

产气荚膜梭菌实时荧光PCR和实时荧光RPA检测方法的建立和比较

刘立兵^{1,2}, 李睿文³, 陈志敏¹, 王金凤¹, 孙晓霞^{1,2}, 袁万哲^{3,*}, 王建昌^{1,2,*}

(1.石家庄海关, 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;

3.河北农业大学动物医学院, 河北 保定 071001)

摘要: 根据产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 高度保守的 *plc* 基因, 设计特异性引物和探针, 建立产气荚膜梭菌的实时荧光聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和实时荧光聚合酶重组酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 检测方法。特异性分析结果表明, 建立的两种检测方法特异性强, 仅对产气荚膜梭菌有特异性扩增, 对其他细菌均无扩增; 两种方法的检出限均为 1.3 pg/μL。在人工污染模拟样品的检测中, 两种方法的检出限均为 1.0×10^2 CFU/mL; 实时荧光RPA需要 3~13 min 即可实现对所有阳性样品的检测, 而实时荧光PCR则需要 24~46 min (Ct值为 17.45~33.65)。实时荧光RPA方法在检测时间、操作方便性和仪器便携性方面, 明显优于实时荧光PCR方法。本研究建立的实时荧光PCR和实时荧光RPA检测方法特异性强、灵敏度高、操作方便, 为实验设备装备较差的基层检测实验室和疫情突发现场产气荚膜梭菌的快速检测提供有效技术手段。

关键词: 产气荚膜梭菌; *plc* 基因; 实时荧光聚合酶重组酶扩增; 实时荧光聚合酶链式反应

Development and Comparison of Real-Time Polymerase Chain Reaction and Real-Time Recombinase Polymerase Amplification Assays for Detection of *Clostridium perfringens* in Food

LIU Libing^{1,2}, LI Ruiwen³, CHEN Zhimin¹, WANG Jinfeng¹, SUN Xiaoxia^{1,2}, YUAN Wanzhe^{3,*}, WANG Jianchang^{1,2,*}

(1. Shijiazhuang Customs District, Shijiazhuang 050051, China;

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

3. College of Veterinary Medicine, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: To develop a rapid detection method for *Clostridium perfringens* using real-time polymerase chain reaction (PCR) or real-time recombinase polymerase amplification (RPA), we designed specific primers and probe based on the conserved sequence of the *plc* gene of *C. perfringens*. The results of specificity analysis showed that the two established methods specifically detected *C. perfringens* but not other bacteria. The sensitivity of both methods was 1.3 pg/μL and the limit of detection for *C. perfringens* in artificially contaminated chicken and milk samples was 1.0×10^2 CFU/mL. The positive samples could be detected in 3–13 min by real-time RPA, and at least 24–46 min by real-time PCR (Ct = 17.45–33.65). Real-time RPA was better than real-time PCR with respect to analysis time, easiness of operation and portability. In conclusion, thanks to their high specificity and sensitivity and easy operation, real-time RPA and real-time PCR provided an effective technical approach for the rapid detection of *C. perfringens*.

Keywords: *Clostridium perfringens*; *plc* gene; real-time recombinase polymerase amplification; real-time polymerase chain reaction
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181026-307

中图分类号: R155.5; Q93.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2020) 04-0268-05

收稿日期: 2018-10-26

基金项目: 国家质检总局科技计划项目 (2016IK107); 河北省高校百名优秀创新人才支持计划项目 (SLRC2017039); 河北省现代农业产业技术体系羊产业创新团队项目 (HBCT2018140204)

第一作者简介: 刘立兵 (1986—) (ORCID: 0000-0001-6690-0472), 男, 兽医师, 硕士, 研究方向为食源性致病菌、动物源性食品掺假的分子生物学检测。E-mail: bing521564@163.com

*通信作者简介: 袁万哲 (1978—) (ORCID: 0000-0002-2663-5368), 男, 教授, 博士, 研究方向为动物疫病的检测和致病机理。E-mail: yuanwanzhe@126.com

王建昌 (1981—) (ORCID: 0000-0003-0921-0218), 男, 高级兽医师, 博士, 研究方向为食源性致病菌、动物源性食品掺假的分子生物学检测。E-mail: jianchangwang1225@126.com

引文格式:

刘立兵, 李睿文, 陈志敏, 等. 产气荚膜梭菌实时荧光PCR和实时荧光RPA检测方法的建立和比较[J]. 食品科学, 2020, 41(4): 268-272. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181026-307. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Libing, LI Ruiwen, CHEN Zhimin, et al. Development and comparison of real-time polymerase chain reaction and real-time recombinase polymerase amplification assays for detection of *Clostridium perfringens* in food[J]. Food Science, 2020, 41(4): 268-272. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181026-307. <http://www.spkx.net.cn>

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*), 又称为魏氏梭菌 (*Clostridium welchii*), 是一种革兰氏阳性厌氧菌, 也是一种人兽共患病病原体^[1]。根据产气荚膜梭菌分泌的 α 、 β 、 ϵ 、 ι 四种主要毒素, 可以将之分为A、B、C、D和E型^[2-3]。不同型的产气荚膜梭菌可以导致不同的疾病, 均具有发病急、死亡率高特点^[4]。产气荚膜梭菌广泛分布在土壤、污水等自然环境中, 引起的食物中毒事件在我国非常严重, 摄入被产气荚膜梭菌污染的食物后, 能够引起恶心、腹泻等临床症状, 从而引发肌坏死性肌炎^[5]; 羔羊、仔猪、牛犊、雏鸡等动物感染产气荚膜梭菌, 会导致坏死性肠炎、肠毒血症等疾病^[6]。产气荚膜梭菌污染给人类健康和畜牧业健康发展造成了巨大的危害, 因此对产气荚膜梭菌的快速检测对于疫病防控和食品安全保障具有重要意义。

目前, 针对产气荚膜梭菌的传统检测方法主要有分离培养、细胞素方法、卵磷脂水解实验和反向间接凝集实验等^[7-9], 存在检测周期长、技术要求高、过程繁琐等不足。随着分子生物学技术的发展, 一系列针对产气荚膜梭菌的新方法被建立并得到了广泛应用。孙佳芝等^[10]建立了灵敏度为4.57 $\mu\text{g/L}$ 的双抗夹心酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测方法; 鲍长磊^[11]建立了产气荚膜梭菌不同毒素型多重聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和 α 毒素抗体ELISA检测方法; 石玉玲等^[12]根据16S rRNA基因建立了实时荧光PCR方法, 灵敏度则为 9×10^2 CFU/mL; 刘哲等^[13]建立了特异性检测产气荚膜梭菌的环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 方法, 灵敏度为 2.92×10^2 CFU/mL。ELISA方法检测灵敏度不高, 试剂盒价格昂贵, 且需要特异性设备; LAMP方法需要4~6条引物, 设计复杂, 且极易造成假阳性结果^[14]。因此, 建立一种反应快速、操作简便、灵敏性高的检测方法对于产气荚膜梭菌的有效控制依然具有重要意义。

聚合酶重组酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 是一种等温扩增技术, 主要依赖于重组酶、具有聚合链置换功能的DNA聚合酶、单链结合蛋白3种核心蛋白实现对靶基因的等温扩增^[15]。在反应过程中, 重组酶结合引物形成蛋白-DNA混合物并启动寻找模板DNA上的同源序列。同源序列定位后, 则会引发链置换反应, 引物结合到对应模板上, 具有链置换功能的

DNA聚合酶进而从引物3'末端开始启动DNA合成, 实现对靶基因的指数级扩增^[9]。RPA能够在37~42 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下20 min内完成对靶基因的有效扩增, 特别适用于体外诊断、兽医、食品安全、生物安全、农业等领域, 目前已经被广泛应用于多种食源性致病菌的快速检测^[16-18]。

本研究根据编码A~E型产气荚膜梭菌 α 毒素的 plc 基因的高度保守区域, 设计特异性引物和探针, 建立实时荧光PCR和实时荧光RPA方法, 并使用人工污染样品对两种方法进行验证和比较, 以期对食品中产气荚膜梭菌的快速检测提供有效技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本实验所用菌种见表1。

表1 实验菌株
Table 1 Bacterial strains used in this study

菌株名称	菌株来源
产气荚膜梭菌 (<i>C. perfringens</i>)	ATCC13124
产气荚膜梭菌C型 (<i>C. perfringens</i>)	CVCC58
产气荚膜梭菌D型 (<i>C. perfringens</i>)	CVCC81
产气荚膜梭菌 (<i>C. perfringens</i>)	本实验室分离
产气荚膜梭菌 (<i>C. perfringens</i>)	本实验室分离
产气荚膜梭菌 (<i>C. perfringens</i>)	本实验室分离
产气荚膜梭菌 (<i>C. perfringens</i>)	本实验室分离
索氏梭菌 (<i>C. sordellii</i>)	CICC22950
艰难梭菌 (<i>C. difficile</i>)	CICC22951
双酶梭菌 (<i>C. bifementans</i>)	CICC22952
生孢梭菌 (<i>C. sporogenes</i>)	CICC22953
拜氏梭菌 (<i>C. beijerinckii</i>)	CICC22954
阪崎肠杆菌 (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	ATCC29544
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC6538
空肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter jejuni</i>)	ATCC33291
副溶血性弧菌 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	ATCC17802
沙门氏菌 (<i>Salmonella</i>)	CICC22956
蜡样芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)	CMCC63301
单核细胞性李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC19114
大肠埃希氏菌O157:H7 (<i>Escherichia coli</i> O157:H7)	CICC21530
宋氏志贺氏菌 (<i>Shigella sonnei</i>)	ATCC51592
绿脓杆菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	ATCC9027
地衣芽孢杆菌 (<i>B. licheniformis</i>)	ATCC14580
铜绿假单胞菌 (<i>P. aeruginosa</i>)	ATCC9027
链球菌 (<i>Streptococcus</i>)	本实验室分离
铜绿假单胞菌 (<i>P. aeruginosa</i>)	本实验室分离
巴氏葡萄球菌 (<i>Staphylococcus pasteurii</i>)	本实验室分离

注: ATCC.美国模式菌种收集中心; CICC.中国工业微生物菌种保藏管理中心; CMCC.中国医学微生物菌种保藏管理中心; CVCC.中国工业微生物菌种保藏管理中心。

胰酶亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂、液体硫乙醇酸盐培养基、0.1%蛋白胨水 北京陆桥技术股份有限公司；细菌基因组DNA提取试剂盒 天根生化科技（北京）有限公司；Premix Ex Taq 宝生物工程（大连）有限公司；TwistAmp™ *exo* kit 英国TwistDx公司。

1.2 仪器与设备

7500 实时荧光PCR仪 美国ABI公司；Genie III等温扩增荧光检测系统 英国OptiGene公司；NanoDrop 2000C超微量分光光度计 美国Thermo Scientific公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计

参考GenBank中登录的产气荚膜梭菌*plc*基因（登录号：NC_008261.1），比对确定特异性保守序列，设计特异性引物和探针。所有引物探针均由生工生物工程（上海）有限公司合成，序列信息见表2。

表2 实验所用引物及探针

方法	引物名称	序列 (5'-3')	长度/bp
实时荧光RPA	RPA-F	TAGTTGGGATGATTGGGATTATGCAGCAAAGGT	193
	RPA-R	CATGTAGTCATCTGTTCCAGCATCTTTCTCACC	
	<i>exo</i> 探针	AGCTAACTCTCAAAAAGGAACAGCGGGATATA (FAM-dT) (THF) (BHQ1-dT) ATAGATTCTTACACGA 3' spacer	
实时荧光PCR	PCR-F	TTGGAGAGGCTATGCACTAATTT	89
	PCR-R	CTTAACATGTCCTGCGCTATCA	
	TaqMan Probe	FAM-CTCCATATCATCTCTGCTAATGTTACTGCCG-BHQ1	

1.3.2 基因组DNA的提取

将产气荚膜梭菌（ATCC 13124）接种到液体硫乙醇酸盐培养基培养基中，37℃厌氧培养20 h。取纯培养菌液1 mL，加入到1.5 mL离心管中，11 500 r/min离心1 min，收集沉淀。采用细菌基因组DNA提取试剂盒进行DNA的提取，使用NanoDrop 2000 C超微量分光光度计测定浓度，-20℃保存备用。

1.3.3 实时荧光RPA方法的建立

以1.3.2节制备的产气荚膜梭菌DNA为模板，采用引物RPA-F/R和*exo*探针，使用TwistAmp™ *exo* kit配制实时RPA反应体系（50 μL）：RPA-F/R（10 μmol/L）各2.1 μL，*exo*探针（10 μmol/L）0.6 μL，Rehydration Buffer 29.5 μL，DNA模板1 μL，ddH₂O 12.2 μL，将其混匀，加入到装有冻干酶制剂的反应管中，吹吸至完全溶解，再加入2.5 μL 280 mmol/L MgAc，盖紧管盖，瞬时离心并涡旋后，放入Genie III中，39℃反应20 min。在扩增过程实时收集检测荧光信号，目的基因扩增后荧光信号会明显增加。

1.3.4 实时荧光PCR方法的建立

以1.3.2节制备的产气荚膜梭菌DNA为模板，采用引物PCR-F/R和探针TaqMan Probe建立实时荧光PCR体系为（25 μL）：Premix Ex Taq 12.5 μL，PCR-F/R（10 μmol/L）各1.0 μL，PCR-Probe（10 μmol/L）1 μL，DNA模板1 μL，补水至25 μL。将上述体系充分振荡混匀后，瞬时离心，放入7500实时荧光PCR仪中，反应程序为：95℃预变性30 s；95℃变性5 s，60℃延伸35 s，40个循环，60℃收集荧光信号。

1.3.5 特异性和灵敏度实验

以表1所示菌株DNA为模板，根据1.3.3节和1.3.4节建立的方法进行检测，分析实时荧光RPA和实时荧光PCR方法的特异性。

提取1 mL纯培养产气荚膜梭菌的基因组DNA，并测定其浓度，进行10倍倍比稀释，以不同稀释度的基因组DNA作为模板，根据1.3.3节和1.3.4节建立的方法进行检测，分析比较实时荧光RPA和实时荧光PCR方法的灵敏度。

1.3.6 对人工污染样品的检测比较

使用经GB 4789.13—2012《食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验》检测确定不含产气荚膜梭菌的奶粉、鸡肉、牛肉和羊肉样品，分别取25 g加入到225 mL灭菌的0.1%蛋白胨水中，拍打均匀。取出9 mL样品均液，加入一定浓度的产气荚膜梭菌纯培养液，使之浓度为 1.0×10^6 CFU/mL。拍打混匀，取1 mL人工污染产气荚膜梭菌的样品均液，用未污染产气荚膜梭菌的样品均液进行10倍倍比稀释，每个稀释度分别取1 mL进行核酸提取，并以之作为模板分别通过实时荧光RPA和实时荧光PCR方法进行检测。同时取各个稀释的样品菌液按照GB 4789.13—2012方法进行平板计数，将3种方法的检测结果进行比较。

2 结果与分析

2.1 实时荧光RPA和实时荧光PCR方法的特异性

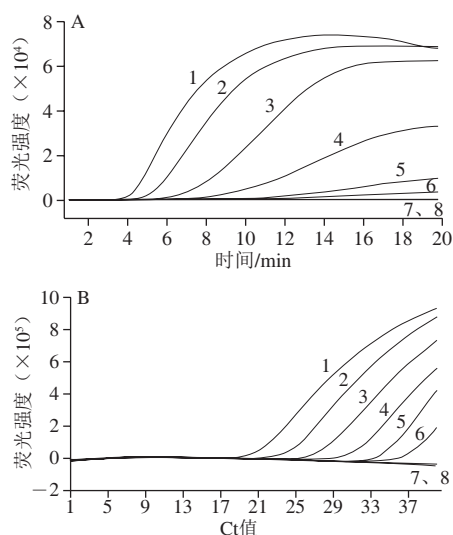
通过建立的实时荧光RPA和实时荧光PCR方法，分别以产气荚膜梭菌基因组DNA和表1中的其他细菌基因组DNA为模板，进行特异性实验分析。表3表明，两种方法仅产气荚膜梭菌有特异性扩增曲线，而其他菌株均无扩增曲线。上述结果表明建立的实时荧光RPA和实时荧光PCR方法均具有良好的特异性。

表3 实时荧光RPA和实时荧光PCR方法特异性分析
Table 3 Specificities of real-time RPA and real-time PCR assays

菌种名称	实时荧光RPA 检测结果	实时荧光PCR 检测结果
产气荚膜梭菌 (<i>C. perfringens</i>)	+	+
产气荚膜梭菌C型 (<i>C. perfringens</i>)	+	+
产气荚膜梭菌D型 (<i>C. perfringens</i>)	+	+
产气荚膜梭菌 (<i>C. perfringens</i>)	+	+
产气荚膜梭菌 (<i>C. perfringens</i>)	+	+
产气荚膜梭菌 (<i>C. perfringens</i>)	+	+
产气荚膜梭菌 (<i>C. perfringens</i>)	+	+
索氏梭菌 (<i>C. sordellii</i>)	—	—
艰难梭菌 (<i>C. difficile</i>)	—	—
双酶梭菌 (<i>C. bifermentans</i>)	—	—
生孢梭菌 (<i>C. sporogenes</i>)	—	—
拜氏梭菌 (<i>C. beijerinckii</i>)	—	—
阪崎肠杆菌 (<i>E. sakazakii</i>)	—	—
金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>)	—	—
空肠弯曲杆菌 (<i>C. jejuni</i>)	—	—
副溶血性弧菌 (<i>V. parahaemolyticus</i>)	—	—
沙门氏菌 (<i>Salmonella</i>)	—	—
蜡样芽孢杆菌 (<i>B. cereus</i>)	—	—
单核细胞性李斯特菌 (<i>L. monocytogenes</i>)	—	—
大肠埃希氏菌O157:H7 (<i>E. coli</i> O157:H7)	—	—
宋氏志贺氏菌 (<i>S. sonnei</i>)	—	—
绿脓杆菌 (<i>P. aeruginosa</i>)	—	—
地衣芽孢杆菌 (<i>B. licheniformis</i>)	—	—
铜绿假单胞菌 (<i>P. aeruginosa</i>)	—	—
链球菌 (<i>Streptococcus</i>)	—	—
铜绿假单胞杆菌 (<i>P. aeruginosa</i>)	—	—
巴氏葡萄球菌 (<i>S. pasteurii</i>)	—	—

注：+，阳性；—，阴性。

2.2 实时荧光RPA和实时荧光PCR的灵敏度



1~7.产气荚膜梭菌基因组DNA质量浓度分别为 1.3×10^5 、 1.3×10^4 、 1.3×10^3 、 1.3×10^2 、 1.3×10^1 、 1.3×10^0 、 1.3×10^{-1} pg/ μ L；8. ddH₂O。

图1 产气荚膜梭菌实时荧光RPA (A) 和实时荧光PCR (B) 方法的敏感性
Fig. 1 Sensitivities of real-time RPA (A) and real-time PCR (B) for *C. perfringens* detection

测定所提取的产气荚膜梭菌基因组DNA为 1.3×10^5 pg/ μ L，将其10倍倍比稀释至 1.3×10^{-1} pg/ μ L，分别进行实时荧光RPA和实时荧光PCR检测。结果表明，实时荧光RPA和实时荧光PCR方法的检出限一致，均为1.3 pg/ μ L（图1）。

2.3 人工污染样品检测结果

对于人工污染产气荚膜梭菌的奶粉、鸡肉、牛肉和羊肉样品，每个稀释度取1 mL模拟污染液，提取核酸，分别进行实时荧光RPA和实时荧光PCR方法检测，与按照国家标准（GB 4789.13—2012）的检测进行对比分析。结果表明，实时荧光RPA和实时荧光PCR方法的最低检出限均为 1.0×10^2 CFU/mL，与标准GB 4789.13—2012检测方法的灵敏度一致（表4）。实时荧光RPA能够在20 min内完成检测，仅需要3~13 min即可实现对所有阳性样品的检测，而实时荧光PCR完成整个反应则需要55 min左右，需要24~46 min（Ct值为17.45~33.65）实现对阳性样品的检测。实时荧光RPA方法在阳性样品的确认时间上明显优于实时荧光PCR方法，而在标准检测中，需要在36℃进行20~24 h的增菌，在检测时间方面较前两种方法更长。

表4 人工污染样品检测结果
Table 4 Results of detection of artificially contaminated samples

样品	检测方法	污染量/(CFU/mL)						
		1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁵	1.0×10 ⁴	1.0×10 ³	1.0×10 ²	1.0×10 ¹	1.0×10 ⁰
奶粉	实时荧光RPA法定值/min	3.08	3.93	5.11	7.42	11.06	—	—
	实时荧光PCR法Ct值	17.45	18.20	21.19	29.15	32.28	—	—
	GB 4789.13—2012法定值/CFU	9.6×10 ⁵	8.9×10 ⁴	7.2×10 ³	7.5×10 ²	2.5×10 ¹	—	—
鸡肉	实时荧光RPA法定值/min	3.04	4.08	5.78	7.33	12.78	—	—
	实时荧光PCR法Ct值	18.21	20.34	24.47	28.32	33.65	—	—
	GB 4789.13—2012法定值/CFU	9.5×10 ⁵	8.6×10 ⁴	7.3×10 ³	6.8×10 ²	9.7×10 ¹	—	—
牛肉	实时荧光RPA法定值/min	3.25	3.80	5.53	7.83	10.92	—	—
	实时荧光PCR法Ct值	17.44	19.55	23.27	28.45	33.78	—	—
	GB 4789.13—2012法定值/CFU	9.1×10 ⁵	7.9×10 ⁴	6.8×10 ³	7.5×10 ²	7.9×10 ¹	—	—
羊肉	实时荧光RPA法定值/min	3.50	3.93	5.40	7.80	11.70	—	—
	实时荧光PCR法Ct值	18.03	19.89	23.46	29.22	34.10	—	—
	GB 4789.13—2012法定值/CFU	8.9×10 ⁵	7.8×10 ⁴	6.5×10 ³	6.9×10 ²	8.7×10 ¹	—	—

注：—，阴性。

3 讨论

食源性致病菌是影响食品安全的重要因素之一。由产气荚膜梭菌引起的食物中毒报道事件逐年上升，对人类的健康造成了严重影响。建立一种快速、特异、精准的产气荚膜梭菌检测方法，对人类的健康和畜牧业的发展有重要意义。本研究采用实时荧光RPA技术检测产气荚膜梭菌。实时荧光RPA反应是基于RPA反应体系中加入exo探针，扩增过程中产生的荧光信号通过荧光检测仪实现实时检测，作为一种等温扩增技术，它具有特异性强、灵敏性高、反应快速等优点，在细菌检测方面、病

毒检测等方面应用广泛^[19-23]。实时荧光PCR是PCR体系中加入荧光基团,利用荧光信号的积累实时监测整个PCR过程,通过标准曲线对未知模板进行分析的技术,该技术以其特异性强、灵敏度高等优点,在食源性致病菌检测^[12,24-25]、转基因产品检测^[26],以及致病性钩端螺旋体^[27]和兔热病杆菌检测^[28]中都得到广泛的应用。

*plc*基因编码的 α 毒素是产气荚膜梭菌的主要外毒素,存在于A~E型产气荚膜梭菌中,是导致畜禽坏死性肠炎、肠毒血症、气性坏疽等疾病的主要致死因素,其毒性最强,是国内外研究产气荚膜梭菌最多的毒素^[29-30]。本研究根据*plc*基因设计特异性的引物和探针,建立的实时荧光RPA和实时荧光PCR方法对产气荚膜梭菌具有很好的特异性,不同类型的标准株和分离株均得到了特异性扩增。对于人工污染样品,两种方法的最低检出限均为 1.0×10^2 CFU/g,但实时荧光RPA方法的检测时间(20 min)明显少于实时荧光PCR方法(55 min),极大地缩短了实际样品的检测周期,更适合于实际样品的快速检测。

本研究使用Genie III实时荧光RPA运行设备,大小为25 cm \times 16.5 cm \times 8.5 cm,质量仅为1.75 kg左右,具有体积小、便携式的优点,而且适用锂电池充电工作,可以维持设备24 h的运行,非常适合实验设备相对落后的基层检测部门,以及食源性疫情的现场检测,为产气荚膜梭菌的快速现场诊断提供了有效的技术手段。

参考文献:

- GARCIA J P, BEINGESSER J, FISHER D J, et al. The effect of *Clostridium perfringens* type C strain CN3685 and its isogenic beta toxin null mutant in goats[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 157(3/4): 412-419. DOI:10.1016/j.vetmic.2012.01.005.
- 李伟杰, 于建慧, 魏财文, 等. 产气荚膜梭菌毒素型菌落多重PCR方法的建立及应用[J]. 西北农业学报, 2016, 25(6): 823-827.
- RADHIKA B, KUMAR N V, SREENIVASULU D. Detection of *Clostridium perfringens* alpha toxin gene in lambs by loop mediated isothermal amplification[J]. Veter Inary World, 2016, 9(1): 60-64. DOI:10.14202/vetworld.2016.60-64.
- 赵凤菊, 关淼, 李井春, 等. 产气荚膜梭菌毒素基因分型PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 动物医学进展, 2017, 38(3): 59-63.
- SHREYA D, UPPALAPATI S R, KINGSTON J J, et al. Immunization with recombinant bivalent chimera r-Cpae confers protection against alpha toxin and enterotoxin of *Clostridium perfringens* type A in murine model[J]. Molecular Immunology, 2015, 65(1): 51-57. DOI:10.1016/j.molimm.2015.01.005.
- LOW L Y, HARRISON P F, LIN Y H, et al. RNA-seq analysis of *virR* and *revR* mutants of *Clostridium perfringens*[J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 391-421. DOI:10.1186/s12864-016-2706-2.
- WATSON G N. The assessment and application of a bacteriocin typing scheme for *Clostridium perfringens*[J]. Journal of Hygiene, 1985, 94(1): 69-79. DOI:10.1017/s0022172400061143.
- 陈兴祥, 薛家宾, 黄克和, 等. A型产气荚膜梭菌 α 毒素的提纯试验[J]. 畜牧与兽医, 2002, 34(3): 26-27. DOI:10.3969/j.issn.0529-5130.2002.03.012.
- STRINGER M F, TURNBULL P C B, GILBERT R J. Application of serological typing to the investigation of outbreaks of *Clostridium perfringens* food poisoning, 1970-1978[J]. Journal of Hygiene, 1980, 84(3): 443-456. DOI:10.1017/s002217240002698x.
- 孙佳芝, 王新桐, 刘雪慧, 等. 产气荚膜梭菌 α 毒素双抗体夹心ELISA检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(6): 930-935.
- 鲍长磊. 产气荚膜梭菌不同毒素型多重PCR和 α 毒素抗体ELISA检测方法的建立及初步应用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- 石玉玲, 曾兰兰, 陈丽丹, 等. 产气荚膜梭菌实时荧光PCR方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(3): 389-392. DOI:10.3969/j.issn.1009-0002.2010.03.021.
- 刘哲, 马晓燕, 张会彦, 等. 环介导等温扩增技术快速检测产气荚膜梭菌的研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(4): 168-174. DOI:10.3969/j.issn.1009-7848.2012.04.025.
- TORRES C, VITALIS E A, BAKER B R, et al. LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 1-7. DOI:10.1186/1471-2105-12-240.
- PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): 1115-1121. DOI:10.1371/journal.pbio.0040204.
- 刘立兵, 南江珠, 孙晓霞, 等. 食品中蜡芽孢杆菌实时荧光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. DOI:10.3969/j.issn.2095-6002.2018.01.012.
- LIU H B, ZANG Y X, DU X J, et al. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella* bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(9): 7016-7025. DOI:10.3168/jds.2017-12566.
- YANG H, WEI S, GOONERATNE R, et al. Development of a recombinase polymerase amplification assay for *Vibrio parahaemolyticus* detection with an internal amplification control[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2018, 64(4): 223-230. DOI:10.1139/cjm-2017-0504.
- SAKAI K, TRABASSO P, MORETTI M L, et al. Identification of fungal pathogens by visible microarray system in combination with isothermal gene amplification[J]. Mycopathologia, 2014, 178(1/2): 11-26. DOI:10.1007/s11046-014-9756-2.
- WANG J C, YUAN W Z, HAN Q A, et al. Reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Journal of Virological Methods, 2017, 243: 55-60. DOI:10.1016/j.jviromet.2017.01.017.
- WANG J C, WANG J C, LIU L B, et al. Development of a real-time recombinase polymerase amplification assay for rapid and sensitive detection of porcine circovirus 2[J]. Archives of Virology, 2017, 162(8): 2293-2296. DOI:10.1007/s00705-017-3368-3.
- BOYLE D S, MCNERNEY R, TENG L H, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* by recombinase polymerase amplification[J]. PLoS ONE, 2014, 9(8): e103091. DOI:10.1371/journal.pone.0103091.
- BOYLE D S, LEHMAN D A, LORRAINE L, et al. Rapid detection of HIV-1 proviral DNA for early infant diagnosis using recombinase polymerase amplification[J]. Mbio, 2013, 4(2): 49-52. DOI:10.1128/mbio.00135-13.
- 王建昌, 王金凤, 段永生, 等. 基于内参的大肠埃希氏菌O157:H7实时荧光定量PCR快速检测方法的建立[J]. 食品科学, 2015, 36(20): 226-231. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-201520044.
- 张惟材. 实时荧光定量PCR[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013.
- 邓婷婷, 黄文胜, 程奇, 等. 重组酶聚合酶扩增技术检测转基因水稻中的*Cry1Ab/c*基因[J]. 中国食品学报, 2015, 15(3): 187-193.
- AHMED A, LINDEN H V D, HARTSKEERL R A. Development of a recombinase polymerase amplification assay for the detection of pathogenic leptospir[J]. International Journal of Environmental Research & Public Health, 2014, 11(5): 4953-4964. DOI:10.3390/ijerph110504953.
- EULER M, WANG Y, OTTO P, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella tularensis*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(7): 2234-2238. DOI:10.1128/JCM.06504-11.
- NAGPAL R, OGATA K, TSUJI H, et al. Sensitive quantification of *Clostridium perfringens* in human feces by quantitative real-time PCR targeting alpha-toxin and enterotoxin genes[J]. BMC Microbiology, 2015, 15(1): 219-230. DOI:10.1186/s12866-015-0561-y.
- 郑晓星, 解真真, 任晓峰, 等. 产气荚膜梭菌*plc*基因的原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. 中国兽医学报, 2012(10): 1048-1052.