

应用双重 Real-time PCR 同步定量检测食品中的副溶血性弧菌及金黄色葡萄球菌

蒋鲁岩¹ 蔡潭溪¹ 邵景东² 徐邦兴³ 陈溥言¹

(1. 南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095; 2. 张家港出入境检验检疫局,江苏 张家港 215633; 3. 盐城出入境检验检疫局,江苏 盐城 224002)

摘要:为同时测定食品中的副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌,建立了基于 TaqMan 探针的双重 Real-time PCR 方法。针对副溶血性弧菌的 *gyrB* 基因序列和金黄色葡萄球菌 *coa* 基因序列分别设计引物和 TaqMan 探针,建立双重 Real-time PCR 检测体系,制作校正曲线,同步定量检测副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌。建立的双重 Real-time PCR 方法对 2 种细菌菌液的检测灵敏度均低于 10 CFU/PCR 反应体系,相关系数均为 1.00,整个试验可在 2 h 内完成。建立的方法可用于食品中副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的快速、同步、定量检测。

关键词:弧菌;副溶血性;葡萄球菌;金黄色;聚合酶链反应;TaqMan 探针

Duplex Real-Time PCR for Quantitative Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus* in Foods

JIANG Lu-yan, CAI Tan-xi, SHAO Jing-dong, XU Bang-xing, CHEN Pu-yan
(Nanjing Agricultural University, Jiangsu Nanjing 210095, China)

Abstract: A duplex Real-time PCR assay for quantitative detection of *V. parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus* was presented. The primers and probe were designed according to the *gyrB* gene sequence of *V. parahaemolyticus* strains and the *coa* gene sequence of *S. aureus* strains, respectively. The sensitivity of the assay was less than 10 CFU per PCR Mixture, and the correlation rate was 1.0 ($r^2 = 1.0$). The assay could be completed within 2 h. The assay presented here can be used as a rapid screening tool for simultaneous and quantitative detection of *V. parahaemolyticus* and *S. aureus* in foods without the need of preisolation and characterization of the bacteria by traditional microbiological methods.

Key word: *Vibrio parahaemolyticus*; *Staphylococcus aureus*; Polymerase Chain Reaction; TaqMan Probes

食品中的副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌威胁人的健康,检查食品中的副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌及数量具有重要的实际意义。国际标准化组织一般采用传统的微生物定量方法如平板记数和 MPN(most-probable-number)方法对食品中的副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌进行检测,这些技术往往需要 6 d 的时间才能完成检测和定量。国内外现有诸多针对副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌毒素的 PCR 方法,这些方法虽然敏感性和特异性比较高,但需要进行 PCR 后处理,增加了交叉污染的可能性,并且不能对细菌进行定量检测^[1]。荧光定量 PCR 技术根据荧光能量传递原理,融合了 PCR 技术的高效性、探针技术的高特异性、光谱技术的高敏感性和高精度性等优点,可直接探测 PCR 过程中荧光信号的变化获得定量结果,利用不同的荧光染料对探针

进行标记,达到同时检测 2 种或更多种细菌的目的^[2]。本文旨在建立一种基于 TaqMan 探针的双重 Real-time PCR 方法^[3],同步、定量检测食品中的副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌。

1 材料和方法

1.1 菌株 10 株副溶血性弧菌、9 株金黄色葡萄球菌以及 9 株阴性对照细菌分别购于上海市疾病预防控制中心、江苏省疾病预防控制中心和北京市药检所。菌株及编号见表 1。

1.2 培养基 碱性蛋白胨水(APW)、胆盐琼脂、硫代硫酸盐-枸橼酸盐-胆盐-蔗糖培养基(TCBS)、胰蛋白大豆肉汤(TSB)、贝尔德-帕克培养基(Baird-Parker Agar Base)、其它细菌的增菌培养基(LB)均购于北京陆桥公司;柯玛嘉弧菌显色培养基购于德国默克公司。

作者简介:蒋鲁岩 男 高级工程师

通讯作者:陈溥言 男 教授

表 1 菌株及编号

菌株	编号	菌株	编号
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC17802	<i>S. aureus</i>	自备菌株
<i>V. parahaemolyticus</i>	20553	<i>S. aureus</i>	自备菌株
<i>V. parahaemolyticus</i>	20562	<i>S. aureus</i>	自备菌株
<i>V. parahaemolyticus</i>	20568	<i>S. aureus</i>	自备菌株
<i>V. parahaemolyticus</i>	20570	<i>S. aureus</i>	自备菌株
<i>V. parahaemolyticus</i>	20571	<i>V. mimicus</i>	91 - 8
<i>V. parahaemolyticus</i>	20572	<i>V. alginolyticus</i>	91 - 1
<i>V. parahaemolyticus</i>	自备菌株	<i>S. hemolyticus</i>	32209
<i>V. parahaemolyticus</i>	自备菌株	<i>S. hemolyticus</i>	32210
<i>V. parahaemolyticus</i>	自备菌株	<i>V. vulnificus</i>	91 - 4
<i>S. aureus</i>	ATCC 12598	<i>E. coli</i>	ATCC 25922
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538P	<i>Salmonella</i>	ATCC1 4028
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	<i>Mono listeria</i>	ATCC 7644
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923		

1.3 主要试剂和仪器 TaKaRa TaqTM PCR 试剂盒, TaKaRa 公司;细菌基因组 DNA 抽提试剂盒, TaKaRa 公司;柯达数码凝胶成像系统,美国 KODAK 公司; iCycler, Bio-Rad 公司; VITEK32 细菌鉴定仪, 生物梅里埃公司。

1.4 引物和 TaqMan 探针的设计和合成 根据 GeneBank 公布的副溶血性弧菌 *gybB* 基因序列 (Accession number: AY527390) 及金黄色葡萄球菌的 *coa* 基因序列 (Accession number: AL306908) 中的保守区域用软件 Oligo 6.0 设计分别一对引物, 针对引物之间的基因片段, 利用 Primer Express (1.0, PE Applied Biosystem) 设计 TaqMan 探针, 交由上海生物工程公司合成, 引物和探针序列如下。

Primer VP-1: 5'-TGAAAGGTTTACTGCCGTTGF-3

Primer VP-2: 5'-TGGGTTTCGACCAAGAAGTCA-3

VP-Probe: 5'-FAM-TTCTCACCCATCGCCGATTCAA CCGC-TAMARA3

Primer SA-1: 5'-AAACAGACCACTCTTAAACCGATA-3

Primer SA-2: 5'-AGCTACTTTCAGACCTTCTAAAA TAGG-3

SA-probe: 5'-HEX-TATACTCAACCGACGACACCGA A-TAMARA3

1.5 细菌记数方法和分离鉴定 取每个稀释度的细菌纯培养液或样品匀浆均匀涂布于 3 个平板 (200 μ l/板, 副溶血性弧菌为 TCBS 平板, 金黄色葡萄球菌为 Baird-Parker 平板), 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 在 3 块平板上点数特征性菌落, 取平均值。挑取单个特征性菌落, 利用生物梅里埃公司 VITEK32 细菌鉴定系统进行副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌鉴定。

1.6 Real-time PCR

1.6.1 试样的准备及 DNA 的提取 取 25 g 样品和 225 ml 的缓冲蛋白胨 (BPW) 溶液加入无菌 BagFilter

试样袋中, 于 BagMixer 拍击式匀浆机中均匀拍击 60 s, 然后收集试样溶液。为防止食品成分对 PCR 反应的抑制, 将试样于 4 $^{\circ}$ C 5700 \times g 离心 15 min, 弃脂质层和水相层; 用 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.5) 洗涤沉淀 3 次, 然后按 Takara 基因组 DNA 抽提试剂盒说明书进行制备, 通过蛋白核酸分析仪测定 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值来确定 DNA 的纯度。

1.6.2 PCR 扩增 PCR 扩增反应在 iCycler 上进行, 反应体系 (30 μ l): 不同浓度的模板 DNA 各 2 μ l, 10 \times TaqMan 缓冲液 3 μ l, 5 mmol/L MgCl₂ 4 μ l, 25 mmol/L dNTP Mixture 2 μ l, 0.25 μ mol/L TaqMan 探针 1 μ l, 0.5 μ mol/L 引物各 1 μ l, 5 U/ μ l UNG 酶 0.1 μ l, 5 U/ μ l Taq 聚合酶 0.5 μ l, 超纯水 11.4 μ l。置于 iCycler 上进行, 反应参数如下: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 40 个循环。PCR 结束后, PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.7 校正曲线制作 取副溶血性弧菌纯培养液和金黄色葡萄球菌纯培养液各 1 ml, 10 倍梯度稀释至终浓度 1.0 $\times 10^3$ CFU/ml 到 1.0 $\times 10^7$ CFU/ml, 按上述步骤提取基因组 DNA 作为模板, 同时加入同一反应管进行定量扩增, 制作校正曲线。

1.8 干扰实验 将相当于 10 CFU/ μ l 副溶血性弧菌或金黄色葡萄球菌的基因组 DNA 与 3 μ l 阴性对照菌 (8 株) 的基因组 DNA 混合, 作为模板进行定量 PCR 扩增。

1.9 人工染菌样品中副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的定量检测 分别取 25 g 无菌龙虾肉和熟牛肉按上述步骤制成试样溶液; 然后分别用缓冲蛋白胨水 10 倍梯度稀释碱性蛋白胨纯培养的副溶血性弧菌 ATCC 17802 和胰蛋白胨肉汤纯培养的金黄色葡萄球菌 ATCC 12598, 按上述方法对每个稀释度的

菌液进行细菌记数;每个稀释度各取 1 ml 分别加入 9 ml 试样溶液中进行人工染菌,取 3 个稀释度各 1ml 人工染菌的试样溶液提取 DNA 进行定量检测。

1.10 食品样品中副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的定量检测 从市场上抽取海虾仁、牡蛎、鲜牛肉、熟食制品共 150 份;从南京某奶牛场抽取 50 份生牛奶,以生产的原始包装放在塑料袋中或高压灭菌的 250 ml 锥型瓶,保持温度 3~5℃,于 2 h 内送达实验室。按上述步骤进行试样准备和 DNA 提取,作 PCR 定量检测。

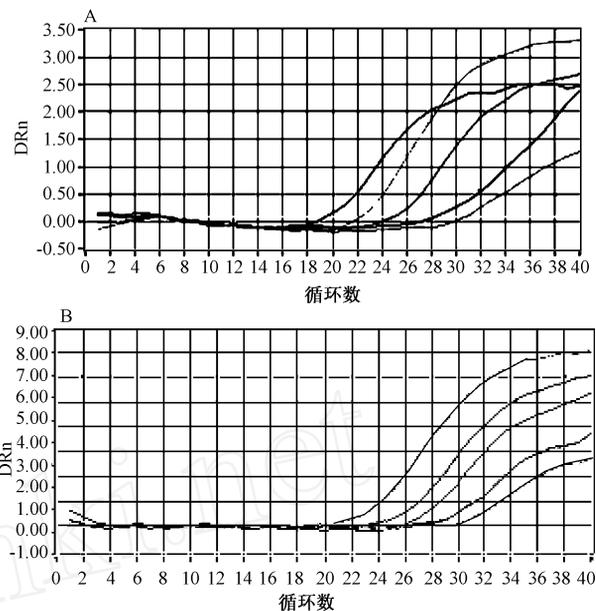
2 结果

2.1 Real-time PCR 的特异性和敏感性 定量 PCR 的结果显示,10 株副溶血性弧菌和 9 株金黄色葡萄球菌均能产生 S 型扩增曲线,而其它阴性对照菌均不能产生 S 型扩增曲线。扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析与 Real-time PCR 一致,进一步证实了本试验的特异性。将纯培养副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌 10 倍梯度稀释至终浓度 1.0×10^3 、 1.0×10^4 、 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 CFU/ml 的进行定量扩增。反应由 iCycler 定量 PCR 仪自动控制,结束后由分析软件进行数据分析。扩增曲线见图 1,校正曲线见图 2。本试验敏感性高,对细菌的定量检测均低于 10 CFU/PCR 反应体系。循环阈值(C_t 值)和初始细胞数的对数相关性好,相关系数为 1.0,副溶血性弧菌初始细胞数与 C_t 值之间的线性关系表达式为 $y = -3.09x + 42.83$,金黄色葡萄球菌为 $y = -2.92x + 43.23$ 。

2.2 干扰实验 DNA 混合液的定量检测结果与副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的纯基因组 DNA 检测结果一致。

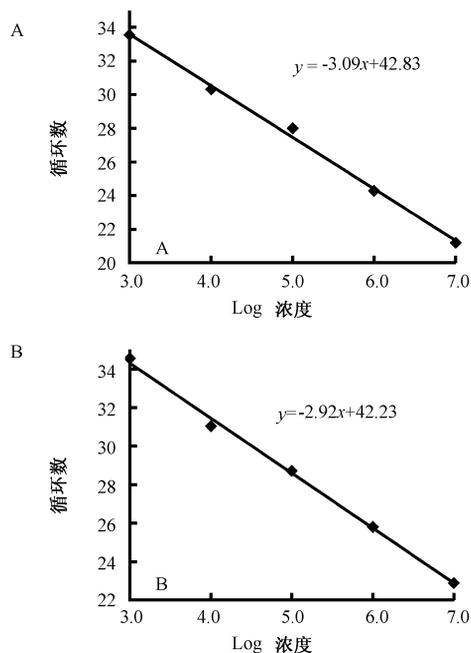
2.3 人工染菌样品副溶血弧菌和金黄色葡萄球菌 DNA 的检测 分别将纯培养的副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌人工染菌至经 BagMixer 拍击式匀浆机处理的龙虾均质溶液中,分别取 1 ml 做细菌记数和 PCR 定量检测,定量结果见表 2。人工染菌的龙虾肉中副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的 Real-time PCR 和平板计数定量结果相关系数分别为 0.992 5 和 0.992 2;熟牛肉为 0.998 9 和 0.980 2。Real-time PCR 和平板计数定量结果相关性良好。

2.4 食品中副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的定量检测结果 用 Real-time PCR 和选择性增菌后平板记数方法检测 200 份样品,定性结果见表 3,定量结果见表 4。副溶血性弧菌阳性检出率 Real-time PCR 方法为 9%,培养方法为 8%,利用配对计数资



A. 1.0×10^3 、 1.0×10^4 、 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 CFU/ml 的副溶血性弧菌基因组 DNA 定量扩增曲线。
B. 1.0×10^3 、 1.0×10^4 、 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 CFU/ml 的金黄色葡萄球菌基因组 DNA 定量扩增曲线。

图 1 双重 Real-time PCR 扩增曲线



A. 1.0×10^3 、 1.0×10^4 、 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 CFU/ml 的副溶血性弧菌基因组 DNA 定量扩增校正曲线。
B. 1.0×10^3 、 1.0×10^4 、 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 CFU/ml 的金黄色葡萄球菌基因组 DNA 定量扩增校正曲线。

图 2 双重 Real-time PCR 校正曲线

料² 检验分析表明,Real-time PCR 方法和传统的培养方法定性检测结果呈差异不显著性($\chi^2 = 0.06$, $P > 0.05$)。但发现 9 份样品副溶血性弧菌培养方法阳性,通过对培养方法阳性,PCR 方法阴性的 6 份

龙虾肉和 1 份牛奶的进一步检验(包括 VITEK32 细菌鉴定仪鉴定)证实为培养方法假阳性。金黄色葡萄球菌阳性检出率 Real-time PCR 方法为 15%,培养方法为 12.5%,配对计数资料²检验分析同样表明两种方法定性检测结果差异呈不显著性($\chi^2 = 0.125, P > 0.05$)。但 3 份样品金黄色葡萄球菌培养方法假阴性。定量结果统计学分析表明,副溶血性

弧菌和金黄色葡萄球菌平板记数方法和 Real-time PCR 方法定量结果均呈显著相关,相关系数分别为 0.980 和 0.992。配对 T 检验表明,Real-time PCR 方法副溶血性弧菌检测敏感性高于平板记数方法($t = 3.559, P < 0.05$),金黄色葡萄球菌两种方法差异无显著性($t = 1.897, P > 0.05$)。

表 2 人工染菌样品中副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的定量检测结果

CFU/ml

人工染菌样品 (龙虾肉)	副溶血性弧菌		金黄色葡萄球菌	
	Real-time PCR 方法	平板记数法	Real-time PCR 方法	平板记数法
1	1.3×10^8	3.0×10^7	5.0×10^7	2.6×10^7
2	7.4×10^6	4.3×10^6	8.0×10^6	1.9×10^6
3	4.6×10^5	2.2×10^5	5.2×10^5	3.0×10^5
4	4.0×10^4	3.0×10^4	4.0×10^4	2.1×10^4
5	9.2×10^3	2.0×10^3	7.0×10^3	1.3×10^3
6	3.8×10^2	3.5×10^2	4.3×10^2	3.0×10^2
7	8.0×10	2.0×10	7.0×10	2.5×10

人工染菌样品 (熟牛肉)	副溶血性弧菌		金黄色葡萄球菌	
	Real-time PCR 方法	平板记数法	Real-time PCR 方法	平板记数法
1	8.4×10^7	2.5×10^7	9.0×10^7	1.9×10^7
2	8.6×10^6	3.4×10^6	6.3×10^6	4.0×10^6
3	5.2×10^5	3.8×10^5	3.8×10^5	2.5×10^5
4	2.2×10^4	2.9×10^4	4.0×10^4	1.5×10^4
5	2.2×10^3	3.8×10^3	6.1×10^3	4.0×10^3
6	1.5×10^2	2.9×10^2	3.2×10^2	2.0×10^2
7	7.0×10	3.6×10	9.0×10	4.0×10

表 3 食品中副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的阳性检测率

%

样 品	副溶血性弧菌		金黄色葡萄球菌	
	Real-time PCR 方法	培养方法	Real-time PCR 方法	培养方法
龙虾肉	7.5 (3/50)	18.0 (9/50)	8.0 (4/50)	8.0 (4/50)
牡蛎	25.0 (10/40)	7.5 (3/40)	12.5 (5/40)	10.0 (4/40)
鲜牛肉	3.3 (1/30)	0.0 (0/30)	13.3 (4/30)	13.3 (4/30)
熟食制品	13.3 (4/30)	10.0 (3/30)	16.7 (5/30)	6.7 (2/30)
鲜奶	0.0 (0/50)	2.0 (1/50)	26.0 (13/50)	26.0 (13/50)

注:括号中分子为阳性份数,分母为检测总份数。

表 4 食品中副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的定量检测结果

CFU/ml^a

样 品	副溶血性弧菌		金黄色葡萄球菌	
	Real-time PCR 方法	平板记数法	Real-time PCR 方法	平板记数法
龙虾肉	$4.7 \times 10^3 \pm 3.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3 \pm 9.0 \times 10$	$2.3 \times 10^3 \pm 5.0 \times 10$	$7.9 \times 10^2 \pm 2.1 \times 10$
牡蛎	$3.6 \times 10^3 \pm 2.9 \times 10$	$8.6 \times 10^2 \pm 3.0 \times 10$	$4.9 \times 10^2 \pm 2.3 \times 10$	$2.6 \times 10^2 \pm 4.2 \times 10$
鲜牛肉	4.3×10^3	1.1×10^3	$3.2 \times 10^3 \pm 1.5 \times 10^2$	$2.9 \times 10^2 \pm 3.0 \times 10$
熟食制品	$7.3 \times 10^2 \pm 4.0 \times 10$	$2.5 \times 10^2 \pm 3.0 \times 10$	$2.6 \times 10^3 \pm 3.1 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3 \pm 5.2 \times 10$
鲜奶	0	0	$1.9 \times 10^4 \pm 3.6 \times 10^2$	$9.3 \times 10^3 \pm 3.0 \times 10^2$

注: a 表示平均值 ±标准偏差

3 讨论

加强对副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的检测力度,特别是进行定量检测,对预防和控制金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌引发的食物中毒有重要的意义。本研究利用 iCycler 多通道激发光源,多个滤光片的检测体系建立了同步定量检测副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的双重 Real-time PCR 方法。整个反应过程是由 iCycler 定量 PCR 仪自动控制并进行结果分析,与常规 PCR 相比,避免了 PCR 后续步骤,减少了产物污染的机会。试验快速、准确,整个反应 2 h 内可完成。

gybB 基因是副溶血性弧菌 DNA 复制所必需的,具有副溶血性弧菌种特异性。金黄色葡萄球菌 *coa* 基因编码的凝固酶可使血浆凝固,是鉴定致病性金黄色葡萄球菌的重要指标。两者均为单拷贝基因,具有设计 PCR 引物的保守区域;将设计的引物和 TaqMan 探针与 GeneBank 中的核苷酸序列进行同源性比对发现本试验设计的引物和探针具有很高的特异性。特异性试验结果同样证实本试验建立的 Real-time PCR 方法可用于副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的同步检测。

敏感性试验表明双重 Real-time PCR 方法对 2 种细菌菌液的检测敏感度均低于 10 CFU/PCR 反应体系。考虑到在实际过程中,很多因素如食品中的某些成分或杂菌等可能影响检测结果,因此,我们增加了食品样品的处理步骤,并做了干扰试验。结果表明,经过处理的食品的成分以及杂菌 DNA 不影响双重 Real-time PCR 的检测灵敏度。为了进一步验证双重 Real-time PCR 方法在实际食品检测中的可行性,我们利用已知浓度的副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌人工染菌至龙虾肉和熟牛肉,并进行定量检测。检测结果和统计学分析表明,Real-time PCR 和平板计数法定量结果相关性良好,且有较高的可重复性。相对平板计数方法,Real-time PCR 方法具有较高敏感性。敏感性差异的原因一方面可能是副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌在繁殖过程中形成簇状,当涂布到平板上时,由于没有充分的分离,导致 1 个菌落中包含多个细菌,另一方面,TCBS 平板对副溶血性弧菌具有部分抑制作用。本试验建立的双重 Real-time PCR 方法可用于实际样

品的检测,且定量敏感性高于传统的平板记数方法。

对食品(200份)的实际检测及对结果进行统计学分析表明,培养方法与 Real-time PCR 方法定性检测结果差异不显著。但副溶血性弧菌培养方法有假阳性。副溶血性弧菌与创伤弧菌之间的同源性很高,导致副溶血性弧菌培养方法假阳性是造成差异显著的原因。定量结果表明 Real-PCR 方法检测灵敏度高于平板记数方法。除了上述造成差异的原因之外,在实际的食品中,由于部分副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌是死细菌或因应激而进入活的但不可培养状态(viable but non-culturable state, VBNC)。VBNC 是细菌的休眠状态,常规方法培养不能使其生长繁殖,但仍然是一种特殊的存活形式,在合适的条件下,可恢复可培养性和致病性^[4]。因为 Real-time PCR 检测的是细菌基因组 DNA,因此相比较于传统平板记数法,具有更高的敏感性和定量的准确性。

综上所述,本试验建立的基于 TaqMan 探针的双重 Real-time PCR 方法,可同步、定量检测食品中的副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌,与传统的平板记数法相比,具有更加省时、操作简便和定量准确等优点,对各类食品中副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌的监控检测有着重要的价值。

参考文献

- [1] K Wernars, C J Heuvelman, T Chakraborty, et al. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Lister monocytogenes* in Soft Cheese [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1991, 70: 121-126.
- [2] Livak K J, Flood S J A. Oligonucleotides with fluorogenic dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization [J]. *PCR Methods and Applications*, 1995, 4: 357-362.
- [3] Higuchi R, Dollinger G. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequence [J]. *Biotechnology*, 1992, 10: 413-417.
- [4] 刘端. 细菌“活的非可培养状态”研究进展 [J]. *疾病检测*, 1998, 13 (9): 350-354.

[收稿日期: 2006-02-16]

中图分类号: R15; R378.11; R378.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2006)03-0205-05