

恒温隔绝式PCR快速检测蜡样芽孢杆菌方法的建立及应用

寇肖迪¹, 孟含¹, 苏雅航¹, 汤承², 胡瑜³, 唐俊妮^{1,2*}

(1. 西南民族大学食品科学与技术学院, 四川成都 610225)(2. 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室, 四川成都 610041)(3. 康美包(苏州)有限公司, 江苏苏州 215021)

摘要: 该研究以编码旋转酶B亚基的 *gyrB* 基因为靶基因, 利用恒温热隔绝式PCR (Insulated isothermal PCR, IiPCR), 建立一种快速检测蜡样芽孢杆菌的方法。同时, 将建立的方法与聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 和实时荧光定量PCR (SYBER Green I 荧光染料法和 TaqMan 探针法) 检测方法相比较, 并应用于不同类型零售食品中的蜡样芽孢杆菌检测。结果表明建立的检测方法能在40 min内迅速判定出结果(+、-、?); 与大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、肠炎沙门氏菌等均无交叉反应, 显示出良好的特异性; 方法的最低检出限为 1.5×10^2 CFU/mL, 优于普通PCR, 与实时荧光定量PCR检出限相当; 对42份零售食品进行检测, 共发现45.23%的样本被蜡样芽孢杆菌污染(19/42)。这一结果与常规PCR检测结果一致, 但检测时间至少节省了4h以上。该研究为蜡样芽孢杆菌提供了一种快速、便捷、特异性强、灵敏度高、适用于现场实时检测的检测方法。

关键词: 蜡样芽孢杆菌; 恒温隔绝式PCR; *gyrB* 基因

文章编号: 1673-9078(2024)04-287-295

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.4.0230

Development of an Insulated Isothermal PCR-based Method for Rapid Detection of *Bacillus cereus*

KOU Xiaodi¹, MENG Han¹, SU Yahang¹, TANG Cheng², HU Yu³, TANG Junni^{1,2*}

(1. College of Food Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610225, China)
(2. Ministry of Education Key Laboratory of Conservation and Utilization of Animal Genetic Resources on the Qinghai-Tibet Plateau, Chengdu 610041, China)(3. SIG Combibloc (Suzhou) Co. Ltd., Suzhou 215021, China)

Abstract: Specific primers and probe were designed for the *gyrB* gene of *Bacillus cereus* encoding the gyrase B subunit, and a method based on insulated isothermal polymerase chain reaction (IiPCR) was established for the rapid detection of *B. cereus* and subsequently validated. The efficacy of this method was compared with that of traditional PCR and real-time fluorescent quantitative PCR (SYBER Green I fluorescent dye and TaqMan probe methods) detection methods, and applied in the detection of *B. cereus* in different types of retail food. The results revealed that the newly developed method

引文格式:

寇肖迪, 孟含, 苏雅航, 等. 恒温隔绝式PCR快速检测蜡样芽孢杆菌方法的建立及应用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(4): 287-295.

KOU Xiaodi, MENG Han, SU Yahang, et al. Development of an insulated isothermal pcr-based method for rapid detection of *Bacillus cereus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(4): 287-295.

收稿日期: 2023-02-28

基金项目: 国家重点研发计划重点专项(2018YFD0500500); 西南民族大学研究生创新型科研项目(ZD2022257)

作者简介: 寇肖迪(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1140662940@qq.com

通讯作者: 唐俊妮(1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与食品微生物, E-mail: 392783291@qq.com

facilitated the rapid detection of *B. cereus* within 40 min. Moreover, there was no cross reaction with other bacteria, including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enteritidis*, thereby indicating good specificity. The minimum detection limit of the method was 1.5×10^2 CFU/mL, which was significantly superior to that of the traditional PCR method, and equivalent to that of quantitative PCR. Of the 42 retail food samples assessed, 19 (45.23%) were found to be contaminated with *B. cereus*. The results obtained for method validated were completely consistent with those obtained using traditional PCR detection, although test results were available within a considerably shorter timeframe, saving at least 4 h. The method developed in this study provides a rapid, convenient, specific, and sensitive procedure that is suitable for the real-time on-site detection of *B. cereus*.

Key words: *Bacillus cereus*; insulated isothermal PCR; *gyrB* gene

蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 是一种常见的食源性致病菌, 广泛存在于土壤、空气、水、动物的肠道以及植物源和动物源食品中, 尤其是蛋白质和碳水化合物含量丰富的食品, 如粮食制品、乳制品、肉类制品和豆制品等^[1-3]。近些年发现蜡样芽孢杆菌也能感染包括人在内的多种动物, 是一种人畜共生细菌, 感染者症状主要表现为恶心甚至呕吐、腹胀腹痛腹泻等^[4]。据文献报道, 我国发生的 *B. cereus* 食源性疾病主要是以呕吐型为主, 占 75.9%^[5]。食用含有超过 10^5 CFU/g 的蜡样芽孢杆菌即可导致食物中毒^[6]。因此, 对食品是否污染蜡样芽孢杆菌的检测十分重要。目前, 蜡样芽孢杆菌的检测方法主要有 GB 4789.14-2014^[7]、免疫学检测方法如 ELISA、免疫组化及实时荧光 PCR 等技术^[8-11]、PCR 技术^[12,13]。传统鉴定蜡样芽孢杆菌的方法操作繁琐、耗时长、检出率低; ELISA、免疫组化以及 PCR 等方法对仪器设备和操作人员要求高^[14,15]。因此, 建立一种快速、准确、简捷检测蜡样芽孢杆菌的方法, 具有十分重要的应用价值。

恒温热隔绝式 PCR (Insulated Isothermal PCR, iiPCR) 是一种以 Rayleigh-Benard 对流系统为原理的能够通过反应管底部液体持续加热产生上下液体温差, 控制对流时间与散热速率, 使其在管内形成稳定温度梯度, 从而提供 PCR 所需快速、低耗的核酸扩增平台^[16]。该技术最早在 2002 年, 由 Krishnan 首次报道, 结合 POCKIT™ 系列手持式核酸检测仪, 体积小、自带电源, 加样后一键操作, 反应仅需 42 min 便可完成, 结果以 “+”、“-”、“?” 直接显示于液晶屏幕上, 方便快捷, 可达到现场快速检测的目的^[17]。如 Tsen^[18] 等建立了 iiPCR 方法检测鸡肉中沙门氏菌, 样品培养到 5 h 即可检测样品是否含有沙门氏菌; 杨若璇等^[19] 使用 iiPCR 检测食品中的沙门氏菌, 其灵敏度较高, 最低检出限可达

75 CFU/mL, 在 6 h 内完成检测; 李传友等^[17] 建立 iiPCR 快速检测技术对食品中的金黄色葡萄球菌进行检测, 检出限为 10^2 CFU/mL, 检出时间为 6 h 且具有较高稳定性。

蜡样芽孢杆菌的管家基因 *gyrB* 基因具有高度保守性^[20], 能够编码蜡样芽孢杆菌旋转酶 B 亚基, 可用于蜡样芽孢杆菌 PCR 快速检测^[21-23]。本研究利用 iiPCR 技术, 建立一种快速检测蜡样芽孢杆菌 *gyrB* 基因的新方法, 该方法能在更短的时间内完成高特异性和高灵敏性的扩增, 仪器设备也简易便携, 能够对现场检测提供有效稳定准确快速的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株来源

蜡样芽孢杆菌 ATCC11778 (*Bacillus cereus*)、金黄色葡萄球菌 ATCC6538 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 ATCC25922 (*Escherichia coli*)、单增李斯特菌 ATCC19115 (*Listeria monocytogenes*)、肠炎沙门氏菌 CICC 21482 (*Salmonella enteritidis*) 等均由本实验室保存。

1.1.2 试剂与培养基

甘露醇卵黄多粘素培养基 (Mannitol-Egg-Yolk-Polymyxin Agar Base, MYP)、多粘素 B、胰蛋白胍大豆肉汤 (Tryptic Soy Broth, TSB), 购于青岛高科园海博生物技术有限公司; 核酸染料 GELVIEW、DL50 Marker、Premix Ex Taq (Probe qPCR)、TB Green Premix Ex Taq II、Taq PCR Master Mix (2x, blue dye), 购于宝生物工程 (大连) 有限公司; G-10 电泳凝胶琼脂糖, 购于 Biowest 公司; 各种食物样品购于学校食堂、超市以及摊位。

表 1 用于iiPCR方法的*gyrB*特异性引物、探针基本信息Table 1 Basic information for iiPCR of *gyrB* specific primers and probes

引物名称	引物序列 (5'-3')	扩增产物长度/bp	退火温度/°C
<i>gyrB-iiF</i>	TTGGTGACACCGATCAAAC	94	56
<i>gyrB-iiR</i>	GCTAGCGTATCAAAATCGTA		
<i>gyrB-Pb</i>	HEX-CTCGATTAAACCAGATCCGG-BHQ1	—	—

1.1.3 设备与仪器

POCKIT™ 小型智能型核酸分析仪、R-tube (48), 厦门金瑞鸿捷生物科技有限公司; CFX96 荧光定量 PCR 仪、VerSaDoc 2000 凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 有限公司; PCR 仪, TSNENEN031445 基因 (美国) 有限公司; Galanz WD800B 型微波炉, 顺德市格兰仕微波炉电器有限责任公司; SC-15 数控超级恒温槽, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Eppendorf 5804R 型冷冻离心机, Eppendorf 公司; DYY-6C 电泳仪, 北京六一仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 引物及探针的设计与合成

选取蜡样芽孢杆菌的管家基因 *gyrB* 基因作为靶基因, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计一对引物及探针, 并进行 BLAST 比对, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 探针由北京擎科新业生物技术有限公司合成。引物和探针序列信息见表 1。

1.2.2 菌株复苏

从超低温冰箱中取出保存的蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肠炎沙门氏菌、单增李斯特菌于室温解冻, 分别吸取 50 μL 菌液接种置 5 mL TSB 液体培养基中, 30 °C (蜡样芽孢杆菌) 或 37 °C (其他细菌) 恒温震荡培养 12~18 h。

1.2.3 DNA模板提取

取 1.2.2 中蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肠炎沙门氏菌、单增李斯特菌等菌株过夜培养菌液 1 mL 于 1.5 mL 的无菌 EP 离心管中, 4 °C, 12 000 r/min 离心 2 min, PBS 洗涤菌体 2~3 次, 弃上清液收集菌体。参考周晏阳等^[24]微波提取 DNA 方法, 向离心管中加入 500 μL TE 缓冲液, 涡旋震荡 30 s, 取 100 μL 于 PCR 管中, Galanz WD 800B 型微波炉预热 1 min 后将 PCR 管用微波炉加热 40~120 s; 12 000 r/min 离心 1 min 收集上清液即为模板 DNA。

1.2.4 引物及探针验证

采用实时荧光定量 PCR 仪 (CFX96) 对蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肠炎沙门氏菌、单增李斯特菌及阴性对照进行扩增检测, 以验证引物和探针的可行性。

反应体系及条件参考崔溢和张贵海^[25], 10 μL 2×Premix Ex Taq, 2 μL 探针 (10 μmol/L), 上、下游引物各 1.0 μL (10 μmol/L), 5 μL DNA 模板, 无菌水补足至 20 μL, 利用无菌去离子水代替 DNA 模板做无模板阴性对照。反应条件: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 10 min; 60 °C 1 min; 40 个循环, 在 56 °C 结束开始收集荧光信号。

1.2.5 iiPCR反应体系摸索

参考杨若璇等^[19]方法, 采用 25 μL 体系分别对 Taq 酶 (预混酶) 5 U/μL (11~13.5 μL) 上下游引物 10 μmol/μL (0.5~2 μL)、探针 10 μmol/μL (0.25~1 μL)、模板 DNA (原始浓度 94.75 ng/μL) (1~4 μL)、无菌水的用量进行条件探索, 确定各自用量的最佳值。

1.2.6 特异性实验

采用本实验建立的 iiPCR 方法对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、肠炎沙门氏菌标准菌株基因组 DNA 进行扩增, 同时设置 1.2.3 中的蜡样芽孢杆菌 DNA 为阳性对照, 无菌 ddH₂O 为阴性对照。

1.2.7 灵敏度试验

对浓度为 1.5×10^8 CFU/mL 的菌悬液进行 10 倍的梯度稀释, 并对 10 个梯度浓度的菌液进行 DNA 提取, 测定 DNA 浓度, 采用已建立的 iiPCR 方法进行检测。同步进行常规 PCR 灵敏性对比试验, 常规 PCR 反应体系为 20 μL: 2×TSINGKE Master mix 10 μL; 10 μmol/L 上下游引物各 0.4 μL; DNA 模板 2 μL; 无菌去离子水 7.2 μL, 阴性对照试验利用无菌去离子水代替 DNA 模板。扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 40 s, 56 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 40 s; 循环 35 次; 所得产物进行 4% (m/V) 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统下观察结果, 并对比常

规 PCR 扩增结果。

1.2.8 稳定性试验

采用建立的 iiPCR 方法对菌液的三个稀释度 (10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7}) 进行三组重复实验, 以评价该方法的稳定性。

1.2.9 与其它蜡样芽孢杆菌检测方法比较

分别采用传统 PCR 方法和荧光定量 PCR 对蜡样芽孢杆菌 DNA 和菌液不同稀释梯度进行检测。

常规 PCR 方法参考高瑞等^[26]的方法稍作修改, 即常规 PCR 反应体系共 20 μL : 2 \times TSINGKE Master mix 10 μL ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 0.4 μL ; DNA 模板 1 μL ; 无菌去离子水 8.2 μL , 阴性对照利用无菌去离子水代替 DNA 模板。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s; 循环 35 次; 所得产物进行 4% (m/V) 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统下观察结果。

实时荧光定量 PCR (SYBER Green I 荧光染料法) 根据董歆^[27]的方法稍作修改, 反应体系共 15 μL : TB Green Premix Ex Taq II 7.5 μL ; 上下游引物各 0.5 μL ; 模板 DNA 1 μL ; ddH₂O 15 μL , 阴性对照试验利用无菌去离子水代替 DNA 模板。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环, 在延伸时采集荧光信号。

实时荧光定量 PCR (TaqMan 探针法) 根据柯振华^[28]的方法稍作修改, 反应总体系为 25 μL : Premix Ex Taq (Probe qPCR) 12.5 μL ; 上下游引物各 1 μL ; 探针 0.5 μL ; 模板 DNA 2 μL ; ddH₂O 8 μL , 阴性对照试验利用无菌去离子水代替 DNA 模板。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环, 在延伸时采集荧光信号。

将上述实验结果与 1.2.6 结果做对比。

1.2.10 实际样品检测

从成都各大农贸市场、路边小摊、食堂、餐馆等地购买粮食制品、肉制品、豆制品、乳制品以及熟食样品共计 42 份 (详见表 3), 并将食品样品切成 1 cm 长小段搅拌均匀, 准确称取各处理后的食品样品 25 g 至胰蛋白胨大豆肉汤中, 振荡培养 2、4、6、8 h 取样 (通过预实验 iiPCR 需培养 6 h, 常规 PCR 至少培养 8 h), 按 1.2.3 方法提取基因组 DNA, 采用 1.2.4 已建立 iiPCR 方法和常规 PCR 方

法进行检测, 并分析蜡样芽孢杆菌在食品中的流行情况。

1.2.11 数据处理

数据处理采用 Excel 2020 进行整理计算。

2 结果与分析

2.1 引物及探针验证结果

采用实时荧光定量 PCR 分别对不同标准菌株提取 DNA 进行扩增, 结果如图 1 所示, 只有 1 号蜡样芽孢杆菌出现阳性, 能够得到特异性扩增, 2~5 号其他菌株为阴性, 证明本研究根据选取的 *gyrB* 基因所设计的引物与探针具有良好特异性。

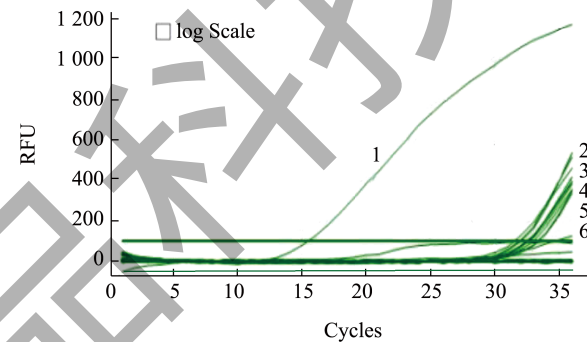


图 1 蜡样芽孢杆菌引物、探针验证结果

Fig.1 The primer and probe verification for *Bacillus cereus*

注: 1: 蜡样芽孢杆菌; 2: 大肠杆菌; 3: 金黄色葡萄球菌; 4: 单增李斯特菌; 5: 沙门氏菌; 6: 阴性对照。

2.2 优化后的反应体系

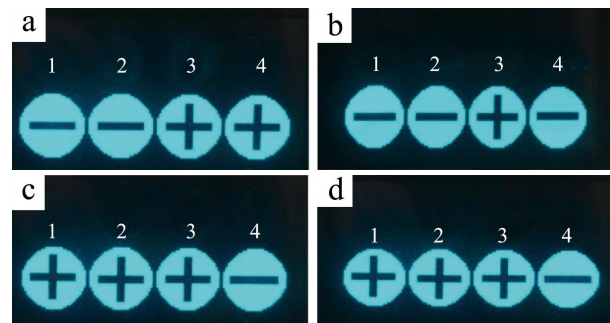


图 2 iiPCR 反应体系优化结果

Fig.2 The optimization results of iiPCR

注: (a) Taq 预混酶用量的优化; (b) 上下游引物用量的优化; (c) 探针用量的优化; (d) 模板 DNA 用量的优化。a 中的 1~4 泳道预混酶添加量分别为 2.1×10^6 、 2.3×10^6 、 2.5×10^6 、 2.7×10^6 U/L; b 中 1~4 泳道引物添加量分别为 0.8、0.6、0.2、0.2 mol/L; c 中 1~4 泳道探针添加量分别为 0.4、0.3、0.2、0.1 mol/L; d 中 1~4 泳道 DNA 添加量分别为 15.16、11.37、7.58、3.79 ng/ μL 。

通过对 Taq 酶、探针、引物、模板用量进行区间优化 (如图 2), 最终确定的反应体系如表 2 所示。Taq 预混酶的用量确定为各 2.5×10^6 U/L, 上、下游引物用量确定为各 0.2 mol/L, 探针用量确定为 0.2 mol/L, DNA 模板用量确定为 7.58 ng/ μ L。

表 2 最终反应体系
Table 2 Final reaction system

名称	用量/ μ L	浓度
Premix Ex Taq (Probe qPCR)	12.5	2.5×10^6 U/L
上游引物 (Primer F)	1	0.2 mol/L
下游引物 (Primer R)	1	0.2 mol/L
探针 (probe)	0.5	0.2 mol/L
DNA 模板	2	7.58 ng/ μ L
ddH ₂ O	8	—
总计	25	—

2.2 特异性评价

对纯培养的蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和沙门氏菌提取 DNA 作为模板, 按上述建立的方法进行 iiPCR 扩增, 结果如图 3a、b 所示, POCKIT™ 手持式核酸分析仪界面上显示只有蜡样芽孢杆菌检出为阳性 (+), 阴性对照和大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、沙门氏菌检出均为阴性 (-)。表示针对蜡样芽孢杆菌所建立的 iiPCR 检测方法特异性良好。

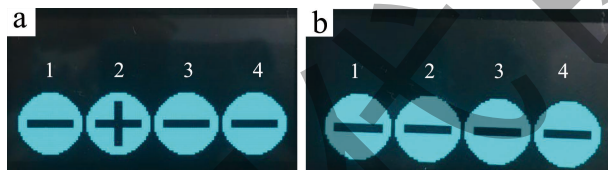


图 3 特异性试验
Fig.3 Specific test

注: 图 a 的 1~4 通道分别为阴性对照、蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌; 图 b 的 1~4 通道分别为阴性对照、阴性对照、单增李斯特菌、沙门氏菌。

2.3 灵敏度试验结果

将制备好的菌悬液梯度 10 倍稀释, 分别选择 100 μ L 不同梯度的稀释菌液, 均匀涂于营养琼脂平板上, 在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下倒置过夜培养, 当培养基上生长出清晰的单个菌落, 并统计典型菌落数, 取平均值后得到第 10^{-5} 稀释梯度的菌落平均数为 1 500 CFU/mL, 经计算得出所制得菌悬液的原始浓度为 1.5×10^8 CFU/mL。

对所稀释的 10 个梯度浓度的蜡样芽孢杆菌的菌悬液采用微波法提取 DNA, 采用上述扩增体系进行检测, 结果如图 4 所示, POCKIT™ 手持式核酸分析仪界面上浓度为 1.5×10^3 CFU/mL 和 1.5×10^2 CFU/mL 均显示为阳性 (+), 浓度为 15 CFU/mL 和阴性对照显示为阴性 (-), 说明建立的 iiPCR 检测方法对蜡样芽孢杆菌纯培养菌液的最低检出限为 150 CFU/mL。



图 4 蜡样芽孢杆菌不同浓度菌液检出结果
Fig.4 Detection results of *Bacillus cereus* in different concentrations of bacterial solution

注: 1~4 泳道分别为 1.5×10^3 、 1.5×10^2 、 1.5×10 CFU/mL、阴性对照。

2.4 稳定性评价

分别对纯培养蜡样芽孢杆菌菌悬液的 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} , 3 个稀释梯度即 1.5×10^3 、 1.5×10^2 、 1.5×10 CFU/mL, 分别提取 DNA 作为模板, 通过上述建立的 iiPCR 方法对其扩增, 进行三次重复性平行试验, 结果如图 5a、b、c 所示, POCKIT™ 手持式核酸分析仪界面上阴性对照和 1.5×10 CFU/mL 显示为阴性 (-), 1.5×10^3 、 1.5×10^2 CFU/mL 显示为阳性 (+), 三次重复检测结果一致, 表示本研究所建立的 iiPCR 方法具有良好的稳定性。

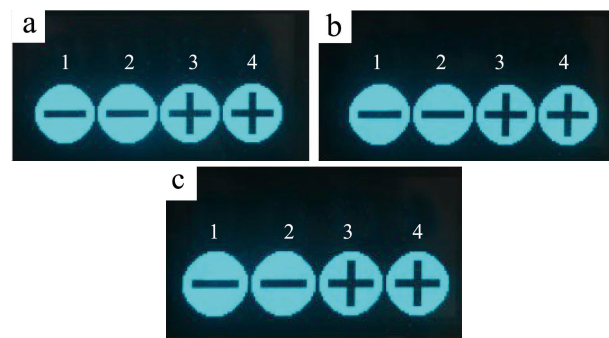


图 5 稳定性试验结果

Fig.5 Stability evaluation test results

注: 图 a、b、c 中的 1~4 通道分别为阴性对照、 1.5×10 、 1.5×10^2 、 1.5×10^3 CFU/mL。

2.5 与其他检测方法比较结果

将纯培养的浓度为 1.5×10^8 CFU/mL 蜡样芽孢杆菌菌悬液经 10 倍梯度稀释, 采用传统 PCR 方法、实时荧光定量 PCR (荧光染料 SYBR Green I

和 TaqMan 探针法) 技术扩增对其灵敏性进行检测。检测结果如图 6 所示。

结果表明, 传统 PCR 方法对蜡样芽孢杆菌的最低检出限为 1.5×10^3 CFU/mL; 实时荧光定量 PCR 方法对蜡样芽孢杆菌的最低检出限为 1.5×10^2 CFU/mL; 与 2.3 中结果比较分析可知, 本研究建立的 iiPCR 方法对蜡样芽孢杆菌的最低检出限与实时荧光检测技术相同, 均比常规 PCR 技术检测结果高出一个数量级。

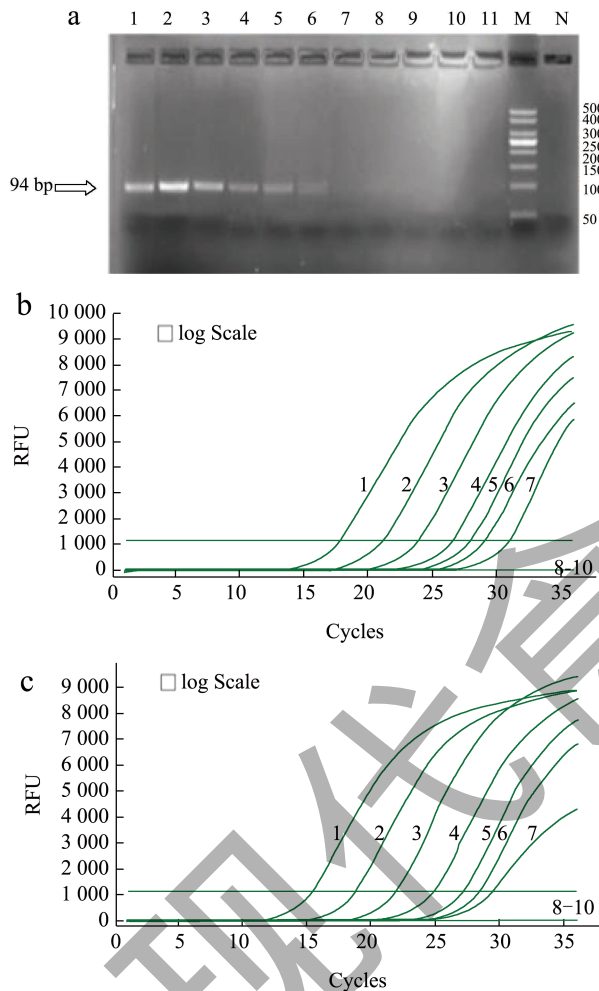


图 6 传统 PCR、实时荧光定量菌液浓度灵敏度试验结果
Fig.6 Traditional PCR, real-time fluorescence quantitative PCR Concentration sensitivity test results

注: (a) 传统 PCR; (b) 荧光染料法 SYBR Green I; (c) TaqMan 探针法。图 a 中 1~8 泳道分别为 1.5×10^8 、 1.5×10^7 、 1.5×10^6 、 1.5×10^5 、 1.5×10^4 、 1.5×10^3 、 1.5×10^2 、 1.5×10^1 CFU/mL; M: DL50 Marker; N: 阴性对照; 图 b、c 中 1~10 分别为 1.5×10^8 、 1.5×10^7 、 1.5×10^6 、 1.5×10^5 、 1.5×10^4 、 1.5×10^3 、 1.5×10^2 、15、1.5 CFU/mL、阴性对照。

iiPCR 方法无需凝胶电泳检测, 总检测流程仅需 7~8 h 即可得到结果, 扩增时间 40 min 即可显示

检测结果。

2.6 实际样品检测结果分析

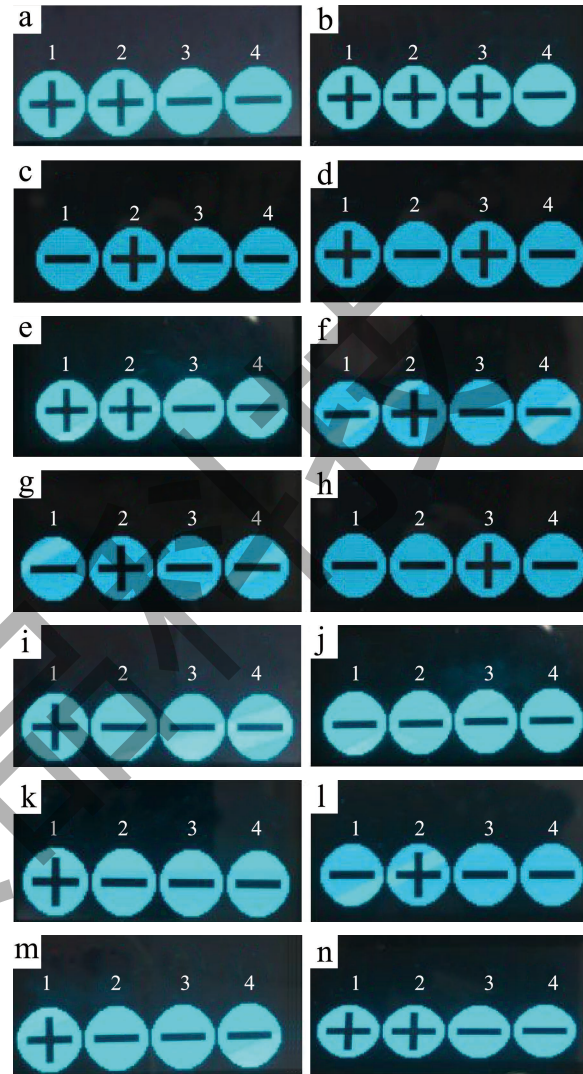


图 7 食品样品 iiPCR 检出结果
Fig.7 Food samples iiPCR detection results

注: 图 a~n 的通道 1~3 依次为实际样品 1~42 号, 通道 4 均为阴性对照。

为验证已建立方法对食品中蜡样芽孢杆菌的检测效果, 采集实际食品样品 42 份进行方法的检验。采用上述研究建立的 iiPCR 方法对采集的 42 份实际食品样品中蜡样芽孢杆菌进行检测, 结果如图 7 所示, 从图中可以看出, 当培养到 6 h 时, 42 份食品样品中共检测出蜡样芽孢杆菌阳性有 19 份, 总检出率为 45.23% (19/42), 其中米面制品的检出率为 23.81% (10/42), 乳制品的检出率为 4.76% (2/42), 熟食类 (肉制品及凉拌菜) 检出率分别为 4.76% (2/42) 和 2.38% (1/42), 豆制品检出率为 9.52% (4/42)。如果按米面制品细分, 其检出率为 62.50% (10/16)。

2.7 实际样品iiPCR与普通PCR方法检出结果比较

采用常规 PCR 方法对上述采集的食品样品检测加以验证 iiPCR 方法的准确性, 当样品增菌培养到 8 h 时提取 DNA(前增菌 6 h 常规 PCR 未能检测出), 通过常规 PCR 进行扩增, 结果如图 8 所示, 由图可以看出此时常规 PCR 方法可对 19 份样品均检出阳性结果, 将两种方法的检出结果进行比较, 比较结果如表 3 所示, 常规 PCR 方法与 iiPCR 方法的检测结果一致。可见, 本研究所建立对蜡样芽孢杆菌检测的 iiPCR 方法比传统 PCR 方法具有耗时更短、操作更简便的优势, 在实际食品样品的现场检测应用方法中, 建立的 iiPCR 方法更加快捷、实用。

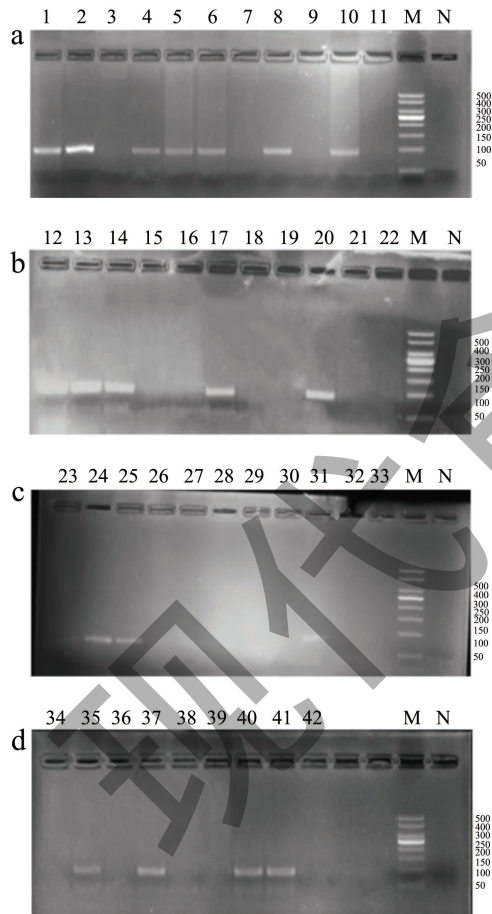


图 8 食品样品常规 PCR 检出结果

Fig.8 Food samples traditional PCR detection results

注: 图 a 中 1~11 泳道: 实际样品 1~11 号; M: DL50 Marker; N: 阴性对照。图 b 中 12~22 泳道: 实际样品 12~22 号; M: DL50 Marker; N: 阴性对照。图 c 中 23~33 泳道: 实际样品 23~33 号; M: DL50 Marker; N: 阴性对照。图 d 中 34~42 泳道: 实际样品 34~42 号; M: DL50 Marker; N: 阴性对照。

表 3 iiPCR与常规PCR检测结果的比较

Table 3 Comparison of iiPCR and traditional PCR results

样品来源	样品编号	样品名称	iiPCR 检测结果	传统 PCR 检测结果	阳性样品数	总检出率
	1	肉馅包子	+	+		
	2	菜馅包子	+	+		
	3	馒头	-	-		
	4	鸡蛋饼	+	+		
	5	青椒肉丝炒饭	+	+		
	6	凉面	+	+		
	7	凉皮	-	-		
米面制品	8	炒面	+	+	10	23.81% (10/42)
	9	炒河粉	-	-		
	10	鸡蛋炒饭	+	+		
	11	肉丝炒饭	-	-		
	12	铁板烧炒饭	+	+		
	13	拔丝蛋糕	+	+		
	14	老婆饼	+	+		
	15	板栗饼	-	-		
	16	三明治面包	-	-		
		17	奶昔	+		
乳制品	18	冰淇淋	-	-	2	4.76% (2/42)
	19	巴氏杀菌乳	-	-		
	20	婴儿奶粉	+	+		
	21	脱脂奶粉	-	-		
肉类熟食	22	泡椒凤爪	-	-	2	4.76% (2/42)
	23	卤鸭锁骨	-	-		
	24	卤鸭脖	+	+		
	25	卤鸭肠	+	+		
	26	卤鸡爪	-	-		
	27	卤猪皮	-	-		
凉拌菜类	28	凉拌金针菇	-	-	1	2.38% (1/42)
	29	凉拌海白菜	-	-		
	30	狼牙土豆	-	-		
	31	卤藕片	+	+		
豆制品类	32	散装凉拌豆干	-	-	4	9.52% (4/42)
	33	散装凉拌腐竹	-	-		
	34	千叶豆腐	-	-		
	35	豆浆	+	+		
	36	豆花	-	-		
	37	黄豆酱	+	+		
	38	豆豉	-	-		
	39	腐乳	-	-		
	40	包装麻辣豆干	+	+		
	41	包装麻辣豆皮	+	+		
	42	豆浆粉	-	-		

注: “+”表示检出为阳性;“-”表示未检出阴性。

本研究所采集的食品样品蜡样芽孢杆菌的总检出率为45.23% (19/42), 与田万帆等^[29](24.00%)、李芳等^[30](26.56%)、权玉玲等^[31](13.03%)、毕宇涵等^[32](30.51%)的研究检测结果偏高, 可能的原因是本研究所采集的食品样品集中在7~9月, 夏季气温高导致大部分食源性致病菌生长繁殖快。粮食制品是蜡样芽孢杆菌最易感染的食品来源, 本研究中米面等粮食制品的小类检出率最高, 为62.50% (10/16), 连国平等^[33]在分析四类不同食品中蜡样芽孢杆菌的分布规律时, 也得出熟制米面制品最易感染蜡样芽孢杆菌的结论, 且检出率最高, 与本研究结论相同。

食品中蜡样芽孢杆菌含量超过 10^5 CFU/g即可作为食物中毒的判断依据^[34], 但由于本次所采样品未进行蜡样芽孢杆菌含量及是否含有能够产生呕吐及腹泻毒素的毒力基因检测, 虽所检出样品含有蜡样芽孢杆菌, 但无法断定其含量是否会导致食物中毒症状发生, 以后我们会进一步针对食品中细菌的含量及毒素进行定量检测。

3 结论

本研究建立了快速检测蜡样芽孢杆菌的iiPCR方法, 选择*gvrB*基因作为检测靶基因, 通过iiPCR方法与传统检测方法以及荧光PCR等方法对不同致病菌的对比得出iiPCR方法蜡样芽孢杆菌最低检出限仅为 1.5×10^2 CFU/mL, 且耗时仅为7~8 h, 此结果远远低于传统PCR方法与荧光PCR方法的检测结果, 说明该方法灵敏度高、耗时短、操作便捷; 通过重复试验及对实验室其他保藏菌进行试验对比, 说明已建立方法稳定性好、特异性强; 采用已建立方法与常规PCR方法做实际样品检测验证, 结果表明两种方法检测结果一致, iiPCR方法可以用于食品的检测。

综上, 本研究建立的基于恒温热隔绝式PCR技术检测食品中的蜡样芽孢杆菌, 可应用于现场快速检测, 不仅节省时间还提高了检测效率, 降低了微生物检测工作的部分难度。

参考文献

- [1] 陆湘华, 崔昌, 王远萍, 等. 蜡样芽孢杆菌食物中毒的研究进展[J]. 传染病信息, 2015, 28(4): 251-254.
- [2] 王慧莹. 基于计算机视觉技术快速检测食品中蜡样芽孢杆菌的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [3] ZHANG Z, FENG L, XU H, et al. Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis of toxigenicity from ready-to-eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(2): 1047-1055.
- [4] M EHLING-SCHULZ, M FRICKER, H GRALLERT, et al. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1 [J]. BMC Microbiology, 2006, 6(1): 20.
- [5] 王欣茹, 黄琼. 食品中蜡样芽孢杆菌污染的预测模型及风险评估进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(6): 1366-1374.
- [6] K DIERICK, E V COILLIE, I SWIECICKA, et al. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning [J]. Clinical Microbiology, 2005, 43(8): 4277-4279.
- [7] GB 4789.14-2014 15食品安全国家标准食品微生物学检验蜡样芽孢杆菌检验[S].
- [8] W CHUNGLOK, D K WURAGIL, S OAEW, et al. Immunoassay based on carbon nanotubes-enhanced ELISA for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(8): 3584-3589.
- [9] S G WILSON, S CHAN, M DEROO, et al. Development of a colorimetric, second generation nucleic acid hybridization method for detection of *Salmonella* in foods and a comparison with conventional culture procedure [J]. Journal of Food Science, 1990, 55(5): 1394-1398.
- [10] 滕昆仑, 卢勉飞, 蔡芷荷, 等. 运用显色培养基从食品微生物中鉴别蜡样芽孢杆菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(7): 955-958.
- [11] 马琳琳, 刘珍, 马腾州, 等. 实时荧光PCR技术快速检测食品中的蜡样芽孢杆菌[J]. 理化检验-化学分册, 2022, 58(12): 1461-1465.
- [12] M SOLEIMANI, H HOSSEINI, Z PILEVAR, et al. Prevalence, molecular identification and characterization of *Bacillus cereus* isolated from beef burgers [J]. Journal of Food Safety, 2018, 38(1): e12414.
- [13] I C FERNANDEZ-NO, M GUARDDON, K BOEHME, et al. Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR [J]. Food Microbiology, 2011, 28(3): 605-610.
- [14] 王琼, 马红梅, 曾瑾, 等. 食源性蜡样芽孢杆菌的危害及其检测方法研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(5): 633-637.
- [15] 种婷. 食品中蜡样芽孢杆菌检测技术应用进展[J]. 现代食品, 2022, 28(7): 28-30.
- [16] 王娟, 卞国志, 王贵平, 等. 恒温热隔绝式PCR技术的原理与应用[J]. 动物医学进展, 2017, 38(12): 114-118.
- [17] 李传友, 曾宝锋, 赵燕英, 等. 恒温隔绝式聚合酶链式反应

- 检测食品中金黄色葡萄球菌[J].食品科学,2022,43(2):339-345.
- [18] H Y TSEN, C M SHIH, P H TENG, et al. Detection of *Salmonella* in chicken meat by insulated isothermal PCR [J]. *Journal of Food Protection*, 2013, 76(8): 1322-1329.
- [19] 杨若璇,佟尧,赵燕英,等.食品中沙门氏菌恒温隔绝式PCR检测方法的建立[J].现代食品科技,2021,37(9):285-293.
- [20] WEI S, R CHELLIAH, B J PARK, et al. Molecular discrimination of *Bacillus cereus* group species in foods (lettuce, spinach, and kimbap) using quantitative real-time PCR targeting *groEL* and *gyrB* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 115: 312-320.
- [21] S YAMADA, E OHASHI, N AGATA, et al. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1483-1490.
- [22] 傅奇,甘美裕,王艳,等.16S与*gyrB*基因联合建树快速鉴定一株蜡样芽孢杆菌[J].食品与生物技术学报,2021,40(10):98-103.
- [23] 白凤岚,罗梦幽,屈云,等.成都市市售食品中蜡样芽孢杆菌污染状况与毒力基因分析[J].中国食品卫生杂志,2019,31(5):429-434.
- [24] 周晏阳,邱莞思,唐俊妮,等.微波加热快速提取芽孢杆菌与乳酸菌DNA[J].中国畜牧兽医,2016,43(10):2792-2796.
- [25] 崔溢,张贵海.实时荧光定量PCR法检测蜡样芽孢杆菌[J].中国乳品工业,2015,43(6):60-62.
- [26] 高瑞,谢玉杰,缪西鹏,等.牛源多杀性巴氏杆菌和溶血性曼氏杆菌双重PCR检测方法的建立与应用[J].中国兽医学报,2022,42(10):2009-2013,2030.
- [27] 董歆.蜡样芽孢杆菌对家蚕的毒性及其蛋白质组的研究[D].镇江:江苏大学,2017.
- [28] 柯振华.餐饮食品中蜡样芽孢杆菌的实时荧光PCR检测方法研究[J].福建轻纺,2020,4:19-23.
- [29] 田万帆,张荣,龙虎,等.生鲜食品中蜡样芽孢杆菌毒力基因及耐药性研究[J].食品工业科技,2018,39(6):135-139.
- [30] 李芳,郑升龙.江山市2014-2017年市售食品微生物检测结果分析[J].中国公共卫生管理,2019,35(1):111-113.
- [31] 权玉玲,胡晓宁,兰光,等.甘肃省地方特色米面食品食源性致病菌污染调查[J].疾病预防控制通报,2013,28(3):61-62.
- [32] 毕宇涵,郑晓华,薛成玉,等.米面制品蜡样芽孢杆菌污染状况调查[J].中国公共卫生管理,2012,28(6):819-820.
- [33] 连国平,孙晓霞,李叶,等.呼和浩特市四类食品中蜡样芽孢杆菌污染状况调查[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(11):191.
- [34] 郑金华,李公和,陆娟娟.2021年泰安市一起由蜡样芽孢杆菌引起食物中毒的调查[J].预防医学论坛,2022,28(4):305-307.