

食品中荧光假单胞菌聚合酶链式反应检测体系的建立和评价

杨一林¹, 周敏^{1,*}, 施春雷¹, 杨捷琳², 史贤明¹

(1.上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; 2.上海市出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘要: 建立用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测食品中荧光假单胞菌的方法。分别针对 16~23S rRNA 基因间隔区序列、*gyrB* 基因以及通过生物信息学方法发掘到的 4 个种特异性基因设计 6 对检测引物, 通过初步特异性实验, 筛选出一对种特异性最佳的引物。最终建立以 *gyrB* 基因为检测靶点的 PCR 扩增体系, 并对体系进行系统评价。结果表明: 该方法可特异检测荧光假单胞菌的存在, 纯 DNA 检测灵敏度为 14.9 fg/μL (2~3 拷贝/μL), 纯培养物检测灵敏度为 2.8×10^2 CFU/mL。豆奶样品经 15h 充分增菌可提高检测灵敏度至 0.28 CFU/25g。
关键词: 荧光假单胞菌; *gyrB* 基因; 聚合酶链式反应(PCR); 检测; 食品

Development and Evaluation of a PCR Assay for Detection of *Pseudomonas fluorescens* in Foods

YANG Yi-lin¹, ZHOU Min^{1,*}, SHI Chun-lei¹, YANG Jie-lin², SHI Xian-ming¹

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;
2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *Pseudomonas fluorescens* in foods was developed in this study. Six pairs of detection primers were designed for the 16–23S rDNA internal transcribed spacer sequence, the *gyrB* gene and 4 specific genes obtained by bioinformatics, respectively. Primary specificity experiments were used to screen the best primer pair out of them. A PCR amplification system targeting the *gyrB* gene was constructed and evaluated. The results indicated that the developed assay could specifically detect *Pseudomonas fluorescens*. The specificity was 14.9 fg/μL for pure DNA, 2.8×10^2 CFU/mL for pure culture and 0.28 CFU/25 g for soybean milk with 15 h enrichment.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*; *gyrB* gene; polymerase chain reaction (PCR); detection; food

中图分类号: TS207.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)20-0185-06

荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)是属于假单胞菌属的嗜冷微生物, 为革兰氏阴性, 能产生水溶性的黄绿色荧光色素^[1]。荧光假单胞菌广泛存在于水和土壤当中, 在冷藏的高蛋白、高脂肪食品(生肉、生牛奶等)中, 它是导致食品腐败的优势菌群^[2-3]。临床上, 该菌主要感染先天性和获得性免疫缺陷的人群, 进入患者血液会导致败血症、感染性休克和血管内凝血等严重后果, 是典型的“条件致病菌”^[4-6]。随着冰箱的普及, 食品中此类菌诱发食物中毒、危害人体健康的可能性日趋增大^[7-8]。

目前, 国内对荧光假单胞菌的检测鉴定依然以传统培养方法为标准, 该方法检验过程耗时、繁琐, 不能满足快速高通量监测食品样品的要求。而基于聚合酶链

式反应(polymerase chain reaction, PCR)的检测方法灵敏、特异、快速, 已被广泛应用于食源性致病菌的检测。检测靶点是分子检测方法的关键, 随着生物信息技术的发展, 3 株荧光假单胞菌(pf 0-1、pf-5、pf SBW25)的基因组完成测序, 为检测靶点的选择和特异引物的设计提供了足够的依据, 通过多重序列 BLAST 比对可快速发掘新的特异检测位点。

荧光假单胞菌的 PCR 检测还处于起步阶段, 2004 年 Scarpellini 等^[9]针对 16S rRNA 基因设计了引物 16SPSEfluF/R, 目前常被应用于检测和鉴定荧光假单胞菌。2009 年, Irenehanning 等^[10]利用 *gyrB* 基因的特异性, 将荧光假单胞菌和莓实假单胞菌这两种细菌和其他假单胞

收稿日期: 2010-12-30

基金项目: 上海市科学技术委员会技术标准专项(08DZ0504200); 国家质量监督检验检疫总局标准课题(2009IK155)

作者简介: 杨一林(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全与微生物。E-mail: ickeyyang1215@gmail.com

* 通信作者: 周敏(1976—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品安全与微生物。E-mail: mzhou2@sjtu.edu.cn

菌分开,但没有对这对引物做系统评价。2010年,邓显文等^[11]依据16~23S rRNA基因间隔区序列建立PCR检测体系,诊断罗非鱼的荧光假单胞菌病,但仅对4株荧光假单胞菌分离株进行了验证。本研究将通过生物信息学手段,寻找新的种特异性的检测靶点,针对这些靶点以及16~23S rRNA基因间隔区序列与*gyrB*基因设计和筛选出新的种特异性强的引物,建立和优化荧光假单胞菌PCR检测体系,并对其进行系统评价,旨在形成一套快速、准确、安全的荧光假单胞菌检测方法,为食品安全监测提供技术支撑和有力的保障。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细菌菌株

实验所用菌株名称和来源见表1。实验菌株均为-80℃甘油管保存。

表1 菌株及PCR检测结果

Table 1 Strains used in the study to characterize PCR specificity

序号	菌株名称	菌株编号	特异性检测结果	
			16SPEfluF/R	gyrBF/R
1	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	IQCC12601	+	+
2	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	AS1.867	+	+
3	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	AS1.55	+	+
4	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	AS1.823	+	+
5	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	CICC20225	+	+
6	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	CICC21896	+	+
7	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	CICC21918	+	+
8	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	CICC23248	+	+
9	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	CICC23250	+	+
10	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	CICC23251	+	+
11	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	CICC23246	+	+
12	恶臭假单胞菌(<i>Pseudomonas putida</i>)	ATCC17485	-	-
13	恶臭假单胞菌(<i>Pseudomonas putida</i>)	CICC21884	-	-
14	铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	IQCC12625	-	-
15	产碱假单胞菌(<i>Pseudomonas alcaligenes</i>)	IQCC12604	-	-
16	洋葱假单胞菌(<i>Pseudomonas cepacia</i>)	CICC21624	-	-
17	类产碱假单胞菌(<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>)	IQCC12603	-	-
18	施氏假单胞菌(<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	IQCC12612	-	-
19	绿针假单胞菌(<i>Pseudomonas chlororaphis</i>)	CICC21627	-	-
20	稻草假单胞菌(<i>Pseudomonas straminea</i>)	CICC21628	-	-
21	门多萨假单胞菌(<i>Pseudomonas mendocina</i>)	CICC21629	-	-
22	单核增生李斯特菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)	BAA-751	-	-
23	大肠杆菌O157(<i>Escherichia coli</i> O157:H7)	ATCC33889	-	-
24	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC27664	-	-
25	副溶血弧菌(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	ATCC33846	-	-
26	创伤弧菌(<i>Vibrio vulnificus</i>)	ATCC27542	-	-
27	痢疾杆菌(<i>Shigella flexneri</i>)	CMCC51311	-	-
28	志贺氏菌(<i>Shigella dysenteriae</i>)	CMCC51335	-	-
29	阴沟肠杆菌(<i>Enterobacter cloacae</i>)	ATCC13047	-	-
30	枸橼酸杆菌(<i>Citrobacter freundii</i>)	ATCC8090	-	-
31	沙雷氏菌(<i>Serratia marcescens</i>)	ATCC21740	-	-

续表1

序号	菌株名称	菌株编号	特异性检测结果	
			16SPEfluF/R	gyrBF/R
32	变形杆菌(<i>Proteus mirabilis</i> Hauser)	ATCC12453	-	-
33	巨大芽胞杆菌(<i>Bacillus megaterium</i> s)	ATCC19218	-	-
34	伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhi</i>)	ATCC14028	-	-
35	藤黄微球菌(<i>Micrococcus luteus</i>)	ATCC9341	-	-
36	普通变形杆菌(<i>Proteus vulgaris</i>)	ATCC33425	-	-
37	鸟肠球菌(<i>Enterococcus avium</i>)	ATCC14025	-	-
38	阪崎肠杆菌(<i>Enterobacter sakazakii</i>)	ATCC50205	-	-
39	屎肠球菌(<i>Enterococcus faecium</i>)	ATCC99457	-	-

注:编号为IQCC的菌株均来自中国检验检疫科学研究院食品安全微生物菌种保藏管理中心,编号为AS的菌株均购自广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心,编号为CICC的菌株均购自中国工业微生物菌种库,其余标准菌株均为本实验室收藏。

1.1.2 培养基与试剂

非选择性培养基:营养肉汤培养基(NB培养基);营养肉汤琼脂培养基(NA培养基)。

选择性培养基:假单胞菌琼脂培养基(英国Oxoid公司);选择性增菌液^[12]。

实验所用种特异性引物序列*gyrBF/R*、*ITSF/R*(表2)由上海生工生物工程技术有限公司合成;测序工作委托北京六合华大基因有限公司完成。

*Taq*酶等PCR反应试剂 深圳富酶泰斯生物技术有限公司;100bp DNA Marker 北京天根生化科技有限公司;DNA凝胶回收试剂盒 上海星汉生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

PTC-200 PCR仪 美国Bio-Rad公司;GIS 2020系列数码凝胶图像处理系统 上海天能科技有限公司;HZ-8211K恒温振荡器 太仓市科教器材厂;EPS 301电泳仪 美国Amersham Biosciences公司;Thermomixer comfort恒温混匀器、5415D高速离心机 德国Eppendorf公司;ES-315高压蒸汽灭菌器 日本Tomy公司;CA-1480-2垂直层流洁净工作台 上海上净净化设备有限公司;DHP-9162恒温培养箱 上海一恒科技有限公司;DU800紫外核酸蛋白分析仪 美国Beckman Coulter公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株培养

实验所用荧光假单胞菌于28℃条件下培养,非荧光假单胞菌于37℃条件培养。

1.3.2 基因组DNA的提取

在不同的实验中分别采取苯酚-氯仿-异戊醇法或煮沸法提取核酸DNA^[13]。

1.3.3 引物设计

根据荧光假单胞菌pf SBW25的基因组测序结果,通过本实验室建立的软件平台^[14],将其所有CDS序列与其他常见食源性致病菌全基因组进行BLAST比对,得

到 237 个种特异性的基因(E 值 > 0.1), 再经手动在线 BLAST 比对, 发掘得到 4 个荧光假单胞菌种内保守的基因(同源性 $> 70\%$)。这 4 个基因分别编码 AraC 家族转录调控子和不同的假性蛋白。采用 primer premier 5.0 软件设计引物, 经过 primer-BLAST 比对, 筛选出理论上可以特异扩增荧光假单胞菌的引物对。

另外, 荧光假单胞菌不同菌株的 16~23S rDNA 序列区间和 *gyrB* 基因 DNA 序列分别具有较高同源性, 且具有种特异性。在 GeneBank 中查找找到荧光假单胞菌不同菌株的上述基因序列, 经 CLUSTALX 1.8.1 比对分析, 找到种间特异种内保守区段设计引物并进行理论筛选。

使用设计出的引物对假单胞菌属的菌株(表 1)进行 PCR 反应验证, 最终筛选出特异性好的引物 *gyrBF/R* 进行后续实验。引物信息如表 2 所示。本研究将引物 *16SPSEfluF/R* 作为对照, 考察新体系的相对优势。

1.3.4 PCR 反应体系建立

PCR 体系和反应程序如 2.2 节所述, 其中 Mg^{2+} 添加量和退火温度经优化之后确定。PCR 产物进行琼脂糖凝胶(1.5%)电泳(160V、30min), 溴化乙锭染色 10min, 用 GIS 凝胶成像系统观察分析电泳结果。

1.3.4.1 Mg^{2+} 浓度优化实验

设置一系列的 Mg^{2+} 浓度梯度, 使每个反应体系中的 Mg^{2+} 浓度分别为 1.25、1.875、2.5、3.125 $\mu\text{mol/L}$ 。分别在这 4 个梯度上进行 PCR 扩增(以荧光假单胞菌 CICC21896 基因组 DNA 为模板), 根据电泳结果的条带亮度和宽度以及有否非特异性扩增, 确定最佳的 Mg^{2+} 浓度。

1.3.4.2 退火温度优化实验

参考引物设计软件的推荐 T_m 值(56.6 $^{\circ}\text{C}$), 在 $T_m \pm 5^{\circ}\text{C}$ 范围内设置 12 个温度梯度(52~62 $^{\circ}\text{C}$), 以荧光假单胞菌 CICC21896 基因组 DNA 为模板分别进行扩增, 根据电泳结果的条带亮度和宽度以及有否非特异性扩增, 确定扩增退火温度。

1.3.5 PCR 检测体系评价

1.3.5.1 特异性评价

对表 1 中所列出的菌株分别进行 PCR 扩增, 以灭菌蒸馏水为空白对照。如电泳结果在 271bp 处出现条带, 则为阳性检测结果。将阳性条带割胶回收, 进行测序, 并对测序结果进行 BLAST 比对, 确定扩增产物序列是否与设计目的片断一致。

1.3.5.2 灵敏度评价

纯 DNA 水平灵敏度评价: 提取荧光假单胞菌 AS1.55 基因组 DNA, 使用含 100 $\mu\text{g/mL}$ RNaseA 的无菌水处理, 测定核酸浓度。10 倍梯度稀释至 10^{-10} 水平, 对每个浓度梯度分别进行 PCR 扩增, 以灭菌蒸馏水为空白对照, 检测引物灵敏度。

纯培养物水平灵敏度评价: 将培养 12h 的荧光假单胞菌 AS1.55 菌液, 进行 10 倍梯度稀释至 10^{-10} 水平, 选取 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 三个稀释倍数梯度进行平板计数, 同时对每个梯度水平的菌液采取煮沸法提取基因组 DNA, 分别进行 PCR 扩增, 以灭菌蒸馏水为空白对照, 检测引物灵敏度。

1.3.5.3 抗干扰能力评价

选取恶臭假单胞菌(ATCC17485)、铜绿假单胞菌(IQCC12625)、产碱假单胞菌(IQCC12604)和洋葱假单胞菌(CICC21624)4 株干扰菌, 与荧光假单胞菌(AS1.55)分别培养至稳定期, 10 倍梯度稀释, 分别计数, 将 4 种干扰菌混合, 设置 3 个干扰浓度($N \times 10^4$ 、 $N \times 10^6$ 、 $N \times 10^8$), 与荧光假单胞菌不同梯度稀释液分别混合摇瓶培养(28 $^{\circ}\text{C}$ 、150r/min), 于 0h 和 15h(依据人工污染的结果选取)分别取样 1 次, 煮沸法提取基因组 DNA, 分别进行 PCR 扩增, 以不加入荧光假单胞菌的干扰菌混合液为空白对照, 检测抗干扰能力(图 1)。

表 2 引物序列信息
Table 2 Information about the primers used in this study

引物名称	目标基因	长度 /bp	引物序列(5'→3')	退火温度 / $^{\circ}\text{C}$	产物长度 /bp
<i>gyrBF/R</i>	<i>gyrB</i>	20	TGCGGTCAACCAGGTGTTCC	63.7	271
		19	CGAGATAATCGCGGTCAGG	58.9	
<i>ITSF/R</i>	16~23S rDNA 区间序列	24	TTTGCTCCACCACTACTGCTTCT	61.9	164
		26	CCTGATCCGTTACCAGTGAAAGTAAC	61.9	
<i>AraCF/R</i>	<i>AraC</i>	18	CGGTCGTGCATGATCTGC	58.2	255
		18	GCGGGACATGATGATGCA	58.4	
<i>Hp2F/R</i>	<i>PFLU_0141</i>	23	CYTACTTCTACGGCRTCATGCTG	55.8	284
		20	GGTGAGBTCGCCCATGACTT	56.3	
<i>Hp3F/R</i>	<i>PFLU_0142</i>	19	CAAATGGTCTCGCTGCTGG	53.6	256
		21	GCTCAACGGTCATCTTCTGGC	55.9	
<i>Hp4F/R</i>	<i>PFLU_4776</i>	20	CACCTTCAACGCGAAGAACG	54.6	307
		19	GGCGAAGACGCTGGTTTTG	54.5	
<i>16SPSEfluF/R</i> ^[9]	16S rRNA	18	TGCATTCAAACTGACTG	50.5	850
		19	AATCACACCGTGGTAACCG	57.6	

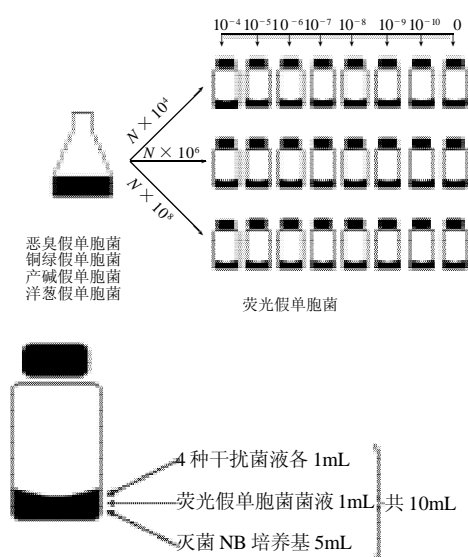


图1 抗干扰实验设计图示

Fig.1 Experimental scheme to test the presence of background bacteria

1.3.6 人工污染食品样品实验

将活化的荧光假单胞菌(AS1.55)菌液接入NB培养基中摇床培养至稳定期, 10倍梯度稀释, 平板计数。向225mL选择性增菌液中接入25mL豆奶, 分别接入1~10、10~100、100~1000CFU/mL三个梯度的菌液, 平行3次, 于0、3、6、9、12、15、24h各取样一次, 煮沸法提取基因组DNA, 分别进行PCR扩增, 以灭菌蒸馏水为空白对照。所选食品样品经培养法^[12]证实不含有检测目的菌。

2 结果与分析

2.1 靶点筛选和引物设计

使用软件设计的6对引物(表2)对假单胞菌属的21株菌株分别进行扩增, 初步验证其特异性。结果表明引物Hp2F/R出现了假阳性现象, 引物ITSF/R、AraCF/R、Hp3F/R、Hp4F/R则出现了假阴性现象, 这是由于各虽同源性较高, 但序列中散布着大量突变位点而造成的。故选择特异性最好的引物gyrBF/R进行后续实验。

2.2 PCR反应体系建立



M. 标准品; 泳道1~12依次为退火温度优化 52.0、52.2、52.8、53.7、54.8、56.1、57.4、58.7、59.9、60.8、61.5、61.9℃; 泳道13~24依次为Mg²⁺浓度优化 1.25、1.25、1.25、1.875、1.875、1.875、2.5、2.5、2.5、3.125、3.125、3.125 μmol/L。

图2 gyrBF/R引物退火温度优化和Mg²⁺浓度优化电泳图Fig.2 Optimization of annealing temperature and Mg²⁺ concentration for PCR using primer gyrBF/R

使用上述方法分别对PCR体系中Mg²⁺浓度和退火温度进行优化。从图2可以看出, 当退火温度为59.9℃和60.8℃时, 扩增条带最清晰明亮, 后续实验在此范围内选取60℃退火; 同样根据条带亮度和宽度, 选择Mg²⁺浓度为1.875 μmol/L。

优化后PCR体系: 上下游引物(10 μmol/L)各0.5 μL, DNA模板1~10 ng, 10 × buffer 2 μL, Mg²⁺(25 mmol/L) 1.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 1 μL, Taq酶1 μL, ddH₂O补足至20 μL。

优化后PCR反应程序: 94℃预变性2 min; 94℃变性30s, 60℃退火30s, 72℃延伸30s, 36个循环; 72℃延伸10 min。

2.3 PCR检测体系评价

2.3.1 特异性评价

采用优化后扩增体系, 利用引物gyrBF/R对11株荧光假单胞菌、10株假单胞菌属其他种类细菌、18株其他属常见食源性致病菌分别进行检测, 结果以荧光假单胞菌的基因组DNA为模板, 均能扩增出长度为271bp的特异性条带, 而以非荧光假单胞菌基因组DNA为模板则没有扩增出特异性条带(表1)。将扩增条带割胶回收, 送交深圳华大基因科技有限公司测序。对测序结果进行BLAST比对, 证实扩增条带与设计目的片断一致。

引物gyrBF/R具有稳定的种特异性, 可准确区分荧光假单胞菌与非荧光假单胞菌, 且特异性检测结果与引物16SPSEfluF/R一致。

2.3.2 灵敏度评价

2.3.2.1 纯DNA水平灵敏度评价

提取荧光假单胞菌AS1.55基因组DNA, 使用RNA酶水纯化, 并用DU800测得质量浓度为5.96 ng/μL, 10倍梯度稀释至10⁻¹⁰水平, 以灭菌蒸馏水为空白对照, 分别进行PCR扩增检测引物灵敏度。如图2所示, 当每个体系中模板终浓度为1.49 fg/μL时, 无法检测到目的条带。因此最终计算得检测灵敏度为14.9 fg/μL (2~3 拷贝/μL)。另外, 对引物16SPSEfluF/R的评价结果显示, 两引物纯DNA水平灵敏度相同。

2.3.2.2 纯培养物水平灵敏度评价

将培养12h的荧光假单胞菌AS1.55菌液进行10倍梯度稀释至10⁻¹⁰水平, 并对其中10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸三个梯度进行计数, 计算初始菌浓度为1.1 × 10⁹。同时对每个浓度的菌液采取煮沸法提取基因组DNA, 以灭菌蒸馏水为空白对照, 分别进行PCR扩增。如图3所示, 当每个体系中模板终浓度为2.8 × 10² CFU/mL时, 无法检测到目的条带。因此最终计算得检测灵敏度为2.8 × 10² CFU/mL。

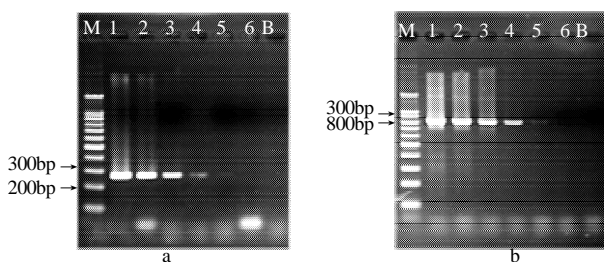


Fig.3 Detection sensitivity of PCR using primer *gyrBF/R* and primer *16SPSEfluF/R* to pure DNA

图3 引物 *gyrBF/R* (a)与引物 *16SPSEfluF/R* (b)的PCR 检测纯DNA 灵敏度检测电泳图



Fig.4 Detection sensitivity of PCR using primer *gyrBF/R* to pure *Pseudomonas fluorescens* culture

图4 *gyrBF/R* 引物PCR 检测纯培养物灵敏度试验电泳图

2.3.3 抗干扰能力评价

选取恶臭假单胞菌(ATCC17485)、铜绿假单胞菌(IQCC12625)、产碱假单胞菌(IQCC12604)和洋葱假单胞菌(CICC21624)与荧光假单胞菌(AS1.55)分别培养至稳定期, 10 倍梯度稀释, 分别计数, 计算得荧光假单胞菌和4种干扰菌纯培养物的起始菌液浓度分别为 1.1×10^9 、 6.8×10^8 、 3.4×10^9 、 4.8×10^9 、 6.8×10^8 CFU/mL。再按1.3.5.3节所述方法进行纯培养物的灵敏度实验, 结果如表3所示。

表3 干扰菌的存在对纯培养物PCR 检测灵敏度的影响

Table 3 Effect of background interference on detection sensitivity of *Pseudomonas fluorescens* in pure culture

增菌时间/h	背景干扰菌起始浓度/(CFU/mL)	无背景菌时检测灵敏度/(CFU/mL)	存在背景菌时检测灵敏度/(CFU/mL)
0	低($N \times 10^3$)	2.8×10^2	2.8×10^2
	中($N \times 10^6$)	2.8×10^2	2.8×10^3
	高($N \times 10^8$)	2.8×10^2	2.8×10^4
15	低($N \times 10^3$)	ND	0.28
	中($N \times 10^6$)	ND	0.28
	高($N \times 10^8$)	ND	2.8*

注: 当向增菌体系中加入稀释梯度为0.28CFU/mL时, 操作中有一定概率会吸不到菌体, 故无法在增菌后被检测; ND表示未检测。

添加约为 10^4 CFU/mL的干扰菌纯培养物对上述PCR检测体系的灵敏度几乎没有影响, 而添加约为 10^8 CFU/mL的干扰菌纯培养物时, 经过充分的增菌培养也能准确的检测出荧光假单胞菌。

可见, 增菌培养不仅可以提高检测灵敏度, 还可以提高检测体系的抗干扰能力, 因此检测前的增菌过程是必要的。

2.4 人工污染食品样品实验

将活化的荧光假单胞菌(AS1.55)菌液接入NB培养基中摇床培养至稳定期, 平板计数得初始菌浓度为 2.3×10^9 CFU/mL。将25mL鲜牛奶样品用选择性增菌液稀释10倍, 分别接入浓度为23、2.3、0.23CFU/mL的荧光假单胞菌1mL, 每个浓度平行3次。于0、3、6、9、12、15、24h各取样1次, 煮沸法提取基因组DNA, 分别进行PCR扩增, 以灭菌蒸馏水为空白对照。检测结果如表4所示。

表4 人工污染样品的PCR 检测结果

Table 4 PCR detection results for artificially contaminated samples

初始接菌量/(CFU/mL)	23	2.3	0.23
增菌时间/h	12	15	24(1/3)

注: 24h时, 初始接菌量为0.23CFU/mL的3组平行中仅有1组检出为阳性。

当初始接菌量为23CFU/mL时, 增菌培养12h可检测到阳性结果; 当接菌量为2.3CFU/mL时, 增菌培养15h可检测到阳性结果; 培养24h后, 初始接菌量为0.23CFU/mL的样品检出率为1/3。可见, 本体系在样品含菌量低的情况下, 经适当时间增菌可准确检测到荧光假单胞菌存在。

3 讨论

本研究所建立的PCR检测体系, 可准确区分荧光假单胞菌和非荧光假单胞菌, 纯DNA水平上检测灵敏度为 $14.9 \text{ fg}/\mu\text{L}$, 纯培养物水平上检测灵敏度为 2.8×10^2 CFU/mL, 当背景干扰菌总量为 10^4 CFU/mL时, 对上述体系检测灵敏度没有影响, 而当背景干扰菌总量达到 10^8 CFU/mL时, 经过充分增菌培养, 也可以准确检测荧光假单胞菌的存在。当向不含检测目的菌的食品样品中接入浓度为2.3CFU/mL的荧光假单胞菌后, 增菌15h即可准确检测到阳性结果。

本研究设置的比较实验结果显示, 引物 *16SPSEfluF/R*^[9]检测特异性和纯DNA灵敏度结果与 *gyrBF/R* 一致。使用邓显文等^[11]和 Irenehanning等^[10]建立的体系对表1中的菌株进行扩增时, 发现属内非荧光假单胞菌株多出现假阳性现象。16S rDNA、16~23S rRNA基因间隔区序列和 *gyrB* 基因都是细菌分子检测的

常用位点,当使用多重序列比对软件 CLUSTALX 进行比较分析时发现:16S rDNA 高度保守,如与铜绿假单胞菌的等位基因同源性达到 95%,种特异性不强,易将不同种判断为同一菌种而出现假阳性结果^[15];16~23S rRNA 基因间隔区序列则高度变异,同种不同株(pf-5 与 pf 0-1)之间同源性仅达到 83%,易错将同一菌种判断为不同种^[15];gyrB 基因也比较保守,与恶臭假单胞菌等位基因同源性为 85%,但其片断上有很多种特异的突变位点,可用来设计特异性的检测引物,这主要是由于遗传密码子具有兼并性,使得 DNA 序列可以发生较多替换而不改变氨基酸序列,尤其对于密码子第 3 位核苷酸,因此,gyrB 基因特别适用于菌种间的区别和鉴定^[16]。

通过 CDS 比对筛选得到的检测位点,虽然等位基因同源性较高,但序列中间散布着大量突变位点,保守区段非常短,若用来设计种特异性引物,实际扩增时,会出现假阴性现象。针对这一情况,本实验尝试设计了一对简并引物 Hp2F/R,在多次重复实验中,假单胞菌属的其他细菌不时会出现假阳性结果,即该引物扩增结果不稳定,而后进行体系优化也没能解决这一问题。本实验筛选得到的特异位点可作为荧光假单胞菌的分类依据,为其分子分型方法的建立提供理论支持。

在绝大多数食品样品中,检测目的菌都以很低的水平存在,而且食品中的各种物质和复杂的背景菌群会影响检测灵敏度和准确性,因此,一定时间的选择性增菌是必要的。虽然增菌培养会使检测时间加长,且使得检测结果不能对样品中目的菌准确定量,但目前大多数食源性致病菌新型分子检测技术的开发都以增菌培养作为目的菌浓缩分离的首选方法。与培养法^[12]需耗时约 4d 相比,本体系准确检测食品中微量存在的荧光假单胞菌,仅需大约 17h,大大缩短了检测时长。

研究^[17]表明,gyrB 基因是以单拷贝的形式存在于细菌中的,因此基于 gyrB 基因的分子检测方法可以向定量检测的方向发展。另外,食品中存在的死亡细菌 DNA 会干扰检测结果,降低可信度。相反,RNA 仅存在于活菌中,因此,可采用反转录 PCR,针对 RNA 进行检测,弥补现存检测体系的漏洞。此外,还可在其他环节运用辅助手段区分活菌与死菌,如单叠氮丙锭预处理 PCR(PMA-PCR)。死亡细菌的细胞膜会降解,DNA 外泄,PMA 可与 DNA 双链紧密结合,使其无法解链发生 PCR 反应。在提取细菌 DNA 之前,先用 PMA 处理菌液,排除掉外泄的 DNA,之后再按常规方法进行 PCR,即可得到针对活菌的检测结果^[18-19]。

综上所述,本研究基于 gyrB 基因建立的 PCR 检测

体系可快速、准确检测荧光假单胞菌,灵敏度高,值得推广使用。

参考文献:

- [1] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 274-312.
- [2] LIU M, GRAY J M, GRIFFITHS M W. Occurrence of proteolytic activity and *N*-acyl-homoserine lactone signals in the spoilage of aerobically chill-stored proteinaceous raw foods[J]. Journal of food protection, 2006, 6(11): 2729-2737.
- [3] BRAUN P, BUCHNER S, FEHOHABER K. Amount and heat stability of lipases in food of animal origin[J]. Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift, 2002, 115(1-2): 24-29.
- [4] LENENETE E H, BALOWS A, WILLIAN J. et al. Manual of clinical microbiology[M]. 4th ed. Waghington, DC: American Society for microbiology, 1985: 356-357.
- [5] 倪语星, 尚红. 临床微生物学与检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [6] 艾亿龄, 周善章. 肠杆菌科外的革兰氏阴性杆菌的鉴定[J]. 国际检验医学杂志, 1982(1): 13-21.
- [7] 马麦生, 赵淑莲, 赵乃听, 等. 从冷藏肉蛋中分离出嗜冷的荧光假单胞菌和变形杆菌[J]. 潍坊医学院学报, 1993(3): 177-179.
- [8] 景慎英, 孙道学. 从变质生猪肉中检出荧光假单胞菌[J]. 中国食品卫生杂志, 1997, 9(3): 28-29.
- [9] SCARPELLINI M, FRANZETTI L, GALLI A. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype[J]. FEMS Microbiol Letters, 2004, 236(2): 257-260.
- [10] HANNING I, JARQUIN R, O' LEARY A, et al. Polymerase chain reaction based assays for the detection and differentiation of poultry significant pseudomonads[J]. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 2009, 17(4): 490-502.
- [11] 邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. PCR 检测诊断罗非鱼荧光假单胞菌病技术的建立[J]. 湖南农业科学, 2010(7): 126-128.
- [12] 杨一林. 荧光假单胞菌 PCR 检测靶点的筛选及 PCR 检测体系的建立[D]. 上海: 上海交通大学, 2011.
- [13] 陆长勇. 食源性致病菌多重 PCR 和基因芯片检测方法的建立[D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- [14] YU Shuijing, CHEN Wanyi, WANG Dapeng, et al. Species-specific PCR detection of the food-borne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* using the *irgB* gene identified by comparative genomic analysis[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 307(1): 65-71.
- [15] 毕春霞, 闫志勇, 王斌. 16SrRNA 基因及 16S~23S rRNA 基因区间在临床细菌学检验中的应用[J]. 青岛大学医学院学报, 2003, 39(4): 493-498.
- [16] 侯晓丽, 曹清毅, 潘劲草. 霍乱弧菌和副溶血弧菌分离株的 gyrB 基因系统发育分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 884-889.
- [17] 安然, 易图永, 肖启明, 等. gyrB 基因在细菌分类和检测中的应用[J]. 江西农业学报, 2010, 22(4): 18-20.
- [18] KOBAYASHI H, OETHINGER M, TUOHY M J, et al. Distinction between intact and antibiotic-inactivated bacteria by real-time PCR after treatment with propidium monoazide[J]. Journal of Orthopaedic Research, 2010, 28(9): 1245-1251.
- [19] CHANG B, TAGULI T, SUGIYAMA K, et al. Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella cells*[J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2010, 63(2): 119-123.