

PCR及核糖体基因分型法检测和鉴定 脂环酸芽孢杆菌

张宇霞, 文朝慧, 李 儒*

(甘肃出入境检验检疫局综合技术中心, 甘肃 兰州 730020)

摘 要: 为实现对果汁生产中脂环酸芽孢杆菌从原料到成品的快速检测和鉴定, 采用聚合酶链式反应(PCR)以及自动化核糖体基因分型RiboPrinter, 对经过分离、筛选和纯化后的59株分离菌株进行鉴定。结果表明: 自动化核糖体基因分型使得鉴定结果更加快速、准确和可靠, 最大化避免了其他因素对实验的影响, 且在鉴定到种的基础上可以进一步分类, 进行溯源分析。RiboPrinter分型结果为建立我国脂环酸芽孢杆菌分子分型数据库积累了一定的数据和经验, 但由于菌株的来源地及数量有限, 因此尚不能看出核糖体基因型是否有明显的地域分布特征。

关键词: 脂环酸芽孢杆菌; 聚合酶链式反应; RiboPrinter; 核糖体基因分型

Detection and Identification of *Alicyclobacillus* by Use of PCR and Automated Ribotyping

ZHANG Yu-xia, WEN Zhao-hui, LI Ru*

(Center Laboratory of Gansu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Lanzhou 730020, China)

Abstract: A rapid detection and identification method for *Alicyclobacillus* was proposed by combined use of PCR and automated ribotyping (RiboPrinter). A total of 59 pure strains were isolated and identified by the method. The results showed that automated ribotyping allowed more rapid, accurate and reliable identification with maximum interference avoidance, the further classification of identified species and enabled their traceability. The results of this study are expected to provide useful data to establish a database for *Alicyclobacillus* typing. However, it remains unclear that whether ribotyping can indicate regional distribution characteristics of *Alicyclobacillus* due to limited sources and number of strains in this study.

Key words: *Alicyclobacillus*; polymerase chain reaction (PCR); RiboPrinter; ribotyping

中图分类号: Q93.331

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)16-0200-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201316040

脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus*)俗称耐热菌、嗜酸耐热菌、耐热耐酸菌等^[1-2], 能引起巴氏灭菌果汁风味改变甚至腐败^[3], 而目前的杀菌条件难以消除该菌, 因此成为果汁生产过程中比较棘手的问题, 并影响我国果汁的出口创汇。目前, 美国、欧洲大部分果汁消费国脂环酸芽孢杆菌达到了小于1个/10mL的要求, 而我国部分浓缩果汁中脂环酸芽孢杆菌的严重超标已成为制约我国浓缩苹果汁出口的主要障碍。因此, 如何在浓缩果汁中快速准确地检测和鉴定脂环酸芽孢杆菌已成为苹果浓缩汁生产企业亟待解决的问题。目前脂环酸芽孢杆菌的检测方法主要有传统检测方法、数值分类技术、细胞膜脂肪酸组成检测^[4]、代谢产物的检测^[5]、基于聚

合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的分子生物学检测^[6-13]、傅里叶红外光谱检测^[14]等, 但这些方法对所需仪器设备以及设备操作人员技术要求较高, 检测方法复杂, 不利于浓缩苹果汁生产厂家在加工生产环节对该菌进行有效、简便的检测和控制, 且不同检测方法判定标准的差异会导致结果存在一定的差异, 而基于PCR的分子生物学方法快速、简便, 因此成为检测该菌的首选方法。本实验在现有脂环酸芽孢杆菌PCR检测方法的基础上^[10], 结合美国杜邦公司的RiboPrinter基因指纹图谱鉴定系统对PCR检测阳性样品进行进一步鉴定, 以期使鉴定结果更加快速、准确、可靠。

收稿日期: 2012-10-15

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2008IK123)

作者简介: 张宇霞(1978—), 女, 兽医师, 硕士, 研究方向为食源性微生物的检验和鉴定。E-mail: 446981395@qq.com

*通信作者: 李儒(1961—), 男, 高级兽医师, 硕士, 研究方向为食品公共卫生。E-mail: liru8573@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酸土脂环酸芽孢杆菌*Alicyclobacillus acidoterrestris* (ATCC 49025)、环庚基脂环酸芽孢杆菌*Alicyclobacillus cycloheptanicus* (ATCC 49029)、枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis* (ATCC 11774)、蜡样芽孢杆菌*Bacillus cereus* (ATCC 11778)、大肠杆菌*Escherichia coli* (ATCC 8739) 美国标准生物品收藏中心; 分离菌株系本实验室保存的分离自浓缩苹果汁生产企业144个浓缩苹果汁和生产用水样品的59株分离菌株。

Taq DNA聚合酶、dNTP、100bp DNA Marker、Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)试剂盒、引物 宝生物工程(大连)有限公司; 蛋白酶K、溶菌酶、CTAB、EDTA、SDS 上海生工生物工程技术有限公司; 琼脂糖 西班牙Biowest公司; 饱和Tris-酚 美国Amresco公司; 其他常规试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 仪器与设备

PCR扩增仪 美国应用生物系统公司; Light Cycler 2.0荧光PCR仪 美国Roche公司; B6200电热恒温培养箱 美国赛默飞世尔科技公司; 紫外分光光度计 美国PE公司; DYY-6C型稳压稳流电泳仪、紫外凝胶成像分析系统 英国UVP公司; 台式离心机 美国Sigma公司; 高速低温离心机 德国Eppendorf公司; 制冰机 美国Scotsman公司; RiboPrinter基因指纹图谱鉴定系统 美国DuPont公司。

1.3 方法

1.3.1 标准菌株和分离菌株的培养

按ATCC提供的1656 BAM-SM培养基配方并添加金属离子溶液配制成分离培养基, 调pH值至4.0后倾注平板制成固体培养基, 然后将标准菌株*Alicyclobacillus acidoterrestris* (ATCC 49025)、*Alicyclobacillus cycloheptanicus* (ATCC 49029)、实验室分离纯化后的分离菌株接种于1656 BAM-SM琼脂平板表面上, 45℃培养24~48h; 同时将标准菌株*Bacillus subtilis* (ATCC 11774)、*Bacillus cereus* (ATCC 11778)、*Escherichia coli* (ATCC 8739)接种于普通营养琼脂平板表面上, 37℃培养24h。然后将标准菌株*Alicyclobacillus acidoterrestris* (ATCC 49025)、*Alicyclobacillus cycloheptanicus* (ATCC 49029)、分离菌株的新鲜培养物挑取单个菌落接种于5mL 1656 BAM-SM液体培养基中培养24~48h。

1.3.2 脂环酸芽孢杆菌基因组DNA以及对照标准菌株基因组DNA的提取

参照文献[2]方法进行。

1.3.3 PCR扩增模板的制备

1.3.3.1 脂环酸芽孢杆菌标准菌株和分离菌株DNA模板含量和纯度的确定

参照文献[15]方法进行, 将确定好质量浓度的标准菌株和分离菌株的DNA样品进行梯度稀释后于-20℃保存备用。

1.3.3.2 脂环酸芽孢杆菌标准菌株和分离菌株液体培养物细菌数量的确定

采用平板计数法进行: 在标准菌株和分离菌株的新鲜培养物中挑取单个菌落接种于10mL 1656 BAM-SM液体培养基中45℃培养48h后进行10倍比稀释, 在适当的梯度下取0.1mL涂布接种于1656 BAM-SM琼脂平板表面, 每个梯度设2个平行, 45℃培养48h后进行计数, 选取菌落数量在30~300之间的平板进行计数, 计算出单个菌落接种于10mL 1656 BAM-SM液体培养基中45℃培养48h后的细菌数量(CFU/mL), 结果取平均值。然后将45℃、48h培养物进行梯度稀释, 各梯度菌悬液12000r/min、4℃离心10min后, 将沉淀重悬于5μL灭菌双蒸水直接作为PCR模板以确定最小检测量, 同时将各稀释梯度菌悬液按照1.3.2节的方法进行基因组DNA的提取, 提取得到的DNA作为PCR模板, 确定最小检测量。

1.3.4 引物的设计与合成

根据参考文献[9]和GenBank数据库中脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 43030)16S rRNA基因核苷酸序列(AY573796), 以DNASTar和Primer 5.0软件, 针对16S rRNA保守区设计一对引物。以*Alicyclobacillus acidocaldarius* (ATCC 43030)为设计对象, 将GenBank数据库中脂环酸芽孢杆菌属中12个16S rRNA基因核苷酸序列经DNASTar Megalign 5.01比对, 发现在*Alicyclobacillus acidocaldarius* (ATCC 43030)16S rRNA基因核苷酸序列(AY573796)1281~1434bp之间高度保守, 上游引物从1281bp开始, 下游引物对应16S rRNA序列3'的1397bp开始, 扩增片段预计134bp。上游引物: 5'-CGTAGTTCGGATTGCAGGC-3'; 下游引物: 5'-GTGTTGCCGACTCTCGTG-3'; CC16S-Probe: CGGAATTGCTAGTAATCGC; 探针5'端标记报告荧光染料6-Carboxyfluorescein (FAM), 3'端标记淬灭荧光染料。

1.3.5 PCR扩增

1.3.5.1 特异性检测

PCR反应体系总体积50μL, 其中10×Buffer(Mg²⁺) 5μL、dNTP(2.5mmol/L) 4μL、模板(脂环酸芽孢杆菌标准菌株和对照标准菌株基因组DNA)1μL、上游引物1μL、下游引物1μL、Taq酶0.25μL、灭菌水37.75μL。PCR反应条件: 94℃、5min; 94℃、30s, 55℃、30s, 72℃、1min, 共35个循环; 72℃、10min。扩增完成后, 取PCR产物5μL用1.5%的琼脂糖凝胶(含0.5μg/mL溴化乙锭)进行电泳, 电泳结束后用紫外凝胶成像系统观察扩增结果,

并将产生预计扩增目的条带对应的脂环酸芽孢杆菌分离菌株制成40%甘油菌悬液置于-80℃超低温冰箱保存备用。

1.3.5.2 灵敏度检测

PCR反应体系和反应条件不变,模板按脂环酸芽孢杆菌标准菌株基因组DNA质量浓度从大到小进行扩增实验,以确定DNA的最小检测量;PCR反应体系和反应条件不变,模板按脂环酸芽孢杆菌标准菌株菌悬液细菌浓度从大到小进行扩增实验,以确定将细菌直接作为模板的最小检测量;PCR反应体系和反应条件不变,模板按脂环酸芽孢杆菌标准菌株菌悬液细菌浓度从大到小进行基因组DNA提取后再进行扩增实验,以确定将不同浓度细菌悬液进行基因组DNA提取后的模板的最小检测量。

扩增完成后,取PCR产物5μL用1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳,电泳结束后用紫外凝胶成像系统观察扩增结果。

1.3.5.3 扩增产物的序列测定

将扩增后的PCR产物回收纯化后送上海生工生物工程有限公司进行DNA片段序列测定。

1.3.6 实时荧光定量PCR扩增

1.3.6.1 实时荧光定量PCR模板的制备

参照文献[15]的方法将脂环酸芽孢杆菌标准菌株和分离菌株以及对照标准菌株的DNA进行提取。

1.3.6.2 实时荧光定量PCR的标准曲线的制备及特异性扩增

用制备的标准菌株ATCC 49025作为模板,确定最佳反应体系和反应条件。反应体系为2×Premix Ex Taq10μL、10μmol/L引物各0.5μL、10μmol/L探针0.3μL、模板DNA 2μL,加灭菌双蒸水使体积至20μL;循环条件为95℃、30s;95℃、5s,60℃、20s,47个循环。以10倍梯度稀释从已知细菌浓度提取的DNA,分别以此为模板进行荧光定量PCR扩增,并利用CFX96 软件进行分析,得到动力学曲线及标准曲线。分别提取脂环酸芽孢杆菌标准菌株ATCC 49025、ATCC 49029和3株分离菌株,以及对照菌株*Bacillus subtilis*(ATCC 11774)、*Bacillus cereus*(ATCC 11778)的基因组DNA,按照优化的条件进行荧光定量PCR分析,通过Ct值验证其特异性。

1.3.7 RiboPrinter基因指纹图谱鉴定系统的鉴定

将经过PCR扩增产生大约134bp目的条带的59株脂环酸芽孢杆菌分离菌株接种于1656 BAM-SM琼脂平板表面,45℃培养24h,挑取新鲜菌落1~3个,悬浮于40μL样品缓冲液中,混匀后吸取30μL于样品杯中,热灭活后各加入5μL裂解液A和裂解液B,放置于RiboPrinter样品孔中并运行程序,选用EcoR I 酶切系统。杂交图谱选择与DuPont ID数据库进行比对,得出待测菌株信息。

2 结果与分析

2.1 脂环酸芽孢杆菌标准菌株和分离菌株液体培养物细菌数量的确定

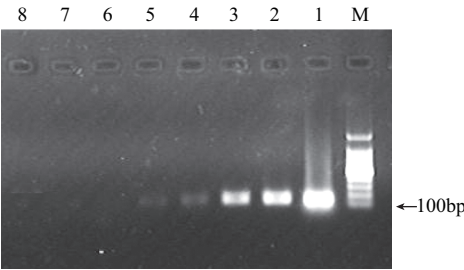
采用1.3.3.2节平板涂布计数的方法选取菌落数量在30~300之间的平板进行计数,结果如表1所示。结果表明挑取单个菌落接种于10mL 1656 BAM-SM液体培养基中45℃培养48h后,细菌数量能够达到10⁷CFU/mL。

表1 各菌株细菌平板计数结果				
Table 1 Plate count results for isolated and standard strains				
菌株	稀释倍数(各稀释倍数吸取0.1mL)			菌落总数/(CFU/mL)
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	
标准菌株 I ^a	多不可计	450	62	5.7×10 ⁷
	多不可计	320	52	
标准菌株 II ^b	多不可计	280	50	4.8×10 ⁷
	多不可计	310	46	
分离菌株 I	多不可计	360	68	7.2×10 ⁷
	多不可计	320	76	
分离菌株 II	多不可计	92	23	8.6×10 ⁶
	多不可计	80	18	
分离菌株 III	多不可计	540	60	6.5×10 ⁷
	多不可计	490	70	

注: a. ATCC 49025, b. ATCC 49029。

2.2 PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

2.2.1 特异性检测



M. DNA分子质量标准100bp; 1. ATCC 49025 PCR产物; 2. ATCC 49029 PCR产物; 3.分离菌株 I PCR产物; 4.分离菌株 II PCR产物; 5.分离菌株 III PCR产物; 6. ATCC 11774 PCR产物; 7. ATCC 11778 PCR产物; 8. ATCC 8739 PCR产物。

图1 16S rRNA保守区的PCR扩增结果
Fig.1 PCR amplification of conservative regions of 16S rRNA sequences from different strains

由图1可知,脂环酸芽孢杆菌标准菌株和分离菌株的PCR扩增产物为约134bp的条带,与预期目的DNA片段大小基本相符,而且对照标准菌株无此条带,表明该扩增片段具有特异性。

2.2.2 灵敏性检测

2.2.2.1 脂环酸芽孢杆菌标准菌株基因组

DNA最小检测量 A_{260nm}/A_{280nm} 在1.8~2.0之间的脂环酸芽孢杆菌标准菌株基因组DNA,经 A_{260nm} 计算DNA样品质量浓度后进行PCR扩增,脂环酸芽孢杆菌标准菌株PCR扩增产物为约134bp的条带,且随着模板质量浓度的降低,PCR产物的数量也随之减少(图2),表明脂环酸芽孢杆菌标准菌株基因组DNA为PCR扩增模板时,扩增出目的条带的最小模板量可以达到0.1ng/mL。

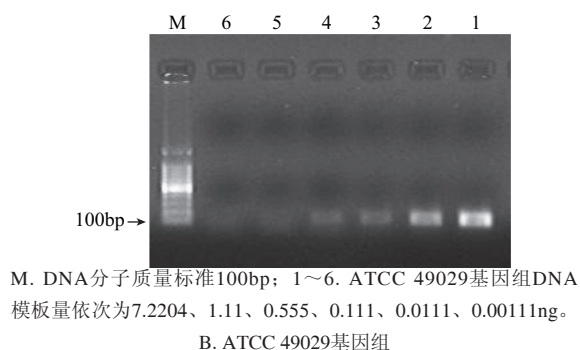
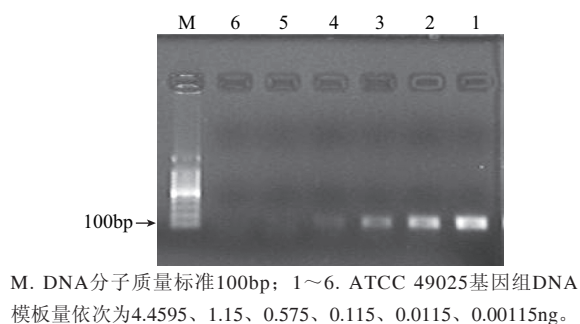


图2 不同质量浓度DNA模板的PCR扩增结果

Fig.2 PCR amplification with different DNA template concentrations

2.2.2.2 脂环酸芽孢杆菌标准菌株直接将菌体作为PCR模板的最小检测量

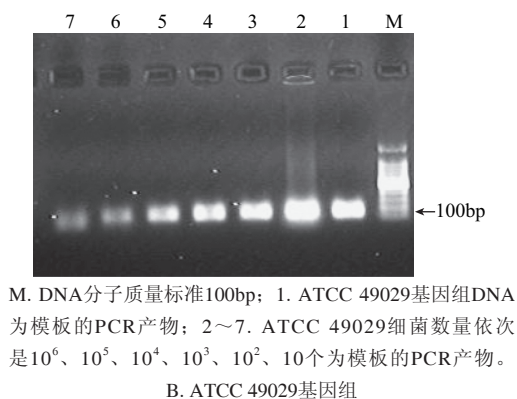
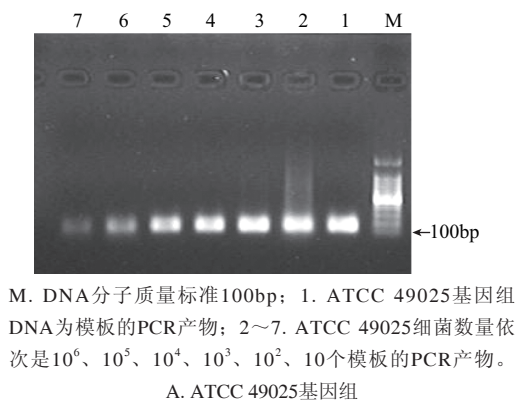


图3 不同浓度的菌体模板的PCR扩增

Fig.3 PCR amplification with different concentrations of bacterial cells as the template

由图3可知, 经平板涂布计数法确定的脂环酸芽孢杆菌菌悬液, 按照细菌个数梯度作为模板进行PCR扩增后, 脂环酸芽孢杆菌标准菌株PCR扩增产物为约134bp的条带, 且随着模板细菌个数的减少, PCR产物的数量也随之减少, 表明脂环酸芽孢杆菌标准菌株直接用菌体作为PCR扩增模板时, 扩增出目的条带的最小模板量可以达到10个。

2.2.2.3 脂环酸芽孢杆菌标准菌株不同浓度细菌悬液进行基因组DNA提取后作为模板的最小检测量

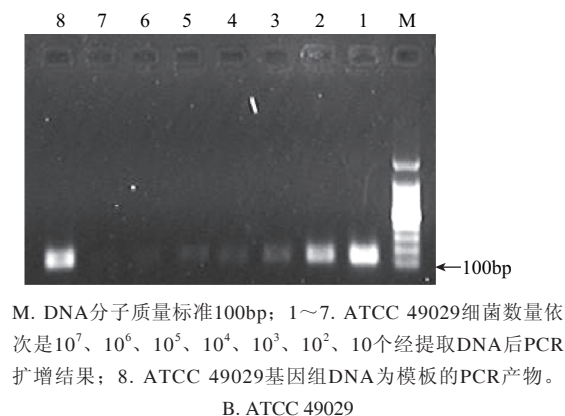
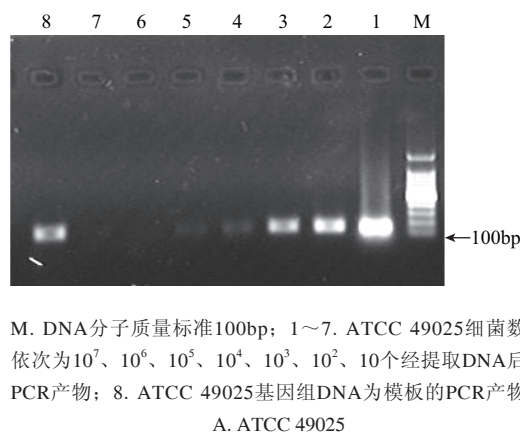


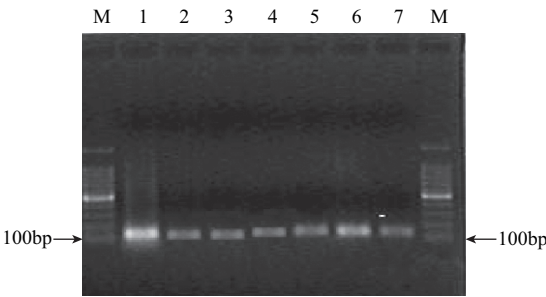
图4 不同浓度的菌悬液经提取DNA后的PCR扩增

Fig.4 PCR amplification with cell suspensions of different cell densities after DNA extraction

由图4可知, 脂环酸芽孢杆菌标准菌株PCR扩增产物为约134bp的条带, 且随着细菌个数的减少, 提取的基因组DNA数量也随之减少, PCR产物的数量也随之减少, 表明脂环酸芽孢杆菌按照细菌个数梯度进行基因组DNA提取后, 再进行PCR扩增, 扩增出目的条带的最小细菌数量为 10^3 个。

2.2.2.4 部分分离菌株的PCR检测与分析

由图5可知, 脂环酸芽孢杆菌分离菌株的PCR扩增产物为约134bp的条带, 与预期目的DNA片段大小基本相符, 表明该引物用于分离菌株目的片段的扩增也具有特异性。



M. DNA分子质量标准100bp; 1. ATCC 49025的PCR产物; 2~7.分离菌株的PCR产物。

图5 分离菌株16S rRNA保守区的PCR扩增结果

Fig.5 PCR amplification of conservative regions of 16S rRNA sequences from isolated strains

2.3 实时荧光PCR

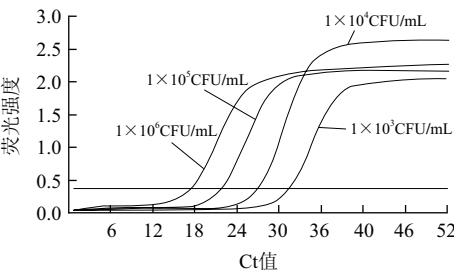
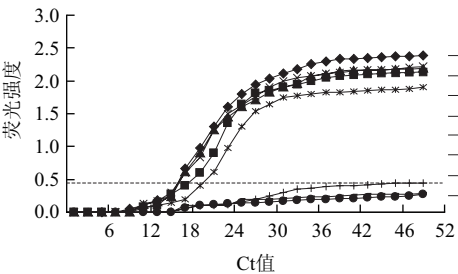


图6 标准模板的实时荧光定量PCR扩增曲线

Fig.6 Dynamic amplification curve of real-time PCR for standard template of ATCC 49025



1. ATCC 49025; 2. ATCC 49029; 3.分离株9~1号; 4.分离株8~1号; 5.分离株15号; 6. ATCC 11774; 7. ATCC 11778; 8.水。

图7 各菌株的实时荧光PCR结果

Fig.7 Real-time PCR amplification curves for isolated strains

将标准样品10倍倍比稀释, 取浓度依次为 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 CFU/mL, 提取DNA, 并分别以此作为模板进行荧光定量PCR扩增, 得到标准模板的S形实时PCR扩增曲线, 如图6所示。根据得到质粒标准模板的实时PCR扩增曲线绘制出标准曲线, 回归方程为: $y = -3.3971x + 27.313$, 相关系数为0.9996, 表明在稀释的范围内有很好的线性关系。以脂环酸芽孢杆菌标准菌株和分离菌株以及对照标准菌株纯培养物菌液的基因组DNA作为模板, 用优化好的荧光定量PCR条件进行荧光定量PCR检测, 结果发现2株标准菌株和3株分离菌株能

够扩增出S形曲线, 而其他对照菌株细菌及水不能扩增出S形曲线(图7), 说明探针CC16S-Probe对脂环酸芽孢杆菌有很强的特异性, 可以把脂环酸芽孢杆菌与其他属细菌菌株分开, 对快速诊断脂环酸芽孢杆菌具有实用价值。

2.4 RiboPrinter基因指纹图谱鉴定系统鉴定

在144个浓缩苹果汁和果汁生产企业生产用水的样品中, 对2.1、2.2节中所述59株脂环酸芽孢杆菌分离菌株进行RiboPrinter基因指纹图谱系统鉴定。挑取新鲜菌落1~3个悬浮于40μL缓冲液中, 预热后加入裂解液, 在RiboPrinter系统中自动运行, 自动酶切后得到的RiboPrinter鉴定结果显示, 59株分离菌株中有49株检测相似性在0.85以上(在鉴定系统中相似性在0.85以上即认为鉴定结果有效), 鉴定结果如表2所示, 表明49株分离菌株主要鉴定出3种脂环酸芽孢杆菌, 它们是酸土脂环酸芽孢杆菌*Alicyclobacillus acidoterrestris* (DUP-13109)37株、酸热脂环酸芽孢杆菌*Alicyclobacillus acidocaldarius* (DUP-13102)3株、脂环酸芽孢杆菌亚种*Alicyclobacillus species* (DUP-18112)9株, 标准菌株ATCC49025鉴定后的结果为DUP-13109; 标准菌株ATCC 27009鉴定后的结果是DUP-14515即*Alicyclobacillus acidocaldarius*, 统计结果见表3。

表2 RiboPrinter基因指纹图谱鉴定系统鉴定结果
Table 2 Identification of isolated strains by ribotyping

样品编号	泳道	DuPont ID	菌名称	相似性	酶切群	图谱
502-15-S-1	1				ECORI 502-15-S-1	
502-15-S-2	2	DUP-13109	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	0.89	ECORI 502-5-S-5	
502-15-S-3	3	DUP-13102	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	0.88	ECORI 502-15-S-3	
502-15-S-4	4				ECORI 502-15-S-4	
502-15-S-5	5				ECORI 502-15-S-5	
502-15-S-6	6	DUP-13109	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	0.86	ECORI 502-5-S-5	
502-15-S-7	7	DUP-13109	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	0.87	ECORI 502-5-S-5	
502-15-S-8	8	DUP-13109	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	0.87	ECORI 502-5-S-5	

表3 分离菌株核糖体基因分型鉴定统计表
Table 3 Ribotyping results of isolated strains

实验批次代码	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16	合计
DUP-10319	4	2	3	8	6	1	4	3	2	4	0	37
DUP-18112	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	5	9
DUP-13102	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3
其他												
可读结果数	4	3	3	8	7	1	5	3	3	5	7	49

3 结论与讨论

本实验所选用的上、下游引物, 是根据脂环酸芽孢杆菌16S rRNA基因的高度保守区1281~1434bp引用Connor等^[9]的设计, Connor等^[9]将脂环酸芽孢杆菌属中的6种及与其亲缘关系近的4株对照菌株的16S rRNA基因核

昔酸序列经DNASTar Megalign 5.01比对,发现该区域在脂环酸芽孢杆菌属高度保守具有种属特异性。笔者也将GenBank数据库中脂环酸芽孢杆菌属中12个16S rRNA基因核苷酸序列经DNASTar Megalign 5.01比对,得出了相同的结论。本实验对浓缩苹果汁生产企业的样品中分离得到的59株菌株,ATCC标准菌株以及ATCC非脂环酸芽孢杆菌标准菌株进行了引物特异性研究,均只能扩增出目标DNA,充分证实了引物的特异性。

rDNA指纹图谱最早于1986年由Grmont等^[16]首次报道,该法又称rRNA基因限制性图谱(rRNA gene restriction patterns)或核糖分型(ribotyping),是根据rRNA基因在长期的进化过程中的具有高度保守性的特点,使用对该基因序列特异的探针可与含有这些序列的DNA片段杂交,从而提供了一个只用一种探针分析多种细菌的通用方法^[17]。细菌的分子分型(molecular subtyping)是相对于传统分型而言的一种以DNA多态性为依据的分型方法,又称为细菌的分子流行病学分型(molecular epidemiological typing)或细菌指纹图谱(bacteria finger printing)。它随着分子生物学技术发展而兴起,综合运用PCR、限制性酶切、杂交、测序和电泳等多种分子生物学实验方法来揭示细菌遗传物质的多态性,结合相关流行病学信息,可以从分子水平获得待分析细菌间的关联度及时空分布。RiboPrinter系统是杜邦公司研发的一种全自动细菌鉴别系统,该系统建立在对核糖体DNA序列多态性分析之上,可以全自动完成细菌鉴定的一系列实验,包括细菌染色体DNA的提取、酶切、电泳、转膜、杂交、曝光、照相、比对分析,通过检测16S-23S-5S rDNA杂交信号而得出基因指纹特征,与数据库比对得出鉴定结果。RiboPrinter系统最大化避免了其他因素对实验的影响,且短时、高效,适用于常见细菌的快速鉴定。目前,RiboPrinter系统数据库中含有197个属、1400种、6009株菌种的杂交图谱,且每半年升级一次,数据库较为全面,对于常见细菌的检测非常准确。本研究中通过EcoR I酶,通过RiboPrinter系统对受试的59株分离菌株中有49株鉴定结果为脂环酸芽孢杆菌家族,且对应的相似度都在0.85以上,这49株分离菌株中共产生3个核糖体基因型组,与数据库中的DUP-13109、DUP-13102、DUP-18112相对应,由于菌株的数量和来源有限,对本地区脂环酸芽孢杆菌的核糖体基因型的地域分布特征还有待进一步验证。

RiboPrinter相比其他鉴定方法,使大量细菌鉴定步骤获得同步化、标准化,排除了人工操作差异的干扰。其优势在于:1)在整个菌种鉴定过程中,除了取平皿单菌落等最初环节,其他鉴定过程真正达到完全自动化。RiboPrinter系统不仅自动提取待测菌株的染色体DNA、完成酶切,还自动进行核酸电泳上样,并转到膜上,自动分子杂交、显色、拍照、运算处理,通过自动比对直接得出待测菌株的种名;2)鉴定速度快。经过8h即可以完成待测样品的检测,一台机器每天可以完成32个样品的检测;3)有效地将菌种信息量化,而且可以在鉴定到种的基础上进一步分类,非常适合于菌株的分型及溯源

分析^[18-20]。本研究先将待测菌进行PCR检测,在初步判定的基础上再进行RiboPrinter系统的鉴定,使得检测时间由原来进行生理生化鉴定的5~7d,缩短到1~2d之内完成,且鉴定结果真实可信、操作简单、重复性好、最大限度减少了操作方面的误差,有很大的应用价值,但是相对检测成本较高。

参考文献:

- [1] CEMY G, HENNLICH W, PORALLA K. Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling organism[J]. Lebensm Vnter Forsch, 1984, 179(3): 224-227.
- [2] WISOTZKEY J D, JURTSCHUK P J, FOX G E, et al. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov.[J]. Int J Syst Bacteriol, 1992, 42(2): 263-269.
- [3] IMPERIO T, VITI C, MARRI L. *Alicyclobacillus pohliae* sp.nov., a thermophilic, endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the north-west slope of Mount Melbourne(Antarctica)[J]. Int J Syst Evol Microbiol. 2008, 58(1): 221-225.
- [4] GOTO K, MATSUBARA H, MOCHIDA K, et al. *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing ω -cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea[J]. Int J Sys Evo Microbiol, 2002, 52(1): 109-113.
- [5] 杨康, 岳田利, 袁亚宏, 等. 利用顶空SPME-GC/MS联用技术检测苹果汁中嗜酸耐热菌代谢产物的研究[J]. 农产品加工, 2007(3): 8-11.
- [6] GOUWS P A, GIE L, PRETORIUSA. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate[J]. Int J Food Sens & Tech, 2005, 40(7): 789-792.
- [7] 陈世琼, 陈文峰, 胡小松, 等. 16S rDNA PCR-RFLP法快速鉴定分离自浓缩苹果汁生产线的脂环酸芽孢杆菌[J]. 中国食品学报, 2006, 6(2): 99-102.
- [8] GOTO K, MOCHIDA K, ASAHARA M, et al. Application of the hypervariable region of the 16S rDNA sequence as an index for the rapid identification of species in the genus *Alicyclobacillus*[J]. J Gen Appl Microbiol, 2002, 48(5): 243-250.
- [9] CONNOR C J, LUO H, BRIAN B, et al. Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. in juice products[J]. Int J Food Microbio, 2005, 99(3): 229-235.
- [10] YAMAZAKI K, TEDUKA H, INOUE N, et al. Specific primers for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by RT-PCR[J]. Letters in Applied Microbiology, 1996, 23(5): 350-354.
- [11] YAMAZAKI K, TEDUKA H, SHINANO H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages[J]. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60(3): 543-545.
- [12] BARRIOS-EGUILUZ K I, SALAZAR-BANDA G R, FUNES-HUACCA M E, et al. Sequence-specific electrochemical detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* DNA using electroconductive polymer-modified fluorine tin oxide electrodes[J]. Analyst, 2009, 134(2): 314-319.
- [13] 李建科, 冯再平, 仇农学. 耐热菌的竞争定量PCR检测方法优化与建立[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 375-380.
- [14] LIN M, AL-HOLY M, CHANG S S, et al. Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Int J Food Microbiol, 2005, 105(3): 369-376.
- [15] 奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 布伦特 R, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 4版. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 2005: 55-56.
- [16] GRMONT F, GRMONT P A D. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools[J]. Ann Inst Pasteur Microbio, 1986, 137(B): 165-175.
- [17] 邱捷琳, 袁秀梅. 细菌rDNA指纹图分析方法的研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 1997, 24(5): 305-308.
- [18] 刘秀梅, 周正, 郭云昌. 食源性沙门氏菌分离株自动化核糖体分型的研究[J]. 中国食品学报, 2006, 6(2): 1-5.
- [19] 杨捷琳, 袁辰刚, 顾鸣, 等. 进出口食品及饲料中沙门氏菌Ribotype分型研究[J]. 检验检疫科学, 2007(17): 16-19.
- [20] 李迎慧, 刘衡川, 姚景会, 等. 食源性单核细胞增生李斯特菌的自动化核糖体基因分型[J]. 现代预防医学, 2009, 36(2): 4162-4167.