

乳及乳制品中阪崎肠杆菌 PCR-DHPLC 检测 新技术的建立

杨春华¹ 曹际娟^{2*} 桂家祥¹ 钟毅¹

(1. 江西出入境检验检疫局 南昌 330002)

(2. 辽宁出入境检验检疫局 大连 116001)

摘要: 为了应用 PCR 结合变性高效液相色谱(DHPLC)技术建立食品中阪崎肠杆菌的快速检测方法, 根据阪崎肠杆菌 16S-23S rRNA 特异基因序列的特点设计特异性引物, PCR 扩增的产物经 DHPLC 技术进行快速检测。以阪崎肠杆菌等 59 株参考菌株做特异性试验; 阪崎肠杆菌菌株稀释成不同梯度, 做灵敏度试验, 结果表明该方法具有很好的特异性, 方法灵敏度较高, 检测下限可达到为 25 CFU/mL; 该方法可以快速、准确检测阪崎肠杆菌, 是食品中致病菌快速检测的新技术。
关键词: DHPLC, 阪崎肠杆菌, 16S-23S rRNA

Construction of Identification of *Enterobacter sakazakii* in Milk and Dairy Product with PCR-DHPLC

YANG Chun-Hua¹ CAO Ji-Juan^{2*} GUI Jia-Xiang¹ ZHONG Yi¹

(1. Jiangxi Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau of P.R.China, Nanchang 330002)

(2. Liaoning Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau of P.R.China, Dalian 116001)

Abstract: To identify the 16S-23S rRNA gene in *Enterobacter sakazakii*, a PCR-DHPLC assay was performed in this study. Primers specific for the 16S-23S rRNA gene of *Enterobacter sakazakii* in food were selected to conduct the DHPLC assays. The specific testing was performed with *Enterobacter sakazakii* and 59 strains, and various grads of *Enterobacter sakazakii* was used for the sensitivity testing. The good specificity was found in the study. Also, the method showed nicer sensitivity with the lowest amount of detecting was 181 CFU/mL, so it can detect and identify *Enterobacter sakazakii* quickly and correctly. The DHPLC could be a new method for detecting food pathogens.

Keywords: DHPLC, *Enterobacter sakazakii*, 16S-23S rRNA

阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)是人和动物肠道内寄生的一种革兰氏阴性无芽孢杆菌, 属肠杆菌科的一种, 被称为条件致病菌。1961年, 英国首次报道 2 例由阪崎肠杆菌引起的脑膜炎病例, 以后

相继在美国、加拿大和比利时等国家报道了新生儿阪崎肠杆菌感染事件^[1,2]。具不完全资料报道, 阪崎肠杆菌能引起严重的新生儿脑膜炎、小肠结肠炎和菌血症^[1], 并且可能引起神经系统后遗症和死亡,

死亡率高达 50%以上^[3,4]。目前,虽然还不能确定阪崎肠杆菌的宿主和传播途径,但多起新生儿阪崎肠杆菌感染事件基本证实了婴儿配方奶粉是主要感染源^[5]。因此,建立高灵敏度的快速检测方法已经成为当务之急。

阪崎肠杆菌传统检测方法要用前增菌和选择性增菌等多种培养基,培养、鉴定、操作步骤繁杂,工作量大,从培养到生化鉴定耗时至少 5 d~8 d^[3,6]。在食品安全面临严峻挑战的形势下,建立快速诊断、鉴定技术,才能正确选择抗菌药物,追踪病菌的来源。变性高效液相色谱(DHPLC)通过对细微差异的 DNA 序列分析可以从菌株水平快速识别病原菌。本文建立的 PCR-DHPLC 检测技术将 PCR 技术与 DHPLC 技术有机地结合在一起,具有快捷、灵敏、特异的优势,能够实现高通量的自动化检测。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

本研究所用标准菌株均购自美国典型菌种保藏中心(ATCC)和中国医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC),其他菌株为本实验室和其他检验检疫局实验室分离鉴定获得的分离株,详见表 1。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 主要仪器: 基因扩增仪(美国 ABI 公司); 变性高效液相色谱(简称 DHPLC, 美国 Transgenomic 公司)。

1.2.2 主要试剂: 细菌基因组 DNA 提取试剂(TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction kit)及 Ex Taq 等试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。三乙胺乙酰盐(TEAA, 色谱纯)购自 Transgenomic 公司。乙腈(色谱纯)购自 Fisher 公司。

阪崎肠杆菌 PCR-DHPLC 检测的引物序列如下: 5'-GGGTTGTCTGCGAAAGCGAA-3', 下游引物: 5'-GTCTTCGTGCTGCGAGTTTG-3', 扩增片段为 228 bp。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

DHPLC 缓冲液: 缓冲溶液 A 为 0.1% mmol/L TEAA; 缓冲溶液 B 为 0.1% mmol/L TEAA。

1.3 试验方法

1.3.1 致病菌 DNA 的提取: 取细菌细胞培养液 1 mL, 采用细菌 DNA 提取试剂盒(TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction kit)提取细

菌 DNA, 并保存于-20°C 备用, 以待检测。

1.3.2 引物筛选与反应体系优化: 检索文献, 确定靶基因, 从 GenBank 下载所有靶基因的序列, 用生物软件进行序列比对, 截取最一致的序列设计引物, 验证其保守性。调整 Taq 酶、Mg²⁺、引物对、引物用量和循环条件, 直至得出最佳反应体系和反应条件。

1.3.3 PCR 扩增条件: PCR 反应体系(25 μL): 10×PCR 缓冲液 2 μL、引物对(10 μmol/L)各 1 μL、dNTPs(10 mmol/L)2 μL、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL、模板 DNA 2 μL、水 16.8 μL。

PCR 反应条件: 94°C 3 min; 94°C 60 s, 60°C 60 s, 72°C 60 s, 35 个循环; 72°C 7 min, 4°C 保存反应产物。

1.3.4 DHPLC 分析条件: 色谱柱: PS-DVB & C18 DNASep 色谱柱(4.6 mm×50 mm, 粒度 3 μm); 柱温: 50°C; 流动相: 缓冲溶液 A 浓度为 50.2%, 缓冲溶液 B 浓度为 49.8%; 流速: 0.9 mL/min; 检测器: 荧光检测器(光源: 150 W Xenon 灯; 激发谱带宽: 15 nm; 发射谱带宽: 15.3 nm; 检测灵敏度: 在波长 350 nm 积分 2 s); 上样量: PCR 产物 5 μL。

1.3.5 特异性试验: 取表 1 中所列的 59 株试验菌株, 经培养后, 建立模板库, 按照 1.3.3 PCR 扩增条件和 1.3.4 DHPLC 分析条件进行致病菌的 PCR-DHPLC 特异性试验。

1.3.6 重现性试验: 取表 1 中所列的 59 株试验菌株, 经培养后, 按照 1.3.3 PCR 扩增条件和 1.3.4 DHPLC 分析条件进行 PCR-DHPLC 重现性试验。

1.3.7 灵敏度试验: 取阪崎肠杆菌标准菌株, 培养 24 h, 测其 OD 值, 估计其菌数, 然后按 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 等倍数梯度稀释, 采用 SN/T1897-2007 Petrifilm 测试片法进行平板计数, 重复 2 次, 取平均值确定其菌密度。将每个梯度的菌液提取模板 DNA, 进行 PCR-DHPLC 检测, 将检测结果与平板计数结果比较, 确定本方法的灵敏度。

1.3.8 验证试验: 将本研究建立的 PCR-DHPLC 检测方法用于乳制品中的阪崎肠杆菌实际检验, 同时采用检验检疫行业标准的培养鉴定方法(SN/T 1632.1-2005)、PCR 法(SN/T 1632.2-2005)和实时荧光 PCR 法(SN/T 1632.3-2005)进行验证比较。

表 1 试验菌种及其编号
Table 1 Test strain and No.

序号 No.	菌株名称 Strain name	拉丁名 Latin name	菌株号 Strain	菌株数量 The number of strains
1	阪崎肠杆菌	<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 51329	1
2	阪崎肠杆菌	<i>Enterobacter sakazakii</i>	分离株	7
3	普通变形杆菌	<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 49027	1
4	奇异变形杆菌	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29245	1
5	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	1
6	福氏志贺氏菌	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	1
7	小肠结肠炎耶尔森氏菌	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610	1
8	空肠弯曲菌	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560	1
9	溶血性链球菌	<i>Streptococcus hemolyticus</i>	CMCC 32121	1
10	霍乱弧菌 O1 群	<i>Vibrio cholerae</i> serotype O1	ATCC 14035	1
11	霍乱弧菌 O139 群	<i>Vibrio cholerae</i> serotype O139	ATCC 51394	1
12	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17803	1
13	溶藻性弧菌	<i>Vibrio alginolyticus</i>	分离株	1
14	创伤弧菌	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	1
15	拟态弧菌	<i>Vibrio mimicus</i>	ATCC 33653	1
16	梅氏弧菌	<i>Vibrio metschnikouii</i>	分离株	1
17	河弧菌	<i>Vibrio fluvialis</i>	分离株	1
18	嗜水气单胞菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	1
19	类志贺单胞菌	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	ATCC 14030	1
20	单核细胞增生李斯特氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	1
21	绵羊李斯特氏菌	<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	1
22	英诺克李斯特氏菌	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	1
23	威尔斯李斯特氏菌	<i>Listeria welshimeri</i>	ATCC 35897	1
24	西尔李斯特氏菌	<i>Listeria seeligeri</i>	ATCC 35967	1
25	格氏李斯特氏菌	<i>Listeria grayi</i>	ATCC 25401	1
26	脱氮李斯特氏菌	<i>listeria denitrificans</i>	ATCC 14870	1
27	肠炎沙门氏菌	<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	1
28	肠炎沙门氏菌	<i>Salmonella enteritidis</i>	分离株	3
29	鼠伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	CMCC 50115	1
30	猪霍乱沙门氏菌	<i>Salmonella cholerae</i>	分离株	2
31	丙型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi C</i>	分离株	3
32	伊思特本沙门氏菌	<i>Salmonella eastbourne</i>	分离株	1
33	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	分离株	5
34	肠出血性大肠埃希氏菌 O157 : H7	<i>Enterohemorrhagic E. coli</i> O157 : H7	ATCC 35150	1
35	产肠毒素大肠埃希氏菌	<i>Enterotoxigenic E. coli</i>	ATCC 35401	1
36	肠致病性大肠埃希氏菌	<i>Enteropathogenic E. coli</i>	ATCC 43887	1
37	肠侵袭性大肠埃希氏菌	<i>Enteroinvasive E. coli</i>	ATCC 43893	1
38	肺炎克雷伯氏菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	分离株	1
39	弗劳地柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	分离株	1
40	阴沟肠杆菌	<i>Enterobacter cloacae</i>	分离株	1
41	产气肠杆菌	<i>Enterobacter aerogenes</i>	分离株	1
42	腊样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	分离株	1
43	产气荚膜梭菌	<i>Clostridium perfringens</i>	分离株	1
44	绿脓杆菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	分离株	1

2 结果与分析

2.1 特异性试验结果

取表 1 中所列的 59 株参考菌株的基因组 DNA 进行 PCR-DHPLC 检测, 检测结果: 仅阪崎肠杆菌出现扩增吸收峰, 结果为阳性; 普通变形杆菌、奇异变形杆菌、金黄色葡萄球菌、福氏志贺氏菌、弗劳地柠檬酸杆菌未出现相应的扩增吸收峰, 结果均为阴性。如图 1 所示(仅示意了部分菌种的图谱)。

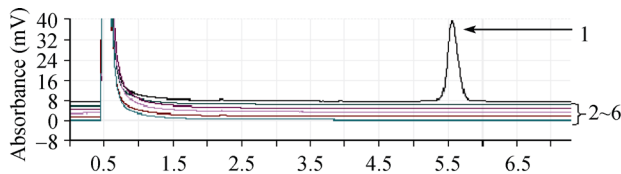


图 1 阪崎肠杆菌特异性检测的 DHPLC 吸收峰图谱

Fig. 1 DHPLC map of specificity detection of *Enterobacter sakazakii*

注: 1: 阪崎肠杆菌; 2: 普通变形杆菌; 3: 奇异变形杆菌; 4: 金黄色葡萄球菌; 5: 福氏志贺氏菌; 6: 弗劳地柠檬酸杆菌

Note: 1: *Enterobacter sakazakii*; 2: *Proteus vulgaris*; 3: *Proteus mirabilis*; 4: *Staphylococcus aureus*; 5: *Shigella flexneri*; 6: *Citrobacter freundii*

上述结果表明: 本试验设计的适合于 PCR-DHPLC 检测的引物可以特异性扩增检测阪崎肠杆菌中 16S-23S rRNA 基因, 具有很好的阪崎肠杆菌鉴定特异性。

2.2 重现性试验结果

取从样品中分离出的 7 株阪崎肠杆菌分离株的 DNA, 进行 PCR-DHPLC 的重现性试验, 结果如图 2 所示。

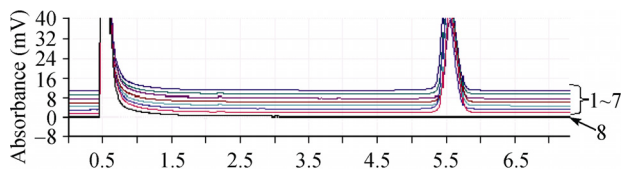


图 2 阪崎肠杆菌重现性检测的图谱

Fig. 2 DHPLC map of reproducible detection of *Enterobacter sakazakii*

注: 1~7: 阪崎肠杆菌 7 株分离株; 8: 大肠杆菌

Note: 1~7: 7 Isolateions of *Enterobacter sakazakii*; 8: *E. coli*

由图 2 可见, 7 株阪崎肠杆菌分离株均出现扩增吸收峰, 且出峰时间和峰型重现性较好, 阴性对照大肠杆菌的检测结果为阴性。

结果表明, 本研究建立的 PCR-DHPLC 检测阪崎肠杆菌的方法, 具有很好的重现性。

2.3 灵敏度试验结果

取阪崎肠杆菌标准菌株 36°C 培养 24 h, 按 1.3.6 所述的灵敏度试验方法进行平板计数, 同时提取制备模板 DNA 进行 PCR-DHPLC 检测, 结果见表 2。

表 2 阪崎肠杆菌标准菌株平板计数与 PCR-DHPLC 检测结果的比较

Table 2 *Enterobacter sakazakii* results comparison of standard strain plate count and PCR-DHPLC

稀释梯度 a Dilution gradient a	平板计数结果 b(CFU/mL) Plate counting results b(CFU/mL)	PCR-DHPLC 检测结果 Test results with PCR-DHPLC
1	∞	+
2	∞	+
3	∞	+
4	23100	+
5	2400	+
6	210	+
7	25	+
8	2	-

注: a: 8 个梯度之间的稀释倍数为 10 倍; b: 平板计数结果为两个平行平板计数结果的平均值

Note: a: Dilution times among 8 Dilution gradients is 10; b: Plate counting results is the average of two Plate counting results

试验结果表明, 本研究所建立的方法可检出阪崎肠杆菌标准菌株的 10^{-7} 浓度梯度, 即检测灵敏度可达到 25 CFU/mL。

2.4 验证试验与应用

用本文建立的 PCR-DHPLC 方法筛选检测 670 份检验样品, 有 7 株阪崎肠杆菌分离菌株为阳性, 与 PCR 法、实时荧光 PCR 法筛选检测的结果一致, 采用培养鉴定方法鉴定这 7 株菌, 结果均为阪崎肠杆菌阳性。

上述结果表明, PCR-DHPLC 方法准确度为 100%, 显示该方法具有较好的适用性。4 种方法的验证比较结果见表 3。

3 讨论

目前国内外食源性致病菌快速检测方法很多, 如: 经典的培养生化鉴定法^[6,7]、PCR-凝胶电泳法^[4,8]、实时荧光 PCR 法^[4,9]、BAX 全自动 PCR 法^[4]、Riboprinter 基因指纹图谱分析法^[10]等, 尽管检测方法很多, 但各种方法都存在各自的优势和缺陷。PCR 凝胶电泳法快捷、成本低, 但繁琐, 灵敏度相对较

表 3 4 种方法验证检测的比较结果
Table 3 Results comparison of 4 verification testing

检测方法 Detection Method	培养鉴定法 Identification of training	PCR 法 PCR	实时荧光 PCR 法 Real-time PCR	PCR-DHPLC 法 PCR-DHPLC
样品数量(份) The number of samples (-)	670	670	670	670
阳性结果(株) Positive results	7	7	7	7
阳性率(%) The positive rate (%)	1.0	1.0	1.0	1.0
假阳性率(%) False positive rate (%)	0	0	0	0

低,且电泳检测步骤是极大的污染源;实时荧光 PCR 技术具有特异性强,灵敏度高等优势,但却存在着检测成本较高,荧光探针保存时间较短等不足^[4,9]; Riboprinter 基因指纹图谱分析法所使用的检测试剂盒非常昂贵^[10]。而常规的细菌培养、生化鉴定是一项既耗时又复杂的工作,由于细菌的生化特征相对的不稳定,给细菌的鉴定带来了很大的困难和不确定性,易发生漏检现象。由于传统方法和其他快速检测方法的局限性,微生物学检测工作者都不断地致力于建立简便、快捷、低廉的检测分析方法。

DHPLC 又称核苷酸片段分析系统,采用高压闭合液相流路,利用离子对反相液相色谱技术进行核酸片段的分离和分析。试验过程中调整乙腈的浓度,能够使核酸片段按分子量大小顺序被依次洗脱出来。根据病原菌的特有基因序列,设计 PCR 引物,进行扩增,结合 DHPLC 技术可分离核酸片段的特点,可达到快速、高通量检测食源性致病菌的目的。此外,本研究发现,PCR 引物、PCR 反应条件、检测时柱温的选择、洗脱液、DNA 聚合酶等都可对 DHPLC 的分辨力产生影响,是试验中不可忽视的重要因素。

本文建立的阪崎肠杆菌 PCR-DHPLC 检测方法具有稳定、特异、灵敏、快捷的特点,完全适用于对乳及乳制品中阪崎肠杆菌的快速检测。

参 考 文 献

- [1] Nazarowec-White M, Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: a review. *Food Microbiol*, 1997, 34: 103-113.
- [2] Willis J, Robinson JE. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediatr Infect Dis*, 1988, 7: 196-199.
- [3] Mullane NR, Murray J, Drudy D, et al. Detection of *Enterobacter sakazakii* in dried infant milk formula by Cationic-Magnetic-Bead capture. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(9): 6325-6330.
- [4] 曹际娟. 食品微生物学与现代检测技术. 沈阳: 辽宁师范大学出版社, 2006, pp.237-244.
- [5] 袁 飞, 徐宝梁, 任发政, 等. 奶粉中阪崎肠杆菌的风险评估. *食品科学*, 2005, 26(11): 33-35.
- [6] 赵林立, 刘 虹, 王海艳, 等. 婴幼儿配方奶粉中阪崎肠杆菌检测分析. *中国公共卫生*, 22(增刊): 49-50.
- [7] 罗茂凰, 高旗利, 张海英, 等. 奶粉中阪崎肠杆菌的检验方法 第 1 部分: 分离和计数方法. SN/T 1632.1-2005.
- [8] 高旗利, 罗茂凰, 张海英, 等. 奶粉中阪崎肠杆菌的检验方法 第 2 部分: PCR 方法. SN/T 1632.2-2005.
- [9] 吕敬章, 赵贵明, 肖性龙, 等. 奶粉中阪崎肠杆菌的检验方法 第 3 部分: 荧光 PCR 方法. SN/T 1632.3-2005.
- [10] 杨捷琳, 顾 鸣, 韩 伟, 等. 奶及奶制品中阪崎肠杆菌株的检测分析. *中国公共卫生*, 2006, 22(增刊): 103-104.