

PCR 法检测动物源性食品中布氏弓形菌

游淑珠, 王小玉, 胡松楠, 唐食明, 邝筱珊, 冯家望

(珠海出入境检验检疫局技术中心, 广东珠海 519015)

摘要: 弓形菌是一种新型食源性致病菌, 其中以布氏弓形菌污染率最高。本研究采用扩增 23S rRNA 的 PCR 法特异性检测布氏弓形菌, 方法灵敏度可达 10^3 CFU/mL。2 株布氏弓形菌均特异性地扩增出了长度为 2061 bp 的条带; 嗜低温弓形菌、斯氏弓形菌、空肠弯曲菌等共 18 株不同种类的菌株均无扩增产物出现, 表明此 PCR 法能特异性的将布氏弓形菌鉴定到种一级水平。比较实验结果表明, API CAMPY 鉴定试剂盒对于布氏弓形菌鉴定仅能到弓形菌属一级水平, 本 PCR 法能实现布氏弓形菌种一级水平的鉴定, 用于布氏弓形菌的检测具有优势。55 份动物源性食品样品用 Johnson-Murano 肉汤增菌后用 PCR 法进行检测, 其中 5 份样品为布氏弓形菌阳性, 阳性检出率为 9.1%。上述实验结果表明, 本方法特异性强、操作简便, 节省了检测时间, 可用于动物源性食品中布氏弓形菌的快速检测。

关键词: 布氏弓形菌; 23S rRNA; 聚合酶链式反应 (PCR); API CAMPY 鉴定

文章编号: 1673-9078(2013)10-2533-2537

Detection of *Arcobacter butzleri* in Animal Derived Food by a PCR Method

YOU Shu-zhu, WANG Xiao-yu, HU Song-nan, TANG Shi-ming, KUANG Xiao-shan, FENG Jia-wang

(Technical Center of Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China)

Abstract: *Arcobacter* spp. are newly emerging human foodborne pathogens, of which *A. butzleri* has the highest contamination rate. PCR method amplifying 23S rRNA gene was applied to specifically detect *Arcobacter butzleri* in this study, and the sensitivity of the method was 10^3 CFU/mL. Both of the 2 different reference strains of *A. butzleri* amplified and formed a band with length of 2061 bp, while *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *Campylobacter jejuni* and other different strains, 18 strains in total, didn't produced any band. The results proved the PCR method had high specificity and could be used to identify *A. butzleri* at the species level. The comparative experimental results showed the PCR method also had advantage over the API CAMPY test kit, as the latter could only be used to identify *A. butzleri* at the genus level. 55 animal derived food samples containing the strains were enriched in Johnson-Murano broth and then detected by the PCR method, of which 5 samples were detected positive for *A. butzleri*, with the positive ratio of 9.1%. It suggested that the method was specific, easy to operate and timesaving, which could be used for rapid detection of *A. butzleri* in animal derived food.

Key words: *Arcobacter butzleri*; 23S rRNA; polymerase chain reaction (PCR); API CAMPY Identification

弓形菌(*Arcobacter*), 为变形菌门(*Proteobacteria*) ϵ -变形菌纲(*Epsilonproteobacteria*)弯曲菌目(*Campylobacteriales*)弯曲菌科(*Campylobacteraceae*)的一个新属, 其中的布氏弓形菌(*A. butzleri*)、嗜低温弓形菌(*A. cryaerophilus*)和斯氏弓形菌(*A. skirrowii*)被认为是新型食源性致病菌, 国际食品微生物标准委员会(International Commission on Microbiological Specifications for Foods, ICMSF)2002年将弓形菌规为对人类健康有严重危害类微生物^[1], 北欧食品分析委员会(Nordic Committee on Food Analysis, NMKL)

收稿日期: 2013-06-22

基金项目: 2011年度国家质检总局科研计划项目(20111K256)

作者简介: 游淑珠(1977-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品微生物检测

通讯作者: 冯家望, 男, 研究员, 研究方向: 食品安全

专家2007年也针对弓形菌做了专项技术报告(NMKL Technical Report No. 2, 2007)^[2]。弓形菌呈弯曲或螺旋形杆状, 不产芽胞, 与弯曲菌属(*Campylobacter*)细菌形态相似, 亲缘关系近, 但生长特性有一定差异, 弓形菌较弯曲菌生长温度范围更广、氧气耐受性更强, 因而较弯曲菌更易存活。弓形菌最佳生长氧气浓度为微量氧气(3~10%), 正常大气氧深度条件和厌氧条件下也可生长下也可生长的革兰氏阴性细菌。弓形菌最高生长温度为40℃左右, 最低生长温度被认为是15℃, 最佳生长温度为25~30℃, 较弯曲菌最佳生长温度(30~42℃)更低, 弯曲菌15~30℃不能生长。生长温度、氧气耐受性的差异和其它生化特性常用于鉴别弓形菌属和弯曲菌这2个属^[3-5]。以往的研究表明, 弓形菌中的布氏弓形菌是污染率最高的一种弓形菌, 本研究以布氏弓形菌为研究对象建立特异性检测的法。

自从Ellis等1977年首次建立了弓形菌的分离方法以来,不同学者建立了多种不同的增菌和平板分离模式的传统方法,其中以1999年Johnson和Murano建立的方法被认为是最好的方法,比较实验表明其弓形菌检出率最高^[6-8]。与其它微生物检测方法一样,传统方法用于弓形菌的检测同样存在步骤复杂、检测周期长等许多的不足。此外,由于弓形菌的生理生化特性表型差异性较大,导致难以依赖传统的生理生化特性进行弓形菌种间分型鉴定^[9-10]。随着近年来分子生物学及其技术的不断发展,依赖核糖体RNA(rRNA)的聚合酶链式反应(PCR)技术已逐步应用于微生物研究领域,克服了传统方法的不足,在种间分型方面具有无法比拟的优势。rRNA存在于所有细菌中,种类少,含量大(约占细菌RNA总量的80%),在结构与功能上具有高度保守性,在细菌的长期进行过程中变化不大,被认为是衡量生命进化历史最理想的标尺。本研究针对布氏弓形菌23S rRNA建立了适用于食品中布氏弓形菌特异性检测的PCR方法。

1 材料与试剂

1.1 样品

禽肉、畜肉各20份、牛奶10份和鸡蛋5份,共55份样品,均从市场上购得。

1.2 菌株

布氏弓形菌(*A. butzleri*) ATCC 49616(模式株)、ATCC 49942,嗜低温弓形菌(*A. cryaerophilus*) ATCC 43158(模式株)、ATCC 49615,斯氏弓形菌(*A. skirrowii*) ATCC 51132(模式株)、ATCC 51400,美国典型培养物保藏中心;空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni subsp. jejuni*) ATCC 33291,美国Microbiologics公司;空肠弯曲菌(*C. jejuni*) CF-1,上海市疾病预防控制中心;大肠杆菌(*Escherichia coli*) CCTCC AB 200068,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CCTCC AB 91053,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) CCTCC AB 91095,肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*) CCTCC AB 94018,单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*) CCTCC AB 97021,中国典型培养物保藏中心;大肠杆菌(*Escherichia coli*) CMCC 44155,福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*) CMCC(B) 51571,乙型溶血性链球菌(β -hemolytic *Streptococcus*) CMCC(B) 32210,中国微生物菌种保藏管理委员会医学细菌中心;大肠杆菌 O157:H7 NCTC 12900,阪崎肠杆菌(*Enterobacter*

sakazakii) ATCC 51329,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CMCC(B)26003,藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) CMCC(B)28001,副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC 17802,产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*) ATCC 13124,粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) CMCC(B) 32223,啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) ATCC 9763,广东环凯微生物科技有限公司;嗜酸乳杆菌(*Lactobillus acidophilus*) CGMCC 1.1878,中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

1.3 培养基、试剂与溶液

布氏肉汤、庖肉培养基、MRS肉汤、营养肉汤,北京陆桥技术有限公司产品;哥伦比亚血液琼脂平板,珠海迪尔生物工程有限公司产品;API CAMPY 鉴定试剂盒,法国bioMérieux公司产品。Johnson-Murano肉汤按文献方法配制^[5,11];Taq酶,DNA Marker,日本TAKARA公司产品;DNA提取试剂盒(离子柱型),天根生化科技(北京)有限公司产品;0.5mol/L EDTA(pH8.0)、TAE电泳储备液(50 \times),国产试剂配制。

1.4 引物

上游引物:5'-GCT AGA GGA AGA GAA ATC AA-3',下游引物:5'-TCC TGA TAC AAG ATA ATT GTA CG-3',上海Invitrogen公司合成。用无菌超纯水稀释成20 μ M, -20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.5 仪器与设备

MARK II智能厌氧系统,荷兰MART公司;BP3100S天平,德国Sartorius公司;BagMixer 400型拍击式均质器,法国Interscience公司;1565-2E恒温培养箱,美国SHELLAB公司;3K15高速离心机,德国SIGMA公司;MASTERCYCLER PRO梯度PCR仪,德国EPPENDORF公司;Mini sub cell电泳仪,美国BIO-RAD公司;Alphaimager HP凝胶成像分析系统,美国ALPHA公司。

2 实验方法

2.1 细菌培养

分别挑取活化的6种弓形菌和2株空肠弯曲菌接种布氏肉汤,弓形菌于30 $^{\circ}$ C培养48 h,空肠弯曲菌于接种布氏肉汤后用MARK II智能厌氧系统提供微需氧环境后于42 $^{\circ}$ C培养48 h;产气荚膜梭菌接种庖肉培养基,36 $^{\circ}$ C培养24 h;嗜酸乳杆菌接种MRS肉汤,36 $^{\circ}$ C培养

48 h; 其它菌接种营养肉汤, 36 °C 培养24 h。

2.2 布氏弓形菌的PCR法检测

2.2.1 细菌DNA模板的提取

取1 mL上述培养好的对数期菌液, 用DNA提取试剂盒并按其说明提取制备DNA模板。

2.2.2 PCR反应体系和反应条件

反应体系体积为50 μ L。1.5 mmol MgCl₂; 上、下游引物各50 pmol; 5 μ L 10 \times PCR缓冲液; 1.5 U Taq聚合酶; 4种dNTP终浓度各0.2 mM, 加无菌超纯水补足体积; 在生物安全柜内冰上无菌操作。

反应条件: 94 °C 预变性5 min; 94 °C 变性45 s, 58 °C 退火45 s, 72 °C 延伸2 min, 30个循环; 72 °C 延伸10 min, 4 °C 保存反应产物。

2.2.3 PCR扩增产物的电泳分析

用电泳缓冲液(1 \times TAE)制备2%琼脂糖凝胶(55 °C~60 °C时加入溴化乙锭至终浓度0.5 μ g/mL)。取10 μ L PCR扩增产物分别和2 μ L上样缓冲液混匀后上样, 用DNA分子量标记物做参照。5 V/cm恒压电泳, 电泳40 min, 电泳检测结果用凝胶成像分析系统记录并保存。

2.2.4 PCR扩增产物的序列分析

PCR扩增产物交由大连宝生物工程有限公司测序。将基因序列在www.ncbi.nlm.nih.gov网站上用BLAST软件分析序列同源性。

2.2.5 PCR方法特异性验证

用DNA提取试剂盒分别提取1.2中所列20株菌株的DNA, 相同条件进行PCR扩增, 验证PCR方法的特异性。

2.2.6 PCR方法灵敏度分析

将2株布氏弓形菌菌株新鲜培养肉汤用按照10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸倍稀释成浓度梯度, 各稀释度菌液分别用布氏琼脂30 °C培养48 h进行菌落计数, 并分别提取DNA、PCR扩增, 分析本PCR方法的灵敏度。

2.3 布氏弓形菌的API CAMPY鉴定试剂盒检测

测

将布氏弓形菌用棉签涂布接种哥伦比亚血液琼脂平板后, 按API CAMPY鉴定试剂盒说明书进行操作、试剂盒A部分置36 °C培养24 h, 试剂盒B部分用MARK II智能厌氧系统进行微需氧处理后置36 °C培养24 h。培养结束后按试剂盒说明书判读各反应孔结果, 用生物梅里埃公司提供的apiweb软件对结果处理获得鉴定结

果。

2.4 食品样品中布氏弓形菌的PCR法检测

2.4.1 样品制备和均质

禽肉、畜肉和鸡蛋分别称取25 g至带滤网的无菌均质袋; 牛奶吸取25 mL至带滤网的无菌均质袋。

向均质袋中加入225 mL无菌Johnson-Murano肉汤, 于拍击式均质器上均质2 min。

2.4.2 样品增菌

样品均质后于恒温培养箱30 °C培养48 h。

2.4.3 PCR检测

样品增菌结束后, 取增菌液1 mL按2.3.1~2.3.3中的方法进行PCR扩增和电泳检测。

3 结果与讨论

3.1 布氏弓形菌的PCR法检测

3.1.1 PCR扩增产物序列分析

对布氏弓形菌标准菌株的PCR扩增产物电泳分析和扩增产物测序结果表明获得片段与预期片段大小(2061 bp)一致, 将布氏弓形菌PCR扩增产物测序结果在www.ncbi.nlm.nih.gov网站上用BLAST软件分析序列同源性, 表明布氏弓形菌标准菌株与NCBI网站上的布氏弓形菌23S rRNA的同源性均大于99%, 可判断本实验所扩增产物为弓形菌23S rRNA基因产物。

3.1.2 PCR特异性验证

20株标准菌株的PCR检测结果产物的电泳图见图1, 2株布氏弓形菌标准菌株扩增出了目的片段, 与布氏弓形菌亲缘关系近的2株嗜低温弓形菌、2株斯氏弓形菌和2株空肠弯曲菌, 以及其它12株菌株和用水设置的空白对照均无扩增条带产生。



图1 2株布氏弓形菌标准菌株和其它18株标准菌株的PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR Products of 2 reference strains of *A. butzleri* and 18 other reference strains

注: M. DL2000 marker; 1. 布氏弓形菌 ATCC 49616; 2. 布

氏弓形菌 ATCC 49942; 3.嗜低温弓形菌 ATCC 43158; 4.嗜低温弓形菌 ATCC 49615; 5.斯氏弓形菌 ATCC 51132; 6.斯氏弓形菌 ATCC 51400; 7.空肠弯曲菌 ATCC 33291; 8.空肠弯曲菌 CF-1; 9.大肠杆菌 CMCC44155; 10.福氏志贺氏菌 CMCC(B) 51571; 11.乙型溶血性链球菌 CMCC(B)32210; 12.大肠杆菌 O157:H7 NCTC 12900; 13.阪崎肠杆菌 ATCC 51329; 14.金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003; 15.藤黄微球菌 CMCC(B)28001; 16.副溶血性弧菌 ATCC 17802; 17.产气荚膜梭菌 ATCC 13124, 18.粪肠球菌 CMCC(B)32223; 19.啤酒酵母 ATCC 9763; 20.嗜酸乳杆菌 CGMCC 1.1878; B.空白对照。

23S rRNA 基因既具有保守性, 又具有较为显著的可变性, 利用其设计引物已广泛并成功地用于不同细菌的鉴定, 本研究结果显示, 23S rRNA 基因可用于布氏弓形菌特异性鉴定。本方法对于布氏弓形菌的检测特异性强。

3.1.3 PCR 灵敏度分析

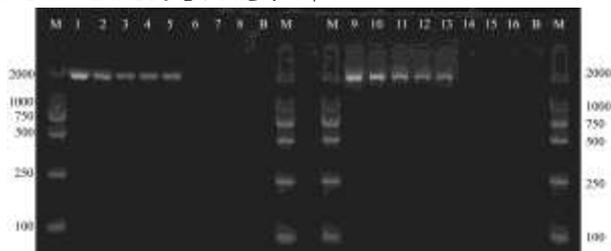


图 2 2 株布氏弓形菌标准菌株 PCR 灵敏度分析电泳图

Fig.2 Electrophoresis of PCR sensitivity analysis of 2 reference strains of *A. butzleri*

注: M. DL2000marker; B. 空白对照; 1~8.布氏弓形菌 ATCC 49616 各稀释度菌液, 菌浓度依次为 10^7 CFU/mL、 10^6 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^4 CFU/mL、 10^3 CFU/mL、 10^2 CFU/mL、 10^1 CFU/mL、 10^0 CFU/mL; 9~16. 布氏弓形菌 ATCC 49942 各稀释度菌液, 菌浓度依次为 10^7 CFU/mL、 10^6 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^4 CFU/mL、 10^3 CFU/mL、 10^2 CFU/mL、 10^1 CFU/mL、 10^0 CFU/mL。

用于灵敏度试验的布氏弓形菌 ATCC 49616 和布氏弓形菌 ATCC 49942 肉汤原液菌落计数结果分别为 1.8×10^8 CFU/mL 和 3.2×10^8 CFU/mL, 2 株布氏弓形菌各稀释度稀释液电泳图见图 2, 由些可以判断布氏弓形菌 ATCC 49616 和布氏弓形菌 ATCC 49942 的检测灵敏度分别为 1.8×10^3 CFU/mL 和 3.2×10^3 CFU/mL, 据此可判断, 本 PCR 方法的检测灵敏度可达 10^3 CFU/mL。

3.2 布氏弓形菌的 API CAMPY 鉴定试剂盒检测

布氏弓形菌模式株 ATCC 49616 和标准菌株

ATCC 49942 经 API CAMPY 鉴定试剂盒鉴定均为嗜低温弓形菌, 由此可知, API CAMPY 鉴定试剂盒对于布氏弓形菌的鉴定仅能达到在属一级水平的鉴定。图 3 是 2 株布氏弓形菌 API CAMPY 鉴定结果。

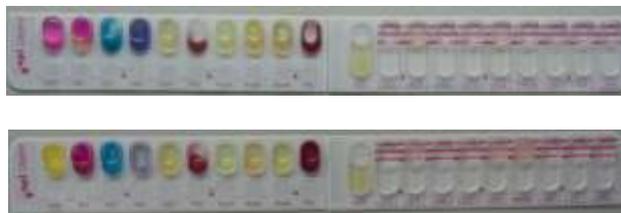


图 3 布氏弓形菌 ATCC 49616(上)和 ATCC 49942(下)的 API CAMPY 试剂盒鉴定结果

Fig.3 Identification of *A. butzleri* ATCC 49616 (top) and ATCC 49942 (bottom) with API CAMPY

3.3 动物源性食品样品中布氏弓形菌的 PCR 法检测

检测禽肉、畜肉、牛奶和鸡蛋样品共 55 份, 其中 5 份样品布氏弓形菌 PCR 检测阳性, 阳性率为 9.1%, 各类样品检测结果见表 1。

表 1 动物源性食品样品中布氏弓形菌检测结果

Table 1 Detection Result of *A. butzleri* in animal derived food samples

动物源性食品种类	样品数	阳性检出数	阳性检出率/%
禽肉	20	3	15
畜肉	20	1	5
牛奶	10	1	10
鸡蛋	5	0	0
总计	55	5	9.1

4 结论

4.1 弓形菌作为一种新型食源性致病菌, 备受关注, 已成为国际研究热点, 但少有国内研究报道, 弓形菌中以布氏弓形菌最为常见, 本研究以布氏弓形菌作为研究对象, 建立了布氏弓形菌特异性检测的 PCR 方法。

4.2 本研究建立了布氏弓形菌特异性检测的 PCR 方法, 方法灵敏度可达 10^3 CFU/mL。本研究将本方法和 API CAMPY 鉴定试剂盒对布氏弓形菌的检测的效果进行了比较, 研究结果表明, API CAMPY 鉴定试剂盒鉴定布氏弓形菌仅限于弓形菌属一级水平, 这与弓形属难以依赖传统的生理生化特性进行弓形菌种间分型鉴定相关文献报道是一致的^[9-10]。本研究利用针对

布氏弓形菌 23S rRNA 扩增的 PCR 法特异性强, 2 株布氏弓形菌均特异性地扩增出了长度为 2061 bp 目的基因的片段; 嗜低温弓形菌、斯氏弓形菌、空肠弯曲菌等共 18 株不同种类的菌株均无扩增产物出现, 表明此 PCR 法能特异性的将布氏弓形菌鉴定到种一级水平, 与 API CAMPY 鉴定试剂盒相比具有优势。

4.3 对 55 个动物源性食品样品采用 Johnson-Murano 肉汤增菌后, PCR 法进行布氏弓形菌的检测, 55 个样品其中 5 个样品为布氏弓形菌阳性, 阳性率为 9.1%。上述实验结果表明, 本研究中的布氏弓形菌检测 PCR 方法特异性强、操作简便, 节省了检测时间, 可用于动物源性食品中布氏弓形菌的快速检测。

参考文献

- [1] Kluwer/Plenum, Dordrecht. Microorganisms in Foods? In Microbiological Testing in Food Safety Management. [R]. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), New York, 2002: 171
- [2] Flemming Hansen, Danish Meat, Katharina EP Olsen, et al. *Arcobacter* - an emerging food borne pathogen? [R]. NMKL Technical Report No. 2, 2007
- [3] George M Garity, Don J Brenner, Noel R Krieg, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, VOLUME TWO [M]. 2nd ed. East Lansing: Springer Michigan State University, 2004
- [4] Houf Kurt, Stephan Roger. Isolation and characterization of the emerging foodborne pathogen *Arcobacter* from human stool [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 68(2): 408-413
- [5] Houf K, De Smet S, Baré J, et al. Dogs as carriers of the emerging pathogen *Arcobacter* [J]. Vet Microbiol, 2008, 130(1-2): 208-213
- [6] Johnson LG, Murano E A. Comparison of three protocols for the isolation of *Arcobacter* from poultry [J]. J. Food Protect, 1999, 62(6): 610-614
- [7] Golla SC, Murano EA, Johnson LG, et al. Determination of the occurrence of *Arcobacter butzleri* in beef and dairy cattle from Texas by various isolation methods [J]. J. Food Protect, 2002, 65(12): 1849-1853
- [8] Scullion R, Harrington CS, Madden RH, et al. A comparison of three methods for the isolation of *Arcobacter* spp. from retail raw poultry in Northern Ireland. [J]. J. Food Protect. 2004, 67(4): 799-804
- [9] Kabeya H, Kobayashi Y, Maruyama S, et al. One-step polymerase chain reaction-based typing of *Arcobacter* species [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 81 (2): 163-168
- [10] On S L. Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms [J]. Clin. Microbiol. 1996, 9: 405-422
- [11] Johnson L G, Murano E A. Development of a new medium for the isolation of *Arcobacter* spp. [J]. J. Food Protect, 1999, 62(5): 456-462