

焦磷酸测序技术在 4 种食源性致病菌快速检测中的应用

赵 新, 王 永*, 兰青阔, 陈 锐, 朱 珠, 余景会, 李欧静, 郭永泽

(天津市农业科学院 中心实验室, 天津 300381)

摘要:为建立一种利用焦磷酸测序技术检测和鉴定沙门氏菌(*Salmonella*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和志贺氏菌(*Shigella*)的方法,通过对 4 种菌毒力靶基因特异性序列的同源性分析,设计出适合焦磷酸测序特异性扩增和测序的引物,摸索出最佳的焦磷酸测序反应体系和反应程序,并建立了 4 种食源性致病菌焦磷酸测序快速检测方法。此方法以传统国标法的前增菌为前提,而省去了后期生化验证的繁琐过程,大大缩短了检测时间,并且其准确性与传统生化验证完全一致,灵敏度可达 10 CFU/mL。结果表明,作者建立的焦磷酸测序检测方法具有高效、快速、精准及操作简便等特点,为食源性致病菌的快速鉴定开辟了广阔的前景。

关键词: 食源性致病菌;焦磷酸测序技术;检测

中图分类号:Q 781 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2013)02—0182—07

Study and Application on Detection of Four Kinds of Food-Borne Pathogenic Bacteria by Pyrosequencing Technology

ZHAO Xin, WANG Yong*, LAN Qing-kuo, CHEN Rui, ZHU Zhu,
YU Jing-hui, LI Ou-jing, GUO Yong-ze

(Central Lab, Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300381, China)

Abstract: The aim of this study was to establish a detection method for identification of food-borne pathogenic bacteria by using pyrosequencing technology. For this, one pair of polymerase chain reaction (PCR) primers and one pyrosequencing sequencing primer of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Shigella cereus* was designed, then the pyrosequencing reaction system and conditions was optimized. the sensitivity of this method was arrived at 10 CFU/mL and has been proven to be highly efficiency, rapid, exact and easy handling. The results provide an informative supplement to fast identified food-borne pathogenic bacteria.

Keywords: food-borne pathogenic bacteria, pyrosequencing technology, detection

收稿日期: 2011-12-11

基金项目: 科技部国际合作项目(2006DFA32380); 天津市农业科学院院长基金项目(08024)。

* 通信作者: 王 永(1977—), 男, 天津人, 理学硕士, 副研究员, 主要从事农产品安全质量分子检测技术方面的研究。

E-mail: wyzl2007@yahoo.com.cn

据世界卫生组织估计,全世界每年有数以亿计的食源性疾病患者中,70%病源是各种致病性微生物。因而,建立一种准确快速的检测致病菌的方法一直是研究的热点^[1-2]。国外针对致病微生物的快速检测,目前主要采用免疫学方法和显色培养基方法以及微生物自动鉴定系统^[3-5]。上述方法的优点就是节省一定的鉴定时间,但缺点也非常明显,免疫学方法的缺点是操作技术性要求高,假阴性高,普及困难;显色培养基的缺点是不稳定,贮存时间短,受外界因素影响大;对于微生物自动鉴定系统,我国还未能生产完全自动化的细菌鉴定仪器设备,而且配套试剂也完全依赖进口。

随着生命科学的飞速发展,各种分子生物学实验技术不断涌现,并且以PCR技术为基础的分子生物学检验技术近年来已经广泛应用于微生物检测领域,但是这些技术仅能提供阳性扩增产物的片段大小信息,且无法显示特异性的基因序列,假阴性和假阳性无法避免,因此不足以提供确证结论。那么,焦磷酸测序(Pyrosequencing)技术是新一代DNA序列分析技术,该技术无须进行电泳,DNA片段也无须荧光标记,从而能够真正达到快速、准确的鉴定病原微生物的目的,且操作极为简便^[6]。

作者旨在利用焦磷酸测序技术建立同步检测和鉴定沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌和志贺氏菌等主要食源性致病菌的快速、简便、灵敏度高的方法,以期克服传统及其他快速致病微生物检测方法的诸多缺点,得到与国标方法一致的检测结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标准菌株

1) 目标菌标准菌株:乙型副伤寒沙门氏菌CMCC(B)50094、甲型副伤寒沙门氏菌CMCC(B)50433、鼠伤寒沙门氏菌CMCC(B)50013;痢疾志贺氏菌CMCC(B)51592、福氏志贺氏菌CMCC(B)51571、鲍氏志贺氏菌ATCC 9207;金黄色葡萄球菌CMCC(B)26003;单增李斯特氏菌CMCC(B)54002共8株常见的危害人和动物的沙门氏菌:作者所在实验室购买标准菌株。菌株复苏后接种于相应的增菌培养基中过夜培养。

2) 非目标菌标准菌株:蜡样芽孢杆菌CMCC

(B)63301,枯草芽孢杆菌CMCC(B)63501,大肠埃希氏菌CMCC(B)44102,铜绿假单胞菌CMCC(B)10104,马红球菌ATCC 6939:作者所在实验室购买标准菌株。菌株复苏后接种于相应的增菌培养基中过夜培养。

1.1.2 主要试剂和仪器 特异性扩增引物和测序引物:上海生工合成;GoTaq® Master Mix 溶液:购自Promega公司;Sepharose Bead、binding buffer、Annealing Buffer、底物、酶和A、C、G、T四种碱基:购自Biotage公司;定量遗传分析仪:购自基因有限公司;PCR扩增仪:ABI Veriti及ABI 2720;凝胶电泳设备:BIO-RAD Power200;凝胶成像系统:SYNGENE公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 通过基因库数据检索网站NCBI、VFDB、KEGG和ClustalW程序分别对沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌和志贺氏菌毒力靶基因序列进行同源性分析,寻找各自适合的特异性序列^[7-8];再应用焦磷酸测序仪配套专业软件设计适合沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌和志贺氏菌的焦磷酸测序特异性扩增和测序引物。

1.2.2 细菌DNA的提取 取选择性增菌后菌液100 μ L,100 $^{\circ}$ C煮菌10 min,立即-20 $^{\circ}$ C冰浴10 min,微型离心机离心2~3 min,上清液即为细菌DNA模板,备用。

1.2.3 PCR反应体系及扩增程序 扩增反应的总体积为50 μ L,其各种成分分别为:2 $\times$ GoTaq® Master Mix 25 μ L,10 μ mol/L引物各1 μ L,模板DNA 2 μ L,用灭菌去离子水补齐至50 μ L;反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性5 min,94 $^{\circ}$ C变性30 s,52 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,循环40次,最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min,4 $^{\circ}$ C保存。

1.2.4 测序单链的制备 将3 μ L链亲和素包被的磁珠和47 μ L的binding buffer混匀,然后加入到50 μ L的PCR产物中,1 300~1 400 r/min室温振荡混匀10~15 min;在PSQ Low反应板中预先加入40 μ L含有0.3 μ mol/L测序引物的Annealing Buffer;在Vacuum prep workstation中进行单链制备,备用。

1.2.5 测序反应体系 反应的总体积约为150 μ L,其中各种成分分别为:PCR产物50 μ L, Sepharose Beads 3 μ L, Binding Buffer 47 μ L (10 mmol/L Tris-HCl, 2 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.1

g/dL Tween20,pH 7.6),10 μ mol/L 测序引物 1.2 μ L, Annealing Buffer 38.8 μ L (20 mmol/L Tris –AC,2 mmol/L MgAC₂,pH 7.6),再根据软件提示在试剂舱相对应位置加入所需的底物,酶和 A、C、G、T。

1.2.6 测序反应程序 沙门氏菌 CTTGACCCGGA AGCCTCCGC;单增李斯特氏菌 ATTCACAAC TGG ATATCTG;金黄色葡萄球菌 TTGATGATTGCCTA TCCCAA;志贺氏菌 AAACGGTCCAGTCG AAGTTC。

1.2.7 引物特异性试验 以目标菌的特异性引物和非目标菌的 DNA 模板构建 PCR 反应体系,进行 PCR 扩增及焦磷酸测序,以鉴定引物设计的特异性。

1.2.8 样品模板惟一性试验 以目标菌的特异性引物和含有目标菌同时也含有其他菌的 DNA 模板构建 PCR 反应体系,进行 PCR 扩增及焦磷酸测定,以证明对样品模板的质量要求。

1.2.9 添加灵敏度对比试验 将 4 种致病菌菌液分别进行 10 倍梯度稀释,筛选出 10⁵、10⁴、10³、10²、10、1、0 CFU/mL 的菌悬液,各取 1 mL 添加于 24 mL 无菌牛奶样本中备用。将上述一系列 25 mL 牛奶样本按照传统国标方法增菌,并进行后期生化鉴定^[9]。

^[2];同时将第一步的增菌液各取 100 μ L,用煮菌法提取模板 DNA,用于 PCR 扩增而后进行焦磷酸测序。

1.2.10 方法验证 为了进一步验证本研究建立的食物源性致病菌焦磷酸测序技术在实际检测中的可用性,应用本研究检测方法对包括鸡肉及制品、牛肉及制品、猪肉及制品、生鲜牛乳、蔬菜等共计 284 份日常实际样品进行了检测,并与国家标准方法的检验结果进行比较。沙门氏菌检验采用国家标准方法 GB 4789.4–2010,单核细胞增生李斯特氏菌检验采用国家标准方法 GB 4789.30–2010,金黄色葡萄球菌检验采用国家标准方法 GB 4789.10–2010,志贺氏菌检验采用国家标准方法 GB/T 4789.5–2003。

2 结果与讨论

2.1 引物设计结果

通过基因库数据检索网站 NCBI BLAST, ClustalW 程序和焦磷酸测序仪配套专业软件分别对沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌和志贺氏菌进行焦磷酸测序特异性扩增引物和测序引物的设计,引物设计情况见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	G+C 含量/%	T _m	片段大小/bp
<i>Salmonella</i> –F1	CTCTGGCAGTACCTTCCTCAGC	59.09	63.80	131
<i>Salmonella</i> –R1	Biotin–GACGGACATCGACAGACGTAA	52.38	59.97	
<i>Salmonella</i> –S1	GCAGTACCTTCCTCAGC	58.82	57.01	
<i>Listeria</i> –F1	Biotin–GAAATCCATCAATCAAAATAATGC	29.17	53.43	68
<i>Listeria</i> –R1	CTGGATATGTTAGGCTCGAAATTG	41.67	58.55	
<i>Listeria</i> –S1	TAGGCTCGAAATTGC	46.67	48.10	
<i>Staphylococcus</i> –F1	Biotin–CACATCAGTAATAGTAGGGGCAAC	45.83	60.26	127
<i>Staphylococcus</i> –R1	GTTTTTTTCGGAATCTGCACTT	36.36	54.48	
<i>Staphylococcus</i> –S1	TGTTCTGAAGCTTGTGC	47.06	52.18	
<i>Shigella</i> –F1	Biotin–GATGAGGCTGTCTCCCGACTTAA	52.17	61.95	94
<i>Shigella</i> –R1	AGTTGTCAGGTAGCGAGGACAGAT	50.00	61.7	
<i>Shigella</i> –S1	GGTAGCGAGGACAGATTT	50.00	55.02	

2.2 PCR 反应扩增结果

扩增反应的总体积为 50 μ L,其各种成分分别为:2×GoTaq® Master Mix 25 μ L,10 μ mol/L 引物各 1 μ L,模板 DNA 2 μ L,用灭菌去离子水补齐至 50

μ L;反应程序:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,循环 40 次,最后 72℃延伸 5 min,4℃保存。取 PCR 产物 5 μ L 用 2 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳,均能得到扩增片段大小的条

带,且空白对照均正常,结果见图1。



M:DL2 000; 1: 沙门氏菌空白对照; 2~4: 沙门氏菌; 5: 金黄色葡萄球菌空白对照; 6~8: 金黄色葡萄球菌; 9: 志贺氏菌空白对照; 10~12: 志贺氏菌; 13: 单核细胞增生李斯特菌属空白对照; 14~16: 单核细胞增生李斯特菌。

图1 4种食源性致病菌PCR扩增产物的电泳分析图谱

Fig. 1 PCR amplification result of four-kinds of food-borne pathogenic bacteria

2.3 焦磷酸测序结果

根据对4种食源性致病菌特异性序列的同源性比对,设计扩增引物和测序引物,通过基因库数据检索网站得到的4种食源性致病菌的已知待测序列分别为:沙门氏菌 CTTGACCCGG AAGCTC CGC;金黄色葡萄球菌 TTGATGATTG CCTATCCCA AA;志贺氏菌 AAACGGTCCA GTCGAAGTTC;单核细胞增生李斯特菌 ATTCACA ACT TGGATATCTG,经本实验方法焦磷酸测序后结果与已知待测序列吻合,结果见图2~5。

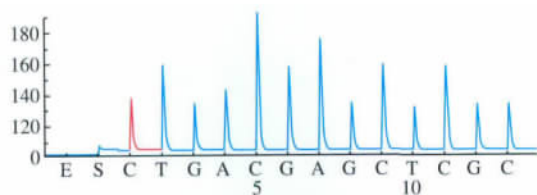


图2 沙门氏菌扩增产物测序结果图

Fig. 2 Result of *Salmonella* spp pyrosequencing

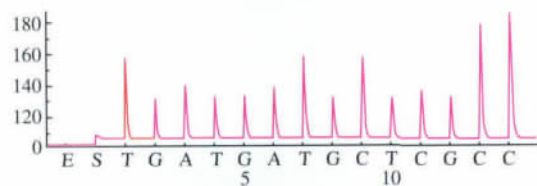


图3 金黄色葡萄球菌扩增产物测序结果图

Fig. 3 Result of *Staphylococcus aureus* pyrosequencing

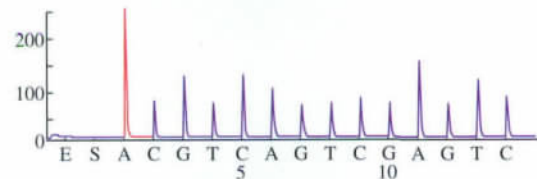


图4 志贺氏菌扩增产物测序结果图

Fig. 4 Result of *Shigella cereus* pyrosequencing

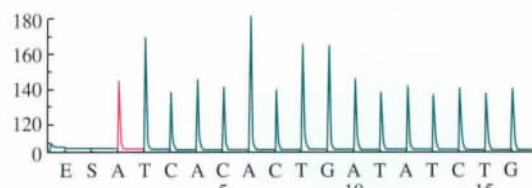


图5 单核细胞增生李斯特菌扩增产物测序结果图

Fig. 5 Result of *Listeria monocytogenes* pyrosequencing

2.4 引物特异性试验结果

以4种食源性致病菌的特异性引物分别与沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌、单核细胞增生李斯特菌的DNA模板以及其他非目标菌的混合DNA模板进行PCR扩增及焦磷酸测序,只有与特异性引物相吻合的DNA模板得到预期扩增片段大小及相应峰型,其余均未得到特异性条带及和已知序列吻合的峰型,由此鉴定了引物设计的特异性,结果见表2。

表2 引物特异性试验

Table 2 Result of specific primers

模板	PCR 扩增结果				焦磷酸测序结果			
	SM	JH	ZH	LST	SM	JH	ZH	LST
沙门氏菌	+	-	-	-	+	-	-	-
金黄色葡萄球菌	-	+	-	-	-	+	-	-
志贺氏菌	-	-	+	-	-	-	+	-
单核增生李斯特氏菌	-	-	-	+	-	-	-	+
其他非目标菌的混合模板	-	-	-	-	-	-	-	-

2.5 样品模板惟一性试验

以沙门氏菌的特异性引物和含有沙门氏菌同时也含有其他菌的DNA模板构建PCR反应体系;以金黄色葡萄球菌的特异性引物和含有金黄色葡萄球菌同时也含有其他菌的DNA模板构建PCR反应体系(其他两种菌同理),进行PCR扩增及焦磷酸测定,均可得到相应目标菌的特异性条带及吻合峰型,由此证明只要样品模板中含有目标菌,就能扩增出特异性条带及吻合峰型,无要求样品进行目标菌的纯培养,只要对样品进行一步目标菌选择性增菌,即可进行PCR扩增和焦磷酸测序,即使含有其他菌也不会影响试验结果,见表3。

2.6 添加灵敏度对比实验结果

4种食源性致病菌的传统国标方法鉴定结果为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 CFU/mL的添加样品均检出,1

CFU/mL 和 0 CFU/mL 的添加样品未检出;焦磷酸测序方法测序结果与为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 CFU/mL 的添加样品均检出,1 CFU/mL 和 0 CFU/mL 的添加样品未检出。由此可见,焦磷酸测序方法基于传统国标法的一步增菌,完全可达到相同的灵敏度,但省去了后期繁琐而费时的生化鉴定步骤,见图 6~9。

表 3 样品模板唯一性试验

Table 3 Result of uniqueness of sample template

模板	PCR 扩增结果				焦磷酸测序结果			
	SM	JH	ZH	LST	SM	JH	ZH	LST
沙门氏菌+其他菌	+				+			
金黄色葡萄球菌+其他菌		+				+		
志贺氏菌+其他菌			+				+	
单核增生李斯特氏菌+其他菌				+				+



图 6 沙门氏菌 PCR 扩增产物的电泳分析图谱

Fig. 6 PCR amplification result of specific primers in *Salmonella spp*

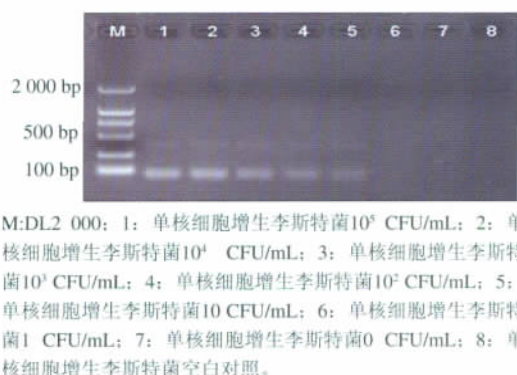


图 7 单核细胞增生李斯特菌 PCR 扩增产物的电泳分析图谱

Fig. 7 PCR amplification result of specific primers in *Listeria monocytogenes*



图 8 金黄色葡萄球菌 PCR 扩增产物的电泳分析图谱

Fig. 8 PCR amplification result of specific primers in *Staphylococcus aureus*

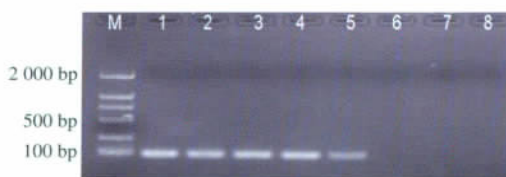


图 9 志贺氏菌 PCR 扩增产物的电泳分析图谱

Fig. 9 PCR amplification result of specific primers in *Shigella cereus*

2.7 方法验证结果

在所检测的 284 份日常实际检测样品中,沙门氏菌检验实际抽取样品 127 份,单核增生李斯特氏菌检验实际抽取样品 87 份,金黄色葡萄球菌检验实际抽取样品 40 份,志贺氏菌检验实际抽取样品 30 份,检测结果见表 4。本研究建立的焦磷酸方法检出的 4 种食源性致病菌的阳性率与传统国标方法检测结果完全一致。

3 结 语

近年来,人们对于食源性致病菌快速检测技术的研究已越来越深入,焦磷酸测序技术目前在国内外、外领域还处于比较前沿和新型的技术手段时期,将该技术应用于食源性致病菌快速检测选择合适的毒力靶基因并设计出特异性扩增引物和测序引物对焦磷酸测序技术至关重要。通过 4 种食源性致病菌特异性保守序列同源性分析,结合焦磷酸实际应用要求,找到适合的特异性扩增片段区域 100~

表4 焦磷酸测序方法验证

Table 4 Method validation for Pyrosequencing method

病原菌	样品数/份	焦磷酸测序方法			国家标准方法		
		阳性/份	阴性/份	阳性率/%	阳性/份	阴性/份	阳性率/%
沙门氏菌	127	4	123	3.1	4	123	3.1
单核增生李斯特氏菌	87	1	86	1.1	1	86	1.1
金黄色葡萄球菌	40	7	33	17.5	7	33	17.5
志贺氏菌	30	1	29	3.3	1	29	3.3
合计	284	13	271	4.6	13	271	4.6

200 bp, 以及在此区域内4种食源性致病菌符合测序要求20 bp左右的变异区域或位点, 利用专业软件得到特异性扩增引物和测序引物, 并在扩增引物的上游或下游引物标记链亲和素包被的磁珠用于后期单链制备。

单链制备在焦磷酸测序过程中也是关键步骤之一, 且通过实际试验发现链亲和素包被的磁珠的充分吸附对试验结果影响明显, 所以选用平底96孔板作为磁珠孵育及抓取底板, 方法改进后效果明

显。

作者建立的焦磷酸测序方法是将微生物检测基于分子水平的研究, 且实现了在基因水平上对致病微生物进行最本质的序列分析及鉴定^[13-14]。该方法通过对284份日常实际检测样品的验证不仅与传统国标方法检测结果一致, 而且还具备准确、快速、操作简便和实时检测等优点, 可以很好的杜绝假阳性及假阴性结果的产生, 为食源性致病菌的快速鉴定开辟了广阔的前景^[15-17]。

参考文献:

- [1] 刘家发, 朱建如. 食品安全存在的问题及对策[J]. 公共卫生与预防医学, 2005, 16(6): 35-38.
LIU Jia-fa, ZHU Jian-ru. Food safety problems and countermeasures[J]. *J of Pub Health and Prev Med*, 2005, 16(6): 35-38. (in Chinese)
- [2] Barbara M L, Tony C B, Grahame W G. The microbiological safety and quality of food [M]. **Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen publishers**, 2000: 374-886.
- [3] Jin S Q, Yin B C, Ye B C. Multiplexed bead-based mesofluidic system for detection of food-borne pathogenic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(21): 6647.
- [4] 曹玮, 王明忠, 王晓英, 等. 核酸检测及相关技术在食源性致病菌快速检测中的研究[J]. 卫生研究, 2008, 37(2): 45-48.
CAO Wei, WANG Ming-zhong, WANG Xiao-ying, et al. Studies on rapid detection of food-borne pathogenic bacteria by nucleic acid testing and related technology[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2008, 37(2): 45-48. (in Chinese)
- [5] Groundwater P W, Todd A, Worsley A J, et al. The technology and techniques used in the detection of pathogenic bacteria[J]. *Pharmaceutical Journal*, 2009, 283(7569): 281-282.
- [6] 陈之遥, 周国华. 焦测序技术的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(8): 1573-1598.
CHEN Zhi-yao, ZHOU Guo-hua. Advances in pyrosequencing[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2008, 8(8): 1573-1598. (in Chinese)
- [7] 李峰, 管宇. 应用16S rRNA基因测序法鉴定兔支气管败血波氏杆菌的研究[J]. 疾病防治, 2008, 1(1): 22-28.
LI Feng, GUAN Yu, SHEN Zhi-qiang, et al. Study of bordetella bronchiseptic strain identified by 16S rRNA gene sequencing[J]. *Chinese Journal of Rabbit Farming*, 2008, 1(1): 22-28. (in Chinese)
- [8] 徐晓可, 吴清平. 食品中金黄色葡萄球菌多重PCR检测方法的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 30(1): 84-89.
XU Xiao-ke, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei, et al. Studies on detection of staphylococcus aureus in foods by multiplex PCR[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 30(1): 84-89. (in Chinese)
- [9] GB 4789.4-2010, 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].

- [10] GB 4789.30-2010, 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S].
- [11] GB 4789.10-2010, 金黄色葡萄球菌检验[S].
- [12] GB 4789.5-2003, 食品微生物学检验 志贺氏菌检验[S].
- [13] 徐保红, 李秀娟. PCR-焦磷酸测序法快速鉴定副溶血性弧菌[J]. 预防医学情报杂志, 2011, 27(1): 78-80.
XU Bao-hong, LI Xiu-juan, YANG Fang, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR and Pyrosequencing[J]. **Journal of Preventive Medicine Information**, 2011, 27(1): 78-80. (in Chinese)
- [14] 公衍文, 任绪义. 焦磷酸测序法鉴定临床常见病原菌[J]. 重庆学报, 2010, 39(22): 3009-3010.
GONG Yan-wen, REN Xu-yi, HU Cheng-jin. Identification of clinical common pathogenic by pyrosequencing [J]. **Chongqing Medical**, 2010, 39(22): 3009-3010. (in Chinese)
- [15] Baback Gharizadeh, Biying Zheng, Michael Akhras, et al. Sentinel-base DNA genotyping using multiple sequencing primers for high-risk human papillomaviruses[J]. **Molecular and Cellular Probes**, 2006, 23: 1-9.
- [16] 汪维鹏, 武海萍, 周国华. 焦测序法检测禽流感病毒[J]. 分析化学研究报告, 2008, 36(6): 775-780.
WANG Wei-peng, WU Hai-ping, ZHOU Guo-hua. Detection of the bird flu virus by pyrosequencing [J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2008, 36(6): 775-780. (in Chinese)
- [17] Ruth Ann Luna, Lea R. Fasciano, et al. DNA Pyrosequencing-based bacterial pathogen identification in a pediatric hospital setting[J]. **American Society for Microbiology**, 2007, 45(9): 2985-2992.

科 技 信 息

卫生部关于批准茶树花等 7 种新资源食品的公告

根据《中华人民共和国食品安全法》和《新资源食品管理办法》有关规定, 卫生部现批准茶树花、盐地碱蓬籽油、美藤果油、盐肤木果油、广东虫草子实体、阿萨伊果和茶藨子叶状层菌发酵菌丝体为新资源食品。生产经营上述食品应当符合有关法律、法规、标准规定。

[信息来源] 中华人民共和国卫生部. 卫生部关于批准茶树花等 7 种新资源食品的公告(卫生部公告 2013 年第 1 号) [EB/OL]. (2013-1-4). <http://www.moh.gov.cn/mohwsjdj/s7891/201301/54a35d82b99b48a8bcfd6cf183dee0f3.shtml>.

欧盟食品安全机构就阿斯巴甜开展公众评议

2013 年 1 月 9 日消息, 欧盟食品安全局(EFSA)在对 2010 年甜味剂与健康状况的关系进行研究后, 于 8 日就阿斯巴甜(Aspartame)的安全性开展了公众评议。

2011 年 5 月, 新公布的科学研究显示阿斯巴甜对孕妇有负面影响, 且会增加癌症风险后, 欧盟委员会要求欧盟食品安全监督机构(EFSA)对阿斯巴甜进行一个全面的重估。

意大利肿瘤学家 Morando Soffritti 在 2010 年公布了一份备受争议的研究, 表明若老鼠在日常生活中受到化学甜味剂暴露, 将增加其患肝脏和肺部癌症的风险。冰岛研究员 Thorhallur Halldorsson 于同年开展的一项涉及 6 万名孕妇的流行病学研究发现, 摄入人工甜味剂软饮料与增加早产发生率存在相互联系。这两项研究导致欧洲议会议员要求重新评估产品的安全性。

自 1994 年欧盟授权使用阿斯巴甜后, 它已经被重新评估了五次。作为欧盟对所有授权食品添加剂进行系统性重估的一部分, 下一次对化学甜味剂的评估预计为 2020 年。

从 20 世纪 80 年代开始, 世界各地的监管机构已对阿斯巴甜的安全性进行了评估。然而, 这是 EFSA 提出的首次全方位评估阿斯巴甜。

在 EFSA 的阿斯巴甜安全性意见草案中, 其科学家得出结论, 消费者在日常暴露水平下不会造成毒性影响。

目前, 低于阿斯巴甜每日容许摄入量水平被认为对普通人群和消费者是安全的。唯一的例外为, 患有苯丙酮尿症(phenylketonuria)的病人应使用更少量的甜味剂。

所有利益相关方可在 2013 年 2 月 15 日之前在线提交有关 EFSA 意见草案的评议意见。此后, EFSA 将与利益相关方举行会议讨论这些反馈意见。

[信息来源] WTO 检验检疫信息网. 欧盟食品安全机构就阿斯巴甜开展公众评议 [EB/OL]. (2013-1-14). <http://www.wtoicq.gov.cn/wto1/show.jsp?cid=261&aid=39416>.