

荧光重组酶介导等温扩增快速检测食品中 克罗诺杆菌属

黄新新¹, 何宇平^{1*}, 郑秋月², 郭德华¹, 赵勇³, 孙晓红³, 曾静⁴

(1. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135; 2. 大连民族大学生命科学院, 大连 116600;
3. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 4. 中国海关科学技术研究中心, 北京 100026)

摘要: **目的** 建立快速简便的荧光重组酶介导等温扩增法(recombinase-aided amplification, RAA)检测克罗诺杆菌属, 以满足口岸快速通关及监管需要。**方法** 根据克罗诺杆菌属 *ompA* 基因保守区设计特异性引物、探针, 通过引物两两组合结合探针筛选出扩增效率及灵敏度最佳的引物组合, 优化反应温度及引物探针浓度, 确定最佳反应条件。将建立的荧光 RAA 法应用于食品基质及实际样品检测, 同时与 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》进行比对验证。**结果** 克罗诺杆菌属荧光 RAA 最佳反应温度为 39 °C, 最佳引物、探针终浓度均为 400 nmol/L。建立的荧光 RAA 法特异性强, 纯菌灵敏度达到 10² CFU/mL。加标食品基质婴儿奶粉及婴儿米粉在改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium, mLST-Vm)增菌只需 2 h, 即可检测原始浓度达到 10² CFU/mL 的克罗诺杆菌属。荧光 RAA 法只需 20~30 min 完成扩增, 5 min 即可观察结果, 速度及灵敏度明显高于国家标准方法。**结论** 荧光 RAA 法简便、快速、无需大型仪器, 可用于口岸或其他场所进行克罗诺杆菌属的快速检测与监控。

关键词: 克罗诺杆菌属; 荧光重组酶介导等温扩增法; 快速检测; 监控

Rapid detection of *Cronobacter* spp. in food by fluorescent recombinase-aided amplification

HUANG Xin-Xin¹, HE Yu-Ping^{1*}, ZHENG Qiu-Yue², GUO De-Hua¹, ZHAO Yong³,
SUN Xiao-Hong³, ZENG Jing⁴

(1. Technical Center For Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine of Shanghai Customs, Shanghai 200135, China; 2. College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China; 3. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Science and Technology Research Center of China Customs, Beijing 100026, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid and simple fluorescent recombinase-aided amplification (RAA) method to detect *Cronobacteria* spp. in order to meet the actual needs of port rapid customs clearance and supervision. **Methods** According to the conserved region of *ompA* gene of *Cronobacter* spp., the specific primers

基金项目: 上海市自然科学基金项目(19ZR1417400、19ZR1470400)、上海市科委平台项目(20DZ2291900)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation of Shanghai City (19ZR1417400, 19ZR1470400), and the Platform Project of Shanghai Science and Technology Commission (20DZ2291900)

*通信作者: 何宇平, 研究员, 主要研究方向为分子生物学检测。E-mail: heyuping668@163.com

*Corresponding author: HE Yu-Ping, Professor, Technical Center For Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine of Shanghai Customs, Shanghai, 200135 China. E-mail: heyuping668@163.com

and probes were designed, the primer combinations with the best amplification efficiency and sensitivity were selected by combining the primers and probes, the optimal reaction conditions were determined by optimizing the reaction temperature and the concentration of primers and probes. The established fluorescence RAA method was applied to the detection of food matrix and actual samples, and compared with the national standard GB 4789.40—2016 *National Food Safety Standard-Food Microbiology Test-Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* test for verification. **Results** The optimum reaction temperature of fluorescent RAA for *Cronobacter* spp. was 39 °C, and the final concentration of primer and probe was 400 nmol/L. The established fluorescence RAA method showed high specificity and the sensitivity, and the detection limit of the method was 10^2 CFU/mL in pure culture. The limit of detection for *Cronobacter* spp. was 10^{-2} CFU/mL original concentrations under 2 h modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium (mLST-Vm) enrichment in artificially contaminated baby milk powder and baby rice. The fluorescence RAA assay gave a positive signal in as early as 5 min, and the whole assay could be completed in approximately 20–30 min. The speed and sensitivity were significantly higher than those of the national standard method. **Conclusion** Fluorescence RAA method is simple, rapid and does not need large instruments, which can be used for rapid detection and monitoring of *Cronobacteria* spp. at ports or other places.

KEY WORDS: *Cronobacter* spp.; fluorescent recombinase-aided amplification; rapid detection; monitor

0 引言

克罗诺杆菌属(*Cronobacter* spp.)是一类重要的食源性病原体,从婴幼儿配方食品、肉制品、水果蔬菜、谷物等食品内均能分离出该菌。克罗诺杆菌属可引起新生儿脑膜炎、坏死性小肠结肠炎、败血症、血痢等病症。对婴儿,尤其是低于 28 d 的新生儿致死率可达到 40%至 80%^[1]。2012 年,克罗诺杆菌属被分为包括阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)在内的 7 个种及 3 个亚种^[2],除了康迪蒙提克罗诺杆菌(*Cronobacter condimenti*),其余均可致病^[3]。有研究表明,克罗诺杆菌属能在婴儿奶粉中长期存活,我国 GB 10765—2010《食品安全国家标准 婴儿配方食品》中明确规定 0~6 月龄婴幼儿配方食品不得检出克罗诺杆菌属。因此对克罗诺杆菌属的及时快速检出是预防其危害发生的重要手段^[4]。

我国 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》是基于传统培养法进行检测,耗时耗力,需要 5 d 以上时间才出结果。分子生物学检测在克罗诺杆菌属及其他食源性微生物的检测方面体现了快速、灵敏的优势,如实时荧光聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、环介导等温扩增(loop mediated isothermal amplification, LAMP)、滚动圈扩增(rolling circle amplification, RCA)等技术^[5-7]。PCR 需要一个复杂的热循环器进行循环加热和冷却过程,阻碍了其在低资源环境中的应用;LAMP 技术存在非特异扩增的缺点。近年来发展起来的重组酶等温扩增技术具有相对低温下扩增的优点(37~42 °C),只需 10~20 min 即可观察结果。从而得以建立一种更为简便、灵敏、快速的检测方法。

重组酶等温扩增技术包括重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)技术及重组酶介导等温扩增(recombinase-aided amplification, RAA)技术,是一种可使微量核酸体外高效快速扩增的新技术。RAA 技术以细菌或真菌中获得的重组酶来替代 RPA 技术中较难获得的噬菌体重组酶,二者整个扩增过程一致,通过结合、链置换、延伸实现体外 DNA 扩增。

RAA 技术主要依赖于 3 种酶:能结合单链核酸(寡核苷酸引物)的重组酶、单链 DNA 结合蛋白(single-stranded DNA binding protein, SSB)和链置换 DNA 聚合酶。这 3 种酶的混合物在常温下也有活性,最佳反应温度在 37 °C 左右。重组酶与引物结合形成的蛋白-DNA 复合物,能在双链 DNA 中寻找同源序列。一旦引物定位了同源序列,就会发生链交换反应形成并启动 DNA 合成,对模板上的目标区域进行指数式扩增。被替换的 DNA 链与 SSB 结合,防止进一步替换。整个过程高效迅速,一般可在 10 min 之内获得可检出水平的扩增产物,且操作简单,设备成本低廉,被认为是一种可以代替 PCR 的新技术。目前重组酶等温扩增技术已取得长足的发展,并被应用在病毒^[8-11]、细菌^[12-15]、食品安全等多个检测领域^[16-17]。上海口岸每年须检测大批量的婴儿奶粉及米粉等婴幼儿配方食品,本研究基于 RAA 技术的优势,拟建立一种针对克罗诺杆菌属的简便、快速的荧光 RAA 法,并评价其在实际样品中的检测效果,以满足口岸快速通关及监管需求。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

阪崎克罗诺杆菌 ATCC29544、苏黎世克罗诺杆菌

NCTC9529、莫金斯科罗诺杆菌 ATCC51329、丙二酸盐克罗诺杆菌 DSM18702、苏黎世克罗诺 DSM18703、都柏林克罗诺杆菌 DSM18705、都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种 DSM18706、都柏林克罗诺杆菌奶粉亚种 DSM18707、产气肠杆菌 ATCC13048、铜绿假单胞菌 ATCC27853、肺炎克雷伯氏 ATCC13883、溶血性链球菌 ATCC21059、大肠埃希氏菌 ATCC29522、单增李斯特菌 ATCC7644、奇异变形杆菌 ATCC12453、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、鼠伤寒沙门氏 ATCC14028、阴沟肠杆菌 ATCC13047、副溶血性弧菌 ATCC17802、溶藻弧菌 ATCC33787、霍乱弧菌 FSCC232004、结肠炎耶尔森氏菌 ATCC23715、创伤弧菌 ATCC27562(上海汉尼生物技术有限公司)。9 株克罗诺杆菌分离株 ES1、ES2、ES3、ES4、ES5、ES6、ES7、ES8、ES9 由实验室分离保存,所有菌株-80 °C 保存于 10% (m:V) 甘油肉汤中。缓冲蛋白胨水(buffer peptone water, BPW)、脑心浸液培养基(北京陆桥技术有限责任公司); 荧光 RAA 扩增试剂盒(江苏奇天基因生物科技有限公司); 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(大连宝生物工程有限公司); 克罗诺杆菌属显色培养基(上海中欣生物工程有限公司); 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium, mLST-Vm)培养基(无锡市塞维生物技术有限公司); 1.5 mL 离心管(美国 axygen 公司)。

F1620 恒温核酸扩增检测仪(江苏奇天基因生物科技有限公司); 5810/5810R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); ESCO 生物二级安全柜(新加坡艺思高科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌株复苏

从甘油冻存管中取 100 μ L 菌液接种到 5 mL 脑心浸液培养肉汤中, 37 °C 150 r/min 振荡过夜。

1.2.2 细菌 DNA 制备

取 1 mL 细菌培养物 1.5 mL 离心管, 12000 r/min 离心 10 min 收集菌液, 弃上清。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒方法提取细菌 DNA。-20 °C 保存备用。

1.2.3 引物设计

从美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI) GenBank 数据库中获得

克罗诺杆菌 *ompA* 序列, 根据 RAA 引物、探针设计原则设计荧光 RAA 引物和探针序列。引物、探针由上海生工生物工程有限公司合成, 具体序列见表 1。

1.2.4 引物的筛选

将 2 条正向引物与 2 条反向引物互相组合, 与探针形成 4 个组合, 对引物和探针的浓度进行最佳配比筛选, 通过荧光信号值的大小以及反应时间筛选最佳引物、探针组合。

1.2.5 反应温度的优化

RAA 反应液包括正反向引物各 2.1 μ L、探针 0.6 μ L, 2 \times 反应缓冲液 25 μ L, ddH₂O 及 DNA 模板 17.7 μ L, 最后加入 2.5 μ L 乙酸镁, 充分混匀。将 RAA 反应液在不同温度(30、35、39、42、45 °C)中进行反应, 确定最佳扩增温度。

1.2.6 引物探针浓度的优化

在探针终浓度为 120 nmol/L 时, 将引物终浓度分别稀释为 100、200、300、400 nmol/L; 引物终浓度为 400 nmol/L 时, 对应的探针终浓度分别稀释为 100、200、300、400 nmol/L 进行扩增。比较最佳扩增效果时引物探针浓度。

1.2.7 特异性检测

包含性实验包括阪崎克罗诺杆菌 ATCC29544 以及 7 株其余的克罗诺杆菌标准菌株: 苏黎世克罗诺杆菌 NCTC9529、莫金斯科罗诺杆菌 ATCC51329、丙二酸盐克罗诺杆菌 DSM18702、苏黎世克罗诺 DSM18703、都柏林克罗诺杆菌 DSM18705、都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种 DSM18706、都柏林克罗诺杆菌奶粉亚种 DSM18707 和 9 株克罗诺杆菌实验分离株 ES1、ES2、ES3、ES4、ES5、ES6、ES7、ES8、ES9。

排除性实验包括产气肠杆菌 ATCC13048、铜绿假单胞菌 ATCC27853、肺炎克雷伯氏 ATCC13883、溶血性链球菌 ATCC21059、大肠埃希氏菌 ATCC29522、单增李斯特菌 ATCC7644、奇异变形杆菌 ATCC12453、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、鼠伤寒沙门氏 ATCC14028、阴沟肠杆菌 ATCC13047、副溶血性弧菌 ATCC17802、溶藻弧菌 ATCC33787、霍乱弧菌 FSCC232004、结肠炎耶尔森氏菌 ATCC23715、创伤弧菌 ATCC27562 等菌株。所有纯培养物按方法 1.2.2 提取 DNA 模板后进行荧光 RAA 检测, 验证方法特异性。

表 1 克罗诺杆菌 RAA 扩增的引物探针
Table 1 Primers and probes for RAA amplification of *Cronobacter* spp.

引物/探针名称	引物/探针序列(5'→3')
OMP-F1	CGCGTTCGGTGGTTACCAGGTTAACCCGTACG
OMP-R1	TACCATGCCGCCAGACGGGTGTATACGTCCAG
OMP-F2	TTACCAGGTTAACCCGTACGTTGGTTTCGAAATGGGC
OMP-R2	TTACCGGGTAACCCAGTTTAGCGGTCAGCTGTACGC
OMP-P1	GCTGGGCCGCATGCCGTATAAAGGCGACAC (FAM-dT)(THF)(BHQ-dT)AAACGGCGCTTTCAA-C3 Spacer

1.2.8 灵敏度检测

挑取营养琼脂平板上新鲜生长的克罗诺杆菌 ATCC29544 单菌落接种于 LB (Luria-Bertani) 肉汤中, 24 h 后依次吸取 1 mL 菌悬液于 9 mL LB 肉汤中, 制成 10 倍梯度稀释液。分别取 100 μ L 菌液涂布于平板上, (37 \pm 1) $^{\circ}$ C 培养 24~48 h, 对不同梯度菌液进行计数。从每个稀释度管子中取 1 mL 菌悬液提取 DNA, 进行荧光 RAA 反应。

1.2.9 基质中检测限检测

收集按照 GB 4789.40—2016 检测为无克罗诺杆菌污染的样品: 婴幼儿米粉、婴幼儿奶粉。以比浊法确定最初的菌液浓度为 10⁸ CFU/mL, 进行 10⁻¹~10⁻¹⁰ 稀释。

称取 25 g 样品于 225 mL BPW 肉汤中, 分别吸取混合液于 10 个试管中, 每个试管 9 mL。将一系列不同浓度梯度的菌悬液分别加入 10 个试管中, 制成不同初始污染浓度 (10⁶~10³ CFU/mL) 的样品, (37 \pm 1) $^{\circ}$ C 预增菌培养 18 h, 再吸取 1 mL 培养液至 10 mL 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胍肉汤-万古霉素(mLST-Vm)增菌液分别增菌 2 和 24 h。提取 DNA 模板, 用 RAA 法进行扩增, 观察结果。所有做荧光 RAA 检测的样品同时利用 GB 4789.40—2016 方法进行检测。

1.2.10 实际样品检测

收集上海口岸跨境及市售的婴幼儿奶粉 20 份、婴幼儿米粉 10 份、乳清蛋白 10 份及乳清粉 10 份样品, 进行荧

光 RAA 检测。所有样品同时利用 GB 4789.40—2016 方法检测。

2 结果与分析

2.1 克罗诺杆菌属荧光 RAA 方法建立及优化

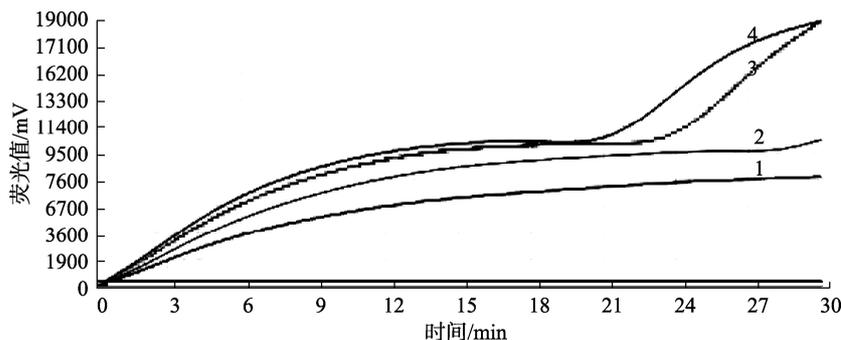
2.1.1 扩增温度优化

分别选择 30、35、39、42、45 $^{\circ}$ C 作为扩增温度, 测试克罗诺杆菌属荧光 RAA 扩增效果差异。结果表明, RAA 反应温度在低于 30 $^{\circ}$ C 或高于 45 $^{\circ}$ C 时, 扩增效果明显下降, 39 $^{\circ}$ C 时扩增荧光值最高, 故扩增克罗诺杆菌属的最佳扩增温度为 39 $^{\circ}$ C (图未显示)。

2.1.2 RAA 不同引物探针浓度优化

由图 1 可知, 探针终浓度 120 nmol/L 时, 引物浓度为 400 nmol/L 时扩增信号最好; 由图 2 可知, 在引物浓度为 400 nmol/L 时, 随着探针浓度的升高, 扩增信号也随之上升。故选择最佳引物终浓度为 400 nmol/L、探针终浓度为 400 nmol/L。

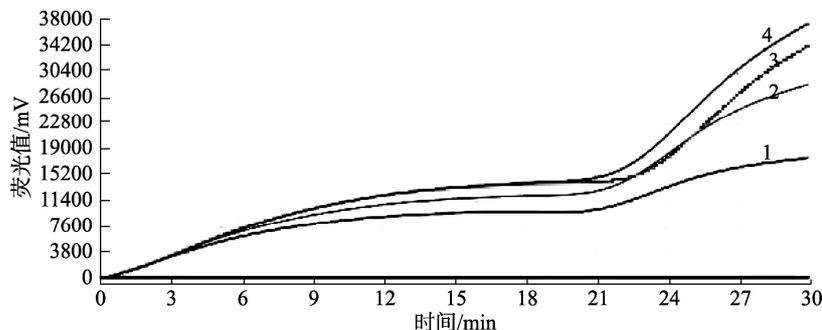
引物、探针浓度对扩增的影响明显, 故为了得到最佳扩增效果, 尤其是对低浓度 DNA 模板进行扩增时, 需要优化最佳反应条件。研究表明, 随着引物探针浓度的提高, 扩增效果明显提升。很好地解决了低浓度 DNA 扩增灵敏度差的难题。



注: 引物浓度分别为 1: 100 nmol/L; 2: 200 nmol/L; 3: 300 nmol/L; 4: 400 nmol/L。

图 1 克罗诺杆菌属荧光 RAA 不同引物浓度扩增效果

Fig.1 Amplification effects of different primer concentrations of fluorescent RAA for *Cronobacter* spp.



注: 探针浓度分别为 1: 100 nmol/L; 2: 200 nmol/L; 3: 300 nmol/L; 4: 400 nmol/L; 5: ddH₂O。

图 2 克罗诺杆菌引物浓度 400 nmol/L 时不同探针浓度荧光 RAA 扩增效果

Fig.2 Amplification effects of fluorescent RAA with different probe concentrations at primer concentration of 400 nmol/L for *Cronobacter* spp.

2.1.3 不同引物探针组合筛选测试

将 OMP-F1、OMP-R1、OMP-F2、OMP-R2 引物两两组合, 探针为 OMP-P1, 测试 OMP-F1R1P1、OMP-F1R2P1、OMP-F2R1P1、OMP-F2R2P1 引物对结合探针的扩增效果。最终结果表明: OMP-F1R1P1 对不同稀释度的菌液荧光扩增值最高。在 10^7 CFU/mL 稀释度时荧光值为 24000 mV, 10^4 CFU/mL 稀释度时荧光值为 2400 mV, 故筛选 OMP-F1R1P1 引物探针组合作为后续实验的扩增引物。

综上所述, 最后确定克罗诺杆菌属荧光 RAA 最佳反应条件为: 缓冲液 25 μ L、上下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L、探针(10 μ mol/L) 2 μ L、乙酸镁 2.5 μ L、DNA 模板 2 μ L、纯化水 14.5 μ L。反应管放入荧光恒温核酸扩增检测仪中 39 $^{\circ}$ C 反应 30 min。

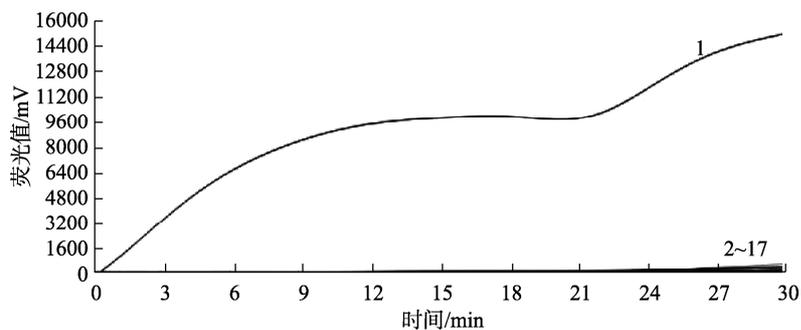
2.2 特异性测试

图 3 为引物探针 OMP-F1R1P1 扩增的效果图。由图 3 可知, 只有克罗诺杆菌 ATCC29544 中的阪崎肠杆菌能扩

增出荧光信号, 其余非克罗诺杆菌的 15 株细菌及无菌水均没有扩增出信号, 表明引物探针 OMP-F1R1P1 特异性较好。利用该引物探针对所有克罗诺标准菌株: 阪崎克罗诺杆菌 ATCC29544、苏黎世克罗诺杆菌 NCTC9529、莫金斯克罗诺杆菌 ATCC51329、丙二酸盐克罗诺杆菌 DSM18702、苏黎世克罗诺 DSM18703、都柏林克罗诺杆菌 DSM18705、都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种 DSM18706、都柏林克罗诺杆菌奶粉亚种 DSM18707 及 9 株实验分离克罗诺杆菌进行扩增, 也均能扩增出荧光信号(图省略), 表明该引物探针可适用于克罗诺杆菌的检测。

2.3 灵敏度测试

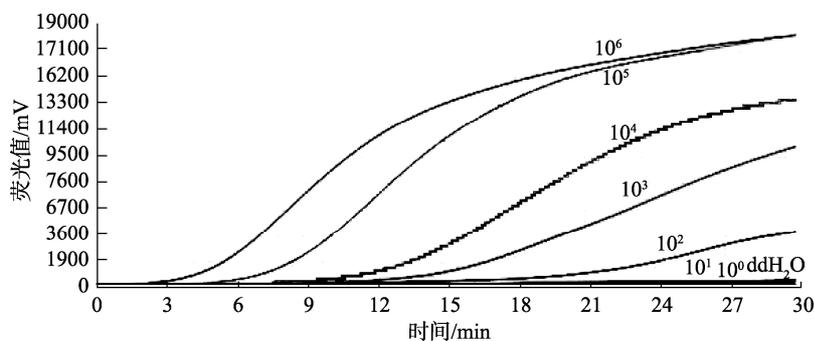
RAA 反应条件选择优化后的温度, 即 39 $^{\circ}$ C, 引物、探针终浓度均为 400 nmol/L。图 4 表明, 克罗诺杆菌属以引物探针 OMP-F1R1P1 进行荧光 RAA 扩增, 灵敏度可达 10^2 CFU/mL。



注: 1: 克罗诺杆菌 ATCC29544; 2: 产气肠杆菌 ATCC13048; 3: 铜绿假单胞菌 ATCC27853; 4: 肺克克雷伯氏 ATCC13883; 5: 溶血性链球菌 ATCC21059; 6: 大肠埃希氏菌 ATCC29522; 7: 单增李斯特菌 ATCC7644; 8: 奇异变形杆菌 ATCC12453; 9: 金黄色葡萄球菌 ATCC6538; 10: 鼠伤寒沙门氏 ATCC14028; 11: 阴沟肠杆菌 ATCC13047; 12: 副溶血性弧菌 ATCC17802; 13: 溶藻弧菌 ATCC33787; 14: 霍乱弧菌 FSCC232004; 15: 结肠炎耶尔森氏菌 ATCC23715; 16: 创伤弧菌 ATCC27562; 17: ddH₂O。

图 3 克罗诺杆菌属特异性反应结果

Fig.3 Specific reaction results of *Cronobacter* spp.



注: 克罗诺杆菌属稀释度由 10^6 至 10^0 CFU/mL, ddH₂O 作为阴性对照。

图 4 克罗诺杆菌属以引物探针 OMP-F1R1P1 进行荧光 RAA 灵敏度测试

Fig.4 Fluorescence RAA sensitivity test for *Cronobacter* spp by primer probe combination OMP-F1R1P1

2.4 基质检测限测试

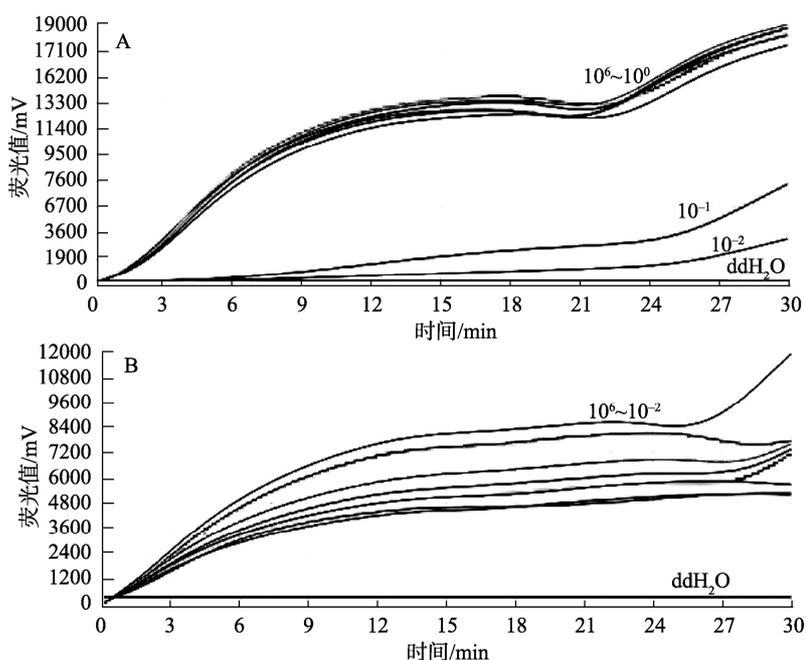
2.4.1 婴幼儿米粉中添加克罗诺杆菌属荧光 RAA 和传统法检出限比较

样品中人工污染不同浓度的克罗诺杆菌属 BPW 增菌 18 h 后, 再接种 mLST-Vm 二次增菌。BPW 增菌前荧光 RAA 扩增检测限为 10^5 CFU/mL(图未显示); 但经过 mLST-Vm 增菌只需 2 h 后, 荧光 RAA 对婴幼儿米粉中克罗诺杆菌属的检出限可达到原始添加浓度 10^{-2} CFU/mL(图 5A), 传统划线培养法检出限则为 10^1 CFU/mL; mLST-Vm 增菌 24 h 后, 荧光 RAA 检测限 10^{-2} CFU/mL 的荧光扩增值更高(图 5B), 传统划线培养法检出限才达到 10^{-1} CFU/mL。由此可见, 荧光 RAA 灵敏度明显高于传统划线

培养法。而且传统培养法还需要 24 h 后判断结果, 荧光 RAA 反应时间则只需 10~30 min, 因而检测更为快速简便。

2.4.2 婴幼儿奶粉中添加克罗诺杆菌属荧光 RAA 和传统法检出限比较

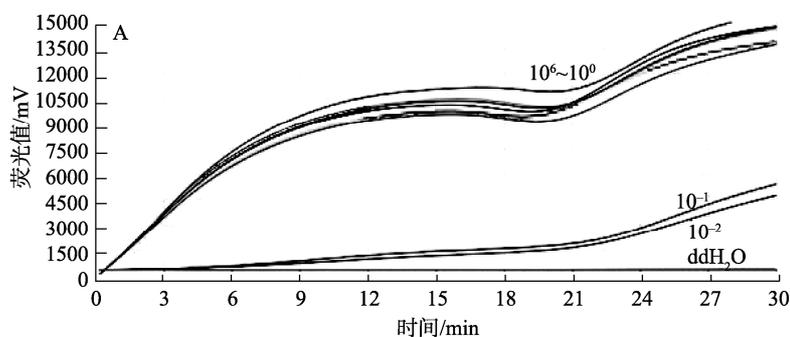
婴幼儿奶粉样品中人工污染不同浓度的克罗诺杆菌属, BPW 增菌前荧光 RAA 扩增检测限为 10^4 CFU/mL(结果未显示); mLST-Vm 增菌只需 2 h, RAA 对婴幼儿奶粉中克罗诺杆菌属的检出限即可达到原始添加浓度的 10^{-2} CFU/mL(图 6A), 传统划线培养法检出限为 10^1 CFU/mL; mLST-Vm 增菌 24 h 后, 荧光 RAA 检测限 10^{-2} CFU/mL 的荧光扩增值更高(图 6B), 传统划线培养法检出限才达到 10^{-1} CFU/mL。荧光 RAA 检测灵敏度及速度明显高于传统划线培养法。



注: A: 增菌 2 h; B: 增菌 24 h; 克罗诺杆菌属稀释度由 10^6 至 10^{-2} CFU/mL, ddH₂O 作为阴性对照。

图 5 克罗诺杆菌属添加入婴幼儿米粉在 mLST-Vm 中不同增菌时间后荧光 RAA 扩增结果

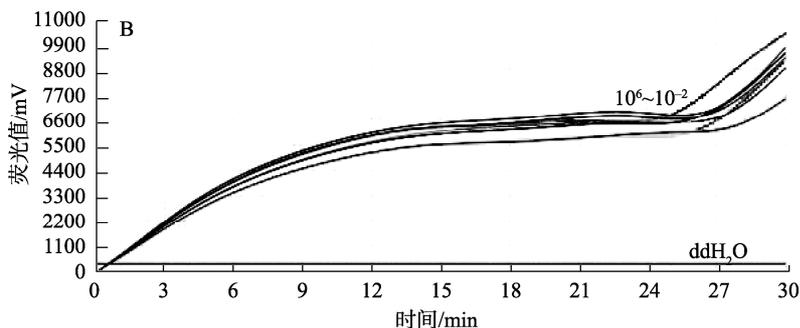
Fig.5 Fluorescence RAA amplification results of *Cronobacter* spp. added into infant rice flour in mLST-Vm after different enrichment time



注: A: 增菌 2 h;

图 6 克罗诺杆菌属添加入婴幼儿奶粉在 mLST-Vm 中不同增菌时间后荧光 RAA 扩增结果

Fig.6 Fluorescence RAA amplification results of *Cronobacter* spp. added into infant milk powder flour in mLST-Vm after different enrichment time



注: B: 增菌 24 h; 克罗诺杆菌属稀释度由 10^6 至 10^2 CFU/mL, ddH₂O 作为阴性对照。

图 6(续) 克罗诺杆菌属添加入婴幼儿奶粉在 mLST-Vm 中不同增菌时间后荧光 RAA 扩增结果

Fig.6 Fluorescence RAA amplification results of *Cronobacter* spp. added into infant milk powder flour in mLST-Vm after different enrichment time

婴幼儿米粉及婴幼儿奶粉为婴幼儿重要的食品及辅食产品, 食品基质对克罗诺杆菌属的检测有明显的干扰作用。由上述研究结果表明, 加标食品在 BPW 增菌前, 荧光 RAA 对婴幼儿米粉及婴幼儿奶粉的检测限分别为 10^5 、 10^4 CFU/mL。即使经过 BPW 增菌 18 h 后, 荧光 RAA 扩增曲线杂乱(图未显示), 因而需要根据国家标准方法进行二次增菌。mLST-Vm 增菌只需 2 h, 2 中加标基质检测限即可达到原始添加浓度的 10^2 CFU/mL, 灵敏度及速度有明显优势。

2.5 样品中克罗诺杆菌属的实际检测

按照 GB 4789.40—2016 对上海口岸跨境及市售的婴幼儿奶粉、婴幼儿米粉、乳清蛋白及乳清粉共 50 份进行前处理增菌后, 提取基因组 DNA, 采用建立的荧光 RAA 方法进行检测, 同时采用 GB 4789.40—2016 中推荐的传统划线培养方法进行检测, 结果表明, 1 份婴幼儿奶粉、1 份婴幼儿米粉及 2 份乳清蛋白荧光 RAA 方法检测结果阳性, 与 GB 4789.40—2016 的方法检测结果一致。

3 结论与讨论

将本研究建立的荧光 RAA 技术应用于婴幼儿奶粉及乳制品中克罗诺杆菌属检测。在纯培养条件下, 荧光 RAA 检测克罗诺杆菌属的检测限为 10^2 CFU/mL, 时间只需 20~30 min。比传统方法及实时荧光 PCR 方法更为快速灵敏。

RAA 作为一种新型的具有我国自主知识产权的等温核酸扩增技术, 其重组酶来源广泛, 使等温扩增技术得以丰富, 更充实了体外核酸扩增技术的发展^[15]。RAA 技术是 RPA 技术的改进, RPA 只能从噬菌体 T4uvsX 获得重组酶, 而 RAA 的重组酶可以从细菌或真菌中获得, 来源广泛, 成本低^[10]。对反应温度有很强的适应性, 检测最快在 3 min 内产生阳性信号。荧光 RAA 通常 20~30 min 完成反应, 而荧光 PCR 则通常需要 1 h 以上^[13]。此外, 39 °C 恒温的要求提供了荧光 RAA 优于荧光 PCR 的优点, 后者通常需要在严格条

件下改变循环温度。荧光 RAA 检测系统不需要复杂的实验室设置或昂贵的设备, 可以用便携式设备进行^[11]。值得注意的是, 就引物设计和成本效益而言, RAA 比同样是等温扩增的 LAMP 分析更简单、更便宜。

引物和探针的设计对于开发敏感、特异的荧光 RAA 检测至关重要。由于荧光 RAA 引物探针设计时需要引物长度 30~35 bp, 可以长于 35 bp, 不能短于 30 bp; 探针长度为 46~52 bp 碱基, 高于 PCR 扩增需要的引物探针长度, 并对 5' 及 3' 有设计要求, 因而特异性强。本研究应用建立的荧光 RAA 法检测克罗诺杆菌属, 结果表明, 阪崎克罗诺杆菌 ATCC29544 以及 7 株其余的克罗诺杆菌标准菌株和 9 株实验室分离的克罗诺杆菌均有扩增信号, 而 15 株非克罗诺杆菌未有扩增, 显示了引物探针的高特异性。在以往的克罗诺杆菌属的分子检测中, 分子靶点通常有 *ompA* 基因、*zpx* 基因、*gvrB* 基因及 *cgcA* 基因等^[18-19]。*ompA* 基因为克罗诺杆菌属保守的基因, 本研究通过对 OMP-F1R1P1、OMP-F1R2P1、OMP-F2R1P1、OMP-F2R2P1 及 OMP-F3R3P2、OMP-F4R4P3(结果未显示)的筛选, 最终确定了荧光扩增值及灵敏度最高的 OMP-F1R1P1 引物探针组合, 可很好地应用于克罗诺杆菌属荧光 RAA 检测。此外, 引物探针的浓度及扩增的温度也影响荧光 RAA 的最佳扩增效果。另外, 本研究发现, 低于 30 °C 时, 荧光 RAA 几乎没有信号。引物探针在反应体系中的终浓度也需要达到 400 nmol/L, 才有更好的灵敏度。

荧光 RAA 使用含有所有酶的冻干颗粒和一个封闭的管道, 操作简便快速, 将操作造成的污染风险降至最低, 还可以实时观察放大结果, 有效地避免了常规恒温放大检测方法中放大后开盖检测造成的气溶胶污染问题。与传统的 LAMP 和 PCR 方法相比, 具有相同或更好的灵敏度和更短的检测时间。该方法的局限为 RAA 中不同靶点的多重扩增目前比较困难, 因为 RAA 的每条引物都需要 30 bp 以上的互补序列, 探针需要 50 bp 左右的互补序列, 一管中的引物越多越长会导致非特异性扩增, 限制了 RAA 多重

分析的发展。近年来, 有学者将等温重组酶扩增技术和侧流试纸技术结合进行视觉检测, 大幅提高了便携性和成本效益, 也有望成为诊断病原体的有力工具^[20]。

参考文献

- [1] HUNTER CJ, PETROSYAN M, FORD HR, *et al.* *Enterobacter sakazakii*: An emerging pathogen in infants and neonates [J]. *Surg Infect*, 2008, 9: 533–539.
- [2] JOSEPH S, CETINKAYA E, DRAHOVSKA H, *et al.* *Cronobacter condiment* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. geno-mospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012, 62(6): 1277–1283.
- [3] CRUZ-CO'RDVAAA, ROCHA-RAMI'REZ LM, OCHOA SA, *et al.* Flagella from five *Cronobacter* species induce pro-inflammatory inflammatory cytokines in macrophage derivatives from human monocytes [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52091.
- [4] PEI XY, YAN L, ZHU JH, *et al.* The survey of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) in Infant and follow-up powdered formula in China in 2012 [J]. *Biomed Environ Sci*, 2016, 29(2): 99–106.
- [5] LIANG T, ZHOU P, ZHOU B, *et al.* Simultaneous quantitative detection of viable *Escherichiacoli* O157:H7, *Cronobacter* spp., and *Salmonella* spp. using sodium deoxycholate-propidiummonoazide with multiplex real-time PCR [J]. *J Dairy Sci*, 2019, 102: 2954–2965.
- [6] HU L, MA LM, ZHENG S, *et al.* Development of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Salmonella* ser. Enteritidis from egg products [J]. *Food Control*, 2018, 88: 190–197.
- [7] LIU J, ZHAN ZX, LIANG TB, *et al.* Dual-signal amplification strategy: Universal asymmetric tailing-PCR triggered rolling circle amplification assay for fluorescent detection of *Cronobacter* spp. in milk [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103: 3055–3065.
- [8] XIONG YF, LUO YS, LI H, *et al.* Rapid visual detection of dengue virus by combining reverse transcription recombinase-aided amplification with lateral-flow dipstick assay [J]. *Int J Infect Dis*, 2020, 95: 406–412.
- [9] WU T, GE YY, ZHAO KC, *et al.* A reverse-transcription recombinase-aided amplification assay for the rapid detection of N gene of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [J]. *Virology*, 2020, 549: 1–4.
- [10] CHEN C, LI XN, LI GX, *et al.* Use of a rapid reverse-transcription recombinase aided amplification assay for respiratory syncytial virus detection [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2018, 90: 90–95.
- [11] WANG WJ, WANG CG, ZHANG ZC, *et al.* Recombinase-aided amplification-lateral flow dipstick assay-A specific and sensitive method for visual detection of avian infectious laryngotracheitis virus [J]. *Poul Sci*, 2021, 100(3): 100895.
- [12] XUE GH, LI SL, ZHAO HQ, *et al.* Use of a rapid recombinase-aided amplification assay for *Mycoplasma pneumoniae* detection [J]. *BMC Infect Dis*, 2020, 20: 79.
- [13] HU JQ, WANG Y, SU HJ, *et al.* Rapid analysis of *Escherichiacoli* O157:H7 using isothermal recombinase polymerase amplification combined with triple-labeled nucleotide probes [J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 50: 101501.
- [14] XIEGY, ZHOU DG, ZHAO GJ, *et al.* Recombinase aided amplification with photoreactive DNA-binding dye for rapid detection of viable *Staphylococcus aureus* [J]. *LWT- Food Sci Technol*, 2021, 135: 110249.
- [15] ZHANGXP, GUO LC, MA RR, *et al.* Rapid detection of *Salmonella* with recombinase aided amplification [J]. *J Microbiol Meth*, 2017, 139: 202–204.
- [16] 孙晓红, 后来旺, 李达容, 等. 重组酶等温扩增技术在分析检测中的应用研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(24): 265–270.
- SUN XH, HOU LW, LI DR, *et al.* Research progress on the application of isothermal recombinase amplification in the field of analytical detection [J]. *Food Ferment*, 2020, 46(24): 265–270.
- [17] 魏莹, 郭利川, 张小平, 等. 重组酶介导扩增方法快速检测 A 族乙型溶血性链球菌[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2018, 41(5): 314–316.
- WEI Y, GUOLC, ZHANG XP, *et al.* Establishment of recombinase aided amplification assay for group *Astreptococcus pyogenes* detection [J]. *Chin Front Health Quarant*, 2018, 41(5): 314–316.
- [18] ZENG HY, LI CS, HE WJ, *et al.* *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonicus*, and *Cronobacter dublinensis* genotyping based on CRISPR locus diversity [J]. *Front Microbiol*, 2019, 8(10): 1989.
- [19] CARTER L, LINDSEY LA, GRIM CJ, *et al.* Multiplex PCR assay targeting a diguanylate cyclase-encoding gene, *cgcA*, to differentiate species within the genus *Cronobacter* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(2): 734–737.
- [20] HU JQ, HUANG RN, SUN YT, *et al.* Sensitive and rapid visual detection of *Salmonella typhimurium* in milk based on recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks [J]. *J Microbiol Meth*, 2019, 158: 25–32.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介

黄新新, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品微生物检测。

E-mail: 1967209925@qq.com



何宇平, 研究员, 主要研究方向为分子生物学检测

E-mail: heyuping668@163.com