

文章编号: 1673-1689(2011)05-0779-09

食源性肠球菌荧光定量 PCR 检测方法的建立与评价

吴晨璐¹, 施春雷^{*1}, 周敏¹, 杨捷琳², 史贤明¹

(1. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240; 2. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘要: 利用基因组序列比对分析等生物信息学方法发掘肠球菌新的属特异性靶点, 根据 42 个候选靶点序列设计 50 对引物, 结合普通 PCR 初筛和荧光定量 PCR 复筛, 挑选特异性和灵敏度等检测性能最佳的引物, 建立相应的荧光定量 PCR 检测方法, 并对该方法应用于食品中肠球菌检测时的效果作出评价。分析结果显示, 特异性最强的引物为 EF1902, 利用该引物建立的荧光定量体系检测肠球菌时均产生特异性扩增信号, 而检测非肠球菌菌株时均无特异性扩增信号形成。经优化 PCR 体系后, 该方法的基因组 DNA 检测灵敏度为 13.78 拷贝/PCR, 纯培养物灵敏度为 38.4 cfu/PCR。以肠球菌人工污染牛奶, 当初始接菌量为 2.63 cfu/mL 时, 只需增菌 6 h 即可用该方法检出肠球菌。对 52 份食品样品进行检测准确率为 94.23%, 证实了该方法可应用于食源性肠球菌的快速检测。综上所述, 作者建立的肠球菌荧光定量 PCR 方法, 特异性强且灵敏度高, 可应用于食品中肠球菌的快速检测。

关键词: 肠球菌; 荧光定量 PCR; 检测靶点

中图分类号: TS 207.7

文献标识码: A

Development and Evaluation of a Real-Time PCR System for *Enterococcus* spp. Detection in Food Samples

WU Chen-lu¹, SHI Chun-lei^{*1}, ZHOU Min¹, YANG Jie-lin², SHI Xian-ming¹

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. Shanghai Entry and Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: The aim of the study was to explore new detective targets for *Enterococcus* spp., with better performance in specificity and sensitivity, and subsequently to develop a real-time PCR method which could be effectively applied to rapid quantitative detection of enterococci. Genomic comparative analysis among *Enterococcus* and non-*Enterococcus* strains was conducted to screen the specific targets for enterococci, and 42 target fragments were selected for the design of 50 primer pairs. Their specificity and sensitivity were then evaluated by regular PCR and real-time PCR, respectively. Finally, the method was effectively evaluated while it was used in the detection of food samples. Analysis results showed that primer EF1902 was confirmed as the best primer due to its high specificity and sensitivity in real-time PCR tests. The results showed a specific amplification from 44 *Enterococcus* strains, whereas no amplification from 23 non-*Enterococcus*

收稿日期: 2010-11-28

基金项目: 上海市技术标准专项项目(08DZ0504200); 国家质检总局项目(2009IK155)。

* 通信作者: 施春雷(1977-), 女, 湖北襄樊人, 医学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品安全和食品生物技术方面的研究。Email: clshi@sjtu.edu.cn

strains. A detection limit of 13 78 copies/PCR for purified genomic DNA and 38 4 cfu/PCR for bacterial cultures could be achieved after PCR parameter optimization. Artificial contamination assays showed that *Enterococcus* could be detected by real-time PCR after 6 h enrichment, with an initial spike of 2 63 cfu/mL bacterium in milk samples. The real-time PCR method developed in this study was also applied to detect various food samples, and the positive rate of detection was 57. 69% . The accuracy was 94 23% compared with the conventional standard method, which demonstrates its potential for practical application. In conclusion, the real-time PCR system developed in this study was suitable for the rapid detection of *Enterococcus* spp in foods for its advantages in specificity, sensitivity, rapidness and accuracy.

Key words: *Enterococcus* spp , real-time PCR, detective target

肠球菌(*Enterococcus* spp) 是人和动物体内上呼吸道、口腔或肠道的常居菌, 当其定植于其它黏膜部位时, 能引起心内膜炎等临床感染^[1], 病死率达到 21. 0% ~ 27. 5%^[2], 是全球范围内主要的医院条件致病菌^[3]。肠球菌在乳制品、肉制品等食品中普遍存在^[4], 由于该菌对热、高盐等加工处理具有高耐受性, 容易在食品中大量增殖, 不但成为引发临床感染的重要途径^[5], 而且食后还能引发腹痛腹泻等肠道疾病^[6- 7]。食品分离株中常能检测到多重耐药基因^[8]和毒力基因^[9], 并且它们可以通过食物链转移到人群^[10], 从而引发更大的食品安全隐患。此外, 肠球菌还常用作监测水质卫生的微生物指标, 饮用天然矿泉水的国家标准(GB 8537-2008) 中规定不得检出粪肠球菌。

目前, 肠球菌主要的检测方法是活菌计数法(SN/T 1933 1- 2007), 该方法费时(48~ 72 h)、费力且灵敏度较低, 有很大的局限性。PCR 等分子检测技术已逐渐成为检测细菌的常用方法, 其中荧光定量 PCR 方法不但快速省力, 且能有效提高检测灵敏度, 实现污染物的定量检测。目前针对肠球菌属

的荧光定量 PCR 检测靶点主要是 16S rRNA^[11]、23S rRNA^[12- 14], 然而由于其基因序列保守性过强, 不同种属的细菌之间序列差异性较小, 以此靶点设计引物进行 PCR 扩增极易产生假阳性结果。

作者利用生物信息学方法在肠球菌全基因组序列中发掘新的检测靶点, 降低与其他常见致病菌基因序列的同源性, 并通过普通 PCR 和荧光定量 PCR 方法筛选具有强特异性、高灵敏度的引物。以此为基础建立荧光定量 PCR 体系, 并通过人工污染牛奶试验、实际样品的检测试验来评价其应用于食品样品检测的效果, 从而建立一种特异、灵敏、快速、准确的荧光定量 PCR 检测方法。

1 材料与方法

1. 1 材料

1. 1. 1 菌株 44 株肠球菌菌株、23 株非肠球菌菌株用于 PCR 体系的评价, 其中标准菌株由上海出入境检验检疫局馈赠, 其余菌株来源为北京大学医学院, 菌株信息及 PCR 检测结果见表 1。

表 1 菌株及 PCR 检测结果
Tab. 1 Bacterial strains used in the test of PCR specificity

菌名	菌株 编号	菌株 数量	PCR 结果 ^a		
			EF1902	EF0500	23S rRNA ^[14]
<i>Enterococcus faecalis</i>	Laboratory strain	20	+	+	+
<i>Enterococcus faecium</i>	Laboratory strain	20	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	ASL 130	1	+	+	+
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC27270	1	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC49452	1	+	+	+
<i>Enterococcus avium</i>	ATCC14025	1	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC14028	1	-	- ^b	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC13076	1	-	- ^b	-

续表 1

菌名	菌株 编号	菌株 数量	PCR 结果 ^a		
			EF1902	EF0500	23S rRNA ^[14]
<i>Salmonella paratyphi A</i>	ATCC 9159	1	—	— ^b	+
<i>Salmonella infantis</i>	ATCC51741	1	—	— ^b	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC5002	1	—	—	—
<i>Shigella dysenteriae</i>	CMCC51333	1	—	—	—
<i>Shigella flexneri</i>	CDC 51311	1	—	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC0114	1	—	—	—
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	ATCC43889	1	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	ATCC21148	1	—	—	—
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC50205	1	—	—	—
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC12453	1	—	—	+
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC33420	1	—	—	—
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC13047	1	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	1	—	—	—
<i>Kocuria rhizophila</i>	ATCC9341	1	—	—	—
<i>Serratia liquefaciens</i>	ATCC27592	1	—	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC27336	1	—	—	—
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC8090	1	—	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDC B32116	1	—	—	+
<i>Vibrio cholerae</i>	ATCC25871	1	—	—	—
<i>Vibrio fluvialis</i>	ATCC33810	1	—	—	—
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC27562	1	—	—	—

a PCR 结果中的“+”表示以对应引物进行 PCR 检测能扩增出目标产物;“—”表示不能扩增出目标产物;b. 进行实时荧光定量 PCR 检测时呈现假阳性结果。

1.1.2 主要试剂与仪器 Taq DNA 聚合酶、10× PCR Buffer、MgCl₂: 购自深圳 Fermentas 公司; Premix Ex TaqTM、MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit: 购自宝生物工程大连有限公司; EvaGreen 染料: 购自美国 Biotium 公司。

PCR 扩增仪 AG22331: 德国 Eppendorf 公司; 核酸与蛋白质分析仪 DU 800: 美国 Beckman Coulter; 电泳仪 RAD300: 美国 Amersham Biosciences; 全自动数码凝胶图像处理系统 Tanon GIS-2020: 中国天能科技有限公司; MJ 梯度 PCR 仪 PTG-200: 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 肠球菌基因组 DNA 提取及浓度测定

按照 MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit 产品说明书提供的方法提取肠球菌基

因组 DNA。将所提基因组 DNA 用无菌水稀释 100 倍, 用核酸与蛋白质分析仪在波长 260 nm 和 280 nm 下测定其纯度与浓度, 放置于- 20 ℃保存。

1.3 生物信息学方法发掘靶点及引物设计

下载 NCBI 肠球菌标准菌株 *Enterococcus faecalis* V583 全基因组序列, 根据作者所在实验室自主研发的基因组比对分析程序^[15] 展开靶点发掘。主要的分析过程包括构建本地细菌核酸序列数据库, 目标食源性致病菌编码序列 (coding sequence, CDS) 自动切割, BLAST 连续调用比对以及结果分析筛选等。在得到的靶基因库中选取与其他常见食源性致病菌基因序列同源性较低 (E value> 1. 0) 且长度大于 200 bp 的编码序列片断, 在 NCBI 网站进行在线 BLAST N 比对分析后, 得到理论上特异

性较强的序列片断作为候选靶点, 采用软件 Primer Premier 5 设计引物。所有引物均由上海生工生物技术服务公司合成。

1.4 普通 PCR 特异性评价

以候选靶点及相应引物为基础, 建立普通 PCR 体系对表 1 所列肠球菌和非肠球菌菌株进行检测, 从而初步评价靶点的特异性。

20 μL 的 PCR 体系包括 10 $\times$ PCR Buffer 2 μL , 25 mmol/L 的 MgCl_2 1.5 μL , 2.5 mmol/L 的 dNTP 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 1 μL , 模板 2 μL , 1 U/ μL 的 Taq DNA 聚合酶 1 μL 。PCR 循环参数: 在 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 接着 35 个循环, 每个循环的程序包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 循环结束后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。用 1.5 g/dL 琼脂糖凝胶电泳, 经 EB 染色后, 在凝胶成像仪下观察结果。

1.5 荧光定量 PCR 特异性评价

以上述普通 PCR 筛选出的引物建立荧光定量 PCR 体系对表 1 所列肠球菌和非肠球菌菌株分别进行检测, 以进一步评价靶点及引物的特异性, 并以文献中基于 23S rRNA 设计的引物作为对照。

荧光定量 PCR 体系的最终体积控制在 25 μL , 反应试剂均按 Premix Ex TaqTM 试剂说明书的推荐量添加。荧光定量 PCR 循环参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, 接着 40 个循环, 每个循环的程序包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 在 77 $^{\circ}\text{C}$ 停留 2 s, 读板。循环结束后溶解曲线从 65 $^{\circ}\text{C}$ 逐步升到 95 $^{\circ}\text{C}$, 在升温过程中每隔 1 $^{\circ}\text{C}$ 停留 2 s, 并采集荧光数据一次。

1.6 荧光定量 PCR 体系优化

保持 25 μL 的反应体系, 分别添加 0.5、1.0、1.25、1.5、2.0 μL 的染料量作荧光定量 PCR 扩增。分别选取引物的质量浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 $\mu\text{mol/L}$ 作荧光定量 PCR 扩增。

1.7 灵敏度评价

1.7.1 基因组 DNA 灵敏度评价 提取肠球菌标准菌株 ATCC 49452 的基因组 DNA 并测定其浓度。用无菌水作 10 倍系列梯度稀释, 每个稀释度取 2 μL 作为模板进行 PCR 扩增。

1.7.2 纯培养物灵敏度评价 将肠球菌标准菌株 ATCC 49452 接种于胰蛋白胨大豆肉汤中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下纯培养 6~8 h 后, 用无菌水作 10 倍系列梯度稀释, 选择 10^5 、 10^6 、 10^7 这 3 个稀释度作平板计数, 计算出初始菌落数。同时各个稀释度取 1 mL 按 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA,

取 2 μL 作为模板进行荧光定量 PCR 扩增。

1.8 人工污染食品样品实验

将肠球菌标准菌株 ATCC49452 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h 至对数期后, 用生理盐水作 10 倍梯度系列稀释。取稀释度为 10^5 、 10^6 、 10^7 的菌液作平板计数, 计算肠球菌纯培养物的初始浓度。取 15 份市购鲜奶 25 mL 分别和 225 mL 缓冲蛋白胨水培养基混合(每 3 份为一实验组, 另设空白对照组), 3 个实验组分别加入 1 mL 稀释度为 10^8 、 10^9 、 10^{10} 的菌液, 每组设 3 个平行, 空白对照组则加入 1 mL 生理盐水, 均置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 增菌培养。培养至 0、3、6、9、12 h 时取样 1 mL, 按 DNA 提取试剂盒说明书来提取基因组 DNA, 采用引物 EF1902 建立的荧光定量 PCR 体系检测。

1.9 食品样品检测

从市场上采集不同来源和批次的乳制品、肉制品、蔬菜等 52 份食品样品, 每份样品无菌操作取 25 mL(25 g), 加入到 225 mL 的缓冲蛋白胨水培养基中, 作均质处理。参照人工污染实验结果选择增菌时间为 12 h, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 增菌培养 12 h 后, 分别取样 1 mL 按 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA, 并进行荧光定量 PCR 检测, 同时采用传统的肠球菌检测方法即活菌计数法进行检测和比较。

荧光定量 PCR 方法的定量准确性评价: 选取 10 份肠球菌污染程度较高的食品样品, 每份样品无菌操作取 25 mL(25 g), 加入到 225 mL 缓冲蛋白胨水培养基中, 作均质处理, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 下增菌培养 12 h。分别取培养液的 10^3 、 10^4 、 10^5 三个稀释度进行平板计数, 每个稀释度取 3 个平行。同时取样 1 mL, 采用 Genomic DNA Extraction Kit 法提取基因组 DNA, 取 2 μL 进行荧光定量 PCR 检测, 每份样品作 3 个平行。将 PCR 反应所得的 α 值与纯培养物灵敏度实验中所作的标准曲线比较, 计算出相应的菌液浓度, 并将其与平板计数结果换算成统一单位(cfu/mL), 采用 t 检验进行显著性分析, 若 P 值 >0.05 , 则认为荧光 PCR 的定量结果与平板计数法所得数据没有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 引物设计和普通 PCR 特异性评价

通过实验室自主研发的基因组比对程序分析, 得到 171 个候选检测靶点, 从中选取 E 值较大且长度合适的 CDS 片断。经在线 BLAST 比对, 针对 42 个理论上特异性较强的候选靶点, 共设计 50 对引

物,通过普通 PCR 验证,初步筛选出两对具有属特异性的引物: EF0500 和 EF1902,见表 2。以肠球菌的基因组 DNA 为模板分别能扩增出长度为 279 bp 和 183 bp 的特异性条带,经切胶回收并测序后,证实为目标片断,而以非肠球菌基因组 DNA 为模板则没有扩增出特异性条带。经 NCBI BLAST_x 比对分析,两对引物对应的靶基因分别编码接合转移蛋白(Conjugal transfer protein)和乙二醛酶家族蛋白(Glyoxylase family protein)。

表 2 引物序列

Tab. 2 Sequences of the primer pairs

引物	名称引物序列(5'→3')	产物长度
EF0500	CGT GCGAACATG ACCGAT AT	279
	CGAAACGGCCATTAACCAAC	
EF1902	ACTGGTGTCTATGGGTTTGC	183
	ATCCACGTCTTTAATGATTGC	

2.2 荧光定量 PCR 特异性评价

采用荧光定量 PCR 体系进一步评价引物的特异性,结果显示,引物 EF0500 针对所有的肠球菌菌株能产生扩增信号,熔解曲线图中目的峰单一,但在扩增非肠球菌时出现 1 个假阳性扩增结果,得到的 c_t 值大于 35 小于 40,在熔解曲线图上与目的峰较为接近。而引物 EF1902 经荧光定量 PCR 证实具有强特异性,针对所有的肠球菌能产生扩增信号,且在熔解曲线图上 82~83℃ 附近有单一的目的峰,对非肠球菌菌株则均无扩增。

2.3 荧光定量 PCR 体系优化

对 0.5~2.0 μL 范围内的染料添加量和 0.1~0.6 μmol/L 范围内的引物浓度进行优化,结果显示,当染料的添加量为 1 μL,引物浓度为 0.2 μmol/L 时, c_t 值较小、耗材量少且熔解曲线上没有非特异性扩增峰,见图 1。因此,荧光定量 PCR 采用的最佳反应体系为 Premix Ex TaqTM 12.5 μL, 10 μmol/L 的引物 0.5 μL, 染料 1 μL, DNA 模板 2 μL, 补水至反应总体积 25 μL。

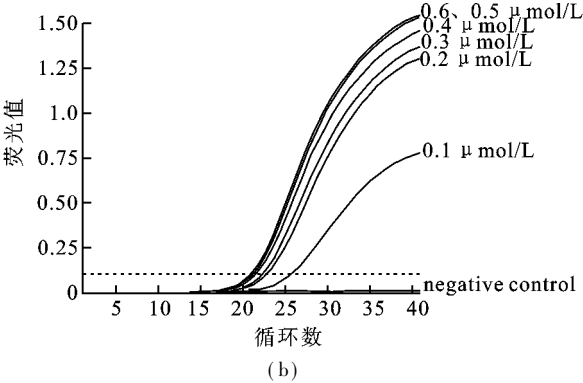
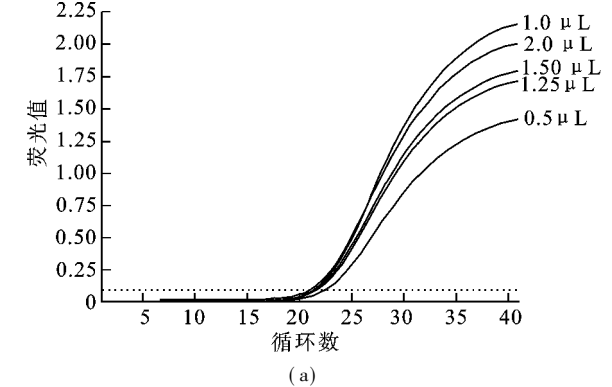


图 1 肠球菌荧光定量 PCR 反应体系参数的优化
Fig. 1 Optimization of real-time PCR system for *Enterococci*

2.4 灵敏度评价

2.4.1 基因组 DNA 检测灵敏度 在设置的浓度梯度系列中当基因组的 DNA 浓度达到 48.62 fg/PCR 时荧光定量 PCR 结果产生特异性扩增,而在 4.86 fg/PCR 的浓度则没有产生扩增,见图 2。表明引物 EF1902 检测肠球菌的灵敏度为 48.62 fg/PCR,经公式^[16]换算后为 13.78 拷贝/PCR。以此为基础作出标准曲线可知引物 EF1902 的扩增效率为 104.70%,而且基因组 DNA 浓度和 c_t 值之间有良好的线性关系(判定系数 $R^2 = 0.9986$)。

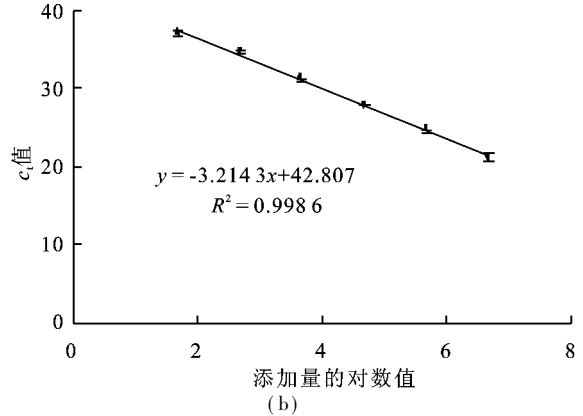
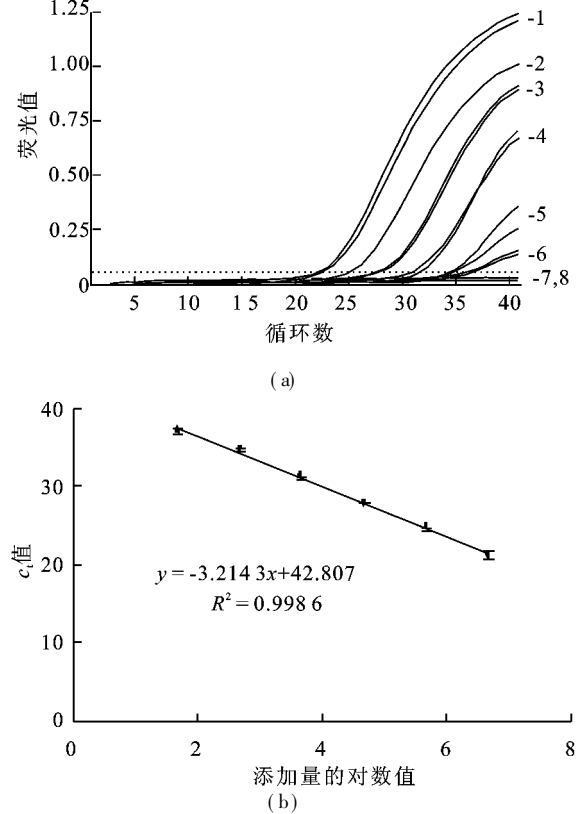


图 2 肠球菌基因组 DNA 灵敏度实验的扩增曲线图、标准曲线图

Fig. 2 Amplification curve and standard curve of sensitivity test for purified genomic DNA

2.4.2 纯培养物检测灵敏度 根据活菌计数结果可知,培养 6~8 h 后菌液的初始浓度为 3.84×10^7 cfu/PCR。结果显示,当菌液浓度为 38.4 cfu/PCR 时,PCR 反应产生特异性扩增;而当菌液浓度为 3.84 cfu/PCR 时,没有明显的特异性扩增信号产生,见图 3。这表明,引物 EF1902 检测肠球菌的纯培养物灵敏度为 38.4 cfu/PCR。标准曲线判定系数 $R^2=0.9991$,由此可知,菌液浓度和 c_t 值之间有良好的线性关系。

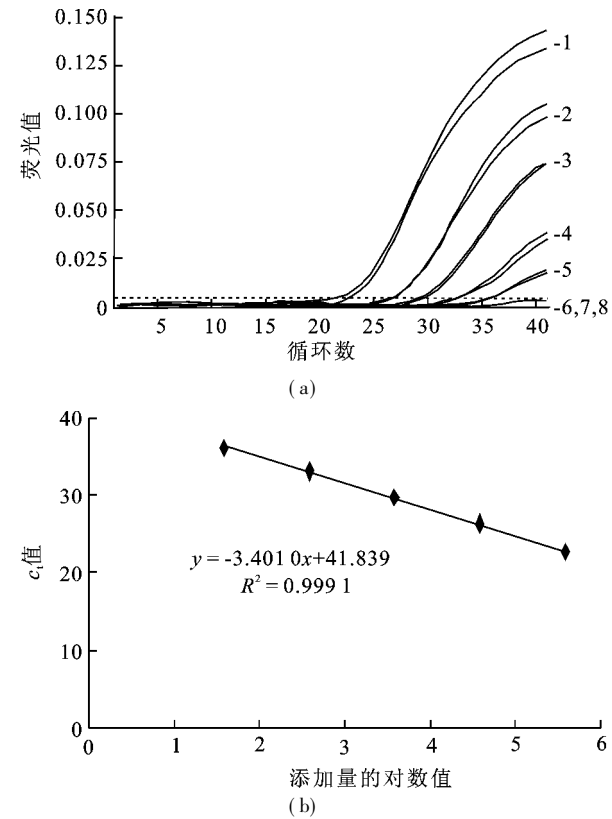


图 3 肠球菌的纯培养物灵敏度实验的扩增曲线图、标准曲线图

Fig.3 Amplification curve and standard curve of sensitivity test for enterococci cultures

2.5 人工污染食品样品实验

经活菌计数法检验,市购鲜奶产品中有少量背景菌但不含肠球菌。在人工污染实验中,当初始接种量为 0.26 cfu/mL 时,实验组在 12 h 内未能检测到扩增信号。而当初始接种量为 2.63 cfu/mL 和 26.30 cfu/mL 时,经 6 h 培养后全部检测到明显的 PCR 扩增信号,利用图 3 所作标准曲线计算得到的

菌液浓度估计值与最初接入的肠球菌数量趋势一致,即初始接种量越大,菌液浓度的估计值越大(大致为初始接种量的 10^3 倍),见表 3。这说明采用引物 EF1902 建立的荧光定量 PCR 方法只需增菌 6 h 即可达到 2.63 cfu/mL 的检测下限。

表 3 肠球菌人工污染实验结果
Tab.3 Detection of enterococci from artificially contaminated milk

初始接种量/ (cfu/mL)	PCR 结果 ^a	c_t 值 $x \pm s$ ($n=3$)	增菌后的菌液 浓度/(cfu/mL)
0	0/6	—	—
0.26	0/3	—	—
2.63	3/3	34.67 ± 0.15	4.2×10^3
26.30	3/3	32.14 ± 0.21	2.6×10^4

2.6 食品样品检测

检测的 52 份样品包括牛奶、酸奶、奶酪、奶粉等乳制品;熏煮火腿、火腿肠、生猪肉、鸡肉等肉制品;生菜、菇类等蔬菜和天然矿泉水等,采用荧光定量 PCR 方法检测的结果见表 4。30 份阳性,22 份阴性,阳性检出率为 57.69%。与传统的活菌计数法得到的检测结果相比,其中 2 份为假阳性,1 份为假阴性结果,准确率达到 94.23%。

表 4 用于肠球菌检测的食品及其检测结果
Tab.4 Detectable results of food samples

食品 样品	传统检测 方法 ^a	荧光定量 PCR ^a	假阳性 结果	假阴性 结果
乳制品	9/20	11/20	2	0
肉制品	15/19	15/19	0	0
蔬菜	5/8	4/8	0	1
矿物质水	0/5	0/5	0	0
总计	29/52	30/52	2	1

a. 阳性结果/检测样品数

2.7 荧光定量 PCR 方法的定量准确性评价

对部分食品样品包括乳制品(3 份)和肉制品(7 份)分别采用实时荧光 PCR 方法进行定量检测和平板计数。结果显示,根据所得 c_t 值与标准曲线(图 3)比较计算得到的菌液浓度平均值和平板计数结果均处于同一数量级,通过 t 检验证明其中 9 份食品样品的荧光 PCR 定量结果和平板计数结果无显著性差异(P 值 > 0.05),见表 5。

表 5 实时荧光 PCR 方法的定量准确性评价
Tab.5 Evaluation of quantization accuracy of real-time PCR

食品 种类	编号	荧光定量 PCR 结果				平板计数法结果	T 检验
		c_t 值			计算值	观察值	P 值
		1	2	3	$x \pm s$ (cfu/ mL)	$x \pm s$ (cfu/mL)	
乳制品	1	21.76	22.29	22.64	1.79±0.45 E+ 07	1.80±0.04 E+ 07	0.979

续表 5

食品 种类	编号	荧光定量 PCR 结果				平板计数法结果	T 检验
		C _t 值			计算值	观察值	P 值
		1	2	3	$x \pm s$ (cfu/mL)	$x \pm s$ (cfu/mL)	
肉制品	2	23 32	22 66	22 92	1 07 ±0.19 E+ 07	9 57 ±0.81 E+ 06	0.320
	3	22 39	21 74	22 44	1 83 ±0.42 E+ 07	1 54 ±0.13 E+ 07	0.466
	1	23 80	23 63	23 51	7 89 ±0.64 E+ 06	3 20 ±0.21 E+ 06	0.009*
	2	25 78	25 63	25 94	1 82 ±0.16 E+ 06	1 15 ±0.16 E+ 06	0.055
	3	27 83	27 97	27 40	4 80 ±0.83 E+ 05	5 13 ±0.82 E+ 05	0.799
	4	29 26	29 11	28 99	1 83 ±0.14 E+ 05	2 33 ±0.13 E+ 05	0.078
	5	26 23	25 78	26 64	1 38 ±0.33 E+ 06	1 64 ±0.05 E+ 06	0.362
	6	30 33	28 74	29 25	1 61 ±0.64 E+ 05	3 70 ±0.30 E+ 05	0.065
	7	26 47	27 29	27 02	8 48 ±2.06 E+ 05	5 70 ±0.78 E+ 05	0.295

* 荧光定量 PCR 结果与平板计数结果存在显著性差异。

3 讨 论

将目前常用于检测肠球菌的 PCR 靶点 16S rRNA 和 23S rRNA 的基因序列在 GenBank 数据库中做 BLAST 分析时,发现它们与其他常见致病菌有较高的同源性,以这些基因为靶点设计引物进行荧光定量 PCR 检测容易出现假阳性结果。因此,筛选特异性更强的检测靶点是十分必要的。作者采用生物信息学方法在全基因组中筛选保守序列,发掘出的检测靶点与其他常见致病菌的同源性非常低,降低了假阳性结果出现的机率,所建立的荧光定量 PCR 体系对表 1 所列菌株的检测结果证明了方法的强特异性。此外,该方法的检测灵敏度为 13.78 拷贝/PCR,与文献中报道的利用 23S rRNA 建立的荧光定量 PCR 方法的灵敏度^[14]处于同一水平。

采用 EvaGreen 荧光定量 PCR 进行特异性评价时,由于染料是非特异性地与 DNA 双链结合,引物二聚体等会对结果产生影响,导致假阳性扩增信号产生。考虑到 Taq 酶对 PCR 方法特异性的影响,作者比较了 TaKaRa 公司的 Premix Ex Taq™ 和 Invitrogen 公司的 Platinum Taq DNA 聚合酶。结果显示,采用 Premix Ex Taq™ 试剂,结合适当提高的退火温度和读板温度,能在一定程度上减少假阳性信号的产生。因此,最后选择 Premix Ex Taq™ 作为 EvaGreen 荧光定量 PCR 的反应试剂。

选择合适的反应体系和扩增条件如 Mg²⁺ 浓度、染料浓度、引物浓度和退火温度等参数对改善荧光定量 PCR 方法的检测性能有很大作用。由于实验中采用的 Premix Ex Taq™ 试剂是含有 Taq 酶

和 Mg²⁺ 等的预混试剂,因此不需对 Mg²⁺ 浓度进行优化。退火温度是影响 PCR 特异性的因素之一。作者以避免非肠球菌产生非特异扩增为目标,选用 60℃ 为退火温度。此外,如果染料的浓度不足会使荧光信号不能反映出扩增产物量的变化,而浓度过高则会抑制 PCR 反应。作者选取的是使 C_t 值到达极小值的染料浓度。同时 PCR 反应体系中选用较低的引物浓度,既不会使 C_t 值过大,也避免了大量引物二聚体的形成。作者通过优化影响 PCR 的重要条件,建立了稳定的荧光定量 PCR 反应体系。

活菌计数法和滤膜法等传统检测方法最终都需要进行生化鉴定以证实是否为肠球菌,较繁琐的检测流程决定了检出时间至少需要 48~72 h^[17]。而作者建立的荧光定量 PCR 方法在人工污染牛奶实验中证实,在存在背景菌干扰的情况下,当肠球菌初始污染量大于 2.63 cfu/mL 时,增菌 6 h 后即可检出,从而实现快速检测。

针对多种类的食品样品进行荧光定量 PCR 和传统活菌计数法检测比较,发现本研究建立的检测方法准确率达到 94.23%,证实了该方法应用于实际样品检测的可行性与准确性。实验中出现 2 例活菌计数法检测结果呈阴性而 PCR 结果呈阳性的情况,这一方面是由于 PCR 方法的局限性,食品中存在的已死细菌的 DNA 也能通过 PCR 方法检出^[18]。另一方面本研究中出现假阳性的两份食品样品分别为酸奶和奶粉,这可能是由于在冷冻冷藏或干燥等加工环境下细菌处于活的非可培养状态 (Viable but non-culturable state, VBNC state)^[19],用基于培养的活菌计数法检测时结果呈

阴性,采用 PCR 方法却可以检出。而处于 VBNC 状态的细菌虽然在常规培养条件下培养时不能生长繁殖,但在合适的条件下如宿主体内可以实现复苏^[20],进而对食品安全构成潜在的威胁。从这个角度来说,采用荧光定量 PCR 方法检测食源性肠球菌具有重要意义。食品样品检测试验中还得到 1 个假阴性结果,这可能是由于成分复杂的食品样品中含有 PCR 抑制剂,在后续研究中可以通过添加内标来指示假阴性^[21],也可以通过改善样品前处理方法如预先富集菌体,改进 DNA 提取方法如加强对肠球菌细胞壁的破坏效果以提高 DNA 提取率,从而进一步提高方法的准确性。

荧光定量 PCR 方法的定量性能准确性评价实验结果显示,在 10 份食品样品中只有 1 份生鸡肉样品的荧光 PCR 定量数据与平板计数结果存在显著性差异,这可能是因为用于制作标准曲线的菌株与食品样品中存在的菌株来源存在差异,很难保证两者的扩增效率一致,加之食品样品成分十分复杂,可能存在抑制 PCR 反应的因子,从而影响定量的准确性。有鉴于此,可以采用竞争性 PCR,或者采用

相对定量的方法,即在测定目的基因的同时测定某一恒定表达的内源性管家基因,作为内参照用以补偿待测样本在基因组 DNA 抽提过程中造成的目的基因的损失,从而反映 PCR 反应体系内是否存在影响扩增的抑制因素^[22]。

4 结 语

1) 作者采用生物信息学方法在全基因组序列上发掘与其他常见致病菌基因序列同源性低的检测靶点,降低了假阳性结果出现的机率。结合普通 PCR 和荧光定量 PCR 筛选得到 1 个新的特异性检测靶点,基于该靶点所对应引物 EF1902 建立了特异性强、灵敏度高的荧光定量 PCR 方法。

2) 作者针对该方法应用于食品中肠球菌检测时的效果进行评价,结果显示,该荧光定量 PCR 方法只需要 6 h 增菌时间就能达到极高的检测下限,能有效应用于多种食品样品检测且具有良好的定量检测性能,从而为食源性肠球菌提供了一种更为特异、灵敏、快速、准确的检测方法。

参考文献(References):

- [1] Sood S, Malhotra M, Das B K, et al. Enterococcal infections & antimicrobial resistance[J]. **Indian Journal of Medical Research**, 2008, 128(2): 111–121.
- [2] Khan S A, Nawaz M S, Khan A A, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR[J]. **Molecular and Cellular Probes**, 2005, 19(1): 27–34.
- [3] Morandi S, Brasca M, Andrighetto C. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north west Italian dairy products[J]. **International Dairy Journal**, 2006, 16(8): 867–875.
- [4] Gomes B C, Esteves C T, Palazzo I C V, et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods[J]. **Food Microbiology**, 2008, 25(5): 668–675.
- [5] Al-Ahmad A, Maier J, Follo M, et al. Food-borne enterococci integrate in to oral biofilm: an in vivo study[J]. **Journal of Endodontics**, 2010, 36(11): 1812.
- [6] 李晓柠, 李鸿鸣, 李彬, 等. 一起由粪肠球菌引起的食物中毒[J]. 预防医学论, 2006, 12(4): 498.
LI Xiao-ning, LI Hong-ming, LI Bing, et al. A food poisoning accident caused by *Enterococcus faecalis*[J]. **Preventive Medicine Tribune**, 2006, 12(4): 498. (in Chinese)
- [7] 单文清, 戴志芳, 何艳, 等. 一起粪肠球菌食物中毒的调查[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(2): 212.
DAN Wen-qing, DAI Zhi-fang, HE Yan, et al. A food poisoning accident caused by *Enterococcus faecalis*[J]. **Experimental and Laboratory Medicine**, 2008, 26(2): 212. (in Chinese)
- [8] Woodford N, Livermore D M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge[J]. **Journal of Infection**, 2009, 59: 4–16.
- [9] Templer S P, Rohner P, Baumgartner A. Relation of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from foods and clinical specimens[J]. **Journal of Food Protection**, 2008, 71(10): 2100–2104.
- [10] Valenzuela A S, Omar N, Abriouel H, et al. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in *Enterococci* from artisan foods of animal origin[J]. **Food Control**, 2009, 20(4): 381–385.
- [11] Kariyama R, Mitsuhashi R, Chow J W, et al. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci[J]. **Journal of Clinical Microbiology**, 2000, 38: 3092–3095.

- [12] Frahm E, Obst U. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2003, 52(1): 123–131.
- [13] Werner G, Stormmenger B, Klare I, et al. Molecular detection of linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* by use of 5′-nuclease real-time PCR compared to a modified classical approach[J]. **Journal of Clinical Microbiol**, 2004, 42(11): 5327–5331.
- [14] 任月, 袁杰利, 卢行安, 等. 粪便中肠球菌 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(6): 499–501.
- REN Yue, YUAN Jie-li, LU Xing-an, et al. Construction and primary application of SYBR Green I real-time quantification PCR for *Enterococcus*[J]. **Chinese Journal of Microecology**, 2007, 19(6): 499–501. (in Chinese)
- [15] Yu S J, Chen W Y, Wang D P, et al. Species-specific PCR detection of the food-borne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* using the *irgB* gene identified by comparative genomic analysis[J]. **FEMS Microbiol Letters**, 2010, 307(1): 65–71.
- [16] Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, et al. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2003, 69(1): 290–296.
- [17] Santo Domingo J W, Siefiring S C, Haugland R A. Real-time PCR method to detect *Enterococcus faecalis* in water[J]. **Biotechnology Letters**, 2003, 25: 261–265.
- [18] 赵文静, 李妍, 高鹏飞, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在乳酸菌定量检测中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 433–437.
- ZHAO Wen-jing, LI Yan, GAO Peng-fei, et al. Application of real-time fluorescent quantitative PCR in quantitative detection of lactic acid bacteria[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(4): 433–437. (in Chinese)
- [19] Lleo MM, Bonato B, Tafi MC, et al. Molecular vs culture methods for the detection of bacterial faecal indicators in groundwater for human use[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2005, 40(4): 289–294.
- [20] 孙晓媛, 李影, 钱爱东. 开发未可培养微生物技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5): 798–802.
- SHUN Xiao-yuan, LI Ying, QIAN Ai-dong. Advance in technique on the development of uncultured microorganism[J]. **Acta Microbiologica Sinica**. 2008, 35(5): 798–802. (in Chinese)
- [21] 何晓华, 余水静, 陈万义, 等. 添加有扩增内标的副溶血弧菌 PCR 检测方法[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 387–394.
- HE Xiao-hua, YU Shui-jing, CHEN Wan-yi, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR method with internal amplification control[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2010, 50(3): 387–394. (in Chinese)
- [22] 廉红霞, 高腾云, 傅彤, 等. 实时荧光定量 PCR 定量方法研究进展[J]. 江西农业学报, 2010, 22(10): 128–129.
- LIAN Hong-xia, GAO Teng-yun, FU Tong, et al. Research advance in method of real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction[J]. **Acta Agriculturae Jiangxi**, 2010, 22(10): 128–129. (in Chinese)