

- [2] 中华人民共和国卫生部. GB2762—2005 食品中污染物限量[S]. 北京:中国标准出版社,2005.
- [3] 刘世明. 洋葱对亚硝酸盐去除作用的实验研究[J]. 食品工业科技,2004,25(2):81-82.
- [4] 吴文泉,李炳焕,祁建敏. 洋葱去除蔬菜中亚硝酸盐的实验研究[J]. 微量元素与健康研究,2009,26(4):31-32.
- [5] 李炳焕,杨怡,郭佳. 大蒜对亚硝酸盐去除作用的实验研究[J]. 微量元素与健康研究,2007,24(5):27-28.
- [6] 王长祥,毕海燕. 萝卜对亚硝酸盐清除作用的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(2):443,466.
- [7] 王耀荣,吴强,冯翠萍. 蔬菜汁对亚硝酸盐的清除作用研究[J]. 现代农业科技,2010,21:374.
- [8] 王红霞,张稳娣. 樱桃汁去除亚硝酸盐的研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(5):1878,1891.
- [9] 黄敏,李静静,余萃,等. 几种食前处理对蔬菜中硝酸盐和亚硝酸盐的去除效果[J]. 食品科学,2011,32(09):82-86.
- [10] 张庆乐,王浩,李瑞,等. 食前处理方式对蔬菜中硝酸盐和亚硝酸盐含量的影响[J]. 中国食品卫生杂志,2008,20(03):267-269.
- [11] 刘文卿. 实验设计[M]. 北京:清华大学出版社,2005:69-104.
- [12] 中华人民共和国卫生部. GB 5009.33—2010 食品安全国家标准-食品中亚硝酸盐和硝酸盐的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [13] 国家质量技术监督局. GB T4882—2001 数据的统计处理 and 解释正态性检验[S]. 北京:中国标准出版社,2001.
- [14] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 4883—2008 数据的统计处理 and 解释正态样品离群值的判断和处理[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [15] 颜虹. 医学统计学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:133-139.
- [16] 李发美. 分析化学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:17-27.
- [17] 杨月欣,王光亚,潘兴昌. 中国食物成分表[M]. 北京:北京大学医学出版社,2009:128-129.
- [18] 王璋. 食品化学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999:149-156.

研究报告

非脱羧勒克菌 YT-1107 生理生化特性研究及 16S rRNA 序列分析

伍海燕¹, 李振军², 宋燕¹, 张萍¹, 孙振璐¹, 姜照¹, 金东², 韩文清¹

(1. 烟台市疾病预防控制中心, 山东 烟台 264003; 2. 中国疾病预防控制中心, 北京 100021)

摘要:目的 菌株 YT-1107 是一株从污染食物中分离得到的非脱羧勒克菌, 对其进行生理生化特性研究及 16S rRNA 序列分析确定其归属。方法 根据流行病学调查及临床表现, 选择疑似病原菌, 用 ATB 微生物自动鉴定系统对采集的样品进行病原菌分离与鉴定。对菌株的 16S rRNA 基因测序结果进行同源性分析, 采用 MEGA4.0 软件的 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树。结果 对该菌株生理生化特征的研究及 16S rRNA 序列分析表明, 该菌株是革兰阴性菌, 属于 *Enterobacter asburiae*。结论 通过 16S rRNA 基因序列的同源性比对, 系统进化树的构建, 初步认定菌株 YT-1107 与 *Enterobacter asburiae* LF7a 为同一物种。

关键词:非脱羧勒克菌; 鉴定; 16S rRNA; 序列分析; 食品安全

中图分类号:TS207.4;R155.5 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)06-0536-03

Physiological and biochemical characteristics of *Leclercia adecarboxylata*

YT-1107 and 16S rRNA sequencing

Wu Haiyan, Li Zhenjun, Song Yan, Zhang Ping, Sun Zhenlu, Jiang Zhao, Jin Dong, Han Wenqing
(Yantai Center for Disease Control and Prevention, Shandong Yantai 264003, China)

Abstract: Objective YT-1107 is a *Leclercia adecarboxylata* strain isolated from contaminated food. The study of physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequencing was aimed to identify its species. **Methods** Suspected pathogens were selected according to epidemiological survey and clinical manifestations, and then samples were isolated and identified by ATB Biolog microbial identification system. 16S rRNA gene sequencing results were analyzed for homology and MEGA4.0 Neighbor-Joining method was used to construct phylogenetic tree. **Results** Based on the physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequencing, the strains were gram negative bacteria,

收稿日期:2012-07-07

作者简介:伍海燕 女 副主任技师 研究方向为食品微生物检验

通信作者:韩文清 女 主任技师 研究方向为分子病原微生物 E-mail:ythwq405@yahoo.com.cn

belonging to *Enterobacter asburiae*. Considering the evidence of homology comparison of 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic tree construction, this strain was preliminary identified as the same species as *Enterobacter asburiae* LF7a.

Conclusion Strain YT-1107 and *Enterobacter asburiae* LF7a are the same species.

Key words: *Leclercia adecarboxylata*; determination; 16S rRNA; sequencing; food safety

非脱羧勒克菌是勒克菌属中唯一的菌种,是一种罕见的肠杆菌科细菌,并且在一定条件下可以成为对人体具有致病力的病原菌。该菌与人类腹泻关系密切,应该引起足够的重视。

于2011年8月从腹泻病人的179份剩余食物(鱼香茄子)中分离到1株非脱羧勒克菌,通过对该菌株的生理生化特征的研究及16S rRNA序列分析初步确定了其归属。

1 材料与方法

1.1 试验材料

送检179份腹泻病人剩余食物样本,其中包括面食(馒头、油饼等)、炒菜(鱼香茄子、西红柿炒蛋、豆芽炒肉等)。培养基及主要试剂:HE平板、TCBS平板、哥伦比亚血平板,缓冲蛋白胨水(BPW)、GN增菌液、7.5%氯化钠肉汤、3%氯化钠碱性蛋白胨水,均来自北京陆桥。Taq DNA聚合酶、dNTPsDNA、Marker、pmD18-T载体均购自Takara公司;全血基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒均购于天根公司;DH5 α 购自大连宝生物公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的分离鉴定

细菌的分离按常规方法进行^[1]。将18~24 h增菌后的培养物划线分别接种于选择性平板,挑取可疑菌落进行传代纯培养,分纯的细菌用法国梅里埃ATB微生物自动鉴定系统进行鉴定,鉴定过程包括:革兰染色,取18~24 h菌龄的新鲜菌落用0.85% NaCl制备浊度相当于0.5麦氏单位的菌悬液,用ATB电子加样枪在鉴定试条的每个试验杯中定量加入菌悬液,(36 $\pm$ 2)℃需氧培养24 h,结果由该仪器电脑自动分析、报告。

1.2.2 引物设计

根据GenBank登录的原核生物16S rRNA基因设计通用引物,上游引物为27F: 5'-gWATTACCGcgCKgCTg-3;下游引物为519R: 5'-gWATTACCGcgCKgCTg-3。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,预计扩增片段长度为500 bp左右。

1.2.3 全基因组提取

刮取经纯培养的非脱羧勒克菌菌落,严格按试剂盒说明书进行DNA提取。

1.2.4 16S rRNA基因的PCR扩增

通过设计合成的原核生物16S rRNA基因,设

计通用引物对所提取的全基因组DNA进行PCR扩增。PCR反应体系总体积为50 μ l,其中Mix Buffer 25 μ l,27F 2 μ l,519R 2 μ l,ddH₂O 16 μ l,DNA 5 μ l。程序PCR如下:94℃变性5 min,接着按以下程序循环30次:94℃变性30 s,52℃复性30 s,72℃延伸1 min,最后72℃延伸10 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

1.2.5 T载体克隆及蓝白斑筛选

pMD-18T载体的两端是碱基T,而PCR产物的两端通常含有1个A,所以T载体自身不能够形成环形的质粒,只有PCR产物或者外源片段插入才能够形成环状的质粒,进行自主复制,并在含有氨苄青霉素的IPTG和X-Gal的LB平板上生长。因此进行16S rRNA基因克隆,克隆程序依照T载体的使用说明;连接、转化产物涂布于准备好的含有IPTG和X-Gal的氨苄青霉素平板上进行筛选,挑取白色菌落送测序。

2 结果与分析

2.1 分离及生化鉴定结果

在HE平板上的典型菌落较小,圆形、光滑、凸起、透明、无色。挑起HE平板上的可疑菌落接种TSI斜面18~24 h培养,底层变黄无气体,斜面变红。经革兰染色和镜检,菌落呈G-,短小无芽孢杆菌。

鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶均为阴性,脲酶阴性,葡萄糖阳性,蔗糖阴性,L-阿拉伯糖阳性,D-阿拉伯糖阴性,麦芽糖、海藻糖、鼠李糖均为阳性,结合其他生化结果报告为99.6% *Enterobacter asburiae*。

2.2 16S rRNA序列分析

采用BLAST软件将测序YT-1107菌株16S rRNA序列与GenBank数据库中相关菌株的16S rRNA序列进行同源性比较,结果与*Enterobacter asburiae* LF7a的同源性达99.8%。按照Fry等^[2]和Clarridge^[3]的建议,当16S rRNA基因同源性在95%以上时,可认定为同一个属,当基因同源性在99%以上时,可认定为同一个种。

2.3 系统进化树构建

采用MEGA4.0软件的Neighbor- Joining方法构建系统发育树,除去50%以下可信度,由图1可知YT-1107菌与*Enterobacter asburiae* LF7a的同源性最高。而MEGA4.0软件做系统发育树时会去掉某些序

列两端的片段,使参与排序比对的片段长度相同。把16S rRNA 作为鉴定依据的是其可变区,因此序列两

端保守区的一些小片段不会影响比对结果,所以用MEGA4.0 软件做的系统发育树是可信的。

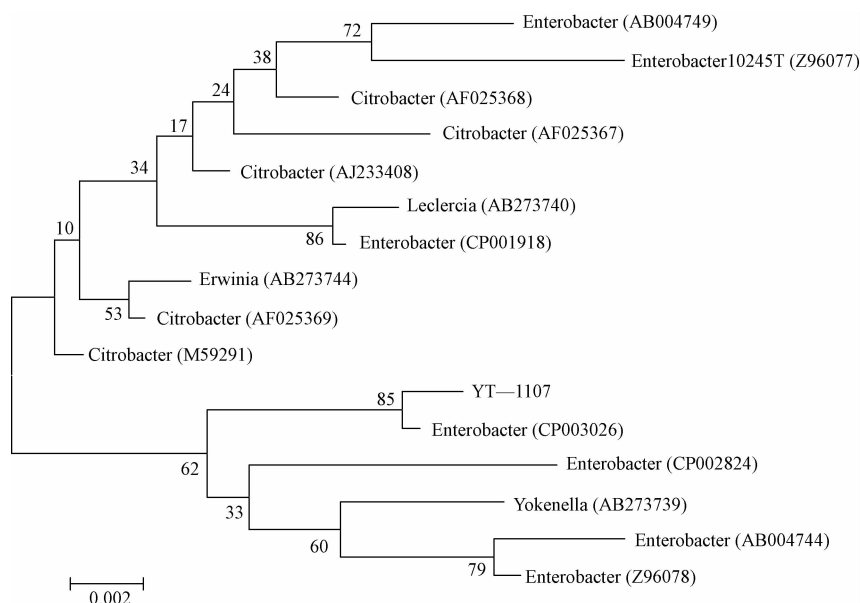


图1 YT菌株基于16S rDNA序列的系统进化树

Figure 1 YT strains based on 16S rDNA sequence phylogenetic tree

2.4 菌株的初步鉴定

对菌株的16S rRNA 基因测序结果进行同源性分析,采用MEGA4.0 软件的Neighbor- Joining 方法构建系统发育树,根据各项结果,初步鉴定YT-1107菌株属于肠杆菌属(Enterobacter),与菌株Enterobacter asburiae LF7a 为同一物种。

3 讨论

非脱羧勒克菌是属于勒克菌属中唯一的菌种,过去在临床上很少引起注意,近年来,该菌在临床上致病的报道增多^[4-7],曾报道从腹泻病人粪便和痰液中检出,对小白鼠有一定致病力。说明该菌在多种因素影响下也可成为对人体具有毒力的病原菌,导致腹泻和感染。由于与人类腹泻关系密切,逐渐引起人们的关注,但其临床意义尚不确定。

本次分离的该菌,其形态、生化特征与已有报道基本符合,故可初步定为非脱羧勒克菌。对于非脱羧勒克菌,国内报道比较少见,从腹泻病人剩余食物中分离出该菌,说明该菌对食品的污染不容忽视^[8-9],不仅要在临床诊断治疗方面引起足够重视,还要在食品安全日常监督方面加强管理力度。本次分离鉴定对进一步研究非脱羧勒克菌和预防食物中毒等方面具有重要意义。

参考文献

- [1] 唐珊熙. 微生物学及微生物学检验[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:175-176.
- [2] FRY N K, WARWICK S, SAUNDERS N A, et al. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family legionellaceae[J]. J Gen Microbiol, 1991, 137(5): 1215-1222.
- [3] CLARRIDGE J E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious disease[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2004, 17(4): 840-862.
- [4] 王迁, 马金群. 从血液标本中分离到1株非脱羧勒克菌[J]. 中华医院感染学志, 2008, 18(4): 578.
- [5] 陈太基, 封幼玲, 王为云, 等. 一株非脱羧勒克氏菌的分离鉴定报告[J]. 中国卫生检验杂志, 1997, 7(2): 120.
- [6] de-Baere T, WAUTERS G, HUYLENBROECK A, et al. Isolations of *Leclercia adecarboxylata* from a patient with a chronically inflamed gallbladder and from a patient with sepsis without focus[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(4): 1674-1675.
- [7] HESS B, BURCHFIT A, HUNTINGTON M K. *Leclercia adecarboxylata* in an immunocompetent patient[J]. J Medi Microbio, 2008, 57: 896-898.
- [8] 陈伟峰, 洪舒音, 赵秀玲. 速冻南瓜泥中检出罕见的非脱羧勒克菌[J]. 食品科技, 2010, 35(12): 311-313.
- [9] 杜强, 钱红. 从真空包装食品中检出罕见的非脱羧勒克菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(4): 502-503.