

实验技术与方法

TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 检测
克罗诺杆菌 *MMS* 基因方法的建立

谭翰清, 蔡建生, 谭海芳, 林凤, 程洁萍

(广东省肇庆市疾病预防控制中心, 广东 肇庆 526060)

摘要:目的 建立克罗诺杆菌的特异、灵敏的 TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 检测方法。方法 根据 GenBank 公布的克罗诺杆菌 *MMS* 基因高保守序列, 设计特异引物和 TaqMan-MGB 探针, 建立和优化反应体系, 用 25 种其他常见致病菌评价反应体系的特异性, 用克罗诺杆菌 *MMS* 基因重组质粒构建实时荧光定量 PCR 标准曲线, 对重组质粒、纯菌和人工模拟污染样本进行灵敏度试验, 并与 FDA 推荐的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 比较, 配对 *t* 检验分析两种方法对 *Ct* 值和荧光强度的差异。结果 采用 TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 检测克罗诺杆菌 *MMS* 基因仅需 40 min, 与 25 种非目标菌无交叉反应, 仅对克罗诺杆菌有特异性扩增; 所构建方法线性关系良好, 相关系数 $r^2 = 0.999$, 扩增效率为 99.972%, 对重组质粒、纯菌、人工模拟污染样品标本的灵敏度分别达 10 拷贝/反应、3.8 和 38 cfu/ml; 与 FDA 推荐的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 相比, TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 的 *Ct* 值更小、 ΔRn 值更高, 灵敏度和分辨率差异均有统计学意义 ($Ct: t = -14.406, P < 0.01$; $\Delta Rn: t = 14.230, P < 0.01$)。结论 本研究建立的 TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 反应体系能够快速、特异、灵敏地检测克罗诺杆菌 *MMS* 基因, 可用于婴幼儿奶粉中克罗诺杆菌的快速筛查和鉴定, 具有较大的应用价值和推广价值。

关键词: 克罗诺杆菌(原阪崎肠杆菌); 实时荧光定量 PCR; TaqMan-MGB 探针; 局部大分子合成操作子; *MMS* 基因; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号: R155.5; R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)01-0040-05

Establishment of quantitative real-time PCR targeting the *MMS* gene of
Cronobacter spp. based on TaqMan-MGB probe

TAN Han-qing, CAI Jian-sheng, TAN Hai-fang, LIN Feng, CHENG Jie-ping

(Zhaoqing Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Zhaoqing 526060, China)

Abstract: Objective To establish a specific and sensitive TaqMan-MGB quantitative real-time PCR assay for the rapid detection of *Cronobacter* spp.. **Methods** Based on the conservative sequence of partial macromolecular synthesis operon gene of *Cronobacter* spp. published on GenBank, specific primers and TaqMan Minor groove binder (TaqMan-MGB) probes were designed, and the rapid real-time PCR assay was established and optimized. The specificity was evaluated with 25 strains of other *Enterobacteriaceae* and some common pathogens. The quantitative standard curve was established with the recombinant plasmids and the sensitivity for the assay was evaluated for recombinant plasmids, pure cultures and contaminated food samples. Comparing with the TaqMan real-time PCR recommended by U. S. FDA, paired-samples *t*-test for the variables of cycle threshold (*Ct*) and relative fluorescence intensity (ΔRn) was done between the two methods. **Results** The TaqMan-MGB quantitative real-time PCR assay could be finished detection in 40 minutes. It was specific enough to discriminate *Cronobacter* spp. from all other *Enterobacter* and non-*Enterobacter* strains tested. The relative coefficient of the quantitative standard curve was 0.999, and the amplification efficiency of the quantitative standard curve was 99.972%. The sensitivity for the assay was 10 copies per reaction for recombinant, 3.8 cfu/ml for pure culture, and 38 cfu/ml for contaminated food samples, respectively. There were statistical differences between two real-time PCR methods by paired-samples *t*-test ($Ct: t = -14.406, P < 0.01$ and $\Delta Rn: t = 14.230, P < 0.01$). The TaqMan-MGB real-time PCR was better than the TaqMan real-time PCR recommended by U. S. FDA in sensitivity and resolution. **Conclusion** The TaqMan-MGB quantitative real-time PCR assay targeted the partial macromolecular synthesis operon gene of *Cronobacter* spp. is rapid, specific and sensitive. It would had a good value in the screening and identification of *Cronobacter* spp. from infant milk powder for food safety and risk monitor.

收稿日期: 2013-09-22

基金项目: 广东省肇庆市科技创新计划项目(2013E1810)

作者简介: 谭翰清 男 主管技师 研究方向为病原微生物快速检测 E-mail: tanhanqing2000@163.com

Key words: *Cronobacter* spp. (former *Enterobacter sakazakii*); quantitative real-time PCR; TaqMan minor groove binder probe; partial macromolecular synthesis operon; *MMS* gene; food-borne pathogen; food safety

克罗诺杆菌(原称阪崎肠杆菌,2008年国际上已经重新分类和命名)为食源性致病菌^[1],是奶粉中危害健康的生物因素之一^[2],约2.5%~14%的婴儿配方奶粉、0%~12%的普通奶粉含有克罗诺杆菌^[3],可引起新生儿脑膜炎、坏死性小肠结肠炎和菌血症等疾病^[4]。传统的克罗诺杆菌检测方法周期约4d,整个过程耗时费力^[5],不利于奶粉中病原菌的快速检测。实时荧光PCR检测技术以其快速、特异、灵敏、完全闭管在线检测等特点,在病原学快速检测方面具有很大优势。已有研究者针对该菌的16S rRNA^[6]、*ITS*^[7]、*ompA*^[8]等基因建立TaqMan探针实时荧光PCR检测方法,提高了检测速度。近年来发展的MGB(minor groove binder)探针标记技术,以其能缩短探针设计长度、提高探针 T_m 值、增强探针杂交稳定性、降低荧光本底、完全特异匹配等优点^[9],进一步促进了实时荧光PCR技术的应用。本研究建立针对克罗诺杆菌*MMS*基因的TaqMan-MGB探针实时荧光定量PCR检测方法,为提高对克罗诺杆菌检测的灵敏度、准确度和检测速度提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

致病性大肠杆菌(44138)、产毒性大肠杆菌(44815)、侵袭性大肠杆菌(44484)、迟钝爱德华菌(ATCC 15947)、肺炎克雷伯菌(ATCC 10031)、阴沟肠杆菌(CMCC 45301)、小肠结肠炎耶尔森菌(YS 52203)均由广东省疾病预防控制中心病原微生物

所提供;克罗诺杆菌标准株(ATCC 29544)、伤寒沙门菌(CMCC 50071)、乙型副伤寒沙门菌(CMCC 50094)、肠炎沙门菌(CMCC 50338)、鼠伤寒沙门菌(CMCC 50115)、痢疾志贺菌(CMCC 51105)、宋内志贺菌(CMCC 51592)、福氏志贺菌(CMCC 51572)、副溶血性弧菌(ATCC 17802)、创伤弧菌(ATCC 27562)、单核增生李斯特菌(ATCC 19115)、大肠埃希菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、铜绿假单胞菌(ATCC 9027)、普通变形杆菌(CMCC49027)、奇异变形杆菌(CMCC 49005)、弗劳地枸橼酸杆菌(ATCC 43864)、粘质沙雷菌(CMCC 41002)、产气肠杆菌(ATCC13048)均为本实验室保存;30株克罗诺杆菌部分由广东省疾病预防控制中心卫生化验所和佛山、河源、中山、潮州等市的疾病预防控制中心惠赠,部分菌株为本实验室保存。

1.1.2 主要仪器与试剂

7500fast 荧光定量PCR仪(美国ABI)、GSG2000 核酸凝胶成像系统(珠海黑马)、电泳仪、高速冷冻离心机等。Premix Ex Taq™(Probe qPCR)、PCR、细菌DNA提取试剂盒均购自大连TaKaRa公司,质粒提取试剂QIAprep Spin Miniprep Kit(德国QIAGEN)。

1.2 方法

1.2.1 引物和探针的设计

参考GenBank 克罗诺杆菌高保守*MMS*基因序列,利用Oligo 6.0、Primer 5.0、Primer Express 3.0软件进行引物和TaqMan-MGB探针设计、评价,委托上海基康生物技术有限公司合成。其序列见表1。

表1 克罗诺杆菌引物及TaqMan-MGB探针序列

Table 1 Sequence of primers and Taq-ManMGB-based probes for *MMS* gene of *Cronobacter* spp.

引物和探针	序列(5'-3')	T_m	位置	长度/bp
Forward Primer	TAAACGCGCCAAAGCTTCC	60	111~129	19
Reverse Primer	TACAATACTACTCTGTCTGTTTCAGGG	61	239~212	28
Probe	FAM-CGAAAACGCACGCCGT-MGB	70	162~177	16

注:引物、探针位置以L01755序列为参考

1.2.2 细菌DNA的提取

吸取克罗诺杆菌纯菌液或人工模拟样本0.1ml,按照细菌DNA提取试剂盒说明书进行操作,经过细胞裂解液裂解细胞、释放基因组DNA、DNA滤膜吸附、洗涤纯化等步骤,最后在Spin Column膜的中央处加入100μl的Elution Buffer,室温静置5min,12000r/min离心2min,洗脱细菌基因组DNA,-20℃保存备用。

1.2.3 *MMS*基因重组质粒的构建

以克罗诺杆菌标准株(ATCC 29544)的核酸为模板,PCR扩增129bp的*MMS*靶基因,产物电泳、纯化后,克隆至pUCK载体,转化至JM109感受态细胞,通过蓝白斑菌落筛选、增菌培养后,用质粒提取试剂QIAprep Spin Miniprep Kit抽提、纯化质粒,利用紫外分光光度计测定重组质粒的浓度,并进行测序鉴定。

1.2.4 实时荧光 PCR 反应体系的建立与优化

采用 Premix Ex Taq(Probe qPCR) 试剂盒,反应体积为 20 μ l, DNA 模板加样量为 1 μ l,初步建立 TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 反应体系,并根据 Primer 5.0 计算的理论退火温度,调整优化反应温度及时间。PCR 反应循环参数为:95 $^{\circ}$ C 预变性 20 s;95 $^{\circ}$ C 变性 3 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s(末端收集荧光),40 个循环;反应模式采用 fast 模式。应用矩阵法优化引物、探针比例,筛选引物和探针的最佳浓度组合,以最小的 *Ct* 值和较高的荧光强度增加值 (ΔRn) 的参数条件为优。

1.2.5 实时荧光 PCR 特异性试验

对 25 株非目标菌株、30 株克罗诺杆菌,进行实时荧光 PCR 反应体系的特异性试验。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

根据 *MMS* 靶基因重组质粒的分子量,将重组质粒样品浓度换算为拷贝数浓度,换算公式为:每 μ l 样品中检测基因的拷贝数 = 浓度 (ng/ μ l) \times 阿佛加德罗常数 $\times 10^9 / (660 \times$ 重组质粒碱基数)^[10],用 Easy Dilution 10 倍梯度稀释,取 $10^3 \sim 10^8$ 拷贝/ μ l 的浓度梯度,制备实时荧光 PCR 定量标准曲线。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 灵敏度试验

取重组质粒 $10^0 \sim 10^9$ 拷贝/ μ l 共 10 个浓度进行实时荧光定量 PCR 检测,确定反应体系对重组质粒的灵敏度。用新鲜培养的克罗诺杆菌标准株 (ATCC 29544) 制备约 0.5 麦氏单位的悬菌液,10 倍梯度稀释至 10^{-8} ,每个稀释度吸取 1 ml 进行平板计数,算出初始纯菌液的浓度;同时每个稀释度各取 0.1 ml 提取 DNA,进行实时荧光定量 PCR,确定对纯菌液的检测下限。

称取 25 g 奶粉加至 225 ml 缓冲蛋白胍水中混匀,9 ml/管分装,分别吸取上述 $10^{-8} \sim 10^0$ 梯度稀释的悬菌液各 1 ml,加至 9 管奶粉缓冲蛋白胍水中,制成 $10^{-9} \sim 10^{-1}$ 梯度稀释人工模拟污染样本,充分混匀后,分别吸取 0.1 ml 提取 DNA,进行实时荧光定量 PCR 检测,确定反应体系对人工模拟污染样品检测的灵敏度。

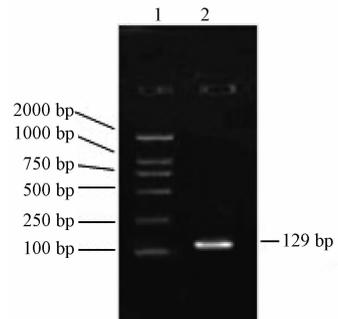
1.2.8 两种实时荧光 PCR 的比较

取克罗诺杆菌标准株 (ATCC 29544) 悬菌液提取 DNA,10 倍梯度稀释至 10^{-9} ,应用美国 FDA 推荐的筛选和确认婴儿配方奶粉中克罗诺杆菌的 TaqMan 探针实时荧光 PCR^[11],以及本研究建立的 TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 进行检测,对两种方法检测的 *Ct* 值和 ΔRn 值分别进行配对 *t* 检验,比较 TaqMan 探针和 TaqMan-MGB 探针两种实时荧光 PCR 方法在检测时间、灵敏度和分辨率上的区别。

2 结果

2.1 阳性质粒的克隆与鉴定

MMS 基因阳性克隆质粒经 PCR 扩增、产物电泳,在 129 bp 处有单一特异亮带(见图 1);对阳性克隆质粒进行序列测定,其碱基序列与 L01755 序列中 111 ~ 239 bp 间的序列完全一致(见图 2)。



注:1、2 号泳道分别表示分子标尺 Marker DL2000 和重组质粒 *MMS* 靶基因 129 bp 特异扩增条带

图 1 *MMS* 靶基因重组质粒 PCR 产物电泳结果

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of the PCR product for the recombinant plasmids with *MMS* gene

2.2 反应体系的优化结果

经矩阵法优化,当反应体系中引物和探针的终浓度分别为 0.4 和 0.2 μ mol/L 时,可获得最小 *Ct* 值且 ΔRn 值较大,为最佳的反应浓度。各浓度优化结果见表 2。

2.3 反应体系特异性试验结果

对 25 株非目标菌株 DNA 模板进行的实时荧光

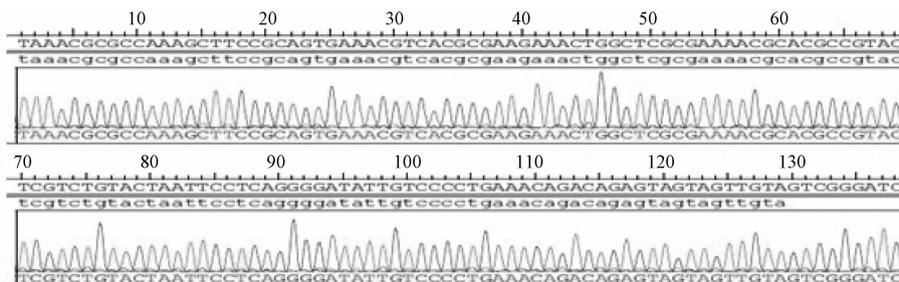


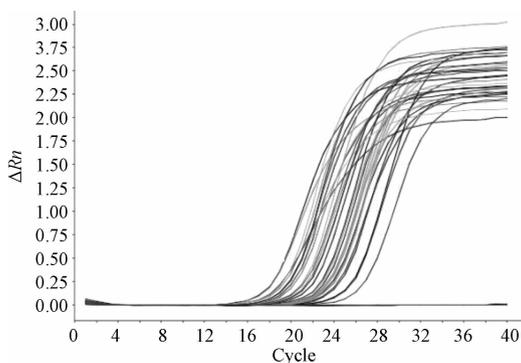
图 2 *MMS* 靶基因重组质粒序列测定结果

Figure 2 The sequence result for the *MMS* gene of recombinant plasmids

表 2 引物、探针浓度优化的 C_t 值和 ΔRn 值结果 ($\mu\text{mol/L}$)

引物终浓度	探针终浓度			
	0.2	0.4	0.6	0.8
0.2	22.25/1.32	22.32/1.36	22.52/1.40	22.58/1.37
0.4	18.86/1.92	19.87/1.66	20.65/1.76	21.54/1.72
0.6	21.32/1.53	21.63/1.62	21.02/1.71	21.37/1.90
0.8	22.53/1.46	21.54/1.67	20.36/1.78	21.52/1.92
1.0	22.62/1.39	21.76/1.78	20.72/1.90	20.36/1.88

PCR 检测,结果均无特异性扩增曲线,反应体系仅对 30 株克罗诺杆菌有特异性扩增(图 3)。



注:阳性扩增曲线为 30 株克罗诺杆菌特异性扩增结果

图 3 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 特异性试验结果

Figure 3 Specific test for the TaqMan-MGB real-time PCR

2.4 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

对克罗诺杆菌 *MMS* 靶基因重组质粒 10 倍稀释,取 $10^8 \sim 10^3$ 拷贝/ μl 的稀释梯度进行实时荧光 PCR 定量标准曲线的构建。结果显示,定量标准曲线相关系数 $r^2 = 0.999$,标准曲线斜率 -3.323 ,截距 39.484 (图 4)。DNA 拷贝数与 C_t 值的线性方程为: $C_t = -3.323 \log \text{concentration} + 39.484$ 。在对样品进行检测时,根据其 C_t 值和线性方程就可获得该样品 DNA 拷贝数。

2.5 灵敏度试验结果

对 $10^0 \sim 10^9$ 拷贝/ μl 的梯度稀释的 *MMS* 基因重组质粒的灵敏度试验结果显示,该反应体系至少能检测到 10 拷贝/反应(见图 5)。克罗诺杆菌灵敏度测试用原始浓度菌液平板计数为 3.8×10^7 cfu/ml;对纯菌液和人工模拟污染样本的最低检测限分别达 3.8 和 38 cfu/ml(见表 3)。

2.6 两种实时荧光 PCR 比较结果

本研究建立的 TaqMan-MGB 探针和美国 FDA 推荐的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法对克罗诺杆菌 10 个 DNA 系列稀释梯度的比较结果显示:在检测时间方面,本研究建立的 TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 仅需 40 min, TaqMan 探针实时荧光 PCR 耗时约 2 h;对于每一个 DNA 稀释梯度的 C_t

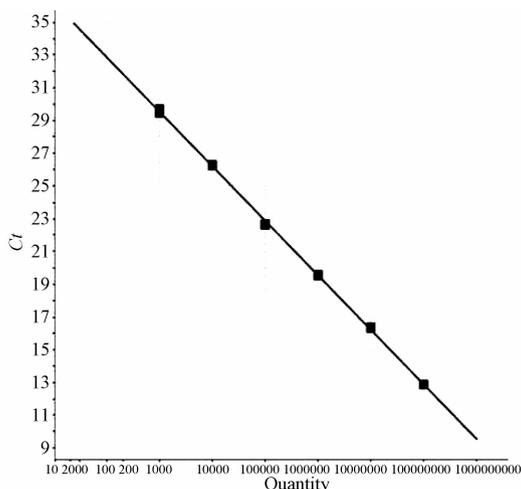
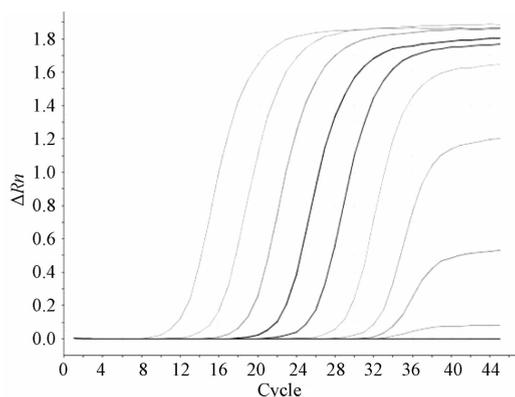


图 4 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 标准曲线图

Figure 4 Standar curve for the TaqMan-MGB quantitative real-time PCR



注:扩增曲线从左至右分别为 $10^9 \sim 10^1$ 拷贝/ μl ; 10^0 拷贝/ μl 的扩增曲线与阴性对照重合在一起,没有 S 型扩增曲线,所以没有标注

图 5 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 对重组质粒的灵敏度试验结果

Figure 5 Sensitivity for the recombinant plasmids by TaqMan-MGB quantitative real-time PCR

表 3 实时荧光 PCR 对纯菌和人工模拟污染样品灵敏度试验结果

Table 3 Sensitivity for pure cultures and contaminated food samples by real-time PCR

稀释度	平板计数 /(cfu/ml)	纯菌检测		人工模拟污染样品	
		C_t	定量结果	C_t	定量结果
10^{-1}	3.8×10^6	17.692	3.6×10^6	18.872	1.6×10^6
10^{-2}	3.8×10^5	20.981	3.7×10^5	21.325	2.9×10^5
10^{-3}	3.8×10^4	23.895	4.9×10^4	24.614	2.9×10^4
10^{-4}	3.8×10^3	27.458	4.1×10^3	28.241	2.4×10^3
10^{-5}	3.8×10^2	30.876	3.8×10^2	31.561	2.4×10^2
10^{-6}	3.8×10^1	34.482	3.2×10^1	35.953	1.1×10^1
10^{-7}	3.8×10^0	36.959	5.7×10^0	—	—

注:—表示未检测到信号值

值, TaqMan-MGB 探针法均比 TaqMan 探针法小,且检测限高 1 个稀释度,配对 t 检验统计分析,两种方

法的 Ct 值差异有统计学意义 ($t = -14.406, P < 0.01$); 在荧光强度方面, TaqMan-MGB 探针法均比 TaqMan 探针法高, 两种方法的 ΔRn 值差异有统计学意义 ($t = 14.230, P < 0.01$), 比较结果见表 4。

表 4 两种实时荧光 PCR 灵敏度试验比较结果

Table 4 Comparison of sensitivity results of TaqMan-MGB and TaqMan probe-based real-time PCR

DNA 稀释度	Ct		ΔRn	
	TaqMan-MGB PCR	TaqMan PCR	TaqMan-MGB PCR	TaqMan PCR
10^{-0}	11.023	12.536	2.90	2.10
10^{-1}	14.142	15.652	2.75	2.00
10^{-2}	17.215	18.853	2.50	1.95
10^{-3}	20.324	21.962	2.45	1.80
10^{-4}	24.201	25.763	2.25	1.75
10^{-5}	27.481	29.853	2.00	1.55
10^{-6}	30.906	32.872	1.85	1.30
10^{-7}	33.904	35.216	1.75	1.10
10^{-8}	35.812	—	1.30	—
10^{-9}	—	—	—	—

注:—表示未检测到信号值

3 小结

本研究利用 TaqMan-MGB 探针的技术优势, 建立快速、特异、灵敏的实时荧光定量 PCR 检测方法, 解决了当前克罗诺杆菌分离培养操作繁琐、检测时间长的问题, 提高了检测速度、灵敏度、准确度, 可应用于婴幼儿奶粉中克罗诺杆菌的快速筛查和鉴定, 能够及时、有效地进行食品安全风险评估和预警, 降低对婴幼儿群体健康的生物危害, 防止食源

性疾病的传播。

参考文献

- [1] 宋蕴如. 柳江县市售国产婴幼儿配方粉中阪崎肠杆菌污染监测分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(5): 464-466.
- [2] Healy B, Cooney S, O'Brien S, et al. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen [J]. Foodborne Pathog Dis, 2010, 7(4): 339-350.
- [3] 袁飞, 徐宝梁, 任发政, 等. 奶粉中阪崎肠杆菌的风险评估[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 261-265.
- [4] Block C, Peleg O, Minster N. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii* [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002, 21(8): 613-616.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.40—2010 食品卫生微生物学检验-阪崎肠杆菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [6] KANG S E, Nam Y S, HONG K W. Rapid detection of *Enterobacter sakazakii* using TaqMan real-time PCR assay [J]. J Microbiol Biotechnol, 2007, 17(3): 516-519.
- [7] LIU Y, CAI X N, ZHANG X, et al. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 65(1): 21-31.
- [8] Kandhai M C, Heuvelink A E, Reij M W, et al. A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in The Netherlands between 2001 and 2005 [J]. Food Control, 2010, 21(8): 1127-1136.
- [9] Igor V K, Irina A A, Alan M, et al. 3'-Minor groove binder-DNA probe increase sequence specificity at PCR extension temperatures [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(2): 655-661.
- [10] 孟双, 李娟, 王艳, 等. 阪崎肠杆菌实时荧光双重 TaqMan PCR 快速检测体系的建立 [J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(10): 857-860.
- [11] Seo K H, Brackett R E. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(1): 59-63.

· 公告 ·

关于批准食品包装材料用添加剂新品种等的公告

根据《中华人民共和国食品安全法》和《食品相关产品新品种行政许可管理规定》的规定, 现批准 3,4-二乙酰氧基-1-丁烯等 4 种物质为食品包装材料用添加剂新品种, 环氧丙烷改性的乙烯-乙醇醇聚合物为食品包装材料用树脂新品种, 十八酸钴盐等 3 种食品包装材料用添加剂扩大使用范围。

特此公告。

附件: 1. 4 种食品包装材料用添加剂新品种(略)

2. 1 种食品包装材料用树脂新品种(略)

3. 3 种扩大使用范围的食品包装材料用添加剂(略)

(相关链接: <http://www.nhfdc.gov.cn/sps/s7890/201401/98263bfea50048789b62f5dcd2867d13.shtml>)