

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240920002

引用格式: 张跃川, 王青龙, 李爽, 等. 实时荧光聚合酶链式反应法快速鉴定阪崎克罗诺杆菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(1): 151–157.

ZHANG YC, WANG QL, LI S, *et al.* Rapid identification of *Cronobacter sakazaki* by real-time fluorescence polymerase chain reaction [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(1): 151–157. (in Chinese with English abstract).

实时荧光聚合酶链式反应法快速鉴定 阪崎克罗诺杆菌

张跃川, 王青龙, 李爽, 王雨婷, 李庆尧, 张爽, 吴林, 袁晓雨, 胡智恺*

[北京市食品检验研究院(北京市食品安全监控和风险评估中心), 北京 100094]

摘要: **目的** 根据 DNA 旋转酶 B 亚基(*gyrB*)基因设计特异性的引物探针, 建立一种能够快速准确鉴定阪崎克罗诺杆菌的实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)方法。**方法** 寻找并在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)中下载目标基因序列, 使用 DNAMAN 进行序列比对, Primer Express 软件设计引物探针。通过特异性实验、绝对灵敏度、相对灵敏性实验、抗干扰实验对所建立方法进行方法验证。选择本实验室保存的 36 种 40 株食品中常见致病菌的标准菌株进行特异性验证。**结果** 多维度特异性验证实验结果显示该方法能够特异性地检测出阪崎克罗诺杆菌, 对亲缘关系较近的其他克罗诺杆菌及食品中较为常见的致病菌均无非特异性扩增。DNA 检测灵敏度可以达到 0.0100 ng/ μ L, 相对灵敏度可以达到 10^3 CFU/mL。抗干扰实验结果显示, 将干扰菌和干扰菌 DNA 分别与阪崎克罗诺杆菌和阪崎克罗诺杆菌 DNA 进行混合检测, 对检测结果无显著影响, 说明该方法抗干扰能力良好。**结论** 本研究所设计的引物探针在实时荧光 PCR 方法下对食品样品中阪崎克罗诺杆菌的检测具有特异、快速、敏感和抗干扰的特点, 可为以后食品中阪崎克罗诺杆菌的检测提供技术支撑。

关键词: 实时荧光聚合酶链式反应; 阪崎克罗诺杆菌; *gyrB* 基因

Rapid identification of *Cronobacter sakazaki* by real-time fluorescence polymerase chain reaction

ZHANG Yue-Chuan, WANG Qing-Long, LI Shuang, WANG Yu-Ting, LI Qing-Yao,
ZHANG Shuang, WU Lin, YUAN Xiao-Yu, HU Zhi-Kai*

[Beijing Institute of Food Inspection and Research (Beijing Municipal Center for
Food Safety Monitoring and Risk Assessment), Beijing 100094, China]

ABSTRACT: Objective To establish subsequently the real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) method that could quickly and accurately identify *Cronobacter sakazaki*, and design specific primer probes based on

收稿日期: 2024-09-20

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1100902)

第一作者: 张跃川(1990—), 男, 工程师, 主要研究方向为食品检验检测。E-mail: 292273357@qq.com

*通信作者: 胡智恺(1991—), 男, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品检验检测。E-mail: 18010289057@163.com

the DNA *gyrB* subunit gene. **Methods** The target gene sequences were searched and downloaded from National Center for Biotechnology Information (NCBI), sequence comparison was performed using DNAMAN, and primer probes were designed by Primer Express software. This established real-time quantitative PCR method was validated through specificity tests, absolute sensitivity tests, relative sensitivity tests and anti-interference tests. The 40 common pathogenic bacteria standard strains were selected for specificity validation. **Results** The results of multi-dimensional specificity validation showed that the method was able to specifically detect *Cronobacter sakazakii*, and there was no non-specific amplification for other closely related *Cronobacter* and common pathogenic bacteria in food. DNA detection sensitivity was 0.0100 ng/ μ L, while relative sensitivity was 10^3 CFU/mL. The anti-interference experiment results showed that mixing interfering bacteria and their DNA with *Cronobacter sakazakii* DNA and *Cronobacter sakazakii* did not significantly affect the detection results, indicating that this method had good anti-interference ability. **Conclusion** The primer probes designed in this study are specific, rapid, sensitive and anti-interference for the detection of *Cronobacter sakazakii* in food samples under real-time fluorescence PCR method. It can provide technical support for detection of *Cronobacter sakazakii* in the future.

KEY WORDS: real-time quantitative polymerase chain reaction; *Cronobacter sakazakii*; *gyrB* gene

0 引言

克罗诺杆菌属(*Cronobacter* spp.)为革兰氏阴性杆菌,属于肠杆菌科,是一种有鞭毛、兼性厌氧、且能运动的食源性条件致病菌,常寄生在动物和人肠道内^[1-2]。公开资料显示,克罗诺杆菌属有 7 个种和 3 个亚种。种包括阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)、丙二酸盐阳性克罗诺杆菌(*Cronobacter malonaticus*)、穆汀斯克罗诺杆菌(*Cronobacter mytjensii*)、都柏林克罗诺杆菌(*Cronobacter dublinensis*)、传奇克罗诺杆菌(*Cronobacter universalis*)、苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)、调味品克罗诺杆菌(*Cronobacter condimenti*);亚种包括都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种(*Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis*)、都柏林克罗诺杆菌粉乳亚种(*Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi*)、都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种(*Cronobacter dublinensis* subsp. *Dublinensis*)^[3-4]。

克罗诺杆菌是一种耐热菌,该菌可以在最高 47 °C 的条件下生长,具有耐高渗透压和抗干燥的特点,特别是能够在水活度非常低的乳粉中存活两年以上。作为一种食源性条件致病菌,主要感染免疫力低的老人和儿童,其能够引起新生儿以及抵抗力不足的幼儿患有脑膜炎、坏死性小肠结肠炎甚至可以引起败血症等能够致人死亡的疾病^[5-7]。新生儿或者早产儿在食用被克罗诺杆菌污染的婴幼儿配方乳粉时均存在感染的风险,而一旦感染克罗诺杆菌其致死率高达 40%~80%^[8]。根据目前报道可以发现,克罗诺杆菌在自然界中分布广泛,可以在乳粉、土壤、蔬菜、污水、谷物制品、肉制品以及动物和人的粪便中生存^[9-11]。其分布虽然广泛但并不是所有的克罗诺杆菌对人类都具有致病性,7 种不同的克罗诺杆菌的致病能力也有比较大的差异^[12-13]。阪崎克罗诺杆菌已被世界卫生组织列为婴幼儿配方乳粉的 A

类致病菌。近年来,国内很多省份报道从婴幼儿配方乳粉和谷物及相关制品等食品中检出阪崎克罗诺杆菌。因此,对克罗诺杆菌属内进行种水平的快速鉴定具有非常重要的实际意义。

常规生化方法对克罗诺杆菌的检测耗时耗力还经常导致结果的不准确,比如 FDA(2002)、ISO(2006)、GB 4789.40—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验》等方法^[14-15]。核酸检测是在 DNA 水平进行检测的技术,常用的核酸检测技术有探针杂交法、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)法、实时荧光 PCR 方法、脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)、多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)和全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)等^[16-18],实时荧光 PCR 方法具有检测周期短、灵敏度高、特异性强等优点,能从基因层面对对克罗诺杆菌进行检测。2024 年我国发布了克罗诺杆菌的检验国家标准 GB 4789.40—2024《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验》,新标准增加了克罗诺杆菌属鉴定的 PCR 方法,此次修订大大减轻了对克罗诺杆菌的检测压力并提高了克罗诺杆菌的准确度,但该方法只是在属水平对克罗诺杆菌进行鉴定。CHEN 等^[19]采用 PCR 检测技术对苏黎世克罗诺杆菌进行检测,WANG 等^[20]采用多重 PCR 方法对阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌、苏黎世克罗诺杆菌进行检测,以上是采用普通 PCR 方法对克罗诺杆菌进行鉴定。此外,国内外有关实时荧光 PCR 方法在属水平对克罗诺杆菌鉴定的方法也多有报道,选择的目标基因一般有:大分子合成(MMS)操纵子序列、16S rRNA 基因、外膜蛋白 A 基因(*OmpA*)、16S-23S rRNA 内部转录间隔区(ITS)等^[21-26]。本研究选择促旋酶(*gyrA*) B 亚单位基因 *gyrB* 作为目标基因进行实验,根据文献报道和基因序列

比对发现, 该基因在亲缘关系较近的菌种鉴定中明显好于 16S rRNA 基因^[27-31]。

本研究设计了引物探针, 并构建了实时荧光 PCR 方法, 此方法可为食品中阪崎克罗诺杆菌种检测工作提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株

阪崎克罗诺杆菌标准菌 2 株、克罗诺杆菌属内其克罗诺杆菌共 6 种 7 株、阴沟肠杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌等其他细菌的标准菌株共 36 种 40 株。这些菌株分别来自中国医学微生物菌种保藏管理中心(National Center for Medical Culture Collection, CMCC)、美国典型菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)、中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)以及中国工业微生物菌种保藏管理中心(China Center Of Industrial Culture Collection, CICC), 具体的菌株信息见表 1。

1.2 试剂与仪器

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)干粉培养基(美国 BD 公司); TSA 干粉培养基、血琼脂平板即用培养基(北京陆桥技术有限公司)。

Taqman master mix、细菌基因组盒(编号 DP302-02)、ABI QuantStudio 7 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司); VITEK® Compact 微生物分析系统(法国生物梅里埃公司)。

1.3 方 法

1.3.1 菌株活化及处理

首先把冷冻保存于-80 °C 的标准菌株直接转接于血琼脂培养基上, 37 °C 需氧培养 24 h±2 h, 然后调取单个菌落转接到 BPW 中进行传代, 传代两代后充分恢复菌种活力, 用于后续实验。

1.3.2 DNA 提取

依据细菌 DNA 提取试剂盒说明书开展 DNA 提取工作。

1.3.3 引物探针设计

从 GenBank 网站下载已公布的阪崎克罗诺杆菌及克罗诺杆菌属内其他菌株的 *gyrB* 基因序列, 利用 DNAMAN 软件对这些序列进行比对, 从中挑选出一段特异性的基因目标序列片段, 以此作为引物探针设计目标片段。随后用 Primer Express 3.0.1 软件设计相应的引物和探针。设计完成后, 将所获引物和探针序列在 NCBI 网站上进行 primerBlast 比对, 筛选出特异性良好的引物探针序列, 并送往上海生物工程有限公司进行合成。引物探针基因序列详见表 2。

表 1 标准菌株的名称及编号
Table 1 Names and serial numbers of standard strains

菌株名称	菌株编号	菌中名称	菌株编号
阪崎克罗诺杆菌	IQCC10403	大肠埃希氏菌	ATCC25922
阪崎克罗诺杆菌	ATCC29544	大肠杆菌	CMCC44747
穆汀斯克罗诺杆菌	ATCC51329	大肠杆菌	CMCC44752
穆汀斯克罗诺杆菌	DSM21870	弗氏柠檬酸杆菌	ATCC43864
传奇克罗诺杆菌	DSM27963	产气肠杆菌	ATCC13048
苏黎世克罗诺杆菌	DSM18703	产酸克雷伯	ATCC700324
都柏林克罗诺杆菌	DSM18705	弗氏柠檬酸杆菌	CICC10404
丙二酸盐阳性克罗诺杆菌	DSM18702	痢疾志贺氏菌	CMCC(B)51105
调味品克罗诺杆菌	DSM27966	福氏志贺氏菌	CICC21534
鼠伤寒沙门氏菌	CMCC50013	粪肠球菌	ATCC29212
丙型副伤寒沙门氏菌	CMCC50017	铜绿假单胞菌	ATCC27853
乙型副伤寒沙门氏菌	CMCC50004	荧光假单胞菌	CICC20066
甲型副伤寒沙门氏菌	CMCC50001	恶臭假单胞	CGMCC1.2309
亚利桑纳沙门氏菌	CMCC47001	杀鲑气单胞菌	CICC23564
甲型副伤寒沙门	ATCC9150	洋葱伯克霍尔德氏菌	CICC21896
鸭沙门氏菌	ATCC9270	普通变形菌	CMCC(B)49027
肠沙门氏菌肠亚种肠炎血清型	ATCC13076	单核增生李斯特氏菌	ATCC19115
布伦登卢普沙门氏菌	ATCCH9812	肠道出血性大肠埃希氏菌	CICC21530
肠沙门氏菌肠亚种伤寒血清型	CMCC(B)50071	肠道集聚性大肠埃希氏菌	CICC24186
肠沙门氏菌肠亚种鼠伤寒血清型	ATCC14028	肠道致病性大肠埃希氏菌	CICC24189
(Ituri)伊图里沙门氏菌	ATCC15611	产肠毒素大肠埃希氏菌	CICC10667
亚利桑纳沙门氏菌	CMCC47001	阴沟肠杆菌	CICC10450
大肠埃希氏菌	ATCC8739	产志贺毒素大肠埃希氏菌	CICC10670
大肠埃希氏菌	CICC10354	肠道侵袭性大肠埃希氏菌	CICC24188
大肠埃希氏菌	AS1.3373		

表 2 实时荧光 PCR 引物和探针序列
Table 2 Primers and the probe sequence of real-time fluorescence PCR

目标菌名称	目标基因	引物探针序列	Ganbank 号
阪崎克罗诺杆菌	<i>gyrB</i>	StF: 5'-ACGCTGAACGCCTATATGGA-3' StR: 5'-TAACGGACACAACGGCAATC-3' StP: 5'-FAM-CGCGCGTCATCGCCGGTAGC-TAMRA-3'	JX983606.1

1.3.4 实时荧光 PCR 的反应体系与参数详情

实时荧光 PCR 的反应体系总体积为 25 μL ，其具体组成如下：上下游引物对(浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL 、探针(浓度 10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL 、模板 DNA 1 μL 、 $2\times$ master mix 12.5 μL 、 ddH_2O 9 μL 。

实时荧光 PCR 的反应参数设定为：首先在 50 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min，接着在 95 $^{\circ}\text{C}$ 进行预变性，时长为 10 min。之后进入循环阶段，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性持续 5 s，66 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸持续 40 s，此循环共进行 40 次，同时收集 FAM 荧光信号，反应结束后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存反应产物。

结果判读规则如下：若实时荧光 PCR 的扩增曲线呈现典型的 S 型曲线，且 Ct 值小于 35，则判定为阳性；若 Ct 值处于 35~40 之间，则判定为可疑，此时需要重复实验，若重复实验后的 Ct 值仍然在 35~40 这个区间，也可判定为阳性；若 Ct 值大于 40，则判定为阴性。

1.3.5 特异性、灵敏性实验

特异性验证实验包括阪崎克罗诺杆菌标准菌 2 株、克罗诺杆菌属内其他克罗诺杆菌共 7 株、阴沟肠杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌等其他细菌的标准菌株共 36 种 40 株。按照 1.3.4 中的反应体系和反应参数进行 PCR 扩增。

灵敏性实验分为两个部分，即绝对灵敏性实验和相对灵敏性实验。

绝对灵敏性实验：运用 DNA 提取试剂盒提取阪崎克罗诺杆菌(ATCC29544)的 DNA，随后将提取出的 DNA 溶液按照梯度稀释，质量浓度分别为 10.0000、1.0000、0.1000、0.0100、0.0010、0.0001 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。所有这些不同浓度的 DNA 稀释液在相同条件下进行实时荧光 PCR 扩增，每次实验设置 5 个平行实验，并且重复实验 4 次。依据 1.3.4 中的结果判读方法对实时荧光 PCR 的结果进行判读，再运用统计学方法对结果进行分析，以此确定该方法的绝对灵敏性下限。

相对灵敏性实验：使用 BPW 溶液将婴幼儿配方奶粉按 10 倍比例溶解，然后向奶粉溶液中添加阪崎克罗诺杆菌，使其添加后的菌落终浓度分别为 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 CFU/mL，每个浓度设置 5 个平行实验，重复实验 4 次。采用细菌提取试剂盒提取 DNA 作为模板，按照 1.3.4 中的反应方法进行实时荧光 PCR 扩增，并对扩增结果进行判读，利用统计学方法分析结果以确定该方法的相对灵敏性下限。按照 1.3.4 中的反应体系和反应参数进行实时荧光 PCR 扩增，此过程重复 20 次，记录阳性结果出现的次数。

1.3.6 抗干扰实验

本研究设计的抗干扰实验包括基因组水平和培养物水平两个层面的抗干扰实验。

基因组水平的抗干扰实验：将提取好的阪崎克罗诺杆菌 DNA 的质量浓度分别稀释至 100.000、10.000、1.000、0.100、0.010、0.001 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，然后分别按照 1:1 的体积比例添加质量浓度为 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的大肠杆菌(ATCC25922)DNA，将混合后的 DNA 作为扩增模板进行实时荧光 PCR 反应，每次实验设置 5 个平行，重复 4 次，记录混合干扰 DNA 后实验结果的变化情况。

培养物水平的抗干扰实验：将活性良好的阪崎克罗诺杆菌制成菌悬液，并将菌悬液浓度依次稀释至 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 CFU/mL，之后分别添加等体积的 10^8 CFU/mL 大肠杆菌(ATCC25922)菌悬液，取充分混合后的菌悬液 1 mL 提取 DNA，将提取后的 DNA 作为扩增模板进行实时荧光 PCR 扩增，每个梯度设置 5 个平行，重复 4 次，记录添加干扰菌后对实验结果产生的影响。

对照设置：阳性对照为阪崎克罗诺 DNA；阴性对照为大肠杆菌 DNA；空白对照为无菌水。

1.4 数据处理

使用 SPSS 24.0 软件通过方差分析的方法对实验结果进行验证，采用 Excel 2019 软件来制作表格。

2 结果与分析

2.1 特异性验证结果分析

从图 1 可以看出，以阪崎克罗诺杆菌 DNA 为模板时，本研究所设计的引物探针对应的反应呈现出典型的 S 型扩增曲线。然而，当以其他克罗诺杆菌属内的克罗诺杆菌以及食品中常见致病菌 DNA 为模板进行反应时，却并无明

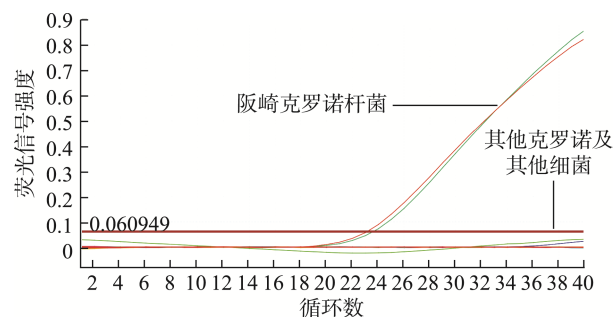


图 1 实时荧光 PCR 特异性实验测试结果

Fig.1 Specificity test results of real-time fluorescence PCR

显的 S 型扩增曲线。这一结果充分表明, 本研究所构建的方法对阪崎克罗诺杆菌具有特异性扩增能力, 对于表 1 中的非克罗诺杆菌和其他常见细菌则无法进行扩增, 由此可见该引物探针的特异性良好。

2.2 灵敏性验证结果分析

2.2.1 绝对灵敏度验证

对提取自阪崎克罗诺杆菌(ATCC29544)的 DNA 溶液进行梯度稀释, 使其质量浓度依次为 10.0000、1.0000、0.1000、0.0100、0.0010、0.0001 ng/μL。在相同的反应条件下, 对所有梯度的稀释液开展扩增操作, 每次实验均设置 5 个平行样, 且重复实验 4 次。由表 3 与图 2 的结果可知, 本研究设计的阪崎克罗诺杆菌(ATCC29544)引物探针能够稳定检出的 DNA 质量浓度为 0.0100 ng/μL, 其检测下限可达 0.0100 ng/μL。依据绝对灵敏度的实验结果, 能够确定本研究建立的实时荧光 PCR 方法的绝对灵敏度为 0.0100 ng/μL。

表 3 实时荧光 PCR 实验的绝对灵敏度实验结果
Table 3 Absolute sensitivity test results of the real-time fluorescence PCR

菌名	质量浓度/(ng/μL)					
	10.0000	1.0000	0.1000	0.0100	0.0010	0.0001
阪崎克罗诺杆菌 ATCC29544	20/20	20/20	20/20	20/20	18/20	0/20

注: 表中数据为“检出次数/检测次数”, 表 4 同。

表 4 实时荧光 PCR 实验的相对灵敏度实验结果
Table 4 Relative sensitivity test results of the real-time fluorescence PCR

基质	菌名	菌浓度/(CFU/mL)						
		10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BPW 1:10 溶解的 婴幼儿配方奶粉	阪崎克罗诺杆菌 ATCC29544	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	18/20	14/20

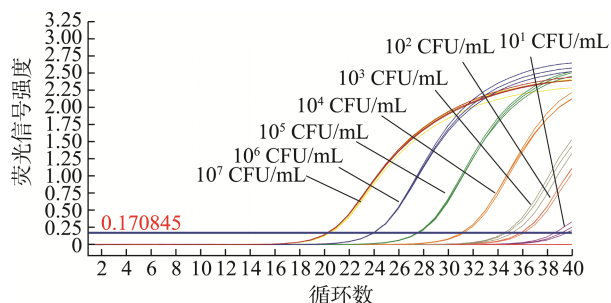


图 3 实时荧光 PCR 实验的相对灵敏度实验结果曲线
Fig.3 Relative sensitivity test result curves of the real-time fluorescence PCR

2.3 抗干扰能力的验证结果分析

2.3.1 基因组水平的抗干扰实验结果

首先, 把提取好的阪崎克罗诺杆菌 DNA 的质量浓度依次稀释至 100.000、10.000、1.000、0.100、0.010 ng/μL、0.001 ng/μL。随后, 针对每一个稀释浓度的阪崎克罗诺杆菌

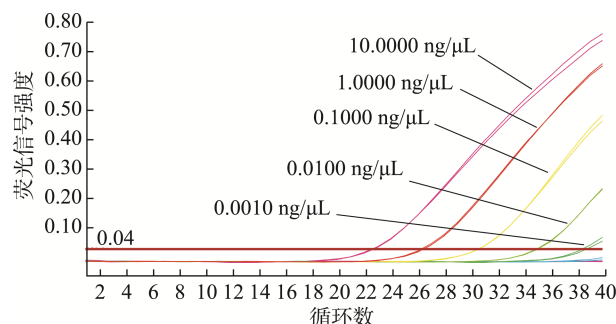


图 2 实时荧光 PCR 实验的绝对灵敏度实验结果曲线
Fig.2 Absolute sensitivity test result curves of the real-time fluorescence PCR

2.2.2 相对灵敏度验证

取灭菌后的 BPW 溶液, 按照 1:10 (V:V) 的比例对婴幼儿配方奶粉进行溶解。接着, 将处于充分活性状态的阪崎克罗诺杆菌添加至奶粉溶液中, 添加后使菌落浓度分别为 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹ CFU/mL。充分混匀后, 分别取不同菌落浓度的 1 mL 奶粉溶液用于 DNA 提取。以提取得到的 DNA 为模板开展实时荧光 PCR 实验, 每个浓度的 DNA 模板均设置 5 个平行样, 且重复实验 4 次。依据 1.3.4 的结果判读方式对该方法的相对灵敏度予以验证。从表 4 和图 3 所呈现的结果能够看出, 当菌落浓度为 10³ CFU/mL 时, 本方法能够稳定地检测出目标。据此可以推断, 本研究涉及的引物探针相对灵敏度可达到 10³ CFU/mL。

DNA, 均按照 1:1 的体积比例添加质量浓度为 100.000 ng/μL 的大肠杆菌(ATCC25922) DNA。将这些混合后的 DNA 当作扩增模板, 用于开展实时荧光 PCR 反应。每次实验都设置 5 个平行样, 并且重复进行 4 次。

实验结果见表 5 和图 4, 发现即使干扰基因(大肠杆菌 DNA)的浓度达到目标基因(阪崎克罗诺杆菌 DNA)浓度的 100000 倍时, Ct 值仍未出现显著性变化。这一现象充分表明本研究设计的引物探针在基因组水平展现出了出色的抗干扰能力。

2.3.2 培养物水平的抗干扰实验结果

把活性优良的阪崎克罗诺杆菌制成菌悬液, 将该菌悬液浓度依次稀释至 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³ CFU/mL。之后, 分别向其中添加等体积的 10⁸ CFU/mL 大肠杆菌(ATCC25922)菌悬液。取充分混合后的菌悬液 1 mL 用于提取 DNA, 把提取得到的 DNA 当作扩增模板来开展实时荧

光 PCR 扩增。每个梯度设置 5 个平行实验,且重复操作 4 次。实验结果展示于表 6 和图 5,从这些结果能够看出,即便干扰菌大肠杆菌(ATCC25922)的浓度达到目标菌浓度的 100000 倍, Ct 值也未受到显著影响。由此可知,本研究设计的引物探针在培养物水平具备出色的抗干扰能力。

表 5 实时荧光 PCR 基因组水平的抗干扰实验结果

Table 5 Anti-disturbance ability of the real-time fluorescence PCR method at the level of the genome

质量浓度 (ng/μL)	Ct 值	
	1:1 (V:V) 添加 TE*	1:1 (V:V)添加 大肠杆菌 DNA
100.000	18.8	18.6
10.000	22.0	22.0
1.000	25.4	25.4
0.100	28.7	28.8
0.010	32.3	32.0
0.001	35.8	35.9
阳性对照	17.5	17.5
阴性对照	—	—
空白对照	—	—

注: *添加 TE (Tris-EDTA)是为了与添加大肠杆菌 DNA 保持相同比例的稀释,减小误差;两组实验具有相同的阳性对照、阴性对照和空白对照;—表示未扩增,表 6 同。

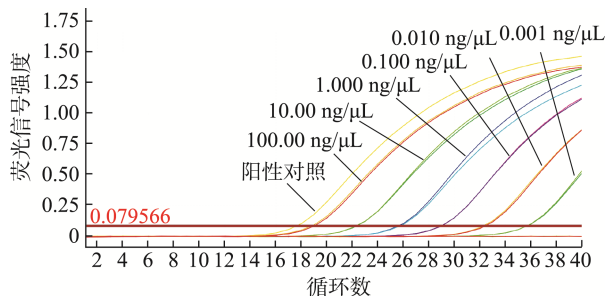


图 4 实时荧光 PCR 基因组水平的抗干扰实验结果曲线

Fig.4 Anti-disturbance ability test result curves of the real-time fluorescence PCR method at the level of the genome

表 6 实时荧光 PCR 培养物水平的抗干扰实验结果

Table 6 Anti-disturbance ability of the real-time fluorescence PCR method at the culture level

阪崎杆菌 (CFU/mL)	Ct 值	
	添加 1 mL 无菌水*	添加 1 mL 10 ⁷ CFU/mL 大肠杆菌
10 ⁸	18.9	19.1
10 ⁷	22.5	22.8
10 ⁶	26.2	26.2
10 ⁵	29.3	29.2
10 ⁴	32.6	33.0
10 ³	35.6	36.2
阳性对照	17.5	17.5
阴性对照	—	—
空白对照	—	—

注: *添加无菌水是为了与添加大肠杆菌保持相同比例的稀释,减小误差;两组实验具有相同的阳性对照、阴性对照和空白对照。

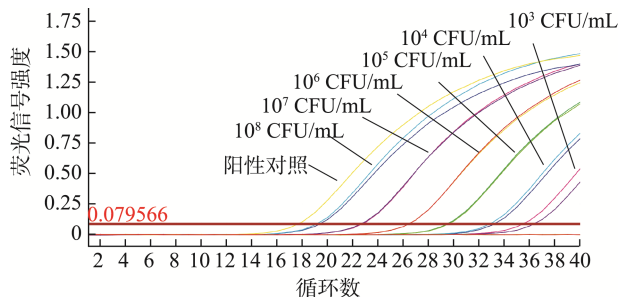


图 5 实时荧光 PCR 培养物水平的抗干扰实验结果曲线

Fig.5 Anti-disturbance ability test result curves of the real-time fluorescence PCR method at the cultured level

3 讨论与结论

传统的阪崎克罗诺杆菌检测主要依赖生化和血清学方法,这种方式属于劳动密集型,不仅耗费大量人力物力,而且准确性不太稳定。已有研究表明,使用 TaqMan 探针法的实时荧光 PCR 法在检测食品样品中的致病菌是可靠的。因此,在众多更快速、更准确的检测方法中,实时荧光定量 PCR 方法最具发展潜力。与常规方法相比,实时荧光定量 PCR 方法检测周期短、操作简便,特异性和灵敏性均较高。由于该方法中活菌存在的步骤较少,能有效避免活菌交叉污染增殖,从而防止对结果判断产生不良影响。

在此背景下,本研究在查阅文献并进行序列比对后,选取了阪崎克罗诺杆菌中具有高区分度的 DNA 旋转酶 B 亚基(*gyrB*)基因作为目标基因,设计出可特异性扩增阪崎克罗诺杆菌的引物探针,以此构建了阪崎克罗诺杆菌的实时荧光 PCR 检测方法。该方法可用于食品样品中阪崎克罗诺杆菌的检测,具有出色的灵敏性和稳定性。其绝对灵敏度可达 10~100 pg/μL,相对灵敏度可达 10³ CFU/mL,在菌种和基因层面都有很强的抗干扰能力。同时,本研究还使用了 36 种共 40 株常见致病菌标准菌株对该方法进行特异性验证,也获得了非常理想的特异性结果。

综上所述,本研究所阐述的实时荧光定量 PCR 方法在检测食品中的阪崎克罗诺杆菌时,具有快速、特异、灵敏的特性,能够为日后阪崎克罗诺杆菌的日常检测提供有力的技术支持,不但能提升检测的灵敏性和准确性,而且能大幅缩短常见检测方法的检测时长。

参考文献

- [1] 郭傲雪,谷传奇,文萱,等. 克罗诺杆菌属检测方法研究进展[J/OL]. 武汉大学学报(医学版), 1-7. [2024-09-05]. <https://doi.org/10.14188/j.1671-8852.2024.0342>
GUO AOX, GU CQ, WEN X, *et al.* Current development of detection of *Cronobacter* spp. [J/OL]. Medical Journal of Wuhan University, 1-7. [2024-09-05]. <https://doi.org/10.14188/j.1671-8852.2024.0342>
- [2] 贾媛,黄燕,宋丹靓敏,等. 克罗诺杆菌分型技术研究进展[J]. 中国乳品工业, 2023, 51(10): 42-48.
JIA Y, HUANG Y, SONG DLM, *et al.* Progress in typing methods for

- Cronobacter* spp. [J]. China Dairy Industry, 2023, 51(10): 42–48.
- [3] QIMING C, YANG Z, ZHEN Q, *et al.* *Cronobacter* spp., foodborne pathogens threatening neonates and infants [J]. Frontiers of Agricultural Science and Engineering, 2018, 5(3): 330–330.
- [4] STRYDOM A, CAWTHORN DM, CAMERON M, *et al.* Species of *Cronobacter*—A review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk [J]. International Dairy Journal, 2012, 27: 1–2.
- [5] JANG H, GOPINATH GR, ESHWAR A, *et al.* The secretion of toxins and other exoproteins of *Cronobacter*: Role in virulence, adaption, and persistence [J]. Microorganisms, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8020229
- [6] GOSNEY M. *Enterobacter sakazakii* bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: A case report [J]. Age & Ageing, 2008, 36(2): 236–237.
- [7] LING N, JIANG YJ, ZENG HY, *et al.* Advances in our understanding and distribution of the *Cronobacter* genus in China [J]. Food Science, 2022. DOI: 10.1111/1750-3841.15577
- [8] 王青龙, 张跃川, 周燕霞, 等. 实时荧光 PCR 鉴定婴幼儿配方食品中克罗诺杆菌的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(6): 836–842.
WANG QL, ZHANG YC, GONG YX, *et al.* Identification of *Cronobacter* spp. in infant formula by real-time PCR [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(6): 836–842.
- [9] 徐湾, 姜华, 张选飞, 等. 我国克罗诺杆菌污染现状与预防控制措施研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2015(9): 848–851.
XU W, JIANG H, ZHANG XF, *et al.* Advances in research on *Cronobacter* spp.: Current contamination status and preventive measures in China [J]. Journal of Pathogen Biology, 2015(9): 848–851.
- [10] ZHANG J, WANG L, SHI L, *et al.* Survival strategy of *Cronobacter sakazakii* against ampicillin pressure: Induction of the viable but nonculturable state [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 334: 108819.
- [11] CHANG Y, XIA S, FEI P, *et al.* *Houttuynia cordata* Thunb. crude extract inactivates *Cronobacter sakazakii*: Antibacterial components, antibacterial mechanism, and application as a natural disinfectant [J]. Food Control, 2022. DOI: 10.1016/j.foodcont.2022.109467
- [12] CHANG Y, XING M, HU X, *et al.* Antibacterial activity of chrysanthemum buds crude extract against *Cronobacter sakazakii* and its application as a natural disinfectant [J]. Frontiers in Microbiology, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2020.632177
- [13] SONBOL H, JOSEPH S, MCAULEY CM, *et al.* Multilocus sequence typing of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula and milk powder production factories [J]. International Dairy Journal, 2013, 30(1): 1–7.
- [14] Food and Drug Administration. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula [Z]. 2002.
- [15] ISO. ISO/TS 22964 and IDF/RM 210-first edition 2006-02-01: Milk and milk product e detection of *Enterobacter sakazakii* [Z]. 2006.
- [16] OGRODZKI P, FORSYTHE SJFIM. DNA-sequence based typing of the *Cronobacter* genus using MLST, CRISPR-Cas array and capsular profiling [Z]. 2017.
- [17] FORSYTHE SJ, DICKINS B, JOLLEY KAJBG. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age [J]. MLST and Whole Genome Sequence Analysis, 2014, 15: 1–14.
- [18] ZENG H, LI C, HE W, ZHANG J, CHEN M, LEI T, WU H, LING N, CAI S, WANG JJFIM [Z]. 2019.
- [19] CHEN QM, LU J, QIU YJ, *et al.* Short communication: Bioinformatics-based mining of novel gene targets for identification of *Cronobacter turicensis* using PCR [J]. Journal of Dairy Science, 2019(7): 102.
- [20] WANG L, WU P, SU Y, *et al.* Detection of genus and three important species of *Cronobacter* using novel genus- and species-specific genes identified by large-scale comparative genomic analysis [J]. Frontiers in Microbiology, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.885543
- [21] SEO KH, BRACKETT RE. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(1): 59–63.
- [22] KANG SE, NAM YS, HONG KW. Rapid detection of *Enterobacter sakazakii* using TaqMan real-time PCR assay [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(3): 516–519.
- [23] KANDHAI MC, HEUVELINK AE, REIJ MW, *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.
- [24] LIU Y, CAI X, ZHANG X, *et al.* Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 65(1): 21–31.
- [25] CHEN Y, HAMMACK TS, SONG KY, *et al.* Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration method for the detection and isolation of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula: Precollaborative study [J]. Journal of AOAC International, 2009, 92(3): 862–872.
- [26] SEO K, BRACKETT RJJOPF. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68: 59–63.
- [27] 李献梅, 王小芬, 杨洪岩, 等. 促旋酶(*gyrase*)B 亚单位基因 *gyrB* 在鉴别细菌近缘种中的应用[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 701–706.
LI XM, WANG XF, YANG HY, *et al.* Application of *gyrB* in the identification of closely related bacteria—A review [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(5): 701–706.
- [28] 张嵘, 蔡加昌, 张书梅, 等. *gyrB* 基因和 16S rRNA 基因序列分析在沙门菌属细菌鉴别中的临床应用评价[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(4): 368–369.
ZHANG R, CAI JC, ZHANG SM, *et al.* Clinical application evaluation of *gyrB* gene and 16S rRNA gene sequence analysis in the identification of *Salmonella* bacteria [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2007, 27(4): 368–369.
- [29] 杨移斌, 胥宁, 董靖, 等. 斑点叉尾鲷病原中温和气单胞菌的分离鉴定及药敏特性分析[J]. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(4): 45–50.
YANG YB, XU N, DONG J, *et al.* Isolation, identification, and drug sensitivity analysis of mild aeromonas in the pathogen of catfish [J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2017, 7(4): 45–50.
- [30] KANG SE, YONG SN, HONG KW, *et al.* Rapid detection of *Enterobacter sakazakii* using TaqMan real-time PCR assay [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(3): 516–519.
- [31] 马晨晨, 宋昌彦, 马梦杰, 等. 实时荧光定量聚合酶链式反应快速检测 4 种食源性致病弧菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(21): 22–31.
MA CC, SONG CY, MA MJ, *et al.* Rapid detection of four foodborne pathogenic *Vibrio* bacteria by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(21): 22–31.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)