

定量 PCR 技术在食源性致病微生物检测中的应用

杜 巍

(国家信息中心博士后科研工作站, 北京 100045)

摘 要: 食源性致病微生物是影响食品质量和安全的主要因素之一, 建立和完善食品中致病微生物快速定量检测技术具有重要的现实意义。定量 PCR 能快速、敏感、特异而准确定量, 深入有效地利用该技术, 必将有力促进食源性致病微生物快速检测工作的发展。

关键词: 定量 PCR; 致病微生物; 快速检测

Review on Application of Q-PCR on the Detection of Foodborne Pathogenic Microorganism

DU Wei

(State Information Center Postdoctor Science and Research Workstation, Beijing 100045, China)

Abstract: Foodborne pathogenic microorganism was one of the important factors that could affect the quality and safety of food. It was been of realistic significance that the rapid detection technology of foodborne pathogenic microorganism should be designed and consummated. Q-PCR was rapid, sensitive, specific and accurate for quantitative determination technology. If it could be effectively utilized, the rapid detection of foodborne pathogenic microorganism would make obvious progress.

Key words quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR); pathogenic microorganism; rapid detection

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)04-0260-04

由沙门氏菌、弯曲菌、大肠埃希氏杆菌、李斯特菌等食源性致病微生物引发的食品污染, 是影响食品质量和安全的主要因素之一。因食源性致病微生物污染食品所导致的食源性疾病不仅会严重损害人体的健康, 而且很容易引起食品贸易纠纷^[1]。随着现代食品安全控制技术如危害分析关键控制点(HACCP)、微生物危险性评估(microbiological risk assessment, MRA)的发展, 以及依据 MRA 建立的食品中致病微生物的限量标准等要求, 建立和完善食品中微生物快速定量检测技术越来越具有重要的现实意义。

聚合酶链式反应(PCR)技术问世 20 年来, 在生物学基础研究领域得到了巨大的发展和完善, 目前在疾病诊断、病原体检测等方面也有了越来越广泛的应用。近几年, 在对扩增产物定性鉴别的技术基础上, 又发展了对模板 DNA 片段进行定量研究的方法, 即定量 PCR (Quantitative PCR, Q-PCR), 成为当前分子生物学技术研究的热点之一^[2, 3]。由于该技术能快速、敏感、特异而准确定量, 因此也成为食品生物技术领域的一个应

用研究重点, 并作为食品中致病微生物快速定量检测研发的一项关键技术。

1 定量 PCR 的基本原理

PCR (聚合酶链式反应) 反应的基本原理为: 在体外利用 DNA 聚合酶活性, 在引物的引导和脱氧核糖核苷酸(dNTP)等参与下将模板 DNA 在数小时内进行百万倍扩增。该酶促反应最基本的 3 个环节是: ①模板 DNA 的变性, 即在 94℃下模板双链 DNA 变为单链 DNA; ②引物与模板链的特异性复性; ③引物链的延伸。

定量 PCR (Q-PCR) 就是在 PCR 反应中应用化学标记的引物或探针, 对扩增的标记产物进行定量^[2~4]。近年来, 在食源性致病微生物定量检测中研究和应用的定量 PCR 方法主要有: 传统定量 PCR (即: 定量竞争性 PCR、PCR-ELISA 法等)、实时定量 PCR 及免疫捕捉 PCR 等^[4]。

2 定量 PCR 技术

收稿日期: 2005-06-24

作者简介: 杜巍(1973-), 男, 副研究员, 博士后, 主要从事食品安全信息化研究。



2.1 传统定量PCR

这一类定量PCR方法是终点检测,即PCR达到平台期后进行定量检测。

2.1.1 定量竞争性PCR

定量竞争性PCR(quantitative competitive PCR, QC-PCR)技术,是利用逆转录酶的作用,将mRNA转变为cDNA,然后在cDNA进行扩增时,加入已知浓度的竞争性参考模板,使两种模板在同一试管内竞争同一对引物,两者的产物因大小或酶切位点的不同而区别开来,通过对两者扩增产物(即凝胶电泳上电泳条带)的测量,达到对mRNA初始浓度的定量^[5]。

竞争性PCR的参考模板一般分为外标准参考模板和内标准参考模板两类。内标准参考模板又分成两类。一类是内源性参考基因,常选择相对恒定表达的管家基因(house-keeping gene),进行双重PCR扩增,这种方法的缺点是制约因素较多而影响定量的准确性;另一类是利用分子生物学技术构建靶基因的突变型参考模板(差别仅在于靶基因内部序列有所缺失或延长),是当前采用较多的内标准参考模板^[6]。

利用QC-PCR进行定量时,要求所选取的参考模板与待测模板序列基本一致,至少是引物结合区域的序列完全一致,以保证两种竞争性模板与引物的结合达到“公平竞争”,从而克服PCR反应中因扩增效率的不同而带来的定量误差。美国密西西比州州立大学食品科技学院的工作人员应用QC-PCR对*E. coli* 0157:H7进行定量,发现肉汤和脱脂乳中*E. coli* 0157:H7的检测范围是 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$, QC-PCR的细胞密度与可见细胞计数紧密相关^[7]。

2.1.2 PCR-ELISA

利用地高辛或生物素等标记引物,扩增产物被固相板上的特异探针所结合,再加入抗地高辛或生物素酶标抗体——辣根过氧化物酶结合物,最终酶使底物显色。常规的PCR-ELISA法,即PCR技术结合酶联免疫吸附分析(ELISA),只是一种定性试验,若加入内标,作出标准曲线,也可以实现定量检测的目的^[8]。

近年来,通过PCR-ELISA技术建立了单核增生李斯特菌^[9]和牡蛎中*E. coli*等^[10]的定量检测方法。Gonzalez等利用大肠杆菌lamB基因的PCR扩增和ELISA联合技术,建立了牡蛎中*E. coli*的直接计数方法,发现当牡蛎样品中包含的*E. coli*浓度在 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ 之间时,底物与酶反应可产生差异明显的吸收信号,而且在该范围内,*E. coli*选择性平板计数和PCR-ELISA吸收值之间呈直线相关,得到的方程可直接用于牡蛎中*E. coli*的定量^[10]。但是,利用PCR-ELISA技术进行定量检测研究时,要特别注意产物被污染。

2.1.3 传统定量PCR存在的问题

定量竞争性PCR、PCR-ELISA等传统定量PCR,在快速定量中被证明是成功的,但这一类定量PCR方法是终点检测,即PCR达到平台期后进行检测,而PCR经过对数期扩增到达平台期时,检测重现性相对较差,因此,传统定量PCR只能算PCR定量方法中较为粗略的一类方法^[11,12]。另外,这类定量方法需要PCR后处理,相应增加了分析时间,而且还有造成实验室污染的可能性。

2.2 实时定量PCR

实时定量PCR(real-time PCR, RT-PCR),是DNA定量分析的新方法,指在PCR反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累,实时监测整个PCR过程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。在整个实验的操作过程中,所有反应均在同一溶液中进行,而且不需要任何后处理过程。被测产物的数量与起始模板拷贝数直接相关,具体可以通过测量每次循环产生的荧光信号强度,并参照对照基因的标准曲线来定量^[2,3]。

实时定量PCR(RT-PCR)技术因采用不同的荧光标记和荧光探针类型,在实际操作中又形成各自具体的方法。目前,较常用的荧光探针是TaqMan荧光探针和LightCycler双探针。

2.2.1 TaqMan实时定量PCR

TaqMan实时定量PCR技术由PE公司建立,是对PCR扩增产物进行定量的一种新方法。

该技术在PCR扩增时,加入一个特异性的TaqMan荧光探针,该探针一般由20~30个核苷酸组成,两端分别标记一个荧光基团(如FAM, 6-羧基荧光素)和一个猝灭基团(如TAMRA, 6-羧基-四甲基若丹明),探针完整时,荧光基团发射的荧光信号被猝灭基团吸收,不产生可检测的荧光;当PCR开始扩增后,Taq酶的5'→3'外切酶活性将结合在DNA模板上的TaqMan荧光探针酶切降解,使荧光基团从探针上游离出来,与猝灭基团分离,不受猝灭基团影响,引起518nm处荧光强度增加,使荧光监测系统接收到荧光信号,即每扩增一条DNA链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与PCR产物形成完全同步,应用序列检测仪可持续测量每一轮循环荧光信号的强度,从而使反应得到实时监测^[13]。目前该方法已经用于单核李斯特菌^[14]、大肠埃希氏杆菌、沙门菌、*E. coli* 0157:H7、E型肉毒梭菌等^[15]的检测。

2.2.2 LightCycler定量PCR

LightCycler定量PCR是Roche公司新近开发的一种PCR定量技术,其特点是利用LightCycler双探针技术将荧光分子和猝灭分子分别标记在两个不同的探针上,产生发光探针和猝灭探针,发光探针的5'端连接荧光分



子, 猝灭探针的 3' 端连接猝灭分子。由于两探针设计时可与模板同一条链相邻的序列杂交, 杂交时因两探针的荧光分子和猝灭分子紧密相邻, 从而发生能量传递而使荧光猝灭。荧光猝灭的程度与起始模板的量成正比, 以此可以进行 PCR 定量分析。该方法的特点是猝灭效率高, 但由于两个探针结合于模板上, 因此影响扩增效率, 此外由于需要合成两个较长的探针, 使合成成本相对较高。迄今为止, 该方法在食源性致病微生物检测领域的应用并不多见^{[4][16]}。

2.2.3 实时定量 PCR 的优点及注意的问题

1996 年, 实时定量 PCR 仪器由美国 Applied Biosystems 公司推出, 实现了 PCR 从定性到定量的飞跃, 与传统的定量 PCR 技术相比, 实时定量 PCR 具有以下优点^[4]: ①实时定量 PCR 不需要 PCR 后处理, 所以可避免 PCR 的实验室污染, 大大减少因交叉污染引起的假阳性错误。②可用 β -actin 基因序列对样本的扩增效率进行标化。在产物积聚的对数期进行实时分析, 允许对多种不同的基因进行同时分析, 而不必考虑“平台效应”对实验结果的影响。③节省了 PCR 后处理的时间, 样本通量大大提高。④实时定量 PCR 无需内标, 具有高度重复性, 可对每个样本进行重复扩增以减少潜在错误。⑤实时定量 PCR 有很大的动力学范围(接近 1×10^6), 用标准曲线对靶序列进行检测时, 可对任何未知样本进行定量, 循环阈值(threshold cycle, Ct)和相关的 DNA 模板拷贝数呈线性相关。

另外, 实时定量 PCR 技术有效地解决了传统定量 PCR 只能终点检测的局限, 实现了每一轮循环均检测一次荧光信号的强度, 并记录在电脑软件之中, 通过对每个样品循环阈值的计算, 根据标准曲线获得定量结果^{[11][14][17]}。

但是, 利用实时定量 PCR 进行食品中致病微生物定量检测时, 需要引起注意的是: DNA 提取方法的差异可能会影响 DNA 的产率, 因此会对 DNA 的检测限产生干扰。理论上如果 DNA 纯化得当、扩增条件良好, PCR 可检测到一个 DNA 基因拷贝, 但由于样品中食品的成分能抑制 PCR 中酶的反应活性, 可能会使实际检测限大于 1^{[7][18]}。

2.3 免疫捕获 PCR

免疫捕获 PCR 就是将免疫捕获和 PCR 扩增结合起来的一种检测方法, 它的检测对象是完整的病原体, 通过固相化的特异抗体捕获特定的抗原微生物, 再利用其基因组序列特异的引物进行 PCR 扩增, 通过对扩增产物的检测和分析达到对完整病原体的检测, 这样不仅提高了特异性, 而且大大提高了样本检测的通量, 从而明显增高检测的灵敏度^[19]。免疫捕获 PCR 大致可分为抗体的固相化、抗原捕获、模板制备、PCR 扩增、扩增产物的检测和分析等步骤。

免疫磁珠分离就是应用这种原理, 将样品与包被目的菌特异性抗体的珠子进行混合, 样品中的目的菌就会与免疫磁珠结合, 然后再把免疫磁珠与样品中的其他物质和微生物分离开。这样就可以对纯化目的菌的靶 DNA 进行 PCR 反应和定量。Waller 等^[20]用该方法对食品中空肠弯曲菌进行分离, 并应用 ELISA 方法进行了定量分析。

定量免疫捕捉 PCR 可避免食品组分对 PCR 反应的影响, 可对靶细菌进行简单快速浓缩, 不需要进行选择富集或 DNA 的纯化就可以对少量的细菌定量。

3 定量 PCR 的优缺点

在过去的几年里, 食品中致病微生物的快速检测研究取得了很大的进展。Q-PCR 的快速、敏感、特异性, 决定了该技术是食源性致病微生物快速定量检测中最具发展前途的方法。目前, 有关食品中致病微生物的存在和计数所引发的, 是否采用危险性评估的方法代替零容忍值的问题, 引起越来越激烈的争论, 在这种情况下, Q-PCR 就显得更为重要。相比各种可用的 Q-PCR 技术, 对扩增反应可进行实时监测的实时定量 PCR 技术最具发展潜力。

Q-PCR 在快速检测中占有明显的时间优势, 但也应注意到现行的以 DNA 为基础的方法, 不能区分活且生长、活而不长和死的细菌, 尤其对即食食品和使用前需要加热处理的食品, 应该考虑该如何区分样本中的死细菌和活细菌, 因此, 在对食品中致病微生物的 Q-PCR 检测结果解释之前, 对食品加工、销售和使用的全过程加以了解, 考虑采用其它或补充实验加以对应比较, 是完全有必要的^[4]。

现在也有人研究用 mRNA 而不是 DNA 的逆转录 PCR 作为检测活细胞的方法。然而, mRNA 的不稳定性、食品基质中 mRNA 提取的复杂性、逆转录抑制物的影响、合适 mRNA 靶子的选择等都对 mRNA 的逆转录 PCR 应用于食品中微生物的定量提出巨大的挑战^[18]。

4 结 语

传统的定量检测方法依靠特异的微生物培养基对食品中活菌进行分离和计数, 测试过程需进行培养基准备、平板培养、菌落计数、生化鉴定等步骤, 所以整个检测显得复杂、费时。随着食品安全控制的重点由单一终产品的质量检验向食品生产加工全过程监控的转变, 对原料、加工环节及终产品中可能存在的有害微生物进行快速检验和定量, 就显得越来越重要。免疫学、分子生物学、计算机技术的发展对建立敏感、快捷的食品微生物快速检测方法起着积极的推动作用, Q-PCR 技术的应用, 使食品中致病微生物的快速定量在



分子水平取得了很大的进步,事实证明以 PCR 为基础的快速定量检测技术在该领域的应用是切实可行的,而且今后会有更为广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 杨建秀. 食品安全与食源性疾病[J]. 热带医学杂志, 2004, 4(2): 201-202.
- [2] 黄留玉. PCR 最新技术原理、方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [3] 谭天伟, 等译. 分子生物学与生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [4] 裴晓燕, 刘秀梅. 食源性致病菌定量检测方法研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2004, 31(5): 257-264.
- [5] Hirano T. Theoretical and experimental dissection of competitive PCR for accurate quantification of DNA [J]. Analytical Biochem, 2002, 303: 57-65.
- [6] Wolf C, Luthy J. Quantitative competitive PCR for quantification of porcine DNA[J]. Meat science, 2001, 57: 161-168.
- [7] Li W, Drake MA. Development of a quantitative competitive PCR assay for detection and quantification of *Escherichia coli* O157: H7 cells[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(7): 3291-3294.
- [8] 全文斌, 高巍, 费然, 等. 核酸扩增产物的量化酶免疫通用型检测方法[J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22: 83-86.
- [9] Wang C, Hong C. Quantitative PCR for *Listeria monocytogenes* with colorimetric detection[J]. J Food Prot, 1999, 62(1): 35-39.
- [10] Gonzalez I, Garcia T, Fernandez A, et al. Rapid enumeration of *Escherichia coli* in oysters by a quantitative PCR-ELISA[J]. J Appl Microbiol, 1999, 86(2): 231-236.
- [11] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR[J]. Genome Res, 1996, 6(10): 986-994.
- [12] Sails AD, Fox AJ, Bolton FJ, et al. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(3): 1383-1390.
- [13] Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, et al. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses[J]. J of Virological Methods, 1999, 77: 37-46.
- [14] Batt CA. Molecular diagnostics for dairy-borne pathogens[J]. J Dairy Sci, 1997, 80(1): 220-229.
- [15] Kimura B, Kawasaki S, Nakano H, et al. Rapid, quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified-atmosphere-packaged fish[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(1): 206-216.
- [16] Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, et al. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification[J]. Biotechniques, 1997, 22: 130-138.
- [17] Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR[J]. Genome Res, 1996, 6(10): 995-1001.
- [18] Nogva HK, Rudi K, Naterstad K, et al. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(10): 4266-4271.
- [19] Jansen RW, Siegl G, Lemon SM. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 2867-2871.
- [20] Waller DF, Ogata SA. Quantitative immunocapture PCR assay for detection of *Campylobacter jejuni* in foods[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(9): 4115-4118.