

基于体温扩增的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种3种可视化快速检测方法的建立

林志伟¹, 王帅^{2,3}, 蔡杰², 聂丹丹⁴, 李涛², 李红娜², 杨艳歌^{2,*}, 袁飞^{2,*}

(1.黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江 大庆 163000; 2.中国检验检疫科学研究院, 国家市场监管重点实验室(食品质量与安全), 北京 100176; 3.黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163000; 4.长春海关技术中心, 吉林 长春 130062)

摘要:为实现食品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种(*Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*)的快速检测, 基于体温扩增技术——酶促重组等温扩增(enzymatic recombinase amplification, ERA), 并根据唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种*bonM*基因序列设计和筛选了ERA检测引物和探针, 分别建立ERA显色法、荧光法、试纸条法3种可视化快速检测方法, 并评估其特异性和灵敏度, 以及在市售样品检测适用性和准确性。结果显示, 建立的方法对3株唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病型菌株均有扩增, 其他常见的食源性致病菌以及其他唐菖蒲伯克霍尔德氏菌均无扩增, 说明检测方法的特异性良好。3种方法的检出限均为 10^{-2} ng/ μ L, 灵敏度较好。采用建立的3种可视化快速检测方法对15份市售样品进行检测, 检出阳性2份, 检出率为13.3%。该结果与国标方法的检测结果一致, 说明方法具有较好的适用性和准确性。本研究建立的基于体温扩增技术的显色法、荧光法和试纸条法具有较高的特异性及灵敏度, 37℃体温扩增15 min左右即可获取检测结果, 且肉眼可视, 可为食品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种的现场可视化快速筛查提供新型简便的策略。

关键词:唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种; 酶促等温扩增技术; 可视化; 快速检测

Establishment of Three Rapid Visual Detection Methods for *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* Based on Body Temperature Amplification

LIN Zhiwei¹, WANG Shuai^{2,3}, CAI Jie², NIE Dandan⁴, LI Tao², LI Hongna², YANG Yange^{2,*}, YUAN Fei^{2,*}

(1. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163000, China; 2. Key Laboratory of Food Quality and Safety for State Market Regulation, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 3. College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163000, China; 4. Changchun Customs Technical Center, Changchun 130062, China)

Abstract: Three rapid visual methods, namely chromogenic, fluorescence and test strip, for the rapid detection of *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* in foods were established based on enzymatic recombinase amplification (ERA). Primers and probes were designed and screened based on the *bonM* gene of *B. gladioli* pv. *cocovenenans*. Then the specificity and sensitivity of the three methods were evaluated, as well as their applicability and accuracy in the detection of commercial food samples. The results showed that three strains of *B. gladioli* pv. *cocovenenans*, but not other common foodborne pathogens and other *B. gladioli* strains, were amplified by the three methods, indicating their good specificity. The detection limits of these methods were all 10^{-2} ng/ μ L, and their sensitivity was good. Out of 15 commercial samples, two tested positive by each of these methods with a detection rate of 13.3%. This result was consistent with that of the national standard method, indicating that our methods had good applicability and accuracy. All three methods give results that can

收稿日期: 2023-06-21

基金项目: 国家市场监督管理总局技术保障专项(2023YJ17); “十四五”国家重点研发计划重点专项(2022YFF0607900)

第一作者简介: 林志伟(1970—)(ORCID: 0009-0000-0450-7536), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为植物保护。

E-mail: 408160466@qq.com

*通信作者简介: 杨艳歌(1986—)(ORCID: 0000-0002-9338-6621), 女, 副研究员, 硕士, 研究方向为食品质量与安全。

E-mail: yange8602@126.com

袁飞(1974—)(ORCID: 0000-0002-7215-1989), 女, 研究员, 博士, 研究方向为食源性病原微生物。

E-mail: feyyuan@163.com

be observed by the naked eye after amplification at 37 °C for 15 min, which provide a new and simple strategy for the rapid, visual and on-site screening of *B. gladioli* pv. *cocovenenans* in foods.

Keywords: *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*; enzymatic recombinase amplification; visualization; rapid detection

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230621-169

中图分类号: TS207.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 09-0219-07

引文格式:

林志伟, 王帅, 蔡杰, 等. 基于体温扩增的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种3种可视化快速检测方法的建立[J]. 食品科学, 2024, 45(9): 219-225. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230621-169. <http://www.spkx.net.cn>

LIN Zhiwei, WANG Shuai, CAI Jie, et al. Establishment of three rapid visual detection methods for *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* based on body temperature amplification[J]. Food Science, 2024, 45(9): 219-225. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230621-169. <http://www.spkx.net.cn>

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病菌 (*Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*) 是唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 中一个能够分泌米酵菌酸和毒黄素的致病变种^[1-3], 又称椰毒假单胞菌酵米面亚种、椰酵假单胞菌^[4-6]。常被唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病菌污染的食物有变质的谷物、湿淀粉、银耳和木耳等, 由该菌引起的食物中毒会导致呼吸循环衰竭、脑水肿和尿毒症等症状^[7-10]。近年来, 因误食用被唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种污染食品引发的中毒事件频繁发生^[11]。据统计, 2005—2020年, 我国共报道唐菖蒲伯克霍尔德氏菌中毒事件30起, 中毒188例, 死亡85例, 病死率为45.21%; 其中较大级别事件占事件总数的93.33%, 病死率53.13%^[12], 是迄今为止我国发现死亡率最高的食源性致病菌。

目前唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种的检测方法有培养法^[13]、液相色谱-质谱联用法^[14-17]、聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 法^[18-19]等。其中GB 4789.29—2020《食品微生物学检验 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 (椰毒假单胞菌酵米面亚种) 检验》^[13]规定的方法是最经典的鉴定方法, 但该方法需要经过初筛、生化鉴定, 并且需要联合GB 5009.189—2016《食品中米酵菌酸的测定》^[20]进行毒性实验测定, 操作复杂、耗时较长, 需要11~12 d才可作出判定结果。质谱法、数字PCR法和实时荧光PCR法能够有效缩短检测时间, 但仍存在仪器昂贵、需要丰富操作经验的人员测定等问题, 不适合现场快速检测和不发达地方检测。酶促等温扩增 (enzymatic recombinase amplification, ERA) 是2019年研发的一种新型等温扩增技术^[21], 可替代PCR技术。ERA与PCR技术一样具有特异性, 但速度更快, 通常在7~10 min即可将核酸模板扩增到可以检出的水平; 且ERA不需要热变性, 因此不需要昂贵的热循环设备。另外, ERA比其他等温扩增技术所需要的温度低, 在37~42 °C条件下即可完成痕量DNA/RNA区段的指数级扩增, 因此又被称为体温扩增技术, 能在广泛的环境温度下应用^[22-24]。

本研究根据唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病型菌株Co14的产毒基因*bonM*, 设计并筛选能够高效检测唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种的特异性高灵敏ERA引物和探针, 依托便携式实时PCR (real-time PCR) 仪, 结合显色剂或试纸条, 分别建立显色法、荧光法和试纸条法3种ERA现场可视化快速检测技术, 以期唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种的快速筛查和风险监测提供良好的技术方案。

1 材料与方

1.1 材料与试剂

实验用菌分别来源于中国工业微生物菌种保藏管理中心 (China Center of Industrial Culture Collection, CICC)、美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)、中国医学细菌菌种保藏管理中心 (National Center for Medical Culture Collections, CMCC) 和中国检验检疫微生物菌种保藏管理中心 (Inspection and Quarantine Culture Collections, IQCC), 信息详见表1。市售食品样品采购于2个北京的超市。

表1 实验用菌株信息

Table 1 Information of the strains used in this study

编号	菌株	拉丁名	菌种号
1	唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种	<i>B. gladioli</i> pv. <i>cocovenenans</i>	CICC 25108
2	唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种	<i>B. gladioli</i> pv. <i>cocovenenans</i>	CICC 25126
3	唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种	<i>B. gladioli</i> pv. <i>cocovenenans</i>	CICC 25132
4	唐菖蒲伯克霍尔德氏菌洋葱致病变种	<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i>	CGMCC 1.2892
5	唐菖蒲伯克霍尔德氏菌唐菖蒲致病变种	<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	CGMCC 1.3360
6	大肠埃希氏菌O157:H7	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	IQCC 10193
7	大肠埃希氏菌	<i>E. coli</i>	IQCC 10138
8	宋内氏志贺氏菌	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 29930
9	小肠结肠炎耶尔森氏菌	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 27729
10	单核细胞增生李斯特菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	IQCC 22291
11	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC 26003
12	蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
13	枯草芽孢杆菌	<i>B. subtilis</i>	ATCC 11774
14	创伤弧菌	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562
15	乙型溶血性链球菌	<i>Streptococcus hemolytic-β</i>	CMCC 32210

注: CGMCC 1.2892=ATCC 19302=LMG 2121, CGMCC 1.3360=ATCC 10248=LMG 2216=NCTC 12378, CICC 25108=CMCC (B) 10802。

GVC增菌液、改良马铃薯葡萄糖琼脂(modified potato dextrose agar, mPDA) 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 脑心浸液肉汤(brain heart infusion, BHI)培养基、脑心浸液琼脂(brain heart infusion agar, BHIA)培养基 英国Oxoid公司; PrepMan™ Ultra样品制备试剂 美国Thermo Fisher Scientific公司; 基础型核酸扩增试剂盒(ERA法)、荧光型核酸扩增试剂盒(ERA法)、试纸条型核酸扩增试剂盒(ERA法)、侧向流检测试纸条 苏州先达基因科技有限公司; 1 000×SYBR Green I 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

便携式real-time PCR仪 艾济遗传(北京)科技有限公司; Pico 17离心机 美国Thermo Fisher Scientific公司; D1008E掌上离心机 美国Scilogex公司; BioSpec-nano紫外-可见分光光度仪 日本岛津公司; 高压灭菌锅 以色列Tuttnauer公司; VORTEX 3涡旋混合器 德国IKA公司; DH-420电热恒温培养箱 美国Memmert公司。

1.3 方法

1.3.1 引物来源

从NCBI数据库下载*B. gladioli* pv. *cocovenenan* Co14的*bonM*基因(序列号: CP033430.1), 通过序列比对, 设计唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种特异性ERA引物和探针, 并由北京六合华大基因科技有限公司合成, 信息见表2。

表2 引物探针序列信息

Table 2 Information of the primers and probes

方法	引物/探针	序列(5'-3')
显色法	F1/F2-2	GCGATGGTCCGTATCTCTGCTGTGGC
	R1-1 ^a	GACAGGTTCCAGTGCCATTACGTGCCGC
	R1-2 ^a	GAATACAGCCGACAGGTTCCAGTGCC
	F2-1	CGTTCGCGGTGATGTCCTGGATCTCCAC
	R2-1 ^a	GTTCTTCGAATCGATCTTCCACATGGGC
	R2-2 ^a	TGCTGCTGACCGATCTGCCGACGCTG
荧光法	P1	TGTCTGGATCTCCACCAGCTCGAAACCGGCA[dT-FAM][THF][dT-BHQ1] TCAGCAGCTTCG[c3-spacer]
	P2	GGCAGTAATGGCACTGGAACCTGTGCGGCG[dT-FAM][THF][dT-BHQ1] ATTCCATGAACTGC[c3-spacer]
试纸条法	P1-试纸	FAM-TGTCTGGATCTCCACCAGCTCGAAACCGGCA[THF]CTTCAGCAGCTTCG[c3-spacer]
	P2-试纸	FAM-GGCAGTAATGGCACTGGAACCTGTGCGGCGT[THF]TATTCCATGAACTGC[c3-spacer]

注: a.采用试纸条法检测时, 下游引物进行5'-biotin修饰。

1.3.2 菌种培养及基因组DNA提取

将表1唐菖蒲伯克霍尔德氏菌接种到GVC增菌液中, 其他菌株接种到BHI培养基, 37℃培养24 h。取1 mL菌液于1.5 mL离心管中16 000×g离心2 min, 去上清液, 加入100 μL PrepMan™ Ultra提取液, 混匀后100℃金属浴放置5 min, 冷却后16 000×g离心2 min, 取上清液50 μL即为DNA模板, 采用紫外-可见分光光度仪测其浓度后于-20℃保存。

1.3.3 反应体系与检测程序

显色法反应体系参照基础型核酸扩增试剂盒(ERA法)使用说明书制备, DNA模板质量浓度10 ng/μL, 体积均为1 μL(荧光法和试纸条法同)。37℃恒温反应15 min, 反应结束后取25 μL扩增产物加入等体积的苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V/V), 振荡混匀后充分离心, 上清液用2%琼脂糖凝胶电泳检测。其余扩增产物加入2 μL 1 000×SYBR Green I观察显色情况。

荧光法反应体系参照荧光型核酸扩增试剂盒(ERA法)使用说明书制备, 便携式real-time PCR仪反应程序: 第1阶段37℃、1 s; 第2阶段37℃、14 s, 共40个循环, 第2阶段进行荧光信号收集。

试纸条法反应体系参照试纸条型核酸扩增试剂盒(ERA法)使用说明书制备, 反应程序: 37℃恒温反应15 min, 反应结束后取5 μL反应产物至1.5 mL离心管, 用纯水稀释25倍; 取出试纸条(不要触碰硝酸纤维素膜), 插入离心管中, 待试纸条被液体完全浸湿, 根据控制带和检测带的显色情况判读结果。

1.3.4 引物探针筛选

ERA引物和探针的筛选是开发灵敏快速的ERA检测方法的关键, 因此设计多组引物探针组合(表2), 以表1中3株唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种的基因组DNA作为模板, 对设计的引物和探针进行筛选, 显色法6种引物组合为F1/R1-1、F1/R1-2、F2-1/R2-1、F2-1/R2-2、F2-2/R2-1、F2-2/R2-2。荧光法和试纸条法引物探针筛选采用上述扩增效果好的引物分别与荧光探针或试纸条探针组合。选择特异性好且扩增效率高的引物和探针组合进行后续实验。所有样品的基因组DNA质量浓度均为10 ng/μL, 每个样品2个平行重复, 重复实验3次。

1.3.5 特异性检测

分别以*B. gladioli* pv. *cocovenenan* CICC 25108为代表菌株、以唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的其他致病型菌株(CGMCC 1.2892、CGMCC 1.3360)及其他种属10株菌株的基因组DNA作为模板进行ERA反应, 对筛选的引物和探针特异性进行检测。所有样品的基因组DNA质量浓度均为10 ng/μL, 重复实验3次。

1.3.6 灵敏度检测

为进一步分析建立的ERA显色法、荧光法和试纸条法的灵敏度, 以*B. gladioli* pv. *cocovenenan* CICC 25108为代表菌株, 将其基因组DNA分别稀释至10¹、10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³ ng/μL, 按照1.3.3节反应程序进行灵敏度分析, 每个样品2个平行重复, 重复实验3次。

1.3.7 市售样品检测

对15份食品样品, 种类包括面条、汤圆、饺子、烧麦、粉丝、木耳、银耳, 按GB 4789.29—2020^[13]的步骤进行样品前处理, 加入GVC增菌液中培养24 h, 采用

1.3.2节的方法进行基因组DNA提取。分别用本研究建立的ERA显色法、荧光法和试纸条法进行检测,以无菌ddH₂O为空白对照,每个样品2个平行重复,重复实验3次。采用GB 4789.29—2020^[13]检验方法对样品进行生化鉴定和米酵菌酸毒性成分检测。

1.4 数据分析

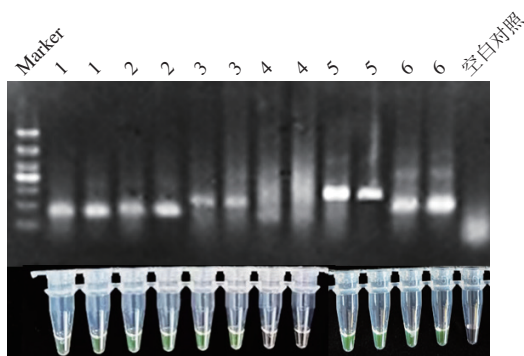
电泳结果有明显的目的条带,且显色结果为绿色,则为检出靶标菌核酸成分,如无明显的目的条带或显色结果为橙色,则为未检出靶标菌核酸成分。从扩增仪导出扩增图谱和检测数据,如有典型扩增曲线,且有检出数据,则为检出靶标菌核酸成分,若无报告值或无荧光对数增长,则为未检出靶标菌核酸成分。试纸条控制带与检测带都出现明显的条带,为检出靶标菌核酸成分;只有控制带出现条带,为未检出靶标菌核酸成分;控制带没有出现条带,判定检测结果无效。

2 结果与分析

2.1 ERA检测引物探针筛选结果

2.1.1 显色法引物筛选结果

传统基础型ERA分析需采用电泳检测和凝胶呈像,为满足现场可视化检测的需求,前期研究对中性红、羟基萘酚蓝、苯酚红、钙黄绿素和1 000×SYBR Green I 5种显色剂在ERA反应中的显色效果进行比较,确定了用SYBR Green I作为显色法的显色剂。本实验以菌株*B. gladioli* pv. *cocovenenan* CICC 25108 DNA为模板对6种组合的基础型ERA引物进行筛选。结果显示F2-2/R2-1引物组合的扩增效果最好(图1),因此初步拟定其作为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种基础型显色法ERA候选引物。



编号1~6,分别为ERA引物F1/R1-1、F1/R1-2、F2-1/R2-1、F2-1/R2-2、F2-2/R2-1、F2-2/R2-2。

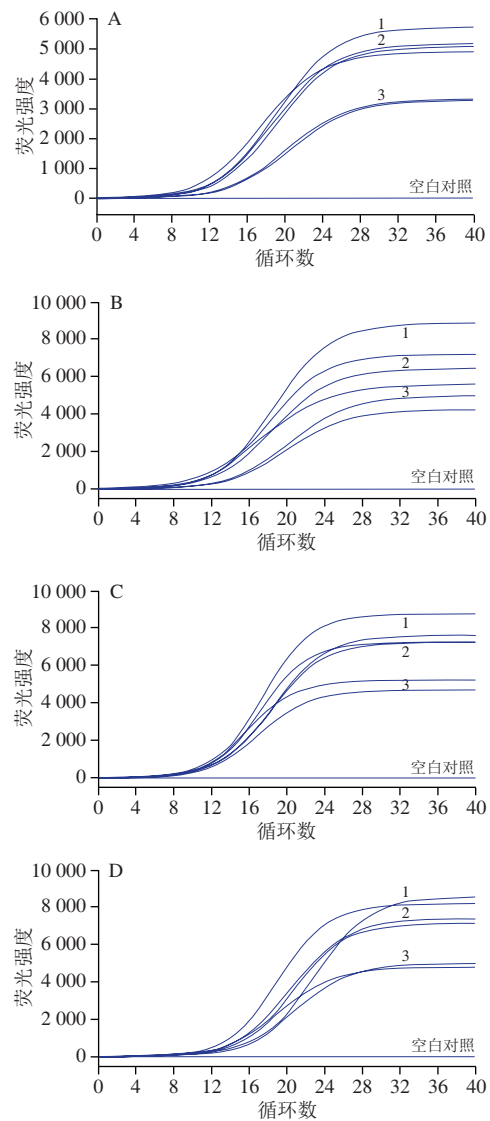
图1 显色法引物筛选结果

Fig. 1 Screening results of primers for chromogenic method

2.1.2 荧光法引物探针筛选结果

在上述扩增效果较好的基础型引物靶序列区域设

计了荧光探针P1和P2,形成4组ERA荧光法引物探针组合:F1/R1-1/P1、F1/R1-2/P1、F2-2/R2-1/P2和F2-2/R2-2/P2,进行扩增效果分析。结果显示,4组引物探针均能扩增3种唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种,但F1/R1-1/P1的荧光强度最低(图2A),其他3组荧光强度差异不大(图2B、C、D),其中F2-2/R2-1/P2引物探针组合的扩增效果最好(图2C),起峰时间较其他2组早,因此初步以F2-2/R2-1/P2作为荧光法ERA检测的候选引物探针组合。



A~D.分别为引物探针组合F1/R1-1/P1、F1/R1-2/P1、F2-2/R2-1/P2、F2-2/R2-2/P2。1~3.分别表示菌株*B. gladioli* pv. *cocovenenan* CICC 25108、*B. gladioli* pv. *cocovenenan* CICC 25126、*B. gladioli* pv. *cocovenenan* CICC 25132,图3同。

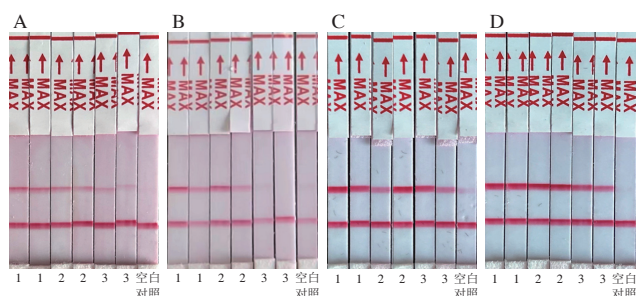
图2 荧光法引物探针筛选结果

Fig. 2 Screening results of primers and probes for fluorescence method

2.1.3 试纸条引物探针筛选结果

为建立ERA试纸条法,以FAM-生物素报告基因进

行免疫层析检测，并设计4种组合的试纸条引物探针：F1/R1-1/P1-试纸条、F1/R1-2/P1-试纸条、F2-2/R2-1/P2-试纸条、F2-2/R2-2/P2-试纸条，对其检测效果进行了筛选。结果发现，F1/R1-2/P1-试纸条引物探针组合无法检出*B. gladioli* pv. *cocovenenan* CICC 25132（图3B），F2-2/R2-1/P2-试纸条引物探针组合对空白对照检测会出现弱带（图3C），F1/R1-1/P1-试纸条和F2-2/R2-2/P2-试纸条引物探针组合对3种唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种均有扩增（图3A、D），但F2-2/R2-2/P2-试纸条较F1/R1-1/P1-试纸条的显色较强，因此初步以其用于后续ERA试纸条法检测的引物探针。



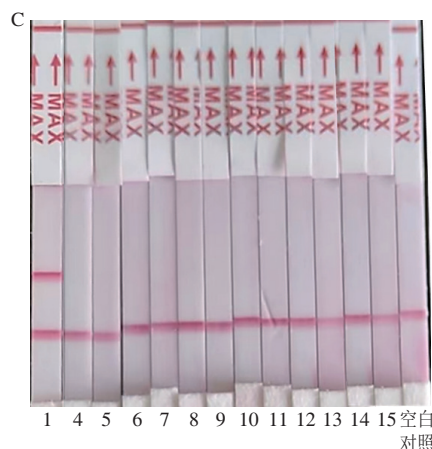
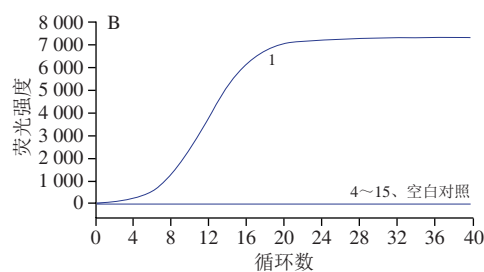
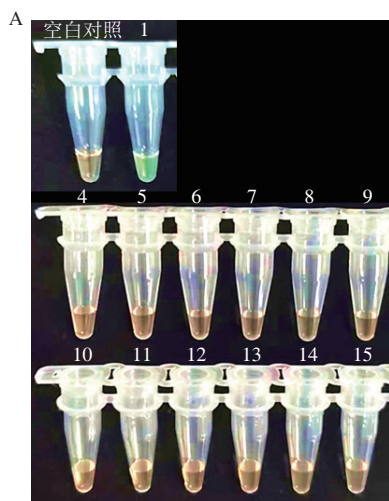
A~D.分别为引物探针组合F1/R1-1/P1-试纸条、F1/R1-2/P1-试纸条、F2-2/R2-1/P2-试纸条、F2-2/R2-2/P2-试纸条。

图3 试纸条法引物探针筛选结果

Fig. 3 Screening results of primers and probes for test strip method

2.2 特异性检测结果

对初步筛选的显色法、荧光法、试纸条法检测的引物和探针进一步进行特异性分析，检测结果显示仅*B. gladioli* pv. *cocovenenan* CICC 25108为阳性，而唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的其他菌株（CGMCC 1.2892、CGMCC 1.3360）及其他常见的10株食源性致病菌检测均为阴性（图4），表明筛选的引物和探针对唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种具有良好的特异性。



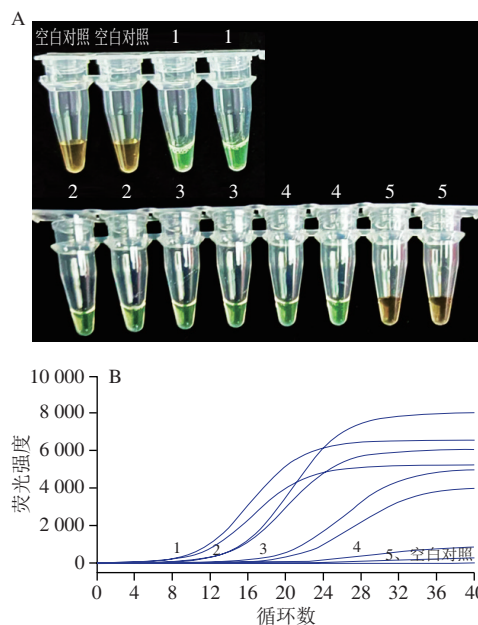
A. F2-2/R2-1特异性检测结果（显色法）；B. F2-2/R2-1/P2特异性检测结果（荧光法）；C. F2-2/R2-2/P2-试纸条特异性检测结果（试纸条法）；图5同。1. *B. gladioli* pv. *cocovenenan* CICC 25108；4~15.表1编号4~15的菌株。

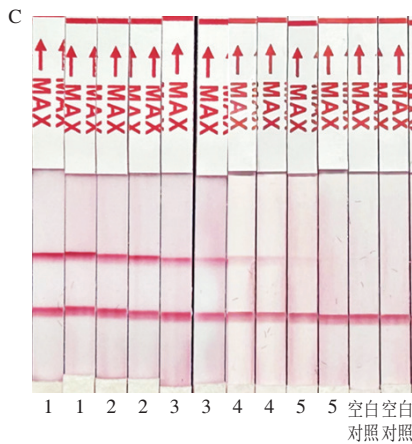
图4 引物探针特异性检测结果

Fig. 4 Specificity evaluation of primers and probes

2.3 灵敏度检测结果

如图5所示，除模板质量浓度为 10^{-3} ng/ μ L的实验组没有检出外，其他质量浓度实验组检测均为阳性。因此，本实验建立的ERA显色法、荧光法、试纸条法检测检出限均为 10^{-2} ng/ μ L，灵敏度较好。





1~5.基因组DNA质量浓度分别为 10^1 、 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} ng/ μ L的*B. gladioli* pv. *cocovenenan* CICC 25108检测结果。

图5 3种ERA可视化快速检测方法灵敏度分析结果

Fig. 5 Sensitivity analysis of three ERA-based rapid visual detection methods

2.4 市售样品检测

如表3所示, 15种市售食品样品中有2个汤圆样品检测出唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种, 检出率为13.3%, 且建立的ERA显色法、荧光法、试纸条法检测结果与GB 4789.29—2020方法的检测结果一致, 生化实验结果符合且检出米酵菌酸毒性成分。证实了本研究建立的3种唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种ERA可视化快速检测方法的准确性和实用性。

表3 实际样品检测结果

Table 3 Results of detection of actual samples

样品编号	样品类型	显色法	荧光法	试纸条法	GB 4789.29—2020方法
1	面条	—	—	—	—
2	面条	—	—	—	—
3	面条	—	—	—	—
4	面条	—	—	—	—
5	汤圆	+	+	+	+
6	汤圆	+	+	+	+
7	饺子	—	—	—	—
8	烧麦	—	—	—	—
9	粉丝	—	—	—	—
10	粉丝	—	—	—	—
11	粉丝	—	—	—	—
12	粉丝	—	—	—	—
13	木耳	—	—	—	—
14	木耳	—	—	—	—
15	银耳	—	—	—	—

注: +.检测结果阳性; —.检测结果阴性。

3 讨论

PCR法是替代传统培养法进行菌种鉴定的有力手段, 而靶基因的选择是保证PCR检测结果准确的关键因素之一。目前基于PCR技术对唐菖蒲伯克霍尔德氏菌进行鉴定的研究中有选用16S~23S rRNA基因^[19,25], 也有选

用*bonM*^[26]产毒基因。唐菖蒲伯克霍尔德氏菌存在多种致病型, 选用16S~23S rRNA基因序列难以将椰毒致病型与其他致病型进行较好的区分, 而*bonM*基因是米酵菌酸毒素合成所必需的基因^[27], 是准确检测唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病型的良好选择。本研究以唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病型菌株Co14^[28]的*bonM*基因为靶基因, 分别筛选了显色法、荧光法和试纸条法3种ERA方法最适的引物探针。在筛选过程中发现, 引物F2-2/R2-1以及与探针P2的组合在显色法和荧光法检测中的扩增效率最高。然而该组合采用试纸条法进行检测时, 空白对照会出现弱阳性, 这可能与试纸条的灵敏度更强有关, 或者是因为空白组产生的弱阳性荧光信号值过低, 导致荧光仪将其识别为噪音信号, 阈值线设定稍高, 将其判定为阴性。因此, 在建立ERA显色法、荧光法和试纸条法的过程中, 所筛选的引物和探针并非是完全通用的, 还要根据具体的实验结果进行分析。

与PCR技术相比, ERA检测技术在无需变温设备的基础上, 反应时间更短且检测灵敏度与PCR技术相同^[29-32]。本研究弥补了利用ERA技术进行唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种可视化快速检测报道的缺失, 同时为便于现场检测, 分别建立了显色法、荧光法和试纸条法3种快速筛查方法, 裸眼即可直接对结果进行判定, 且在37℃的体温下即可反应, 因此显色法和试纸条法可在手心或者腋窝下10~20 min完成扩增, 也可采用项目组前期研究使用的热帖^[33]进行反应, 解决对传统实验设备依赖的问题, 并能快速判断致病菌的有无。而荧光法仅需依托便携式real-time PCR仪或荧光等温扩增仪即可完成检测, 可快速对致病菌的含量进行半定量, 还可以进行多重检测。本研究可为食源性致病微生物的可视化快速检测提供一种新的思路。

4 结论

本研究以唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种的米酵菌酸生物合成基因簇中的*bonM*基因序列为靶点, 通过对关键致病菌靶基因序列的比对分析, 分别设计了高特异性、高灵敏度的ERA基础型检测引物, 以及荧光法和显色法检测探针, 并通过对其特异性、灵敏度分析, 分别建立了显色法、荧光法和试纸条法3种唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种现场可视化快速检测方法。本研究建立的方法从DNA提取到检测结果完成仅需30 min左右, 对其他唐菖蒲伯克霍尔德氏致病型以及常见的食源性致病菌无任何交叉, 灵敏度可达为 10^{-2} ng/ μ L, 具有特异性好、灵敏度高、检测时间短、操作简单、现场可视等技术优势, 可为食品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种的快速鉴别、溯源和检测开辟新的途径。

参考文献:

- [1] WANG H S, MA Y L, LIU L, et al. Incorporation of clove essential oil nanoemulsion in chitosan coating to control *Burkholderia gladioli* and improve postharvest quality of fresh *Tremella fuciformis*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 170: 114059. DOI:10.1016/j.lwt.2022.114059.
- [2] YUAN M D, HAN R W, BAI L, et al. Recent advances in the characterization of *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* and its toxin production[J]. Food Reviews International, 2024, 40(3): 867-882. DOI:10.1080/87559129.2023.2199829.
- [3] HUANG Q Y, WU Z T. Safe eating of fermented corn and coconut food: mechanism, clinical manifestations and inhibition of food poisoning involved in bongkrekkic acid[C]//E3S Web of Conferences. EDP Sciences, 2021, 267: 02075. DOI:10.1051/e3sconf/202126702075.
- [4] 申屠平平, 朱珈慧, 徐小民, 等. 一起椰毒假单胞菌酵米面亚种引起的食物中毒调查[J]. 上海预防医学, 2019, 31(6): 466-468. DOI:10.19428/j.cnki.sjpm.2019.19233.
- [5] 李兵, 叶青华, 赵美平, 等. 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种污染调查及其生长与产毒特性分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(10): 283-289. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.10.1366.
- [6] 彭沛穰, 景雪梅, 冶晓燕, 等. 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌致病变种的危害及预防[J]. 生物学通报, 2021, 56(6): 1-3. DOI:10.3969/j.issn.0006-3193.2021.06.001.
- [7] PENG Z X, DOTTORINI T, HU Y, et al. Comparative genomic analysis of the foodborne pathogen *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* harboring a bongkrekkic acid biosynthesis gene cluster[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 628538. DOI:10.3389/fmicb.2021.628538.
- [8] 董银苹, 王伟, 江涛, 等. 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种食物中毒分离株的遗传特性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(1): 39-43. DOI:10.13590/j.cjfh.2022.01.008.
- [9] ZHANG H X, GUO Y C, CHEN L L, et al. Epidemiology of foodborne bongkrekkic acid poisoning outbreaks in China, 2010 to 2020[J]. PLoS ONE, 2023, 18(1): e0279957. DOI:10.1371/journal.pone.0279957.
- [10] JONES C, WEBSTER G, MULLINS A J, et al. Kill and cure: genomic phylogeny and bioactivity of *Burkholderia gladioli* bacteria capable of pathogenic and beneficial lifestyles[J]. Microbial Genomics, 2021, 7(1): 000515. DOI:10.1099/mgen.0.000515.
- [11] 于浩洋, 冯静, 李颜岩. 超高效液相色谱-串联质谱测定米粉中米酵菌酸[J]. 化学分析计量, 2022, 31(9): 12-15. DOI:10.3969/j.issn.1008-6145.2022.09.003.
- [12] 陈晖, 傅镁洁, 王琦, 等. 2005—2020年我国唐菖蒲伯克霍尔德氏菌中毒事件流行病学分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(6): 1336-1341. DOI:10.13590/j.cjfh.2022.06.035.
- [13] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品微生物学检验 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)检验: GB 4789.29—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020: 1-17.
- [14] HU J P, LIANG M, XIAN Y P, et al. Development and validation of a multianalyte method for quantification of aflatoxins and bongkrekkic acid in rice and noodle products using PRiME-UHPLC-MS/MS method[J]. Food Chemistry, 2022, 395: 133598. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.133598.
- [15] 邹攀, 段圣省, 胡西洲, 等. 改良的QuEChERS-超高效液相色谱-三重四极杆质谱法检测银耳和木耳中米酵菌酸[J]. 色谱, 2021, 39(12): 1368-1373. DOI:10.3724/SP.J.1123.2021.06013.
- [16] LIANG M, CHEN R Q, XIAN Y P, et al. Determination of bongkrekkic acid and isobongkrekkic acid in rice noodles by HPLC-orbitrap HRMS technology using magnetic halloysite nanotubes[J]. Food Chemistry, 2021, 344: 128682. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128682.
- [17] 王俊虎, 乔勇升, 王建, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定六神曲中的米酵菌酸[J]. 色谱, 2019, 37(9): 963-968. DOI:10.3724/SP.J.1123.2019.03014.
- [18] 李会杰, 董莲华, 陈桂芳, 等. 食品中椰毒假单胞菌微滴式数字PCR定量检测方法的建立[J]. 生物技术通报, 2023, 39(1): 127-136. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-0254.
- [19] 王晓雯, 陈晶, 陈国培, 等. 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病型实时荧光PCR方法的建立[J]. 食品科技, 2022, 47(1): 330-335. DOI:10.3969/j.issn.1005-9989.2022.1.spkj202201049.
- [20] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中米酵菌酸的测定: GB 5009.189—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-5.
- [21] 于继彬, 李俊, 马陈翠, 等. 一种常温核酸扩增反应: CN109971834A[P]. 2019-07-05.
- [22] 王帅, 杨艳歌, 吴占文, 等. 重组酶聚合酶扩增、重组酶介导等温扩增及酶促重组等温扩增技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 297-305. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220526-322.
- [23] ZHANG L, WANG Y, HU J J, et al. Rapid detection of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei* based on real-time enzymatic recombinase amplification[J]. Aquaculture, 2023, 566: 739196. DOI:10.1016/j.aquaculture.2022.739196.
- [24] LIU Y, CHEN Y L, HUANG S S, et al. Rapid and sensitive diagnosis of drug-resistant FLT3-F691L mutation by CRISPR detection[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2021, 25(8): 753276. DOI:10.3389/fmolb.2021.753276.
- [25] 林捷, 方陈玉, 陆晶芳, 等. 食品中椰毒假单胞菌酵米面亚种实时荧光PCR检测的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(11): 3538-3544. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2020.11.031.
- [26] ZHENG J L, LIU L, LI X M, et al. Rapid and simple detection of *Burkholderia gladioli* in food matrices using RPA-CRISPR/Cas12a method[J]. Foods, 2023, 12(9): 1760. DOI:10.3390/foods12091760.
- [27] GONG H, HUANG X L, ZHU W J, et al. Pan-genome analysis of the *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* reveal the extent of variation in the toxigenic gene cluster[J]. Food Microbiology, 2023, 113: 104249. DOI:10.1016/j.fm.2023.104249.
- [28] 彭子欣, 陈雪, 李孟寒, 等. 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病型菌株Co14毒力相关基因解析[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(6): 558-562. DOI:10.13590/j.cjfh.2018.06.002.
- [29] LI J B, WANG Y, HU J J, et al. An isothermal enzymatic recombinase amplification (ERA) assay for rapid and accurate detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* infection in shrimp[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2023, 197: 107895. DOI:10.1016/J.JIP.2023.107895.
- [30] 吴占文, 王帅, 康婕, 等. 双重荧光RT-ERA技术快速检测贝类食品中诺如病毒[J]. 食品科学, 2023, 44(18): 355-363. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221126-300.
- [31] XIA S M, CHEN X. Single-copy sensitive, field-deployable, and simultaneous dual-gene detection of ARS-CoV-2 RNA via modified RT-RPA[J]. Cell Discovery, 2020, 6(1): 37. DOI:10.1038/s41421-020-0175-x.
- [32] 林志伟, 王帅, 王迎春, 等. 婴儿配方乳粉中食源性致病菌双重ERA快速检测方法的建立[J]. 食品科学, 2023, 44(18): 347-354. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221013-127.
- [33] 杨艳歌, 王帅, 李红娜, 等. 沙门氏菌ERA可视化快速检测方法的建立[J]. 中国食品学报, 2023, 23(10): 261-272. DOI:10.16429/j.1009-7848.2023.10.026.