

高浓度接种量时的阳性率达 100%，在总共 64 份样本中的检出率是 89.1%，是几种检验方法中最高的。

LAMP 是一种新型的核酸扩增技术，其操作简便，不需要 PCR 扩增仪；检测时间短，一般只需要 60 min；特异性高，针对目的片段上 6 个位点设计 4 条引物；结果可用肉眼观察。目前 LAMP 技术已经被广泛应用于致病微生物的检测，并且已有很多商品化的试剂盒面世^[6-7]。本研究中用 LAMP 检测样本中 O157 高浓度接种量时的阳性率达 93.8%，总体阳性率为 85.9%。

BAX、LAMP 法敏感性较高，但可能出现阳性结果后在样本中却分离不到活菌，有一种可能是由于食品中杂菌较多，某些菌在和 O157:H7 竞争生长中占有优势导致 O157:H7 死亡或数量减少，这两种方法能检测出 O157:H7 死菌或少量活菌的核酸但却无法通过分离培养方法分离到活菌，这需要研究更好的选择性增菌培养基来解决这些问题。

参考文献

[1] RILEY L W, REMIS R S, HELGERSON S D, et al. Outbreaks

of hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype[J]. *N Engl J Med*,1983, 308(12) :681-685.

[2] JOHNSON J L, BROOKE C L, FRITSCHER S J. Comparison of the BAX for screening *E coli* O157:H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef[J]. *Appl Environ Microbiol*,1998,64(11) :4390-4395.

[3] 王燕琴,朱健勇. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 检测方法研究进展[J]. *内蒙古农业科技*,2010(3) :113-114.

[4] 易海华,赵金伟,徐波,等. 使用环介导等温扩增技术快速检测食品中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的初步研究[J]. *中国食品卫生杂志*,2010,22(3) :206-213.

[5] 杜邦BAX[™] 系统被定为病原菌检测标准方法[J]. *中国食品学报*,2008,(4) :112.

[6] NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*,2000,28(12) :63.

[7] HARA-KUDO Y, KONISHI N, OHTSUKA K, et al. Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: a collaborative study[J]. *In J Food Microbiol*,2008,(122) :156-161.

实验技术与方法

阪崎肠杆菌 *zpx* 基因的分子信标-实时 PCR 技术研究

李雪玲,陈勇,张莉,张健,王慧芳

(陕西省产品质量监督检验所,陕西 西安 710054)

摘要:目的 建立分子信标-实时 PCR 技术检测婴幼儿乳粉中阪崎肠杆菌的快速方法。方法 在 PCR 反应体系中加入分子信标探针,探针的 5'端标记 FAM,3'端标记 TAMRA,建立阪崎肠杆菌 *zpx* 基因分子信标-实时 PCR 技术快速检测方法。结果 检测方法特异性强,无非特异性扩增;分子信标-实时 PCR 反应体系 DNA 灵敏度为 180 fg/PCR 反应体系,纯阪崎肠杆菌菌液的检出限为 10² CFU/ml,无交叉反应;以此反应体系检测 23 份样品,其中 2 份为阳性,余未检出,与传统检测方法结果一致。结论 分子信标-实时 PCR 检测体系快速、灵敏度高、特异性强,可用于婴幼儿乳粉中阪崎肠杆菌的快速检测。

关键词:阪崎肠杆菌;分子信标;实时 PCR;*zpx* 基因;食源性致病菌

中图分类号:TS252.7 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)01-0030-04

A real-time PCR with molecular beacon assay for the detection of *zpx* gene of *Enterobacter Sakazakii* in food

Li Xueling, Chen Yong, Zhang Li, Zhang Jian, Wang Huifang

(Shaanxi Provincial Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Xi'an 710054, China)

收稿日期:2011-07-08

基金项目:国家质检总局科技计划项目(SNQTS-2010QK269);陕西省科技计划资助项目(2011K12-03-12)

作者简介:李雪玲 女 硕士 工程师 研究方向为微生物检测技术 E-mail:lxlmorenake@yahoo.com.cn

通讯作者:陈勇 男 高级工程师

Abstract: Objective To develop a method for rapid detection of *Enterobacter Sakazakii* from contaminated food by real-time PCR with molecular beacons. **Methods** The *zpx* gene of *Enterobacter Sakazakii* was amplified with PCR reaction system containing a molecular beacon probe labeled with FAM at its 5' end and with TAMRA at its 3' end; and then the reaction system was established for rapid detection of *Enterobacter Sakazakii*. **Results** The reproducibility of the method was good and no non-specific amplification. The sensitivity achieved 180 fg/PCR reaction system for the DNA and 10^3 CFU/ml for the pure culture of *Enterobacter Sakazakii*. There was no cross-reaction with other bacteria, only 2 of 23 tested samples were positive, and the result of this assay was consistent with other traditional methods. **Conclusion** The real-time PCR with molecular beacon assay is rapid, sensitive, and specific for *Enterobacter Sakazakii* detection, and can be used for rapid microbiological analysis of *Enterobacter Sakazakii* in powdered infant formula.

Key words: *Enterobacter Sakazakii*; molecular beacons; real-time PCR; *zpx* gene; foodborne pathogens

阪崎肠杆菌(*Enterobacter Sakazakii*)是人和动物的肠道寄生菌和条件致病菌,属肠杆菌科肠杆菌属,该菌毒力强^[1],可引起严重的新生儿脑膜炎、小肠结肠炎和败血症。多项研究报道证实了婴儿配方奶粉为婴儿阪崎肠杆菌感染的主要来源^[2-4]。目前阪崎肠杆菌常规检测方法大多要经过前增菌、选择性增菌、培养、生化鉴定等过程,操作繁琐,耗时长,已远远不能满足现代检测要求。传统 PCR 技术易污染,造成检测失败。因此,迫切需要建立一种快速、准确、灵敏、特异的检测方法。本文探讨了采用分子信标-实时 PCR 技术,根据阪崎肠杆菌 *zpx* 基因设计特异性引物和探针,用于快速检测婴幼儿乳粉中的阪崎肠杆菌。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

IQ-5 实时 PCR 仪;DNA 提取试剂盒以及 Taq DNA 聚合酶和 dNTPs (北京天为时代公司);ULtrospc2000 紫外可见光蛋白核酸分析仪;API20E 生化鉴定试剂条和 VITEK2 生物鉴定系统(法国生物梅里埃公司)。

1.2 实验用菌株

14 种细菌共 20 株,分别购自中国科学院微生物研究所、陕西省疾病预防控制中心馈赠以及本实验室保存(见表 1)。

1.3 引物和探针

根据 GenBank 公布的阪崎肠杆菌 ATCC 29544 株基因组 *zpx* 基因的保守序列(Genebank 号:EF061082.1),采用 Primer 软件设计 PCR 引物和分子信标探针,探针的荧光标记选择 FAM 作为报告发光基团, TAMRA 为淬灭基团,委托上海生物工程公司合成。见表 2。

1.4 DNA 模板制备

菌株经缓冲蛋白胨水(BPW)增菌培养过夜,取 1 ml 菌液,12 000 r/min 离心沉淀 10 min,菌体用 500 μ l TE 缓冲液悬浮,加入终浓度为 50 μ g/ μ l 溶

表 1 实验用菌株

菌株名称	菌株编号	菌株来源
阪崎肠杆菌	ATCC 29544	陕西省疾病预防控制中心
阪崎肠杆菌	ATCC 29004	中国科学院微生物研究所
阪崎肠杆菌	ATCC 51329	中国科学院微生物研究所
阪崎肠杆菌	ATCC 12868	中国科学院微生物研究所
阪崎肠杆菌		本室分离
阪崎肠杆菌		本室分离
阪崎肠杆菌		本室分离
甲型副伤寒沙门菌	ATCC 50001	中国科学院微生物研究所
乙型副伤寒沙门菌	ATCC 50004	中国科学院微生物研究所
伤寒沙门菌	ATCC 47727	中国科学院微生物研究所
肠炎沙门菌	ATCC 13076	中国科学院微生物研究所
宋内志贺菌	ATCC 51081	中国科学院微生物研究所
痢疾志贺菌	ATCC 51329	中国科学院微生物研究所
鲍氏志贺菌	ATCC 51265	中国科学院微生物研究所
福氏志贺菌	ATCC 51093	中国科学院微生物研究所
普通变形杆菌	ATCC 49001	中国科学院微生物研究所
单增李斯特菌	ATCC 19114	中国科学院微生物研究所
大肠埃希菌	ATCC 44104	中国科学院微生物研究所
阴沟肠杆菌	ATCC 13047	中国科学院微生物研究所
成团泛菌属	ATCC 27993	中国科学院微生物研究所

表 2 阪崎肠杆菌 *zpx* 基因引物和分子信标探针序列

引物名称	序列	序列位置
引物 1	5'-ACCGTTATTCCTCCCGTACATC-3'	41 ~ 61
引物 2	5'-GCACAAGCTCGCCTGGC-3'	217 ~ 233
探针	FAM-ctgcat-CCAAAGAGACCGCTGCCGC-atgcag-TAMRA	134 ~ 153

菌酶,37 $^{\circ}$ C 作用 1 h,然后再加入终浓度为 1% SDS 和 0.2 μ g/ μ l 的蛋白酶 K,55 $^{\circ}$ C 作用 1 h 后,用酚-氯仿抽提 DNA。煮沸、离心、取上清液 1 μ l 即可用于实时 PCR 反应。阴性对照和阳性对照按照同样方法处理。

1.5 阳性标准品制备

以阪崎肠杆菌 ATCC 29544 作为标准参考菌株,抽提 DNA 后作为模板,按常规方法将引物 1 和 2 的 PCR 扩增产物纯化,克隆到 pGEM-T 载体,转化 Top10 感受态细胞,在含 Amp⁺ 的平板上涂抹,培养 12 ~ 16 h,提取质粒,测序、鉴定后制成阳性标准品,

-20 ℃分装保存。

1.6 实时 PCR 检测标准曲线的建立

利用经过连续稀释的已知量的阪崎肠杆菌标准菌株纯培养液做阳性模板,每个稀释度取 1 μl 进行实时 PCR 检测,以阪崎肠杆菌标准株已知量的不同菌数对数值为横坐标,以反应过程中出现荧光信号的初始循环数为纵坐标绘制标准曲线。

1.7 实时 PCR 扩增体系的构建

反应总体积为 25 μl,其中模板 DNA 上清液 1 μl,引物 1、2 (4 μmol/L) 各 1 μl, dNTP 混合液 (2.5 mmol/L) 1 μl, TaqDNA 聚合酶 (2.5 U/μl) 1 μl,缓冲液 (10 ×) 5 μl,探针 (1 μmol/L) 1 μl,三蒸水 14 μl。扩增程序:94 ℃ 预变性 10 min, 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 65 s, 共 40 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.8 结果及判断

检测样本 Ct 值 ≤ 35.0 时,报告阪崎肠杆菌检测阳性; > 35.0 或检测不到 Ct 值时,报告阪崎肠杆菌未检出。

1.9 实时 PCR 检测阪崎肠杆菌方法的评价

(1) 特异性检测:抽提试验用所有菌株的 DNA 并对 *zpx* 基因进行实时 PCR 检测,评价该方法的特异性。

(2) 灵敏度检测:按 1.4 方法抽提模板 DNA,用核酸蛋白分析仪测 DNA 浓度进行 10 倍系列稀释,每个稀释度取 1 μl 进行实时 PCR 检测。

1.10 实时 PCR 反应体系的应用

以 GB 4789.40—2010《食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验》作为对照,本研究对 23 份实际样品进行实时 PCR 检测。取 100 g 奶粉置于 900 ml 缓冲蛋白胨水中形成均质液,37 ℃ 培养 18 h,取 1.0 ml 均质液按照 1.4 方法抽提 DNA 作为 PCR 反应的模板。PCR 扩增反应条件见 1.7。PCR 检测结果与国标方法检测结果进行比较,阳性结果采用特异性生化显色培养基进行验证。

2 结果与分析

2.1 实时 PCR 检测标准曲线的建立

浓度范围在 $4 \times 10^2 \sim 4 \times 10^8$ CFU/ml 之间时,标准曲线线性良好,相关系数 R^2 值大于 0.996。以此模板范围建立阪崎肠杆菌实时 PCR 检测标准曲线,见图 1、表 2。

2.2 特异性

对 7 株阪崎肠杆菌及 13 株非阪崎肠杆菌进行实时 PCR 检测,结果发现 7 株阪崎肠杆菌均表现为阳性扩增;而 13 株非阪崎肠杆菌及对照未有荧光增加信号,表现为阴性,表明该方法有良好的特异性。

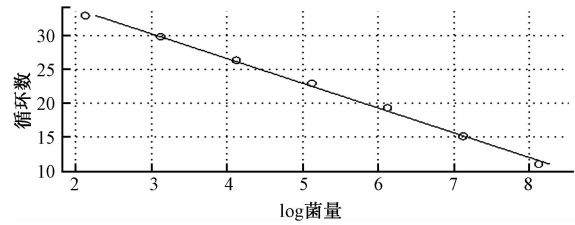


图 1 实时 PCR 检测标准曲线

Figure 1 Standard curve in the real-time PCR assay

实时 PCR 扩增曲线见图 2。

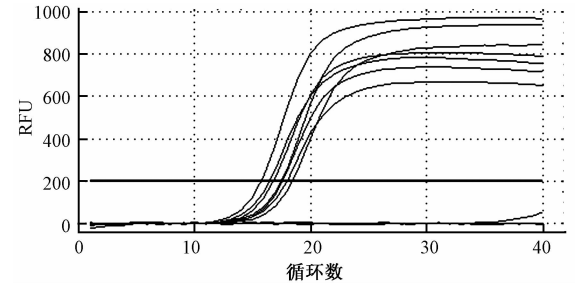


图 2 不同菌株 DNA 的实时 PCR 扩增曲线

Figure 2 The real-time PCR amplification curves for the DNA of different strains

2.3 灵敏度

在实时 PCR 仪上所能检测出的最低限为 180 fg/PCR 反应体系,而常规 PCR 可观察到的条带,其最低稀释浓度为 18 pg/PCR 反应体系 (见图 3 和表 3),可见,实时 PCR 的灵敏度比常规 PCR 高 100 倍。显示出良好的灵敏度。

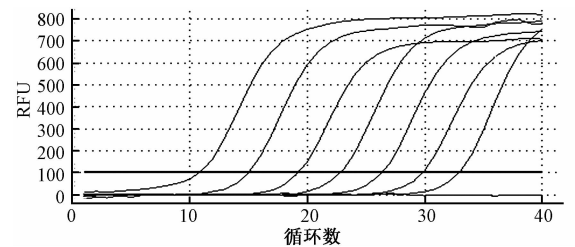


图 3 不同浓度阪崎肠杆菌 DNA 的实时 PCR 扩增曲线

Figure 3 The real-time PCR amplification curve for the DNA of different concentration of *Enterobacter Sakazakii* strains

表 3 实时 PCR 与常规 PCR 检测灵敏度的比较

Table 3 Sensitivities of real-time PCR vs Conventional PCR

阳性模板 DNA 含量 (/PCR 反应体系)	实时 PCR Ct 值	普通 PCR
180 ng	7.61	阳性
18 ng	12.23	阳性
1.8 ng	15.34	阳性
180 pg	19.76	阳性
18 pg	21.52	阳性
1.8 pg	25.13	阴性
180 fg	27.79	阴性
18 fg	0	阴性
1.8 fg	0	阴性

2.4 实际样品的检测

在受检的 23 份婴幼儿乳粉中,国标法检出阳性标本 2 份,分子信标实时 PCR 法检出 2 份(Ct 值分别为 27.34、25.62),检出率为 8.69%。

3 讨论

阪崎肠杆菌是近年来受到广泛关注的食源性病原菌。作为一种重要的条件性致病菌,其感染的大多数病例都是婴儿及免疫力低下人群^[5-7]。其致病机制还不是很清楚,有学者认为阪崎肠杆菌 *zpx* 基因编码的一种含锌蛋白酶在其致病过程中起了非常重要作用,该蛋白酶具有溶胶原活性,可能导致新生儿肠道细胞的大范围坏死,产生坏死性小肠结肠炎。该蛋白酶亦可促使阪崎肠杆菌穿过血脑屏障,导致新生儿脑膜炎^[8]。目前对阪崎肠杆菌 *zpx* 的研究甚少,主要在 PCR 技术的探索方面。

本研究建立了分子信标-实时 PCR 方法:根据阪崎肠杆菌 *zpx* 基因,设计 2 条特异性引物和 1 个分子信标探针,对 7 株阪崎肠杆菌和其他 13 种肠道细菌共 20 株菌进行分子信标-实时 PCR 检测。研究表明:该方法特异性强,仅 7 株阪崎肠杆菌得到阳性扩增结果,与对照组 13 株其他肠道致病菌无交叉反应,证明引物具有很高的特异性;灵敏度高,是普通 PCR 的 100 倍,对纯阪崎肠杆菌 DNA 的检出限为 180 fg/PCR 反应体系,纯阪崎肠杆菌菌液的检出限为 10² CFU/ml;对实际样品进行增菌检测,显示该方法与传统的分离培养方法具有很好的一致性,且操作简单、快捷,检测时间仅需 1 d(包括样品的增菌及前处理),检测结果可靠性好、稳定性高。

因此,该方法检测阪崎肠杆菌特异性强、灵敏度高,并且操作简便、检测成本低、耗时短,可作为大批量婴幼儿乳粉样品阪崎肠杆菌检测的筛选方法,具有很好的应用前景。

参考文献

- [1] TOWNSEND S, CAUBILLA B J, LOC-CARRILLO C, et al. The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat[J]. *Food Microbiol*, 2007, 24(1): 67-74.
- [2] 刘秀梅. 婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌-食品安全控制的新目标[J]. *中国食品卫生杂志*, 2004, 16(5): 385-388.
- [3] van AKER J, de SMET F, MUYLDERMANS G, et al. Outbreak of necrotizing Enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(1): 293-297.
- [4] WEIR E. Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii* [J]. *Can Med Assoc J*, 2002, 166(12): 1570.
- [5] 李兆辉. 浅论阪崎肠杆菌的危害及其检测方法[J]. *现代畜牧兽医*, 2006, (5): 29-31.
- [6] NAZAROWEC-WHITE M, FARBER J M. *Enterobacter sakazakii*: a review[J]. *Inter J Food Microbiol*, 1997, 34(2): 103-113.
- [7] CORTI G, PANUNZI I, LOSCO M, et al. Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man[J]. *J Chemotherapy*, 2007, 19: 94-96.
- [8] KOTHARY M H, McCARDELL B A, FRAZAR C D, et al. Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by *zpx* and development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(13): 4142-4151.