



唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒假单胞菌酵米面亚种环介导等温扩增荧光方法的建立

姚栩荣¹, 陈子慧², 王海燕², 蔡锦昂¹, 黄晓君¹, 蒋宇明¹, 李秀英^{1*}

1 广州检验检测认证集团有限公司 国家加工食品质量检验检测中心(广东), 广东 广州 511400

2 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 511430

姚栩荣, 陈子慧, 王海燕, 蔡锦昂, 黄晓君, 蒋宇明, 李秀英. 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒假单胞菌酵米面亚种环介导等温扩增荧光方法的建立[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4594-4605.

YAO Xurong, CHEN Zihui, WANG Haiyan, CAI Jin'ang, HUANG Xiaojun, JIANG Yuming, LI Xiuying. A novel method for detecting *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* by fluorescent probe-based loop-mediated isothermal amplification[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4594-4605.

摘要: 【目的】建立一个基于环介导等温扩增与荧光探针结合的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒假单胞菌酵米面亚种(*Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*)特异性检测方法。【方法】通过多重序列比对分析, 选择 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 共有的 *bonA* 为靶位点, 设计环介导等温扩增的特异性引物和荧光探针, 通过 19 株 *B. gladioli* 和 3 株非目标菌株, 验证该方法的特异性。将该方法的检测特异性与现有的基于实时荧光定量 PCR 鉴定 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 的方法进行比较, 并对建立的方法进行灵敏度探究。【结果】建立的环介导等温扩增荧光鉴定方法对 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 具有特异性, 能在 30 min 内得出结果, 且该方法能进行可视化直接观测。该方法的基因组 DNA 最低检测限度为 1.98 pg/ μ L, 检测灵敏度为 2.7×10^2 CFU/mL。另外, 该方法能应用到食品样品中 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 的检测。【结论】本研究建立了一个快速、可视化、特异性强的检测方法, 能有效用于 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 的快速筛查, 为保障食品安全提供了一种快速、准确的分子检测手段。

关键词: 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒假单胞菌酵米面亚种; 环介导等温扩增; 荧光可视化; 食品安全

资助项目: 广东省自然科学基金(2020A1515010663)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2020A1515010663).

*Corresponding author. E-mail: js@cngttc.cn

Received: 2023-04-13; Accepted: 2023-09-05; Published online: 2023-09-22

A novel method for detecting *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* by fluorescent probe-based loop-mediated isothermal amplification

YAO Xurong¹, CHEN Zihui², WANG Haiyan², CAI Jin'ang¹, HUANG Xiaojun¹, JIANG Yuming¹, LI Xiuying^{1*}

1 National Processed Food Quality Inspection and Testing Center, Guangzhou Inspection Testing and Certification Group Co., Ltd., Guangzhou 511400, Guangdong, China

2 Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To establish a fluorescent probe-based loop-mediated isothermal amplification method for the specific detection of *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*. [Methods] According to the results of the multiple sequence alignment analysis, a conserved sequence, *bonA*, was selected for the specific detection of *B. gladioli* pv. *cocovenenans*. The primers and fluorescent probes were designed according to the conserved sequence for the establishment of a fluorescent probe-based loop-mediated isothermal amplification method. The established method was employed to detect 19 strains of *B. gladioli* and 3 non-target strains, and thus the specificity of this method was examined. Furthermore, the specificity of this method was compared with that of the real-time fluorescent PCR. Additionally, we investigated the limit of detection of this method for genomic DNA. [Results] The established method exhibited specificity towards *B. gladioli* pv. *cocovenenans* and could obtain the result within 30 min. Moreover, this method could visualize the detection results. The limits of detection for the genomic DNA and bacterial suspension were 1.98 pg/ μ L and 2.7×10^2 CFU/mL, respectively. In addition, this method can be applied to the detection of *B. gladioli* pv. *cocovenenans* in food samples. [Conclusion] A rapid, visualizable, and specific method was established for detecting *B. gladioli* pv. *cocovenenans* and can serve as a rapid and accurate molecular detection method for ensuring food safety.

Keywords: *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*; loop-mediated isothermal amplification; visual detection based on fluorescence; food safety

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒假单胞菌酵米面亚种(*Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*), 是一种存在于谷物类制品、薯类制品和变质银耳中的病原菌^[1]。近年来, 因 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 引起的中毒事件频发, 最近一起最为严重的中毒事件是 2020 年发生在黑龙江省的自制“酸汤子”事件, 9 人食用变质米制品后发生中毒, 其中 7 人死亡。*B. gladioli* pv. *cocovenenans*

导致的食物中毒主要是由其分泌的米酵菌酸引起的, 该物质会作用于哺乳动物中的线粒体腺嘌呤核苷酸转位酶, 抑制该酶的 ATP/ADP 交换过程, 从而抑制有氧呼吸过程, 造成哺乳动物死亡^[2-3]。由于米酵菌酸无色无味, 一般在食品中难以被察觉^[3]。另外, 米酵菌酸具有热稳定性, 食物在烹煮过程无法分解米酵菌酸, 因此分泌米酵菌酸的 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 成为影响

食品安全性的严重危害因素,如何从食品中排除米酵菌酸风险成为了检测行业的热点之一^[1,4]。

根据现有食品安全国家标准 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》^[5],鉴定 *cocovenenans* 亚种需要繁琐的检验流程,包括生化试验和毒性试验,其中毒性试验包含产毒培养和毒力测定,检验周期长达 15–20 d,并且容易受人员操作和环境因素影响。国标规定的检测方法难以满足检测的时效性要求,流通的湿粉制品等食品在抽检过程中可能已经被消费者食用,造成中毒事件的发生,对相关部门快速决策和应急处置带来困难^[6]。因此,许多研究者针对 *B. gladioli* 开发分子快速检测方法,以提高检测的及时性。

近年来,随着测序技术的发展,目前已有 239 株 *B. gladioli* 进行了全基因组测序,其中有 36 种含有 *bon* 基因簇,该基因簇编码生产米酵菌酸的酶系。但是 36 种菌株中并非所有都为 *cocovenenans* 亚种,这对利用 *bon* 基因簇作为检测靶序列区分 *cocovenenans* 亚种和非 *cocovenenans* 亚种造成困难^[7]。王晓雯等^[6]针对 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* Co14 设计了实时荧光定量 PCR 方法,该方法特异性高,能正确地区分 *cocovenenans* 亚种。

相比于传统的实时荧光定量 PCR,环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)具有高灵敏度和迅速的特点,能在 15–60 min 内完成鉴定,并且不需要借助高端仪器和专业训练^[8–9]。但环介导等温扩增技术中引物的设计较为复杂,需要尽量避免错配、二配体形成等情况。由于传统的环介导等温扩增使用 pH 指示剂、核酸染料、络合指示剂等进行显色,非特异性扩增会干扰实验结果,增加

假阳性的发生概率,所以一般需要筛选多套引物才能保证环介导扩增的特异性,需要耗费大量时间和人力物力^[10]。为了简化环介导等温扩增的引物设计环节,引入荧光探针能特异性结合扩增产物,避免非特异性扩增带来的干扰。Shen 等^[11]在环介导扩增的基础上,引入核糖核酸修饰的荧光探针,利用 RNase HIII 切割杂合的 DNA-RNA 双链使荧光探针断裂,能高特异性检测沙门氏菌(*Salmonella*)的核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。

本研究通过分析 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 的 *bon* 基因簇的保守序列,设计环介导等温扩增的引物,在此基础上引入核糖核酸修饰的荧光探针和 RNase HIII,建立了一个快速、可视化、特异性强的 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 的检测方法。该方法能应用在食物样品的检测上,为保障食品安全提供了一个高效的分子检测方法。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

本研究所用细菌唐菖蒲伯克霍尔德菌(*Burkholderia gladioli*) CICC 10574、CICC 25108、CICC 25068、CICC 25089、CICC 25126、CICC 25132、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*) CICC 23648 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(China Industrial Microbial Culture Collection Management Center, CICC), *B. gladioli* ATCC 33664、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 15442 购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),其他细菌均从食物样品或环境涂抹样品中分离得到,保存于–80 °C 冰箱。所有细菌使用马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基 36 °C 培养 2 d。

1.1.2 PDA 培养基(g/L)

马铃薯(提取浸出粉) 300, 葡萄糖 20, 琼脂 15, pH 5.6±0.2。

1.1.3 马铃薯葡萄糖水(PDB)培养基(g/L)

马铃薯(提取浸出粉) 300, 葡萄糖 20, pH 5.6±0.2。

1.1.4 营养琼脂(NA)培养基(g/L)

蛋白胨 10, 牛肉膏粉 3, 氯化钠 5, 琼脂 15, pH 7.3±0.2。

1.1.5 营养肉汤(NB)培养基(g/L)

蛋白胨 10, 牛肉膏粉 3, 氯化钠 5, pH 7.3±0.2。

1.1.6 食物样品或环境涂抹样品

见表 1。

1.2 主要试剂及仪器

TaKaRa Ex Taq[®]购自宝日医生物技术(北京)有限公司; *Bst* 2.0 DNA 聚合酶、RNase HII 购自 New England BioLabs; PDA、NA、NB 培养基购自广东环凯微生物科技有限公司; 4S Green 核酸染色剂、细菌基因组提取试剂盒、玻璃珠、琼脂糖、DNA Marker、引物和探针购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 琼脂糖 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; DNeasy mericon Food Kit 购自凯杰生物工程(深圳)有限

表 1 菌株信息和环介导等温扩增荧光鉴定方法与实时荧光定量 PCR 方法的 C_t 值比较

Table 1 Information of strains and comparison of C_t value of fluorescent probe-based loop-mediated isothermal amplification (FP-LAMP) and real-time quantitation PCR (RT-qPCR)

Sample name	Sample source	Bongkrekeic acid production	C_t value of FP-LAMP	C_t value of RT-qPCR
RB2109	Rice	-	-	-
PB2208	Swap sample	-	-	-
PB2107	Swap sample	-	-	-
NB2207	Rice noodles	-	-	-
PB2207	Swap sample	+	12.89	20.10
NB2207-2	Rice noodles	-	-	-
PB2109	Swap sample	+	12.56	16.82
PB2208-2	Swap sample	+	13.60	19.47
PB2109	Swap sample	+	14.60	21.68
RB2210	Rice	+	13.84	21.50
RB2210-2	Rice	+	14.50	21.87
PB2108	Swap sample	+	14.50	22.24
<i>B. gladioli</i> CICC 10574	Purchased from CICC	-	-	-
<i>B. gladioli</i> ATCC 33664	Purchased from ATCC	+	6.87	21.82
<i>B. gladioli</i> CICC 25108	Purchased from CICC	+	7.15	20.50
<i>B. gladioli</i> CICC 25088	Purchased from CICC	-	-	-
<i>B. gladioli</i> CICC 25089	Purchased from CICC	-	-	-
<i>B. gladioli</i> CICC 25126	Purchased from CICC	+	7.24	21.58
<i>B. gladioli</i> CICC 25132	Purchased from CICC	+	7.43	22.38
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Purchased from ATCC	-	-	-
<i>B. cepacia</i> CICC 23648	Purchased from CICC	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Purchased from ATCC	-	-	-

+: Positive; -: Negative; Swap sample represents swap sample from environment of food manufactory.

公司; 普通 PCR 仪 PTC-200 购自 MJ Research 公司; 实时荧光定量 RCR 仪 Gentier96E 购自西安天隆科技有限公司; 凝胶成像系统 Tanon 4100 购自上海天能科技有限公司; 超微量紫外可见分光光度计 NanoDrop one 购自赛默飞世尔科技公司; 按箱式三用紫外分析仪 WFH-203B 购自上海精科实业有限公司。

1.3 多重序列比对分析

36 个含有 *bon* 基因簇的 *B. gladioli* 基因组下载自 PATRIC^[12]。来自 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* DMSZ11318 的 67.5 kb 的 *bon* 基因簇(GenBank: JX173632.1)作为参考序列, 下载自 NCBI 基因组数据库。BLASTn+ (v2.12.0)、ClustalW (v2.1) 用于多重序列比对分析。

1.4 菌株的培养和样品的处理

取表 1 中所有菌株分别接种到 PDA 培养基, 36 °C 培养 2 d 后, 挑取单菌落到含有 50 μL 的洗脱缓冲液(DNeasy mericon Food Kit)的 1.5 mL 离心管中, 在金属浴中 100 °C 孵育 10 min 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min, 取上清到另一离心管中。

1.5 标准 DNA 的制备

根据 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* Co14 的检测靶序列设计引物组 ST, 并进行 PCR 反应, 引物见表 2。反应体系: ST-1 2.5 μL, ST-2 0.2 μL, ST-3 0.2 μL, ST-4 0.2 μL, ST-5 0.2 μL, ST-6 0.2 μL, ST-7 0.2 μL, ST-8 2.5 μL, 10×Ex *Taq* buffer 2.5 μL, dNTPs mixture 2 μL, Ex *Taq* 0.15 μL,

表 2 本研究所用引物及探针

Table 2 Primers and probes in this study

Primers and probes	Sequence (5'→3')	Source
ST-1	CTCGACGAGATGGACTGCT	This study
ST-2	TCGGCCTCGGCCGGCGAGATGTTGAAGAACAGCGGGTCTGAAGCAGTCCA TCTCGTCGAG	This study
ST-3	CCGGCCGAGGCCGAGCTGATGGATCCCCAGCAGCGCTGTTCTGGAGGA GGGCTACCG	This study
ST-4	TCGCTGAGCTGGCGCGGATCGTAGCCGGCGTCCTCGAAGGCGCGGTAGCC CTCCTCCAG	This study
ST-5	GCGCCAGCTCAGCGAGGCACGCTGCGGGCTCTATCTCGGCATCATGGGCG CGAGCGAAT	This study
ST-6	GGTGATGTCGCCGGCGCCGCGGTGCTGCTGCACCAGCCAGCCGTATTCGC TCGCGCCCA	This study
ST-7	GCCGGCGACATACCGGCACCAGCACCGCGATCGCGGCCGCGCGCATCGC CTATTCCT	This study
ST-8	TTCAGGAAATAGGCGATGCGC	This study
FIP-2	AGCCCTCCTCCAGGAACACCGCTGTTCTTCAACATCT	This study
BIP-2	TTCGAGGACGCCGGCTACCAGCCAGCCGTATTCGCT	This study
F3-2	CTCGACGAGATGGACTGC	This study
B3-2	TTCAGGAAATAGGCGATGCG	This study
LoopF-2	GCTGGGGATCCATCAGCT	This study
LoopB-2	GCGTCTATCTCGGCATC	This study
BA-F	CGATGATATAGCCGAGGTTTTTC	[6]
BA-R	CAGGTTCCAGTGCCATTACGT	[6]
Probe BA	Cy5-CGATGGTCCGTATCTCCTGCTTGTGC-BHQ	[6]
Probe DP-1	FAM-TCCGCGCCAGCTCrArGCGAG-BHQ	This study
Probe DP-2	AMCA-TCCGCGCCAGCTCrArGCGAG-BHQ	This study

ddH₂O 补至 25 μL。反应条件: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 56 °C 25 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 1 min。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测和切胶, 按照琼脂糖 DNA 回收试剂盒说明书进行回收。经超微量紫外可见分光光度计测定 DNA 浓度后, 稀释成 200 ng/μL 作为标准 DNA (阳性对照)。标准 DNA 序列通过测序证实与参考序列一致。

1.6 实时荧光 PCR 反应

引物及探针参考王晓雯等^[6]的研究, 见表 2。反应体系: BA-F 1 μL, BA-R 1 μL, 探针 BA 0.65 μL, 10×Ex Taq buffer 2.5 μL, dNTPs mixture 2 μL, Ex Taq 0.15 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 补至 25 μL。反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 5 s, 60 °C 40 s (测取荧光信号), 40 个循环。

1.7 环介导等温扩增反应

根据 *B. gladioli* 的 *bon* 基因簇中的 *bonA* 设计引物, 引物见表 2。反应体系: FIP-2 2.4 μL, BIP-2 2.4 μL, F3-2 0.3 μL, B3-2 0.3 μL, LoopF-2 0.6 μL, LoopB-2 0.6 μL, 10× isothermal amplification buffer 2.5 μL, dNTPs 4 μL, *Bst* 2.0 1 μL, RNase HII 0.5 μL, 探针 DP-1 或 DP-2 1 μL, DNA 模板 1 μL, RNase-free H₂O 补至 25 μL。反应条件: 60 °C 60 min, 每 1 min 测取一次 FAM 荧光信号。

1.8 环介导等温扩增可视化检测

环介导等温扩增可视化检测反应体系与 1.7 一致。反应条件: 60 °C 60 min, 在紫外分析仪 (365 nm) 中进行检测。

1.9 环介导等温扩增荧光方法基因组 DNA 最低检测限量测试

将从样品中分离的 PB2108 接种到 PDB 培养基中, 在 36 °C 培养 24 h 后, 根据细菌基因组提取试剂盒说明书提取基因组, 用超微量紫外可见分光光度计测取基因组浓度。用 RNase-free

水 10 倍连续稀释 6 个梯度, 各取 1 μL 稀释液按照 1.7 进行基因组 DNA 最低检测限量测试。

1.10 环介导等温扩增荧光方法灵敏度测试

PB2108 接种到 PDB 培养基中, 在 36 °C 培养 24 h 后, 用生理盐水稀释成麦氏浊度为 0.5, 用洗脱缓冲液 (DNeasy mericon Food Kit) 10 倍稀释成 7 个梯度, 各取 1 μL 稀释液按照 1.7 进行灵敏度测试。取 100 μL 稀释 10⁶ 后的菌液进行菌落计数。

1.11 *B. gladioli* 的鉴定及米酵菌酸的定性测定

食物样品中 *B. gladioli* 的鉴定根据 GB 4789.29—2020 中的 5.1—5.5 进行, 米酵菌酸的定性测定根据 GB 5009.189—2016 进行。

1.12 人工污染样品的环介导等温扩增荧光检测

PB2108 接种到 PDB 培养基中, 在 36 °C 培养 24 h 后, 用生理盐水稀释成麦氏浊度为 0.5。以新鲜河粉和泡发银耳作为检测样品, 分别取 2 份 5 g 样品, 其中一份作为实验组, 加入 100 μL 稀释后菌液, 待自然风干, 另一份作为对照组。把样品分别加入到 50 mL 离心管中, 加入 5 g 玻璃珠, 加入 15 mL 裂解缓冲液 (DNeasy mericon Food Kit), 剧烈振荡, 把食品基质打碎后, 根据试剂盒说明书进行 DNA 提取, 最后收集到同一离心柱中, 用 50 μL 洗脱缓冲液洗脱。各取 1 μL 洗脱液按照 1.7 进行检测。

2 结果与分析

2.1 多重序列比对分析 *B. gladioli* 基因组

为了能有效区分 *cocovenenans* 亚种和非 *cocovenenans* 亚种, 首先通过多重序列比对分析, 确定检测靶序列。以 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* DSMZ11318 的 *bon* 基因簇序列 (67 546 bp) 为参考序列, 通过 BLASTn 对 36 株含 *bon* 基因簇的

B. gladioli 进行比对, e -value 设定值为 $1e^{-5}$ 。结果表明有 17 株 *B. gladioli* 的 *bon* 基因簇与 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* DSMZ11318 的相似度较高。用 ClustalW 进行多重序列比对[附图 S1 已提交至国家微生物科学数据中心(<http://nmdc.cn>), 编号 NMDCX0000224], 结合王晓雯等^[6]的研究, 选定了 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* DSMZ11318 的 *bon* 基因簇(GenBank: JX173632.1)中 15 792–16 010 的 219 bp 序列作为 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 的检测靶序列。

2.2 特异性检测 *B. gladioli* pv. *cocovenenans*

为了验证环介导等温扩增荧光鉴定方法对 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 的特异性, 对 19 株 *B. gladioli* 和 3 株非目标菌株进行特异性测试。其中, 12 个菌株从实际食物样品中分离得到, 7 株 *B. gladioli* 从菌种保藏中心购买并已知菌株的产米酵菌酸情况, 3 株非目标菌株包括 *S. aureus*、*B. cepacia* 和 *P. aeruginosa*, 菌株的来源见表 1。*B. gladioli* 的米酵菌酸产生情况根据 GB 5009.189–2016 规定进行产毒培养, 并进行高效液相色谱进行定性鉴定, 产毒情况见表 1, 19 株 *B. gladioli* 中有 11 株能产生米酵菌酸。

对 22 个菌株进行环介导等温扩增荧光鉴

定, 其中标准 DNA 作为阳性对照, *B. gladioli* CICC 10574、*B. gladioli* CICC 25088、*B. gladioli* CICC 25089 作为阴性对照, RNase-free 水作为空白对照。检测结果如图 1 所示, 阴性对照和空白对照均无明显的扩增曲线, 阳性对照有明显的扩增曲线, 设定相对荧光强度 (relative fluorescence unit, RFU) 的阈值为 500, C_t 值为 7.35, 16 min 到达荧光强度峰值。产生米酵菌酸的菌株 PB2207、PB2109、PB2208-2、PB2109、RB2210、RB2210-2、PB2108、*B. gladioli* ATCC 33664、*B. gladioli* CICC 25108、*B. gladioli* CICC 25126 和 *B. gladioli* CICC 25132 均有明显的扩增曲线, C_t 值分别为 12.89、12.56、13.60、14.60、13.84、14.50、14.50、6.91、7.15、7.24 和 7.43 (表 1)。而其他不产生米酵菌酸的菌株 RB2109、PB2208、PB2107、NB2207、NB2207-2 和 3 株非目标菌株均没有明显的扩增曲线。结果表明了建立的环介导等温扩增荧光鉴定方法对 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 具有特异性。使用普通实时荧光定量 PCR 方法的 C_t 值见表 1, 结果表明环介导等温扩增荧光鉴定方法和普通实时荧光定量 PCR 方法对 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 的鉴定一致。

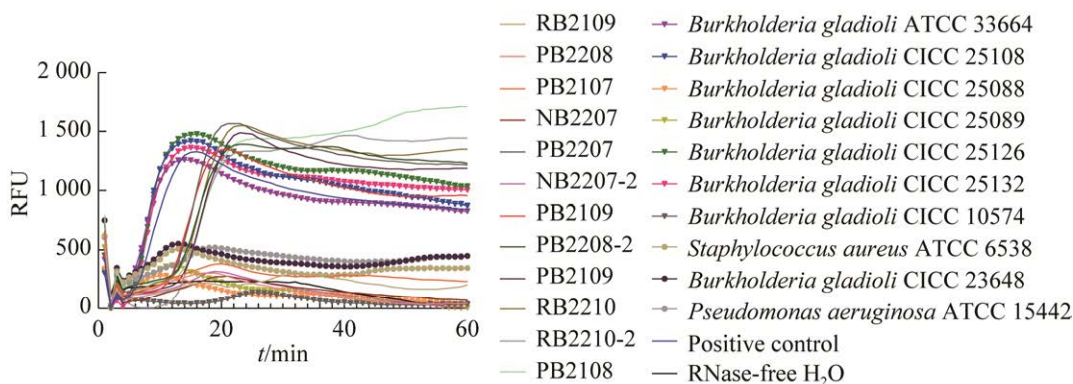


图 1 环介导等温扩增荧光鉴定方法对不同菌株的扩增曲线

Figure 1 Amplification curve of the reaction that detecting different strains by FP-LAMP. Straight lines represent *Burkholderia gladioli* isolated from food samples or swap sample from environment of food manufactory; Lines with reverse triangle symbols represent *B. gladioli* from culture collection; Lines with dot symbols represent non-target strains.

2.3 环介导等温扩增荧光鉴定方法基因组 DNA 最低检测限量测试

为了探究环介导等温扩增荧光方法对基因组 DNA 的最低检测限量, 提取样品中 PB2108 菌株的基因组进行检测。PB2108 菌株的基因组稀释成系列梯度, 浓度范围为 19.8 fg/ μ L–19.8 ng/ μ L。通过实时荧光定量 PCR 仪检测, 在 1.98 pg/ μ L–19.8 ng/ μ L 浓度有明显的扩增曲线(图 2A), 表明该方法的最小基因组 DNA 浓度为 1.98 pg/ μ L。

2.4 环介导等温扩增荧光鉴定方法灵敏度测试

为了探究环介导等温扩增荧光方法对菌液浓度的灵敏度, 用梯度稀释的 PB2108 菌液进行检测。PB2108 菌液梯度稀释成梯度浓度, 浓度范围为 2.7×10^1 – 2.7×10^7 CFU/mL。通过实时荧光定量 PCR 仪检测, 在 2.7×10^2 – 2.7×10^7 CFU/mL

菌液浓度有明显的扩增曲线(图 3A), 表明该方法的灵敏度为 2.7×10^2 CFU/mL。

2.5 环介导等温扩增荧光鉴定方法可视化检测

为了能更直观地对环介导等温扩增的结果进行观测, 把荧光探针的 FAM 基团变更为 AMCA 基团, 使结果能在检测行业常用的紫外分析仪直接观测。对 22 个菌株进行特异性检测, 在紫外分析仪中进行观测(图 4)。结果表明阳性对照有明显的蓝色荧光, *B. gladioli* CICC 10574、*B. gladioli* CICC 25088、*B. gladioli* CICC 25089 和 RNase-free 水没有明显荧光。产生米酵菌酸的菌株 PB2207、PB2109、PB2208-2、PB2109、RB2210、RB2210-2、PB2108、*B. gladioli* ATCC 33664、*B. gladioli* CICC 25108、*B. gladioli* CICC 25126、*B. gladioli* CICC 25132 和阳性对照

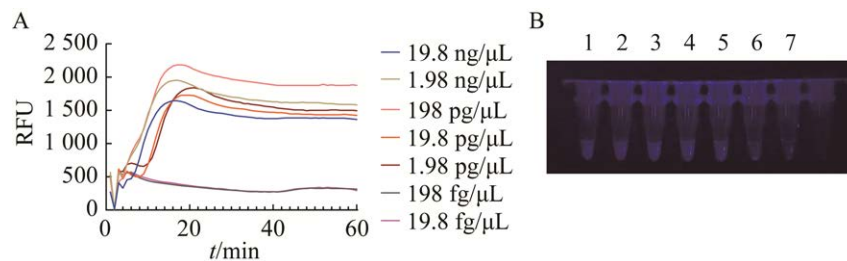


图 2 环介导等温扩增荧光鉴定方法的基因组 DNA 最低检测限量测试

Figure 2 Detection limit of genomic DNA by FP-LAMP via RT-qPCR analyzer (A) and visual detection (B). 1: 19.8 ng/ μ L; 2: 1.98 ng/ μ L; 3: 198 pg/ μ L; 4: 19.8 pg/ μ L; 5: 1.98 pg/ μ L; 6: 198 fg/ μ L; 7: 19.8 fg/ μ L.

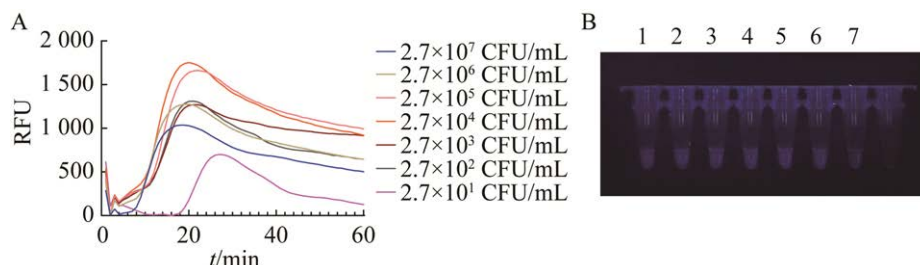


图 3 环介导等温扩增荧光鉴定方法的灵敏度测试

Figure 3 Detection limit of bacterial suspension by FP-LAMP via RT-qPCR analyzer (A) and visual detection (B). 1: 2.7×10^7 CFU/mL; 2: 2.7×10^6 CFU/mL; 3: 2.7×10^5 CFU/mL; 4: 2.7×10^4 CFU/mL; 5: 2.7×10^3 CFU/mL; 6: 2.7×10^2 CFU/mL; 7: 2.7×10^1 CFU/mL.

均有明显的蓝色荧光,而其他不产生米酵菌酸的菌株 RB2109、PB2208、PB2107、NB2207、NB2207-2 和 3 株非目标菌株均没有明显的荧光,表明了可视化的环介导等温荧光鉴定方法也具有特异性。

对可视化的环介导等温荧光鉴定方法进行基因组 DNA 最低检测限量测试和灵敏度测试。对于基因组 DNA 最低检测限量测试,对梯度稀释浓度的 PB2108 菌株基因组进行环介导等温扩增后,在紫外分析仪中进行观测(图 2B),结果表明在 1.98 pg/ μ L–19.8 ng/ μ L 浓度有明显的蓝色荧光,与在实时荧光定量 PCR 中可检测浓

度范围一致,该方法的基因组 DNA 最低检测浓度为 19.8 ng/ μ L。而对于灵敏度测试,对梯度稀释的 PB2108 菌株直接进行环介导等温扩增后,在紫外分析仪中进行观测(图 3B),结果表明在 2.7×10^2 – 2.7×10^7 CFU/mL 浓度有明显的蓝色荧光。

2.6 人工污染样品的检测

为了探究环介导等温扩增荧光方法对实际食品基质的效果,选择了河粉和泡发银耳作为食品基质,通过人工污染的方法模拟实际受 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 污染的食品。人工污染的食物样品通过试剂盒提取 DNA 后,在实时荧光定量 PCR 仪中检测(图 5A)。结果表明污染样

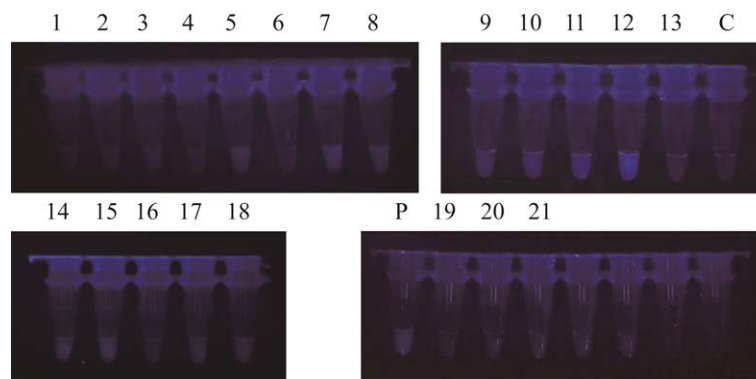


图 4 环介导等温扩增荧光鉴定方法可视化检测结果

Figure 4 Results of visual detecting different strains by FP-LAMP. 1: RB2109; 2: PB2208; 3: PB2107; 4: NB2207; 5: PB2207; 6: NB2207-2; 7: PB2109; 8: PB2208-2; 9: PB2109; 10: RB2210; 11: RB2210-2; 12: PB2108; 13: *B. gladioli* CICC 10574; 14: *B. gladioli* ATCC 33664; 15: *B. gladioli* CICC 25108; 16: *B. gladioli* CICC 25088; 17: *B. gladioli* CICC 25089; 18: *B. gladioli* CICC 25126; 19: *B. gladioli* CICC 25132; 20: *S. aureus* ATCC 6538; 21: *B. cepacia* CICC 23648; 22: *P. aeruginosa* ATCC 15442; C: Blank control, RNase-free H₂O; P: Positive control.

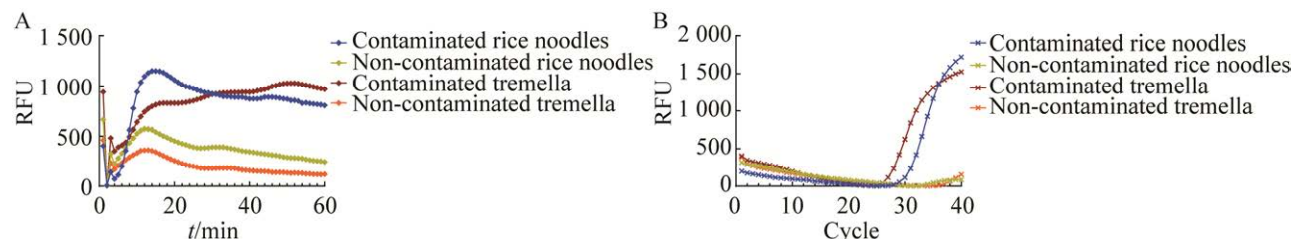


图 5 人工污染样品的检测结果

Figure 5 Results of detection of the artificially contaminated samples by FP-LAMP (A) and RT-qPCR (B). Lines with diamond symbols represent samples detected by FP-LAMP; Lines with cross symbols represent samples detected by RT-qPCR.

品和非污染样品的扩增曲线存在明显差异,对污染河粉和污染银耳的 C_t 值分别为 7.71 和 8.08,该方法对实际样品仍然能进行 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 鉴定。同时,也利用普通荧光定量 PCR 方法对污染和非污染样品进行扩增(图 5B)。结果表明该方法对污染样品的扩增曲线典型,对污染河粉和污染银耳的 C_t 值分别为 32.36 和 29.43,该方法对实际样品能进行 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 鉴定。

3 讨论

B. gladioli pv. *cocovenenans* 作为食源性致病菌,在变质的食品中释放的米酵菌酸无色无味,且具有热稳定性,少量摄入即可致死,严重危害国家的食品安全。发展对该致病菌的快速检测技术,对提高食物样品的检测及时性,避免中毒事件的发生至关重要。环介导等温扩增作为热门的快速检测,具有操作方便、快速的特点,且相比于普通实时荧光定量 PCR 具有更高的检测灵敏度,但目前没有应用环介导等温扩增技术特异性鉴定 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 的报道。

环介导等温扩增就一直存在假阳性的问题^[10],这可能是由于环介导等温扩增中加入的引物数量较多,有可能引物间形成引物二聚体,也有可能基因组的其他位置进行非特异性扩增,在琼脂糖凝胶电泳就能发现非特异扩增条带,如果使用 pH 指示剂、核酸染料、络合指示剂等显色剂,就会造成结果的错误判断。因此市面上基于传统显色剂的环介导等温扩增技术,引物需要严格的设计和筛选,需要大量人力物力的投入。为了解决这一问题,在环介导等温扩增基础上引入了荧光探针,通过碱基互补配对方式与靶基因结合,能有效降低假阳性的发生。引物设计的难度降低,也不需要大量筛选,降低了环介导等温扩增的开发难度和成本。

本研究通过确立的环介导等温扩增荧光鉴定方法对不同的 *B. gladioli* 进行检测,证实了该方法能特异性鉴定 *B. gladioli* pv. *cocovenenans*。相比于普通实时荧光定量 PCR,该方法对纯培养 *B. gladioli* 的 C_t 值平均减少了 9.53,提高了检测效率。理想的快检技术是能直接对食物样品进行扩增检测,不需要进行增菌步骤,因此本研究通过人工污染的方法,选用通常受 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 污染的 2 种食物基质,包括河粉和银耳,探究其对环介导等温扩增荧光鉴定方法的影响。结果表明该方法对人工污染样品的鉴定仍然具有较好的效果,但扩增曲线有波动情况。在进行灵敏度测试的实验中,发现用洗脱缓冲液稀释菌液比用生理盐水稀释的效果好,因此认为该方法受缓冲液环境的影响较大,而相比之下普通实时荧光定量 PCR 方法受缓冲液影响不大,对于实际样品的直接扩增更具有鲁棒性。除了环介导等温扩增外,滚环扩增(roll cycle amplification, RCA)、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)是常用的等温扩增方法^[13],这些方法对于直接对食物样品进行扩增可能比环介导等温扩增具有更好的鲁棒性。此外,CRISPR-Cas 系统被广泛报道应用于致病菌的检测上,能进一步提高检测的灵敏度^[14],目前已经有报道将 RPA 和 CRISPR-Cas12a 应用在食品中 *B. gladioli* 的检测上^[15]。为了能够实现对食物样品的直接检测,正开发把 CRISPR-Cas 系统结合等温扩增技术检测 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 的新方法。

总的来说,本研究开发的环介导等温扩增荧光鉴定方法对于鉴定食物中分离的 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 有着专一性强、检测效率高的特点,对于食物样品的检测也具有较好的效果,且该方法可以借助便携式荧光光谱仪、紫外分析仪等便携设备即能完成可视化判断。在设备条件和

专业人员不充足的地方,能及时发现食物中存在 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 的风险,避免中毒事件的发生,从而保障国民的食品安全。

4 结论

本研究通过生物信息学分析,确定了 *bon* 基因簇中的 *bonA* 为 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 的检测靶序列,建立了一个环介导等温扩增荧光鉴定方法,该方法特异性强,准确性高,可用于食品中 *B. gladioli* 的风险监测,对于开发其他食品中致病菌的环介导等温扩增检测技术具有重要参考意义。

参考文献

- [1] 郭颖希,梅灿辉,阮征,李汴生. 椰毒假单胞菌酵米面亚种及其毒素的最新研究进展[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(1): 196-202.
GUO YX, MEI CH, RUAN Z, LI BS. The latest research progress of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* and its toxin[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2022, 37(1): 196-202 (in Chinese).
- [2] SHI RJ, LONG CY, DAI YD, HUANG Q, GAO YZ, ZHANG NP, CHEN YC, LIU SP, MA QQ, QUAN L, ZHANG YH, LUO B. Bongkrekeic acid poisoning: severe liver function damage combined with multiple organ failure caused by eating spoiled food[J]. Legal Medicine (Tokyo, Japan), 2019, 41: 101622.
- [3] ANWAR M, KASPER A, STECK AR, SCHIER JG. Bongkrekeic acid—a review of a lesser-known mitochondrial toxin[J]. Journal of Medical Toxicology, 2017, 13(2): 173-179.
- [4] 李发俊,黄煜强,雷柳冰,马冉,段雪娟,崔碧玲. 食品中椰毒假单胞菌的污染原因及其检测方法[J]. 广东化工, 2021, 48(6): 145-146.
LI FJ, HUANG YQ, LEI LB, MA R, DUAN XJ, CUI BL. The contamination and detection methods of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. in food[J]. Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(6): 145-146 (in Chinese).
- [5] 国家卫生健康委员会,国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌: GB 4789.29—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
National Health Commission of the PRC, State Administration for Market Regulation. National food safety standard-food microbiological examination-*Burkholderia gladioli*: GB 4789.29—2020[S]. Beijing: Standards Press of China, 2020 (in Chinese).
- [6] 王晓雯,陈晶,陈国培,黄建飞,王远洋,李碧芳,杨国武. 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.
WANG XW, CHEN J, CHEN GP, HUANG JF, WANG YY, LI BF, YANG GW. Developing a novel method detecting *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* by real-time fluorescent PCR[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(1): 330-335 (in Chinese).
- [7] PENG ZX, DOTTORINI T, HU Y, LI MH, YAN SF, FANNING S, BAKER M, XU J, LI FQ. Comparative genomic analysis of the foodborne pathogen *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* harboring a bongkrekeic acid biosynthesis gene cluster[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 628538.
- [8] MORI Y, NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2020, 26(1): 13-17.
- [9] MORI Y, KANDA H, NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2013, 19(3): 404-411.
- [10] 谢佳芮,寇美玲,苗海生. 环介导等温扩增技术的最新研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(2): 119-125.
XIE JR, KOU ML, MIAO HS. Latest progress in research on loop-mediated isothermal amplification[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(2): 119-125 (in Chinese).
- [11] SHEN HY, WEN JP, LIAO XM, LIN QJ, ZHANG JF, CHEN KF, WANG SJ, ZHANG JM. A sensitive, highly specific novel isothermal amplification method based on single-nucleotide polymorphism for the rapid

- detection of *Salmonella pullorum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 560791.
- [12] WATTAM AR, DAVIS JJ, ASSAF R, BOISVERT S, BRETTIN T, BUN C, CONRAD N, DIETRICH EM, DISZ T, GABBARD JL, GERDES S, HENRY CS, KENYON RW, MACHI D, MAO CH, NORDBERG EK, OLSEN GJ, MURPHY-OLSON DE, OLSON R, OVERBEEK R, PET AL. Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D535-D542.
- [13] XIA XH, YANG H, CAO JJ, ZHANG JQ, HE Q, DENG RJ. Isothermal nucleic acid amplification for food safety analysis[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2022, 153: 116641.
- [14] CHAKRABORTY J, CHAUDHARY AA, KHAN S-U-D, RUDAYNI HA, RAHAMAN SM, SARKAR H. CRISPR/Cas-based biosensor as a new age detection method for pathogenic bacteria[J]. *ACS Omega*, 2022, 7(44): 39562-39573.
- [15] ZHENG JL, LIU L, LI XM, XU ZL, GAI ZQ, ZHANG X, LEI HT, SHEN X. Rapid and simple detection of *Burkholderia gladioli* in food matrices using RPA-CRISPR/Cas12a method[J]. *Foods*, 2023, 12(9): 1760.