

· 药学基础 ·

基于实时荧光定量PCR技术的当归不同炮制品中金黄色葡萄球菌含量测定方法的开发及比较

严维花¹, 曹虹虹¹, 郭爽¹, 白德涛², 陈杰², 毛春芹¹, 李林^{1*}, 陆兔林¹

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2. 甘肃中天药业有限责任公司, 甘肃定西 743000)

[摘要] 目的:对当归不同炮制品中金黄色葡萄球菌的变化情况进行定量分析。方法:建立了实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR),对不同产地、不同收集企业、不同储藏时间当归饮片中金黄色葡萄球菌进行定量分析。荧光定量反应体系为SYBR Premix Ex Taq II 10 μL,正向引物、反向引物(10 μmol·L⁻¹)各0.8 μL,模板/基因组DNA 1 μL,双蒸水 7.4 μL。荧光定量反应条件为①扩增曲线:94 °C预变性 30 s,94 °C变性 10 s,60 °C退火 12 s,72 °C延伸 30 s,循环 45次,72 °C单点检测信号;②熔解曲线:72 °C开始检测,以0.5 °C为台阶温度停留 15 s采集荧光。根据 Real-time PCR的测定结果,分别从生当归、酒当归和土炒当归中选择具有代表性的样品进行平板计数法测定,并与 Real-time PCR检测结果进行比较。结果:不同炮制品中金黄色葡萄球菌含量排序为生当归>土炒当归>酒当归;在不同产地的当归饮片中均以甘肃渭源地区样品所含的金黄色葡萄球菌含量为最低;与零售企业相比,生产销售企业的生当归和酒当归中金黄色葡萄球菌含量较低;不同储藏时间对生当归和酒当归中金黄色葡萄球菌含量有一定的影响,随储藏时间的增加,金黄色葡萄球菌的含量增加。对部分代表性样品进行检测时发现,平板计数法检测结果数量级较 Real-time PCR低 3~4个数量级。结论:建立的 Real-time PCR的特异性、灵敏度、准确性以及报告周期均优于平板计数法,可为当归不同炮制品中金黄色葡萄球菌的快速、准确定量检测提供有效技术手段。

[关键词] 当归饮片; 炮制品; 金黄色葡萄球菌; 实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR); 致病菌; 特异性引物; 平板计数法

[中图分类号] R28;R943.1;Q939.5;S852.61 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)23-0137-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201549

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200428.1420.002.html>

[网络出版日期] 2020-4-28 14:53

Development and Comparison of Determination of *Staphylococcus aureus* in Different Processed Products of *Angelicae Sinensis Radix* Based on Real-time PCR Technique

YAN Wei-Hua¹, CAO Hong-hong¹, GUO Shuang¹, BAI De-tao², CHEN Jie²,
MAO Chun-qin¹, LI Lin^{1*}, LU Tu-lin¹

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
2. Gansu Zhongtian Pharmaceutical Co. Ltd., Dingxi 743000, China)

[Abstract] **Objective:** To quantitatively analyze the changes of *Staphylococcus aureus* in different processed products of *Angelicae Sinensis Radix*. **Method:** The real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction method (Real-time PCR) was established to quantitatively analyze *S. aureus* in *Angelicae Sinensis Radix* decoction pieces which bought from different producing areas, different enterprises and different storage time. The fluorescence quantitative reaction system was SYBR Premix Ex Taq II of 10 μL, each of forward

[收稿日期] 20200217(027)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1707000;2017YFC1701902);第六批全国老中医药专家学术经验继承项目(国中医药人教发[2017]29号)

[第一作者] 严维花,在读硕士,从事中药炮制及中药饮片质量标准研究,E-mail:1987171663@qq.com

[通信作者] *李林,博士,副教授,从事中药炮制学研究,E-mail:lilin_med@163.com

primer and reverse primer ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of $0.8 \mu\text{L}$, template/genome DNA of $1 \mu\text{L}$, double distilled water of $7.4 \mu\text{L}$. The reaction conditions of the fluorescence quantitative amplification curve were pre-denaturing for 30 s at $94 \text{ }^\circ\text{C}$, denaturing for 10 s at $94 \text{ }^\circ\text{C}$, annealing for 12 s at $60 \text{ }^\circ\text{C}$, extending for 30 s at $72 \text{ }^\circ\text{C}$, cycling 45 times, single-point detection signal at $72 \text{ }^\circ\text{C}$. The melting curve was made from $72 \text{ }^\circ\text{C}$, and the step temperature of $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ was kept for 15 s to collect fluorescence. According to the results of Real-time PCR, representative samples were selected from Angelicae Sinensis Radix decoction pieces for comparison between plate counting method and Real-time PCR. **Result:** The content of *S. aureus* in different processed products was sorted by rank of raw Angelicae Sinensis Radix>soil-fried Angelicae Sinensis Radix>wine-processed Angelicae Sinensis Radix. The content of *S. aureus* was the lowest in the samples from Weiyuan area of Gansu province by comparing with other producing areas. Compared with the retail enterprises, the content of *S. aureus* in raw products and wine-processed products from production and sale enterprises was lower. Different storage time had certain effect on the content of *S. aureus* in raw products and wine-processed products, and the content of *S. aureus* increased with the increase of storage time. The detection results of plate counting method were 3-4 orders of magnitude lower than that of Real-time PCR. **Conclusion:** The established Real-time PCR is superior to plate counting method in specificity, sensitivity, reliability and reporting period, which can provide an effective method for rapid and accurate quantitative detection of *S. aureus* in different processed products of Angelicae Sinensis Radix.

[Key words] Angelicae Sinensis Radix decoction pieces; processed products; *Staphylococcus aureus*; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction method (Real-time PCR); pathogenic bacteria; specific primers; plate counting method

当归为伞形科植物当归的干燥根,性温,味辛、甘,归肝、心、脾经,具有补血活血、调经止痛和润肠通便之功效,素有“十方九归”之誉。当归在药品、食品、化妆品工业用途广泛,《伤寒论》和《金匱要略》中将“当归生姜羊肉”作为典型的食疗处方,美国、欧盟以及日本等将当归作为香辛料使用^[1],因此其品质是否安全可控,与饮食用药安全息息相关。

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 是诱发人类和动物日常疾病较为常见的重要致病菌,广泛分布于空气、水源、土壤以及其他自然环境中^[2-3]。其致病力强主要是通过借助食品作为繁殖载体,在代谢活动中产生耐热肠毒素,然后通过食物链进入人体引起严重食物中毒,其危害仅次于沙门菌和副溶血性弧菌^[4-5];同时,金黄色葡萄球菌也是引起人类感染和食物中毒最常见的病原菌之一,其感染已成为世界三大难治传染性顽症。

现阶段官方食品安全机构对食品中金黄色葡萄球菌的检测主要采用传统的分离方法,如 Baird-Parker 法^[6]。但这种检测方法工序繁琐、费时费力,其检测结果受人为因素影响较大,容易出现漏检和假阴性的现象,故市场上急需一种快速、准确的检测方法。实时荧光定量聚合酶链式反应法 (Real-time PCR) 是近几年兴起的分子生物学检测技术,是指在 PCR 体系中加入荧光基团或荧光染

料,利用反应过程中荧光信号的累积来实时监测整个 PCR 的进程,最后结合相应软件通过已知拷贝数的模板建立的标准曲线对未知样品进行绝对定量分析的核酸定量技术^[7]。本研究拟建立当归的金黄色葡萄球菌 Real-time PCR,为中药饮片的微生物污染风险评估和微生物标准制定提供数据支持。

1 材料

FQD-48A (A4) 型荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 检测系统和 TC-96/G/H(b)C 型梯度 PCR 仪 (杭州博日科技有限公司), Allegra 21R 型台式高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司), AR5120 型电子天平 (美国 Ahoms 公司), MultiTemp III 型恒温水浴锅和 Hofer MV-25 型紫外透射仪 (美国 Amersham Pharmacia 公司), SIM-F140AY65 型雪花状制冰机 (日本 Sanyo 公司), SJ-CJ-1FD 型单人单面 (垂直送风) 洁净工作台 (苏州苏洁净化设备有限公司)。

AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (美国 Axygen 公司, 批号 AP-GX-50), SoilPure 超纯土壤基因组 DNA 快速提取试剂盒和零背景 pTOPO-TA 克隆试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司, 批号分别为 DN27, CV1401), SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒和 Hind III [宝生物工程 (大连) 有限公司, 批号分别为 RR820L, 1060A], DL2000 DNA Plus Marker 和 1 kb DNA Ladder Marker (南京

诺唯赞生物技术有限公司,批号分别为MD101, MD105-01),琼脂糖(西班牙 Biowest 公司,批号 91622),GelStain(北京全式金生物技术有限公司,批号 GS101-01)。

当归饮片经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根经不同炮制方法制成的饮片。其中样品 S1~S35 为生当归,样品 J1~J24 为酒当归,样品 T1~T17 为土炒当归;样品 S1~S24, J1~J19, T1~T17 为生产销售企业饮片,其余为不同零售企业饮片;在生产销售企业的样品中,样品 S1~S17, J1~J17 和 T1~T17 的储藏时间较短,其余样品储藏时间较长;具体样品信息见表 1。

2 方法

2.1 当归微生物 DNA 提取 取当归样品(粉碎过三号筛)0.2 g,按 SoilPure 超纯土壤基因组 DNA 快速提取试剂盒的试验步骤进行 DNA 的提取。DNA 样品于 -20 °C 冰箱中保存待用。

2.2 引物的设计与合成^[8-9] 利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计特异性引物,并将引物序列在 BLAST 数据库中进行比对验证。引物委托南京钟鼎生物技术有限公司合成,上游引物为 5'-TGAGTGATGAAGGTCTTCGGATC-3';下游引物为 5'-ATAACGCTTGCCACCTACGTATTAC-3'。扩增片段长度 150 bp。

2.3 PCR 扩增及电泳 PCR 扩增体系(25 μ L)为 2 \times Taq PCR MasterMix 12.5 μ L,模板 1 μ L,上下游引物(10 μ mol \cdot L⁻¹)各 0.5 μ L,加双蒸水至 25 μ L。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 次循环;72 °C 修复延伸 7 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检查,电泳条件为 160 V 恒压 30 min。通过凝胶成像系统分析试验结果。PCR 产物用纯化试剂盒进行纯化,测定质量浓度,具体操作按照说明书进行。纯化产物用于随后的克隆试验。

2.4 目的基因的 TA 克隆 在 10 μ L 的连接反应体系中,包括纯化的 PCR 产物 0.5~8 μ L, pTOPO-T Vector 载体 1 μ L,10 \times Enhancer 1 μ L,加入双蒸水至 10 μ L,轻轻混匀,室温连接 5 min,将连接产物加入至 100 μ L 的 DH5 α 感受态细胞中进行重组质粒的转化,加入不含抗生素的 Luria-Bertani(LB)培养基 500 μ L,混匀,于 200 r \cdot min⁻¹,37 °C 振荡 30 min。吸取复苏后的细菌,均匀涂在含抗氨苄青霉素(Amp)的琼脂培养基上,37 °C 倒置培养过夜,挑取平板中

阳性单菌落进行 PCR 检测,并送南京钟鼎生物技术有限公司进行测序。

2.5 Real-time PCR 标准曲线、反应体系 挑选阳性菌株接种到含 Amp 的 LB 培养基中,置于 37 °C,200 r \cdot min⁻¹ 摇菌过夜。提取质粒,通过单酶切后,回收酶切产物。使用微量分光光度计测得标准质粒的浓度,并计算出标准质粒原液中拷贝数浓度。将对照品(为含有目的片段的单拷贝克隆质粒)进行 10 倍梯度稀释,然后以对照品为模板进行 Real-time PCR。反应完成时,以阈值循环数(C_t ,即每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数)为纵坐标,对照品浓度的对数为横坐标绘制标准曲线。荧光定量反应体系为 SYBR Premix Ex Taq II 10 μ L,正向引物、反向引物(10 μ mol \cdot L⁻¹)各 0.8 μ L,模板/基因组 DNA 1 μ L,双蒸水 7.4 μ L。荧光定量反应条件为①扩增曲线:94 °C 预变性 30 s,94 °C 变性 10 s,60 °C 退火 12 s,72 °C 延伸 30 s,循环 45 次,72 °C 单点检测信号;②溶解曲线:72 °C 开始检测,以 0.5 °C 为台阶温度停留 15 s 采集荧光。

2.6 金黄色葡萄球菌群平板计数法 根据 Real-time PCR 的测定结果,分别从生当归、酒当归和土炒当归中选择具有代表性的样品进行平板计数法。称取样品 25 g,放入盛有生理盐水 225 mL 的无菌均质杯内进行稀释操作,所有操作需保证严格无菌,取上清液,即得样品匀液(1:10)。吸取该样品匀液 1 mL,沿管壁缓缓注入至含有生理盐水 9 mL 的无菌试管中,振摇试管,使其混合均匀,制成 1:100 的样品匀液。按上述操作,依次制成 10 倍递增系列稀释样品匀液。选取 2~3 个适宜的连续稀释度,每个稀释度分别吸取样品匀液 0.5 mL 加入 2 块 Baird-Parker 平板,然后用无菌 L 棒涂布整个平板。涂布后将平板静置 10 min,待样品匀液吸收后翻转平板,倒置后于(36 \pm 1) °C 培养 24~48 h。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取与 PCR 扩增 采用设计的金黄色葡萄球菌引物对当归金黄色葡萄球菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增,产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳获得与预期片段大小相一致(150 bp)的 DNA 条带,见图 1。

3.2 目的片段的克隆与鉴定 回收金黄色葡萄球菌 PCR 产物,连接 pTOPO-T Vector 后转化感受态细胞,蓝白斑筛选后,挑取白色菌落,提取重组质粒进行 PCR 鉴定,结果与预期片段大小相一致,见图 2。阳性重组质粒测序结果与 GenBank 上已知菌种相

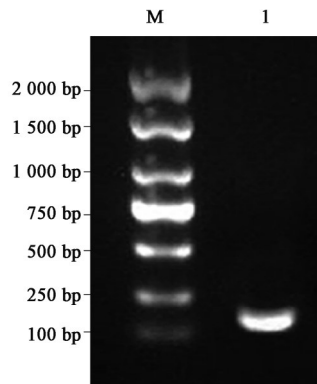
表1 76批当归饮片的样品信息

Table 1 Sample information of 76 batches of Angelicae Sinensis Radix decoction pieces

样品	批号	产地	生产时间	样品	批号	产地	生产时间
S1	M-1-1	甘肃禾驮乡	2018-03-09	J4	M-1-4	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S2	M-1-2	甘肃禾驮乡	2018-03-09	J5	M-2-1	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S3	M-1-3	甘肃禾驮乡	2018-03-09	J6	M-2-2	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S4	M-1-4	甘肃禾驮乡	2018-03-09	J7	M-2-3	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S5	M-2-1	甘肃禾驮乡	2018-03-09	J8	M-2-4	甘肃禾驮乡	2018-03-20
S6	M-2-2	甘肃禾驮乡	2018-03-09	J9	M-3-1	甘肃岷县	2018-03-20
S7	M-2-3	甘肃禾驮乡	2018-03-09	J10	M-3-2	甘肃岷县	2018-03-20
S8	M-2-4	甘肃禾驮乡	2018-03-20	J11	M-3-3	甘肃岷县	2018-03-20
S9	M-3-1	甘肃岷县	2018-03-20	J12	M-3-4	甘肃岷县	2018-03-20
S10	M-3-2	甘肃岷县	2018-03-20	J13	M-3-5	甘肃岷县	2018-03-20
S11	M-3-3	甘肃岷县	2018-03-20	J14	W-1-1	甘肃渭源	2018-03-08
S12	M-3-4	甘肃岷县	2018-03-20	J15	W-1-2	甘肃渭源	2018-03-08
S13	M-3-5	甘肃岷县	2018-03-20	J16	W-1-3	甘肃渭源	2018-03-08
S14	W-1-1	甘肃渭源	2018-03-08	J17	W-1-4	甘肃渭源	2018-03-08
S15	W-1-2	甘肃渭源	2018-03-08	J18	1602017	甘肃	2016-02-17
S16	W-1-3	甘肃渭源	2018-03-08	J19	1609054	甘肃	2016-09-23
S17	W-1-4	甘肃渭源	2018-03-08	J20	DBB161	甘肃	2017-12-16
S18	1705052	甘肃	2017-05-17	J21	20170813	甘肃	2017-08-13
S19	1705054	甘肃	2017-05-16	J22	171101	甘肃	2017-11-21
S20	1709099	甘肃	2017-09-21	J23	1610260282	甘肃	2016-10-26
S21	1708021	甘肃	2017-08-20	J24	20161103	甘肃	2016-11-03
S22	C1605016	甘肃	2016-05-16	T1	M-1-1	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S23	1705108	甘肃	2017-05-11	T2	M-1-2	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S24	1705109	甘肃	2017-05-31	T3	M-1-3	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S25	171002161	甘肃	2017-10-12	T4	M-1-4	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S26	DC5061	甘肃	2017-05-06	T5	M-2-1	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S27	2017081702	甘肃	2017-08-17	T6	M-2-2	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S28	171201	甘肃	2017-12-11	T7	M-2-3	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S29	1706200191	甘肃	2017-06-20	T8	M-2-4	甘肃禾驮乡	2018-03-20
S30	1804002	甘肃	2018-04-01	T9	M-3-1	甘肃岷县	2018-03-20
S31	18010261	甘肃	2018-01-20	T10	M-3-2	甘肃岷县	2018-03-20
S32	20171202	甘肃	2017-12-29	T11	M-3-3	甘肃岷县	2018-03-20
S33	20180101	甘肃	2018-01-20	T12	M-3-4	甘肃岷县	2018-03-20
S34	20171002	甘肃	2017-10-26	T13	M-3-5	甘肃岷县	2018-03-20
S35	161201	甘肃	2016-12-14	T14	W-1-1	甘肃渭源	2018-03-08
J1	M-1-1	甘肃禾驮乡	2018-03-09	T15	W-1-2	甘肃渭源	2018-03-08
J2	M-1-2	甘肃禾驮乡	2018-03-09	T16	W-1-3	甘肃渭源	2018-03-08
J3	M-1-3	甘肃禾驮乡	2018-03-09	T17	W-1-4	甘肃渭源	2018-03-08

应序列进行比较,金黄色葡萄球菌扩增片段序列与相应菌株的同源性高度一致,说明所得标准质粒为目的质粒。

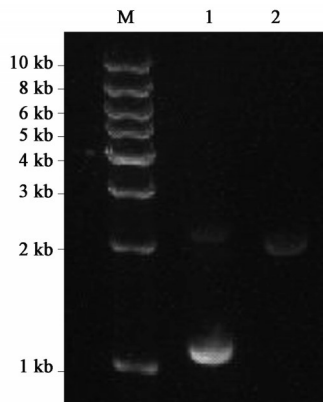
3.3 金黄色葡萄球菌 Real-time PCR 的建立 以金黄色葡萄球菌 16S rDNA 片段重组质粒的梯度稀释度为模板,进行 Real-time PCR 扩增,得到金黄色葡



M. DL2000 DNA Plus Marker; 1. 金黄色葡萄球菌

图1 金黄色葡萄球菌的PCR扩增

Fig. 1 PCR amplification of *Staphylococcus aureus*



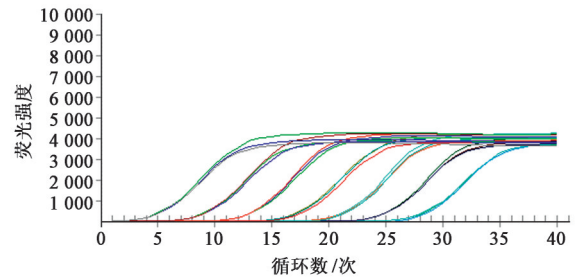
M. 1 kb DNA Ladder Marker; 1. 金黄色葡萄球菌 16S 质粒; 2. 线性化金黄色葡萄球菌 16S 质粒

图2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids by restriction enzyme digestion

萄球菌荧光定量扩增曲线及溶解曲线,见图3,4。结果发现扩增曲线较光滑,为典型的“S”形曲线,各循环阈值间隔均匀。金黄色葡萄球菌 16S rDNA 片段重组质粒的扩增效果较好,得到线性回归方程为 $Y = -3.849 5X + 38.379 (R^2 = 0.998 8)$,表明在模板稀释范围内 ($1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 有很好的线性关系。由图4可知,梯度稀释样品溶解曲线呈单一溶解峰,未出现其他杂峰,峰值出现在 82.9°C ,表明扩增反应产物特异性良好且无引物二聚体影响;曲线平稳,说明各浓度质粒的溶解温度均一,扩增产物特异性好。

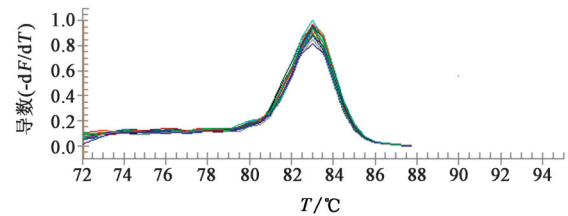
3.4 样品的金黄色葡萄球菌数目 通过检测金黄色葡萄球菌 16S rDNA 基因数目来反映当归中金黄色葡萄球菌的数目。结果所有当归样品均含有大量的 16S rDNA 基因片段。由 *rrnDB* (<https://rrndb.umms.med.umich.edu/>) 数据库可知金黄色葡萄球菌 16S rDNA 基因的拷贝数大多数为 6,实验对绝对定



从左到右对照品浓度依次为 $1 \times 10^9, 1 \times 10^8, 1 \times 10^7, 1 \times 10^6, 1 \times 10^5, 1 \times 10^4, 1 \times 10^3 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

图3 金黄色葡萄球菌的 Real-time PCR 扩增曲线

Fig. 3 Amplification curve of Real-time PCR for *Staphylococcus aureus*



F. 荧光强度

图4 金黄色葡萄球菌的 Real-time PCR 溶解曲线

Fig. 4 Melting curve of Real-time PCR for *Staphylococcus aureus*

量获得的数据进行计算处理,见表2。结果发现不同炮制品中以酒当归中金黄色葡萄球菌的含量最低,而不同产地中金黄色葡萄球菌含量均以甘肃渭源最低;对生产销售企业以及不同零售企业生当归和酒当归中金黄色葡萄球菌的含量进行比较时发现,零售企业样品中金黄色葡萄球菌的含量高于生产销售企业;对生当归和酒当归不同储藏时间样品中金黄色葡萄球菌含量进行考察时,发现储藏时间短的样品中金黄色葡萄球菌含量相对较低。

3.5 金黄色葡萄球菌群的平板计数法 选取菌落数在 15~150 cfu 的平板,计数平板上出现的典型和可疑的金黄色葡萄球菌菌落,金黄色葡萄球菌典型菌落为灰黑色至黑色,有光泽,常有浅色边缘,表面光滑,凸起,菌落直径约 2 mm。结果表明在选定的 10 个样本 (S8, S10, S21, S27, S32, J14, J17, J23, T3, T12) 中均能检测出金黄色葡萄球菌,同时,其含量依次为 500, 100, 3 000, 400, 200, 150, 1 000, 5, 100, 500 cfu $\cdot \text{g}^{-1}$ 。

4 讨论

4.1 Real-time PCR 建立的合理性 目前对中药饮片中金黄色葡萄球菌含量的研究较少,本研究尝试建立当归不同炮制品中金黄色葡萄球菌 Real-time PCR 检测体系。由于 16S rDNA 是细菌的高度保守序列,其可变区在不同细菌之间存在一定程度的差

表2 76批当归样品中金黄色葡萄球菌的含量

Table 2 Content of *Staphylococcus aureus* in 76 batches of *Angelicae Sinensis Radix* decoction pieces by Real-time PCR 个/g

样品	金黄色葡萄球菌含量	样品	金黄色葡萄球菌含量	样品	金黄色葡萄球菌含量
S1	8.43×10 ⁵	S27	3.16×10 ⁶	J18	1.97×10 ⁶
S2	1.09×10 ⁶	S28	2.79×10 ⁶	J19	2.08×10 ⁶
S3	1.09×10 ⁶	S29	2.92×10 ⁶	J20	1.44×10 ⁶
S4	1.97×10 ⁶	S30	1.90×10 ⁶	J21	1.43×10 ⁶
S5	8.02×10 ⁵	S31	3.07×10 ⁶	J22	9.50×10 ⁵
S6	1.18×10 ⁶	S32	1.70×10 ⁶	J23	2.04×10 ⁶
S7	1.89×10 ⁶	S33	1.67×10 ⁶	J24	1.24×10 ⁶
S8	2.13×10 ⁶	S34	2.27×10 ⁶	T1	1.20×10 ⁶
S9	9.07×10 ⁵	S35	1.28×10 ⁶	T2	8.11×10 ⁵
S10	1.05×10 ⁶	J1	1.47×10 ⁶	T3	1.29×10 ⁶
S11	1.30×10 ⁶	J2	4.66×10 ⁵	T4	7.14×10 ⁵
S12	1.73×10 ⁶	J3	1.43×10 ⁶	T5	1.41×10 ⁶
S13	6.45×10 ⁵	J4	3.84×10 ⁵	T6	1.29×10 ⁶
S14	9.27×10 ⁵	J5	4.43×10 ⁵	T7	2.59×10 ⁶
S15	6.62×10 ⁵	J6	8.74×10 ⁵	T8	1.19×10 ⁶
S16	8.31×10 ⁵	J7	1.09×10 ⁶	T9	9.57×10 ⁵
S17	8.41×10 ⁵	J8	1.02×10 ⁶	T10	1.24×10 ⁶
S18	2.51×10 ⁶	J9	5.14×10 ⁵	T11	9.54×10 ⁵
S19	2.43×10 ⁶	J10	7.32×10 ⁵	T12	1.57×10 ⁶
S20	2.50×10 ⁶	J11	4.51×10 ⁵	T13	6.08×10 ⁵
S21	2.35×10 ⁶	J12	1.18×10 ⁶	T14	6.89×10 ⁵
S22	2.35×10 ⁶	J13	1.10×10 ⁶	T15	8.56×10 ⁵
S23	1.43×10 ⁶	J14	3.30×10 ⁵	T16	8.79×10 ⁵
S24	1.28×10 ⁶	J15	4.64×10 ⁵	T17	6.40×10 ⁵
S25	1.24×10 ⁶	J16	4.78×10 ⁵		
S26	2.17×10 ⁶	J17	8.00×10 ⁵		

异,具有细菌属或种的特异性,是细菌鉴别中较为理想的靶序列^[10]。故本研究以金黄色葡萄球菌16S rDNA为切入点,将PCR产物克隆至pTOPO-T Vector载体上,抽提质粒梯度稀释制备对照品。重组质粒PCR鉴定和测序分析后发现,克隆序列与原标准菌株已知序列同源性在99%以上,证实对照品构建成功^[9]。熔解曲线是用来验证以SYBR Green I为荧光染料的定量PCR扩增的特异性,利用SYBR Green I指示双链DNA熔点的性质来分析产物的均一性,有助于更准确地分析PCR定量结果。根据前期实验结果,在采集荧光前设定1个临界温度82.9℃,使引物处于单链状态,扩增产物仍为双链结构,避免引物二聚体对产物荧光值的干

扰,从而使定量结果更为准确。

4.2 当归不同炮制品中金黄色葡萄球菌的含量分析 当归不同炮制品中金黄色葡萄球菌含量存在差异,与生品相比,酒炙品和土炒品均能降低金黄色葡萄球菌的含量,推测其原因是该菌的耐热性虽较强^[11],但一切细菌的繁殖体于100℃煮沸5 min后都会死亡,而酒炙和土炒的温度均达到100℃以上,故能杀死绝大多数金黄色葡萄球菌;土炒炮制用辅料灶心土在加工、储藏、运输等过程中有可能被金黄色葡萄球菌污染,从而在土炒过程中进一步污染当归样品,因此酒当归中金黄色葡萄球菌含量下降程度高于土炒当归。由此可联想到当归饮片在服用前经过煎煮或冲泡,一方面有利于有效成分的溶出,另一方面通过加热对金黄色葡萄球菌等致病菌有明显的杀灭作用。

4.3 不同产地不同炮制品中金黄色葡萄球菌的含量分析 金黄色葡萄球菌是常见的能够造成生物性污染的环境微生物之一,广泛存在于各种废水、废气及废物中。当金黄色葡萄球菌所在的环境适合其生长时,金黄色葡萄球菌将会大量繁殖,通过空气、水等介质传播,对所在环境造成污染。受金黄色葡萄球菌污染的废水或废物被排放到河流及湖泊中则会使水体进一步受到污染;同时,由于我国水资源的紧缺,大面积的实施污水回灌利用^[12]可能会使土壤及地下水都受到一定的污染。在本研究中,当归不同炮制品中金黄色葡萄球菌含量均以甘肃渭源产地最低,在一定程度上说明甘肃渭源土壤微生物污染程度较小。

4.4 不同收集企业不同炮制品中金黄色葡萄球菌的含量分析 与不同零售企业相比,生产销售企业可以在当归药材的种植、采收加工、炮制、运输储藏、销售等环节对金黄色葡萄球菌进行控制,从而降低被感染的机率,同时,当归饮片是由企业直接到消费者手中,减少了被金黄色葡萄球菌污染环节;而零售企业在当归饮片的加工、包装、运输、存储等环节容易携带或引入金黄色葡萄球菌,因此生产销售企业的生当归和酒当归中金黄色葡萄球菌的含量相对较低。金黄色葡萄球菌本身也是一种人类共生体,50%以上健康人的皮肤上都存在金黄色葡萄球菌^[13],因此企业应及时更新从业人员的健康情况,避免患有皮肤化脓性疾病(金黄色葡萄球菌感染)的加工人员污染药材或饮片。

4.5 不同储藏时间不同炮制品中金黄色葡萄球菌的含量分析 金黄色葡萄球菌对生存环境营养要

求不高,普通培养基就可以生长良好,同时对温度和pH要求很低,使金黄色葡萄球菌能够在很广的环境范围内生长和生存,在应激性环境中也可以长时间存活繁殖。因此随储藏时间的增长,样品中金黄色葡萄球菌不断繁殖生长,其含量也在不断增加,表明当归饮片从生产到消费之间间隔的时间越久,受到的污染情况就会越严重。金黄色葡萄球菌还能分解一些有机物质,如葡萄糖、乳糖、蔗糖和麦芽糖等,可以产酸(乳酸、甲酸、乙酸等)但不产气^[14]。当归多糖主要由葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖和木糖组成,具有活血、调节免疫等显著的生理活性,是当归补血活血的化学成分之一,在当归药材和饮片的质量研究中常将其作为质量控制指标^[15],也就是说当归中金黄色葡萄球菌的含量越高,对当归中多糖的影响就越大,从而造成当归质量的降低和有效期的缩短。

4.6 Real-time PCR与平板计数法测定金黄色葡萄球菌含量的差异分析 近年来文献报道显示,Real-time PCR技术是目前最准确、重复性最好并得到国际公认的核酸分子定性和定量检测标准方法,已被广泛用于金黄色葡萄球菌的检测^[16-19]。本研究比较了Real-time PCR与传统平板计数法,结果发现二者的测定结果均呈阳性,但平板计数法测定结果数量级较Real-time PCR低3~4个数量级,且有极显著性差异。这可能与平板计数法阳性检出率较低有关^[20],还可能与当归样品中金黄色葡萄球菌处于活的可培养状态(VBNC)或样品中有活力的金黄色葡萄球菌太少以至于培养方法不能分离得到有关;也可能与当归样品中存在一些灭活菌有关;此外,与当归煎剂、当归挥发油、当归丙酮提取物、当归总黄酮醇提液对金黄色葡萄球菌有一定的抑菌作用^[21-24],在培养过程中杀灭部分金黄色葡萄球菌也有一定的关系。

以Baird-Parker平板和分离鉴定为主要的传统检测金黄色葡萄球菌的方法存在较多问题,费时费力、需要大量人员参与,而WILSON等^[25]研究指出传统方法不适用于大批量金黄色葡萄球菌的种群鉴定;Real-time PCR的灵敏度高、重复性好、检测周期短、操作简单,还可有效规避部分病原微生物高度变异出现的金黄色葡萄球菌假阳性结果,提高准确性。此外,当归中VBNC菌虽失去生长繁殖能力,但仍处于存活状态,保留原菌的毒力和致病性^[26],对当归安全性存在潜在的威胁,Real-time PCR对这种细菌的检测能力则可反映当归金黄色

葡萄球菌的携带能力。另一方面,当归经过杀菌虽会残存大量的灭活菌而被Real-time PCR检测出,但当死菌与活菌的比例低于 1×10^3 时,样品中的死菌不会影响定量结果^[27],故本实验结果在一定程度上可反映当归样品中金黄色葡萄球菌的携带情况。

5 结论

本研究通过Real-time PCR技术精确定量当归不同炮制品中16S rDNA基因的拷贝数,从而对其进行绝对定量。结果表明不同炮制方法、不同产地、不同收集企业以及不同储藏时间对金黄色葡萄球菌的含量均有一定影响,阐述了炮制、产地、包装、储存、运输环节的重要性,可为当归饮片微生物污染风险评估提供一定数据支持,并为其合理制定标准、控制质量提供一定的参考依据。但本研究中也存在一些不足之处,当归样品中金黄色葡萄球菌死菌及其基因组DNA的干扰并未扣除,后续实验将利用叠氮溴化丙锭与Real-time PCR技术相结合的方法,对当归样品中活的金黄色葡萄球菌进行检测,避免假阳性结果,从而更加准确地反映样品中金黄色葡萄球菌的携带情况。

[参考文献]

- [1] 梁爱华.“药食同源”有讲究[J].中国食品药品监管,2018(4):81-84.
- [2] SERGELIDIS D, ANGELIDIS A S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a controversial foodborne pathogen[J].Lett Appl Microbiol, 2017, 64(6): 409-418.
- [3] WU S J, DUAN N, GU H J, et al. A review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins[J].Toxins (Basel), 2016, 8(7): 176.
- [4] ALVES V F, NIÑO-ARIAS F C, PITONDO-SILVA A, et al. Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* from some artisanal Brazilian dairies [J]. Int Dairy J, 2018, 85: 247-253.
- [5] ZHANG Z H, LIU W T, XU H Y, et al. Propidium monoazide combined with real-time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products [J]. J Dairy Sci, 2015, 98(3): 1625-1633.
- [6] 中华人民共和国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.
- [7] 安钢力. 实时荧光定量PCR技术的原理及其应用[J]. 中国现代教育装备, 2018(21): 19-21.

- [8] 胡骑.FQ-PCR检测DPV强毒感染鸭消化和呼吸道大肠杆菌/乳酸杆菌/葡萄球菌数量变化规律的研究[D].雅安:四川农业大学,2006.
- [9] 尹传宝,陈俊,朱琦,等.大肠杆菌与葡萄球菌实时定量PCR检测方法的建立[J].贵州农业科学,2010,38(10):135-138.
- [10] SOMETAKKE S, CADENAS M B, MAGGI R G, et al. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology [J]. J Microbiol Meth, 2008, 76 (3) : 217-225.
- [11] 李晓梅,耿艺介.金黄色葡萄球菌及其肠毒素B的生物学特性[J].中国热带医学,2007,7(4):617-619.
- [12] 黄玉珠,万红友.污水土地处理技术的优势及其应用前景[J].环境科学导刊,2008,27(6):71-75.
- [13] 赵元煜.HPLC指纹图谱技术检测食品中金黄色葡萄球菌的研究[D].保定:河北农业大学,2014.
- [14] 张冰.查尔酮抗金黄色葡萄球菌分选酶A和 α -溶血素的作用研究[D].长春:吉林大学,2018.
- [15] 聂瑞杰,王英姿,孙振阳,等.当归饮片生产加工工艺标准化的初步研究[J].中国中药杂志,2017,42(23):4503-4509.
- [16] 李苗云,惠利娜,赵改名,等.荧光定量PCR检测生鲜猪肉中金黄色葡萄球菌的应用研究[J].河南农业大学学报,2014,48(4):475-480.
- [17] 谢雪钦.TaqMan实时荧光聚合酶链式反应(PCR)技术定量检测婴幼儿配方食品中的金黄色葡萄球菌[J].食品与发酵工业,2016,42(7):223-229.
- [18] 钟秀茵,杨晓斌,刘钰钗,等.LAMP和荧光定量PCR检测食品中致病微生物的对比分析[J].首都食品与医药,2018,25(1):97-98.
- [19] 杨晓云,刘蕊,穆小燕.实时荧光定量PCR法鉴定耐甲氧西林金黄色葡萄球菌效果观察[J].山东医药,2016,56(6):80-81.
- [20] 陈丽芬.两种实验方法检测食品中金黄色葡萄球菌的比较和分析[J].医学动物防制,2016,32(5):581-582.
- [21] 张金霞.中药当归丙酮提取物抗菌活性及成分鉴定[D].兰州:兰州理工大学,2014.
- [22] 金元宝.超临界CO₂萃取中药材挥发油抑菌活性检测研究[D].长春:吉林农业大学,2013.
- [23] 孙鹏,张鑫,贺凯,等.当归颗粒剂与煎剂有效成分及体外抑菌活性比较[J].动物医学进展,2017,38(2):50-54.
- [24] 李谷才,魏文亭,高堂杰,等.当归总黄酮提取及其体外抑菌活性研究[J].时珍国医国药,2011,22(2):310-311.
- [25] WILSON I G, GILMOUR A, COOPER J E, et al. A non-isotopic DNA hybridisation assay for the identification of *Staphylococcus aureus* isolated from foods[J].Int J Food Microbiol, 1994, 22(1):43-54.
- [26] 田聪,余以刚,肖性龙,等.金黄色葡萄球菌活的可培养状态复苏及PMA-qPCR检测[J].现代食品科技,2013,29(6):1390-1394.
- [27] LØVDAL T, HOVDA M B, BJÖRKBLOM B, et al. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua* [J]. J Microbiol Methods, 2011, 85 (2) : 164-169.

[责任编辑 刘德文]