

种特异性 PCR 快速检测奶粉中阪崎肠杆菌研究*

叶应旺^{1 2 3} 吴清平^{2* *} 郭伟鹏² 张菊梅² 董晓晖^{1 2 3}

(中国科学院南海海洋研究所 广州 510301) (广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 阪崎肠杆菌是一种目前认为以奶粉为传播媒介的食源性条件致病菌,通过 α -1,4-葡萄糖苷酶基因和 *ompA* 基因分别设计引物 ESF-ESR 和 ESSF-ESSR,进行单重和双重 PCR 方法研究,结果显示所有阪崎肠杆菌菌株 PCR 扩增均为阳性,阴性对照均未扩增出目的片段,纯菌单重 PCR 灵敏度分别为 10^2 cfu/mL 和 10^1 cfu/mL,双重 PCR 灵敏度为 10^3 cfu/mL;在有或无其他细菌存在时,人工污染阪崎肠杆菌模拟样品单重 PCR 检测灵敏度分别为 10^3 cfu/mL 和 10^2 cfu/mL,双重 PCR 检测灵敏度为 10^4 cfu/mL,实际样品检测显示 PCR 方法与传统方法具有很好的一致性。结果表明,该 PCR 方法具有很好的种特异性和灵敏度,能够克服奶粉中杂菌对快速检测阪崎肠杆菌造成的干扰,减少以保守序列来设计引物导致假阳性结果的出现,可以较好地应用于奶粉中阪崎肠杆菌的检测与鉴定。

关键词 阪崎肠杆菌, α -1,4-葡萄糖苷酶基因, *ompA* 基因,奶粉

中图分类号:TS202.3 文献标识码:A 文章编号:10253-2654(2007)06-1192-06

Rapid Detection for *Enterobacter sakazakii* in Powdered Milks Based on Species-specific PCR*

YE Ying-Wang^{1 2 3} WU Qing-Ping^{2* *} GUO Wei-Peng² ZHANG Ju-Mei² DONG Xiao-Hui^{1 2 3}

(South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301) (Guangdong Provincial Key Laboratory

of Microbiol Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

(Graduate University of CAS, Beijing 100049)

Abstract *Enterobacter sakazakii* was an emerging food-borne pathogen associated with meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis, especially in neonates with high potential danger. The conventional detection methods were time-consuming and operated arduously, sometimes gave ambiguous signals. Increasing of reports showed the infant formula was the main infection vehicle. Consequently, it was important that improvement of methods for earlier detection and confirmation of presumptive *E. sakazakii* in infant formula to control and guard against the epidemic diseases due to *E. sakazakii*. In this study, PCR assay was developed based on *ompA* and α -1,4-glucosidase genes. Expected fragments(469 bp and 673 bp) were produced from 8 strains of *E. sakazakii* including *E. sakazakii* ATCC51329 after PCR amplification, but not from 70 strains of other bacteria. The sensitivity is 10^1 cfu/mL and 10^2 cfu/mL by signal-PCR using ESSF-ESSR and ESF-ESR as primers respectively in pure culture, sensitivity of dual-PCR is 10^3 cfu/mL. Detection limit in artificially contaminated infant formula is 10^2 cfu/mL and 10^3 cfu/mL by single-PCR with ESF-ESR and ESSF-ESSR respectively. To investigate whether the presence of other bacteria in infant formula have any effect on the sensitivity of PCR, two sets of experiment were designed. Different levels of other bacterial do not affect the PCR detection limit, which indicates the primers are species-specific for *E. sakazakii*. The investigation of actual samples shows that PCR assay is consistent with FDA standard method. The new method developed in the study can be used widely to detect the presence of *E. sakazakii* in infant formula with higher sensitivity and specificity than conventional methods.

Key words *Enterobacter sakazakii*, α -1,4-glucosidase gene, *ompA* gene, Powdered milk

阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)是一种重要的食源性致病菌,目前其感染疾病的传播途径以及致病机理还不是很清楚^[1,2,3,4]。为了控制和预防阪

崎肠杆菌感染疾病的流行,寻找阪崎肠杆菌种特异性基因或特征序列,建立种特异性快速分子检测技术显得尤为重要。近年来,基于阪崎肠杆菌具有 α -

* 广东省自然科学基金项目(No.04000244)

** 通讯作者 Tel/Fax:020-87688132, E-mail:wuqp@gdas.ac.cn

收稿日期:2007-03-15,修回日期:2007-05-15

葡萄糖苷酶活性特征的特异性显色生化检测方法取得重要进展^[5,6],但是特异性生化方法均存在检测时间较长以及时有不同程度的假阳性结果。最近根据阪崎肠杆菌 16S rDNA 和 16S-23S rDNA 居间序列 (ITS) 为分子靶点, Keyser 等^[7]、Angelika 等^[8]、Liu 等^[9]先后建立检测阪崎肠杆菌的分子检测方法。2006年, Nair 等^[10]克隆了阪崎肠杆菌 *ompA* 基因, 并以其基因序列为目标建立了单重 PCR 快速检测方法, 同年 Lehner 等^[11]证实了阪崎肠杆菌基因组中存在 α -葡萄糖苷酶基因簇, 并获得该基因簇的分子序列。但目前尚未见有以 α -1,4-葡萄糖苷酶基因为目标片段的分子检测技术的相关报道。针对 16S rDNA 保守序列检测结果种特异性不强以及单重 PCR 易于产生假阳性的问题, 本研究以阪崎肠杆菌

基因组中种特异性 α -1,4-葡萄糖苷酶基因的分子序列为目标设计特异性引物, 并结合 *ompA* 基因设计引物^[10], 建立起快速、特异性强、灵敏度较高的单重和双重 PCR 检测阪崎肠杆菌分子检测方法, 并且对方法的特异性、灵敏度以及模拟样品检测结果进行了系统的分析研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 本研究所用菌株见表 1, 其中阪崎肠杆菌 ATCC51329 标准菌株由广东环凯微生物科技有限公司提供, 阪崎肠杆菌野生分离株采用传统的 FDA 标准方法^[4]从奶粉中分离获得, 其余菌株由本研究室提供。

表 1 本实验所用菌株

Species	Number	Strains or sources	Species	Number	Strains or sources
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	ATCC51329	<i>Listeria</i> sp.	3	GIM
<i>E. sakazakii</i>	7	GIM	<i>L. monocytogenes</i>	3	GIM
<i>Escherichia coli</i>	1	ATCC25922	<i>Salmonella paratyphi</i> B	1	CMCC50004
<i>E. coli</i>	1	ATCC8739	<i>S. paratyphi</i> A	1	CMCC50093
<i>E. coli</i>	1	CMCC44102	<i>S. arizonae</i>	1	CMCC47001
<i>E. coli</i>	1	A.SI.751	<i>S. thompson</i>	1	CMCC50023
<i>E. coli</i> 157	3	GIM	<i>S. enterica</i>	1	CMCC50335
<i>E. coli</i> O157:H7	1	ATCC12900	<i>S. typhosa</i>	1	CMCC50115
<i>E. coli</i>	25	GIM	<i>Salmonella</i> sp.	10	GIM
<i>Shigella sonnei</i>	1	CMCC 51105	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	GIM
<i>S. flexneri</i>	1	CMCC 51572	<i>Yersinia enterocolitica</i>	4	GIM
<i>S. dysenteriae</i>	1	CMCC 51592	<i>Enterobacteriaceae</i>	1	NPCBPB45103
<i>S. dysenteriae</i>	3	GIM	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	GIM
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	NICBPB54002	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	ATCC 26003

ATCC : American Type Culture Collection ; CMCC : China Microbiological Culture Collection ;

GIM : Guangdong Institute of Microbiology ;

NICBPB : National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products ; A.S : Academy of Science .

1.1.2 主要试剂 本研究 DNA 提取试剂盒以及其它用于 PCR 的分子试剂或试剂盒均购于北京天为时代有限公司, 培养基或原料购于广东环凯微生物科技有限公司, UNI-Q-10 DNA 凝胶回收试剂盒购于大连宝生物工程公司。

1.2 PCR 反应

1.2.1 基因组 DNA 的提取 将实验 G⁺ 和 G⁻ 纯菌分别接种至营养肉汤 (NB) 和胰蛋白胨肉汤 (TSB) 中,

37℃ 过夜培养, 取过夜培养物 1.0mL, G⁻ 和 G⁺ 分别按照 DNA 提取试剂盒说明书和传统酚-氯仿方法提取细菌基因组 DNA, 溶解于 TE 缓冲液 (pH = 7.6) 中。模拟样品中的细菌基因组同样按照上述方法提取。

1.2.2 引物的设计 本实验所用引物见表 2, 由北京赛百盛公司合成。

表2 本实验所用引物

Primers	Sequence (5→3)	Position	GenBank num.	Products(bp)
ESSF ^[10]	GGA TTTAACCGT GAA CTTT TTCC	325 ~ 346	DQ000206	469
ESSR ^[10]	CGCCAGCGATGTTAGAAG A	775 ~ 793		
ESF	GGC GGA GCC GAA TAA CTG	69877 ~ 69894	AM705280	673
ESR	CGT GCC CTG CAT GAG AAA A	70531 ~ 70549		

1.2.3 扩增体系和程序 :单重反应体系(50 μL) : 10 \times reactor buffer 5 μL ,正向、反向引物各 0.5 $\mu\text{mol/L}$, dNTP 各 150 $\mu\text{mol/L}$, 2.5 U 的 Taq 酶 ,模板为 5.0 μL 加双蒸水补足 50 μL 。扩增反应程序 :95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 , 2 min ; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 , 45 s , 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 , 30 s , 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s , 35 cycles ; 72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min。双重 PCR 反应体系(50 μL) : 10 \times reactor buffer 5 μL , ESF 和 ESR 各 0.5 $\mu\text{mol/L}$, ESSF 和 ESSR 各 1.0 $\mu\text{mol/L}$, dNTP 各 200 $\mu\text{mol/L}$, 4 U 的 Taq 酶 ,模板为 5.0 μL 加双蒸水补足 50 μL 。扩增反应程序 :95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 , 5 min ; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 , 50s , 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 , 55s , 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 , 1.5 min , 35 cycles ; 72 $^{\circ}\text{C}$, 10min。

1.3 PCR 反应特异性测定

以阪崎肠杆菌 ATCC51329 为阳性对照 ,检测从奶粉中分离的阪崎肠杆菌野生菌株 ,并且以 70 株非阪崎肠杆菌为阴性对照菌株(见表 1) ,提取其基因组 DNA ,按照 1.2.3 条件和程序扩增。运用 UNIQ-10 DNA 凝胶试剂盒回收、纯化 PCR 产物 ,委托上海英骏公司对 PCR 产物进行测序。

1.4 特异性生化显色培养基验证 PCR 检测结果

为了更进一步验证 PCR 方法的特异性 ,采用特异性生化显色培养基(DFI 培养基^[6])验证 PCR 方法的检测结果。挑取 PCR 检测为阪崎肠杆菌菌落 ,用无菌水稀释 取合适稀释度的稀释液 100 μL ,直接涂布在加有特异性底物(5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-葡萄糖苷)的琼脂上 ,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 ~ 24 h ,观察结果。实际样品验证采用肠道增菌肉汤进行前增菌^[4] ,再涂布在特异性显色培养基上 ,培养 24h ,观察结果。

1.5 PCR 反应灵敏度测定

以阪崎肠杆菌 ATCC51329 为参考菌株进行灵敏度测定 ,提取 1mL 平板菌落计数为 10⁸ cfu/mL 的过夜 NB 培养液基因组 DNA ,用无菌双蒸水将基因组 DNA 按 10⁰ ~ 10⁻⁸ 进行 10 倍梯度稀释 ,取不同稀释度的 DNA 样品 5 μL 进行单重和双重 PCR 扩增。以部分野生分离菌株进行同样重复。

1.6 人工污染奶粉的检测

1.6.1 人工污染阪崎肠杆菌样品的检测 :以阪崎肠杆菌 ATCC51329 为参考菌株 ,用经 FDA 标准传统方法鉴定 ,取阪崎肠杆菌为阴性的国产奶粉和进口奶粉各 5 份(每份 1 g)无菌操作分别置于 8mL 的无菌蒸馏水中形成均质液 ,把阪崎肠杆菌的过夜培养液进行 10 倍稀释 ,取 1 mL 置于 9 mL 的均质液中形成不同浓度阪崎肠杆菌(10⁸ cfu/mL ~ 10⁰ cfu/mL)均质液 ,基因组的提取以及扩增等参照 1.2.1 , 1.2.3 方法进行。

1.6.2 样品中存在其它细菌时阪崎肠杆菌的检测 :为了使奶粉中细菌更接近真实情况以及验证奶粉中其他细菌的存在对阪崎肠杆菌 PCR 扩增可能产生的影响。设计 2 组实验 ,其中一组均质液中分别接种不同浓度(10⁸ cfu/mL ~ 10⁰ cfu/mL)的阪崎肠杆菌的同时 ,再接种浓度为 10⁸ Cfu/mL 的大肠杆菌(Escherichia coli)8099。另外一组接种三种不同浓度(10⁴ cfu/mL , 10³ cfu/mL 和 10² cfu/mL)的阪崎肠杆菌 ,同时分别接种不同浓度(10⁸ cfu/mL ~ 10¹ cfu/mL)的大肠杆菌 8099。

1.7 实际样品的检测

为了更好地了解 PCR 方法在实际样品中的应用 ,本研究对 36 份实际样品进行调查。取 100 g 奶粉置于 900 mL LB 培养基中形成均质液 ,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h。用 DNA 提取试剂盒提取 1.0 mL 培养液 DNA ,溶解 50 μL 的 TE(pH = 7.6)缓冲液中作为 PCR 反应的模板。PCR 扩增反应条件和参数参见 1.2.3。PCR 检测结果与 FDA 标准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

2.1 阪崎肠杆菌的单重和双重 PCR 检测特异性

把阪崎肠杆菌 ATCC51329 作为阳性对照 ,检测奶粉中阪崎肠杆菌野生分离株 ,以 70 株非阪崎肠杆菌为阴性对照菌株(见表 1)来检验该方法的特异

性如图1,图2所示。阳性对照与7株分离株均扩增出特征性条带,阴性对照株均无特征性条带出现,表明该方法检测阪崎肠杆菌具有很强的种特异性。运用凝胶试剂盒回收、纯化PCR产物,测序结果表明ompA基因目的片段(469bp)同源性达95%~99% α-1 A-葡萄糖苷酶基因目标片段(673bp)同源性达92%~96%。

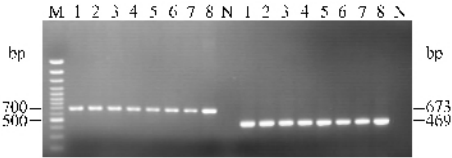


图1 阪崎肠杆菌的单重PCR扩增检测

M: GeneRuler DNA Ladder; lane1: *Enterobacter sakazakii* ATCC51329; lane 2~8: *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered milks; N: negative control.

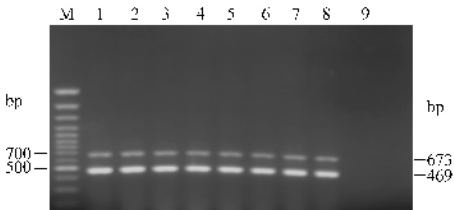


图2 阪崎肠杆菌双重PCR扩增结果

M: GeneRuler DNA Ladder; Lane1: *E. sakazakii* ATCC51329; Lane2~8: *E. sakazakii* isolates from powdered milks; Lane9: negative control.

2.2 阪崎肠杆菌PCR检测与生化检测方法的比较

本实验用阪崎肠杆菌野生菌株采用FDA标准方法从奶粉中分离获得,并对本实验建立的PCR技术检测结果与FDA鉴定结果和特异性生化培养基验证结果进行比较。在8株菌株中,菌株1、2、3、4、5、6、7,运用3种方法鉴定均为阪崎肠杆菌,菌株8采用PCR和特异性生化培养基鉴定为非阪崎肠杆菌,而FDA方法则显示为阪崎肠杆菌(表3)。针对菌株8不同鉴定结果的情况,本研究作进一步的生化试验结果显示,菌株8为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*),可见本实验所建立的方法不仅与生化方法具有很好的一致性,而且特异性更强,克服了传统方法检测结果假阳性较突出等问题。

2.3 灵敏度测定

取1mL阪崎肠杆菌ATCC51329过夜培养液,提取基因组DNA,用无菌水做10倍稀释,以不同稀释度的DNA为模板,结果显示:10⁰~10⁻⁷稀释的模板,ESSF-ESSR作引物检测呈现阳性结果;10⁰~10⁻⁶稀释的模板,ESF-ESR作引物检测呈现阳性。平板菌落计数得起始的细菌为10⁸cfu/mL,即ESSF-ESSR和ESF-ESR作引物单重PCR检测灵敏度分别为10¹cfu/mL和10²cfu/mL(图3,图4),双重PCR检测灵敏度为10³cfu/mL(图5)。部分野生菌株重复实验结果与之一致。

表3 PCR分子方法与生化方法鉴定结果比较

Method	Strain1	Strain2	Strain3	Strain4	Strain5	Strain6	Strain7	Strain8
PCR	+	+	+	+	+	+	+	-
FDA	+	+	+	+	+	+	+	+
DFI*	+	+	+	+	+	+	+	-

"+" : *E. sakazakii* positive, "-" : *E. sakazakii* negative

* : Validation of *E. sakazakii* by DFI culture medium

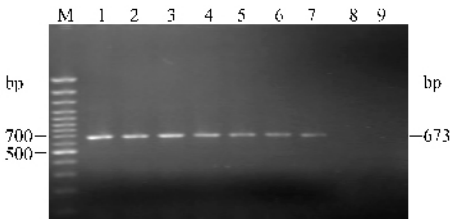


图3 ESF-ESR单重PCR检测阪崎肠杆菌灵敏度

M: GeneRuler DNA Ladder; lane1~9: DNA genomic of 10⁸cfu/mL~10⁰cfu/mL respectively.

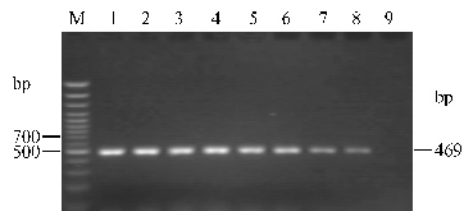


图4 ESSF-ESSR单重PCR检测阪崎肠杆菌灵敏度

M: GeneRuler DNA Ladder; lane1~9: DNA genomic of 10⁸cfu/mL~10⁰cfu/mL respectively.

2.4 人工模拟样品灵敏度测定

2.4.1 奶粉中阪崎肠杆菌测定:按照方法1.6.1,接

种阪崎肠杆菌至传统方法鉴定为阪崎肠杆菌阴性的奶粉中,提取基因组DNA,ESF-ESR和ESSF-ESSR作

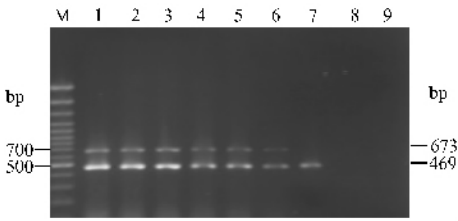


图5 ESF-ESR 和 ESSF-ESSR 双重 PCR 检测阪崎肠杆菌灵敏度

M: GeneRuler DNA Ladder; lane1 ~ 9: DNA genomic of 10^8 cfu/mL ~ 10^0 cfu/mL respectively.

引物进行单重 PCR 扩增,检测结果表明,人工模拟样品的检测灵敏度分别为 10^3 cfu/mL 和 10^2 cfu/mL (图6,图7),双重 PCR 的检测灵敏度为 10^4 cfu/mL (图8)。

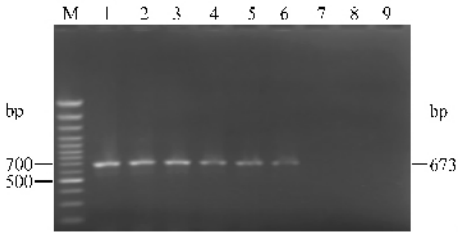


图6 ESF-ESR 单重 PCR 检测人工污染奶粉灵敏度

M: GeneRuler DNA Ladder; lane1 ~ 9: DNA genomic of 10^8 cfu/mL ~ 10^0 cfu/mL respectively.

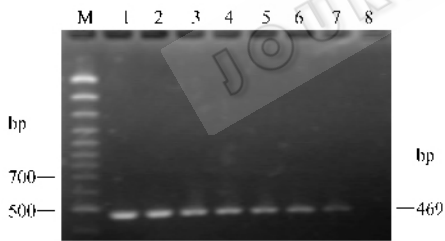


图7 ESSF-ESSR 单重 PCR 检测人工污染奶粉的灵敏度

M: GeneRuler DNA Ladder; lane1 ~ 8: DNA genomic of 10^8 cfu/mL ~ 10^1 cfu/mL respectively.

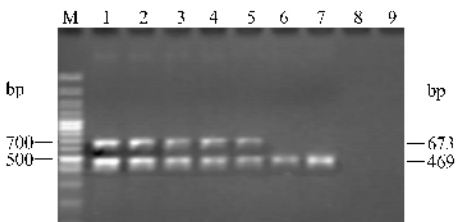


图8 ESSF-ESSR 和 ESF-ESR 双重 PCR 检测人工污染奶粉的灵敏度

M: GeneRuler DNA Ladder; lane1 ~ 9: DNA genomic of 10^8 cfu/mL ~ 10^0 cfu/mL respectively.

2.4.2 奶粉中杂菌对阪崎肠杆菌测定的影响 :按照 1.6.2 方法接种阪崎肠杆菌,提取不同浓度下细菌基因组,扩增程序和条件参照 1.2.3。奶粉中存在 10^8 cfu/mL 大肠杆菌时,采用 ESF-ESR 和 ESSF-ESSR 为引物,以 α -1,4-葡萄糖苷酶基因和 *ompA* 基因作为扩增目标片段,对阪崎肠杆菌模拟样品的检测灵敏度分别为 10^3 cfu/mL 和 10^2 cfu/mL;当存在不同浓度大肠杆菌(10^8 cfu/mL ~ 10^1 cfu/mL)时,上述两种基因的单重 PCR 检测灵敏度同样分别为 10^3 cfu/mL 和 10^2 cfu/mL;双重 PCR 检测灵敏度为 10^4 cfu/mL, 10^8 cfu/mL 的大肠杆菌作为阴性对照均没有扩增出特征目的条带(图9、图10、图11)。

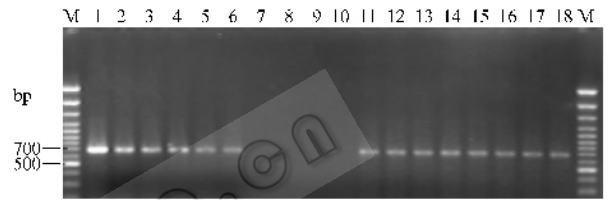


图9 奶粉中大肠杆菌对 ESF-ESR 单重 PCR 检测模拟样品的影响

M: GeneRuler DNA Ladder; lane1 ~ 9: PCR product of infant formula containing 10^8 cfu/mL ~ 10^1 cfu/mL *E. sakazakii* in the presence of 10^8 cfu/mL *E. coli* 8099 for each sample or lane; Lane10: PCR amplification in infant formula containing 10^8 cfu/mL *E. coli* 8099; lane 11 ~ 18: PCR products in infant formula containing 10^3 cfu/mL *E. sakazakii* along with 10^8 cfu/mL ~ 10^1 cfu/mL *E. coli* 8099.

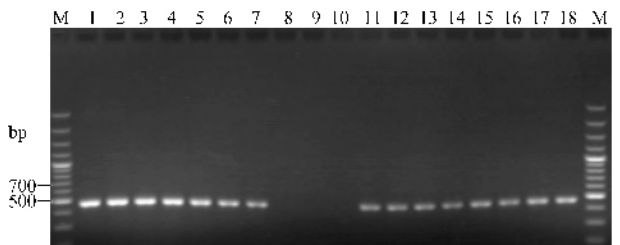


图10 奶粉中大肠杆菌对 ESSF-ESSR 单重 PCR 检测模拟样品的影响

M: GeneRuler DNA Ladder; lane1 ~ 9: PCR product of infant formula containing 10^8 cfu/mL ~ 10^0 cfu/mL *E. sakazakii* in the presence of 10^8 cfu/mL *E. coli* 8099 for each sample; Lane10: PCR amplification of infant formula containing 10^8 cfu/mL *E. coli* 8099; lane 11 ~ 18: PCR products of infant formula containing 10^2 cfu/mL *E. sakazakii* along with 10^8 cfu/mL ~ 10^1 cfu/mL *E. coli* 8099

2.5 实际样品的检测

运用本实验建立的 PCR 方法对 36 份实际奶粉样品的检测结果显示,2 份奶粉被阪崎肠杆菌污染,

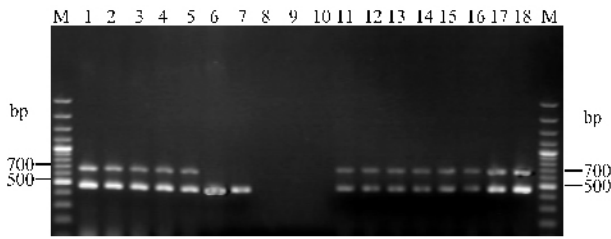


图 11 奶粉中大肠杆菌对双重 PCR 检测模拟样品的影响
M: GeneRuler DNA Ladder; lane1~9: PCR product of infant formula containing 10^8 cfu/mL ~ 10^0 cfu/mL *E. sakazakii* in the presence of 10^8 cfu/mL *E. coli* 8099 for each sample; Lane10: PCR amplification of infant formula containing 10^8 cfu/mL *E. coli* 8099; lane 11~18: PCR products of infant formula containing 10^4 cfu/mL *E. sakazakii* along with 10^8 cfu/mL ~ 10^1 cfu/mL *E. coli* 8099

检出率达 5.55%, 这与 FDA 标准方法的检测结果一致, 阳性样品均在特异性生化显色培养基上生长出蓝绿色特征菌落。可见 PCR 方法较传统方法具有更高的灵敏度和特异性, 能实现对奶粉中阪崎肠杆菌的早期快速检测。

3 讨论

目前对阪崎肠杆菌的检测主要采用特异性生化显色培养基^[5,6]和以保守序列及 *ompA* 基因为目标片段的单重 PCR 检测方法^[7-10], 而以 α -1 *A*-葡萄糖苷酶基因为目标设计引物建立单重 PCR 的分子检测技术以及同时以 α -1 *A*-葡萄糖苷酶基因及 *ompA* 基因为目标的双重 PCR 分子检测技术尚未见报道。本文在分析阪崎肠杆菌 α -1 *A*-葡萄糖苷酶基因基础上设计特异性引物 ESF-ESR, 并结合 *ompA* 基因所设计的引物 ESSF-ESSR^[10], 建立起奶粉中快速检测鉴定阪崎肠杆菌的单重和双重 PCR 检测方法。结果表明以 α -1 *A*-葡萄糖苷酶基因和 *ompA* 基因为目标片段, 该方法单重 PCR 纯菌检测灵敏度分别为 10^2 cfu/mL 和 10^1 cfu/mL, 其中以 ESSF-ESSR 为引物对纯菌和模拟样品的检测, 灵敏度均比 *Nai*^[10] 的灵敏度检测结果提高 10 倍; 在此基础上通过优化条件建立的双重 PCR 检测灵敏度为 10^3 cfu/mL。当模拟样品中存在不同浓度的大肠杆菌时, 以 ESF-ESR 和 ESSF-ESSR 为引物单重 PCR 检测灵敏度分别为 10^3 cfu/mL 和 10^2 cfu/mL, 双重 PCR 检测灵敏度为 10^4 cfu/mL, 与不存在大肠杆菌时的模拟样品灵敏

度检测结果完全一致。另外以 70 株其他菌株作阴性对照, 均未扩增出目标片段, 而阪崎肠杆菌 ATCC51329 和 7 株阪崎肠杆菌野生分离菌株则均扩增出目的条带。

本研究中, 单重和双重 PCR 方法对纯菌检测灵敏度较模拟样品均提高了 10 倍, 这可能是由于奶粉中复杂的组分对目标菌 DNA 的提取产生了一定的影响, 降低了目标菌 DNA 模板纯度, 另外奶粉中金属离子等特殊组分对 PCR 反应可能具有抑制作用, 导致 PCR 方法对模拟样品的检测灵敏度较纯菌有所降低。本实验建立的 PCR 方法具有很强的种特异性, 能够克服奶粉中杂菌对阪崎肠杆菌快速准确检测造成的干扰, 可以减少以保守序列来设计引物导致的假阳性结果的出现。实际样品的检测结果显示 PCR 方法与传统检测方法具有很好的一致性, 同时克服了传统检测所需时间较长、假阳性结果较突出等缺点, 因而在阪崎肠杆菌检测与鉴定方面将具有优势和应用前景, 可以更好地实现对奶粉中阪崎肠杆菌的早期快速检测, 为预防和控制以奶粉为媒介的阪崎肠杆菌感染疾病的流行提供技术手段。

参考文献

- [1] Farmer J J, Asbury M A, Hickman F W, et al. International Journal of Systematic Bacteriology, 1980, 30(3): 569 ~ 584.
- [2] Gurtler J B, Komacki J L, Beuchat L R. International Journal of Food Microbiology, 2005, 104(1): 1 ~ 34.
- [3] Van Aker J, De Smet F, Muylldermans G, et al. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(1): 293 ~ 297.
- [4] Iversen C, Forsythe S. Food Microbiology, 2003, 21(11): 771 ~ 777.
- [5] Leuscher R G K, Baird F, Donald B, et al. Food Microbiology, 2004, 21(5): 527 ~ 533.
- [6] Iversen C, Druggan P, Forsythe S. International Journal of Food Microbiology, 2004, 96(2): 133 ~ 139.
- [7] Keyser M, Withuhn R C, Ronquest L C, et al. Biotechnol Lett, 2003, 25: 1893 ~ 1898.
- [8] Lehner A, Tasara T, Stephan R. BMC Microbiology, 2004, 4: 43.
- [9] Liu Y, Gao Q L, Zhang X, et al. Molecular and Cellular Probes, 2006, 20(1): 11 ~ 17.
- [10] Nair M K M, Venkitanarayanan K S. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(4): 2539 ~ 2546.
- [11] Lehner A, Riedel K, Ratte A, et al. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29(8): 609 ~ 625.