

产酪胺粪肠球菌和屎肠球菌 PCR 检测方法的建立

舒蕊华¹, 卢士玲², 徐幸莲^{1,*}

(1.南京农业大学 教育部肉品加工与质量控制重点实验室, 江苏 南京 210095;

2.石河子大学食品学院, 新疆 石河子 832003)

摘要:目的: 建立快速简便地检测产酪胺粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)的 PCR 方法。方法: 将粪肠球菌和屎肠球菌的酪氨酸脱羧酶基因与 GenBank 数据库中已公布的细菌的酪氨酸脱羧酶基因进行比对, 根据它们的非保守序列, 分别设计粪肠球菌和屎肠球菌的特异性引物, 建立检测产酪胺粪肠球菌和屎肠球菌的 PCR 方法。结果: 根据非保守序列, 分别设计粪肠球菌和屎肠球菌的特异性引物, 用 27 株细菌对这两对引物分别进行反复验证, 结果显示, 所设计的两对引物都只对其目的菌株产生特异性扩增, 对其他菌株没有扩增, 方法的检测限可达到 1.0×10^2 CFU/mL。结论: 本方法具有良好的特异性、稳定性和灵敏性, 可用作食品中产酪胺粪肠球菌和屎肠球菌的检测。

关键词: 粪肠球菌; 屎肠球菌; 酪氨酸脱羧酶基因; 聚合酶链式反应

Development of A PCR Assay for Detection of Tyramine-producing *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*

SHU Rui-hua¹, LU Shi-ling², XU Xing-lian^{1,*}

(1. Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. College of Food, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: Objective: The aim of this study was to develop a PCR assay for the detection of tyramine-producing *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. Methods: The tyrosine decarboxylase genes (*tdc* gene) of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* were compared with those published in GenBank database, and specific primers were designed based on their nonconservative sequences to develop a PCR assay. Results: Each primer pair could only amplified their target gene from the associated ones of 27 bacterial strains tested. The detection limit of this assay was 1.0×10^2 CFU/mL. Conclusion: The developed PCR assay has good specificity, stability and sensitivity.

Key words: *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus faecium*; tyrosine decarboxylase gene; polymerase chain reaction (PCR)

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)18-0176-04

生物胺在食品中广泛存在, 尤其是在含有丰富蛋白质和氨基酸的发酵食品中, 并且已经成为世界范围内潜在的食品安全问题。人体内适量存在的生物胺具有重要的生理功能, 如促进生长、增强代谢等。但是, 过多的生物胺积累就会引起头痛、高血压、腹部痉挛、呕吐、腹泻等症状, 严重的还会危及生命^[1]。食品中

存在的生物胺, 除精胺和亚精胺外, 主要由微生物作用产生。微生物产生的氨基酸脱羧酶作用于特定的氨基酸前体, 使其脱羧形成各种生物胺^[2-4]。食品中常见的生物胺主要有酪胺、组胺、尸胺、腐胺、苯乙胺、色胺、精胺和亚精胺^[5]。其中酪胺和组胺在各种食品中普遍存在, 且这二者的毒性也最强。食品中产酪胺的

收稿日期: 2010-11-04

基金项目: 国家“863”计划项目(2010AA10Z303)

作者简介: 舒蕊华(1985—), 女, 硕士, 研究方向为肉品质量安全控制。E-mail: srh8585@126.com

* 通信作者: 徐幸莲(1962—), 女, 教授, 博士, 研究方向为肉品质量安全控制。E-mail: xlxu@njau.edu.cn

微生物主要为肠细菌和乳酸菌,其中粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)检出率和产酪胺能力均较高。对产生物胺微生物的检测方法主要有微生物培养显色法、化学检测法和分子检测法。前两种方法费时费力,且只能鉴定该微生物是否产胺,归类于哪一属。分子检测法不仅比前两种方法快捷简便,而且对微生物能鉴定到种^[6-11]。目前针对产生物胺微生物的分子检测方法主要是根据微生物氨基酸脱羧酶基因的保守序列设计特异性引物,通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术进行特异性扩增,根据扩增结果来判定其是否产生某种特定的生物胺^[12]。而在判定该微生物为何种微生物时,常采用细菌 16S rDNA 通用引物对其进行扩增,然后通过测序和序列比对来判定其为何种微生物。本研究以目前 GenBank 数据库已公布的 10 种细菌的酪氨酸脱羧酶基因(*tdc* 基因)序列为基准,将粪肠球菌和屎肠球菌的 *tdc* 基因与其他几种细菌的 *tdc* 基因进行比对,根据其非保守序列分别设计粪肠球菌和屎肠球菌的特异性引物,从而建立一种快速检测产酪胺粪肠球菌和屎肠球菌的方法。

1 材料与方法

1.1 菌种、试剂与仪器

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, 编号 1.2135)和屎肠球菌(*Enterococcus faecium*, 编号 1.2136)标准菌株 中国普通微生物菌种保藏中心;粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*)、多变棒杆菌(*Corynebacterium variabilis*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)、木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylosus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhosa*)、单核增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)等其他菌株均为本实验室分离保存(除粪肠球菌和屎肠球菌外,其余菌株均为不产酪胺菌株)。

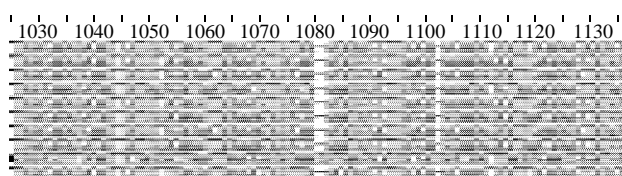
PCR Green Mix、DL2000 DNA Marker 大连宝生物工程有限公司;Gold View 赛百盛基因技术有限公司;琼脂糖 北京索莱宝科技有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型, TIANamp Bacteria DNA Kit) 北京天根生物科技有限公司;营养肉汤培养基 北京陆桥技术有限责任公司。

Veriti 96 Well Thermal Cycler 普通 PCR 仪 美国 ABI 公司;DY602S 稳流稳压琼脂糖凝胶电泳仪 南京生兴生物技术有限公司;Universal Hood II 凝胶成像系统 美

国 Bio-Rad 公司;SW-CJ-2FD 洁净工作台 苏净安泰集团苏州安泰空气技术有限公司;TG16-WS 台式高速离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 引物设计与选择

本研究拟采用 *tdc* 基因为目的基因,建立定性检测粪肠球菌和屎肠球菌的 PCR 检测方法。在 GenBank 数据库检索得到目前已公布的 10 种细菌的 *tdc* 基因序列,分别为:屎肠球菌, GenBank AJ783966.1;粪肠球菌, GenBank AF354231.1;弯曲乳杆菌, GenBank FN392115.1;广布肉毒杆菌, GenBank DQ336701.1;表皮葡萄球菌, GenBank EF371899.1;短乳杆菌, GenBank FN392118.1;嗜盐四联球菌, GenBank AB059363.1;发酵乳杆菌, GenBank EF371900.1;植物乳杆菌, GenBank EF178285.1;耐久肠球菌, GenBank AJ630043.1。用 BioEdit 软件进行分析(图 1),根据非保守序列分别设计粪肠球菌和屎肠球菌的特异性引物。



从上到下依次为屎肠球菌、粪肠球菌、弯曲乳杆菌、广布肉毒杆菌、表皮葡萄球菌、短乳杆菌、嗜盐四联球菌、发酵乳杆菌、植物乳杆菌、耐久肠球菌。

图 1 *tdc* 基因序列分析

Fig.1 Alignment of *tdc* gene nucleotide sequences

利用 PrimerPremier5 软件在非保守序列上设计引物,并将设计的引物在 NCBI-BLAST 上对其特异性进行检索验证。经特异性检索验证,最终选择引物为:粪肠球菌:上游引物 TCAGTTCCATGGCATAACAGCAGGT (24bp),下游引物 AGGCAACGTTGTTCCCGTTCCA (22bp),产物 115bp;屎肠球菌:上游引物 TAGGTG TAGTCGGTGTGTAG(21bp),下游引物 CGAATG GAATGAAGTTGTTGTC(22bp),产物 188bp。引物由上海生工生物科技有限公司合成。

1.3 PCR 方法建立

1.3.1 细菌培养

所有菌株接种于营养肉汤中,37℃过夜培养,收集菌体待用。

1.3.2 细菌基因组 DNA 提取

根据试剂盒说明书进行。

1.3.3 PCR 扩增条件优化

退火温度优化:退火温度从 52℃到 62℃,以 2℃为递增单位,逐个进行验证。引物浓度优化:引物从

0.25、0.5、0.75、1.0 μL (每 25 μL 反应体系中的体积数) 进行逐级优化。模板浓度优化: 模板从 1.0、1.5、2.0 μL (每 25 μL 反应体系中的体积数) 进行逐级优化。

1.3.4 引物特异性验证

以提取的验证菌的 DNA 进行 PCR 扩增, 有目的条带为阳性, 无目的条带为阴性。

1.3.5 引物重复性和稳定性

用相同浓度的模板, 同批重复两次, 不同批重复进行 PCR 扩增, 以验证引物重复性与稳定性。

1.3.6 引物灵敏性验证

将已知浓度的粪肠球菌和屎肠球菌菌液 10 倍逐级稀释, 取各稀释度的菌液 1 mL 按照试剂盒方法提取基因组 DNA, 用蛋白核酸微量定量仪对基因组 DNA 定量, 在优化好的 PCR 条件下以各稀释浓度的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 出现扩增条带的最高稀释度即为检测限。

2 结果与分析

2.1 PCR 反应条件

确定粪肠球菌引物的最佳退火温度为 58℃, 屎肠球菌引物的最佳退火温度为 60℃。两种引物的上下游引物最适添加量均为 0.5 μL , 模板最适添加量为 2 μL (25 μL 反应体系)。

反应总体积为 25 μL : PCR Green Mix 12.5 μL , 正向引物 0.5 μL , 反向引物 0.5 μL , 模板 2 μL , 加无菌水 9.5 μL , 补足至 25 μL 。

粪肠球菌 PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃、30 s 变性, 58℃、30 s 退火, 72℃、30 s 延伸, 反应 30 个循环, 再 72℃、5 min 结束反应, 最后降温至 4℃ 保存。

屎肠球菌 PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃、30 s 变性, 60℃、30 s 退火, 72℃、30 s 延伸, 反应 30 个循环, 再 72℃、5 min 结束反应, 最后降温至 4℃ 保存。

2.2 特异性

用 10 株粪肠球菌、5 株屎肠球菌、2 株松鼠葡萄球菌等 27 株细菌 (表 1) 对所设计引物分别进行特异性验证, 结果显示, 粪肠球菌特异性引物只对 10 株粪肠球菌有扩增, 产物大小为 115 bp, 对其他菌株均没有扩增; 屎肠球菌引物只对 5 株屎肠球菌有扩增, 且产物大小为 188 bp, 对其他菌株也没有扩增。说明这两对分别针对粪肠球菌和屎肠球菌设计的引物特异性良好, 只对目的菌株有扩增, 对其他菌株无扩增。

表 1 用于验证引物特异性的菌株及验证结果

Table 1 List of bacterial strains used

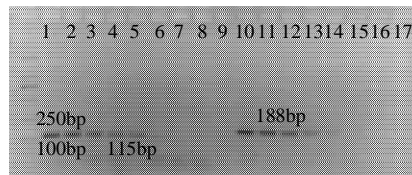
菌株	来源	PCR 反应结果		
		粪肠球菌	屎肠球菌	
粪肠球菌	CGMCC 1.2135	+	—	
	DA3	发酵香肠	+	—
	DA5	发酵香肠	+	—
	DA6	发酵香肠	+	—
	DA7	发酵香肠	+	—
	LfA4	发酵香肠	+	—
	LfA5	发酵香肠	+	—
	ChA3	发酵香肠	+	—
	ChA4	发酵香肠	+	—
	zhA5	发酵香肠	+	—
屎肠球菌	CGMCC 1.2136	—	+	
	shR1	发酵香肠	—	+
	shR2	发酵香肠	—	+
	shR3	发酵香肠	—	+
	shR4	发酵香肠	—	+
腐生葡萄球菌	RGA6	发酵香肠	—	—
	LAX3	发酵香肠	—	—
水生棒状杆菌	发酵香肠	—	—	
产气肠杆菌	发酵香肠	—	—	
植物乳杆菌	发酵香肠	—	—	
嗜盐四联球菌	发酵香肠	—	—	
木糖葡萄球菌	发酵香肠	—	—	
表皮葡萄球菌	发酵香肠	—	—	
大肠杆菌	鸡肉	—	—	
肠炎沙门氏菌	鸡肉	—	—	
鼠伤寒沙门氏菌	鸡肉	—	—	
单增李斯特菌	鸡肉	—	—	

注: “+”表示阳性; “—”表示阴性。

2.3 重复性与稳定性

在同批和不同批次实验中, 所设计的特异性引物均只对其目的菌株产生扩增, 对其他菌株无扩增, 说明所设计的两对引物的重复性和稳定性良好。

2.4 灵敏性



1~8 泳道粪肠球菌浓度依次为 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 、 1.0×10^1 、 1.0×10^1 CFU/mL; 泳道 9. NTC; 10~17 泳道屎肠球菌浓度依次为 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 、 1.0×10^1 、 1.0×10^1 CFU/mL。

图 2 灵敏度验证

Fig.2 Validation of detection limit of the developed assay

取浓度分别为 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^1$ CFU/mL 的菌液提取的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增结果如图 2 所

示。当菌液浓度为 1.0×10^1 CFU/mL 时未出现扩增条带, 其他浓度均有扩增条带出现, 因此, 此方法的检测限为 1.0×10^2 CFU/mL。

3 讨论与结论

粪肠球菌和屎肠球菌作为致病菌在医学等领域已经有了很多深入的研究, 然而作为食品中重要的产生物胺菌株, 针对它们的研究还很少, 检测方法以传统微生物培养法为主, 较为繁琐。PCR 技术作为一种分子检测手段在微生物的鉴定检测方面已经有了非常成熟的应用, 不仅结果准确可信, 操作也十分简便快捷。本研究建立了食品中产酪胺粪肠球菌和屎肠球菌的 PCR 检测方法, 与传统方法相比, 具有操作简单、检测时间短等特点。

本研究以粪肠球菌和屎肠球菌的酪氨酸脱羧酶基因为目的基因, 分别设计它们的特异性引物, 通过对引物特异性、稳定性和灵敏性的检验, 结果证实, 该方法能快速准确地检测出目的菌株, 为食品中产酪胺粪肠球菌和屎肠球菌的检测提供了一种快捷简便的方法。

参考文献:

- [1] RAWLES D D, FLICK G J, MARTIN R E, et al. Biogenic amines in fish and shellfish[J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1996, 39: 329-365.
- [2] TEN B B, DAMINK C, JOOSTEN H M L J, et al. Occurrence and formation of biologically active amines in foods[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1990, 11(1): 73-84.
- [3] MAIJALA R, EEROLA S. Biogenic amines[M]//HUBERT R. *Encyclopedia of dairy science*. Oxford: Elsevier, 2002: 156-162.
- [4] LORENZO J M, MARTINEZ S, FRANCO I, et al. Biogenic amine content during the manufacture of dry-cured lacon, a Spanish traditional meat product: Effect of some additives[J]. *Meat Science*, 2007, 77(2): 287-293.
- [5] SHALABY A R. Significance of biogenic amines to food safety and human health[J]. *Food Research International*, 1996, 29(7): 675-690.
- [6] BOVER-CID S, HOLZAPFEL W H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 53(1): 33-41.
- [7] 李超. 产生物胺乳酸菌检测方法的建立及其应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2005: 34-47.
- [8] LATORRE-MORATALLA M L, BOVER-CID S, VECIANA-NOGUES T, et al. Thin-layer chromatography for the identification and semi-quantification of biogenic amines produced by bacteria[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(18): 4128-4132.
- [9] KUNG H F, LEE Y C, HUANG Y R, et al. Biogenic amines content, histamine-forming bacteria, and adulteration of pork and poultry in tuna dumpling products[J]. *Food Control*, 2010, 21(7): 977-982.
- [10] KUNG H F, WANG T Y, HUANG Y R, et al. Isolation and identification of histamine-forming bacteria in tuna sandwiches[J]. *Food Control*, 2009, 20(11): 1013-1017.
- [11] KUNG H F, TSAI Y H, WEI C I. Histamine and other biogenic amines and histamine-forming bacteria in miso products[J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(1): 351-356.
- [12] LADERO V, MARTINEZ N, MARTIN M C, et al. QPCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products[J]. *Food Research International*, 2010, 43(1): 289-295.