

## 实验技术与方法

## 单核细胞增生李斯特菌质粒 DNA 参考物质的研制

蒲泽南<sup>1</sup>, 林晓峰<sup>1</sup>, 袁暮云<sup>2</sup>, 努色热提·阿布都沙拉木<sup>1</sup>, 许龙岩<sup>2</sup>, 陈瑶<sup>1</sup>

(1. 南方医科大学检验与生物技术学院, 广东 广州 510515;

2. 广州海关检验检疫技术中心, 广东 广州 510623)

**摘要:**目的 研制一种能够用于快速鉴定单核细胞增生李斯特菌(以下简称单增李斯特菌)的质粒 DNA 标准物质。方法 设计一种质粒 DNA 包含目前常用于单增李斯特菌检测的 *hlyA*、*plcB*、*inlA* 基因, 并对其稳定性、均匀性和量值可追溯性进行评价。评估其在实时定量聚合酶链式反应(PCR)检测中的适用性。结果 质粒 DNA 参考物质的最终定值结果为 29.85 μg/mL。该质粒 DNA 参考物质量值可靠, 均匀性和稳定性良好, 可以在-20℃下保存1年以上。质粒 DNA 参考品在实时荧光 PCR 检测中的适用性证明, 可以保证实时定量 PCR 检测结果与单增李斯特菌基因组 DNA 参考品具有可比性。结论 研制的质粒 DNA 标准物质可以替代单增李斯特菌基因组 DNA 对单增李斯特菌进行质量监控, 满足单增李斯特菌检测在实验室质量的有效控制和试验方法验证的需要。

**关键词:**单核细胞增生李斯特菌; 合成质粒标准品; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2021)03-0279-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2021.03.007

Preparation of plasmid DNA reference material for *Listeria monocytogenes*PU Zenan<sup>1</sup>, LIN Xiaofeng<sup>1</sup>, YUAN Muyun<sup>2</sup>, Nusereti·Abudushalamu<sup>1</sup>,XU Longyan<sup>2</sup>, CHEN Yao<sup>1</sup>

(1. School of Laboratory and Biotechnology, Southern Medical University, Guangdong Guangzhou 510515, China; 2. Inspection and Quarantine Technology Center (IQTC), Guangdong Guangzhou 510623, China)

**Abstract: Objective** To develop a plasmid DNA reference material for rapid and comprehensive identification of *Listeria monocytogenes*. **Methods** The synthetic DNA fragment contained the *hlyA*, *plcB* and *inlA*, which were currently used for the detection of *Listeria monocytogenes*, was cloned into vector PUC57 to construct the plasmid reference material (pDNA *Listeria*). The quantity, homogeneity and stability of pDNA *Listeria* were evaluated by ultraviolet spectrophotometry (UV). real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to evaluate the applicability of pDNA *Listeria*. **Results** The results showed that the fixed value of pDNA *Listeria* was 29.85 μg/mL, which had traceable values, reliable homogeneity and good stability. The pDNA *Listeria* could be stored at -20℃ for more than one year. The pDNA *Listeria* also provided comparable sensitivity and reliability to the genomic references material. **Conclusion** The pDNA *Listeria* could be used not only to identify *Listeria monocytogenes* but also to describe the biological characteristics such as virulence, pathogenicity, and invasiveness of *Listeria monocytogenes* at the same time. Importantly, the study proved the application of rapidly synthesized multiple targets plasmid serving as qPCR standard for pathogen identification.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*; synthetic plasmid standard; real time fluorescent quantitative PCR

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, 以下简称单增李斯特菌), 归属于李斯特菌属

(*Listeria*), 在世界范围内被公认是一种重要的人兽共患食源性致病菌, 该菌具有较强的致病性, 可导致单核细胞增多、败血症、脑膜炎、孕妇流产及死胎等<sup>[1-2]</sup>。单增李斯特菌易通过肉乳制品引起人的感染发病, 因此世界多国卫生部门已经逐步重视起对单增李斯特菌的防控<sup>[1,3]</sup>。

目前单增李斯特菌的实验室检测已经从微生物学检测转向核酸检测<sup>[3]</sup>。PCR 方法原理是利用单增李斯特菌区别于李斯特菌属内其他细菌的多

收稿日期: 2020-11-25

基金项目: 广东省科技计划项目(2017A040405043); 国家标准样品研复制计划项目(S2019154)

作者简介: 陈瑶 女 副教授 研究方向为感染性疾病病原体检测  
E-mail: yaoc@i.smu.edu.cn

通信作者: 许龙岩 男 研究员 研究方向为感染性疾病病原体检测  
检验检疫 E-mail: xuly@iqtc.cn

个靶基因选择特异性序列建立 PCR 以及实时荧光 PCR。单增李斯特菌毒力基因主要集中在两个毒力岛 IPI-1 和 LIP-2, 其中李氏溶血素基因 (*hlyA*)、磷脂酶 C 基因 (*plcB*) 属于 LIP-1, 内化素基因 (*inlA*) 属于 LIP-2。*hlyA* 基因编码的李斯特菌溶血素 O (listeriolysin, LLO) 是单增李斯特菌最重要的一种毒力因子, 是单增李斯特菌检测的关键性靶标, 联合检测三种毒力基因将有助于了解李斯特菌的毒力状况, 并进行相关分型<sup>[1-4]</sup>。

但是作为 PCR 检测方法相应的核酸参考品目前十分缺乏。基因组 DNA 作为参考品, 难以同时为多个靶标提供可溯源的定量参考。小片段核酸则无法在多种检测试剂和方法之间提供可参比的参考性。因此新型的可对多种检测靶标量值溯源的核酸参考材料对于李斯特菌的核酸检测发展至关重要<sup>[5-6]</sup>。

本研究中, 拟通过合成含有单增李斯特菌检测的 *hlyA*、*plcB*、*inlA* 基因的质粒作为荧光定量聚合酶链反应 (qPCR) 参考品, 并就其均匀性、稳定性等性能进行评价, 探讨其替代传统基因组参考品的可行性, 以期这种可追溯的、有效的参考材料可以解决病原核酸检测能力快速发展与缺乏参考材料之间的矛盾。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

单增李斯特菌标准菌株 (ATCC 19115), 由广州海关检验检疫中心保存。全基因人工合成等服务由上海吉玛生物工程有限公司提供; 引物合成、DNA 测序由华大基因科技股份有限公司提供。ABI SYBR FAST qPCR Master Mix (2×) (英国 New England Biolabs)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 片段设计和克隆

根据单增李斯特菌检测的 *hlyA* (GenBank: KC770796.1)、*plcB* (GenBank: JF712529.1)、*inlA* (GenBank: EF445938.1) 基因序列人工合成一段基因作为检测靶标片段。单个基因的核酸序列可在美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载。将三个基因以 1:1 的比例串联在一起 (以不相关的基因片段 aagtcg 隔开), 并克隆到 pUC57 中以形成重组质粒, 命名为 pDNA *Listeria*, 扩增纯化后用于进一步试验。

#### 1.2.2 质粒纯度鉴定

采用紫外分光光度 (UV) 法对质粒 DNA 的纯度

进行鉴定, 通过检测样品在 260、280、230 nm 波段的紫外光下的吸光度值 ( $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ,  $A_{230}$ ), 确定样品纯度, 排除 RNA 和蛋白质污染。质粒 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  在 1.8~2.0 之间,  $A_{260}/A_{230}$  大于 2.0 被认为纯度符合参考品要求。

#### 1.2.3 均匀性检测

依照国际标准化组织 (International Organization for Standardization, ISO) 规定的方法<sup>[7]</sup>进行取样, 最小采样量为 1  $\mu$ L, 使用 UV 法分析 pDNA 的瓶间性和瓶内均匀性。

瓶内均匀性检测: 随机选择 9 管 pDNA, 从每管样品的上层、中层和下层分别提取 1  $\mu$ L 测试用样品, UV 法检测后方差分析 ( $F$ -测试) 瓶内均匀性。

瓶间均匀性检测: 随机选择 10 管 pDNA, 并用 UV 法对每管中提取的 1  $\mu$ L 样品重复测量 3 次, 方差分析瓶间均匀性。并根据 ISO 指南 35 评估 pDNA 均匀性的不确定性贡献。根据公式 (1) 计算质粒 DNA 的瓶间不均匀性引起的不确定度 ( $u_h$ ): 所有公式中变量均改为斜体

$$u_h = \sqrt{(Q1/v1 - Q2/v2)/n} \quad (1)$$

其中:  $Q1$  为组间差方和,  $Q2$  为组内差方和,  $v1$  为组间自由度,  $v2$  为组内自由度,  $n$  为组内测量次数。

#### 1.2.4 稳定性检测

在标准物质制备中需要考虑物质的长期稳定性和短期稳定性。分别选择 4、-20、-70  $^{\circ}$ C UV 法进行短期稳定性 (6 个月) 试验, 56  $^{\circ}$ C (2 个月) 进行极端温度试验, 温度 -20  $^{\circ}$ C 作为制备的质粒标准物质的特定储存条件进行长期稳定性试验 (每月 UV 法检测一次, 一共检测 12 个月)。监测质粒 pDNA *Listeria* 在储存期间的稳定性。并根据 ISO 指南 35 评估长时间保存的稳定性, 并评估稳定性的不确定性贡献。进一步根据公式 (2) 计算质粒 DNA 在 12 个月内的长期稳定性引起的不确定度 ( $u_s$ ):

$$u_s = s(\beta_1) \times N \quad (2)$$

其中:  $\beta_1$  是稳定性线性模型中的斜率,  $S_{(\beta_1)}$  是斜率的标准偏差,  $N$  是稳定性评估的总时间,  $N = 12$  个月。

#### 1.2.5 pDNA 的定值与不确定度分析

pDNA *Listeria* 的特性值由 8 个不同的实验室用 UV 方法协同测定, 检测结果通过统计检查以确认每组数据没有异常值和显著差异后, 将 8 个实验室的结果平均值作为该 pDNA 标准品的特性值。进而参考 ISO 指南 35<sup>[7]</sup>, 根据公式 (3) 计算质粒 DNA 在定值过程引入的不确定度 ( $u_q$ ):

$$u_q = s/\sqrt{p} \quad (3)$$

其中:  $s$  为总平均值的标准偏差,  $p$  为实验室数目。

pDNA 的不确定度由三部分组成,分别是:由于分装过程中不均匀性引入的不确定度( $u_h$ )、长期保存引入的不确定度( $u_s$ )、定值过程引入的不确定度( $u_q$ )。按照公式(4)计算参考物质的标准不确定度:

$$U_{CRM} = \sqrt{(u_q^2 + u_h^2 + u_s^2)} \quad (4)$$

计算扩展不确定度时,应将标准不确定度乘以包含因子( $k, k=2$ )。所以,扩展相对不确定度按公式(5)计算:

$$U_{CRM} = u_{CRM} \times k \quad (5)$$

### 1.2.6 qPCR 试验

分别对 pDNA 和从 *Listeria*:H7 标准菌株中提取的 gDNA 通过 A260 进行定量。根据单增李斯特菌基因组大小 2.90 Mbp 估算 gDNA 的拷贝数,并基于 4 271 bp 估算 pDNA *Listeria* 的拷贝数。公式(6)用于计算每微升质粒 DNA 和基因组 DNA (gDNA) 的拷贝数。

$$\text{copies}(\mu\text{L}) = \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{拷贝数} / \text{mol}) \times \text{DNA 浓度}(\text{g}/\mu\text{L})}{660 \times \text{DNA 分子大小}(\text{g}/\text{mol})} \quad (6)$$

定量完成后,分别使用  $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^1$  拷贝/L 的 pDNA *Listeria* 和 gDNA 制备 10 倍稀释系列浓度样品用于进行 qPCR 检测。qPCR 分析使用 ABI SYBR FAST qPCR Master Mix (2 $\times$ ),在八联管中以 25  $\mu\text{L}$  体积进行 PCR 反应(引物序列和扩增子大小见表 1),每个反应均含 10 pmol/L 引物。PCR 程序:95  $^\circ\text{C}$  预变性 10 min,95  $^\circ\text{C}$  变性 30 s,55  $^\circ\text{C}$  退火 45 s 进行 40 个循环。根据 qPCR 结果生成 pDNA 和 gDNA 的五点标准曲线。

表 1 单增李斯特菌 PCR 检测引物

目标基因	引物序列(5'-3')	片段大小/bp
<i>hlyA</i>	F:CCGTAAGTGGGAAATCTG	143
	R:AATATCTCGTAAGTCTCC	
<i>plcB</i>	F:CCAGCAGCTCCGCATGAT	199
	R:ATTCCTTGAGCAATTTGTT	
<i>inlA</i>	F:TCCCTAATCTATCCGCTGAAG	69
	R:TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS 16.0 和 Graphpad 5.0 软件进行统计分析。均匀性测试使用单向方差分析。稳定性分析使用单向线性回归分析来计算斜率  $\beta_1$ ,当  $|\beta_1| < t_{0.95, n-2} \times S_{(\beta_1)}$  [( $n-2$  是自由度),而  $S_{(\beta_1)}$  是斜率的不确定性]时未观察到不稳定性。使用配对  $t$  检验分析 pDNA 与 gDNA 的适用性结果。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 质粒构建和 pDNA *Listeria* 纯度鉴定

合成了含有 *hlyA*、*plcB*、*inlA* 基因的 DNA 片段,并将该片段插入克隆载体 pUC57 中,制备了重组质粒 pDNA *Listeria* (见图 1)。pDNA 经提取纯化后,经测序证实,重组质粒中插入片段的序列准确度为 100%,符合预期(见图 2)。同时 pDNA 的 A260/A280 比值为  $1.863 \pm 0.234$ ,介于 1.8 ~ 2.0 之间,A260/A230 的比值超过 2.0,表明该 pDNA 溶液中无乙醇、蛋白质或 RNA 污染。

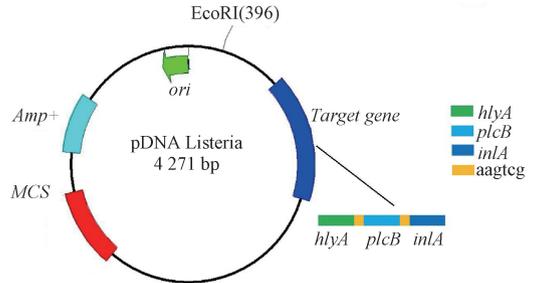


图 1 pDNA *Listeria* 质粒构建示意图

Figure 1 Diagram of pDNA *Listeria* plasmid construction

### 2.2 pDNA *Listeria* 的均匀性

为了满足核酸参考品的使用要求,依照方差分析法( $F$ -检验法)评价了 pDNA 的瓶内和瓶间均匀性,并对数据进行了统计学分析。制备的质粒 DNA 标准物质 pDNA *Listeria* 的瓶内均匀性和瓶间均匀性统计数据见表 2。结果显示,pDNA 的性质值在瓶内和瓶间均质性上差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),表明该 pDNA 满足 qPCR 的参考材料的均匀性要求。根据公式计算得出的均匀度不确定度为 0.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 2 pDNA *Listeria* 基因均匀性检测结果统计

Table 2 Statistical analysis of homogeneity test results

分类	Q1	Q2	$F$	$F_{0.05}$
瓶内	17.090	12.233	3.104	$F_{0.05}(2,20) 3.49$
瓶间	23.845	25.833	2.051	$F_{0.05}(9,20) 2.39$

### 2.3 pDNA *Listeria* 的稳定性

在 4、-20、-70、56  $^\circ\text{C}$  的温度下进行了 180 天的短期稳定性评估,并在 56  $^\circ\text{C}$  进行了 60 天的极端温度测验,结果表明 pDNA *Listeria* 降解不明显(见表 3)。采用线性模型作为 pDNA 的经验模型进行长期稳定性评价,通过 12 个月采样结果建立单项线性回归方程  $Y = \beta_1 + \beta_0$  ( $\beta_1$  为 -0.017 58,  $\beta_0$  为 29.51),自由度为  $n-2$  和  $P = 0.95$  (95%置信水平)的学生分布  $t$ -因子等于 1.812,结果提示  $|\beta_1| < t_{0.95, n-2} \times S_{(\beta_1)}$  ( $n-2$  是自由度,  $S_{(\beta_1)}$  是斜率的不确定性 0.116 8),表明所制备的质粒 DNA 参考物质

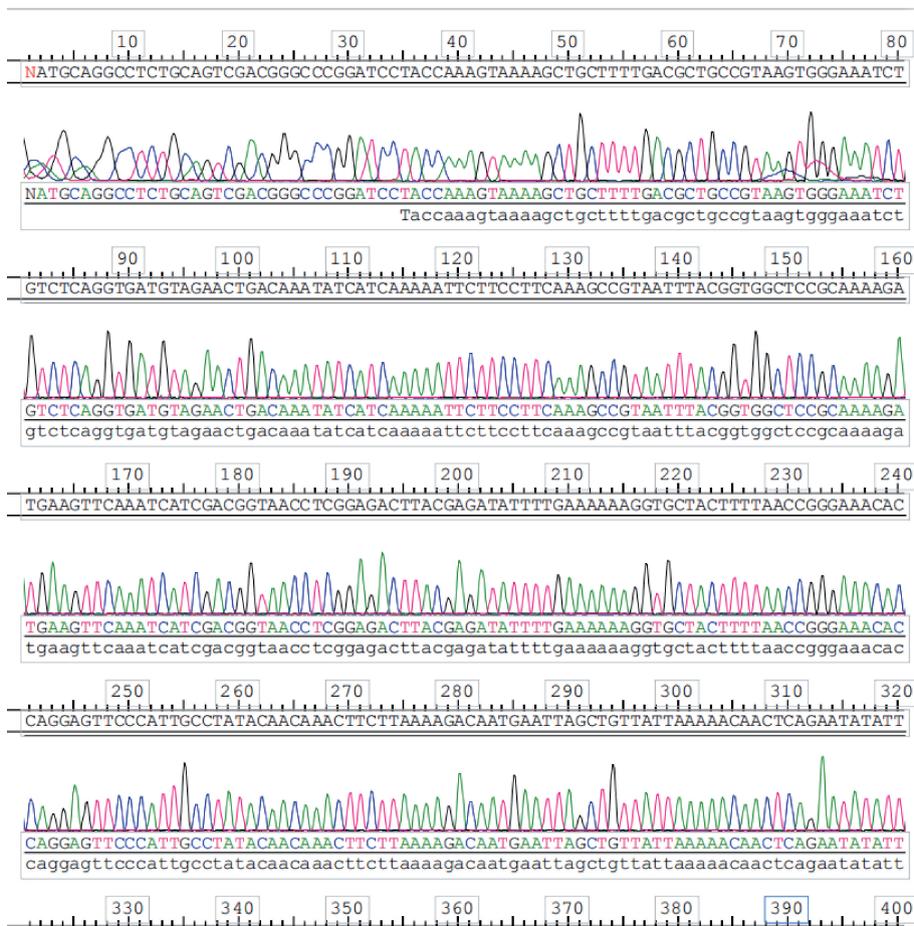


图 2 pDNA *Listeria* 插入靶标序列测序图

Figure 2 Sequencing of the insertion target sequence of pDNA *Listeria*

表 3 pDNA *Listeria* 短期稳定性的统计结果

温度/°C	时间/d	$\bar{x} \pm s$	<i>t</i>	<i>P</i>
4	0	30.04±0.20	2.845 1	0.104 5
	180	29.02±0.82		
-20	0	30.31±0.17	1.879 4	0.240 9
	180	29.95±0.25		
-70	0	29.95±0.17	0.289 9	0.799 2
	180	29.99±0.11		
56	0	30.02±0.31	3.529 3	0.071 7
	60	28.15±0.73		

具有良好的稳定性。根据公式(3)计算 pDNA *Listeria* 在 12 个月内的稳定性引起的不确定性 ( $u_s$ ), 最终计算得出的稳定性不确定度为 1.40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### 2.4 pDNA *Listeria* 定值

8 个不同实验室共同测定 pDNA 的属性值, 测量数据遵循正态分布, 并且每个单元的测量数据的平均值的精度相等。8 个实验室定值的平均值 29.85  $\mu\text{g}/\text{mL}$  被认为是 pDNA *Listeria* 的属性值。pDNA 定值过程带来的不确定性  $u_q$  由统计公式(4)计算得出, 定值引入的不确定度为 0.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### 2.5 pDNA *Listeria* 综合不确定性分析

质粒 DNA 参考材料的不确定度包括由不均匀性引入的不确定度 ( $u_h$ )、长期保存稳定性引入的不确定度 ( $u_s$ )、定值过程中引入的不确定度 ( $u_q$ ), 综合三种不确定度按照公式(5)计算参考物质的标准不确定度, 按公式(6)计算扩展相对不确定度, 结果表明标准不确定度 1.57  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。扩展不确定度为 3.14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### 2.6 qPCR 标准曲线的建立

通过梯度稀释 pDNA *Listeria* 作为模板 ( $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$  和  $10^1$  copy/mL) 进行 qPCR 分析。每个反应重复 3 次, 并根据循环阈值 (Ct 值) 与模板浓度之间的关系建立标准曲线 (见图 3)。各标准曲线的线性相关系数如表 4 所示。在本研究中, 所有靶基因的扩增效率在 94.3% ~ 98.1% 的范围内, 且线性良好, 表明合成基因片段可作为 qPCR 标准品, 且 qPCR 核酸检测参考品可用于单增李斯特菌的检测。使用低至  $10^1$  copy/mL 的模板浓度 (每次 9 次重复反应), 可以在 7 次中检测到全部 3 个基因。结果表明, 所有 qPCR 检测的 LOD 值 (检测下限) 约为  $10^1$  copy/mL (见表 4)。

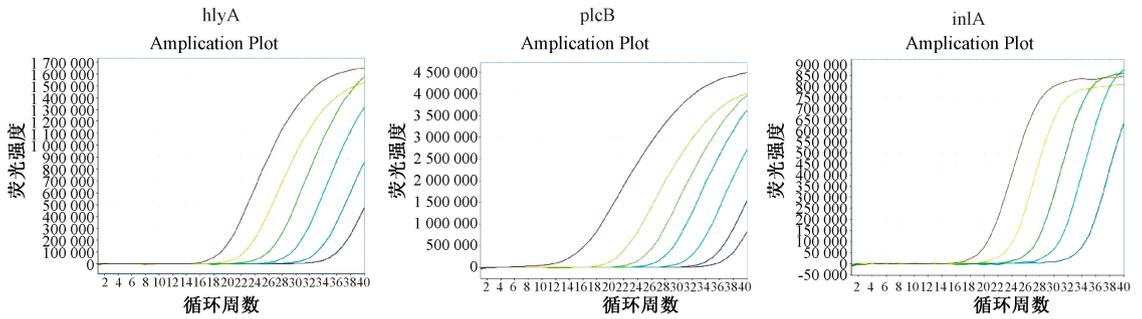


图3 pDNA *Listeria* 构建的 *hlyA*、*plcB*、*inlA* 基因扩增图

Figure 3 Standard curves of *hlyA*, *plcB* and *inlA* genes constructed by pDNA *Listeria*

表4 pDNA *Listeria* 建立的标准曲线

Table 4 Standard curve for pDNA *Listeria*

目标基因	标准曲线	R <sup>2</sup>	扩增效率/%	LOD /(copy/mL)
<i>hlyA</i>	y = 40.618 - 3.448x	0.999	95.0	10 <sup>1</sup>
<i>plcB</i>	y = 41.116 - 3.368x	0.997	98.1	10 <sup>1</sup>
<i>inlA</i>	y = 40.346 - 3.468x	0.998	94.3	10 <sup>1</sup>

### 2.7 pDNA *Listeria* 和基因组 DNA 标准品的替代

使用了基因组标准品和质粒 DNA 参考材料

梯度稀释为模板绘制标准曲线,每条标准曲线重复6次。统计分析每个标准曲线的扩增效率和斜率(*t*检验)。结果证明,通过评估斜率和扩增效率,在95%置信度下,基因组DNA建立的标准曲线与pDNA *Listeria* 建立的标准曲线之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表5。因此,可以使用pDNA *Listeria* 代替基因组DNA来检测单增李斯特菌。

表5 pDNA *Listeria* 和基因组DNA的替代比较

Table 5 Comparison of substitution between pDNA *Listeria* and genomic DNA

目标基因	扩增效率( <i>e</i> )				斜率( <i>K</i> )( <i>n</i> = 6)			
	pDNA	gDNA	<i>t</i>	<i>P</i>	pDNA	gDNA	<i>t</i>	<i>P</i>
<i>hlyA</i>	0.949 9	0.960 9	0.789 7	0.465 5	-3.448 2	-3.454 5	0.827 6	0.445 6
<i>plcB</i>	0.981 1	0.980 1	1.540 6	0.184 1	-3.368 3	-3.377 5	1.137 8	0.306 8
<i>inlA</i>	0.942 5	0.941 9	0.564 1	0.597 0	-3.468 3	-3.453 5	0.595 6	0.577 4

### 3 讨论

传统的基因检测标准物质通常为病原体基因组核酸提取物,但是由于需要检测的靶标序列在基因组中不能以均匀和量值可溯源的形式存在,因此在进行质量评价的时候,靶标序列和量值都难以溯源,各个实验室的检测结果难以进行比较。因此亟需研制新型核酸参考材料<sup>[8-9]</sup>。

人工DNA合成技术为参考标准物质的制备提出了新的可能,可以通过人工合成获得完整的基因片段,甚至通过基因工程技术将多个目的基因串联在同一个质粒载体上,进而实现同时对多个检测目的基因的检测进行质量参考<sup>[10-12]</sup>。

本研究中,根据李斯特菌检测的需要,构建了pDNA *Listeria* 作为单增李斯特菌定性检测和检测性能评价的参考品。一个质粒同时覆盖 *hlyA*、*plcB*、*inlA* 3种检测目标。检测序列根据NCBI公布的 *hlyA*、*plcB*、*inlA* 序列人工合成,质粒的浓度由不同的实验室联合定值确认,因此在序列的准确性和量值的可溯源性上,均可提供稳定的保障。同时通过对pDNA *Listeria* 进行均匀度和稳定性分析,显示pDNA *Listeria* 纯度良好,均匀性、稳定性满足ISO指南35

的相关要求。同时通过qPCR分析了pDNA *Listeria* 在单增李斯特菌qPCR检测中的应用,结果显示,使用pDNA *Listeria* 制备的标准曲线,线性良好,可替代单增李斯特菌基因组DNA用于 *hlyA*、*plcB*、*inlA* 3基因的PCR检测的质量参考。

因此,本研究研制的单增李斯特菌质粒DNA参考物质为单增李斯特菌 *hlyA*、*plcB*、*inlA* 基因PCR相关检测提供了量值溯源的依据,为单增李斯特菌检测实验室质量控制提供了有力保障。质粒DNA标准物质具有短期内可大量复制、经济高效、量值准确可靠等特点,目前在单增李斯特菌检测中,已见单独使用 *hlyA* 基因制备质粒标准品的报道<sup>[2]</sup>。在沙门菌检测中,也有使用包含 *invA* 基因质粒作为PCR检测参考品的报道<sup>[12]</sup>。但是将多种可用于鉴定和毒力分析的靶标合成到一个质粒中,实现一种参考品对多种检测靶标进行质量参考的实践尚未见报道<sup>[13]</sup>。通过此项研究,希望该标准物质在我国单增李斯特菌检验实验室能够较好推广应用,能够较好地提高单增李斯特菌检验实验室相关项目的检测水平,保障各实验室测量结果的可比性、准确性,为检验结果的互认和共享打下了良好的基础,为预防由单增李斯特菌引发的大规模突发性公共

安全事件进行技术储备。

## 参考文献

- [1] 焦颖,张巍. 李斯特菌生物学特征与临床相关性[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015(5): 491-495.
- [2] 刘刚,李妍,许丽. 一种特异性检测单增李斯特菌的质粒 DNA 标准物质[J]. 化学试剂, 2016, 38(7): 664-668.
- [3] 马保华,张辉华,吕平,等. 李斯特菌套式 PCR 快速检测方法的建立及初步应用[J]. 动物医学进展, 2005, 26(11): 57-60.
- [4] 刘二龙,袁慕云,吕英姿,等. 单增李斯特菌三重实时荧光 PCR 检测的建立及其毒力基因在分离菌株中分布[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(5): 451-456.
- [5] 王连秀,赵维勇,牛桓彩,等. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌调查及毒力研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2001, 13(2): 16-18.
- [6] 蒋玲丽,王华梁,王雪亮,等. HCV 核糖核酸国家二级标准物质的研制[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(1): 60-63.
- [7] ISO/REMCO Committee on reference materials. Reference

- materials: General and statistical principles for certification; ISO Guide 35:2006 [S]. 2006.
- [8] 肖维威,张宝,赵卫,等. 用于筛查转基因作物成分的质粒标准分子的研制[J]. 生命科学研究, 2019, 23(3): 192-199.
- [9] BALLARI R V, MARTIN A, GOWDA L R. A calibrator plasmid for quantitative analysis of insect resistant maize (Yieldgard MON 810)[J]. Food Chemistry, 2013, 140(1/2): 382-389.
- [10] 许丽,梁文,李妍,等. 一种质粒 DNA 标准物质的定值数据统计及不确定度评定[J]. 中国测试, 2014, 40(z1): 9-13.
- [11] XU L K, CHEN H, CANALES M, et al. Use of synthesized double-stranded gene fragments as qPCR standards for the quantification of antibiotic resistance genes [J]. Journal of Microbiological, 2019, 164: 105670.
- [12] 李正义,梁成珠,贾俊涛,等. 沙门氏菌 *invA* 基因重组质粒标准的构建[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(7): 2119-2124.
- [13] 於颖,顾其芳,陈敏,等. 肉制品中沙门菌实时荧光定量聚合酶链反应标准质粒的构建[J]. 上海预防医学, 2017, 29(4): 273-276, 280.

## 实验技术与方法

### 微滴式数字聚合酶链式反应定量检测食品中金黄色葡萄球菌方法的研究

李丹<sup>1</sup>,徐蕾蕊<sup>1</sup>,魏海燕<sup>1</sup>,魏咏新<sup>1</sup>,马丹<sup>1</sup>,汪琦<sup>1</sup>,张西萌<sup>1</sup>,张峰<sup>2</sup>,曾静<sup>1</sup>

(1. 中国海关科学技术研究中心,北京 100026; 2. 中国检验检疫科学研究院,北京 100176)

**摘要:**目的 建立微滴数字聚合酶链式反应(ddPCR)快速定量检测食品中金黄色葡萄球菌的方法。方法 以金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因为靶序列,筛选出同时适用于实时荧光定量 PCR(qPCR)和微滴数字 PCR(ddPCR)的引物探针,建立食品中金黄色葡萄球菌 ddPCR 快速定量检测方法,并对该方法进行特异性、灵敏度、准确性和重复性实验。结果 梯度稀释金黄色葡萄球菌纯培养液,确定 ddPCR 方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)均为 110 CFU/mL;通过人工添加实验,同时进行 ddPCR 与平板计数检测,LOQ 可达 1 000 CFU/g,且 4 个添加水平的检测结果偏差最大为 4.77%,5 个平行重复的检测变异系数均小于 20%,展现出良好的准确性和重复性。结论 本研究建立的金黄色葡萄球菌 ddPCR 定量检测方法特异性好、灵敏度高、结果准确,为快速定量检测金黄色葡萄球菌提供了参考。

**关键词:**微滴式数字 PCR;金黄色葡萄球菌;定量检测

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)03-0284-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.03.008

### Detection of *Staphylococcus aureus* in food by droplet digital polymerase chain reaction

LI Dan<sup>1</sup>, XU Leirui<sup>1</sup>, WEI Haiyan<sup>1</sup>, WEI Yongxin<sup>1</sup>, MA Dan<sup>1</sup>, WANG Qi<sup>1</sup>,  
ZHANG Ximeng<sup>1</sup>, ZHANG Feng<sup>2</sup>, ZENG Jing<sup>1</sup>

(1. China Customs Science and Technology Research Center, Beijing 100026, China;

2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

**Abstract: Objective** To establish a new quantitative method for detection of *Staphylococcus aureus* in food by droplet

收稿日期:2020-02-04

基金项目:“食品安全关键技术研发”重点专项(2017YFC1601602);原国家质检总局科技计划(2017IK176)

作者简介:李丹 女 工程师 研究方向为食品安全与微生物检测 E-mail:113674758@qq.com

通信作者:曾静 女 研究员 研究方向为食品安全与微生物检测 E-mail:jingzeng\_cn@163.com