

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2018.01.012

文章编号:2095-6002(2018)01-0089-06

引用格式:刘立兵,南汇珠,孙晓霞,等.食品中蜡样芽胞杆菌实时荧光RPA检测方法的建立与应用[J].食品科学技术学报,2018,36(1):89-94.



LIU Libing, NAN Huizhu, SUN Xiaoxia, et al. Development and application of real-time recombinase polymerase amplification assay for detection of *Bacillus cereus* in food[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018,36(1):89-94.

食品中蜡样芽胞杆菌实时荧光 RPA 检测方法 的建立与应用

刘立兵^{1,2}, 南汇珠¹, 孙晓霞^{1,2}, 姜彦芬¹, 王金凤¹, 王建昌^{1,2,*}

(1. 河北出入境检验检疫局技术中心, 河北 石家庄 050051;

2. 河北省检验检疫科学技术研究院, 河北 石家庄 050051)

摘要:为实现简便快速地检测蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*),根据 GenBank 中蜡样芽胞杆菌 16S RNA 序列设计特异性引物和 *exo* 探针,建立了一种实时荧光重组酶聚合酶扩增方法,在 39 ℃ 恒温下仅需 20 min 即可完成检测。该方法特异性扩增蜡样芽胞杆菌 16S RNA 基因片段,对其他芽胞杆菌和非芽胞杆菌无扩增;以蜡样芽胞杆菌基因组 DNA 作为模板,该方法的检测灵敏度为 1.0×10^{-3} ng/ μ L,同已发表的 real-time PCR 方法一致。人工污染实验表明,当大米饭中蜡样芽胞杆菌污染量 $\geq 1.5 \times 10^4$ CFU/g 时,即可通过 real-time RPA 方法检出,所需时间仅为 6 ~ 13 min;而当污染量 $\geq 1.5 \times 10^5$ CFU/g 时,才能通过 real-time PCR 方法检出,所需时间至少为 30 min (Ct 值为 20 ~ 31)。

关键词:蜡样芽胞杆菌;等温扩增;实时荧光 RPA;检测方法

中图分类号: TS207.4; R155.5; Q93-3

文献标志码: A

蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)是革兰氏阳性兼性厌氧菌,是食品污染常见的致病菌之一^[1],具有代谢通路多样化、营养需求低的特点^[2-3]。人体感染后临床症状有恶心、呕吐、腹痛以及腹泻等^[4],食物中毒的发病率高达 60% ~ 100%^[5]。探索简便、快速、高灵敏性的检测方法是该菌研究的重点。

蜡样芽胞杆菌传统的检测方法操作过程繁琐,检测周期长,需要经验丰富的操作人员。张志鸿等^[6]建立 real-time PCR 方法检测食品中的产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌,周巍等^[7]通过环介导等温扩增技术(LAMP)对酸乳中的蜡样芽胞杆菌进行检测,贾雅菁等^[8]在 LAMP 反应体系中加入荧光

染料,实现了对蜡样芽胞杆菌的定性荧光监测;但上述方法都不能满足简单、快速的检测特点。重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)因其操作简单、反应快速、不需要昂贵的设备等优势,在医疗诊断、转基因食品和动物疫病检测中受到广泛关注^[9]。RPA 技术主要依赖于重组酶、单链结合蛋白和具有链置换活性的 DNA 聚合酶在恒温条件下(25 ~ 42 ℃)进行,而实时荧光重组酶聚合酶扩增(real-time recombinase polymerase amplification, real-time RPA)技术将 RPA 基础反应与荧光探针结合,具备了实时监测扩增进程的优势,灵敏度和特异性也进一步提高,已被广泛运用于细菌、病毒及寄生虫的检测^[10]。但截

收稿日期:2017-09-13

基金项目:国家质量监督检验检疫总局科研项目(2016IK107)。

作者简介:刘立兵,男,中级兽医师,硕士,主要从事食源性微生物、动物疫病分子生物学方面的研究;

*王建昌,男,高级兽医师,博士,主要从事食源性微生物、动物疫病分子生物学方面的研究,通信作者。

至目前利用该方法检测蜡样芽胞杆菌的研究未见报道。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与设备

甘露醇卵黄多粘菌素琼脂(MYP)、营养肉汤,购自北京陆桥技术股份有限责任公司;细菌基因组DNA提取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公

司;Premix Ex Taq,购自宝生物工程(大连)有限公司;RAA试剂盒(荧光型),购自浙江泰晶生物科技有限公司。

Genie III型等温扩增荧光检测系统,英国 Opti-Gene 公司;ABI7500 型实时荧光 PCR 仪,美国 ABI 公司;NanoDrop 2000C 型超微量分光光度计,美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 实验菌株

实验所用的菌株见表 1。

表 1 实验菌株
Tab. 1 Bacterial strains used in study

序号	菌种名称	来源	real-time RPA 检测结果
1	蜡样芽胞杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	CICC63301	+
2	蜡样芽胞杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	ATCC14579	+
3	蜡样芽胞杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	本实验室分离	+
4	蜡样芽胞杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	本实验室分离	+
5	地衣芽胞杆菌(<i>Bacillus licheniformis</i>)	本实验室分离	-
6	球形芽胞杆菌(<i>Bacillus sphaericus</i>)	本实验室分离	-
7	栗褐芽胞杆菌(<i>Bacillus badius</i>)	本实验室分离	-
8	解淀粉芽胞杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	本实验室分离	-
9	枯草芽胞杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	本实验室分离	-
10	福氏志贺氏菌(<i>Shigella flexneri</i>)	CICC21678	-
11	宋内氏志贺氏菌(<i>Shigella sonnei</i>)	CICC21679	-
12	痢疾志贺氏菌(<i>Shigella dysenteriae</i>)	CMCC51105	-
13	鲍氏志贺氏菌(<i>Shigella boydii</i>)	CICC21680	-
14	单核细胞增生李斯特氏菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC19114	-
15	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	CICC21600	-
16	鼠伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella</i>)	CICC22956	-
17	空肠弯曲菌(<i>Campylobacter jejuni</i>)	ATCC33291	-
18	大肠埃希氏菌 O157:H7(<i>Escherichia coli</i> O157:H7)	CICC21530	-
19	阪崎肠杆菌(<i>Enterobacter sakazakii</i>)	ATCC29544	-
20	副溶血弧菌(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	CICC21617	-
21	乙型溶血性链球菌(<i>Streptococcus hemolytic-β</i>)	CMCC10373	-
22	肺炎克雷伯(<i>Klebsiella pneumonia</i>)	本实验室分离	-
23	粪肠球菌(<i>Enterococcus faecalis</i>)	本实验室分离	-
24	恶臭假单胞菌(<i>Pseudomonas putida</i>)	本实验室分离	-
25	弗氏柠檬酸杆菌(<i>Citrobacter freundii</i>)	本实验室分离	-
26	溶血性曼氏杆菌(<i>Mannheimia haemolytica</i>)	本实验室分离	-
27	绿脓杆菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	本实验室分离	-
28	阴沟肠杆菌(<i>Enterobacter cloacae</i>)	本实验室分离	-

+, 阳性; -, 阴性。

1.3 细菌基因组 DNA 的提取

将蜡样芽胞杆菌(CICC63301)纯培养菌接种于 10 mL 营养肉汤中,37 ℃ 培养 16 h。取 1 mL 菌液 10 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,将菌体沉淀按照细菌 DNA 提取试剂盒方法提取细菌基因组 DNA,立即使用或 -20 ℃ 保存备用。同时使用 NanoDrop 2000C 型超微量分光光度计测定核酸浓度。

1.4 引物探针设计

参考 GenBank 中蜡样芽胞杆菌 16S RNA 基因序列(登录号:KY224970.1),选择保守区域,设计 real-time RPA 引物及 exo 探针,目的片段大小为 297 bp。用于蜡样芽胞杆菌检测的 real-time PCR 引物及探针参照文献[11]中相关序列(表 2),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 2 实验所用引物及探针
Tab.2 Primers and probes used in real-time RPA and real-time PCR

方法	引物名称	序列(5'-3')	长度/bp
real-time RPA	RPA-F	ATACCTGCTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG	297
	RPA-R	CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCA	
	exo probe	CTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGC(FAM-dT)(THF) AAG(BHQ1-dT)TAACGCATTAAGC-C3 spacer	
real-time PCR	PCR-F	GCGGCGTGCCTAATACATGC	269
	PCR-R	CTCAGGTCGGCTACGCATCG	
	PCR-probe	FAM-TCGAGCGAATGCGATTAAGAGCTTGC-BHQ1	

1.5 Real-time RPA 方法的建立

使用 RAA 试剂盒(荧光型)配制单个反应体系,其中 10 μmol/L 的 RPA-F 和 RPA-R 各 2 μL(终浓度 0.4 μmol/L),10 μmol/L exo probe 0.6 μL(终浓度 0.12 μmol/L),A buffer 12.5 μL,模板 1 μL,ddH₂O 29.4 μL。将上述 47.5 μL 溶液混匀后加入到装有冻干酶制剂的反应管中,用移液器上下吹打至完全溶解,向反应管中加入 2.5 μL B buffer(280 mmol/L MgAc),瞬时离心并涡旋后放入 Genie III 中 39 ℃ 反应 20 min。

1.6 Real-time PCR 方法

用于蜡样芽胞杆菌检测的 real-time PCR 反应按照文献[10]进行,反应体系为 25 μL。其中 Premix Ex Taq 12.5 μL,10 μmol/L PCR-F 和 PCR-R 各 1.5 μL(终浓度 0.6 μmol/L),5 μmol/L PCR-probe 1 μL(终浓度 0.2 μmol/L),模板 1 μL,ddH₂O 7.5 μL。将上述体系充分混匀后放入 ABI 7500 型实时荧光 PCR 仪中,反应程序设置为 95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 延伸 35 s,35 个循环,60 ℃ 收集荧光信号。

1.7 特异性和灵敏性实验

以表 1 中所示菌株的基因组 DNA 作为模板进行 real-time RPA 反应,确定是否出现特异性扩增曲线。将蜡样芽胞杆菌基因组 DNA 使用 ddH₂O 进行 10 倍梯度稀释,以不同稀释度的 DNA 作为模板进

行 real-time RPA 反应,确定该方法的灵敏性。同时与已建立的 real-time PCR 方法的灵敏性进行比较。

1.8 人工污染样品检测

蜡样芽胞杆菌(CICC63301)经过纯培养后,用生理盐水稀释至浓度约为 1.1 麦氏浊度,进行 10 倍梯度稀释。将不同稀释度的菌液 1 mL 分别添加到 25 g 大米饭样品中(样品预先按照 GB 4789.14—2014 检测,未检出蜡样芽胞杆菌),再添加到 225 mL PBS 中,用拍击式均质器连续均质 1~2 min,分别取 1 mL 模拟样品,采用稀释平板法,测定其活菌添加范围为 1.5 × 10² ~ 1.5 × 10⁷ CFU/g,同时从中各取 1 mL 模拟样品参照 1.3 进行细菌 DNA 的提取,取 1 μL 作为模板进行检测。

2 实验结果

2.1 特异性实验分析

对蜡样芽胞杆菌和其他细菌基因组 DNA(浓度均为 100 ng/μL)作为模板进行 real-time RPA 检测,结果表明仅蜡样芽胞杆菌呈现典型的扩增曲线,为阳性结果,而其他芽胞杆菌和非芽胞杆菌细菌均未出现扩增曲线(表 1)。表明该方法具有良好的特异性。

2.2 灵敏性实验分析

将浓度为 100 ng/μL 的蜡样芽胞杆菌基因组

DNA 进行 10 倍梯度稀释,连续稀释 8 个梯度后,取每个梯度的核酸进行 real-time RPA 和 real-time PCR 检测,结果表明,real-time RPA 的检测限为 1.0×10^{-3}

ng/ μ L(图 1a),同 real-time PCR 方法检测限一致(图 1b)。

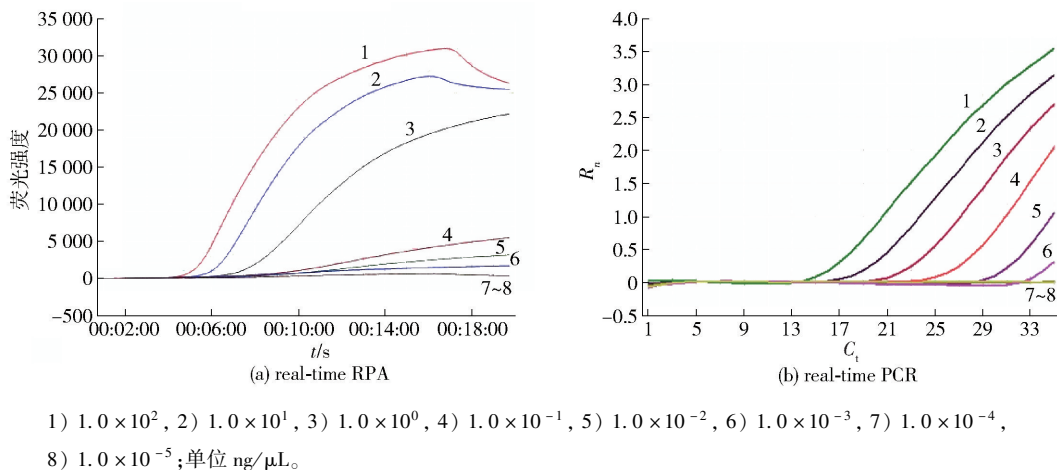


图 1 蜡样芽胞杆菌灵敏性实验结果

Fig. 1 Sensitivity of real-time RPA and real-time PCR for *Bacillus cereus*

2.3 人工污染样品的检测分析

人工污染蜡样芽胞杆菌的大米饭的检测结果表明,当污染量 $\geq 1.5 \times 10^4$ CFU/g 时,real-time RPA 即可检出大米饭中蜡样芽胞杆菌,所需要时间仅为 6 ~ 13 min;当污染量 $\geq 1.5 \times 10^5$ CFU/g,real-time PCR 方可检出大米饭中蜡样芽胞杆菌,所需时间在 30 min 以上(C_t 值为 20 ~ 31)。结果说明,在检测人工污染样品时 real-time RPA 的灵敏性高于 real-time PCR,同时前者所需时间明显少于后者(表 3)。

胞杆菌的 real-time RPA 快速检测方法,即 39 $^{\circ}$ C 恒温反应 20 min 实现对蜡样芽胞杆菌的有效扩增。方法特异性良好,灵敏性可达到 1.0×10^{-3} ng/ μ L,与 real-time PCR 检测方法一致。对人工污染的大米饭,real-time RPA 在反应时间上明显少于 real-time PCR 方法。该方法操作简单、反应快速,为食品中蜡样芽胞杆菌污染的现场快速检测提供了一种新的检测方法。

目前已报道的蜡样芽胞杆菌检测方法有分离培养法、普通 PCR、多重 PCR、荧光 PCR、LAMP 及基因芯片等^[12-14],但是分离培养法和基因芯片技术操作繁琐,检测时间相对较长;PCR 技术不仅对环境要求高,而且需要昂贵的 PCR 仪器和熟练的技术人员。上述方法在突发食物中毒等公共卫生事件中的应用有诸多不便^[15-16]。研究建立的 real-time RPA 方法与 real-time PCR 相比,具有操作简便、反应时间短的优点,同时使用的 OptiGene III 等温扩增荧光检测系统紧凑小巧,轻便耐用,仅为 1.75 kg 左右,触摸屏操作,无需连接电脑,其内置长航时锂电池,可在无电源环境中全天户外工作,可实现便携式的致病菌现场快速检测。虽然 LAMP 和 real-time RPA 均属于等温检测方法,但 LAMP 反应温度较高(> 60 $^{\circ}$ C),反应时间一般在 45 ~ 60 min^[7],并且实验设计复杂,需要设计 4 ~ 6 条引物;而 real-time RPA 扩增在常温下(25 ~ 42 $^{\circ}$ C)即可实现,且一般在 20 min 内即可完成,实验设计简单,仅需要 2 条引物和 1 条探针,并且 RPA 试剂为冻干粉形式,可实现常温下

表 3 蜡样芽胞杆菌人工污染样品检测结果

Tab. 3 *Bacillus cereus* detection results of artificial contamination samples

污染量/ (CFU·g ⁻¹)	t(增菌)/h	t(real-time RPA)/min	C _t (real-time PCR)
1.5×10^7	0	5.75	20.29
1.5×10^6	0	7.98	26.49
1.5×10^5	0	11.12	30.94
1.5×10^4	0	12.20	—
1.5×10^3	0	—	—
1.5×10^2	0	—	—

—:未检出。

3 讨论与结论

研究选取蜡样芽胞杆菌的 16S RNA 基因保守序列设计特异性引物和探针,建立了食品中蜡样芽

运输,从而为蜡样芽胞杆菌的现场快速检测提供了有价值的参考方法。

研究中 real-time RPA 方法的建立,结合细菌核酸的快速提取,可以达到现场快速检测的目的,为食品加工质量控制及食源性疫病等公共卫生事件中蜡样芽胞杆菌的检测提供了可借鉴的技术手段。

参考文献:

- [1] 程池. 食源性致病菌快速分子学检测方法探讨[J]. 食品安全导刊,2011(9):28-29.
CHENG C. Discuss rapid molecular detection of food-borne pathogenic *Bacteria*[J]. China Food Safety Magazine, 2011(9):28-29.
- [2] GUINEBRETIÈRE M H, THOMPSON F L, SOROKIN A, et al. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(4):851-865.
- [3] JENSEN G B. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(8):631-640.
- [4] MA Z, LI C, SU H. Dark bio-hydrogen fermentation by an immobilized mixed culture of *Bacillus cereus* and *Brevibacterium najaensis* [J]. Renewable Energy, 2017,105:458-464.
- [5] 谢来球,瞿丽开. 136例蜡样芽胞杆菌食物中毒案例分析[J]. 食品安全导刊,2017(6):31.
XIE L Q, QU L K. Analysis of food poisoning of 136 cases of *Bacillus*[J]. China Food Safety Magazine, 2017(6):31.
- [6] 张志鸿,王力均,甘蓓,等. 基于 QPCR 快速检测米饭中产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(2):100-104.
ZHANG Z H, WANG L J, GAN B, et al. Study on rapid detection of emetic *Bacillus cereus* by QPCR[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 29(2):100-104.
- [7] 周巍,张薇,刘亮,等. 环介导等温扩增技术检测酸乳中蜡样芽胞杆菌[J]. 乳业科学与技术, 2013, 36(5):29-31.
ZHOU W, ZHANG W, LIU L, et al. Detection of *Bacillus cereus* in yogurt by loop-mediated isothermal amplification assay[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2013, 36(5):29-31.
- [8] 贾雅菁,付博宇,王羽,等. 实时荧光环介导等温扩增技术检测牛乳中的蜡样芽胞杆菌[J]. 食品科学, 2016,37(6):184-189.
JIA Y J, FU B Y, WANG Y, et al. Detection of *Bacillus cereus* in milk by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification method [J]. Food Science, 2016,37(6):184-189.
- [9] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. Plos Biology, 2006,4(7):204.
- [10] 景志刚,董浩,狄栋栋,等. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J]. 生物技术通报,2016,32(6):47-53.
JING Z G, DONG H, DI D D, et al. Research progress on recombinase polymerase amplification[J]. Biotechnology bulletin, 2016,32(6):47-53.
- [11] REEKMANS R, STEVENS P, VERVUST T, et al. An alternative real-time PCR method to detect the *Bacillus cereus* group in naturally contaminated food gelatine: a comparison study[J]. Letters in Applied Microbiology, 2009,48(1):97.
- [12] PEDRERO M, CAMPUZANO S, PINGARRÓN J M. Electroanalytical sensors and devices for multiplexed detection of foodborne pathogen microorganisms [J]. Sensors, 2009(7):5503-5520.
- [13] 季秀玲,魏云林,杨琳琳,等. 荧光原位杂交检测蜡样芽胞杆菌与枯草芽胞杆菌的方法:CN 102605084 B [P]. 2014-07-02.
- [14] 王炜,江晓,金萍,等. PCR 快速检测在细菌质控考核盲样鉴定中的应用[J]. 中国医学创新,2017(4):44-48.
WANG W, JIANG X, JIN P, et al. Application of PCR in the multi-blind quality control projects [J]. The Manuscript Editing Center, 2017(4):44-48.
- [15] DAHER R K, STEWART G, BOISSINOT M, et al. Influence of sequence mismatches on the specificity of recombinase polymerase amplification technology [J]. Molecular and Cellular Probes, 2015,29(2):116.
- [16] KERSTING S, RAUSCH V, BIER F F, et al. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens[J]. Microchimica Acta, 2014, 181(13):1715-1723.

Development and Application of Real-Time Recombinase Polymerase Amplification Assay for Detection of *Bacillus cereus* in Food

LIU Libing^{1,2}, NAN Huizhu¹, SUN Xiaoxia^{1,2}, JIANG Yanfen¹, WANG Jinfeng¹, WANG Jianchang^{1,2,*}

(1. Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Technical Center, Shijiazhuang 050051, China;

2. Hebei Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: The study established a simple and rapid method for the determination of *Bacillus cereus*. According to the 16S RNA gene sequences of *Bacillus cereus* available in Genbank, specific primers and exo probe were designed for establishing real-time recombinase polymerase amplification (real-time RPA). The RPA reaction was performed successfully at 39 °C and the results were obtained within 20 min. This method could specifically detect *Bacillus cereus*, but could not detect other bacteria. The study showed that the detection limit of real-time RPA was 1.0×10^{-3} ng/ μ L with genomic DNA of *Bacillus cereus*, which was the same as the real-time PCR method. *Bacillus cereus* in artificially contaminated rice samples with a bacterial concentration of 1.5×10^4 CFU/g could be detected after 6 – 13 min by real-time RPA; when the bacterial concentration was 1.5×10^5 CFU/g, the *Bacillus cereus* could be detected at least 30 min by real-time PCR (the Ct value was between 20 and 31).

Keywords: *Bacillus cereus*; isothermal amplification; real-time RPA; detection method

(责任编辑:张逸群)

(上接第 78 页)

Comparison of rDNA ITS Sequence and Carbon Metabolic Fingerprinting of Four *Alternaria* Nees Isolated from Fruits

REN Xiangfeng, YAO Ting, ZHANG Meng, ZHANG Yan, WANG Yousheng*

(Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Four fungi, strain 231[#], 320[#], 322[#], and 333[#] were isolated from infected jujube, sweet cherry, apricot, and blueberry fruit. All the fungal pathogens were identified as *Alternaria* Nees by morphological characterization. Analysis of rDNA ITS sequence showed that strain 320[#] and 322[#] were both closely related to *A. alternata* (AY625056.1). In contrast, strain 231[#] and 333[#] showed close phylogenetic relationship with *A. tenuissima* (KP324980.1). The biolog microbial identification system with FF MicroPlate was applied in the 95 carbon and nitrogen sources utilization tests, and the carbon metabolic fingerprinting showed that four strains have 86 carbon sources in common, including 78 optimal carbon sources and 8 unavailable carbon sources. Moreover, strain 231[#] was closely related to *A. alternata* (Fr.) Keissl. There were some difference between rDNA ITS sequence and carbon metabolic profiling of four strains.

Keywords: fruit; *Alternaria* Nees; rDNA ITS sequence analysis; carbon metabolic fingerprinting

(责任编辑:李 宁)