

实验技术与方法

产气荚膜梭菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 特异性引物设计和方法验证

马嘉琦^{1,2}, 孙波^{1,2}, 马红梅^{1,2}, 王东^{1,2}, 赵志军^{3,4}, 李勇^{1,2}, 曾瑾^{1,2}

- (1. 宁夏大学西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏银川 750021; 2. 宁夏大学生命科学学院, 宁夏银川 750021; 3. 宁夏医科大学总医院宁夏临床病原微生物重点实验室, 宁夏银川 750021; 4. 宁夏医科大学总院医学实验中心, 宁夏银川 750021)

摘要:目的 建立针对水样中产气荚膜梭菌检测的 TaqMan 实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)方法,并测试该方法在自来水样中的检测效果。方法 选择位于该菌拟核中高度保守的 *plc* 基因,设计特异性引物和 TaqMan 探针,经优化后建立了针对该菌的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法,结合滤膜法处理含有 *plc* 基因的标准菌株的模拟污染水样,并对所建立的方法进行测试。结果 所建立的产气荚膜梭菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法具有高度的特异性,13 株食源性致病菌、3 株艰难梭菌及 1 株腐败梭菌的 Ct 值大于 40;该方法的最低检出限为 1×10 copies/ μ L,具有较高的灵敏性;对模拟污染水样的最低检测限为 1.0×10^2 CFU/mL。应用该方法对 4 份人工模拟污染阳性水样与 90 份自来水样进行检测发现,2 份 1.0×10^2 CFU/mL 的模拟污染水样可检出产气荚膜梭菌,2 份 1.0×10 CFU/mL 的模拟污染水样与 90 份自来水样均未检出产气荚膜梭菌。结论 所建立的产气荚膜梭菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法具有特异性好、灵敏性高的优点,对水体中产气荚膜梭菌的检测具有较高的应用价值。

关键词:产气荚膜梭菌;实时荧光定量 PCR;TaqMan 探针法;水样检测;食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)02-0147-09

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.02.006

Establishment and application of a TaqMan-based real-time fluorescence quantitative PCR detection method for *Clostridium perfringens*

MA Jiaqi^{1,2}, SUN Bo^{1,2}, MA Hongmei^{1,2}, WANG Dong^{1,2}, ZHAO Zhijun^{3,4}, LI Yong^{1,2}, ZENG Jin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in the Western, Ningxia University, Ningxia Yinchuan 750021, China; 2. College of Life Science, Ningxia University, Ningxia Yinchuan 750021, China; 3. Ningxia Key Laboratory of Clinical Pathogenic Microorganism, General Hospital of Ningxia Medical University, Ningxia Yinchuan 750021, China; 4. Medical Experimental Center, General Hospital of Ningxia Medical University, Ningxia Yinchuan 750021, China)

Abstract: Objective A TaqMan-based real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) method was established to detect *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) in tap water samples. **Methods** The highly conserved *plc* gene located in the pseudonucleus of the bacterium was amplified and specific primers and TaqMan probes were designed. After optimization, a TaqMan-based real-time fluorescence quantitative PCR detection method was established. Combined with the filter membrane method, simulated polluted water samples of standard strains containing *plc* genes were treated, and the established method was tested. **Results** The established TaqMan-based method for detecting *C. perfringens* showed high specificity. Ct >40 were found in 13 foodborne pathogens, 3 *Clostridium difficile* and 1 *Clostridium putrefaciens* strain. The detection limit of this method was 1×10 copies/ μ L, showing high sensitivity. The minimum detection limit for the simulated polluted water sample was 1.0×10^2 CFU/mL. This method was also used to detect 4 simulated water

收稿日期:2022-12-26

基金项目:宁夏自然科学基金重点项目(2022AAC02019);宁夏回族自治区重点研发计划重点项目(2021BEF02028)

作者简介:马嘉琦 女 硕士研究生 研究方向为动物病原生物学 E-mail:18295503565@163.com

通信作者:曾瑾 女 教授 研究方向为病原微生物学 E-mail:zengjin@nxu.edu.cn

李勇 男 教授 研究方向为病原微生物学 E-mail:liyong7732@nxu.edu.cn

曾瑾和李勇为共同通信作者

contamination samples and 90 imported water samples. The results showed that *C. perfringens* could be detected in 2 simulated 1.0×10^2 CFU/mL-contaminated water samples, while not in 2 simulated 1.0×10 CFU/mL-contaminated and imported water samples. **Conclusion** The TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR method established in this study for the detection of *C. perfringens* has good specificity, high sensitivity, and practical value for detecting *C. perfringens* in water samples.

Key words: *Clostridium perfringens*; real-time fluorescent quantitative PCR; TaqMan probe method; water sample detection; foodborne pathogens

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)常在食物、土壤、污水、粪便及人和动物的肠道中检出^[1],是一种食源性条件致病菌,能引起人的食物中毒,表现为严重的腹痛、腹泻,甚至引起血痢和坏死性肠炎^[2],对食品安全造成严重影响。由该菌引起的食物中毒事件在欧美等国家和地区时有发生^[2-3],而我国居民的饮食结构以熟食和沸水为主,该菌引起的食源性公共安全事件报道不多,但由于该菌所产生的芽胞在水中能存活数月,对外部环境有较强抵抗力,常规消毒方法不能将其灭活^[4]。因此检测水体中产气荚膜梭菌对评价水质资源的质量和安全性具有重要意义。一些研究认为,鉴于产气荚膜梭菌所产芽胞在环境中的稳定性,可以作为粪便污染的指示性微生物,而建议将该菌作为评价饮用水品质以及水质污染程度的指示菌^[5-6]。欧盟于1998年12月制定的《欧盟饮用水水质指令》(98/83/EC)将产气荚膜梭菌作为水质卫生指标^[7]。国际标准化组织《食品和动物饲料微生物学-产气荚膜梭菌计数的水平方法-菌落计数技术》(ISO7937:2004)^[8]中规定了食品与动物饲料中产气荚膜梭菌的菌落计数检测方法。《出口食品中致病菌环介导恒温扩增(LAMP)检测方法第10部分:产气荚膜梭菌》(SN/T 2754.10—2011)^[9]中规定了出口食品中产气荚膜梭菌的筛选检测方法。2018年我国发布《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水》(GB 8537—2018)^[10]规定产气荚膜梭菌为必检菌株之一,即每50 mL饮用天然矿泉水中检出标准为0 CFU。因此,产气荚膜梭菌作为重要的食源性致病菌以及重要的饮用水指示菌,建立对其进行准确、快速、灵敏的检测方法具有重要的意义。

产气荚膜梭菌是一种较为严格的厌氧菌,对营养条件要求较苛刻,其生长需要在氮源丰富的硫乙醇酸盐培养基或脑心浸液培养基中进行厌氧培养,培养方法复杂,而检测鉴别则需要卵黄培养基,而且需要专用的厌氧培养箱或厌氧产气袋进行培养,因此传统检测产气荚膜梭菌方法存在检测周期较长、技术要求高、过程繁琐且检出率低等问题^[11]。而聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)等分子生物学检测方法能够特异性地从少量细菌

中扩增目的DNA,简单、快速和重复性高,且无需对待检目标菌进行培养即可进行检测,检出率高,目前已被广泛运用于食源性病原体的检测^[12]。实时荧光定量PCR(Real-time quantitative fluorescent PCR)是在DNA扩增过程中将荧光探针或荧光染料添加于PCR反应体系中,通过荧光信号的累积实现对PCR进程的监测,利用标准曲线对待测基因作定量分析的方法^[13]。其中,TaqMan探针法利用设计的特异性与靶序列相匹配的带有荧光分子的寡核苷酸序列与PCR扩增过程中获得的的目的产物相结合,水解后产生荧光信号,相比实时荧光定量PCR直接加入荧光染料,特异性更为优秀,且具有开发为高通量、多重基因检测的潜质^[14]。

本研究选择存在于各种株型产气荚膜梭菌拟核中的特异性 plc 基因作为检测用靶基因,设计引物和TaqMan探针,建立产气荚膜梭菌基于TaqMan探针的荧光定量PCR检测方法,并与《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》(GB 8538—2016)中的滤膜法^[15]相结合,建立模拟污染水样的检测方法,并应用该方法对90份自来水样品及4份人工模拟污染的阳性对照样品进行检测,以期快速检测水体中产气荚膜梭菌提供方法支持。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

供试菌株来源于本实验室保存及北京美莱博医学科技有限公司(表1)。

1.2 主要仪器与试剂

qTOWER3 G实时荧光定量PCR仪(德国耶拿公司 Analytik Jena);Tone 96GPCR仪(德国 Biometra 公司);电泳装置与凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);恒温振荡培养箱(中国上海旻泉仪器有限公司);生物安全柜(中国苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);智能型生化培养箱(中国上海琅环实验设备有限公司)。

细菌基因组DNA提取试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司);2×PCR Taq Mix、引物探针(北京美莱博医学科技有限公司);2×Easy TaqPCR

表 1 实验菌株

Table 1 Bacterial strains used in study

菌株名称	菌株来源
产气荚膜梭菌 A 型 (<i>C. perfringens</i>)	ATCC 3624 ^[16]
产气荚膜梭菌 A 型 (<i>C. perfringens</i>)	C57-1 ^[16]
产气荚膜梭菌 B 型 (<i>C. perfringens</i>)	C58-1 ^[16]
产气荚膜梭菌 B 型 (<i>C. perfringens</i>)	C58-2 ^[16]
产气荚膜梭菌 C 型 (<i>C. perfringens</i>)	C59-2 ^[16]
产气荚膜梭菌 C 型 (<i>C. perfringens</i>)	C59-41 ^[16]
产气荚膜梭菌 C 型 (<i>C. perfringens</i>)	C59-42 ^[16]
产气荚膜梭菌 D 型 (<i>C. perfringens</i>)	C60-2 ^[16]
腐败梭菌 (<i>Clostridium septicum</i>)	C55-1 ^[16]
艰难梭菌 (<i>Clostridium difficile</i>)	临床分离株
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC 6538
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC 25923
表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	ATCC 35984
表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	ATCC 14990
肺炎链球菌 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	ATCC 13883
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	ATCC 8739
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	ATCC 25922
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	ATCC 15442
伤寒沙门菌 (<i>Salmonella typhi</i>)	ATCC 14028
粪肠球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	ATCC 29212
肺炎克雷伯菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	CMCC 46117
单核细胞增生李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 19114
乙型溶血性链球菌 (<i>Beta hemolytic streptococcus</i>)	CMCC 3221

注: ATCC: 美国模式菌种收集中心; CMCC: 中国医学微生物菌种保藏管理中心

SuperMix (+dye) (北京全式金生物技术股份有限公司); 液体硫乙醇酸盐培养基、蛋白胨、酵母提取物 (青岛海博生物技术有限公司); 琼脂糖 (上海贝晶生物技术有限公司); 50×TAE Buffer (赛文创新 (北京) 生物科技有限公司); 0.22 μm 水系滤膜与可换膜过滤器均购于上海市新亚净化器件厂。

1.3 产气荚膜梭菌 *plc* 基因检测标准品质粒的构建

为所建立的产气荚膜梭菌 TaqMan 探针的荧光定量 PCR 检测方法提供阳性参考品, 构建了含产气荚膜梭菌 *plc* 基因的检测标准品质粒。

首先提取产气荚膜梭菌 ATCC 3624 基因组 DNA 作为模板获取 *plc* 基因。PCR 体系为: 基因组 DNA 2 ng, 引物 CPA-F 与 CPA-R (10 μmol/L) 各 1 μL (引物序列见表 2), dNTP 4 μL, 10×Taq DNA 聚合酶缓冲液 5 μL, Taq DNA 聚合酶 5 U, DEPC 水补足至 50 μL。反应程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 7 min^[17]。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 采用胶回收法获得目的基因片段, 经 *Sma* I 及 *Bam*H I 双酶切后与同样酶切处理的 pUC57 载体过夜连接, 转化至 *DH5α* 感受态细胞中; 选择阳性菌落, 提取质粒, 经核苷酸序列测定鉴定正确后, 将重组质粒命名为 pUC57-*plc*,

表 2 产气荚膜梭菌检测标准品 *plc* 基因引物序列Table 2 Primers sequence of *C. perfringens plc* gene

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp
CPA-F	CCGGGCCCTCAAAGGATAATAGTTGG (<i>Sma</i> I)	600
CPA-R	GGATCCGTCATCTGTTCCAGCATCTTTTC (<i>Bam</i> H I)	

作为 *plc* 基因检测标准品。

依据以下公式计算重组质粒拷贝数^[18]:

$$\text{拷贝数 (copies/}\mu\text{L)} = (6.02 \times 10^{23}) \times (\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (660 \times \text{碱基数})$$

1.4 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

1.4.1 *plc* 基因检测引物与探针的设计

根据 GenBank 中公布的高度保守基因 *plc* (GenBank: MK599266.1), 设计特异性引物和探针。VIC 和 BHQ1 分别作为该探针的荧光报告基因及淬灭基团。

表 3 产气荚膜梭菌 *plc* 基因检测引物及探针序列Table 3 Primers and probe sequence of *C. perfringens plc* gene

引物/探针名称	引物/探针序列 (5'→3')	产物长度/bp
<i>plc</i> -F	ATTCTATCTTGGAGAGGCTATGC	115
<i>plc</i> -R	CTCTGCAAAAAGTCTCAAACCTAACA	
<i>plc</i> -P	VIC-CGCTATCAACGGCAGTAACATTAGCAG	

通过在线工具 Primer-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对该引物的特异性进行验证, 再通过常规 PCR 对荧光定量 PCR 引物进行特异性验证。

1.4.2 标准曲线的建立

以产气荚膜梭菌标准品质粒 pUC57-*plc* 为模板, 建立 10 μL 反应体系, 反应体系为: 2×PCR Taq Mix 5 μL, *plc*-F、*plc*-R 各 0.25 μL (10 μmol/L), 探针为 0.3 μL (10 μmol/L), 模板 1 μL, DEPC 水补至 10 μL。反应程序: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s; 42 个循环。根据拷贝数计算公式, 使用 TE 缓冲溶液将标准品质粒 pUC57-*plc* 拷贝数稀释至 1×10⁶ copies/μL, 再依次进行 10 倍梯度稀释, 使用 10²~10⁶ copies/μL 浓度的重组质粒稀释液作为模板; 将拷贝数对数值作横坐标, 将 Ct 值作纵坐标, 生成标准曲线。

1.4.3 特异性实验

依据基因组 DNA 提取试剂盒, 提取 7 株产气荚膜梭菌、1 株腐败梭菌及其他 16 株食源性致病菌的 DNA (表 1), 将提取好的 DNA 分装储存备用。

利用所建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 反应体系, 分别以 7 株产气荚膜梭菌以及 13 株食源性致病菌 DNA 为模板, 运行实时定量荧光 PCR 程序, 检

测实时荧光定量 PCR 检测方法的特异性。同时,选择与产气荚膜梭菌同属的 1 株腐败梭菌及 3 株艰难梭菌分离株 DNA 为模板进一步检测该体系在梭菌属中的检测特异性。

1.4.4 灵敏性实验

分别以 $10^0\sim 10^6$ copies/ μL 的标准品质粒 pUC57-*plc* 作为模板,运行实时定量荧光 PCR 程序,检测 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的灵敏性。

1.5 人工模拟污染样品检测

将以上建立好的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法对人工模拟污染样品进行检测。将初始浓度为 1×10^8 CFU/mL 的产气荚膜梭菌质粒标准菌株 DH5 α (pUC57-*plc*)作 10 倍梯度稀释,将每个稀释梯度的稀释液分别吸取 1 mL 与 50 mL 无菌水样充分混匀,通过孔径为 0.22 μm 的无菌水系滤膜进行过滤富集菌体,无菌取出滤膜,剪碎后置于无菌的 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL 无菌水,涡旋振荡 15~20 min 后吸出液体,通过煮沸法提取核酸,将其作为模板进行检测,并与常规 PCR 作比较。

1.6 自来水样品的检测

将以上建立好的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法对采集的自来水样品进行检测。从实验楼、及宿舍楼等不同楼宇采集自来水水样共 90 份,每一份样品为 50 mL,样品采集、保存及处理遵循《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》(GB 8538—2022)。分别设置阳性对照、阴性对照及 2 份 1×10^2 CFU/mL 与 2 份 1×10 CFU/mL 的产气荚膜梭菌标准品人工模拟污染的阳性对照样品,将 90 份自来水样品及 4 份人工模拟污染的阳性对照样品通过滤膜法过滤富集菌体,并采用煮沸法提取核酸进行检测。

2 结果

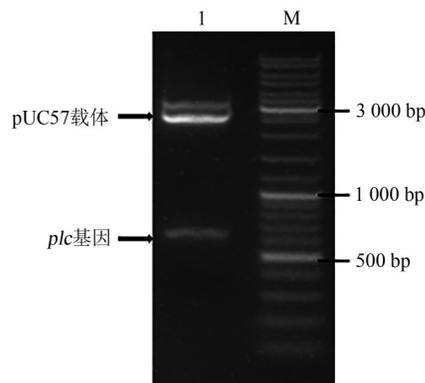
2.1 标准品质粒的构建

利用 PCR 技术,从产气荚膜梭菌 ATCC 3624 基因组 DNA 中获得 *plc* 基因片段,将其克隆至载体 pUC57 中,构建重组质粒标准品 pUC57-*plc*。提取重组质粒后进行 *Sma* I/*Bam*H I 双酶切鉴定,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,获得 640 bp 的目的基因和 2 660 bp 的载体基因片段,与理论结果相符。经核苷酸序列分析鉴定,表明产气荚膜梭菌 *plc* 基因检测标准品质粒 pUC57-*plc* 构建成功(图 1)。

2.2 方法的建立及结果

2.2.1 引物的特异性验证

通过 Primer-BLAST 在线工具设计产气荚膜梭菌 TaqMan 荧光定量 PCR 引物并检测其特异性;



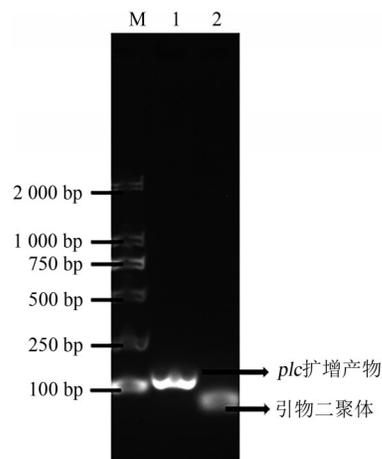
注:M:DNA Marker;1:*Sma* I/*Bam*H I 双酶切

图 1 pUC57-*plc* 重组质粒的酶切鉴定图

Figure 1 Enzyme digestion identification of pUC57-*plc* recombinant plasmids

Primer-BLAST 结果显示该引物仅能与产气荚膜梭菌相匹配,表明该引物具有良好的序列特异性。

以阳性标准品质粒 pUC57-*plc* 为模板,通过常规 PCR 进一步检测所设计荧光定量引物的特异性产物。结果显示,该引物仅可扩增出一条特异性条带,阴性对照仅为一条小于 100 bp 的引物二聚体条带(图 2)。



注:M:DL2000 DNA Marker;1:pUC57-*plc*;2:阴性对照

图 2 荧光定量引物特异性常规 PCR 结果

Figure 2 Fluorescent quantitative primer specific routine PCR results

2.2.2 标准曲线建立

以 $10^2\sim 10^6$ copies/ μL 浓度的产气荚膜梭菌 *plc* 基因检测标准品质粒 pUC57-*plc* 稀释液为模板,采用产气荚膜梭菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 体系及程序,获得产气荚膜梭菌 TaqMan 荧光定量 PCR 标准曲线;结果显示,在 $10^2\sim 10^6$ copies/ μL 浓度范围内标准曲线的回归方程为 $y=-2.429x+33.02$,相关系数 $r=0.99$;表明在该浓度范围内产气荚膜梭菌标准品重组质粒拷贝数对数对应的 X 轴与 Ct 值对应的 Y 轴之间线性关系良好,进一步表明所设计的

引物与探针对产气荚膜梭菌 *plc* 基因的扩增效率较高, 荧光定量 PCR 体系稳定(图 3)。

2.2.3 特异性实验

以 7 株产气荚膜梭菌和 13 株食源性致病菌 DNA 为模板, 以 DEPC 水为阴性对照, 进行特异性

验证; 结果显示, 仅有 7 株产气荚膜梭菌有阳性扩增曲线, 13 株其他食源性致病菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、单核细胞增生李斯特菌等)均未见检测信号, 表明针对产气荚膜梭菌的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 体系具有良好的特异性(图 4)。

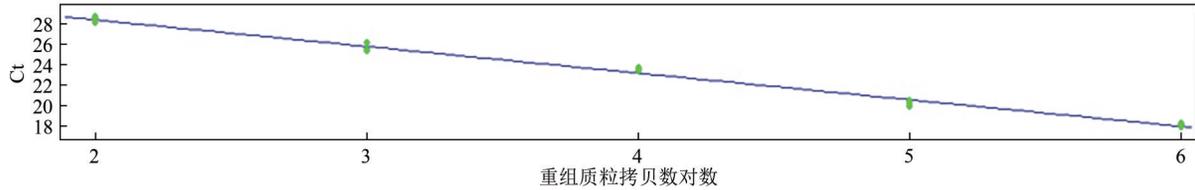
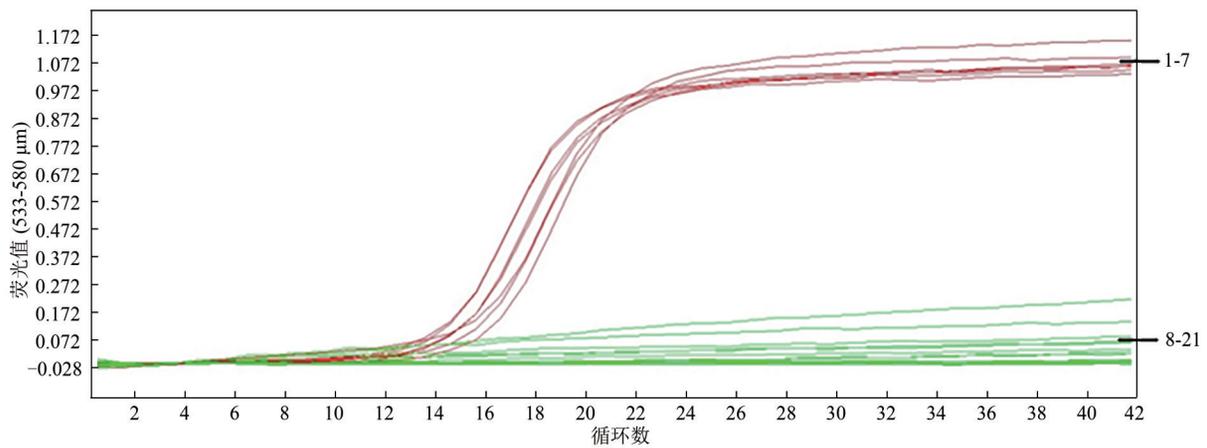


图 3 荧光定量 PCR 标准曲线

Figure 3 Standard curve of fluorescence quantitative PCR



注: 1: 产气荚膜梭菌 ATCC 3624; 2: 产气荚膜梭菌 57-1; 3: 产气荚膜梭菌 58-1; 4: 产气荚膜梭菌 58-2; 5: 产气荚膜梭菌 59-2; 6: 产气荚膜梭菌 59-41; 7: 产气荚膜梭菌 59-42; 8: 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538; 9: 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923; 10: 表皮葡萄球菌 ATCC 35984; 11: 表皮葡萄球菌 ATCC 14990; 12: 肺炎链球菌 ATCC 13883; 13: 大肠杆菌 ATCC 8739; 14: 铜绿假单胞菌 ATCC 15442; 15: 伤寒沙门菌 ATCC 14028; 16: 粪肠球菌 ATCC 29212; 17: 大肠杆菌 ATCC 25922; 18: 肺炎克雷伯菌 CMCC 46117; 19: 单核细胞增生李斯特菌 ATCC 19114; 20: 乙型溶血性链球菌 CMCC 3221; 21: 阴性对照

图 4 产气荚膜梭菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 的特异性实验

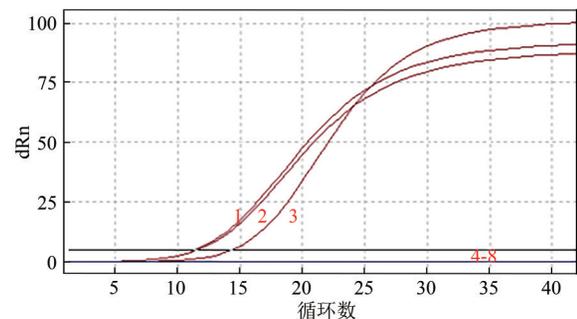
Figure 4 Specificity experiment of TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR for *Clostridium perfringens*

在此基础上, 以 3 株产气荚膜梭菌、3 株艰难梭菌及 1 株腐败梭菌 DNA 为模板, 以 DEPC 水为阴性对照, 进一步检测该体系在梭菌属中的检测特异性。结果显示, 仅有 3 株产气荚膜梭菌有阳性扩增曲线, 3 株艰难梭菌及 1 株腐败梭菌均未见检测信号, 进一步表明该方法特异性良好(图 5)。

2.2.4 灵敏性实验

分别以 $10^0 \sim 10^6$ copies/ μL 浓度产气荚膜梭菌 *plc* 基因检测标准品质粒 pUC57-*plc* 稀释液为模板, 检测产气荚膜梭菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测体系的灵敏性; 结果如图所示, 在浓度为 $10^1 \sim 10^6$ copies/ μL 时均有相应曲线扩增, Ct 值随拷贝数的降低而逐渐增加, 以 $\text{Ct} \leq 35$ 判定为阳性, 当 10^0 copies/ μL 时无荧光信号且未扩增出曲线, 判定为扩增阴性; 表明所建立的产气荚膜梭菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的最低限为 10 copies/ μL , 具有较高的灵敏

性(表 4, 图 6)。



注: 1: 产气荚膜梭菌 C59-2; 2: 产气荚膜梭菌 60-2; 3: 产气荚膜梭菌 ATCC3624; 4: 腐败梭菌 C55-1; 5-7: 艰难梭菌临床分离株; 8: 阴性对照

图 5 产气荚膜梭菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 对部分梭菌属细菌检测特异性实验

Figure 5 Specificity detection in *Clostridium* bacteria of TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR for *Clostridium perfringens*

表4 产气荚膜梭菌荧光定量PCR灵敏性实验 Ct 值

Table 4 Ct value of sensitivity test for fluorescence quantitative PCR of *C. perfringens*

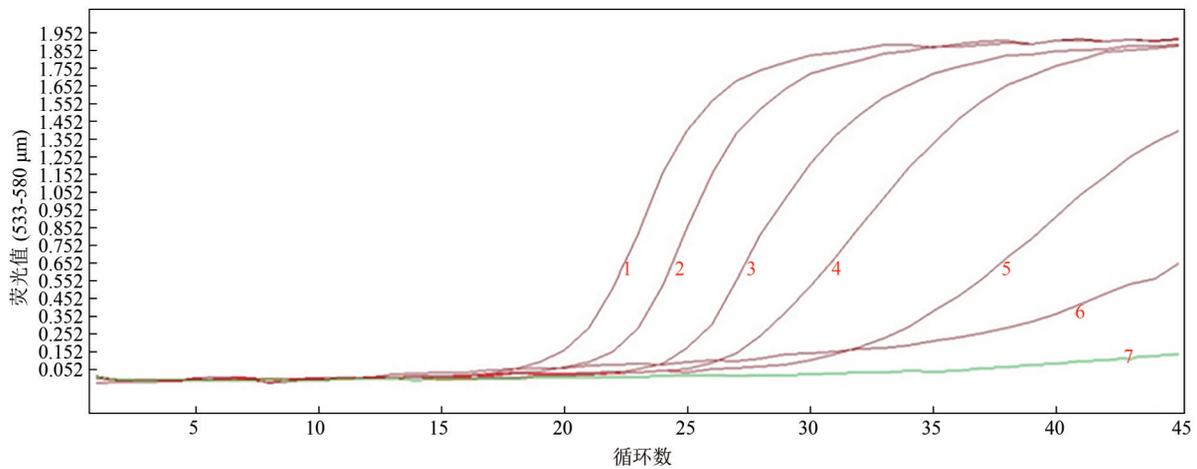
样品编号	Ct	拷贝数
1	18.47	1 000 000
2	20.57	100 000
3	23.75	10 000
4	26.06	1 000
5	29.24	100
6	32.15	10
7	—	1

2.3 人工模拟污染样品的检测

将产气荚膜梭菌质粒标准品菌株 *DH5α* (pUC57-*plc*) 以 10 倍梯度稀释后, 分别与 50 mL 无菌水样混合, 用 0.22 μm 的滤膜进行过滤富集菌体, 煮沸法提取核酸后用作模板; 应用所建立的产

气荚膜梭菌 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对产气荚膜梭菌标准品菌株人工模拟污染样品进行检测, 并与常规 PCR 方法进行比较。结果表明, 对产气荚膜梭菌人工模拟污染样品的常规 PCR 检测最低检出限为 10⁵ CFU/mL, TaqMan 荧光定量 PCR 方法的最低检出限为 10² CFU/mL, 与常规 PCR 方法相比, 该方法灵敏性提高了 1 000 倍。

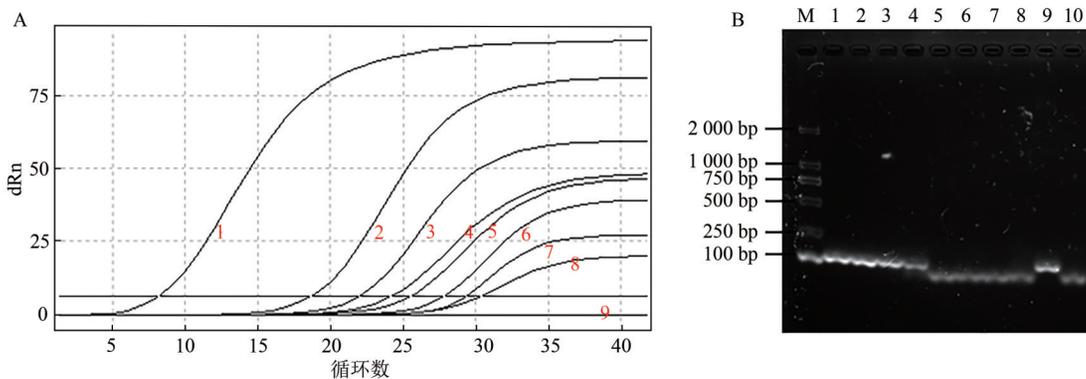
在荧光定量 PCR 检测过程中, Rn 是荧光报告基团与参比染料的荧光发射强度的比值, ΔRn 是扣除了背景信号之后的荧光值 (ΔRn=Rn-基线), 对检测值的判定更为准确。本实验中, 将 ΔRn 为 6.349 设为阈值时, Ct 值随着人工模拟污染样品浓度的降低而增加, 阳性样品的 Ct 值均小于 35, 10 CFU/mL 时 Ct 值大于 40, 判定为扩增阴性。



注: 1: 1×10⁶ copies/μL; 2: 1×10⁵ copies/μL; 3: 1×10⁴ copies/μL; 4: 1×10³ copies/μL; 5: 1×10² copies/μL; 6: 1×10¹ copies/μL; 7: 1×10⁰ copies/μL

图6 产气荚膜梭菌荧光定量PCR灵敏性扩增曲线图

Figure 6 Sensitivity amplification curve for quantitative fluorescent PCR of *C. perfringens*



注: A: 1: 阳性对照 (标准品质粒 pUC57-*plc*); 2: 1×10⁸; 3: 1×10⁷; 4: 1×10⁶; 5: 1×10⁵; 6: 1×10⁴; 7: 1×10³; 8: 1×10² CFU /mL; 9: 阴性对照。B: M: DNA Marker; 1: 1×10⁸ CFU /mL; 2: 1×10⁷ CFU /mL; 3: 1×10⁶ CFU /mL; 4: 1×10⁵ CFU /mL; 5: 1×10⁴ CFU /mL; 6: 1×10³ CFU /mL; 7: 1×10² CFU /mL; 8: 1×10¹ CFU /mL; 9: 阳性对照 (标准品质粒 pUC57-*plc*); 10: 阴性对照

图7 模拟污染样品 TaqMan 荧光定量 PCR(A)和常规 PCR 方法(B)的灵敏性试验

Figure 7 Sensitivity test of TaqMan fluorescence quantitative PCR (A) and conventional PCR method (B) for simulated contaminated samples

2.4 自来水样品的检测

运用本方法对所采集的 90 个自来水样品及 4 个人工模拟污染的阳性对照样品进行检测, 通过滤膜法

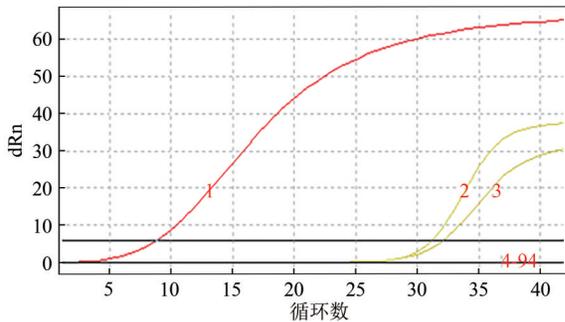
富集菌体并提取核酸; 结果显示, 2 份 1×10² CFU/mL 产气荚膜梭菌标准品菌株人工污染的阳性对照样品 Ct 值小于 35, 表明检测出产气荚膜梭菌, 由 1×

10 CFU/mL 产气荚膜梭菌标准菌株人工污染的 2 个阳性样品及 90 个自来水样品 C_t 值均大于 40, 表明未检测出产气荚膜梭菌(表 5、图 8)。

表 5 人工模拟污染样品检测 C_t 值

Table 5 C_t values of artificially simulated contaminated samples

样品编号	C_t	菌落数
1	8.9	阳性对照
2	18.73	10^8
3	22.04	10^7
4	24.19	10^6
5	25.49	10^5
6	27.84	10^4
7	29.35	10^3
8	30.36	10^2
9	—	10



注:1:阳性对照(标准品质粒 pUC57-*plc*);2-3: 1×10^2 CFU/mL 人工污染阳性对照样品;4-9:其他人工污染样品及自来水样品

图 8 产气荚膜梭菌 TaqMan 荧光定量 PCR 对自来水样品的检测

Figure 8 Detection of tap water samples by TaqMan fluorescence quantitative PCR for *C. perfringens*

3 讨论

近十年来全球范围内食源性疾病的发病率呈逐年上升的趋势,食源性疾病不仅对人类的健康和生命造成威胁,还会造成巨大的经济损失^[19]。产气荚膜梭菌被认为是自然界中分布最广泛的病原微生物之一,在人类和动物的胃肠道中有很高的检出率^[20],因此它常与食源性疾病的暴发有关。在美国产气荚膜梭菌被认为是第三大常见食源性病原菌,在英国产气荚膜梭菌是目前仅次于弯曲杆菌的第二大最常见的食源性病原菌,由于产气荚膜梭菌病常具有自限性,病例报告往往不足,目前的保守估计每年约有 8 万例胃肠炎病例^[21]。在中国,产气荚膜梭菌对畜牧业已造成严重影响,由该菌引起的疾病通常发病快、病程短、传染性强、死亡率高,造成了重大的经济损失^[22]。因此,建立一种反应速度快、特异性强、灵敏度高且操作简便的方法,对产气荚膜梭菌进行有效监控,从而对人类的健康保障与畜牧业的发展等都具有重要意义。

目前国内外已建立了许多针对产气荚膜梭菌的检测方法;ASKARI 等^[23]利用 PCR 方法对患病牛犊进行产气荚膜梭菌的检测并鉴定分型,但普通 PCR 方法较荧光 PCR 方法相比,具有耗费时间久、灵敏度低等劣势;鲍长磊等^[24]建立了间接 ELISA 方法,为产气荚膜梭菌的 α 毒素抗体检测试剂盒奠定了一定的研制基础;然而 ELISA 方法是针对产气荚膜梭菌产生的 α 毒素进行检测的,没有对待测物进行扩增的能力,灵敏度不及 PCR 检测方法,且价格昂贵,需要专用设备,因此该方法存在一定的局限性,特别是产气荚膜梭菌为条件致病菌,当该菌不产生毒素时,则无法通过该方法检测;刘哲等^[25]建立了环介导等温扩增检测方法,该方法需要 4~6 条设计复杂的引物,操作中容易产生气溶胶污染,且产物为一系列长度不一的产物,结果的特异性不够好。SRIDAPAN 等^[3]建立了一种环介导等温扩增与横流生物传感器相结合的检测产气荚膜梭菌的方法,该方法虽不需要昂贵的仪器,成本较低,但耗时久,待检菌富集至少 10 h,且富集前灵敏度为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/g,较荧光定量 PCR 低;DAVE^[26]建立了一步比色法检测食用罐头中的产气荚膜梭菌,该方法运用酶-底物反应原理,通过待测菌与特定溶液及吸水纸的颜色变化来判定,但颜色发生变化的时间不定,对实验易造成误差。

在针对水体中产气荚膜梭菌的检测方法中,往往还需结合滤膜法富集培养后进行检测^[11,27],但由于产气荚膜梭菌难培养的特性,会存在漏检的问题;郑萍等^[4]选取 α -*toxin* 基因作为检测产气荚膜梭菌的目标基因,对于重组质粒的最低限为 10 copies/ μ L,但文中未见对产气荚膜梭菌在水体中的应用研究;张谦等^[28]建立了检测矿泉水中致病菌的多重荧光 PCR 方法,该方法中使用 16S rDNA 作为检测用靶基因,对产气荚膜梭菌的最低检出限为 10² copies/ μ L,但 16S rDNA 基因虽然在物种中具有高度的保守性,但往往缺乏足够多的可变序列信息导致菌种间无法相互区分,从而造成假阳性结果。

本研究经对反应体系和程序的优化后,建立了具备良好特异性的产气荚膜梭菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法。所建方法选择在产气荚膜梭菌各种株型中均高度保守的 *plc* 作为靶基因,该基因编码的 α 毒素也是产气荚膜梭菌最重要的毒素之一^[24],因此选择 *plc* 作为检测用靶基因具有更优秀的特异性。经对 7 种不同株型的产气荚膜梭菌以及 13 株食源性致病菌进行检测后表明,7 株不同株型的产气荚膜梭菌 C_t 值均小于 20,而其他如金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌等 13 株食源性致病

菌的 Ct 值大于 40 均未检出。鉴于梭菌属的产气荚膜梭菌、腐败梭菌、艰难梭菌与肉毒梭菌均为有极高风险的食源性致病菌,而且其培养特性均有较强的相似性,在进行培养鉴别时难度较大。因此,本研究还进一步对所建立的产气荚膜梭菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法在梭菌属的部分菌株中的检测特异性进行了检测,结果表明,仅有 3 株产气荚膜梭菌可扩增出特异性曲线,进一步表明该方法具有良好的特异性。在对该方法进行灵敏性检测时表明,在 42 个循环之内,阳性结果反应的 Ct 值均低于 35,确定该方法的检测 Ct 值为 35。在此标准下,以产气荚膜梭菌质粒标准品菌株 *DH5α(pUC57-plc)* 为模板的最低检出限为 10 copies/ μ L。本研究利用构建的产气荚膜梭菌质粒标准品菌株 *DH5α(pUC57-plc)* 模拟污染水样对所建方法的灵敏性进行进一步检测,表明最低检出限为 10² CFU/mL,与常规 PCR 相比,所建立的方法灵敏性提高了 1 000 倍,且无需进行 PCR 后的琼脂糖凝胶电泳检测,能够极大地缩短检测时间。

应用本实验对 90 份自来水样品及 4 份人工模拟污染的阳性对照样品进行检测,结果显示,2 份 1 \times 10² CFU/mL 产气荚膜梭菌质粒标准品人工污染的阳性对照样品 Ct 值均低于 35,可检出产气荚膜梭菌,2 份 1 \times 10 CFU/mL 产气荚膜梭菌质粒标准品人工污染的阳性对照样品及 90 份自来水样品 Ct 值均大于 40,未检出产气荚膜梭菌。进一步验证了产气荚膜梭菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测人工污染样品的检出限为 1 \times 10² CFU/mL,表明该方法灵敏性较高,具有一定的实用价值。

本实验的优势体现在构建产气荚膜梭菌质粒标准品菌株 *DH5α(pUC57-plc)*,以此代替厌氧的、难培养的产气荚膜梭菌标准株作为检测过程中的阳性标准品;设计了特异性强的产气荚膜梭菌 *plc* 基因的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 法的引物和探针;同时,在制备水样待检样品时,以煮沸法代替试剂盒法提取核酸,更为经济简便;将所建立的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法与滤膜法相结合,能够快速、精准地检测水样中的产气荚膜梭菌。该方法的建立和应用,可为水体中产气荚膜梭菌的检测提供一种特异性强、灵敏度高、快速且便捷的检测方法。

参考文献

[1] JOHNSTON M D, WHITESIDE T E, ALLEN M E, et al. Toxigenic profile of *Clostridium perfringens* strains isolated from natural ingredient laboratory animal diets [J]. Comparative

Medicine, 2022, 72(1): 50-58.

- [2] BHATTACHARYA A, SHANTIKUMAR S, BEAUFOY D, et al. Outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning linked to leeks in cheese sauce: An unusual source[J]. Epidemiology and Infection, 2020, 148: e43.
- [3] SRIDAPAN T, TANGKAWSAKUL W, JANVILISRI T, et al. Rapid detection of *Clostridium perfringens* in food by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow biosensor [J]. PLoS One, 2021, 16(1): e0245144.
- [4] 郑萍, 毛怡心, 陈西平, 等. 水中产气荚膜梭菌的荧光定量 PCR 检测法[J]. 环境与健康杂志, 2017, 34(8): 698-700. ZHENG P, MAO Y X, CHEN X P, et al. Detection of *Clostridium perfringens* in water by fluorescent quantitative PCR [J]. Journal of Environment and Health, 2017, 34(8): 698-700.
- [5] PAYMENT P, FRANCO E. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(8): 2418-2424.
- [6] 欧盟. 欧盟饮用水水质指令 (98/83/EC) [J]. 净水技术, 2004, 23(S1): 24. European Union. EU drinking water quality directive (98/83/EC) [J]. Water Purification Technology, 2004, 23(S1): 24.
- [7] STELMA G N JR. Use of bacterial spores in monitoring water quality and treatment [J]. Journal of Water and Health, 2018, 16(4): 491-500.
- [8] International Technical Committee for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens*-Colony-count technique: ISO 7937: 2004[S]. Switzerland: Copyright Office of the International Organization for Standardization, 2004.
- [9] 国家质量监督检验检疫总局. 出口食品中致病菌环介导恒温扩增 (LAMP) 检测方法 第 10 部分: 产气荚膜梭菌: SN/T2754.10—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Loop-mediated isothermal amplification detection method for pathogens in export food-Part 10: *Clostridium perfringens*: SN/T2754.10—2011[S]. Beijing: Standards Press of China, 2011.
- [10] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水: GB 8537—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018. National Health Commission, State Administration for Market Regulation. National food safety standard-Drinking natural mineral water: GB 8537—2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018.
- [11] 章海通, 承海, 邢家漂, 等. 饮用天然矿泉水中产气荚膜梭菌检测方法的改良 [J]. 食品研究与开发, 2020, 41(4): 192-196. ZHANG H T, CHENG H, XING J L, et al. Improvement of detection method for *Clostridium perfringens* in drinking natural mineral water [J]. Food Research and Development, 2020, 41(4): 192-196.
- [12] TAO J, LIU W W, DING W, et al. A multiplex PCR assay with a common primer for the detection of eleven foodborne pathogens

- [J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(3): 744-754.
- [13] GREEN M R, SAMBROOK J. Analysis and normalization of real-time polymerase chain reaction (PCR) experimental data [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018, 2018(10): pdb.top095000.
- [14] PAN Z Z, LU J X, WANG N N, et al. Development of a TaqMan-probe-based multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of emerging and reemerging swine coronaviruses [J]. *Virulence*, 2020, 11(1): 707-718.
- [15] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法: GB 8538—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. National food safety standard- Methods for examination of drinking natural mineral water: GB 8538—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [16] 中国兽药监察所, 中国微生物菌种保藏管理委员会兽医微生物中心. 中国兽医菌种目录[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992: 38-45.
- China Veterinary Drug Control Institute, Veterinary Microbiology Center, China Microbiological Preservation and Control Committee. List of veterinary strains in China[M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1992: 38-45.
- [17] 曾瑾, 邓光存, 陈耀光, 等. 大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位与产气荚膜梭菌 β 1、 β 2毒素融合基因的构建及表达[J]. 黑龙江畜牧兽医(上半月), 2012, 413(9): 21-23.
- ZENG J, DENG G C, CHEN Y G, et al. Construction and expression of the fusion gene of beta1-toxin gene and beta2-toxin gene from *Clostridium perfringens* with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2012, 413(9): 21-23.
- [18] 王宇鹏, 齐浩, 林红丽, 等. 重组乳杆菌质粒拷贝数测定方法的建立[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(9): 40-42.
- WANG Y P, QI H, LIN H L, et al. Establishment of a method for determining the copy number of recombinant *Lactobacillus* plasmid [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2015, 51(9): 40-42.
- [19] 赵彤. 食源性致病菌检测现状与食品微生物危险性评估[J]. 中国卫生标准管理, 2019, 10(4): 7-9.
- ZHAO T. Detection status of foodborne pathogenic bacteria and food microbial risk assessment [J]. *China Health Standard Management*, 2019, 10(4): 7-9.
- [20] OHTANI K, SHIMIZU T. Regulation of toxin production in *Clostridium perfringens* [J]. *Toxins*, 2016, 8(7): 207.
- [21] KIU R, CAIM S, PAINSET A, et al. Phylogenomic analysis of gastroenteritis-associated *Clostridium perfringens* in England and Wales over a 7-year period indicates distribution of clonal toxigenic strains in multiple outbreaks and extensive involvement of enterotoxin-encoding (CPE) plasmids [J]. *Microbial Genomics*, 2019, 5(10): e000297.
- [22] 乔煜婷, 金鹰, 赵丽霞, 等. 内蒙古中西部地区牛产气荚膜梭菌病血清流行病学调查[J]. 兽医导刊, 2022, 385(3): 4-8.
- QIAO Y T, JIN Y, ZHAO L X, et al. Epidemiological survey on the seropositive rate of bovine *Clostridium perfringens* in central and western Inner Mongolia [J]. *Veterinary Orientation*, 2022, 385(3): 4-8.
- [23] ASKARI N, GHANBARPOUR R, KHEIRANDISH R, et al. Detection of *Clostridium perfringens* bacterium in the clinical specimens from blackleg calves: A report of two cases [J]. *Comparative Clinical Pathology*, 2017, 26(2): 255-259.
- [24] 鲍长磊, 何亚鹏, 张琪, 等. 产气荚膜梭菌 α 毒素的原核表达及间接ELISA的建立与应用[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(8): 939-945.
- BAO C L, HE Y P, ZHANG Q, et al. Establishment and application of an indirect ELISA with alpha-toxin protein of *Clostridium perfringens* expressed in *Escherichia coli* [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(8): 939-945.
- [25] 刘哲, 马晓燕, 张会彦, 等. 环介导等温扩增技术快速检测产气荚膜梭菌的研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(4): 168-174.
- LIU Z, MA X Y, ZHANG H Y, et al. The study on the detection of *Clostridium perfringens* by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(4): 168-174.
- [26] DAVE G A. A rapid qualitative assay for detection of *Clostridium perfringens* in canned food products [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2017, 64(2): 207-213.
- [27] 王晓娟, 王惠玉. 饮用天然矿泉水中产气荚膜梭菌检测遇到的问题及解决办法[J]. 中国食品, 2021(17): 54-55.
- WANG X J, WANG H Y. Problems and solutions in detection of *Clostridium perfringens* in drinking natural mineral water [J]. *China Food*, 2021(17): 54-55.
- [28] 张谦, 黄家瑞, 董睿. 矿泉水中四种致病菌多重荧光PCR检测法的建立[J]. 现代食品, 2020, 12(24): 198-200.
- ZHANG Q, HUANG J R, DONG R. Establishment of multiple fluorescence PCR detection method for four pathogenic bacteria in mineral water [J]. *Modern Food*, 2020, 12(24): 198-200.