

致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌 实时荧光 RPA 检测方法的建立

刘婧文^{1,2}, 黄成栋¹, 凌莉¹, 王菊芳², 李志勇¹

(1. 广州海关技术中心, 广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室, 广东广州 510623)

(2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 本研究建立了致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌的实时荧光重组酶聚合酶扩增 (real-time Recombinase Polymerase Amplification, real-time RPA) 检测方法。根据致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌黏附侵袭位点 *ail* 致病基因序列设计特异性引物和 *exo* 探针, 在 37 °C 恒温下 20 min 内即可完成检测, 方法特异性高, 对目的 DNA 的检测限为 0.1 ng/μL。在稳定性实验中, 对 10 ng/μL、0.1 ng/μL、0.01 ng/μL、0.001 ng/μL 的目的 DNA 各进行 8 个平行的测试, 0.1 ng/μL 及以上浓度的 DNA 均可稳定检出; 当 DNA 为 0.1 ng/μL 时, 8 个平行的阈值时间和最大荧光值的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 最低且 ≤7.06%。致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌在奶粉和牛肉的人工污染样品中初始污染量为 3 CFU/25 g 时, 培养 20 h 后, 可用本方法检出。对 20 份各种类实际样品进行检测, 本方法与国标方法结果一致。本方法对致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌的常温现场快速定性检测具有重要意义。

关键词: 致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌; 实时荧光重组酶聚合酶扩增; 快速检测; 食品安全

文章编号: 1673-9078(2020)02-255-262

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.2.036

Development of a Real-time RPA Assay for Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Detection

LIU Jing-wen^{1,2}, HUANG Cheng-dong¹, LING Li¹, WANG Ju-fang², LI Zhi-yong¹

(1. Guangzhou Customs Technology Center, Guangdong Provincial Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal, Plant and Food, Guangzhou 510623, China)

(2. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: A real-time recombinase polymerase amplification (RPA) assay for pathogenic *Yersinia enterocolitica* detection was established in this work. According to the sequences of *Yersinia enterocolitica* pathogenic *ail* (Attachment Invasion Locus) gene, the specific primer and *exo* probe were designed and the detection could be finished within 20 mins at 37 °C. This real-time RPA assay showed a good specificity and the detection limit of the target DNA was 0.1 ng/μL. In stability study, the assay was performed at the DNA concentration of 10 ng/μL, 0.1 ng/μL, 0.01 ng/μL and 0.001 ng/μL in octuplicate. The concentration of 0.01 ng/μL and above could be detected. The relative standard deviation (RSD) of threshold time and maximum fluorescence values of the eight parallels at 0.1 ng/μL DNA were the lowest (≤7.06%). In artificially contaminated powdered milk and beef samples with an initial bacterial concentration of 3 CFU/25 g, the pathogen can be detected using this real-time RPA method after incubation for 20 hours. The detection of 20 different real samples showed that the results of real-time RPA assay were consistent with that of GB 4789.8-2016, which is the national standard of China to detect *Yersinia enterocolitica*. This real-time RPA assay is helpful for the rapid field inspection at room temperature when conducting qualitative detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*.

Key words: pathogenic *Yersinia enterocolitica*; real-time recombinase polymerase amplification (real-time RPA); rapid detection; food safety

小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 属肠杆菌科, 是革兰氏阴性菌, 不产芽孢, 无荚膜,

收稿日期: 2019-09-14

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1601203)

作者简介: 刘婧文 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物工程

通讯作者: 李志勇 (1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品安全

在环境中分布广泛。它是一种在 0~4 °C 也可繁殖的人畜共患致病菌, 因此容易通过冰箱和冷藏食品 (尤其是肉类和乳制品) 感染人类, 引起诸如肠胃炎、关节炎、心肌炎、脓肿、皮肤病等疾病^[1-3]。致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌的感染病例遍布全球, 尤其发生在北欧、日本、美国等发达国家和地区^[4]。在 1996 年至 2009

年间,美国上报 FoodNet (Foodborne Diseases Active Surveillance Network) 的小肠结肠炎耶尔森氏菌感染病例有两千多例,近一半为 5 岁以下的婴幼儿^[5]。中国疾病预防控制中心在 2010-2015 年的调查表明,我国 5 岁以下儿童的该菌感染率和发达国家相近^[4]。因此,很多国家制定了检测该菌的食品标准^[6-11],以保障食品安全和民众健康。

目前,致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌检测主要采用传统生化培养法,其步骤繁琐,检测周期长。利用聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 方法^[7,11,12]、环介导等温扩增法 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)^[8,13]、多位点序列分析 (Multilocus sequence typing, MLST)^[9]等检测该菌已有相关标准,但由于需要变温、中高温等设备,检测时间偏长,实际用于现场快速检测不多。酶联免疫吸附方法、胶体金免疫层析技术、免疫磁性分离技术、生物芯片技术和生物飞行质谱技术等分子生物学方法也被用于检测小肠结肠炎耶尔森氏菌^[14],但检测过程复杂或处于研究之中,尚未在检测中得到普及运用。因此,建立适合实际应用的致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌快速检测方法,仍有重大实用意义。

实时荧光重组酶聚合酶扩增 (real-time Recombinase Polymerase Amplification, RPA) 技术是 2006 年开发的新型等温扩增技术^[15],该方法主要通过三种酶:重组酶和引物结合并扫描同源区域、单链结

合蛋白与被置换的单链结合、以及 DNA 聚合酶在 3' 端进行核酸的添加,来模拟生物体内的高效率的 DNA 复制过程,无须通过高温和变温来解旋、延伸 DNA,在常温下即可迅速进行反应^[16],最低可检测 1~1000 个拷贝的 DNA 或 RNA 分子。RPA 结果读取方式多样,可采用琼脂糖凝胶电泳、实时荧光、侧流层析试纸条的方式,已应用于病毒、细菌、转基因作物、寄生虫、动物源性、癌细胞等检测研究^[17,18]。本研究建立的致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌 real-time RPA 检测方法操作简单,在 37 °C 恒温、20 min 内即可完成检测,可为致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌鉴别提供技术支持,对及时采取防控措施具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

奶粉和牛肉:经国标法检测小肠结肠炎耶尔森氏菌阴性;改良磷酸盐缓冲液 (PSB),北京陆桥;改良 Y 培养基,北京陆桥;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;基础型 RPA 试剂盒 (TwistAmp™ basic kit),英国 TwistDx 公司;荧光型 RPA 试剂盒 (TwistAmp™ exo kit),英国 TwistDx 公司;引物及探针,生工生物工程(上海)股份有限公司。

本研究中用到的菌株见表 1。

表 1 实验菌株

Table 1 Bacterial strains used in this study

菌株名称	菌株编号
小肠结肠炎耶尔森氏菌 (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	CMCC 52204
小肠结肠炎耶尔森氏菌 (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	CMCC 52207
小肠结肠炎耶尔森氏菌 (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	CMCC 52221
小肠结肠炎耶尔森氏菌 (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	CMCC 52225
克氏耶尔森氏菌 (<i>Yersinia kristensenii</i>)	ATCC 33639
假结核耶尔森氏菌 (<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)	CMCC 53504
假结核耶尔森氏菌 (<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)	CMCC 53510
大肠埃希氏菌 (<i>Escherichia coli</i>)	ATCC 25922
大肠埃希氏菌 O157:H7 (<i>Escherichia coli</i> O157: H7)	ATCC 10907
阪崎肠杆菌 (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	ATCC 12868
单核细胞增生李斯特氏菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 19115
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC 6538
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	CMCC 26003
鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	ATCC 14028
弗氏柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter freundii</i>)	CICC 10296
普通变形杆菌 (<i>Proteus pneumonia</i>)	NICPB 490059
奇异变形杆菌 (<i>Proteus mirabilis</i>)	ATCC 35659

表2 本实验所用的引物和探针

Table 2 Primers and probe used in this study

引物名称	序列 (5'-3')
RPA-F	ATAGGTTTCGTTTGCTTATACTCATCAGGGA
RPA-R	AGTAATCCATAAAGGCTAACATATTCGTTG
RPA-Probe	CTCATCAGGGATATGATTTCCTTCTATGGCAG[FAM-dT][THF]A[BHQ1-dT]AAGTTTGGTCATGGT[3'-block]
片段长度	143 bp

1.2 仪器与设备

小型高速离心机 Centrifuge 5424, 德国 Eppendorf 公司; 旋涡混合器 MS 2, 德国 IKA 公司; 微量核酸蛋白测定仪 Nanospec, 日本岛津公司; 电泳仪, Bio-Rad 公司; 恒温金属浴, 杭州博日科技有限公司; 实时荧光 PCR 仪 7900 HT, 美国 ABI 公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取

将表 1 中菌株复苏纯化后, 取 24 h 的新鲜培养物进行提取。最后用 50 μL 的 TE 缓冲液进行洗脱, 并过吸附柱两次, 以增加回收率。使用微量核酸蛋白测定仪 Nanospec 测定浓度, 并将致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC 52207 的 DNA 质量浓度调至 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。全部 DNA 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3.2 引物探针设计

Exo 探针的命名由来是它需要核酸外切酶 III (Exonuclease III) 来促成荧光的发生。当探针完整时, 5'端报告基团发射的荧光被 3'端的淬灭基团吸收, 体系不发荧光; 在体系中添加核酸外切酶 III 后, 将两个基团之间的四氢呋喃 (THF) 位点进行切割, 使荧光基团与淬灭基团分离, 从而产生荧光。荧光的强弱指示 RPA 的扩增效率。

参考标准 ISO/TS 18867: 2015 和文献^[11,13]中常用的检测致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌的目的基因后, 本研究选择了致病基因 *ail* (attachment invasion locus, 黏附侵袭位点) 基因 (NCBI Reference Sequence: NC_008800.1) 作为目的基因。在 GeneBank 中获得相应序列后, 利用 Oligo7 软件进行目的片段的筛选, 设计了 3 套引物和 exo 探针。再利用 NCBI 网站中的 BLAST 功能检验引物探针的特异性, 并通过普通型 RPA 和琼脂糖凝胶电泳的初筛, 确定使用表 2 所列特异性引物探针进行后续试验。

1.3.3 反应体系和条件

real-time RPA 实验: 取 rehydration buffer 29.5 μL , RPA-F (10 mM) 和 RPA-R (10 mM) 各 2.1 μL , RPA-Probe (10 mM) 0.6 μL , ddH₂O+模板 DNA 共 13.2

μL , 2.5 μL MgAc (280 mM); 共 50 μL 的体系。basic RPA 实验中除了不加探针, 以及 RPA-F (10 mM) 和 RPA-R (10 mM) 各取 2.4 μL 之外, 其它成分与 real-time-RPA 一样, 且 DNA 用量均为 1.5 μL 。

将除 2.5 μL MgAc 之外的 47.5 μL 溶液转移至反应微球管中, 吹打混匀; 然后将 2.5 μL MgAc 加入反应管盖上, 所有反应管一起瞬时离心, 立刻置于恒温金属浴或实时荧光检测仪中开始反应。

在 basic RPA 实验中, 使用恒温金属浴: 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 20 min。

在 real-time RPA 实验中, 使用实时荧光 PCR 仪 7900 HT 作为恒温荧光检测装置。反应程序: 37 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; 37 $^{\circ}\text{C}$ 24 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 6 s (采集荧光); 40 个循环, 即 20 min。7900HT 仪器设置 40 个循环, 最后约 5 个循环的荧光信号曲线会出现不完整现象, 故在后文中只显示 35 个循环的曲线图。

1.3.4 特异性

使用表 1 所列菌株的 DNA, 通过 basic RPA 和 real-time RPA 分别对引物探针进行特异性验证。

1.3.5 灵敏度

将上述 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC 52207 DNA 进行 10 倍梯度稀释至 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、0.1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、0.01 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、0.001 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。每个梯度做两个平行, 进行 real-time RPA 检测。

1.3.6 稳定性

选取 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、0.1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、0.01 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、0.001 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 DNA 进行稳定性实验。每个浓度进行 8 次重复。

1.3.7 人工污染实验

选取小肠结肠炎耶尔森氏菌阴性的奶粉和牛肉样品, 人工添加致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC 52207。称取相应食物样品 10 g 到 90 mL 的灭菌 PSB 中, 均质 1 min 后, 分装到试管中, 其中 1 管为 5 mL, 其余 8 管为 9 mL。在 5 mL 样品溶液试管中, 添加含 10⁷ CFU/mL 菌量的致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC 52207 菌液 1 mL, 以及 4 种干扰菌液 (假结核耶尔森氏菌 CMCC 53510、沙门氏菌 ATCC 14028、阪崎肠杆菌 ATCC 12868、金黄色葡萄球菌 ATCC 6538, 菌量均为 10⁵ CFU/mL) 各 1 mL, 制成 10 mL

混合菌液。混合菌液用 9 mL 样品溶液试管进行 10 倍梯度稀释并进行菌落计数。

称取食品样品每份 25 g 到 225 mL 的灭菌 PSB 中, 均质 1 min。

往每份食品样品中分别加入 1 mL 不同稀释倍数的上述混合菌液 (菌量分别为 10^0 CFU/mL, 10^1 CFU/mL, 10^2 CFU/mL), 置 27 °C 培养。在培养的 12 h、20 h、48 h 各吸取 1 mL 培养液提取 DNA, DNA 模板用量为 1.5 μ L, 两个平行, 进行荧光 RPA 实验, 并同时用国标方法 GB 4789.8-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验》进行检测。

1.3.8 实际样品测试

从卫生条件一般的超市和菜市场购买婴幼儿配方奶粉、冷藏冷冻食品 (鲜牛奶等需冷藏的乳制品、新鲜/冷冻肉类、速冻饺子、新鲜蔬菜/即食沙拉、冷饮) 等 20 份样品, 每份取 25 g (mL) 到 225 mL 的灭菌 PSB 中, 均质 1 min, 放置 27 °C 培养 20 h 和 48 h 后, 用 real-time RPA 方法和国标方法 GB 4789.8-2016 同时进行检测。

1.3.9 数据处理

用 7900HT 实时荧光检测仪的“Multicomponented data”模式导出 real-time RPA 实验中的数据, 计算多个平行的阈值时间 (Threshold Time, TT) 和最大荧光值以及最大荧光值出现时间的相对标准偏差 (Relative Standard Deviation, RSD), 以数据化的形式, 评价实验操作和结果的重复性。

2 结果与讨论

2.1 特异性实验结果

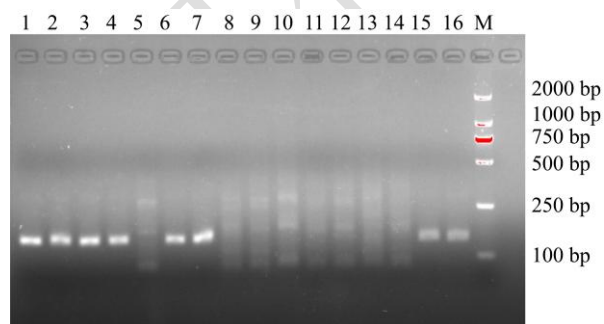


图 1 致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌 basic RPA 特异性结果

Fig.1 Specificity of basic RPA detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*

注: 1~3. 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC 52207; 4. 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC 52221; 5. 克氏耶尔森氏菌 ATCC 33639; 6. 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC 52225; 7. 小肠结肠炎

耶尔森氏菌 CMCC 52204; 8. 假结核耶尔森氏菌 CMCC 53504; 9. 假结核耶尔森氏菌 CMCC 53510; 10. 阪崎肠杆菌 ATCC 12868; 11. 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538; 12. 金黄色葡萄球菌 CMCC 26003; 13. 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC 19115; 14. ddH₂O; 15~16. 阳性对照; M. DNA Marker。

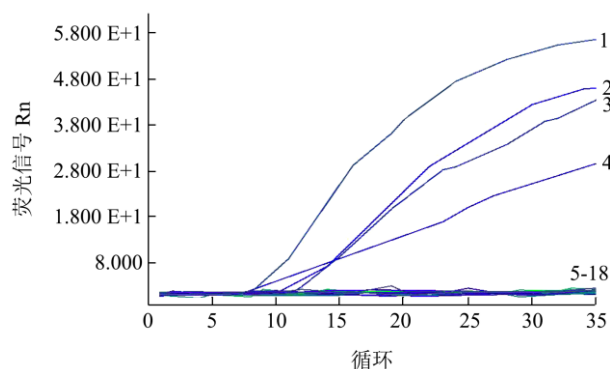


图 2 致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌荧光 RPA 特异性结果

Fig.2 Specificity of real-time RPA detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*

注: 1. 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC 52204; 2. 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC 52207; 3. 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC 52225; 4. 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC 52221; 5. 假结核耶尔森氏菌 CMCC 53504; 6. 假结核耶尔森氏菌 CMCC 53510; 7. 克氏耶尔森氏菌 ATCC 33639; 8. 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538; 9. 金黄色葡萄球菌 CMCC 26003; 10. 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC 19115; 11. 沙门氏菌 ATCC 14028; 12. 普通变形杆菌 NICIPB 490059; 13. 奇异变形杆菌 ATCC 35659; 14. 弗氏柠檬酸杆菌 CICC 10296; 15. 阪崎肠杆菌 ATCC 12868; 16. 大肠埃希氏菌 ATCC 25922; 17. 大肠埃希氏菌 O157:H7 ATCC 10907; 18. ddH₂O。

根据图 1 的琼脂糖凝胶电泳结果和图 2 的 real-time RPA 结果, 本套引物探针只对致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌的目的基因有特异性扩增。本实验特意将目的片段大小设计为 143 bp, 和 basic RPA 试剂盒自带的阳性对照大小一样, 方便观察和进行引物的筛选, 从图 1 的凝胶电泳图可以看到第 1~4 道, 第 6、7 道和阳性对照 (第 15、16 道) 的片段大小一致。

2.2 灵敏度实验结果

根据荧光 RPA 结果见图 3, 在 40 个循环内 (即 20 min 内), 本套引物探针可检测到最低为 0.01 ng/ μ L 的致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌基因组 DNA。但 0.01 ng/ μ L DNA 的 8 个平行之间的 real-time RPA 结果不稳定 (详见 2.3 部分), 因此, 将可以保证稳定检出的 0.1 ng/ μ L 作为本方法的检出限。

因为小肠结肠炎耶尔森氏菌生长极其缓慢的特性, 传统分离和生化鉴定法至少需要 8 天才能完成整

套检测流程；而国内外建立的 PCR、LAMP、MLST 等分子生物学方法，也都至少需要过夜培养，才能继续进行检测。在灵敏度上，检测限为 0.1 ng/μL 的 RPA 远比不上能检出 85 fg（相当于 10 个细胞）^[12] 的致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌的 PCR 技术，但 RPA 方法的优势在于能在常温下进行快速初筛，4~11 min 即可有可视化信号产生，而 PCR 检测 0.17 ng/μL DNA 的 Ct 值为 (21.75±0.58) 个循环 (PCR 程序为：95 °C 10 min；95 °C 15 s，60 °C 1 min；45 个循环)，即至少需要 36 min。在同样经过增菌的情况下，real-time RPA 方法更适合去进行快速初筛工作。

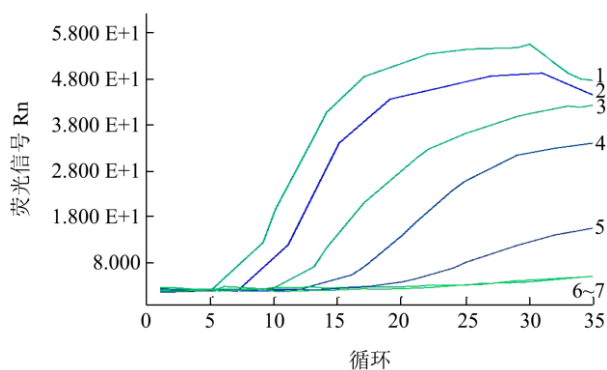


图3 致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌荧光 RPA 灵敏度结果

Fig.3 Sensitivity of real-time RPA for pathogenic *Yersinia enterocolitica* detection

注：1.100 ng/μL；2.10 ng/μL；3.1 ng/μL；4.0.1 ng/μL；5.0.01 ng/μL；6.0.001 ng/μL；7.ddH₂O。

2.3 稳定性实验结果

选取 10 ng/μL, 0.1 ng/μL, 0.01 ng/μL, 0.001 ng/μL 致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌 DNA 为模板，50 μL 体系内加 1.5 μL 的 DNA，每个浓度做 8 个平行，进行稳定性测试。结果如图 4a~4d 所示，10 ng/μL 和 0.1 ng/μL 两个浓度的 8 个平行均能稳定检出；0.01 ng/μL 虽大部分能够检出，但和空白对照的荧光强度比较接近、且曲线重合率也欠佳；只有在 0.1 ng/μL 时，8 条曲线的重合率最高，因此把 0.1 ng/μL 作为稳定检出限。

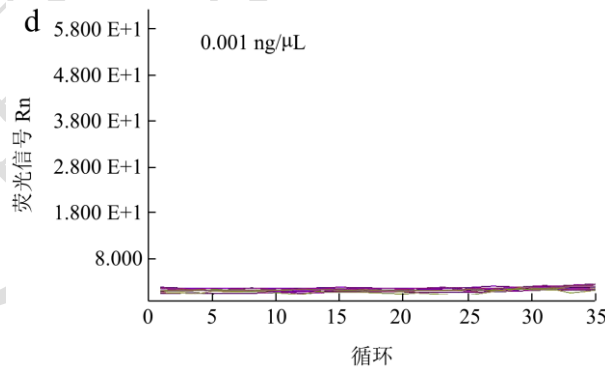
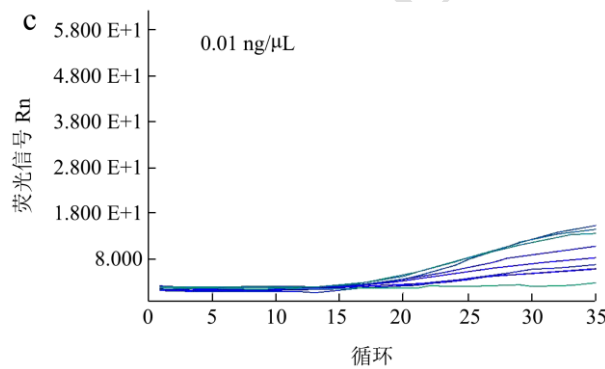
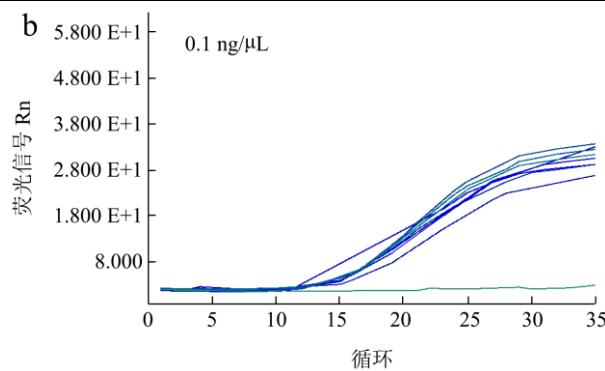
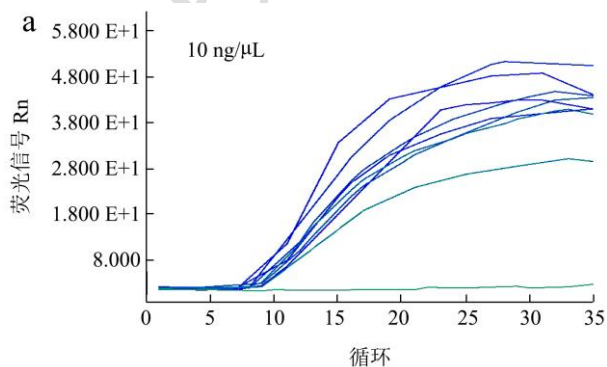


图4 致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌荧光 RPA 稳定性结果

Fig.4 Stability of real-time RPA for pathogenic *Yersinia enterocolitica* detection

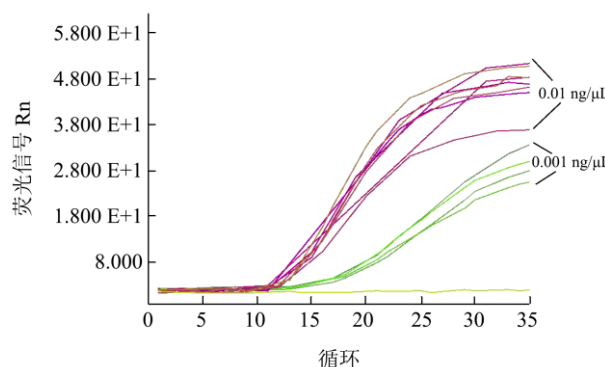


图5 DNA 模板量增至 12.5 μL 时的致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌荧光 RPA 结果

Fig.5 Results of real-time RPA for pathogenic *Yersinia enterocolitica* detection when using 12.5 μL DNA template

加大 DNA 模板量至 12.5 μL，见图 5，能更好地检出 8 个平行的 0.01 ng/μL 的小肠结肠炎耶尔森氏菌

DNA, 且对测试的4个平行的0.001 ng/ μ L的DNA, 也均能检出。

实验结果表明, 与PCR方法不同, 在样品含菌量比较低的情况下, 加大模板量, 能明显提高RPA方法检出限。

2.4 人工污染实验结果

表3 人工污染样品的检测结果

污染量/ (CFU/25 g)	增菌 时间/h	Real-time RPA		GB 4789.8-2016	
		奶粉	牛肉	奶粉	牛肉
3	12	-	-	-	-
	20	+	+	+	+
	48	+	+	+	+
25	12	-	-	-	-
	20	+	+	+	+
	48	+	+	+	+
215	12	+	+	+	+
	20	+	+	+	+
	48	+	+	+	+

见表3, 当奶粉和牛肉样品的初始污染量为3 CFU/25 g或25 CFU/25 g时, 培养20 h后, 同时用国标方法和real-time RPA方法进行检测, 都能检出样品中的小肠结肠炎耶尔森氏菌。当初始污染量为215 CFU/25 g时, 培养12 h后, 即可用两种方法检出。而在国标方法中, 样品溶液增菌时间本应是48~72 h。即使从划线开始计算, 完成系列生化鉴定到最终定性所需时间, 最快也需5~6 d。使用real-time RPA方法所需的时间为: 提取DNA的时间+配体系的时间+20 min的RPA时间, 样品在2 h内即可完成定性检测。

表4 实际样品检测结果

编号	样品名称	20 h		48 h		编号	样品名称	20 h		48 h	
		RPA	国标	RPA	国标			RPA	国标	RPA	国标
1	鲜牛奶1	-	-	-	-	11	冰鲜鱼	-	-	-	-
2	鲜牛奶2	-	-	-	-	12	冰鲜虾1	+	+	+	+
3	婴幼儿配方奶粉1	-	-	-	-	13	冰鲜虾2	-	-	-	-
4	婴幼儿配方奶粉2	-	-	-	-	14	新鲜猪肉1	-	-	-	-
5	酸奶	-	-	-	-	15	新鲜猪肉2	-	-	-	-
6	奶酪	-	-	-	-	16	新鲜猪肉3	-	-	-	-
7	芝士	-	-	-	-	17	速冻饺子	-	-	-	-
8	新鲜牛肉	-	-	-	-	18	即食沙拉	-	-	-	-
9	冷冻牛肉	-	-	-	-	19	新鲜蔬菜	-	-	-	-
10	新鲜鱼	-	-	-	-	20	冷饮	-	-	-	-

因此, 本方法有潜力作为一种常温下的快速初筛手段, 对致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌进行定性检测。

2.5 实际样品测试

在增菌培养20 h和48 h后, 采用real-time RPA和国标方法对20份市售样品进行致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌的定性检测。见表4, 其中, real-time RPA和国标方法均在冰鲜虾1样品中检出了阳性菌。其它样品均为阴性。两种方法结果一致。

2.6 数据处理

表5的数据显示, 在同样的DNA模板用量下, DNA浓度越高, 荧光信号的阈值时间越短; 而在同一浓度的DNA时, 模板用量越大, 荧光信号的阈值时间越短。

在多平行实验中, 1 ng/ μ L、10 ng/ μ L和100 ng/ μ L DNA的最大荧光值有重叠部分, 即低浓度DNA的最大荧光值有时比高浓度DNA的最大荧光值更高, 但这并不影响本方法对于目标菌或DNA“有无”的判断。只要在规定的时间内有稳定的荧光信号产生, 即为有效的检出结果。

当DNA为0.1 ng/ μ L时(模板用量为1.5 μ L), 8 min内就可产生荧光信号, 而且8个平行的阈值时间和最大荧光值的RSD值都最小, 分别为4.90%和7.06%, 此时结果最稳定。本方法可以作为小肠结肠炎耶尔森氏菌的有效初筛手段和定性方法, 有较好的重复性和可靠性。

DNA模板用量为12.5 μ L时的数据及其比较稳定的RSD值表明, 在本方法的未来实际运用中, 加大模板量是提高检出限和检出率的建议操作之一。

表5 阈值时间和最大荧光值的相对标准偏差

Table 5 Relative standard deviation (RSD) of threshold time and the maximum fluorescence value

DNA 用量/ μL	DNA 浓度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	n	阈值时间/(mm:ss)		20 min 内的最大荧光值			
			平均	RSD/%	出现时间/(mm:ss)		荧光值	
					平均	RSD/%	平均	RSD/%
1.5	100	3	4:06	7.79	15:07	10.53	4336.24	36.57
	10	8	5:28	5.86	17:43	4.11	4337.95	15.47
	1	3	6:06	8.02	19:54	0.81	3858.95	31.56
	0.1	8	7:19	4.90	20:00	0.16	3147.48	7.06
	0.01	8	10:38	13.21	20:00	1.47	1049.79	38.23
12.5	100	3	3:30	0.24	15:44	1.75	5047.89	5.73
	10	3	4:18	3.48	15:43	3.06	5059.68	11.67
	1	8	4:45	9.99	16:42	2.88	5496.90	13.69
	0.1	8	5:40	8.63	17:58	4.12	5180.52	12.67
	0.01	8	6:36	6.79	19:28	4.29	4752.50	10.43
	0.001	4	8:07	9.49	19:55	0.73	3072.14	12.45

3 结论

3.1 在我国,致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌曾在 1986 年和 1987 年各引发了一次百人以上感染的集中大爆发^[19],此外基本都为散发病例。该菌的分布很广泛和复杂,在各个省份、多种食品中均有检出,可导致腹泻、关节炎、脓肿、乃至心肌炎、以及一些并发症等。因此,对该致病菌进行预防、鉴定和控制,有着重要意义。包括 LAMP、PCR、MLST 在内的检测致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌的分子生物学方法,在快速检测、现场检测方面,都有一定局限性。而 real-time RPA 作为一种新型的常温快速扩增技术,则克服了这个局限。

3.2 国内外运用 real-time RPA 方法在致病菌的鉴定研究中取得了很多成果,其中,对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、结核分枝杆菌、沙门氏菌、单核增生李斯特氏菌等致病菌的研究最多^[17,20],但目前还没有小肠结肠炎耶尔森氏菌 RPA 检测方法的相关报道。

3.3 在本研究中,设计了特异性引物和 exo 探针,建立了检测致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌的 real-time RPA 方法,在 37 °C, 20 min 内即可完成检测。对目的 DNA 的检测限为 0.1 ng/ μL , 8 个平行的 RSD 值 $\leq 7.06\%$, 显示了良好的重复性。对奶粉和肉类样品进行致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌的人工污染,起始污染量为 3 CFU/25 g 或 25 CFU/25 g 时,经过 20 h 增菌,可同时用 real-time RPA 方法和国标方法检出;当污染量为 215 CFU/25 g 时,经 12 h 培养后,即可用两种方法检出。20 份实际样品的检测结果也显示了 real-time

RPA 方法与国标方法的一致性。

3.4 梁磊等^[13]建立的同为用恒温扩增方法检测致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌的 LAMP 技术,仍然需要 64 °C 的中高温和通过肉眼观察现象;而本方法可在常温下迅速反应,在 4~11 min 即有荧光信号产生,从而完成初筛、判断有无。而且, LAMP 方法需要至少两对引物,设计复杂,并非每种细菌都能适用,而 RPA 的引物设计更便捷。再者, LAMP 在检测中容易造成气溶胶污染,而 RPA 的操作非常简便。另外,和普通 RPA 的操作相比, real-time RPA 方法因省去了纯化 DNA 和凝胶电泳的繁琐步骤而更加简便。

3.5 本研究中建立的实时荧光 RPA 方法适用于致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌的快速初筛定性检测,最突出优势就在于“迅速”和“常温进行”,完成整个实验只需要具备培养箱以及一台便携式的实时荧光检测仪,操作简便且成本低廉,对仪器、场地和人员操作要求不高,能够满足基层实验室的需求,极大地缩短了检测周期、节约了人力和时间,可为现场检测、快速初筛、常温检测,提供数据支持和新的方向。

参考文献

- [1] Garrity G, Brenner D J, Krieg N R, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume TWO 2nd ed [M]. USA: Springer, 2005
- [2] 蒋原. 食源性病原微生物检测技术图谱[M]. 北京: 科学出版社, 2019
JIANG Yuan. Detection Technology of Food-borne Pathogenic Microorganism with Graphs [M]. Beijing: Science Press, 2019

- [3] 王淑颖,杨宝兰,王淑真,等.食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌检验方法的研究Ⅱ乳及其制品中小肠结肠炎耶尔森氏菌分离方法的研究[J].中国食品卫生杂志,1989,1:39-41
WANG Shu-ying, YANG Bao-lan, WANG Shu-zhen, et al. Study on *Yersinia enterocolitica* detection in food Ⅱ Isolation method of *Yersinia enterocolitica* in dairy and its products [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 1989, 1: 39-41
- [4] 段然.我国 5 岁以下儿童小肠结肠炎耶尔森菌病流行特征与致病性耶尔森菌比较基因组学初步研究[D].北京:中国疾病预防控制中心,2017
DUAN Ran. Epidemic characteristics of *Yersinia enterocolitica* infection in children ≤5 years old in China and preliminarily study of comparative genomics of pathogenic *Yersinia* [D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2017
- [5] Ong K L, Gould L H, Chen D L, et al. Changing epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections: Markedly decreased rates in young black children, foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996-2009 [J]. Clinical Infectious Diseases, 2012, 54(5): 385-390
- [6] GB 4789.8-2016,食品安全国家标准食品微生物学检验 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验[S]
GB 4789.8-2016, National Food Safety Standard Food Microbiology Examination: *Yersinia enterocolitica* [S]
- [7] SN/T 1870-2016,出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法[S]
SN/T 1870-2016, Method for the Detection of Pathogens in Food for Export-Real-Time PCR method [S]
- [8] SN/T 2754.6-2011,出口食品中致病菌环介导恒温扩增 LAMP 检测方法 第 6 部分: 小肠结肠炎耶尔森氏菌[S]
SN/T 2754.6-2011, Loop-mediated Isothermal Amplification Detection Method for Pathogens in Export Food-Part 6: *Yersinia enterocolitica* [S]
- [9] SNT 4525.10-2016,出口食品中致病菌的分子分型 MLST 方法第 10 部分:小肠结肠炎耶尔森氏菌[S]
SNT 4525.10-2016, Multilocus Sequence Typing Detection Method for Pathogens in Export Food: Part 10: *Yersinia enterocolitica* [S]
- [10] ISO 10273: 2017, Microbiology of the Food Chain-Horizontal Method for the Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* [S]
- [11] ISO/TS 18867: 2015, Microbiology of the Food Chain-Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Detection of Food-borne Pathogens-detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* [S]
- [12] Lambertz S T, Nilsson C, Hallanvuo S, et al. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food [J]. Applied and environmental microbiology, 2008, 74(19): 6060-6067
- [13] 梁磊,李英军,孟兆祥,等.环介导等温扩增技术检测小肠结肠炎耶尔森氏菌的研究[J].食品科技,2011,36(9):335-339
LIANG Lei, LI Ying-jun, MENG Zhao-xiang, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Yersinia enterocolitica* [J]. Food Science and Technology, 2011, 36(9): 335-339
- [14] 陈学强.食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌检测技术研究[J].现代食品,2017,8:6-9
CHEN Xue-qiang. Study on detection technique of *Yersinia enterocolitica* in food [J]. Modern Food, 2017, 8: 6-9
- [15] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. Plos Biology, 2006, 4(7): 1115-1121
- [16] Piepenburg O, Williams C H, Armes N A, et al. Recombinase polymerase amplification: US, 7399590B2 [P]. 2008-07-15.
- [17] Lobato I M, O'Sullivan C K. Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2018, 98: 19-35
- [18] 林霖,冯荣虎,王坤,等.牛肉真伪鉴别荧光 RPA 现场快检方法建立[J].食品科技,2018,43(6):322-326
LIN Lin, FENG Rong-hu, WANG Kun, et al. Construct beef authentication on-site rapid detection method based on fluorescent RPA technology [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(6): 322-326
- [19] 陈邬锦,王鹏.中国小肠结肠炎耶尔森菌流行现状及其研究进展[J].中国人兽共患病学报,2015,31(4):380-384
CHEN Wu-jin, WANG Peng. Epidemiological status and research progress of *Yersinia enterocolitica* in China [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2015, 31(4): 380-384
- [20] 王金凤,刘立兵,耿云云,等.单核细胞增生李斯特氏菌实时荧光 RPA 检测方法的建立及应用[J].现代食品科技,2018, 34(8):213-219
WANG Jin-feng, LIU Li-bing, GENG Yun-yun, et al. Development and application of the real-time recombinase polymerase amplification assay for detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(8): 213-219