

水产品中副溶血性弧菌 PMA-ddPCR 活菌定量检测方法的研究

翁文川¹, 管锦绣², 谢会³, 凌莉¹, 陈文锐¹, 冼钰茵¹, 许喜林²

(1. 广东检验检疫技术中心, 广东省动植物与食品进出口应对技术措施重点实验室, 广东广州 510623)

(2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)(3. 广州双螺旋基因技术有限公司, 广东广州 510320)

摘要: 本研究旨在针对水产品中活的副溶血性弧菌建立一种快速定量的 PCR 检测方法。基于叠氮溴化丙锭(PMA)在一定光照条件下能抑制死亡菌 DNA 扩增, 以及微滴式数字 PCR 技术能将检测精度扩展至单分子目标基因, 并实现绝对定量的特点, 以副溶血性弧菌 *tlh* 基因为目的片段设计及筛选适合的特异性引物与探针, 优化反应体系, 通过对 PMA 浓度及曝光条件等优化, 建立了一种联用 PMA-ddPCR 技术快速检测水产品中活的副溶血性弧菌的定量检测方法。研究结果显示: 选择 16 $\mu\text{g/mL}$ 作为 PMA 工作浓度, 曝光时间为 8 min, 此条件下能够完全抑制副溶血性弧菌死菌的 DNA 扩增并对活菌扩增无影响。通过对比 PMA-ddPCR 和 PMA-qPCR 的检测下限分别为 2×10^1 cfu/mL、 2×10^2 cfu/mL, PMA-ddPCR 法的灵敏度比 PMA-qPCR 法的高。应用 PMA-ddPCR 定量方法检测人工污染的基围虾和小帆立贝这两种海产品, 在基围虾中最低可检出 1.9×10^1 cfu/g 的副溶血性弧菌、在小帆立贝中最低可检出 8.9 cfu/g 的副溶血性弧菌。该研究为将 PCR 技术实际应用于水产品中低量污染、活的副溶血性弧菌的定量检测奠定了基础。

关键词: 副溶血性弧菌; 叠氮溴化丙锭; 微滴式数字 PCR

文章篇号: 1673-9078(2019)06-273-279

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.036

Study on PMA-ddPCR Method for Quantitative Detection of Live *Vibrio parahaemolyticus* in Aquatic Products

WENG Wen-chuan¹, GUAN Jin-xiu², XIE Hui³, LING Li¹, CHEN Wen-rui¹, XIAN Yu-yin¹, XU Xi-lin²

(1. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal, Plant and Food, Guangzhou 510623, China)

(2. School of Food and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(3. Guangzhou Double Helix Gene Technology Co. Ltd., Guangzhou 510320, China)

Abstract: A rapid quantitative PCR detection method for live *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products was studied. As propidium monoazide (PMA) can inhibit the death of bacteria DNA amplification under at certain lighting condition, and the droplet digital PCR technology can extend detection accuracy to single molecule target genes and achieve absolute quantification, a new method called PMA-ddPCR (combined PMA and ddPCR) was applied to detect live *Vibrio parahaemolyticus*. Specific primers and probes targeting the *tlh* gene of *Vibrio parahaemolyticus* were designed, and the PCR reaction system was optimized. The PMA concentration and exposure conditions of PMA-ddPCR for target gene were also tested. The results showed that the working concentration of PMA was 16 $\mu\text{g/mL}$ and the exposure time was 8 min. The expansion of dead bacteria could be completely inhibited and the activity of live bacteria was not affected under this condition. The sensitivity of PMA-ddPCR method was higher than that of PMA-qPCR method by comparing the detection limits of PMA-ddPCR and PMA-qPCR (2×10^1 cfu/mL and 2×10^2 cfu/mL, respectively). The live *Vibrio parahaemolyticus* in artificially contaminated marine products (sea shrimp and small scallop) were detected by PMA-ddPCR quantitative method, and the lowest detectable *Vibrio parahaemolyticus* in sea shrimps was 1.9×10^1 cfu/g, and the lowest detectable of *Vibrio parahaemolyticus* in small sail was 0.89×10^1 cfu/g. This study provided the foundation for the application of PCR technology to the quantitative detection of low-level pollution of live *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products.

收稿日期: 2019-02-26

基金项目: 广东省科技计划项目(2016A040403093); 广州市科技计划项目(201804010500)

作者简介: 翁文川(1973-), 男, 高级工程师, 研究方向: 食品安全检测

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; propidium monoazide (PMA); droplet digital PCR (ddPCR)

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)一种嗜盐性革兰氏阴性弧状杆菌,广泛存在于海水和海产品中,是沿海地区常见的食物中毒病原菌。随着全球化商品流通的快速发展及海产品消费的迅速上升,该菌已成为引发世界范围内细菌性急性胃肠炎的重要致病原,成为不可忽视的对食品质量和人体健康产生威胁的一大对象,它的检测也一直倍受人们关注。PCR 技术因其特异性强、灵敏度高的优点而成为检测副溶血性弧菌的有效方法^[1],由于 PCR 技术是基于核酸水平的检测,样品中死亡细胞 DNA 的稳定存在,使普通 PCR 技术无法区分活菌与死菌^[2]。叠氮溴化丙锭(Propidium monoazide, PMA)是一种能够进入膜不完整的死菌细胞中与死菌细胞的 DNA 发生光激化反应从而共价结合抑制其扩增的活细胞荧光染料,将其与 PCR 技术结合,能够克服无法区分活菌与死菌的问题,实现活菌检测的目的^[3]。目前已有将 PMA 与 PCR 技术结合用于活菌检测的研究报道^[4-7]。微滴式数字 PCR(Droplet digital PCR, ddPCR)作为新的 PCR 技术,通过将反应体系微滴化处理并分配至独立的反应室内,读取各反应室内荧光信号的有无并进行泊松统计从而能够直接测定初始模板拷贝数^[8]。不需标准曲线,可实现绝对定量,且检测限实现了在 10 拷贝以内的突破;由于对反应体系的微滴化处理,也较好解决了 PCR 反应易受基质抑制的问题,能够获得较稳定一致的扩增效率^[9]。目前微滴式数字 PCR 在食源性致病菌检测已有相关报道^[10-13],技术优势初步展现。

本文将微滴式数字 PCR 与 PMA 活细胞荧光染料相结合,通过对 PCR 检测中所用引物探针、DNA 提取方法的确定及 PMA 处理条件的优化,初步建立了一种高灵敏度的快速、直接的活菌检测技术,评价了 PMA-ddPCR 的线性关系和灵敏度,与 qPCR 法、平板计数法比较,此方法在用于不同活菌比例混合菌液的检测中确证了方法的有效性,并将该方法初步应用于人工污染的基围虾和小帆立贝中副溶血性弧菌活菌检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验菌株

实验菌株如表 1 所示。

1.1.2 试剂

副溶血性弧菌培养基,北京陆桥有限公司;

Chelex-100, 美国 SIGMA; PMAxx, 美国 Biotium 公司; Premix Ex Taq TM (Probe qPCR), 大连宝生物工程有限公司; ddPCR Supermix for Probes (No dUTP)、QX200 Droplet Generation Oil、ddPCR Droplet Reader Oil, 美国伯乐公司。

表 1 实验菌株

Table 1 The experimental strains

菌株名称	菌株来源	菌株编号
沙门氏菌	ATCC	14028
沙门氏菌	ATCC	H9809
阪崎肠杆菌	ATCC	12868
大肠杆菌	ATCC	25922
肺炎克雷伯氏菌	CMCC	46108-5
宋内志贺氏菌	CMCC	51334
大肠杆菌 O157	ATCC	43889
阪崎肠杆菌	ATCC	12868
金黄色葡萄球菌	CMCC	26001
金黄色葡萄球菌	ATCC	6538
副溶血性弧菌	ATCC	17802
副溶血性弧菌		VPL4-91
副溶血性弧菌	阳性株	VP200404
副溶血性弧菌	阳性株	VP200606
副溶血性弧菌	阳性株	VP200609
副溶血性弧菌	阳性株	VP201103
溶藻弧菌	CMCC	1833
河流弧菌	CMCC	1613
创伤弧菌	ATCC	27562
最小弧菌	CMCC	1969
拟态弧菌	ATCC	33847
单增李斯特氏菌	ATCC	19115

1.2 仪器

HG-EMA 核酸光标记仪,上海互恒科学仪器有限公司; ABI 7900HT Fast 型实时荧光 PCR 仪,美国 ABI 公司; DG8 cartridge 微滴生成卡、QX200 Droplet Generator、PX1 PCR Plate Sealer、PCR 基因扩增循环仪和 QX200 Droplet Reader, 美国伯乐公司。

1.3 方法

1.3.1 引物探针设计及确证

根据相关文献报道,食源性和环境分离出的副溶血性弧菌中不耐热溶血毒素基因(*tlh*)的携带率均为 100%^[14-16],本研究以副溶血性弧菌 *tlh* 作为靶标基因,

从 Genbank 数据库已知序列中选取保守及特异的区域进行引物探针的设计, 用多株菌株对多组引物探针进

行特异及灵敏度的筛选, 最终确定以下的副溶血性弧菌 *tlh* 引物探针, 并由上海生工生物工程公司合成。

表 2 副溶血性弧菌引物探针序列

Table 2 The primers and probe for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*

名称	引物和探针	序列(5'-3')	产物长度/bp
tlh-2	F	CACAATGGCGCTTCCCTAAC	150
	R	GCGCGATGTATTGGTTCTCA	
	Probe	FAM-AAGAACCTTCCGCTCTACAACCTGGGCA-BHQ	

1.3.2 副溶血性弧菌培养及其菌悬液的制备

将副溶血性弧菌菌株接种至 3%碱性蛋白胨水, 培养 36±1 °C, 8~18 h, 于 TCBS 上进行划线分离, 36±1 °C 培养 24 h 后, 挑取单个特征菌落接种至 3% NaCl TSA 上, 36±1 °C 培养 24 h。挑取纯培养物于 0.8% 生理盐水中, 制得活菌悬液, 另在 95 °C 下热致死 10 min 制备死菌悬液。

1.3.3 DNA 提取方法

比较几种 DNA 提取方法后, 确定采用 Chelex-100 提取方法: 取菌悬液 1 mL 灭菌离心管, 12000 r/min 下离心 1 min, 弃上清, 于沉淀中加入 200 μL 10% Chelex-100 溶液, 剧烈振荡 5~10 s; 56 °C 水浴 30 min, 取出振荡, 95 °C 加热 10 min, 剧烈振荡 5~10 s; 12000 r/min 下离心 5 min, 取上清液作为 DNA 模板。

1.3.4 ddPCR 和 qPCR 检测

ddPCR 反应体系 (20 μL): Supermix 10 μL, 正向引物 1.5 μL (10 μmol/L), 反向引物 1.5 μL (10 μmol/L), 探针 0.5 μL (10 μmol/L), DNase-free Water 2.5 μL, DNA 模板 4 μL。反应条件设置为: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 60 °C 1 min, 共 40 个循环; 98 °C 10 min; 4 °C。ddPCR 反应结束后, 自动计算出最终结果。

qPCR 反应体系 (25 μL): Premix Ex Taq (Probe qPCR) 12.5 μL, 正向引物 1.0 μL (10 μmol/L), 反向引物 1.0 μL (10 μmol/L), 探针 0.5 μL (10 μmol/L), DNase-free Water 5.0 μL, DNA 模板 5 μL。反应条件设置为: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共 45 个循环。

1.3.5 副溶血性弧菌 PMA 处理的优化

1.3.5.1 完全抑制死菌扩增的最低 PMA 浓度的研究

选择平板计数定量的 10²~10⁵ cfu/mL 梯度的菌悬液, 分别取 500 μL, 95 °C 下热致死 10 min 制备死菌悬液, 并涂布至 3% NaCl TSA 上培养 36 h, 以确证是否灭活。加入不同量的 PMA 工作液混匀, 避光孵育 10 min, 核酸光标记仪曝光 10 min, 按 1.3.3 中 Chelex-100 法提取 DNA 后进行 qPCR 反应, 反应体系和条件同 1.3.5。

1.3.5.2 不抑制活菌扩增的最高 PMA 浓度的研究

取 10² cfu/mL 稀释度的菌悬液 500 μL 作为活菌悬液, 然后向其中加入不同量的 PMA 工作液混匀, 避光孵育 10 min, 然后使用核酸光标记仪曝光 1 min, 按 1.3.3 中 Chelex-100 法提取 DNA 后进行 qPCR 反应, 反应体系和条件同 1.3.5。

1.3.5.3 曝光时间的选择

取 10⁵ cfu/mL 浓度菌悬液 500 μL 95 °C, 10 min 制备成死菌悬液, 加入 PMA 使其终浓度为 16 μg/mL, 避光孵育 10 min, 使用核酸光标记仪分别曝光 0、2、4、6、8、10 min, 按 1.3.3 使用 Chelex-100 法提取 DNA 后进行 qPCR 反应, 反应体系和条件同 1.3.5。

1.3.6 不同比例活/死菌混合液的 PMA-ddPCR、PMA-qPCR 检测

取 10⁵ cfu/mL 浓度菌悬液 95 °C, 10 min 制备成死菌悬液, 与不同体积、相同浓度的活菌悬液进行混合, 使活菌在混合液中的比例为 0~100%, 具体比例见表 3, 然后按已确定 PMA 条件进行处理, 对照组为不经 PMA 处理。按 1.3.3 中 Chelex-100 法提取 DNA 后进行 qPCR 反应和 ddPCR 反应, 反应体系和条件同 1.3.4。

表 3 死菌液中活菌的添加比例

Table 3 The rate of live bacteria in dead bacteria

活菌占比	0%	1%	5%	10%	20%	50%	70%	100%
总菌浓度	2.00×10 ⁵ cfu/mL							

1.3.7 PMA-ddPCR 和 PMA-qPCR 的灵敏度实验

以浊度为 0.8 的菌悬液作为初始稀释液 (制备方法见 1.3.2), 并对菌悬液进行梯度稀释。取适当稀释度进行平板计数。取稀释度为 10¹~10⁶ cfu/mL 的菌悬液 500 μL, PMA 条件处理, 按 1.3.3 中 Chelex-100 法提取 DNA 后进行 qPCR 反应和 ddPCR 反应, 反应体系和条件同 1.3.4。

1.3.8 PMA-ddPCR 检测人工污染样品中副溶血性弧菌活菌

取浊度为 0.8 的菌悬液作为初始稀释液(制备方法见 1.3.2), 并对菌悬液进行梯度稀释。取适当稀释度进行平板计数。称取经国标方法检测副溶血性弧菌阴性的基围虾和小帆立贝(样品来自当地海产品零售市场) 25 g, 向其中分别加入菌浓度为 $10^2 \sim 10^8$ cfu/mL 副溶血性弧菌(ATCC17802)活菌悬液 2 mL 以制备人工污染样品, 将污染后的样品加入至 225 mL 3%碱性蛋白胨水均质, 取 1 mL 均质液 12000 r/min 下离心 1 min, 弃上清液, 向沉淀中加入 500 μ L 去离子水, 振荡至沉淀悬浮且分散均匀, 在 PMA 优化条件下处理, 提取 DNA 后进行 ddPCR 反应, 反应体系和条件同 1.3.4。

1.3.9 数据统计分析

使用 SDS2.4 对 qPCR 结果进行数据分析, 使用 QuantaSoft 1.7.4.0917 对 ddPCR 的结果进行数据分析。qPCR 的每反应设置 2 个平行, 以 Ct 平均值 ≤ 36 作为有效数据判定依据; ddPCR 每反应设置 2 个平行, 计算平均值及相对标准偏差 (RSD), 以 $RSD \leq 25\%$ 作为有效数据判定依据。使用 Excel 365 绘制 qPCR、PMA-qPCR、PMA-ddPCR 标准曲线, 并进行线性回归分析, 使用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 引物的筛选结果

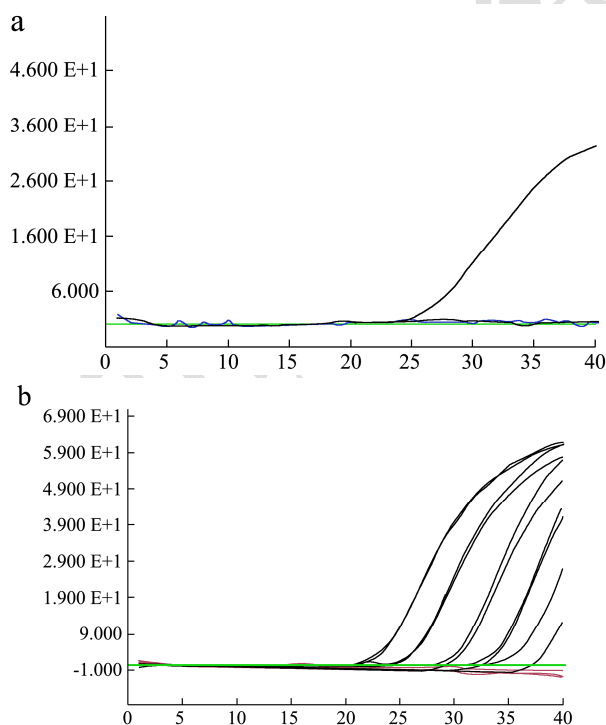


图1 引物探针 tlh-2 特异性及敏度性结果

Fig.1 The specificity and sensitivity results of primer and probes for tlh-2

分别对 4 组设计的引物探针进行特异性与敏感性实验, 结果如图 1 可知: 上图中显示只有副溶血性弧菌才扩增曲线, 弧菌属内的其它弧菌及其非弧菌属的对照菌均无扩增; 上图下显示该 tlh-2 引物探针对于梯度浓度的副溶血弧菌检测结果重复性, 均匀稳定确定 tlh-2 的引物探针组用后期的研究为本研究。

2.2 PMA 处理优化结果

2.2.1 完全抑制死菌扩增的最小 PMA 浓度的研究

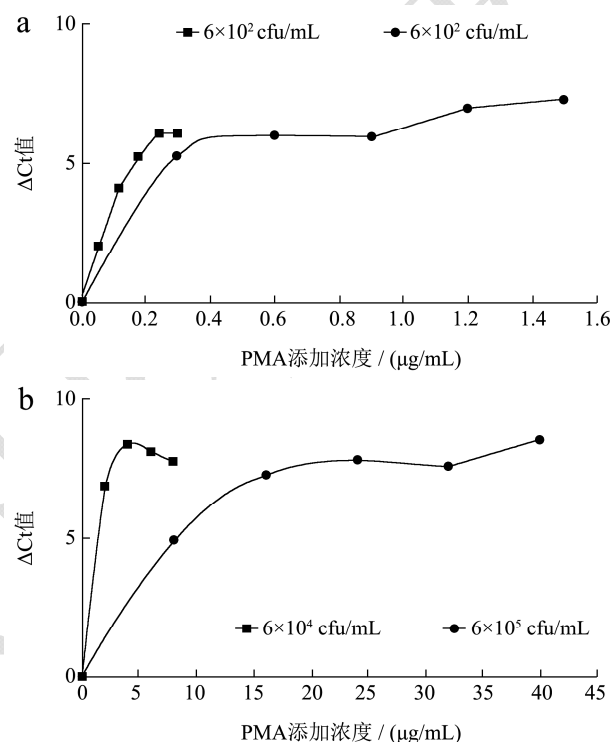


图2 各死菌浓度下不同 PMA 浓度下 PMA-qPCR 检测结果

Fig.2 The results of PMA-qPCR at different PMA concentration of different dead bacteria concentration

注: $\Delta Ct =$ 经 PMA 处理的实验组 Ct 值 - 相同浓度不经 PMA 处理的对照组 Ct 值。

选择平板计数为 $6.55 \times 10^2 \sim 6.55 \times 10^5$ cfu/mL 死菌悬液, 分别添加不同 PMA 浓度进行处理, 再进行 qPCR 反应, 结果如图 2 所示: 不同死菌浓度下, 随着 PMA 处理浓度上升, ΔCt 值上升, PMA 对死菌 DNA 扩增的抑制作用增强; 随着死菌浓度上升, 完全抑制死菌扩增的最小 PMA 浓度也上升, 在死菌浓度为 6.55×10^2 cfu/mL 时, 0.12 μ g/mL PMA 就能完全抑制其扩增, 在死菌浓度为 6.55×10^5 cfu/mL 时, 16 μ g/mL PMA 才能完全抑制其扩增。结果表明了对于不同的死菌浓度, 其完全抑制死菌的最小 PMA 浓度也存在差异, 考虑到实际检测中初始菌液浓度未知的情况, 建议选择浓度偏高以完全抑制死菌扩增且对活菌扩增无

影响的 PMA 浓度。

2.2.2 不抑制活菌扩增的最大 PMA 浓度研究

选择平板计数为 6.55×10^2 cfu/mL 活菌菌悬液, 经不同浓度 PMA 处理, 进行 qPCR, 结果如图 3 可知: 在 PMA 浓度不超过 $16 \mu\text{g/mL}$ 时, ΔCt 波动于 $0 \sim -0.39$, 表明此时 PMA 浓度对活菌扩增基本无抑制; 当 PMA 浓度大于 $20 \mu\text{g/mL}$ 时, ΔCt 大于 1 并逐步增长, 表明此时 PMA 对活菌扩增有明显抑制作用。结合 2.2.1 结果, 确定 $16 \mu\text{g/mL}$ 为本研究的 PMA 工作浓度, 此 PMA 浓度下, 能够完全抑制较高浓度死菌扩增而对低浓度活菌扩增无影响。

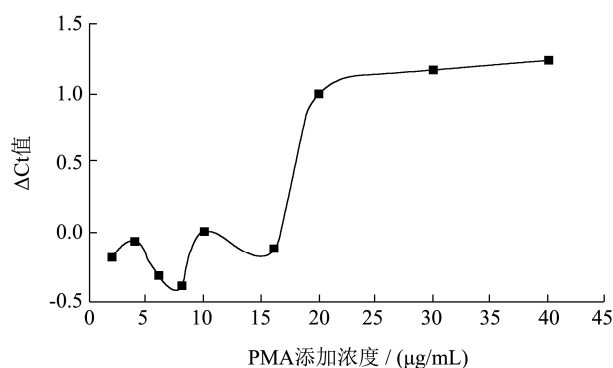


图3 不同 PMA 浓度下 PMA-qPCR 活菌检测结果

Fig.3 The results of PMA-qPCR at different PMA exposure time of live bacteria concentration

注: ΔCt =经 PMA 处理的实验组 Ct 值-相同浓度不经 PMA 处理的对照组 Ct 值。

2.2.3 PMA 曝光时间的选择

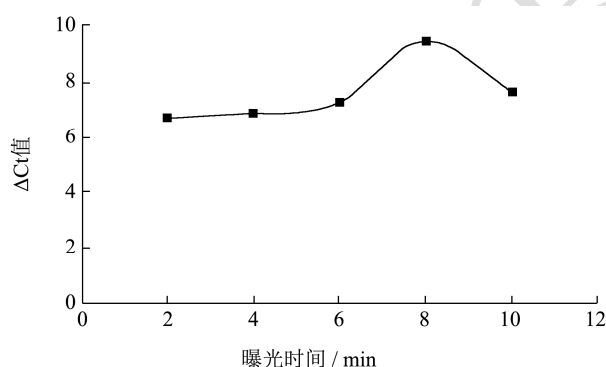


图4 不同曝光时间下 PMA-qPCR 死菌检测结果

Fig.4 The results of PMA-qPCR at different PMA exposure time of dead bacteria concentration

注: ΔCt =经 PMA 处理的实验组 Ct 值-相同浓度不经 PMA 处理的对照组 Ct 值。

选择平板计数为 6.55×10^5 cfu/mL 死菌菌悬液, 加入 $16 \mu\text{g/mL}$ PMA 进行不同时间 (0、2、4、6、8、10 min) 的曝光处理后, 进行 qPCR, 其结果如图 4 可知, 当曝光时间为 8 min 时, ΔCt 值最大, 表明此时 PMA 对死菌扩增的抑制作用最强, 并且此时 Ct 大于 35,

接近阴性, 说明此时 PMA 浓度能够完全抑制死菌扩增。选择 8 min 作为本研究最佳曝光时间。

2.3 平板计数与 PMA-ddPCR、qPCR 的线性

关系

将平板计数为 $2 \sim 2 \times 10^5$ cfu/mL 的梯度活菌悬液分为两组, 一组进行 PMA 处理, 提取 DNA 后进行 ddPCR 反应; 一组不进行 PMA 处理, 直接提取 DNA 后进行 qPCR 反应。根据测得的 Ct 值及拷贝数建立与菌浓度相关性的标准曲线: PMA-ddPCR 的标准曲线方程为 $y=0.9934x-1.5069$, R^2 为 0.9949; qPCR 法的标准曲线方程为 $y=-3.155x+38.873$, R^2 为 0.9982。

2.4 PMA-ddPCR 和 qPCR 检测不同活菌比例的

的菌液结果

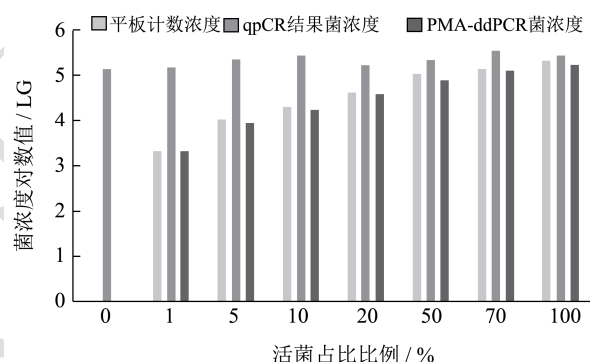


图5 平板计数、qPCR 与 PMA-ddPCR 在不同活菌比例的结果

Fig.5 The concentration of live *Vibrio parahaemolyticus* of different rate detected by plate count methods, qPCR and PMA-ddPCR

分别使用平板计数、qPCR 及 PMA-ddPCR 对不同活菌比例的混合菌液进行检测, 结果如图 5 可知: qPCR 的结果与平板计数的结果相比较, $0.01 < P < 0.05$, 两者存在显著差异性, 且 qPCR 结果不受比例的影响较为稳定, qPCR 测得的结果为所有细菌 DNA 总量, 不能区分活死菌; PMA-ddPCR 测得的拷贝数浓度由 2.3 标准方程换算得到的菌浓度与平板计数的结果相比较, $P > 0.05$, 两者非显著性差异。该 PMA-ddPCR 方法测得的拷贝数浓度由 2.3 标准方程换算得到的菌浓度与平板计数结果基本一致, 且均随活菌比例上升而上升, 该 PMA-ddPCR 方法测得的是活菌浓度, 且方法的准确度较高, 检测结果与平板计数结果在对数值上基本一致。

2.5 PMA-ddPCR 和 PMA-qPCR 的灵敏度

用 PMA-ddPCR、PMA-qPCR 方法检测 $2\sim 2\times 10^5$ cfu/mL 连续梯度稀释的副溶血性弧菌, 结果由图 6 可知: PMA-ddPCR 方法的检测灵敏度为 2×10^1 cfu/mL; PMA-qPCR 方法的检测灵敏度为 2×10^2 cfu/mL。

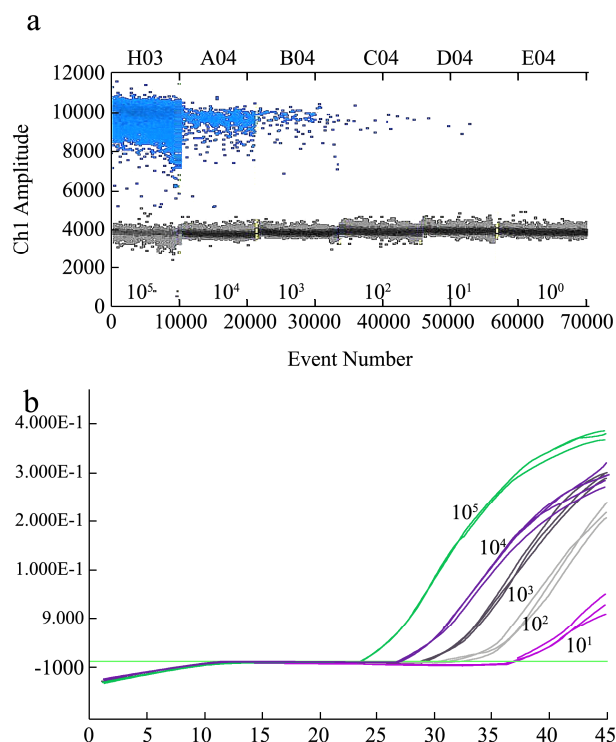


图 6 PMA-ddPCR 灵敏度的一维散点图、PMA-qPCR 灵敏度扩增曲线图

Fig.6 One-dimensional scatter plots of sensitivity of ddPCR and the amplification plot of sensitivity of ddPCR

2.6 PMA-ddPCR 和 PMA-qPCR 测定人工污染样品中副溶血性弧菌活菌

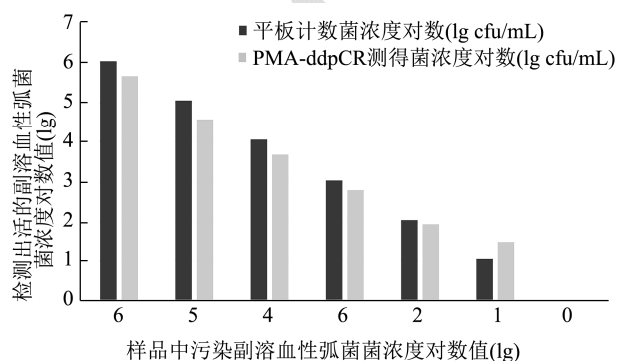


图 7 人工污染副溶血性弧菌基围虾样品平板计数与 PMA-ddPCR 结果对比

Fig.7 The results of live bacteria in artificial contaminated sea shrimp without enrichment by plate culture count and PMA-ddPCR

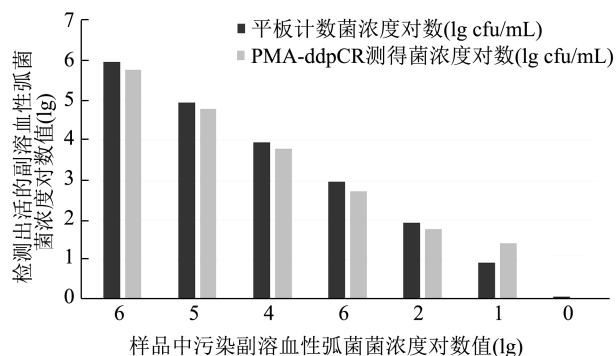


图 8 人工污染副溶血性弧菌帆立贝样品平板计数与 PMA-ddPCR 结果对比

Fig.8 The results of live bacteria in artificial contaminated small scallop without enrichment by plate culture count and PMA-ddPCR

使用 PMA-ddPCR 检测人工污染基围虾和小帆立贝中活的副溶血性弧菌, 由图 7、图 8 可知, 在 $10^2\sim 10^3$ cfu/mL 菌污染浓度下, PMA-ddPCR 测定菌浓度与平板计数结果基本吻合, PMA-ddPCR 测定人工污染基围虾中活菌的灵敏度为 1.12×10^1 cfu/g, 测定人工污染小帆立贝的灵敏度为 8.96 cfu/g; PMA-qPCR 测定人工污染基围虾中活菌的灵敏度为 1.12×10^2 cfu/g, 测定人工污染小帆立贝的灵敏度为 8.96×10^1 cfu/g。

3 结论

3.1 在过去 20 年间, 已发表的多篇研究论文表明副溶血性弧菌也已成为中国细菌性食源性暴发最重要的原因^[17]。该菌主要通过生食海鲜、被污染的水产品及制品传播, 从而引起人感染。当前在食品安全监控中对副溶血性弧菌是有量值限制的, 根据 GB 29921-2013 致病菌限量里规定: 水产制品中副溶血性弧菌的量不得超过 1000 MPN/g^[18]。副溶血性弧菌的食品安全国家标准 GB 4789.7-2013 规定的检测过程^[19], 经过前增菌、分离纯化、生化鉴定等过程, 再加上血清学鉴定, 检测周期少则 3 d, 多则要超过 5 d 的。随分子技术发展, 基于核酸片段 PCR 技术提供了快速、高效、特异性强的解决方法, 被广泛应用于食源性致病菌的检测。然而, 当遇到细菌死亡时, 其核酸仍能较长时间保留, PCR 检测方法难以有效区别样品中的死亡菌与活菌, 造成实际样品检测时, 容易出现假阳性的结果。

3.2 PMA 作为一种新型的核酸染料, 它在光激反应下能与游离核酸结合, 并对结合后核酸扩增起了有效的阻断作用; ddPCR 作为绝对定量方法能准确定量至单个目标 DNA, 与相对定量技术的 qPCR 方法相比,

不仅检测精度的提高,而且无需依赖标准曲线和 Ct 值,从而实现真正意义上的绝对定量。PMA 新型染料与 ddPCR 新技术的结合与应用,使水产品中低污染量的、活的副溶血性弧菌的定量检测得以实现。本研究以此建立的 PMA-ddPCR 定量检测副溶血性弧菌的方法,整个检测过程只需 3~4 h 内完成,检测结果与传统平板计数方法基本一致,检测时间缩短了 3~5 d,并解决了常规 PCR 法受死亡菌 DNA 影响出现“假阳性”结果的情况,本方法的检测低限能达到 $10^1 \sim 10^2$ cfu/g,已经完全满足食品安全监管的需求,具有广阔的应用前景和研究价值。

参考文献

- [1] 王小玉,冯家望,吴小伦,等.实时荧光 PCR 方法检测副溶血性弧菌的研究[J].食品研究与开发,2007,28(6):135-138
WANG Xiao-yu, FENG Jia-wang, WU Xiao-lun, et al. Study on the detection of *Vibrio parahaemolyticus* using REAL-TIME PCR method [J]. Food Research and Development, 2007, 28(6): 135-138
- [2] 祝儒刚,吕淑霞,刘月萍,等.基于 DNA 染料 EMA 的 PCR 技术检测鉴别副溶血性弧菌死活细胞[J].食品与发酵工业,2010,7:144-149
ZHU Ru-gang, LYU Shu-xia, LIU Yue-ping, et al. Discrimination of viable and dead cell of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR based on DNA binding dye of EMA [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 7: 144-149
- [3] 肖莉莉.叠氮溴化丙锭(PMA)应用于南美白对虾中食源性致病菌活菌检测及微生物多样性分析的研究[D].上海:上海海洋大学,2016
XIAO Li-li. Application of propidium monoazide (PMA) on the detection of foodborne pathogen and microbial diversity in shrimp [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016
- [4] 罗剑飞,林伟铁,郭勇.PMA 与 PCR 结合的细菌活细胞检测方法[J].华南理工大学学报(自然科学版),2010,38(9):142-146
LUO Jian-fei, LIN Wei-tie, GUO Yong. Detection of viable bacterium cells based on propidium monoazide in combination with PCR [J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2010, 38(9): 142-146
- [5] Liu Y Y, Liu Z S, Shi-Ying L U, et al. Development of PMA-PCR method for detection of viable *Enterobacter sakazakii* in pasteurized milk [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(2): 65-69
- [6] Liu P, Niu C, Hu J, et al. The applications prospects of PMA-PCR technology in plant pathogenic bacteria quarantine [J]. Journal of Inspection & Quarantine, 2014, 24(4): 72-75
- [7] 刘艳艳,柳增善,卢士英,等.灭菌乳中活阪崎肠杆菌 PMA-PCR 检测方法的建立[J].中国畜牧兽医,2014,41(2): 65-69
LIU Yan-yan, LIU Zeng-shan, LU Shi-ying, et al. Development of PMA-PCR method for detection of viable *Enterobacter sakazakii* in pasteurized milk [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(2): 65-69
- [8] 冯兆民.基于微滴式数字 PCR 技术的甲型流感病毒绝对定量研究[D].中国疾病预防控制中心,2017
FENG Zhao-min. Absolute quantitative study of influenza A virus based on microdroplet digital PCR [D]. Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2017
- [9] Dingle T C, Sedlak R H, Cook L, et al. Tolerance of droplet-digital PCR versus real-time quantitative PCR to inhibitory substances [J]. Clin Chem., 2013, 59(11): 1670-1672
- [10] Wang M, Yang J, Gai Z, et al. Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 266: 251-256
- [11] 赵丽青,方佩佩,唐静,等.数字 PCR 定量检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌方法的研究[J].食品安全质量检测学报,2017,8(11):4133-4138
ZHAO Li-qing, FANG Pei-pei, TANG Jing, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by droplet digital PCR [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017, 8(11): 4133-4138
- [12] Papić B, Pate M, Henigman U, et al. New approaches on quantification of *Campylobacter jejuni* in poultry samples: The use of digital PCR and real-time PCR against the ISO standard plate count method [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 331
- [13] Chen J Q, Healey S, Regan P, et al. PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes*, and *Listeria ivanovii*, in foods and environmental sources [J]. Food Science & Human Wellness, 2017, 6(2): 39-59

(下转第 190 页)