

食品中常见病原微生物的 DNA 条形码识别技术

Study on DNA barcoding identification technology of common pathogenic microorganisms in food

钟文涛^{1,2}徐 越^{1,2}王淑好^{1,2}王芳妹^{1,2}ZHONG Wen-tao^{1,2}XU Yue^{1,2}WANG Shu-hao^{1,2}WANG Fang-mei^{1,2}

(1. 国家农产品质量监督检验中心, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南省产商品质量监督检验研究院, 湖南 长沙 410007)

(1. National Quality Supervision and Inspection Centre for Agricultural and Sideline Product, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Hunan Testing Institute of Product and Commodity Supervision, Changsha, Hunan 410007, China)

摘要:为探究 DNA 条形码技术在微生物识别方面的应用前景,对食品中常见的 8 种病原微生物的 16S rRNA 序列进行了比对,设计通用引物后,进行 PCR 扩增、测序及数据库检索,尝试建立一套基于 DNA 条形码的微生物识别方案。结果表明,扩增的 V3~V6 可变区域能准确区分变形杆菌纲(肠杆菌目、弧菌目、假单胞菌目)的致病菌和相关干扰菌,对芽孢杆菌纲(芽孢杆菌目)可鉴定到“属”水平。

关键词: DNA 条形码; 16S rRNA; 病原微生物; 识别

Abstract: In order to explore the application prospects of DNA barcode technology in microbial identification, the 16S rRNA sequences of 8 common pathogenic microorganisms in food were compared. The PCR amplification, sequencing and database search were conducted followed by universal primers designing, which were purposed to establish a microbial identification method based on DNA barcode. The results showed that the variable region sequence of V3~V6 amplified provided sufficient resolution for *Gamma*proteobacteria *Enterobacteriales*, including *Vibrionales*, and *Pseudomonadales* to accurately distinguish pathogenic bacteria and related interfering bacteria, corresponding to *Bacillibacteria* (*Bacillales*) could be identified to the “genus” level.

Keywords: DNA barcoding; 16S rRNA; pathogeny microbiology; identification

加拿大动物学家 Hebert 等^[1]于 2003 年提出“DNA 条形码”的概念,希望用“标准化”的基因片段(如 *COI* 基

因)作为物种快速识别的标记,建立起物种名称和生物实体之间一一对应的关系。经过 10 余年的发展,科研人员将 DNA 条形码与基因测序技术相结合,在动植物的相似种识别方面已经做了大量工作^[2],在国际上建立了多个与 DNA 条形码相关的合作组织和大型数据库^[3],取得了初步成效。Buddhachat 等^[4]评估了条形码技术与传统形态学鉴定技术在鱼类分类上的差异,认为 DNA 条形码更为准确、高效;Xing 等^[5]使用 *COI* 基因对中国市场上销售的各种动物源食品的标签错误问题进行了调查,发现 23% 的产品标签存在瑕疵;Liu 等^[6]为识别中国药典中有毒药用植物及其掺假物,对比了 4 种候选 DNA 条形码的识别效率,发现 *ITS2* 基因可用作通用条形码。

对微生物 DNA 条形码的研究虽有文献^[7-8]报道,但相较于动植物而言则显得滞后。究其原因这是由于微生物具有物种的多样性和基因的高突变性,找到稳定可靠的保守基因片段作为研究目标具有一定难度^[9]。现有文献^[10-11]报道发现适用于原核生物 DNA 条形码研究的目标基因有 16S rRNA、*COI* 和 *cpn60*,其中 16S rRNA 在各大数据库中资源最为丰富,因此对其的研究也相对集中。

在食品检验领域,DNA 条形码在肉制品、海产品真实性鉴定上已有应用^[12],但对食品中病原微生物的相关研究尚未开展。研究选择 16S rRNA 的 V3~V6 区域为目标基因片段,对食品中常见病原微生物及其表型类似株的序列进行分析,目的是建立一种基于 DNA 条形码技术的快速、准确的识别方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Chelex 100; 美国 Bio-Rad 公司;

2 × PCR Master mix, DNA Marker, Agarose Gel

基金项目:湖南省市场监督管理局科技计划项目(编号: 2019KJJH03)

作者简介:钟文涛(1983—),男,湖南省产商品质量监督检验研究院工程师,博士。E-mail: wentao_zhong@foxmail.com

收稿日期:2020-09-15

DNA Extraction Kit:宝生物工程(大连)有限公司;
电泳级琼脂糖:生工生物工程(上海)股份有限公司;
8 种常见病原微生物(见表 1)和 15 种表型类似株(大肠埃希氏菌、奇异变形杆菌、普通变形杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、产气肠杆菌、斯氏李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌、枯草芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、溶藻弧菌、霍乱弧菌、荧光假单胞菌、表皮葡萄球菌):ATCC、CICC、CMCC 菌株库和广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

PCR 仪:C1000 Touch 型,美国 Bio-Rad 公司;
核酸蛋白测定仪:SmartSpec plus 型,美国 Bio-Rad 公司;
电泳仪:powerpac universal 型,美国 Bio-Rad 公司;
凝胶成像系统:GelDoc XR+型,美国 Bio-Rad 公司;
高速离心机:MiniSpin Plus 型,德国 Eppendorf 公司。

1.3 菌株纯化及核酸提取

菌株活化后用非选择性培养基划线分离,挑取单个菌落接种增菌肉汤,(36±1)℃培养(24±2)h。将菌悬液振荡混匀后,取 1.5 mL 在 8 000 r/min 下离心 5 min,弃上清液,使用适量的无菌生理盐水洗菌 3 次,最后一次离心时尽量吸干剩余液体。在沉淀物中加入 30 μL 5%的 Chelex 100 溶液并使其重新悬浮,然后在 100℃沸水中保持 10 min,立即置于冰上冷却 1 min,12 000 r/min 离心 10 min,所得上清液作为扩增模板,-20℃保存备用。

1.4 引物设计

16S rRNA 包含 9 个 V 区(可变区,Variable region)和 10 个 C 区(保守区,Conserved region),且 V 区和 C 区

交替排列^[13-14]。设计 DNA 条形码通用引物时应考虑将上下游引物落在 C 区,中间包含一个或数个 V 区。在 GeneBank 中搜索表 1 中 8 种病原微生物的 16S rRNA 基因组编码序列,选择尽可能完整的序列,目的是包含所研究的 V3~V6 区域(起止位置为 433~1 043,共计 610 bp^[15])。将序列导入到 DNASTAR 软件中,通过 MegAlign 功能分析菌种间 16S rRNA 基因的同源性和变异性,用 Primer Premier 6 设计适合在不同菌种间扩增的通用引物。共测试了两对通用引物(表 2),其中通用引物 1 为项目组自行设计,通用引物 2 为项目组对文献^[15]中的引物进行改良所得。引物序列由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.5 PCR 扩增

通用引物 PCR 反应在 20 μL 体系中进行:2×PCR Master mix 10 μL,10 μmol/L 正反引物各 0.5 μL,DNA 模板 1 μL,无菌水 8 μL。PCR 反应条件为:94℃预变性 3 min,94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 150 s,循环 35 次,72℃再延伸 5 min。取 5 μL 反应产物进行 1%的琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统分析扩增产物。将琼脂糖凝胶上的电泳条带切下,按照琼脂糖 DNA 纯化试剂盒说明书进行提取纯化后,送至宝生物工程(大连)有限公司进行基因测序鉴定。

1.6 数据处理

将测序所得的序列除去首尾各 30 bp 碱基,选择合适的数据库进行序列比对。GenBank 是最为常用的比对数据库,序列资源非常丰富,但其质量良莠不齐;而 RDP 是基于细菌和真菌的核糖体序列信息建立的专业数据库,最新版本已包含 3 356 809 条 16S rRNA 信息,可提供足够可靠的比对信息。采用 GenBank 的 Blastn 功能,结合 RDP 的 Classifier 和 Sequence Match 功能,对测序结果进

表 1 菌种信息及其 16S rRNA 序列片段编号

Table 1 Bacterial informations and 16S rRNA sequence designations

菌种名称	菌种库编号	16S rRNA 序列片段编号	菌种名称	菌种库编号	16S rRNA 序列片段编号
鼠伤寒沙门菌	ATCC14028	X80681	铜绿假单胞菌	ATCC27853	AB037545
阪崎肠杆菌	ATCC25944	NR_044076	单核细胞增生李斯特氏菌	ATCC19115	M58822
福氏志贺氏菌	CMCC(B)51572	NR_026331	蜡样芽孢杆菌	ATCC11778	AF290547
副溶血性弧菌	ATCC17802	M59161	金黄色葡萄球菌	ATCC6538	NR_118997

表 2 通用引物序列

Table 2 The sequence of universal primer

引物名称	引物序列(5'-3')	片段大小/bp	区域
通用引物 1	正向引物:CGGGAGGCAGCAGTNGGSAAT	461	V3~V4
	反向引物:GGACTACCAGGGTATCTAATCC		
通用引物 2	正向引物:CCAGACTCTACGGGAGGCAG	733	V3~V6
	反向引物:ACATTTTACAACACGAGCTGACGA		

行综合分析。

1.7 干扰菌测试

按照 1.3 中描述的试验步骤,对 15 种干扰菌进行纯化并提取核酸。使用表 2 中的 2 对通用引物分别进行 PCR 扩增,后续 PCR 扩增按照 1.5 中所述的步骤进行,数据处理按照 1.6 中所述执行。

2 结果与分析

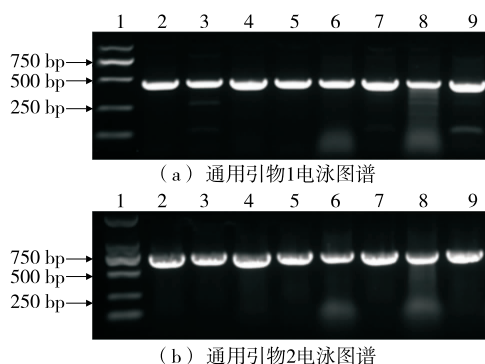
2.1 电泳图谱

由于所扩增的 23 种测试菌株分别属于 4 个“目”、6 个“科”及 11 个“属”,为了实现扩增效率的最大化,在设计通用引物时使用了简并碱基。从图 1 和图 2 可以看出,试验条件下,通用引物 1 和 2 对所有目标片段均进行了有效的扩增,电泳条带清晰明亮,大小符合预期,没有发生引物二聚体的现象,说明通用引物的适用性较强。

2.2 序列比对

经比对,在 GenBank 数据库中,通用引物 1 扩增的序列 Percent Identity 最低值为 97.96%,通用引物 2 扩增的序列 Percent Identity 最低值为 98.91%;经 RDP 数据库的 Classifier 检索,所有序列的“门、纲、目、科、属”信息匹配率为 100%,通用引物 1 扩增的序列在 Seqmatch score 最低值为 0.983,通用引物 2 扩增的序列在 Seqmatch score 最低值为 0.972。

因此,不论是在 GenBank 数据库还是在 RDP 数据库进行检索,序列的匹配率均符合预期值,所有菌种的序列均能准确鉴定到“属”水平,部分能准确鉴定到“种”水平(见表 3)。通用引物 1 和通用引物 2 的扩增产物虽然长度相差近 300 bp,但是对试验所涉及的目标菌的识别能力基本一致,仅在福氏志贺氏菌的比对结果上存在差异。



1~9 泳道分别为 DNA Marker、鼠伤寒沙门菌、阪崎肠杆菌、福氏志贺氏菌、副溶血性弧菌、铜绿假单胞菌、单核细胞增生李斯特氏菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌

图 1 食品中 8 种常见病原微生物的 DNA 条形码电泳图谱

Figure 1 Electrophoresis diagrams of DNA barcoding of 8 common pathogenic microorganisms in food

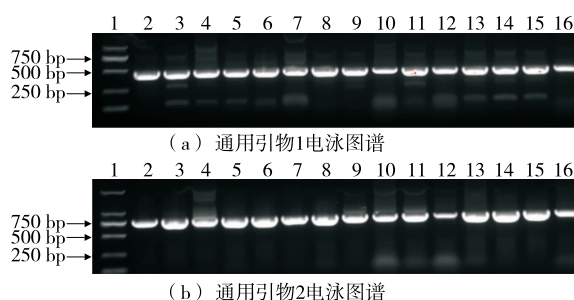
2.3 菌种识别

根据表 3 所列信息,对 8 种常见的病原微生物及相关 15 种表型类似菌株按所属“目”“科”进行分类后,统计 DNA 条形码序列在不同分类水平上的菌种识别能力,如图 3、4 所示。可以发现,16S rRNA 的 V3~V6 区域能较好地鉴别弧菌目、假单胞菌目和芽孢杆菌目的葡萄球菌相关菌种,可明确区分其中的致病菌和非致病菌;而对芽孢杆菌目中的李斯特氏菌科、芽孢杆菌科中的相关菌种只能鉴别到“属”水平,还需要借助其他技术手段才能达到区分的目的;对肠杆菌科目肠杆菌科的菌种识别中,沙门氏菌属和志贺氏菌属不能鉴定到“种”水平,但可以明确区分肠杆菌科的其他属,由于食品中分离出的沙门氏菌属和志贺氏菌属均属于致病菌范畴,因此也能达到病原微生物识别的目的。

部分菌种仅能识别到“属”水平,在“种”水平给出了多个可能的鉴定结果,可能由于这些菌种在 V3~V6 区域的序列过于近似,引物设计时可考虑扩增其他一个或几个可变区域。

DNA 条形码结合基因测序技术极大地提高了物种分类学的准确性和高效性^[16-17],其最大优势在于可以实现对未知物种的识别。目前,基因测序技术已经发展到了第三代,每一代技术各具优势,应用场景也存在差异。例如高通量测序可快速实现对环境样品中微生物进行宏观普查,节约了大量时间、人力成本,但同时由于得到的信息量大,干扰数据多,因此针对性不强。而试验建立的方法其成本和技术门槛较低,试验结果无需生物信息学专业人士分析,适用于普通实验室中单一样品或单一菌落分析。

但是,在 DNA 条形码试验设计及执行过程中有以下几点需要引起重视:① 不同物种间通用引物的设计需要



1~16 泳道分别为 DNA Marker、大肠埃希氏菌、奇异变形杆菌、普通变形杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、产气肠杆菌、斯氏李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌、枯草芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、溶藻弧菌、霍乱弧菌、荧光假单胞菌、表皮葡萄球菌

图 2 15 种表型类似菌株的 DNA 条形码电泳图谱

Figure 2 Electrophoresis diagrams of DNA barcoding of 15 phenotypic similar strains

表 3 序列比对结果
Table 3 The results of sequence alignment

菌种	通用引物 1				通用引物 2			
	目	科	属	种	目	科	属	种
鼠伤寒沙门菌	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	×
阪崎肠杆菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
福氏志贺氏菌	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	✓
副溶血性弧菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
铜绿假单胞菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
单核细胞增生李斯特氏菌	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	×
蜡样芽孢杆菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
金黄色葡萄球菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
大肠埃希氏菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
奇异变形杆菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
普通变形杆菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
弗氏柠檬酸杆菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
产气肠杆菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
斯氏李斯特氏菌	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	×
英诺克李斯特氏菌	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	×
伊氏李斯特氏菌	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	×
枯草芽孢杆菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
蕈状芽孢杆菌	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	×
巨大芽孢杆菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
溶藻弧菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
霍乱弧菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
荧光假单胞菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
表皮葡萄球菌	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
合计	23	23	23	16	23	23	23	17

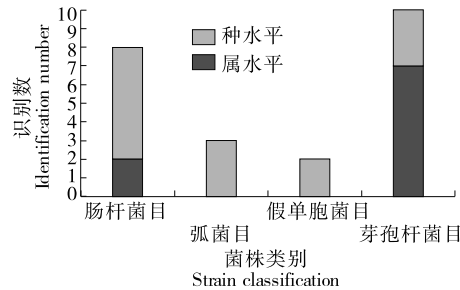


图 3 “目”水平的菌种识别
Figure 3 Strain identification at the “order” level

考虑的因素较多;② 对纯化后的核酸质量(如纯度、浓度)要求较高,否则会出现套峰或无法检测的情况;③ 测序长度一般控制在 400~800 bp 的范围内,且首尾 20 bp 左右的序列由于准确度较差,需舍去后再进行数据库比对;④ 菌种的 16S rRNA 数据库信息需进一步更新、完善,以

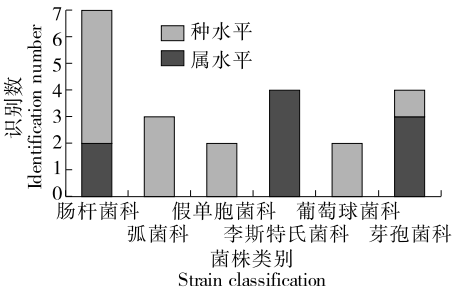


图 4 “科”水平的菌种识别
Figure 4 Strain identification at the “family” level

增加菌种识别的范围和准确度。
3 结论
中国现行食品安全检验标准体系中涉及病原微生物的检测均为针对某一指定菌种进行分离鉴定,强调检验

结果的特异性,而对产品中可能存在的其他微生物风险无法全面覆盖。试验基于细菌的 16S rRNA,对 DNA 条形码在食品生物安全领域的应用进行了探索。依照试验设计,选择 V3~V6 区域作为目标片段,对变形杆菌纲(肠杆菌目、弧菌目、假单胞菌目)具有足够的分辨率,能准确识别食品中的致病菌和相关干扰菌,而对芽孢杆菌纲(芽孢杆菌目)的鉴定将范围缩小到了“属”水平,减轻了进一步识别的工作量。在食品病原微生物研究范畴内,*COI*、*cpn60* 或其他基因片段是否能实现更高的识别效率,还有待进一步验证。DNA 条形码技术能实现在较低的技术平台上对未知微生物的无靶标识别,极大地方便了企业查因溯源及监管机构开展风险评估。

参考文献

- [1] HEBERT P D, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1 512): 313-321.
- [2] DECRU E, MOELANTS T, DE GELAS K, et al. Taxonomic challenges in freshwater fishes: A mismatch between morphology and DNA barcoding in fish of the north-eastern part of the Congo basin[J]. *Mol Ecol Resour*, 2016, 16(1): 342-352.
- [3] 王文婧, 王晓亮, 王新存, 等. DNA 条形码技术在菌物研究中的应用[J]. *前沿科学*, 2009, 3(2): 5-13.
- [4] BUDDHACHAT K, CHONTANANARTH T. Is species identification of *Echinostoma revolutum* using mitochondrial DNA barcoding feasible with high-resolution melting analysis? [J]. *Parasitology research*, 2019, 118(6): 1 799-1 810.
- [5] XING Ran-ran, HU Ran-ran, HAN Jian-xun, et al. DNA barcoding and mini-barcoding in authenticating processed animal-derived food: A case study involving the Chinese market [J]. *Food Chem*, 2020, 309: 125653.
- [6] LIU Miao, LI Xi-wen, LIAO Bao-sheng, et al. Species identification of poisonous medicinal plant using DNA barcoding[J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(8): 585-590.
- [7] LEBONAH D E, DILEEP A, CHANDRASEKHAR K, et al. DNA barcoding on bacteria: A review[J]. *Advances in Biotechnology*, 2014(2): 1-9.
- [8] SEIFERT K A. Progress towards DNA barcoding of fungi[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 9(S1): 83-89.
- [9] CHAUDHARY N, SHARMA A K, AGARWAL P, et al. 16S classifier: A tool for fast and accurate taxonomic classification of 16S rRNA hypervariable regions in metagenomic datasets[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116106.
- [10] CHAKRABORTY C, DOSS C G, PATRA B C, et al. DNA barcoding to map the microbial communities: Current advances and future directions[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2014, 98(8): 3 425-3 436.
- [11] PURTY RS C S. DNA barcoding: An effective technique in molecular taxonomy[J]. *Austin J Biotechnol Bioeng*, 2016, 3(1): 1 059.
- [12] 牛家乐, 费鑫杨, 傅寅旭, 等. DNA 条形码技术在加工食品鉴定中的应用[J]. *山东化工*, 2019, 48(10): 61-64.
- [13] VAN DE PEER Y, CHAPELLE S, DE WACHTER R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(17): 3 381-3 391.
- [14] ZHANG Jun-yi, DING Xiao, GUAN Rui, et al. Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake[J]. *Sci Total Environ*, 2018, 618: 1 254-1 267.
- [15] CHAKRAVORTY S, HELB D, BURDAY M, et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria[J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 69(2): 330-339.
- [16] VALENTINI A, POMPANON F, TABERLET P. DNA barcoding for ecologists[J]. *Trends Ecol Evol*, 2009, 24(2): 110-117.
- [17] ZHOU Jie-min, BAI Xu-ming, ZHAO Rui-lin. Microbial communities in the native habitats of *Agaricus sinodeliciosus* from Xinjiang Province revealed by amplicon sequencing[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1-13.

信息窗

α -淀粉酶等 16 种“三新食品”通过审查

2月20日,国家卫生健康委员会网站发布公告称, α -淀粉酶等 10 种食品添加剂新品种和氢氧化钙等 6 种食品相关产品新品种的安全性评估材料通过审评机构专家审查。

其中,10 种食品添加剂新品种包括:3 种食品工业用酶制剂新品种(α -淀粉酶、蛋白酶、乳糖酶)、4 种扩大

使用范围的食品添加剂品种(二氧化硅、番茄红、可得然胶、可得然胶)、2 种扩大使用范围的食品工业用加工助剂(丁烷、磷酸〔湿法〕)、1 种扩大使用范围的营养强化剂(6S-5-甲基四氢叶酸钙)。

(来源: <http://news.foodmate.net>)