

花生制品中金黄色葡萄球菌 SYBR Green qPCR 快检方法的评价研究

赵 萍^{1,2}, 陈 飞^{2,3}, 周家宏³

(1.南京师范大学食品与制药工程学院,江苏 南京 210023)

(2.南京师范大学南京市特色生物资源功能成分开发工程研究中心,江苏 南京 210023)

(3.南京师范大学生命科学学院,江苏 南京 210023)

[摘要] 金黄色葡萄球菌是花生及其制品中常见的一种食源性致病菌,针对金黄色葡萄球菌的快速检测方法对实现花生及其制品中的食品安全防控有重要意义. 根据金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因(*nuc*)设计了 3 对特异性引物,同时优化了退火温度,成功建立了一种特异性引物的 SYBR Green 实时荧光定量 PCR (qPCR) 快速检测方法,进一步对该方法的特异性、重现性及灵敏度进行了验证. 以 8 种模拟污染花生加工产品为实验对象,对该方法与荧光定量 PCR 试剂盒-探针法及商品化 Baird-Parker 干粉培养基法进行了评价研究. 结果表明,建立的 SYBR Green qPCR 快速检测方法特异性和重现性良好,最低检测限为 8.99 copies/ μ L,其灵敏度比荧光定量 PCR 试剂盒-探针法高 2 个数量级. SYBR Green qPCR 快速检测方法具有成本低、检测快速、特异性好、灵敏度高的优点,可用于花生及其制品中金黄色葡萄球菌的快速检测,也可为防控其他食品中的金黄色葡萄球菌污染提供参考.

[关键词] 金黄色葡萄球菌,花生制品,SYBR Green 实时荧光定量 PCR,快速检测,评价研究

[中图分类号] TS207.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-1292(2023)02-0069-08

The Evaluation Study of SYBR Green qPCR Rapid Detection Method for *Staphylococcus aureus* in Peanut Products

Zhao Ping^{1,2}, Chen Fei^{2,3}, Zhou Jiahong³

(1.School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2.Nanjing Engineering Research Center for Functional Components Development of Featured Biological Resources, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(3.School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: *Staphylococcus aureus* is a common causative pathogen in peanuts and peanut products. Rapid detection of *S. aureus* is of great significance for the prevention and control of microbial contamination of peanut products. In this study, we design three pairs of specific primers according to the *nuc* gene of *S. aureus*, and a SYBR Green qPCR rapid detection method is established by optimizing the annealing temperature. The specificity, repeatability and sensitivity of the method are further evaluated. Finally, eight simulated contaminated peanut products are used as experimental objects to evaluate SYBR Green qPCR method, fluorescence quantitative PCR kit-probe method and commercial Baird-Parker dry powder medium method. The results show that the established method can specificity and repeatability detect *S. aureus*, the minimum detection limit is 8.99 copies/ μ L, and its sensitivity is two orders of magnitude higher than that of probe PCR kit method. The SYBR Green qPCR method has the advantage of economy, rapidity, specificity and high sensitivity, is suitable for the rapid detection of *S. aureus* in peanuts and peanut products, and can also provide reference for the prevention and control of *S. aureus* contamination in other foods.

Key words: *staphylococcus aureus*, peanut product, SYBR Green quantitative real-time PCR (qPCR), rapid detection, evaluation study

收稿日期: 2021-11-21.

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项项目(2018YFC1603400).

通讯作者: 陈飞, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术. E-mail: chenfei@njnu.edu.cn

食品安全问题一直是全社会共同关注的重点问题。微生物污染引起的食源性疾病是国内外食品安全中的首要问题^[1-2]。在食品加工过程中,食源性病菌通常会随着原料的生产、加工、包装、储存进入到食品中,从而造成食品的污染^[3]。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种常见的共生型致病菌,有快速适应宿主的能力,且可通过受污染的食物进行传播^[4-5]。其传播到食物中产生的多种有害毒素可通过直接与宿主相互作用对生物膜造成损害,导致细胞死亡,从而威胁人类健康^[6-7]。因此,金黄色葡萄球菌的检验工作对保证产品卫生质量及消费饮食安全有着重要的作用。金黄色葡萄球菌易感染的食品主要有剩饭、米面、牛乳及乳制品、肉制品等,目前对金黄色葡萄球菌的检测大多集中在各类牛乳及其制品和肉类及其制品^[8-10]。据新闻报道,在日常的食品安全监管抽调中其他食品中也被发现检出了金黄色葡萄球菌。

金黄色葡萄球菌的传统检测方法是微生物生化鉴定法^[11],尽管其准确度高,但需辅以形态学鉴定、生化鉴定等步骤,检验周期长、所需试剂复杂、操作步骤繁琐,不适用于大批量食品的快速检测。在食品检测中,新鲜食品的供应和样本检验之间存在时间差距,导致未经检验的产品中的致病菌造成食品安全问题。为填补这一空白,研究人员开发了多种灵敏度和特异性高、耗时短的食源性致病菌检测方法^[12],例如基于分子生物学的实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 的试剂盒法、基于显色反应和核酸酶原理的试纸片法和商品化干粉培养基法、基于胶体金免疫层析技术原理的快速检测卡法等。对于微生物检验来说,检测方法与传统的常规方法相比,能够缩短 1/2 或 1/3 的时间出具具有判断性意义结果的方法即可视为快速方法^[13-14]。

本文通过对金黄色葡萄球菌 SYBR Green qPCR 法、荧光定量 PCR 试剂盒-探针法与商品化 Baird-Parker 干粉培养基法 3 种不同的微生物快速检测技术,以代表性花生制品为样本,从检测方法的时间、成本、结果准确度等方面进行评价研究^[15],以为花生及其制品中的生物安全防控提供更可靠的快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、大肠杆菌(ATCC 29922)、蜡样芽孢杆菌(ATCC 14679)、巨大芽孢杆菌(ATCC 14581)由本实验室保存。

花生加工产品:1号花生酱(四季宝),2号花生香辣脆(小康),3号香辣花生(洽洽),4号花生牛奶(银鹭),5号花生巧克力豆(M&M's),6号花生巧克力脆(士力架),7号麻辣花生(口水娃),8号凉拌花生(苏果超市零售)。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP2001)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(DP1721),百泰克生物技术有限公司;PCR 反应试剂:2×Phanta Max Master Mix(Dye Plus)、q-PCR 反应试剂:SYBR qPCR Master Mix,诺唯赞生物科技股份有限公司;金黄色葡萄球菌荧光定量 PCR 试剂盒-探针法(50T),上海康朗生物技术有限公司;Baird-Parker 琼脂基础,青岛海博生物;引物由南京擎科生物科技有限公司合成。

1.2 主要仪器与设备

TC1000 梯度 PCR 仪,大龙兴创实验仪器有限公司;EPS300 电泳仪,上海天能科技有限公司;Step One 实时荧光定量 PCR 系统,美国 ABI 生物应用公司;D3024R 高速冷冻离心机,大龙兴创实验仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细菌培养

将菌株接种于肉汤培养基(Luria Broth, LB)营养琼脂平板 37℃ 培养 24 h,挑取单菌落于 LB 营养肉汤中培养 24 h(180 r/min, 37℃),取 1 mL 菌液于新鲜 LB 营养肉汤中,混匀后放入振荡培养箱 4 h(180 r/min, 37℃),使菌液浓度保持在 10^6 – 10^7 CFU/mL。

LB 培养基配制:以配制 1 L 培养基为例,在 950 mL 去离子水中加入胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、氯化钠 10 g(固体培养基需加入 15 g 琼脂),121℃ 高压灭菌 15 min。

1.3.2 模拟污染样品的准备

称取 8 种不同的花生加工产品各 9 g 于无菌锥形瓶中,任取不同体积的金黄色葡萄球菌菌液加入到已称取的样品中,然后分别添加 45 mL 质量比 7.5%氯化钠肉汤,均质 2 min,制成模拟金黄色葡萄球菌污染的样品,静置后取上层液体作为待检液。

7.5%氯化钠肉汤:蛋白胨 10 g、牛肉膏 5 g、氯化钠 75g、蒸馏水 1 000 mL,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

1.3.3 细菌 DNA 提取

按照细菌基因组 DNA 提取说明书,提取金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、蜡样芽胞杆菌、巨大芽胞杆菌 DNA,使用微量紫外可见分光光度计进行质量检查,-20 ℃ 保存备用。

1.3.4 SYBR Green qPCR 检测方法的建立

反应体系:按照 qPCR 预混液说明书提供的反应体系进行 qPCR 扩增:SYBR mix 10 μL;正反向引物各 0.4 μL;DNA 模板 1 μL;加超纯水至 20 μL。

扩增条件:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 30 s,共 40 个循环。

熔解曲线条件:95 ℃ 15 min;60 ℃ 60 s;95 ℃ 30 s。

1.3.4.1 引物设计与合成

从美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)的 Genbank 数据库中查找金黄色葡萄球菌耐热核酸酶基因^[16-17](*nuc*)序列(GU186372.1,EF529606.1,MZ067392.1),通过 DNAMAN 8 软件比对分析 *nuc* 基因序列的同源性并确定保守区域,采用 Primer-Blast 在线网站根据保守区域设计 3 对引物(表 1);通过 SYBR qPCR 法筛选引物,确定最佳引物。

表 1 *nuc* 基因特异性引物
Table 1 *nuc* specific primers

引物编号	引物序列 5'→3'	产物长度/bp
S1	F:TCGTCAAGGCTTGGCTAAAGT R:GCGTTGCTCTCGCTCCAAA	120
S2	F:GGTTGATACACCTGAAACAAAGCA R:TACGCTAAGCCACGTCCTATA	157
S3	F:TGGTTGATACACCTGAAACAAAGC R:TATACGCTAAGCCACGTCCTCA	160

1.3.4.2 标准品制备

以金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增:2×Phanta Max Master Mix(Dye Plus)25 μL,引物 F 和 R(10 μmol/mL)各 2 μL,模板 DNA 2 μL,ddH₂O 至 50 μL。将上述反应体系充分混匀并短暂离心后进行 PCR 扩增;反应结束取扩增产物 50 μL 于质量比 1%琼脂糖凝胶电泳,进行胶片段回收;取 3 μL 胶回收产物,1%琼脂糖凝胶电泳分析,验证产物片段长度,将胶回收产物作为阳性标准品。

PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 15 s;56 ℃ 退火 15 s;72 ℃ 延伸 1 min,34 个循环;72 ℃ 彻底延伸 5 min。用超微量紫外分光光度计测定浓度和纯度,取 OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.8~2.0 的胶回收产物作为标准品。

1.3.4.3 标准曲线的建立

按公式计算胶回收产物的拷贝数制备阳性标准品,拷贝数 = $(6.02 \times 10^{23}) \times (1 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (\text{DNA length} \times 660) = \text{DNA copies}/\mu\text{L}$,以 10 倍梯度稀释的标准品为模板,建立 20 μL qPCR 反应体系,以拷贝数的对数值(以 10 为底)为 X 轴, C_t 值(扩增循环数)为 Y 轴绘制标准曲线,每个拷贝数重复测定 3 次。

1.3.4.4 特异性实验

以提取的基因组 DNA 为模板,同时设置阳性和阴性对照。通过分析扩增曲线和 C_t 值验证其特异性,每个模板重复测定 3 次。

1.3.4.5 灵敏度实验

用 ddH₂O 对阳性标准品进行系列梯度稀释制备为标准品($10^5 \sim 10^{-1}$ copies/μL),并进行 qPCR 扩增确定本实验所设计引物可检测的最小拷贝数,每个拷贝数重复测定 3 次。

1.3.4.6 重复性实验

选取 3 种不同浓度的标准品进行 SYBR Green qPCR 检测,进行所建立方法的批内和批间的重复性实验^[18]。进行 3 个不同批次的检测,每个批次重复 3 个,对各浓度梯度标准品的 C_t 值进行统计分析,计算各 C_t 值的标准差(SD)和变异系数(SV),验证所建立方法的重复性。

1.3.5 模拟污染样品的检测

采用 3 种不同的快速检测方法对 1.3.2 的样品进行检测,针对 3 种方法检测结果之间的差异性 & 灵敏度进行分析,并基于实际检测情况对快检方法进行多方面的评价研究.

1.3.5.1 SYBR Green qPCR 法

取 1.3.3 中处理的样品 DNA 作为模板,按照 1.3.4 中建立的 SYBR Green qPCR 法进行检测,每种样品重复测定 3 次;按照待测样品的 C_t 值从建立的标准曲线推算出样品 DNA 的拷贝数.

1.3.5.2 荧光定量 PCR 试剂盒-探针法

反应体系 (20 μL): 2 \times Probe qPCR Magic Mix 10 μL ; 金黄色葡萄球菌 PCR 引物-探针混合液 3 μL ; 模板 7 μL .

标准曲线的建立: 以试剂盒提供的金黄色葡萄球菌阳性对照 (1×10^7 copies/ μL) 为模板开始 10 倍稀释,对 $10^1 \sim 10^7$ copies/ μL 这 7 个稀释度的标准品按照试剂盒说明书的参数 (表 2) 进行 qPCR 检测,以阳性对照浓度的对数值 (以 10 为底) 为横坐标,对应的 C_t 值为纵坐标,绘制标准曲线.

表 2 荧光定量 PCR 试剂盒-探针法参数		
Table 2 Parameters of quantitative real-time probe PCR kit		
过程	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间
预变性	95	10 min
PCR 反应 (45 个循环)	95	15 s
	50	1 min

样品检测: 取 1.3.3 中处理的样品 DNA 进行检测,每个样品设置 3 个复孔,按照待测样品的 C_t 值从建立的标准曲线推算出样品 DNA 的拷贝数.

1.3.5.3 商品化 Baird-Parker 干粉培养基法

称取 Baird-Parker 琼脂粉 63.0 g,加热搅拌溶解于 950 mL 蒸馏水中,分装每瓶 95 mL,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min,冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右,于每 95 mL 培养基中加入常温解冻的卵黄亚碲酸钾增菌剂 5 mL 摇匀后倾入无菌平皿 (60 mm). 取 1.3.3 中的各样品的待检测液 200 μL 均匀涂布于平板表面,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱倒置培养 24 h,每种样品重复检测 3 次.

2 结果与分析

2.1 引物筛选

根据 qPCR 引物设计原则共设计 3 对引物,经改变退火温度,通过 qPCR 扩增的熔解曲线进行分析,结果如图 1 所示. 3 对引物在退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时,均能有完整的熔解曲线,其中引物 S1 的熔解曲线在 76.93 $^{\circ}\text{C}$ 处出现单一峰,说明无引物二聚体和非特异性扩增峰,而引物 S2 和 S3 的熔解曲线在 65~70 $^{\circ}\text{C}$ 之间出现非特异性扩增峰. 因此,选取引物 S1 作为金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因的特异性引物用于后续实验.

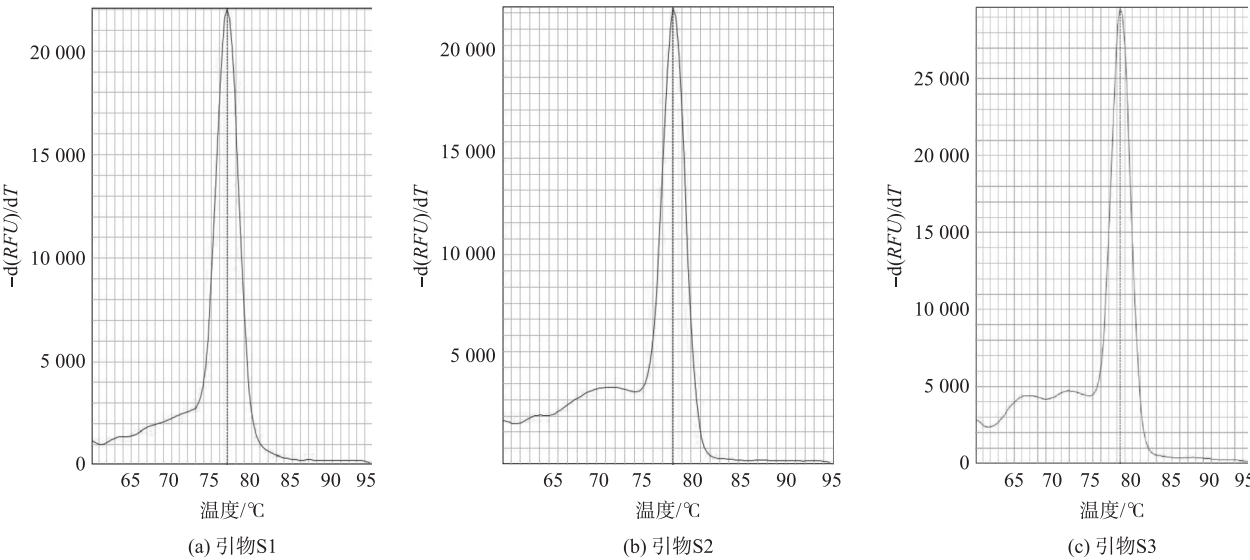


图 1 扩增产物熔解曲线
Fig. 1 Fusion curves of amplified products

2.2 标准曲线的建立

利用引物 S1 从金黄色葡萄球菌的 DNA 中扩增出约 100 bp 的片段(图 2),经胶回收后测序片段大小为 120 bp,与预期相符,将其作为阳性标准品. 计算得到阳性标准品的拷贝浓度为 8.99×10^6 copies/ μL . 取 10 倍梯度稀释的标准品进行 SYBR Green qPCR 扩增,并建立标准曲线, $R^2 > 0.99$,线性关系良好(图 3).

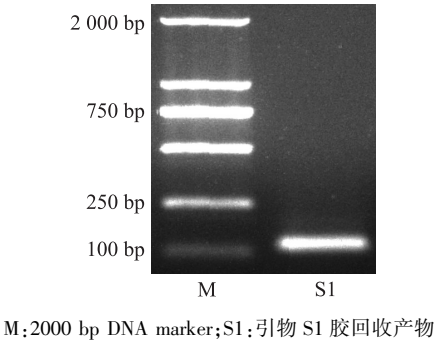


图 2 引物 S1 胶回收电泳图
Fig. 2 Electrophoresis results of primer S1

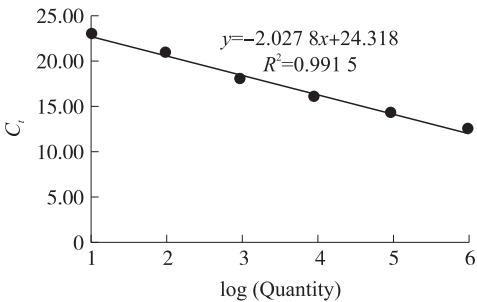


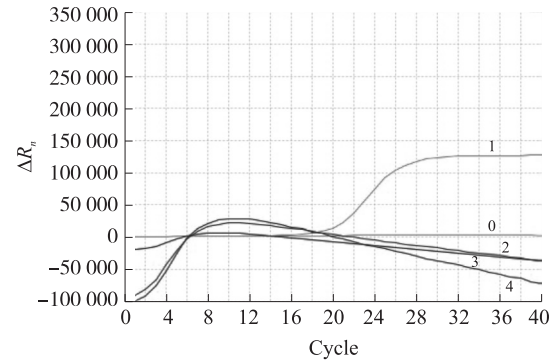
图 3 SYBR Green qPCR 检测法的标准曲线
Fig. 3 Standard curve of SYBR Green qPCR

2.3 特异性实验结果

用建立的 SYBR Green qPCR 方法检测大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌的 DNA 样品,扩增曲线如图 4 所示. 金黄色葡萄球菌的扩增曲线呈现“S”型, C_t 值为 20.08;其余非目标菌的扩增曲线未呈现“S”型,检测结果的 C_t 值均为“undet”;说明建立的特异性引物 SYBR Green qPCR 法无法检测出大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌,证明建立的金黄色葡萄球菌检测方法特异性较好.

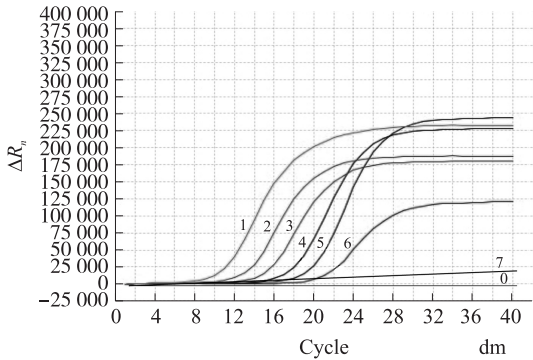
2.4 灵敏度实验结果

用 7 个稀释梯度($8.99 \times 10^5 \sim 8.99 \times 10^{-1}$ copies/ μL)的标准品为模板,进行 SYBR Green qPCR 检测,扩增曲线如图 5 所示. $8.99 \times 10^5 \sim 8.99$ copies/ μL 这 6 个浓度的标准品呈现“S”型曲线, C_t 值分别为 12.55、14.43、16.15、18.06、20.98、22.92;浓度为 8.99×10^{-1} copies/ μL 的标准品的 C_t 值为 27.02,虽然数值未大于 35,但扩增曲线图无良好的“S”型扩增,可能是由于检测目标的浓度低于检测限而无法呈现良好的扩增曲线;说明本文所建立方法的最低检测限为 10^1 数量级,灵敏度为 8.99 copies/ μL .



0:ddH₂O;1:金黄色葡萄球菌;2:大肠杆菌;3:蜡样芽孢杆菌;4:巨大芽孢杆菌

图 4 SYBR Green qPCR 检测法的特异性
Fig. 4 Specificity of SYBR Green qPCR



0:ddH₂O;1-7 依次表示模板浓度为: 8.99×10^5 、 8.99×10^4 、 8.99×10^3 、 8.99×10^2 、 8.99×10^1 、8.99、0.899 copies/ μL

图 5 SYBR Green qPCR 检测法的灵敏度
Fig. 5 Sensitivity of SYBR Green qPCR

2.5 重复性实验结果

选取 8.99×10^5 、 8.99×10^2 、 8.99×10^1 copies/ μL 3 种不同浓度的标准品为模板,计算 C_t 值的标准差(SD)和变异系数(SV),考察其批内和批间的精密度. 如表 3 所示,模板浓度为 8.99×10^2 的变异系数相比其他浓度更低,可能是加样时的操作误差小,检出的复孔 C_t 值相差小. 总体而言,批内的变异系数范围为 0.47%~4.67%,批间的变异系数范围为 0.56%~4.28%,均小于 5%,说明此方法的批内和批间精密度较好,建立的检测方法重复性高.

表 3 SYBR Green qPCR 的重复性实验结果
Table 3 Repeatability of SYBR Green qPCR

模板浓度/(copies/ μ L)	批内重复实验		批间重复实验	
	平均值 \pm 标准差	变异系数/%	平均值 \pm 标准差	变异系数/%
8.99×10^5	12.55 \pm 0.59	4.67	12.81 \pm 0.55	4.28
8.99×10^2	18.06 \pm 0.09	0.47	17.98 \pm 0.10	0.56
8.99×10^1	19.98 \pm 0.56	2.79	19.94 \pm 0.33	1.65

2.6 模拟污染样品的检测结果

采用商品化 Baird-Parker 干粉培养基法检测 1.3.2 制备的模拟污染样品,金黄色葡萄球菌生长情况如表 4 所示. 理论检测结果应是 8 种模拟污染样品均检测出金黄色葡萄球菌菌落,但实际检测结果只有 8 号样品的 3 次重复检测都出现阳性结果,其他样品检测结果平行性差,出现假阴性结果,说明商品化 Baird-Parker 干粉培养基法的灵敏度和重现性较低.

本文建立的 SYBR Green qPCR 法检测结果如表 5 所示,对 8 种模拟污染样品均能不同程度地检出金黄色葡萄球菌污染.

表 4 Baird-Parker 培养基检测结果
Table 4 Results of Baird-Parker culture medium

样品编号	n_1	n_2	n_3	样品编号	n_1	n_2	n_3
1	+	-	-	5	-	-	-
2	-	-	-	6	+	-	-
3	-	+	-	7	-	-	+
4	-	-	-	8	++	++	++

注:+:菌落特征较明显;+:菌落特征明显;-:无菌落.

表 5 3 种检测方法的定量结果
Table 5 Quantitative results of three methods

样品编号	SYBR Green qPCR 法		荧光定量 PCR 试剂盒-探针法		Baird-Parker 培养基法
	C_t 平均值	拷贝数/(copies/ μ L)	C_t 平均值	拷贝数/(copies/ μ L)	
1	17.05	3 853.22	33.87	3 916.02	无法计数
2	17.44	2 465.21	34.54	2 527.04	ND
3	17.28	2 956.35	34.25	3054.58	无法计数
4	18.60	662.90	36.08	923.34	ND
5	22.45	8.34	ND	ND	ND
6	20.70	61.19	ND	ND	无法计数
7	18.32	907.58	36.09	917.32	无法计数
8	15.44	23 976.60	30.92	26 942.46	无法计数

注:ND 表示未检出.

根据试剂盒提供的阳性标准品 $10^1\sim 10^7$ copies/ μ L 荧光定量 PCR 试剂盒-探针法建立的标准曲线,实际检测结果发现浓度为 10^2 和 10^1 copies/ μ L 的标准品 C_t 值未检出,说明此试剂盒检测方法的检测限为 10^3 copies/ μ L,而试剂盒说明书描述最低检测限为 10^2 copies/ μ L,推测可能是由于检测仪器的差异造成. 对检出的 5 种不同浓度的标准品建立标准曲线,结果如图 6 所示, $R^2=0.997\ 3>0.99$,线性关系良好. 荧光定量 PCR 试剂盒-探针法检测结果如表 5 所示,对 6 种样品检出金黄色葡萄球菌污染,5 号和 6 号样品的 C_t 值未检出.

对 3 种检测方法的结果进行定量分析,发现 Baird-Parker 培养基法对检测结果呈阳性的样品无法计数,可能是因为样品污染程度过高,无法进行准确定量,若对模拟样品的待检液进行稀释则可能增加样品假阴性的检测结果,造成检测结果准确度降低;说明 SYBR Green qPCR 法和荧光定量 PCR 试剂盒-探针法的灵敏度及准确度均高于 Baird-Parker 培养基法. 对两种可计数方法的检测结果进行线性拟合(图 7),得到 $R^2>0.99$,说明两种方法的相关性较好,且检测结果都较准确. 但荧光定量 PCR 试剂盒-探针法未检出样品 5 号和 6 号,说明本文建立的 SYBR Green qPCR 法的灵敏度要优于荧光定量 PCR 试剂盒-探针法.

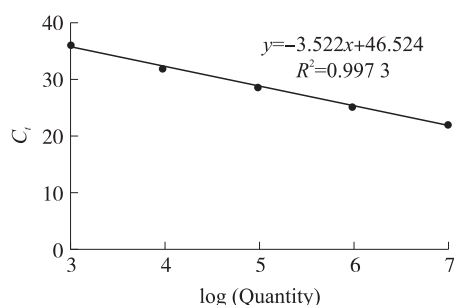


图 6 荧光定量 PCR 试剂盒-探针法标准曲线

Fig. 6 Standard curve of probe qPCR kit

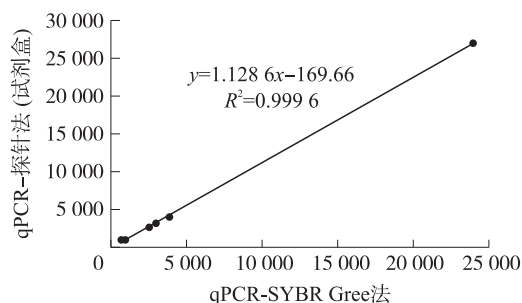


图 7 两种 qPCR 方法检测结果的相关性(除样品 5 和样品 6)

Fig. 7 Correlation between the results of two qPCR methods
(Except sample 5 and sample 6)

3 讨论

金黄色葡萄球菌一直是食品安全领域的重点检测对象^[19],其主要致病因子肠毒素具有热稳定性,且难以通过热处理等方式去除^[20]。目前多数研究侧重于肉制品及奶制品^[21]中金黄色葡萄球菌检测方法的开发,但不代表其他食品不会被金黄色葡萄球菌污染,因此本文以不同的花生制品为实验对象开展 3 种不同的金黄色葡萄球菌检测技术的评价研究。

本文以金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因为目标基因,设计了 3 对特异性引物,通过观察熔解曲线筛选出特异性较好的一对引物,建立了一种特异性引物扩增 SYBR Green qPCR 的金黄色葡萄球菌检测方法。后来旺等^[22]根据金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因序列设计引物,建立重组酶等温扩增结合侧流层析试纸条的金黄色葡萄球菌快速检测方法,根据试纸条 T 线条带亮度进行结果判断,不能进行准确的定量检测。郭建平^[23]建立的基于可视化环介导等温扩增技术快速检测金黄色葡萄球菌,根据反应物的颜色变化来判断样品的阴性和阳性结果,无法达到准确定量。母润红^[24]针对饲料中金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌,建立了微滴式数字聚合酶链式反应(ddPCR)快速检测方法,最低检测限为 8.8×10^1 copies/ μ L,比本文所建立方法的灵敏度低了一个数量级。本文建立的 SYBR Green qPCR 法,可对样本进行准确定量的计算,避免人为判断的误差,方法的灵敏度可达 8.99 copies/ μ L。通过对比 SYBR Green qPCR 检测方法、荧光定量 PCR 试剂盒-探针法以及商品化 Baird-Parker 培养基法 3 种快速检测方法对 8 种模拟污染的花生制品的检测结果,发现 SYBR Green qPCR 法、荧光定量 PCR 试剂盒-探针法对花生制品的检测结果较一致,说明所建立的 SYBR Green qPCR 法的特异性良好,且检出准确度较高;SYBR Green qPCR 法的检出结果与 Baird-Parker 培养基法的检出结果不一致,原因可能是 PCR 技术能从基因水平进行判断,其敏感性和特异性都高于传统的微生物学方法^[25];从时间成本比较,SYBR Green qPCR 法和荧光定量 PCR 试剂盒-探针法仅需 2 h 即可对大量样本完成检测并得到结果,而 Baird-Parker 培养基法需要孵育 24 h 才可得出结果;从经济成本比较,由于合成探针的成本,试剂盒法每完成一个样品的检测至少花费 76.8 元,SYBR Green qPCR 法每完成样品的一次检测约花费 31.2 元,远远低于荧光定量 PCR 试剂盒-探针法,说明 SYBR Green qPCR 法经济实惠。

4 结论

本文首先基于金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因建立了特异性引物的 SYBR Green qPCR 法,经验证发现此方法特异性好、重现性稳定且灵敏度高,检测限可达 8.99 copies/ μ L,比荧光定量 PCR 试剂盒-探针法的灵敏度高 2 个数量级。利用所建立方法与荧光定量 PCR 试剂盒-探针法、商品化 Baird-Parker 干粉培养基法对 8 种模拟污染花生制品为实验对象进行金黄色葡萄球菌的检测,并以此为基础对金黄色葡萄球菌的 3 种不同快速检测方法进行了评价研究,发现基于分子生物学原理的 2 种快速检测方法的准确度及灵敏度都高于传统的微生物学方法,分子水平的快检方法可在短时间内完成大量样本的检测,效率高于培养基法。从经济成本考虑,SYBR Green qPCR 法要比荧光定量 PCR 试剂盒-探针法更加经济实惠。综上,本文所建立的 SYBR Green qPCR 法成本低、检测时间短、方法特异性较好、准确度高、灵敏度高,对花生及其制品中金黄色葡萄球菌的现场快速检测适用性较好,可为防控其他食品中的金黄色葡萄球菌污染提供参考。

[参考文献](References)

- [1] 惠媛媛,彭海帅,王毕妮,等. 基于适配体的光学和电化学法对食源性致病菌检测的研究进展[J]. 中国农业科学, 2021,54(11):2419-2433.
- [2] 李莹. 中国食品安全及其监管制度研究[D]. 长春:吉林大学,2014.
- [3] 张宁,王建华. 食品微生物标准和食品安全[J]. 品牌与标准化,2014(8):23.
- [4] VAIYAPURI M,JOSEPH T C,RAO B M,et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in seafood;Prevalence,laboratory detection,clonal nature,and control in seafood chain[J]. Journal of Food Science,2016,84(12):3341-3351.
- [5] DA SILVA A C,RODRIGUES M X,SILVA N C C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food and the prevalence in Brazil;a review[J]. Brazilian Journal of Microbiology,2020,51(1):347-356.
- [6] RUBAB M,SHAHBAZ H M,OLAIMAT A N,et al. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food[J]. Biosensors & Bioelectronics,2018,105:49-57.
- [7] SHIMAA E,MOHAMMED Z. Ultrasensitive peptide-based multiplexed electrochemical biosensor for the simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*[J]. Mikrochimica Acta;An International Journal of Physical and Chemical Methods of Analysis,2020,187(9):486.
- [8] 李传友,曾宝锋,赵燕英,等. 恒温隔绝式聚合酶链式反应检测食品中金黄色葡萄球菌[J]. 食品科学,2022,43(2):339-345.
- [9] 宋明辉,施春雷,李琼琼,等. 速冻面米制品中金黄色葡萄球菌和肠毒素A基因三重PMA-qPCR快检方法的建立[J]. 中国食品学报,2020,20(7):244-252.
- [10] PAPADOPOULOS P,ANGELIDIS A S,PAPADOPOULOS T,et al. *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in bulk tank milk, livestock and dairy-farm personnel in north-central and north-eastern Greece: Prevalence, characterization and genetic relatedness[J]. Food Microbiology,2019,84:103249.
- [11] 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 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,2016.
- [12] LEE W,PARK Y,SHRIVASTAVA S,et al. A fully integrated bacterial pathogen detection system based on count-on-a-cartridge platform for rapid, ultrasensitive, highly accurate and culture-free assay[J]. Biosensors and Bioelectronics,2020,152:112007.
- [13] 王海军,马福敏,张革新,等. 快速检测在食品安全监管中应用的研究[J]. 食品研究与开发,2013,34(19):118-121.
- [14] 汪华,孔英戈,潘萍,等. 快速检测技术在食用农产品安全监管中的应用[J]. 食品安全导刊,2016(33):12-13.
- [15] 李菊,谢建军,王璐,等. 基于质量评价的孔雀石绿快检试剂盒筛选策略[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(3):875-882.
- [16] YANG Y,SUN X D,YUAN Y W,et al. Detection of *Staphylococcus aureus* in dairy products by polymerase chain reaction assay[J]. Agricultural Sciences in China,2007,6(7):857-862.
- [17] 廖光华,代佳君,邓钰萍,等. 基于 *nuc* 基因的奶牛乳房炎性金黄色葡萄球菌 PCR 检测方法的建立[J]. 塔里木大学学报,2019,31(4):7-11.
- [18] 郭慧芳,李宁,王白玉,等. 鸡 *Caspase-1* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报,2021,43(5):521-526.
- [19] 王礼. 食品中金黄色葡萄球菌的检测及防控技术[J]. 中国食品,2021(17):142-143.
- [20] LOIR Y L,BARON F,GAUTIER M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning[J]. Genetics & Molecular Research,2003,2(1):63-76.
- [21] SHEET O H,GRABOWSKI N T,KLEIN G,et al. Development and validation of a loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis milk samples[J]. Molecular and Cellular Probes,2016,30(5):320-325.
- [22] 后来旺,李达容,邓波,等. 金黄色葡萄球菌 RAA-LFD 快速检测方法的建立与应用[J]. 食品科学,2022,43(4):331-339.
- [23] 郭建平,万佳佳,陆兆新,等. 基于可视化环介导等温扩增技术快速检测金黄色葡萄球菌[J]. 食品科学,2019,40(20):325-331.
- [24] 母润红,聂丹丹,赵明,等. 微滴式数字聚合酶链反应检测金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌[J]. 吉林医药学院学报,2021,42(2):81-83.
- [25] 孙冰清,姜芹,张文刚,等. 基于 qPCR 检测金黄色葡萄球菌 3 种肠毒素基因的方法研究[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(9):2798-2805.

[责任编辑:严海琳]