

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¹,徐蕾蕊¹,魏海燕¹,魏咏新¹,马丹¹,汪琦¹,张西萌¹,张峰²,曾静¹

(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 Dan¹, XU Leirui¹, WEI Haiyan¹, WEI Yongxin¹, MA Dan¹, WANG Qi¹,
ZHANG Ximeng¹, ZHANG Feng², ZENG Jing¹

(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

digital polymerase chain reaction (ddPCR). **Methods** A pair of primers and probe for both qPCR and ddPCR was selected according to the single copy gene of *nuc* in *Staphylococcus aureus*. The specificity, sensitivity, accuracy and repeatability of this method were analyzed. **Results** The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of ddPCR method were determined to be 110 CFU/mL by gradient dilution of pure culture of *Staphylococcus aureus*. The LOQ of ddPCR was 1 000 CFU/g in the artificial contaminated experiment, and the maximum deviation of detection result of four spiked levels was 4.77%, and the coefficient of variation of 5 parallel repeats was less than 20%, showing good accuracy and repeatability. **Conclusion** The established method has good specificity, high sensitivity and accurate result, which provides a reference for rapid quantitative detection of *Staphylococcus aureus*.

Key words: Droplet digital polymerase chain reaction; *Staphylococcus aureus*; quantitative detection

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种广泛存在于空气、水、土壤和人体的革兰阳性菌,主要存在于人的黏膜和皮肤等部位,尤其是鼻咽部,健康人群中该菌的携带率约为 30%~80%,因此,金黄色葡萄球菌导致食品污染和食物中毒的风险较高^[1]。2015 年由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒人数排我国食物中毒人数的前 4 位^[2]。根据欧洲食品安全局的相关报告,2013 年欧洲发生的食源性疾病事件中由葡萄球菌属引起的事件为 386 件,其中大多数都是由金黄色葡萄球菌引起^[3]。

目前食品中的金黄色葡萄球菌定量检测常用方法为传统培养法,如 GB 4789.10—2016^[4]中的平板计数法,需要经过选择性平板分离培养、染色镜检和血浆凝固酶试验等步骤,不仅检测周期长,而且样品中潜在的非目标菌有可能会因过度增殖而给金黄色葡萄球菌的鉴定造成干扰。此外,传统培养法无法有效检测到“活的不可培养状态 (VBNC)”的细菌^[5],从而影响检测结果的准确性。

微滴式数字 PCR (Droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR) 作为第三代核酸扩增技术的代表,其原理为将含有目标核酸分子的反应体系均匀的分布到 10 000~20 000 个微滴中,使大部分微滴中不含或者含有一个目标核酸分子。经过 PCR 扩增后,通过读取每个微滴的荧光信号确定阳性反应单元数,再根据泊松分布计算出反应体系中的模板拷贝浓度,从而完成对目标核酸分子的绝对定量^[6-7]。该技术目前已被应用于部分微生物的定量检测,例如牛粪便样本中产志贺毒素的大肠埃希氏菌^[8],食品中的单核细胞增生李斯特菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌 O157-H7 以及阴沟肠杆菌等^[9-13]。

本研究建立了检测食品中金黄色葡萄球菌的 ddPCR 定量方法,旨在为食品安全检测工作提供一种快速、精确的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

主要实验菌株见表 1。菌株来源包括:美国典型菌种保藏中心 (ATCC)、中国医学细菌保藏管理中心 (CMCC)、中国一般微生物典藏中心 (CGMCC)、北京海关 (BJHG)、大连海关 (DLHG)。

表 1 实验菌株

Table 1 Experimental strain

序号	名称	来源及编号	数量
1	金黄色葡萄球菌	ATCC 25923	1
2	金黄色葡萄球菌	ATCC 29213	1
3	金黄色葡萄球菌	CMCC 26003	1
4	金黄色葡萄球菌	ATCC 6538	1
5	金黄色葡萄球菌	BJHG, 食品自分离株	6
6	表皮葡萄球菌	ATCC 12228	1
7	腐生葡萄球菌	DLHG	1
8	肠炎沙门氏菌	ATCC 13076	1
9	鼠伤寒沙门氏菌	CMCC 50115	1
10	甲型副伤寒沙门氏菌	CMCC 50001	1
11	粪肠球菌	CGMCC 1.2135	1
12	单核细胞增生李斯特氏菌	ATCC 13932	1
13	蜡样芽孢杆菌	ATCC 11778	1
14	福氏志贺氏菌	CMCC 51571	1
15	痢疾志贺氏菌	CMCC 51252	1
16	阪崎肠杆菌	ATCC 29544	1
17	丙型溶血性链球菌	CMCC 32206	1
18	乙型溶血性链球菌	CMCC 32210	1
19	小肠结肠炎耶尔森氏菌	CMCC 52212	1
20	大肠埃希氏菌	ATCC 25922	1
21	副溶血性弧菌	ATCC 17802	1
22	溶藻弧菌	ATCC 33787	1
23	创伤弧菌	ATCC 27562	1
24	阴沟肠杆菌	ATCC 13047	1
25	马红球菌	ATCC 6936	1
合计			30

1.1.2 材料与试剂

ddPCRSupermix for Probes (2×), 美国 BIO-RAD 公司;微滴生成油,美国 BIO-RAD 公司;葡萄球菌裂解酶试剂盒,武汉光谷百桥生物;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技有限公司;培养基均购自北京陆桥技术股份有限公司。蔬菜沙拉样品购自本地超市。

1.1.3 仪器与设备

超微量紫外分光光度计 (Nanodrop2000, 美国赛默飞世尔公司); PCR 仪 (Veriti, 美国 Applied BioSystems); 实时荧光 PCR 仪 (ABI7900, 美国 Applied BioSystems); 微滴生成仪 (QX200, 美国 Bio-Rad); 微滴读取仪 (QX200, 美国 Bio-Rad)。

1.2 实验方法

1.2.1 引物探针的设计与筛选

选取金黄色葡萄球菌的单拷贝耐热核酸酶编码基因 (*nuc*, GenBank no. JQ228528.1) 作为靶序列, 筛选文献中报道的 4 对引物和探针组合 (序列见表 2), 同时选取另外的 2 对针对 *spa* 基因和 Sa442 DNA 片段的引物探针一并进行筛选^[14-18]。探针 5' 端标记荧光报告基团 FAM, 3' 端标记荧光淬灭基团 BHQ。引物和探针由上海生工生物有限公司合成, 并采用 qPCR 方法对设计合成的引物探针进行初步筛选, 再用 ddPCR 验证上述引物和探针的有效性, 并优化反应条件。

1.2.2 DNA 提取与超微量紫外分光光度计测定

利用磷酸盐缓冲液对金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923) 的过夜培养菌悬液进行 10 倍梯度稀释。取各稀释度菌液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 12 000 g 离心 5 min, 收集菌体细胞; 用葡萄球菌裂解酶处理, 即将菌体沉淀溶于 180 μL 的试剂 1, 再加入 20 μL 试剂 2, 室温孵育 10 min; 再用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 最后用 50 μL TE 缓冲液洗脱核酸。

使用超微量分光光度计 (Nanodrop 2000) 测定提取的基因组 DNA 的纯度和浓度, DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值应为 1.7~1.9, 并按下列公式^[19] 计算提取的金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的拷贝浓度。

$$c = \frac{m \times 10^{-9}}{n \times 1.096 \times 10^{-21}} \quad (1)$$

其中 *c* 代表提取的细菌基因组浓度 (拷贝/μL); *m* 代表超微量分光光度计测得的核酸浓度 (ng/μL); *n* 代表细菌基因组的长度 (bp), 根据 NCBI 上已发布的金黄色葡萄球菌基因组的测序数据, 其平均长度为 2.85×10⁶ bp。

表 2 qPCR 反应引物和探针序列

Table 2 Primer and probe sequence of qPCR

靶基因名称	引物/探针名称	序列 (5'-3')
<i>nuc</i>	<i>nuc</i> -F1	GAGGTTTTCTTTTCGCTACTAGTTG
	<i>nuc</i> -R1	TGTTGGATCTTCAGAATCACTTCTATTT
	<i>nuc</i> -P1	CTCAGCAAATGCATCACAAACAGGTAACGG
<i>nuc</i> ^[14]	<i>nuc</i> -F2	TGTTACTTATAGGGATGGCTATCAG
	<i>nuc</i> -R2	AGTTAACACTAAGCAACTAGTAGCG
	<i>nuc</i> -P2	AACCTCTTTGCGTATTGCCCTTTTCG
<i>nuc</i> ^[15]	<i>nuc</i> -F3	CCTGAAGCAAAGTCATTTACGA
	<i>nuc</i> -R3	CTTTAGCCAAGCCTTGACGAACT
	<i>nuc</i> -P3	CATCAGCATAAATATACGCTAAGCCACGTCCA
<i>nuc</i> ^[16]	<i>nuc</i> -F4	AGCATCCTAAAAAAGGTGTAGAGA
	<i>nuc</i> -R4	CTTCAATTTTMTTTCATTCTACCA
	<i>nuc</i> -P4	TTTTGCTAAATGCATTTGCTTCAGGACCA
<i>spa</i> ^[17]	<i>spa</i> -F	TACATGTGCGTTAAACCTGGTG
	<i>spa</i> -R	TACAGTTGTACCGATGAATGG
	<i>spa</i> -P	CAAACGGCCTACTGCTGACAAAATTGCTGCA
Sa442 ^[18]	442-F	CATCGGAAACATTGTGTTCTGTATG
	442-R	TTTGGCTGGAAAATATAACTCTCGTA
	442-P	AAGCCGTCTTGATAATCTTTAGTAGTACCGAAGCTGGT

1.2.3 qPCR 检测

qPCR 反应体系包括: 2×Master Mix 10 μL, 10 μmol/L 的上下游引物和探针各 1 μL, 模板 DNA 5 μL, DEPC 水补齐至 20 μL。反应条件为: 50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。

1.2.4 ddPCR 检测

反应体系包括 10 μL ddPCRSupermix for Probes (No dUTP), 上下游引物各 1.5 μL (终浓度

750 nmol/L), 探针 0.5 μL (终浓度 250 nmol/L), DNA 模板 5 μL, DEPC 水补齐至 20 μL。根据 ddPCRSupermix for Probes (No dUTP) 试剂盒说明书相关步骤生成微滴。将生成的微滴放入 PCR 仪按照如下条件进行扩增: 95 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 30 s, 52.5 °C 退火 1 min, 45 个循环; 98 °C 固化微滴 10 min。扩增反应结束后, 利用微滴读取仪检测结果并进行分析。ddPCR 测定结果与对应菌悬液浓度的换算公式如下:

$$C_1 = N \times \frac{V_1}{V_2 \times V_3} \quad (2)$$

注:上式中: C_1 为对应菌悬液浓度 (CFU/mL); N 为 20 μL ddPCR 反应体系中测得的核酸拷贝数 (拷贝/20 μL); V_1 为提取核酸的最终定容体积 (μL); V_2 为 ddPCR 反应体系中加入的核酸模板体积 (μL); V_3 为提取的菌悬液体积 (mL)。

1.2.5 平板计数

对 10 倍梯度稀释的纯菌液进行平板计数,按国标方法吸取 1 mL 各稀释度菌悬液以 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 接种量分别加入 3 块 Barid-Parker 平板,然后用无菌 L 棒涂布整个平板^[4]。36 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 24~48 h。选取菌落数在 20~200 CFU 之间的稀释度平板计数菌落总数。

1.2.6 ddPCR 退火温度的优化

以金黄色葡萄球菌基因组 DNA 作为模板,分别在 52.5 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 两个退火温度下进行 ddPCR 扩增反应,根据扩增结果确定最佳退火温度。

1.2.7 实际样品添加

选择经传统方法^[4]及 qPCR 方法验证无金黄色葡萄球菌的市售蔬菜沙拉作为添加基质。对金黄色葡萄球菌过夜培养菌悬液进行 10 倍梯度稀释并进行平板计数,同时吸取 10^{-5} 和 10^{-6} 稀释度菌液各 4 mL 和 2 mL 分别加入到 25 g 沙拉样品中,每个添加量均添加 5 个样品,同时取 1 份不添加菌液的 25 g 沙拉样品设置为阴性对照。所有样品都加入 225 mL 磷酸盐缓冲液,用拍击式均质器拍击 2 min,制成系列含有不同浓度金黄色葡萄球菌的蔬菜沙拉污染样品。取各样品匀液 4 mL 分别利用试剂盒法提取细菌基因组 DNA,最终将核酸溶解在 50 μL TE 缓冲液中,进行 ddPCR 检测,按照公式(3)计算样品中目标菌的含量 (CFU/g),同时计算与平板计数结果间的偏差。

$$C_2 = N \times \frac{V_1}{V_2 \times V_3} \times 10 \quad (3)$$

注:上式 C_2 为检样中目标菌含量 (CFU/g); N 为 20 μL ddPCR 反应体系中测得的核酸拷贝数 (拷贝/20 μL); V_1 为提取核酸的最终定容体积 (μL); V_2 为 ddPCR 反应体系中加入的核酸模板体积 (μL); V_3 为提取核酸时吸取的样品匀液体积 (mL)。

2 结果

2.1 引物探针的筛选

文献中报道的针对金黄色葡萄球菌特异性单拷贝耐热核酸酶编码基因 (*nuc*, GenBank no.

JQ228528.1) 4 对引物/探针 *nuc* 1~4,以及另外针对 *spa* 和 Sa442 基因设计 2 套引物探针一并进行 qPCR 检测,结果发现 *nuc* 4 引物探针出现的荧光扩增信号最强 (图 1)。取 *nuc* 4 引物探针对 4 株来自 ATCC 或 CMCC 的金黄色葡萄球菌标准菌株、6 株金黄色葡萄球菌自分离株、2 株近源菌株以及其他常见食源性致病菌 DNA 进行 qPCR 检测进行特异性验证,结果发现只有 4 株金黄色葡萄球菌的标准菌株及 6 株自分离株出现阳性扩增信号,而其他近源葡萄球菌及食源性致病菌检测均呈阴性 (图 2),证明 *nuc* 4 引物探针具有良好的包容性和排他性。

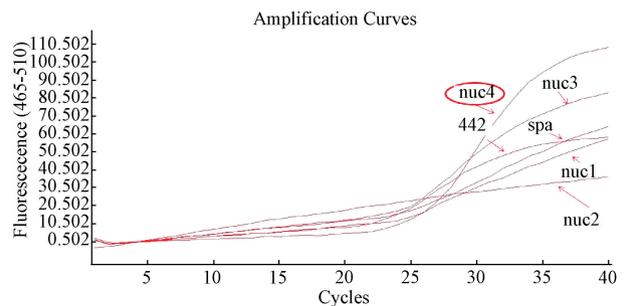


图 1 qPCR 方法筛选金黄色葡萄球菌引物探针

Figure 1 Screening of primers and probes for *Staphylococcus aureus* by qPCR

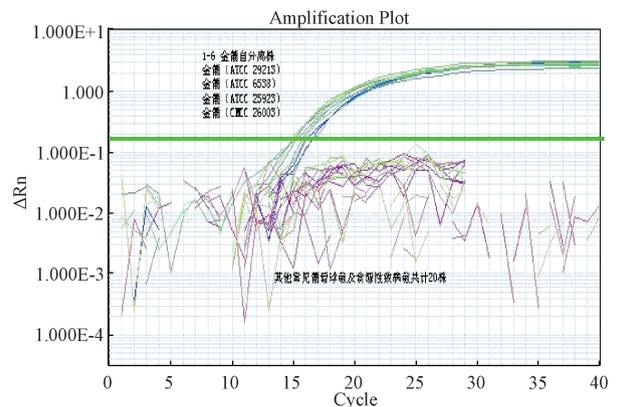


图 2 qPCR 方法验证 *nuc*4 特异性

Figure 2 Verification of specificity of *nuc*4 by qPCR

取 *nuc* 1、*nuc* 4 和 442 号引物探针同时对金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923) 的基因组 DNA 进行 ddPCR 检测,验证引物探针在 ddPCR 中的有效性,同时比较不同退火温度对检测效果的影响。结果发现同样是 *nuc* 4 的荧光扩增信号最强,并且其 52.5 $^{\circ}\text{C}$ 的退火温度扩增效果优于 55 $^{\circ}\text{C}$ (图 3)。因此后续选取 *nuc* 4 引物探针及 52.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火温度建立 ddPCR 反应体系。

2.2 金黄色葡萄球菌纯菌液的检测

提取金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923) 的过夜培养菌悬液 DNA,经过超微量分光光度计测定,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.81, DNA 浓度为 181.2 ng/ μL ,经过

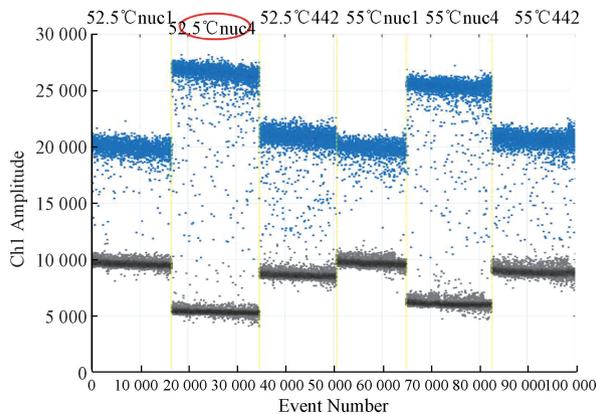


图3 ddPCR对金黄色葡萄球菌引物探针的筛选与退火温度优化

Figure 3 Screening of primer/probe and amplification results of ddPCR at different annealing temperature

计算所得原始菌液浓度为 2.9×10^9 CFU/mL, 其对数值为 9.46。分别吸取 1 mL 的各梯度稀释的金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923) 纯菌液提取 DNA, 并进行 ddPCR 检测。ddPCR 在 10^{-2} 稀释度达到检测上限,

阳性微滴的比率达 100% (结果未显示), 自 10^{-3} 至 10^{-7} 稀释度菌液测得的阳性微滴数量和菌体基因组浓度呈明显的梯度下降趋势 (图 4、表 3), 最低可检测到 10^{-7} 稀释度, LOD 和 LOQ 均为 110 CFU/mL。

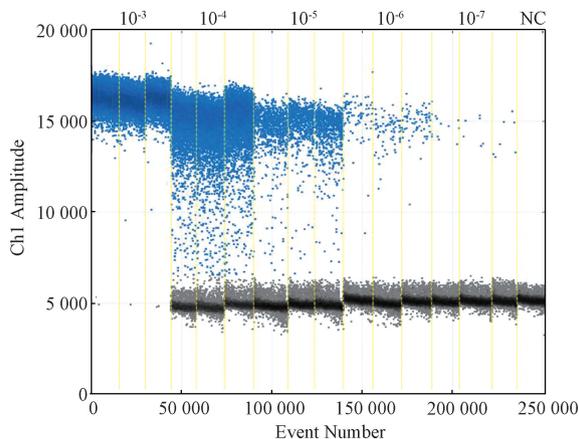


图4 金黄色葡萄球菌纯菌液 ddPCR 扩增微滴分布图

Figure 4 ddPCR amplification droplet map of *Staphylococcus aureus*

表3 ddPCR 方法定量检测梯度稀释的金黄色葡萄球菌纯菌液结果

Table 3 Quantitative detection of gradient diluted *Staphylococcus aureus* by ddPCR

稀释因子	ddPCR 定量结果 (拷贝数/mL) ^a							原菌液浓度 (LOG ₁₀ CFU/mL)	偏差 (%) ^a
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	平均值	CV (%)		
10^{-3}	2 200 000	2 120 000	2 260 000	2 000 000	2 020 000	2 120 000	5.29	9.33	0.64
10^{-4}	163 200	159 600	158 800	162 000	163 400	161 400	1.30	9.21	1.92
10^{-5}	12 240	12 060	12 420	12 080	13 140	12 388	3.59	9.09	3.19
10^{-6}	1 020	1 160	1 080	1 160	1 040	1 092	6.01	9.04	3.73
10^{-7}	118	152	92	90	104	110	22.84	9.05	3.62

^a偏差 = (平均值 - 理论值) / 理论值 * 100%, 以平板计数结果 LOG 值 9.39 作为理论值

2.3 ddPCR 与平板计数测定结果的比较

金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923) 过夜培养物的平板计数结果为 2.48×10^9 CFU/mL, 其对数值为 9.39; 在 10^{-3} 至 10^{-7} 定值范围内 ddPCR 测得的菌液浓度分别乘以对应稀释倍数计算出原菌液浓度为 $2.1 \times 10^9 \sim 1.1 \times 10^9$ CFU/mL, 其对数值在 9.04 ~ 9.33 范围内 (表 3), 平均值为 9.14, 比平板计数法测得值低 0.25 个 LOG 值 (图 5), 偏差均小于 4% (表 3)。ddPCR 的定值结果与平板计数的预计值间存在良好的相关性 ($R^2 = 0.999$, 图 6)。

2.4 人工污染样品的检测

在蔬菜沙拉中添加梯度稀释的金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923) 制成人工污染的阳性样品, 同时进行 ddPCR 和平板计数检测, 结果显示 ddPCR 的定值效果良好, 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 < 20%, 展现出良好的重复性, 见表 4。

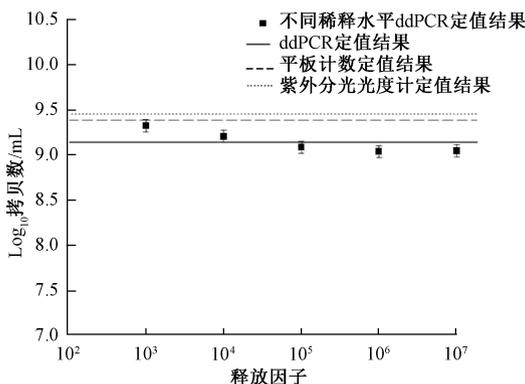


图5 3种方法定量检测金黄色葡萄球菌纯菌液的基因组浓度结果比较

Figure 5 Comparison of three methods for quantitative detection of genomic concentration of *Staphylococcus aureus*

3 讨论

ddPCR 技术与传统培养法相比, 无需进行典型菌落确认等步骤, 可以在 1 d 内完成检测, 能够满足快速检测的要求; 其与 qPCR 为代表的分子生物学

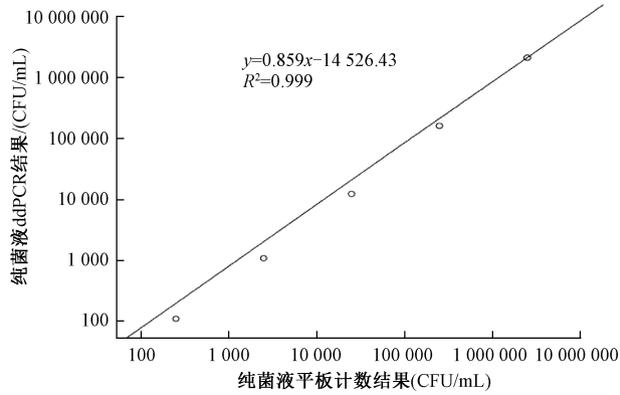


图 6 ddPCR 定值结果与平板计数结果的关系

Figure 6 Relationship between ddPCR and plate count results

表 4 ddPCR 方法定量检测人工污染沙拉样品中金黄色葡萄球菌的结果 (CFU/g)

Table 4 ddPCR method for quantitative detection of *Staphylococcus aureus* in artificially contaminated salad samples (CFU/g)

添加菌液的稀 释度/添加量	平板计数结果			ddPCR 结果								
	计数值	Ig 值		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	平均值	CV%	Ig 值	偏差 (%)
10 ⁻⁵ /4 mL	14 500	4.16		1 510	1 505	1 465	1 590	1 585	15 310	3.56	4.18	0.57
10 ⁻⁵ /2 mL	7 250	3.86		495	505	510	660	425	5 190	16.57	3.72	3.76
10 ⁻⁶ /4 mL	1 450	3.16		145	220	190	185	215	1 910	15.64	3.28	3.79
10 ⁻⁶ /2 mL	730	2.86		1 150	950	900	1 050	950	1 000	10.00	3.00	4.77

提取中的细胞破壁难题,建立了一种提取高纯度金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的方法,其提取效率明显优于超声破碎、蛋白酶 K 消化等处理方式(结果未显示)。这种高效的核酸提取对于确保 ddPCR 定值结果的准确性具有重要的意义。

其次,利用梯度稀释的金黄色葡萄球菌纯菌液对 ddPCR 方法的检测性能进行评价。在一定菌液和 DNA 浓度的动态检测范围内,能被可靠检测到的最低靶基因水平即为最低检测限 (LOD)^[21],而测定结果的变异系数 CV ≤ 25% 时的最低靶基因浓度即为最低定量限 (LOQ)^[22]。因此,该 ddPCR 方法对金黄色葡萄球菌纯菌液的 LOD 和 LOQ 均为 110 CFU/mL(表 3)。而且 ddPCR 定值结果具有良好的准确性,同传统平板计数方法的结果相比,只相差 0.25 个 LOG 值(图 5)。

最后,进一步比较 ddPCR 与国标平板计数方法在人工污染的蔬菜沙拉样品实验中的检测结果来评价所建立 ddPCR 方法。结果显示 ddPCR 对食品中金黄色葡萄球菌的定量检测效果良好,同一污染水平内 5 个平行重复的检测变异系数均小于 20%,呈现出良好的重复性,LOQ 可达 1 000 CFU/g,与赵丽青等^[23]所建立的在鸡肉样品中 ddPCR 的检测低限基本相当 (10² CFU/mL, 1 000 CFU/g)。2013 年 Kelley 等^[21]在 *Journal of Clinical Microbiology* 上报了利用 ddPCR 技术对 397 份临床样本进行耐甲氧西林金黄色葡萄球菌检测,取得了同 qPCR 相当的检测灵敏度 (96.8%) 和特异

方法相比,ddPCR 不依赖标准曲线,可以直接进行绝对定量检测。本研究以金黄色葡萄球菌的单拷贝、具有较高保守性的 *nuc* 基因和金黄色葡萄球菌蛋白 A 基因作为靶序列,筛选出荧光信号最强的一套引物探针,建立起 ddPCR 精准定量检测方法,为食源性致病菌的定量检测提供了一种更精确的选择。

金黄色葡萄球菌为革兰阳性细菌,细胞壁较厚,90%以上金黄色葡萄球菌含有葡萄球菌蛋白 A;有些金黄色葡萄球菌自身还分泌一种耐热核酸酶的蛋白质可以降解核酸,基因组 DNA 提取难度大^[20]。本研究通过添加葡萄球菌裂解酶解决了

性 (91.0%),其最低检测限可达 6 拷贝/反应,相当于 3×10² CFU/拭子及 4×10³ CFU/mL。此外,在人工污染的蔬菜沙拉样品中 ddPCR 定值结果略高于平板计数结果(表 4),这可能是由于平板上的单个菌落可能由多个细胞组成,并且金黄色葡萄球菌易成串生长;而 ddPCR 方法中选取的 *nuc* 基因为单拷贝,在金黄色葡萄球菌中普遍存在、序列高度保守^[24],每个拷贝代表单个细胞,所以 ddPCR 结果能更精准反应样品中金黄色葡萄球菌的实际菌体数量。我们所建立的 ddPCR 方法,直接对样品中提取的 DNA 进行定量检测,属于终点检测,对样品中的 PCR 抑制剂的耐受度更高^[25-28]。

ddPCR 作为一种基于核酸扩增的检测方法,虽然可有效检测到 VBNC 状态的细菌,但无法区别死菌与活菌,可能对定量检测结果的准确性产生影响。为避免样品中可能存在的死菌产生的结果误差,可在样品中加入去游离核酸酶(美国 BIO-RAD 公司)进行处理,然后再提取细菌基因组进行 ddPCR 检测,以消化掉死菌残留的核酸,从而保证检测结果的准确性。后续我们将加强在此方面的研究,进一步增强所建立 ddPCR 定量检测方法的实用性。

综上所述,本研究建立的 ddPCR 方法灵敏且稳定,为食品中金黄色葡萄球菌的快速定量检测提供了新的手段,对预防和控制公共卫生事件的发生,提高致病菌的检出率等均具有重要意义。

参考文献

- [1] CHIANG Y C, FAN C M, LIAO W W, et al. Real-time PCR detection of *Staphylococcus aureus* in milk and meat using newprimers designed from the heat shock protein gene *htrA* sequence[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(12): 2855-2859.
- [2] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会. 国家卫生计生委办公厅关于2015年全食物中毒事件情况的通报[EB/OL]. [2016-04-01]. <http://www.nhpc.gov.cn/yjb/s7859/201604/8d34e4c442c54d33909319954c43311c.shtml>.
- [3] European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013[J]. EFSA Journal, 2015, 13(1): 3391.
- [4] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 中华人民共和国国家标准: 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验: GB 4789.10-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [5] 田聪, 徐以刚, 肖性龙, 等. 金黄色葡萄球菌活的非可培养状态复苏及PMA-qPCR检测[J]. 现代食品科技, 2013, 29(6): 1390-1394.
- [6] 李亮, 隋志伟, 王晶, 等. 基于数字PCR的单分子DNA定量技术研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(10): 1017-1023.
- [7] MORISSET D, STEBIH D, MILAVEC M, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62583.
- [8] VERHAEGEN B, DE REU K, DE ZUTTER L, et al. Comparison of droplet digital PCR and qPCR for the quantification of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine feces[J]. Toxins, 2016, 8(5): 157.
- [9] WITTE A K, FISTER S, MESTER P, et al. Evaluation of the performance of quantitative detection of the *Listeria monocytogenes* *prfA* locus with droplet digital PCR[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(27): 7583-7593.
- [10] 方佩佩, 赵丽青, 马云, 等. 副溶血性弧菌微滴数字PCR定量方法的建立[J]. 食品工业科技, 2018, 39(19): 252-257.
- [11] 赵新, 蓝青阔, 陈锐, 等. 应用微滴数字PCR技术快速检测食用菌中沙门氏菌[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(3): 315-321.
- [12] 董莲华, 张玲, 姜君, 等. 大肠杆菌O157:H7微滴数字PCR定量方法的建立[J]. 分析化学研究报告, 2015, 43(3): 319-324.
- [13] 禹思宇, 唐连飞, 陈雪琴, 等. 检测阴沟肠杆菌的数字PCR定量方法建立[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(3): 1-4.
- [14] 邵美丽, 董鑫, 赵燕丽, 等. 单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌双重荧光定量PCR检测方法建立[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 169-172.
- [15] 苏裕心, 高姗, 康琳, 等. 荧光定量PCR快速检测金黄色葡萄球菌方法的建立[J]. 军事医学科学院院刊, 2010, 34(1): 25-29, 39.
- [16] GADSBY NJ, MCHUGH MP, RUSSELL CD, et al. Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2015, 21(8): 788.e1-788.e13.
- [17] HALDAR M, BUTLER M, QUINN C D, et al. Evaluation of a real-time PCR assay for simultaneous detection of *Kingella kingae* and *Staphylococcus aureus* from synovial fluid in suspected septic arthritis[J]. Annals of Laboratory Medicine, 2014, 34(4): 313-316.
- [18] Peters Remco P H, vanAgmael Michiel A, Gierveld Sonja, Danner Sven A, Groeneveld A B Johan, Vandenbroucke-Grauls Christina M J E, Savelkoul Paul H M. Quantitative detection of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* DNA in blood to diagnose bacteremia in patients in the intensive care unit[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(11): 3641-3646.
- [19] Nordic Committee on Food Analysis NMKL 156, 2. Ed., 1997 Pathogenic *Vibrio* species. Detection and enumeration in foods[S].
- [20] 唐俊妮, 龙飞, 史贤明, 等. 金黄色葡萄球菌基因组DNA提取方法的比较研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(8): 1467-1469.
- [21] KELLEY K, COSMAN A, BELGRADER P, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a duplex droplet digital PCR assay[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(7): 2033-2039.
- [22] RICCHI M, BERTASIO C, BONIOTTI M B, et al. Comparison among the quantification of bacterial pathogens by qPCR, dPCR, and cultural methods[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1174.
- [23] 赵丽青, 王静, 秦燕, 等. PMA结合ddPCR检测食品中金黄色葡萄球菌的研究[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(1): 105-109.
- [24] CHESNEAU O, ALLIGNET J, EL SOLH N. Thermonuclease gene as a target nucleotide sequence for specific recognition of *Staphylococcus aureus*[J]. Molecular and Cellular Probes, 1993, 7(4): 301-310.
- [25] DEVONSHIRE A S, HONEYBORNE I, GUTTERIDGE A, et al. Highly reproducible absolute quantification of *Mycobacterium tuberculosis* complex by digital PCR[J]. Analytical chemistry, 2015, 87(7): 3706-3713.
- [26] HOSHINO T, INAGAKI F. Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR[J]. Systematic and applied microbiology, 2012, 35(6): 390-395.
- [27] HUDECOVA I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids[J]. Clinical Biochemistry, 2015, 48(15): 948-956.
- [28] PAVŠI Č J, DEVONSHIRE A S, PARKES H, et al. Standardization of nucleic acid tests for clinical measurements of bacteria and viruses[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(7): 2008-2014.