

嘉南藥理學院專題研究計畫成果報告	
食物中成分對沙門氏菌 PCR 檢測靈敏度的影響	
計畫編號：CNFH-88-06	
執行日期：87 年 9 月 1 日至 88 年 6 月 30 日	
計畫類別： <input type="checkbox"/> 個別型	<input type="checkbox"/> 整合型
主持人：周隆武	計畫總主持人：
協同研究：	協同研究：
摘要	
<p>本實驗之目的在於藉由 PCR 預期產物的出現與否，探討培養基、食品成分及實驗過程中所使用之藥品殘留於 PCR 反應溶液中的量，其對於 PCR 檢測的抑制效果。實驗中發現溶質含量高的培養基如 BHI 其抑制性高於溶質含量低的培養基如 LB。而培養基成分中以鹽類之抑制性最高。另實驗過程中所使用之藥品以 SDS、phenol 的殘留其抑制性最高。食品中醣類的殘留則以多醣如 starch 的抑制性最高。不同的食品種類均質液殘留則以牛肉之抑制性最高。</p>	
關鍵字：PCR、溶質含量、鹽類、SDS、多醣、牛肉。	
前言	
<p>一般而言，傳統的食品中毒之檢驗方法可分為三個階段，分別是：利用選擇性培養基來增菌培養，適當的鑑別性培養基來分離純化菌落，一連串的相關之生化與微生物測試來確定病原菌。而上述每個階段皆需耗時數天之久，以檢驗沙門氏菌為例，傳統的沙門氏菌檢驗方法則耗時六天⁽¹⁾，由此可知傳統的食品中毒之檢驗方法在今日處處講究時效的社會是緩不濟急的，所以開發更快速更靈敏的快速檢測方法⁽²⁾則是今後必然的趨勢。</p> <p>在眾多之快速檢測方法中，聚合鏈反應法(Polymerase Chain Reaction, PCR)是最適當的選擇之一，因為此方法不但檢測所需時間短，若 DNA 抽取順利，則反應只需數小時即有結果，靈敏度高，已有的報告⁽³⁾指出，只要樣品中目標菌含量在每 C.C 有 10¹ 個以上，即可檢出，而且只要給予其適當的引子(primer)及反應條件，理論上，各種食物中毒菌皆可適用。聚合鏈反應法其優點頗多，但在實際應用時仍須考慮一些因素，一般研究^(4.5.6.7.8.9.10.11)皆將重點放在引子的設計，PCR 反應條件的探討方面，殊不知由於食物的多變化，食品中的某些成分其對 PCR 反應的進行是具有抑制的作用，已有報告指出 cheese 為樣品時，PCR 反應即有抑制現象產生。如此將使 PCR 法的產物減少，連帶使 PCR 法的靈敏度降低，PCR 法的靈敏度降低，則迫使檢驗過程必須增列增菌的階段，如此又使檢驗所需的時間增加，喪失採用 PCR 法的本意。故本研究擬以沙門氏菌為對象，針對食品中的一些成分其對 PCR 法靈敏度的影響加以探討，研究食物中成分對 PCR 法抑制效果的大小，以期克服食品中的某些成分其對 PCR 法的負面作用。</p>	

材料與方法

一、材料

菌株：Salmonella (ST80)

藥品：所有藥品均為試藥級。

二、方法

DNA 溶液的製備：將菌株培養於 20 ml LB 或 BHI 培養基中，於 37°C 培養過夜，將菌液分裝為 0.5 ml 一管，以 7000rpm 離心 10 分鐘，將上層液倒去，加入等體積的去離子水，置於-20°C 下冷凍，待使用時取出反覆解凍冷凍至細胞完全破裂為止。

聚合 鏈反應^(12,13,14)：

取 0.2ml 加入微量離心管(Enppendorf tube)分別加入 10mM 之 dATP, dTTP, dGTP 及 dCTP 各 1 ul, 10XPCR 緩衝液(10mM Tris-HCl,(pH8.3),500mM KCl, 60mM MgCl₂, 0.1%gelatin 和 1%Triton X-100) 5ul, 25 pmoles/ul 的引子 TS₄, TS₁₁ 各 2 ul, 目標菌 DNA 溶液 20 ul, 以蒸餾水使其最終體積為 50ul, 最後在此溶液上滴入 100ul 的礦物油(Mineral oil),加蓋後放入熱循環器(perkin elmer PCR system 2400)中,進行 PCR 反應。其條件如下：先升溫至 94°C,維持 18 分鐘,待剩 3 分鐘時加入 0.4 ul 1.25 unit 的 Taq DNA 聚合 再進行反應,首先 94°C 維持 30sec,再降溫至 55°C,維持 50sec,接著進行延伸(Extension),升溫至 72°C,維持 50 sec,最近一個循環 72°C 維持 2 分鐘。如此擴增目標,共經過 30 個循環,即可進行 PCR 產物之膠體電泳分析。電泳分析係取 10ul PCR 之反應物與 1ul BPB (Bromophennol blue)混合,以 1.8%高純度的洋菜膠進行電泳,PCR 產物分子量判定,則依同時電泳的 marker, 100bp ladder 作為標準分子量之對照組 (MBI Fermentas, USA)。

表一沙門氏菌檢測用之 PCR 引物之序列

primers	sequence	(G+C)%	Tm	location (bp)
TS11	GTCACGGAAGAAGAGAAATCCGTACGG	50	78	26-51
TS4	GCGGATCGTGCAACTGCGGTACGTA	60	76	1180-1204

預估之 PCR 產物大小, TS11/TS4 為 1179 bp.

食品中成分對沙門氏菌 PCR 檢測靈敏度的分析：將不同的培養基如 LB、BHI, 培養基成分如 yeast extract、tryptone、NaCl, 抽取 DNA 方法使用之溶劑如 NaOH、chloroform、phenol、SDS, 食品中之成分如 starch、glucose、sucrose 等之溶液, 及食品の種類如 beef, pork, chicken, 吳郭魚、虱目魚、蝦、雞蛋、千島沙拉、沙拉、牛奶等之十倍均質液加入聚合 鏈反應溶液中作用, 取 10ul PCR 之反應物與 1ul BPB (Bromophennol blue)混合, 以 1.8%高純度的洋菜膠進行電泳。

結果與討論

培養基種類對 PCR 檢測靈敏度的影響：於製備 DNA 溶液時, 菌株由培養基離心時, 會有少許的培養基殘留, 而殘留的量對 PCR 檢測靈敏度的影響

如表一所示。由表二我們可發現 BHI 的量只有 LB 的量的一半，這可能是因為 BHI 的成分(每升含有溶質 64.5 克)較 LB(每升含有溶質 20 克)來的複雜。

表二、培養基殘留量對 PCR 檢測靈敏度的影響

	最低抑制量 ^a (ul)
LB	10 ^b
BHI	2.5 ^b

a：電泳結果 PCR 的預期產物沒有出現。

b：聚合 鏈反應最終體積 50ul 中所含的量。

以 LB 培養基為對象，進一步探討其成分對 PCR 檢測靈敏度的影響：由表三我們發現 NaCl 對 PCR 檢測靈敏度的抑制最強，只要聚合 鏈反應最終體積含有 0.05% 就無法檢出，這推測可能是影響到 Taq DNA 聚合酵素或 DNA 雙股↔單股之間的變化。

表三、LB 培養基成分之殘留對 PCR 檢測靈敏度的影響

	最低抑制量 ^a (%)
Yeast extract	0.4 ^b
tryptone	0.5 ^b
NaCl	0.05 ^b

a：電泳結果 PCR 的預期產物沒有出現。

b：聚合 鏈反應最終體積 50ul 中所含的濃度。

另於一般抽 DNA 時會利用到一些溶劑如 NaOH、chloroform、phenol 等，其殘留亦可能會對 PCR 檢測靈敏度有影響，故本實驗亦探討其對 PCR 檢測的抑制性(表四)。由表四可發現 SDS 對 PCR 檢測正確的抑制性最強，只需 0.002% 即使 PCR 之結果無法檢出，phenol 次之(0.15%)，推測可能是影響到 Taq DNA 聚合酵素之作用。

表四、DNA 抽取過程中所用藥品之殘留對 PCR 檢測靈敏度的影響

	最低抑制量 ^a
NaOH	1mM ^b
chloroform	9 % ^b
phenol	0.15 % ^b
SDS	0.002 % ^b
proteinase K	0.4 % ^b
ice ethanol	1 % ^b
ethanol	5 % ^b

a：電泳結果 PCR 的預期產物沒有出現。

b：聚合 鏈反應最終體積 50ul 中所含的濃度。

因 PCR 快速檢測其理想的狀況是直接從食品中檢測有無目標菌的存在，故本實驗亦探討一些食品常見的醣類成分之殘留與日常食品之殘留對 PCR 檢測靈敏度的影響如表五與表六。

表五、食品中常見的醣類成分之殘留對 PCR 檢測靈敏度的影響

最低抑制量 ^a	
starch	0.5% ^b
glucose	150mM ^b
sucrose	70mM ^b

a：電泳結果 PCR 的預期產物沒有出現。

b：聚合 鏈反應最終體積 50ul 中所含的濃度。

表六、不同食品種類殘留對 PCR 檢測靈敏度的影響

最低抑制量 ^a (ul)	
牛肉	5 ^b
豬肉	10 ^b
雞肉	10 ^b
吳郭魚	15 ^b
虱目魚	10 ^b
蝦	10 ^b
雞蛋	20 ^b
千島沙拉	15 ^b
沙拉	20 ^b
牛奶	15 ^b

a：電泳結果 PCR 的預期產物沒有出現。

b：聚合 鏈反應最終體積 50ul 中所含的食品均質液量。

參考文獻

1. Food and Drug Administration: Bacteriological Analytical Manual 6th ed., 1984. Association of Analytical Chemists, Arlington, USA.
2. Swaminathan, B., J.A.G. and S. Innich, 1985. Enzyme-immunoassays for *Salmonella*: one day testing is now a reality. Food Technol., 39:83-89.
3. Wernars, K., E. Delfgou, P.S. Soentoro and S. Notermans. 1991. Successful approach for detection of low numbers of enterotoxigenic *Escherichia coli* in minced meat by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol., 57:1914-1919.
4. Bej, A.K., R.J. Steffan, J.DiCesare, L. Haff and R.M. Atlas. 1990. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probe. Appl. Environ. Microbiol., 56:307-314.
5. Bej, A.K., J.DiCesare, L. Haff and R.M. Atlas. 1990. Detection of *E. coli* and *Shigella spp.* in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for *uid*. Appl. Environ. Microbiol., 57:1013-1017.
6. Lampel, K.A., J.A. Jagow, M. Trucksess and W.E. Hill. 1990. polymerase chain

- reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food. Appl. Environ. Microbiol., 56:1536-1540.
7. Gannon, Y.P.J., R.K. King, J.Y. Kim and E.J.G. Thomas. 1992. Rapid and sensitive method for detection of shiga-like-toxin producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol., 58:3809-3815.
 8. Karch, H. and T. Meyer. 1989. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 27:2751-2757.
 9. Johnson, W.M., S.D. Tyler, E.P. Ewan, F.E. Ashton, D.R. Pollard, and K.R. Rozee. 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin I in *Staphylococcus aureus* by the polymerase reaction. J. Clin. Microbiol., 29:426-430.
 10. Mahon, J., C.K. Murphy, P.W. Jones and P.A. Barrow. 1994. Comparison of multiplex PCR and standard bacteriological methods of detecting *Salmonella* on chicken skin. Letters in Appl. Microbiol., 19:169-172.
 11. 劉珮如，王添貴，林建谷，潘子明，曾浩洋·1996·應用聚合鏈反應(PCR)方法快速鑑定傷寒桿菌·藥物食品分析，4：65-73·
 12. Tsen, H.Y., M.H. Chen, J.S. Shieh, S.J. Wang and N.T. Hu. 1989. Possible use of a 1.8 kb DNA fragment for the specific detection of *Salmonella* in foods. J. Ferment. Bioeng. 68:1-6.
 13. Tsen, H.Y., S.J. Wang and S.S. Green. 1991. *Salmonella* detection in meat and fish by membrane hybridization with chromogenic/phosphate/biotin DNA probe. J. Food Sci., 56:1519-1523.
 14. 曾浩洋，王淑珍，龔賢鳳，謝峻旭·1994·應用生物素標識三段寡核苷酸探針於食品中沙門氏菌檢測之探討·中國農化會誌，32：-467·