

纯,加入硝酸镁溶液的量要准,和样品充分混匀,水浴 90 ℃ 蒸干。氧化镁粉末要细,称量要准,误差控制在 0.01 g 以内,覆盖要均匀,这些可以降低试剂空白值,保证较好的平行试验效果。②炭化前最好在 260 ℃ 电热板上先烤干水分再炭化,可防止炭化时样品起泡、飞溅,减少样品损失。

综上所述,湿消解法具有灵活调节消解温度,消解酸种类、用量和消解时间等优点,可适用于大部分食品样品的前处理;微波消解法处理食品样品时耗费时间短,但最高消解温度有限,酸用量大,适合砷存在形态相对简单的样品;干灰化法处理食品样品时耗费时间较长,适用于挥发温度高、油脂含量高、砷存在形态比较复杂的样品。对于前处理比较理想的样品,氢化物发生原子荧光光谱法具有准确灵敏、简便高效的特点,适用于食品中总砷的测定。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.11—2003 食品中总砷和无机砷的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [2] 伍雨江,聂婵,万兴兰,等. 原子荧光法测定酱油中总砷的含量[J]. 农产品加工:学刊,2014(10):49-51.
- [3] 郭莹莹,翟毓秀,林洪,等. 海产品中砷化合物检测方法的研

- 究进展[J]. 水产科学,2008,27(12):674-679.
- [4] 徐虹,张春玲,宋寅生,等. 原子荧光法测定海产品中总砷前处理方法的研究[J]. 江苏预防医学,2010,21(6):51-52.
- [5] 宋洪强,郝云彬,吴益春,等. 原子荧光光度法中湿法消解、微波消解、干灰化前处理法测定水产品中总砷含量的比较[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版,2010,29(4):367-372.
- [6] 刘明钟,汤志勇,刘雯欣. 原子荧光光谱分析[M]. 北京:化学工业出版社,2008.
- [7] 屈明华,汤富彬,倪张林. 原子荧光法测定食品总砷的前处理方法探讨[J]. 食品科学,2013,34(10):177-179.
- [8] 吴艳,帅文林,陈大志. 不同前处理条件对水产品中总砷含量的影响[J]. 广州化工,2010,38(8):206-207.
- [9] 马国军. 不同前处理对原子荧光法测定海产品总砷的影响[J]. 中国食品添加剂,2013(3):238-241.
- [10] 王正,张妮娜,李敏,等. 氢化物发生-原子荧光光度法测定保健食品袋泡茶中的总砷[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(11):2650-2653.
- [11] 刘敏敏,陈俏. 不同消化方法对氢化物发生-原子荧光法测定鱼粉中总砷的影响[J]. 中国卫生检验杂志,2013,23(4):1041-1042.
- [12] 陈宇鸿,沈仁富. 微波消解-原子荧光光谱法测定发中砷[J]. 中国卫生检验杂志,2013,23(12):2586-2588.
- [13] 林磊. 虾粉中总砷测定方法的研究[J]. 江西食品工业,2011(2):30-32.
- [14] 卢俊荣. 原子荧光法测农产品中总砷的前处理方法探讨[J]. 商品与质量,2012(7):120-121.

实验技术与方法

实时荧光单引物等温扩增检测阪崎克罗诺杆菌方法的建立

李静,段永生,王建昌,孙晓霞,胡连霞

(河北出入境检验检疫局检验检疫技术中心,河北 石家庄 050051)

摘要:目的 建立实时荧光单引物等温扩增(SPIA)检测阪崎克罗诺杆菌的方法。方法 本文以阪崎克罗诺杆菌 *OmpA* 基因特异序列为靶序列,设计 RNA-DNA 组合引物和链终止序列,优化反应体系,对 4 株不同来源阪崎克罗诺杆菌和 21 株其他食源性致病菌进行实时荧光 SPIA 特异性分析,通过不同浓度梯度阪崎克罗诺杆菌菌悬液灵敏度的检测和添加有阪崎克罗诺杆菌的婴儿配方奶粉样品检出限的确定,评价方法的准确度。结果 除 4 株阪崎克罗诺杆菌外,其他细菌均未出现特异性荧光扩增曲线,具有良好的特异性。在 40 min 内,实时荧光 SPIA 检测阪崎克罗诺杆菌纯培养基基因拷贝灵敏度为每反应 1 copies,相应活菌数为 1.6×10^{-1} cfu/ml;对婴儿配方奶粉模拟样品中阪崎克罗诺杆菌的检出限是 1.5×10^0 cfu/100 g。结论 本研究建立的方法具有灵敏度高、特异性强、耗时短、操作简单等优点,适用于实验室快速检测阪崎克罗诺杆菌 *OmpA* 基因。

关键词:实时荧光;单引物;等温扩增;阪崎克罗诺杆菌;*OmpA* 基因;婴儿配方奶粉;食源性致病菌

中图分类号:R155;Q93-3 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-8456(2015)05-0524-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.05.009

收稿日期:2015-03-16

基金项目:质检公益性科研项目(201210128;201310126)

作者简介:李静 女 农艺师 研究方向为植物病原、食源性致病菌的分子生物学检测 E-mail:13603397511@163.com

通讯作者:胡连霞 女 副高级工程师 研究方向为微生物检验 E-mail:hulianxia168@tom.com

Establishment of the real-time fluorescence single primer isothermal amplification for the detection of *Cronobacter sakazakii*

LI Jing, DUAN Yong-sheng, WANG Jian-chang, SUN Xiao-xia, HU Lian-xia
(The Technical Center of Inspection and Quarantine, Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hebei Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: Objective Establishment of real time fluorescence single primer isothermal amplification method for detection of *Cronobacter sakazakii*. **Methods** Taking *Cronobacter sakazakii* *OmpA* gene specific sequence as the target sequence, the RNA-DNA combination primer and chain termination sequence was designed, and the reaction system was optimized. 4 different strains of *Cronobacter sakazakii* strains and 21 other foodborne pathogens were detected by the method, and the specificity of the real-time fluorescent SPIA was analyzed. The sensitivity was analyzed by different dilution of *Cronobacter sakazakii* and the detection limit was determined by spiked infant formula. **Results** Only *Cronobacter sakazakii* could be detected and showed the typical fluorescence curve. The method has good specificity. In 40 min, the sensitivity of real-time fluorescent SPIA for the detection of *Cronobacter sakazakii* in pure culture was 1 copies/reaction. The corresponding number of the living bacteria was 1.6×10^{-1} cfu/ml. The detection limit of *Cronobacter sakazakii* in infant formula is 1.5×10^0 cfu/100 g. **Conclusion** The method has the advantages of high sensitivity, strong specificity, less time-consuming.

Key words: Real-time fluorescence; single primer; isothermal amplification; *Cronobacter sakazakii*; *OmpA* gene; infant formula milk powder; foodborne pathogenic bacteria

阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 是克罗诺杆菌属的一种条件性致病菌, 以前属于肠杆菌属, 亦称阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*)^[1]。该菌可导致婴幼儿 (尤其是新生儿) 脑膜炎、小肠结肠炎和败血症, 甚至遗留神经系统后遗症或导致死亡, 死亡率高达 20% ~ 50%^[2]。尽管阪崎克罗诺杆菌可以从多种食品中检出, 但在新生儿感染该菌事件的调查中发现婴儿配方奶粉是主要的感染渠道^[3-4]。FAO/WHO 在 2004 年召开了两次国际相关会议, 倡导采用国际通用的分子生物学方法来检测阪崎克罗诺杆菌, 以弥补传统方法的局限性^[5]。

单引物等温扩增技术 (SPIA) 是近年报道的一种新型线性核酸等温扩增技术^[6]。该技术主要是通过一条 3'端是 DNA 片段、5'端是 RNA 片段的组合引物、RNase H 及具有强链置换活性的 DNA 聚合酶实现 DNA 的体外线性等温扩增。在扩增反应中, RNase H 不断降解引物与模板 DNA 所形成的 DNA/RNA 杂合链中 RNA 部分, 使未结合的引物能够不断获得结合位点并与模板结合进行链置换合成, 并在模板链末端或链终止序列 (Blocker) 结合处终止, 最终扩增出大量的具有高度忠实性 cDNA 单链^[7]。SPIA 技术具有操作设备简单、高忠实性、高效率和有效防污染等优点。美国的 NuGEN 公司已经开发出专门用于 RNA 扩增的 Ribo-SPIA 相关产品。Potash 等^[8]成功应用 Ribo-SPIA 技术从生物样品中扩增全基因组 cDNA 对重组病毒 EcoHIV 感染小鼠后感染应激基因表达情况进行研究。Whitworth 等^[9]在分析猪胚胎不同发育阶段基因表达差异时也应用了 Ribo-SPIA 技术进行

mRNA 的扩增和转录。

外膜蛋白 A (OmpA) 是革兰阴性菌的主要外膜蛋白之一, 其主要作用是维持外膜的完整。阪崎克罗诺杆菌外膜蛋白 A 基因 (*OmpA*), 具有高度保守性, 能够很好地将阪崎克罗诺杆菌与肠杆菌科其他属、种区分^[10-11]。本研究以阪崎克罗诺杆菌 *OmpA* 基因序列为靶序列, 设计 RNA-DNA 组合引物和链终止序列, 在单引物等温扩增技术的基础上加入荧光染料, 建立了实时荧光单引物等温扩增 (real-time fluorescence SPIA) 检测阪崎克罗诺杆菌的方法。通过实时荧光检测仪对荧光信号进行实时检测, 具有操作简单、耗时短、实时监控等优点。国内外目前关于 SPIA 方法的报道比较少, 实时荧光单引物等温扩增方法也未见到报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

本试验所用 4 株不同来源的阪崎克罗诺杆菌和 21 株非阪崎克罗诺杆菌分别购自美国典型微生物种保藏中心 (ATCC); 中国工业微生物种保藏管理中心 (CICC); 中国医学微生物菌种保藏管理中心 (CMCC)。具体信息见表 1。

1.1.2 主要仪器与试剂

GNM-C7-8 型实时荧光定量 PCR 仪 (北京金诺美生物技术有限公司)、Whatman T Gradient PCR 扩增仪 (德国 Biometra)、核酸蛋白分析仪 (德国 Eppendorf)。

表 1 试验用菌株

Table 1 Strains in this study

菌株名称	菌株编号
阪崎克罗诺杆菌(<i>Cronobacter sakazakii</i>)	ATCC 29544
阪崎克罗诺杆菌(<i>Cronobacter sakazakii</i>)	ATCC 51329
阪崎克罗诺杆菌(<i>Cronobacter sakazakii</i>)	ATCC 29004
阪崎克罗诺杆菌(<i>Cronobacter sakazakii</i>)	CICC 21548
单核细胞增生李斯特菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 19114
空肠弯曲杆菌(<i>Campylobacter jejuni</i>)	ATCC 33291
鼠伤寒沙门菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)	CICC 22956
大肠杆菌 O157:H7(<i>Escherichia coli</i> O157:H7)	CICC 21530
宋内志贺菌(<i>Shigella sonnei</i>)	CICC 21679
福氏志贺菌(<i>Shigella flexneri</i>)	CICC 21678
蜡样芽胞杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	CICC 10468
小肠结肠炎耶尔森菌(<i>Yersinia enterocolitica</i>)	CICC 21609
大肠埃希菌(<i>Escherichia coli</i>)	CMCC 44102
乙型溶血性链球菌(<i>Streptococcus hemolytic-β</i>)	CMCC 10373
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC 6538
嗜麦芽寡养单胞菌(<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)	ATCC 13637
地衣芽胞杆菌(<i>Bacillus licheniformis</i>)	ATCC 21424
恶臭假单胞菌(<i>Pseudomonas putida</i>)	ATCC 17485
河生肠杆菌生物群 2(<i>Enterobacter amnigenus</i> bigroup 2)	ATCC 51816
粘质沙雷菌(<i>Serratia marcescens</i>)	ATCC 14756
粪肠球菌(<i>Enterococcus faecalis</i>)	ATCC 29212
弗氏柠檬酸杆菌(<i>Citrobacter freundii</i>)	ATCC 10787
肺炎克雷伯杆菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	ATCC 4352
奇异变形杆菌(<i>Proteus mirabilis</i>)	ATCC 29906
雷氏普罗威登斯菌(<i>Providencia rettgeri</i>)	ATCC 29944

Bst DNA 聚合酶、RNase H 酶、RNA 酶抑制剂、MgCl₂、dNTPs、SYBER Green II 均购自上海生工生物工程有限公司,基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,营养琼脂、营养肉汤、缓冲蛋白胨均购自北京陆桥有限责任公司,试验中所用到的婴儿配方奶粉均购自当地超市。

1.2 方法

1.2.1 阪崎克罗诺杆菌的培养

取保藏的阪崎克罗诺杆菌(ATCC 29544)在营养琼脂培养基中进行斜面划线,恒温培养箱 37 °C 培养 12 h,传代培养 2 次。挑取传至第 3 代培养的单菌落接种至新鲜无菌的营养肉汤中,37 °C 振荡过夜培养。

1.2.2 阪崎克罗诺杆菌基因组 DNA 的提取

采用普通热裂解法、蛋白酶 K 法、饱和酚提取法和商业化试剂盒法对纯培养的阪崎克罗诺杆菌进行基因组 DNA 的提取,并测定浓度^[12-14]。

1.2.3 RNA/DNA 组合引物和 Blocker 的设计和合成

根据 GeneBank 中阪崎克罗诺杆菌 *OmpA* 基因(基因号:AY702093)已知序列,对其进行同源性分析,确定其保守序列,用 Primer premier 5.0 设计组合引物和相应链终止序列所设计组合引物 *Pbrn1* 和 *Blocker1* 均由大连 TAKARA 公司合成,见表 2。

表 2 实时荧光 SPIA 设计的引物

Table 2 Real-time fluorescence SPIA primer design

引物名称	序列 5'-3'	修饰
<i>Pbrn1</i>	GGUCCGACCACGAAAGCC	5'端 8 nt 碱基为 RNA 序列, 3'端 11 nt 碱基为 DNA 序列
<i>Blocker1</i>	CGACGACCACGACA	3'端用生物素修饰,中间随机加上两个 XNA 修饰

注:XNA,即 LNA,又称“锁核酸”(locked nucleic acid,LNA),是一种经过修饰的类寡核苷酸衍生物,包括 A,C,G,T,U,mC 6 种碱基

1.2.4 阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 反应体系和反应条件的建立

建立阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 检测 25 μl 反应体系,优化反应体系中 RNA/DNA 组合引物、链终止序列(Blocker)、Bst DNA 聚合酶、RNase H、dNTPs、MgCl₂、RNases 抑制剂(Inhibitor)和 SYBER Green II 的使用浓度,以期筛选出最佳的引物和 Blocker 组合,以及最佳的反应体系,从而建立阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 最佳检测方法。

将阪崎克罗诺杆菌基因组 DNA 模板、组合引物、Blocker 及反应缓冲液的混合液经 99 °C,90 s 处理后降温至 60 °C,迅速加入 RNase H 酶和 Bst DNA 聚合酶,在实时荧光定量 PCR 仪上 55 ~ 65 °C,反应 40 min(2 400 s)。反应过程中实时监测荧光信号,以期确定最佳反应温度,建立阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 检测方法。

1.2.5 阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 检测方法的特异性分析

取表 1 中 25 株过夜培养菌悬液 1 ml,用热裂解法提取基因组 DNA 作为模板,根据 1.2.4 中建立的最佳反应条件对所建立的实时荧光 SPIA 方法进行扩增特异性分析。

1.2.6 不同基因组 DNA 提取方法对实时荧光 SPIA 检测结果的影响

使用 1.2.2 中 4 种方法提取阪崎克罗诺杆菌基因组 DNA,并作为模板进行实时荧光 SPIA 检测,以分析不同方法提取的 DNA 对检测结果的影响。

1.2.7 阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 检测方法的灵敏性分析

挑取营养琼脂 37 °C 培养 12 h 的阪崎克罗诺杆菌单菌落,制备成一定浓度菌悬液。用生理盐水进行 10 倍系列稀释,采用稀释平板法,测定其纯培养物活菌数为 1.6 × 10⁹ cfu/ml;同时取 1 ml 纯培养物直接用热裂解法提取阪崎克罗诺杆菌基因组 DNA,测得 DNA 浓度为 5.0 × 10¹ ng/μl,换算成基因拷贝数为 1.0 × 10¹⁰ copies,用灭菌焦碳酸二乙酯水(DEPC H₂O)进行 10 倍系列稀释,进行 SPIA 灵敏性试验。

1.2.8 阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 检测方法在模拟样品中检出限分析

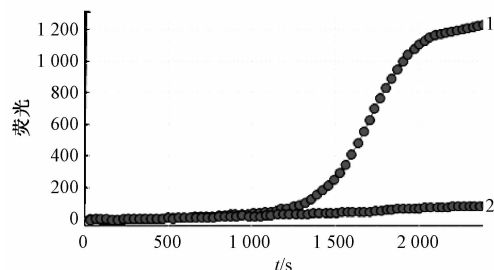
在婴儿配方奶粉中添加阪崎克罗诺杆菌作为模拟污染样品进行检出限分析。进行添加前,婴儿配方奶粉样品已按 GB 4789.40—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验》^[15]常规检验法证实阪崎克罗诺杆菌阴性。挑取营养琼脂上,37 °C 培养 12 h 的阪崎克罗诺杆菌单菌落,制备成一定浓度菌悬液,用生理盐水进行 10 倍系列稀释后,选取适当系列浓度菌悬液 1 ml 分别添加到婴儿配方奶粉溶液中(取 100 g 婴儿配方奶粉于 44 °C,900 ml 灭菌缓冲蛋白胍水中均质)。采用稀释平板法计数,确定添加模拟样品中活菌数为 $1.5 \times 10^{-2} \sim 1.5 \times 10^5$ cfu/100 g。

各取 1 ml 模拟样品,直接用热裂解法提取阪崎克罗诺杆菌基因组 DNA,并将获得的系列浓度 DNA 模板,用于检测限分析。本试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 反应体系和反应条件的建立

如图 1 所示,经过各种反应体系和条件的优化,设计合成的组合引物和 Blocker(*Pbrn1* + *Blocker1*)对阪崎克罗诺杆菌出现特异性扩增曲线,其最佳反应体系为:2.8 μmol/L RNA/DNA 组合引物、0.2 μmol/L Blocker、5.0 mmol/L Mg²⁺、1.0 mmol/L dNTPs、20 U



注:1 为阪崎克罗诺杆菌阳性对照;2 为 DEPC H₂O

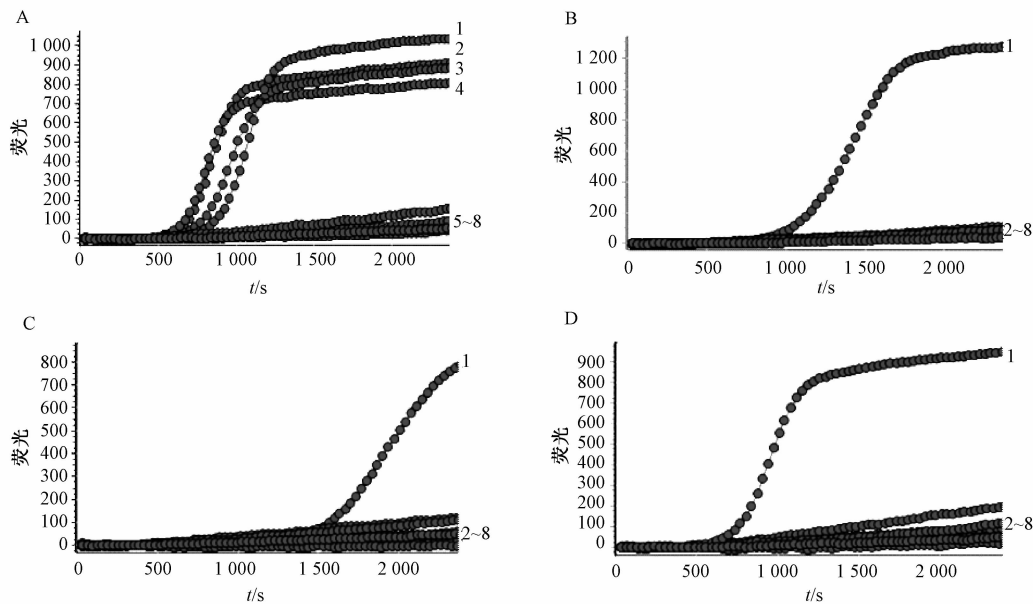
图 1 阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 组合引物 *Pbrn1* 和 *Blocker1* 扩增结果

Figure 1 Results of the real-time fluorescence SPIA with *Pbrn1* Primers and *Blocker1* for *Cronobacter sakazakii*

Bst DNA、2.5 U RNase H 酶、32 U RNase Inhibitor、SYBER Green II 用量为 0.3 μl(300 倍稀释),用灭菌 DEPC H₂O 补足体系;最佳反应条件为 55.0 °C,反应 40 min。

2.2 阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 检测方法的特异性分析

在实时荧光定量 PCR 仪上采用 *Pbrn1* + *Blocker1* 对 4 株阪崎克罗诺杆菌和 21 株食源性肠道细菌进行检测,阪崎克罗诺杆菌出现典型的荧光扩增曲线,其他细菌均未产生荧光扩增曲线。结果表明建立的实时荧光 SPIA 检测方法对阪崎克罗诺杆菌有很好的特异性,见图 2。



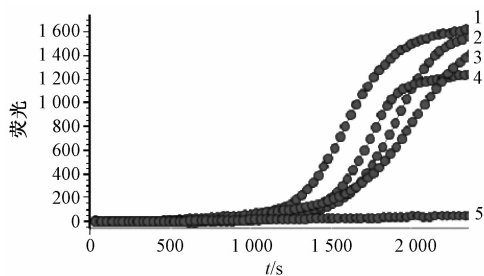
注:图 A 中 1~4 表示阪崎克罗诺杆菌(ATCC 29544、ATCC 51329、ATCC 29004、CICC 21548),5~7 表示单核细胞增生李斯特菌、空肠弯曲杆菌、鼠伤寒沙门菌,8 表示 DEPC H₂O;图 B 中 1 表示阪崎克罗诺杆菌(ATCC 29544),2~7 表示大肠杆菌 O157:H7、宋内志贺菌、福氏志贺菌、蜡样芽胞杆菌、小肠结肠炎耶尔森菌、乙型溶血性链球菌,8 表示 DEPC H₂O;图 C 中 1 表示阪崎克罗诺杆菌(ATCC 29544),2~7 表示大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、嗜麦芽寡养单胞菌、地衣芽胞杆菌、恶臭假单胞菌、河生肠杆菌生物群,8 表示 DEPC H₂O;图 D 中 1 表示阪崎克罗诺杆菌(ATCC29544),2~7 表示粘质沙雷菌、粪肠球菌、弗氏柠檬酸杆菌、肺炎克雷伯杆菌、奇异变形杆菌、雷氏普罗威登斯菌,8 表示 DEPC H₂O

图 2 阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 方法特异性检测结果

Figure 2 Specificity of the real-time fluorescence SPIA for *Cronobacter sakazakii*

2.3 不同模板 DNA 提取方法对实时荧光 SPIA 检测结果的影响

4种不同方法提取的阪崎克罗诺杆菌模板 DNA 用实时荧光 SPIA 方法检测的结果没有明显差异,均出现典型的扩增曲线。研究表明,可以选择经济、快捷又简便的普通热裂解法提取阪崎克罗诺杆菌 DNA 作为模板。普通热裂解法提取阪崎克罗诺杆菌的 DNA 有利于实时荧光 SPIA 扩增方法在基层的推广,见图 3。



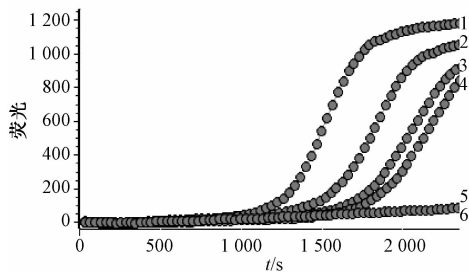
注:1. 商业化试剂盒法;2. 普通热裂解法;3. 蛋白酶 K 法;
4. 饱和酚提取法;5. DEPC H₂O

图 3 不同方法提取阪崎克罗诺杆菌模板 DNA 检测效果比较

Figure 3 Comparison of the detection results for *Cronobacter sakazakii* template DNA from four different extraction methods

2.4 阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 检测方法的灵敏性试验

如图 4 所示,当模板用量为 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^0$ copies 时,均出现典型的扩增曲线;当模板用量为 1.0×10^{-1} copies 时,则无扩增曲线。所以将建立的实时荧光 SPIA 检测方法对阪崎克罗诺杆菌的检测灵敏度确定为 1 copies,见图 3。



注:1 为阪崎克罗诺杆菌阳性对照;2 为 1.0×10^2 copies 的模板用量;3 为 1.0×10^1 copies 的模板用量;4 为 1.0×10^0 copies 的模板用量;5 为 1.0×10^{-1} copies 的模板用量;
6 为 DEPC H₂O

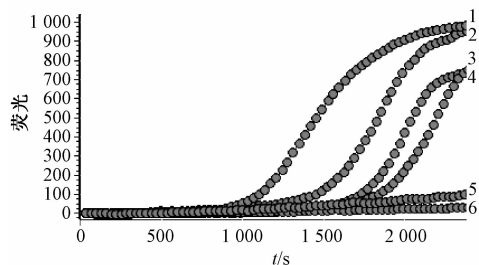
图 4 阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 检测方法灵敏性试验

Figure 4 Sensitivity of real-time fluorescence SPIA detection for *Cronobacter sakazakii*

2.5 阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 检测方法在模拟样品中的检出限试验

当模拟样品中细菌浓度为 1.5×10^0 cfu/100 g 时,反应出现典型的扩增曲线;当模拟样品中细菌

浓度为 1.5×10^{-1} cfu/100 g 时,则无扩增曲线。因此阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 检测方法在模拟样品中检出限为 1.5×10^0 cfu/100 g,见图 5。



注:1 为阪崎克罗诺杆菌阳性对照;2 表示细菌浓度为 1.5×10^2 cfu/100 g;3 表示细菌浓度为 1.5×10^1 cfu/100 g;
4 表示细菌浓度为 1.5×10^0 cfu/100 g;5 表示细菌浓度为 1.5×10^{-1} cfu/100 g;6 为 DEPC H₂O

图 5 阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 对模拟样品中阪崎克罗诺杆菌的检出限

Figure 5 Detection limit of real-time fluorescence SPIA for the *Cronobacter sakazakii* in simulated sample

3 讨论

根据引物长度及组成,本研究设计了 3 条阪崎克罗诺杆菌 SPIA 组合引物,经过筛选,确定当组合引物长度为 19 nt,其中 DNA 部分为 11 nt, RNA 部分为 8 nt 时,反应效果最好。在 Blocker 序列上进行“锁核酸”修饰,提高其 T_m 值,使 Blocker 增强与模板的结合力,同时 Blocker 3'-OH 经过小分子生物素阻塞,起到了有效终止扩增的作用。阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 检测方法的特异性决定于组合引物,同时其反应时间对于靶基因的检测亦非常重要。本研究中当阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 反应时间为 40 min 时,反应呈现良好的特异性,同时检测灵敏度最高,检出限最低;反应时间小于 40 min 时,检测的灵敏度相应降低,检出限相对提高;反应时间超过 40 min 时,则容易出现非特异性荧光扩增曲线。

阪崎克罗诺杆菌在极其微量的情况下都有致病性^[16],即使是婴儿配方奶粉中大肠菌群污染水平符合相应的微生物学标准,也可能存在阪崎克罗诺杆菌的污染^[5]。因此检测阪崎克罗诺杆菌的方法是否灵敏、特异及快速至关重要。目前对阪崎克罗诺杆菌的检测方法主要有 FDA 推荐的传统检测方法,免疫学方法和各种 PCR 方法。传统检测方法操作繁琐,检测时间长,而且灵敏度较低;免疫学方法的特异性和灵敏度均较低;PCR 方法敏感、准确、快速,可替代传统检测方法,但由于需要昂贵的仪器设备、繁琐的电泳过程以及对检测人员较高的技术要求,而使其在

基层和现场难以推广。

阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 检测方法是新型线性等温核酸扩增技术,不需要进行温度循环,同时 SPIA 反应的 cDNA 产物缺少 5' 端引物区大部分序列,使得 SPIA 产物无法与引物结合进行扩增反应,从而有效避免了扩增产物污染造成“假阳性”的可能性,使其适用于临床开放平台高通量试验,更易于在条件艰苦的基层和现场推广。

近年来,阪崎克罗诺杆菌的生化及分子检测方法取得重要进展^[17-18],基于保守序列如 16S rRNA、23S rRNA 以及 16S ~ 23S rRNA 间区序列(ITS),以及基于其特异性基因的分子检测技术也相继建立。高旗利等^[19]建立了奶粉中阪崎克罗诺杆菌 PCR 检测方法,奶粉样品中阪崎克罗诺杆菌检测低限为 2.2 ~ 5.4 cfu/100 g。Seo 等^[20]建立了阪崎克罗诺杆菌实时荧光定量 PCR 方法,灵敏性为 100 cfu/ml PBS,增菌后检测限可达到 0.6 cfu/100 g 婴儿配方奶粉。张霞等^[21]建立的实时荧光 PCR 方法检测灵敏度可达到 1.1 cfu/100 g。张宏伟等^[22]建立的奶粉中阪崎克罗诺杆菌中环介导等温扩增方法,检测低限为 1.2 cfu/100 g。

本研究在普通 SPIA 的基础上,采用加入特异性结合单链 DNA 的荧光染料 SYBER Green II,利用荧光仪进行实时监测扩增情况,建立了实时荧光 SPIA 检测方法。本方法可省去烦琐的凝胶电泳检测过程,比 PCR 技术省时省力,成为可以替代 PCR 的核酸扩增新技术。同时这是第一个应用实时荧光 SPIA 检测婴儿配方奶粉中的阪崎克罗诺杆菌的研究,探索了一种更为特异、敏感、灵敏的分子检测实际样品中阪崎克罗诺杆菌的新技术。本文建立的实时荧光 SPIA 法检测方法,其反应时间仅为 40 min,对阪崎克罗诺杆菌纯培养的灵敏度为每反应 1 copies,在检测婴儿配方奶粉模拟污染样品时其检出限是 1.5 cfu/100 g,与环介导等温扩增方法的灵敏度相当,具有特异性强、灵敏度高、快速、简便的优点。

本文建立的阪崎克罗诺杆菌实时荧光 SPIA 方法具有很好的敏感性和特异性,同时对模板 DNA 要求较低,因此能够用于检测效果明显、成本低廉的检测体系的建立。随着对 SPIA 技术研究的不断深入,将不断完善、发展这种新型的技术,使之在食源性致病菌检测方面发挥更大地优势,得到更全面的应用。单引物等温扩增技术在食源性致病菌的快速检测方面将具有极大的应用前景。

参考文献

- [1] YAN Q Q, Conndell O, Power K, et al. *Cronobacter species* (formerly known as *Enterobacter sakazaki*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium[J]. *J Appl Microbiol*, 2012, 113(1): 1-15.
- [2] FAO/WHO. Joint FAO/WHO workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula [R]. Geneva, 2004.
- [3] 裴晓燕, 刘秀梅. 中国市售配方粉中阪崎肠杆菌和其它肠杆菌的污染状况[J]. *中国食品学报*, 2006, 6(5): 6-10.
- [4] 宋曼丹, 陈秋霞, 杨冰, 等. 2012 年广东省婴幼儿食品中 3 种食源性致病菌污染状况调查[J]. *华南预防医学*, 2013, 39(6): 17-19, 23.
- [5] FAO/WHO. Draft risk assesement for *Enterobacter sakazakii* [J/OL]. WHO, 2004. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6>.
- [6] 彭涛. 核酸等温扩增技术及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 47-57.
- [7] Kurn N, CHEN P, Heath J D, et al. Novel isothermal, linear nucleic acid amplification system for highly multiplexed applications[J]. *Clin Chem*, 2005, 51(10): 1973-1981.
- [8] Potash M J, CHAO W, Bentsman G, et al. A mouse model for study of systemic HIV-1 immune responses, and neuroinvasiveness [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(10): 3760-3765.
- [9] Whitworth K M, Agea C, Kim J G, et al. Transcriptional profiling of pig embryogenesis by using a 15K member unigene set specific for pig reproductive tissues and embryos[J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(6): 1437-1451.
- [10] Kandhai M C, Heuvelink A E, REI J M, et al. A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in the Netherlands between 2001 and 2005[J]. *Food Control*, 2010, 21(8): 1127-1136.
- [11] Mohan Nair M K, Venkitanarayanan K S. Cloning and sequencing of the *OmpA* gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *OmpA*-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(4): 2539-2546.
- [12] Sreenivas R K. Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork[J]. *J Food Prot*, 2002, 65(9): 1470-1474.
- [13] 陈珊珊. PCR 技术检测婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的研究[D]. 河北: 河北农业大学, 2008.
- [14] 邱阳, 王刚, 卢行安. PCR 技术检测食品中金黄色葡萄球菌肠毒素 B 基因[J]. *中国微生态学杂志*, 2004, 16(2): 115-116.
- [15] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 40—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [16] Iversen C, Stephen F. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2003, 38(5): 443-454.
- [17] 楼秀芹, 斯国静, 戚建江. 食品中阪崎肠杆菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(2): 159-163.
- [18] 谭翰清, 蔡建生, 谭海芳, 等. TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 检测克罗诺杆菌 *MMS* 基因方法的建立[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(1): 40-44.
- [19] 高旗利, 张霞, 罗茂凰, 等. 奶粉中阪崎肠杆菌 PCR 检测方法

- 研究[J]. 检验检疫学, 2005, 15(4): 4-8.
- [20] Seo K H, Brackett R E. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay [J]. *Journal of Food Protection*, 2005, 61(1): 59-63.
- [21] 张霞, 高旗利, 罗茂凰, 等. 实时荧光 PCR 对奶粉中坂崎肠杆菌的检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(2): 214-241.
- [22] 张宏伟, 于佳, 郑文杰, 等. 利用环介导等温扩增技术对奶粉中阪崎肠杆菌进行检测[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6): 114-117.

实验技术与方法

同位素稀释-液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中6种玉米赤霉醇类化合物

王炼^{1,2}, 王希希^{1,2}, 张新申²

(1. 成都市疾病预防控制中心, 四川 成都 610041; 2. 四川大学, 四川 成都 610041)

摘要:目的 建立动物源性食品中6种玉米赤霉醇类化合物残留量的同位素稀释-液相色谱-串联质谱的检测方法。方法 样品加入同位素内标后, 用甲醇提取, 离心后上清液经50℃水浴氮气吹至近干, 乙酸乙酯溶解残渣后, 采用氨基小柱固相萃取, 正己烷-乙酸乙酯(20:80, V/V)和乙酸乙酯两种溶液洗脱后, 氮气吹干, 流动相溶解后, 涡旋混匀过0.22 μm有机滤膜后, LC-MS/MS多反应离子监测(MRM)模式检测, 内标法定量。结果 6种玉米赤霉醇类化合物在3类动物源性食品中的加标回收率为84.8%~103.6%; RSD为3.7%~8.6%; 检出限和定量限分别为0.03~0.07 μg/kg和0.10~0.24 μg/kg。结论 该方法灵敏、准确, 适用于动物源性食品中玉米赤霉醇类物质的检测。

关键词:玉米赤霉醇; 液相色谱-串联质谱法; 动物源性食品; 同位素; 兽药残留; 违禁药物

中图分类号: R155.5; O657.7 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)05-0530-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.05.010

Determination of 6 zearanols residues in animal derived foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope dilution

WANG Lian, WANG Xi-xi, ZHANG Xin-shen

(Chengdu Centre for Disease Control and Prevention, Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To establish a method for determination of 6 zearanols residues in animal derived foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope dilution. **Methods** The sample was added isotope internal standard and extracted using methanol. Methanol was nearly dried-up under nitrogen and the residue was dissolved with ethyl acetate. After solid phase extraction of amino cartridge, the eluent was dried-up by nitrogen at 50℃. The analytes were dissolved by the mobile phase and determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Results** The recoveries of analytes were 84.8%-103.6%, and the relative standard deviations of detection were 3.7%-8.6%. The limits of detection and quantification were 0.03-0.07 μg/kg and 0.10-0.24 μg/kg. **Conclusion** The method is sensitive, accurate and it can meet the determination requirements of 6 zearanols residues in animal derived foods.

Key words: Zearanol; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; animal derived food; isotope; residue of veterinary drug; forbidden drug

玉米赤霉醇类化合物(zearanols, ZALs)属于同化激素的一种, 有促进细胞的生长与分化、扩增肌肉、

增强骨强度等作用, 常被用于畜牧业养殖中, 以促进动物生长。ZALs通常包括玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZON)、α-玉米赤霉醇(α-zearalanol, α-ZAL)、β-玉米赤霉醇(β-zearalanol, β-ZAL)、α-玉米赤霉烯醇(α-zearalenol, α-ZOL)、β-玉米赤霉烯醇(β-zearalenol, β-ZOL)、玉米赤霉酮(zearalanone, ZAN)

收稿日期: 2015-06-28

基金项目: 中国博士后面上项目资助(2012M521703)

作者简介: 王炼 男 副主任技师 研究方向为有机污染物残留分析

E-mail: septwolvesnjwl@163.com