

5 种致泻大肠埃希氏菌实时荧光定量 PCR 快速检测技术

Study on the rapid detection of five strains of diarrheagenic *Escherichia coli* by real-time fluorescence quantitative PCR

王芳妹^{1,2,3} 钟文涛¹ 王淑好¹ 卢琳¹ 韩奉玲¹

WANG Fang-mei^{1,2,3} ZHONG Wen-tao¹ WANG Shu-hao¹ LU Lin¹ HAN Fen-ling¹

(1. 湖南省产商品质量监督检验研究院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410081; 3. 湖南师范大学蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081)

(1. Hunan Province Produced Commodity Quality Supervision and Inspection Institute, Changsha, Hunan 410007, China; 2. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410081, China; 3. Key Laboratory of Protein Chemistry and Development Biology of State Education Ministry, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410081, China)

摘要:将 5 种致泻大肠埃希氏菌的毒力基因保守序列进行设计并合成了引物和探针, 建立的多重实时荧光 PCR 4 种试剂盒可以同时检测 5 种致泻大肠埃希氏菌。结果表明: 4 种试剂盒的 12 对毒力基因通过 5 种致泻大肠埃希氏菌的标准储备菌株均得到验证; 并且 12 对毒力基因只对对应的致泻大肠埃希氏菌特异性起作用, 对常见的食源性致病菌都无扩增曲线; *escV*、*bfpB*、*stx₁*、*ipaH* 和 *invE* 基因的检出限是 10 CFU/mL, *aggR* 基因的检出限是 10² CFU/mL, *astA* 和 *pic* 基因的检出限是 10³ CFU/mL, 而 *stx_{2A}*、*ipaH* 和 *stIb* 基因菌液浓度 < 10 CFU/mL 时, 均可观察到明显的“S”型扩增曲线, 且线形较好; 并且对抽查和委托检验的肉类、奶和动物腹泻物以及人工污染样品等 40 份样品进行检测, 共检出 11 份阳性样本, 与 GB 4789.6—2016 标准检测结果相一致, 表明建立的 4 种试剂盒方法具有良好的实用性。

关键词:致泻大肠埃希氏菌; 实时荧光定量 PCR; 毒力基因

Abstract: Primers, and probes were designed for the conserved sequences of five virulence genes involved in *Escherichia coli* diarrhea mentioned in the new standard of GB 4789.6—2016 national food safety standard. Four kits of multiple real-time fluo-

rescence PCR were established to detect five diarrhea-causing *E. coli* simultaneously. The results showed that 12 pairs of virulence genes of the four kits were verified by the standard reserve strains of the five diarrhea-causing *E. coli* strains. In addition, these 12 pairs of virulence genes only play a role in the specific role of corresponding diarrhea-causing *E. coli*, and have no amplification curve for common foodborne pathogens. The detection limit of *escV*, *bfpB*, *stx₁*, *ipaH* and *invE* genes is 10 CFU/mL, and that of *aggR* gene is 10² CFU/mL. The detection limit of *astA* and *Pic* genes was 10³ CFU/mL. When the concentration of *stx_{2A}*, *ipaH* and *stIb* genes was less than 10 CFU/mL, a significant “S” type amplification curve could be observed, and the line shape was better. In addition, 40 samples including meat, milk, animal diarrhea, and some artificial contamination samples were tested, and a total of 11 positive samples were found. Consistent with the test results of the new standard 4789.6—2016, The results showed that the four kit methods were simple, specific, sensitive and practical.

Keywords: diarrhea-causing *E. coli*; real-time fluorescence quantitative PCR; virulence genes

致泻大肠埃希氏菌是一类能引起人体腹泻的食源性病原微生物。由于致泻性大肠埃希氏菌相同的基因片段内保守区很相似, 检测单一基因片段特异性并不高, 难以确认或排除致泻性大肠埃希氏菌感染, 很容易造成漏检^[1-3]。因而 5 种致泻性大肠埃希氏菌的检测方法的灵敏度和准确性对预防和控制由其引起的腹泻有着十分重要的作用。

在新标准(GB 4789.6—2016)发布之前采用的检测方

基金项目: 湖南省质量技术监督局科技计划项目(编号: 2018KJJH08)

作者简介: 王芳妹(1985—), 女, 湖南省产商品质量监督检验研究院工程师, 硕士。E-mail: wfmmeimei@163.com

收稿日期: 2019-01-12

法主要是从分离培养、生化试验鉴定、血清试验和肠毒素试验进行鉴定^[4-6],该传统检测方法简单易行、费用低,但周期长,所用的试剂和血清要求严格^[7];对于那些致病菌含量很低且生化特征与普通大肠埃希氏菌相似的病原体,很难挑出真正的目的菌,也可能因为杂菌增长速度过快不易检出目的菌。2016年发布的GB 4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》中明确要求,在常规微生物检测的基础上必须要根据分子生物学中的PCR技术进行确认试验,此方法很好地解决了传统方法中检测特异性不高,耗时较长、操作较繁琐等问题,但该方法对人员专业技术要求较高,试验试剂溴化乙啶对检验人员的身体健康危害十分严重,并且在开盖操作时会增加气溶胶污染的可能性,造成假阳性的产生,难以根除^[8-10]。实时荧光定量PCR技术中的TaqMan法对目标序列具有较高的特异性,结果重复性也比较好的,引物和探针的设计相对比较简单的,因此该方法已广泛应用于分子生物学研究中。PCR技术的应用十分广泛,已从扩增单一基因片段的PCR,发展到同时扩增几个基因的多重荧光定量PCR^[11-16]。

目前,研究致泻性大肠埃希氏菌与志贺菌等的区分或检测某几类大肠埃希氏菌的类似方法很多,如朱惠芳等^[17]利用微生物法鉴定1株与志贺氏菌生化相似、抗原相同的大肠埃希氏,所用微生物法耗时耗力,人为因素干扰比较大,未根据分子方法进行确认试验,也未覆盖其他大肠埃希氏菌的检测;Youmans等^[18]利用普通PCR对产肠毒素大肠杆菌进行检测,Octaviana等^[19]和赵爱兰等^[20]使用多重PCR方法鉴定了5类致泻性大肠埃希菌,所使用的均为普通PCR,其扩增结果需配制扩增体系繁多,并进行凝胶电泳,较为费时费力、操作较繁琐、引物特异性不高;张红宇等^[21]利用Taqman多重实时PCR技术即可在同一PCR反应管内同时检出3种病原微生物,有效地解决了单基因PCR体系1次只可检测1个基因型的低效缺点,但未覆盖其他大肠埃希氏菌的检测。本研究拟在以往研究的基础上全面覆盖检测这5种致泻大肠埃希氏菌,并且采用TaqMan探针技术结合了商品化的多重普通PCR技术的方法共同验证本研究的可行性,并对4种试剂盒进行特异性、灵敏度、准确度的验证,旨在为准确高效的全面筛查5种致泻大肠埃希氏菌提供参考,提高检验质量水平。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器设备

Chelex-100 提取液:宝生物工程(大连)有限公司;

DNA marker 和预混合 Taq PCR Master Mix(2×):宝生物工程(大连)有限公司;

脑心浸液培养基、平板计数琼脂、肠道增菌肉汤等:

北京陆桥技术股份有限公司;

引物和探针:生工生物工程(上海)股份有限公司;

5种致泻大肠埃希氏菌多重普通PCR检测试剂盒:

北京卓诚惠生生物公司;

猪肉和牛奶:市售;

冷冻离心机:Fresco 17型,美国赛默飞世尔科技公司;

漩涡混匀器:MX-S型,美国赛洛捷克公司;

实时荧光定量PCR仪:7500Fast型,美国ABI公司;

凝胶成像系统:ChemiDoc XRS+型,美国伯乐公司;

试验所用标准储备菌株:美国菌株保存中心(ATCC)或中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)菌种库(见表1)。

表1 试验所用菌株

Table 1 Strains involved in the experiment

菌株名称	菌种库编号	携带毒力基因
EPEC	CICC24189	<i>escV</i> 或 <i>eae</i> 、 <i>bfpB</i>
STEC	CICC10670	<i>escV</i> 或 <i>eae</i> 、 <i>stx₁</i> 、 <i>stx₂A</i>
EHEC	CICC24187	<i>escV</i> 或 <i>eae</i> 、 <i>stx₁</i> 、 <i>stx₂A</i>
ETEC	CICC10667	<i>lt</i> 、 <i>stIa</i> 、 <i>stIb</i>
EIEC	CICC24188	<i>invE</i> 或 <i>ipaH</i>
EAEC	CICC24186	<i>astA</i> 、 <i>aggR</i> 、 <i>pic</i>
大肠埃希氏 O157:H7	FSCC149015	<i>escV</i>
沙门氏菌	ATCC14028	/
副溶血性弧菌	ATCC17802	/
单增李斯特氏菌	ATCC19115	/
阪崎肠杆菌	ATCC25944	/

1.2 引物和探针的设计与合成

肠道致病性大肠埃希氏菌(EPEC)的毒力基因为*escV/eae*、*bfpB*,产志贺毒素大肠杆菌(STEC)和肠道出血性大肠埃希氏菌(EHEC)的毒力基因为*escV/eae*、*stx₁*、*stx₂A*,产肠毒素大肠埃希氏菌(ETEC)的毒力基因为*lt*、*stIa*、*stIb*,肠道侵袭性大肠埃希氏菌(EIEC)的毒力基因为*invE/ipaH*,肠道聚集性大肠埃希氏菌(EAEC)的毒力基因为*astA*、*aggR*、*pic*(见表1);首先在NCBI中查找出*escV*、*bfpB*、*stx₁*、*stx₂A*、*lt*、*stIa*、*stIb*、*invE*、*astA*、*aggR*和*pic*的多个genebank序列号的基因序列,通过Genbank软件和BLAST软件进行序列同源性分析,确定各毒力基因的保守区域,采用Primer Premier 5.0和DNASTar软件在各自保守区域中设计引物与探针(见表2),将设计好的引物和探针委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行人工合成。

1.3 模板制备

1.3.1 菌种活化和计数 将5种致泻大肠埃希氏菌和食品中常见致病菌的标准储备菌株在BHI培养基中培养

表 2 5 种致泻大肠埃希氏毒力基因的引物和探针序列[†]

Table 2 Primers and probe sequences of virulence genes in the five strains of diarrheagenic escherichia coli

5 种致泻大肠埃希氏	毒力基因	引物和探针序列
EPEC 与 STEC/EHEC (1 号)	<i>escV</i>	F:CCACAATCCTGTTGATTACGACGTT R:TACCGAAGGAGTAAATAATGTCACCC T:FAM-TGCGCCTGTCGCTCAGTGTTAGTACAAC-BHQ ₁
	<i>bfpB</i>	F:TGGGCTCTGTTTCAACCTCAA R:CGTTCATTCAGATATCCTGTAA T:CY5-CGGCAACAAGCGGCACCCC-BHQ ₂
	<i>stx₁</i>	F:TCGCCATTCGTTGACTACTTCTT R:AACATCGCTCTTGCCACAGA T:ROX-CGCATAGCGGAACCTCACTGACGC-BHQ ₂
	<i>stx_{2A}</i>	F:GTGTCGCAGCGCTGGAA R:AACGCCAGATATGATGAAACCA T:JOE-TTCCGGAATGCAAATCAGTCGTCCTC-BHQ ₁
EIEC(2 号)	<i>ipaH</i>	F:GATTAACCTCTTCGCCGACTAC R:GGAACCATGCTGTACCGG T:FAM-CGGCCCGCAGATTTACTTCTCCATGAGTG-BHQ ₁
	<i>invE</i>	F:CTTTCAGGCAGCAAGCGTTCCACAGGA R:CGCGCAAAGTCACTCTGT T:JOE-AGAGATTCATTAGCCTTTTCAAGTCCTT-BHQ ₁
ETEC(3 号)	<i>lt</i>	F:AGTGGAAACATATCCGTCATCATATCT R:GGCATAATGAGTACTTCGATAGAGGAA T:FAM-CAAAGCCGGTTTGTGTTCCTCTCGC-BHQ ₁
	<i>stIa</i>	F:CTCCCTCTTTTAGCCAGAAAAG R:GCTCTGTCACTAGAAATTTAATAACATGG T:JOE-AGCACAGGCAGGATTACAACAAAGTTCACAGCAG-BHQ ₁
	<i>stIb</i>	F:TGGAGGCTGAAGAACGACTAAGA R:CCTTGCCCTCCGCTAACACT T:ROX-TGAAAAGTCTCCACACACCCGGTGA-BHQ ₂
EAEC(4 号)	<i>astA</i>	F:CCGGATGCCATCAACACA R:GCACCATATGCACGATGCA T:FAM-ATATCCGAAGGCCCGCATCCAGTT-BHQ ₁
	<i>aggR</i>	F:CCATTTATCGCAATCAGATTAAGCAG R:CGGACAACGCAAGCATCTAC T:JOE-GCGATACATTAAGACGCCTAAAGGATGCCCTGATGA-BHQ ₁
	<i>pic</i>	F:TACCCGTGGAGCACATGCT R:CGTGTCAAGCCGATGGTAA T:ROX-TCATGCCTCTGCGGCG TCAACA-BHQ ₂

[†] F 为上游引物,R 为下游引物,T 为探针,FAM,ROX,JOE 和 CY5 为荧光基团,BHQ₁、BHQ₂ 和 BHQ₃ 为淬灭基团。

(见表 1),取 1 mL 培养 24 h 后的菌液提取核酸,另取 1 mL 菌液逐级稀释至 10⁻⁹,选择 4 个稀释度(10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸和 10⁻⁹)分别吸取 1 mL 在 PCA 平板中 36 °C 培养生长 2 d 后计数。

1.3.2 核酸提取 取 1 mL 已活化的菌液至 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 3 min。弃上清,加入 5% 的 Chelex-100 提取液 30 μL,震荡混匀,煮沸 10 min 后立刻放入冰上,12 000 r/min 离心 3 min 后取上清扩增待用或放入 -20 °C 冰箱备用。

1.4 实时荧光 PCR 扩增体系建立

根据致泻大肠埃希氏菌携带的毒力基因及其探针的荧光报告基团,设计 4 组反应体系对 5 种致泻大肠杆菌进行实时荧光 PCR 扩增和分型,其中 1 号反应体系检测 EPEC、STEC、EHEC,扩增 *escV*、*bfpB*、*stx₁* 和 *stx_{2A}* 基因;2 号反应体系检测 EIEC,扩增 *ipaH* 和 *invE* 基因,3 号反应体系检测 ETEC,检测 *lt*、*stIa* 和 *stIb* 基因,4 号

反应体系检测 *astA*、*aggR* 和 *pic* 基因。

实时荧光 PCR 反应体系(25 μL):Taq PCR Master Mix(2×) 12.5 μL、上下游引物(10⁻⁵ mol)各 1 μL、菌株 DNA 模板 2 μL、ddH₂O 8.5 μL;实时荧光 PCR 扩增条件为:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 34 s,40 个循环。

1.5 特异性分析

取 1 mL 已活化的沙门氏菌、副溶血性弧菌、单增李斯特氏菌、阪崎肠杆菌菌液,按 1.3.2 中的方法进行提取核酸。使用本研究建立的 4 组实时荧光 PCR 扩增体系对此 4 种常见的食源性致病菌的基因组 DNA 进行检测,Ct 值报告为“Undet”或无明显的“S”型扩增曲线,判定为阴性。

1.6 灵敏度分析

将已计数的 5 种致泻大肠埃希氏菌进行 10 倍梯度稀释,取 1 mL 稀释液,按 1.3.2 中的方法进行提取核酸,

使用本研究建立的4组实时荧光PCR扩增体系对各梯度稀释液的核酸进行检测,当检测体系的 C_t 值 <35.0 时,有荧光信号检出,并出现典型的“S”扩增曲线,判定为阳性;当 $35.0 \leq C_t$ 值 ≤ 40.0 时,且有典型的“S”扩增曲线时,则需重复试验。再次扩增后检测体系的 C_t 值仍 ≤ 35.0 ,判定为阳性。当再次扩增后,检测体系 C_t 值 >35.0 ,或无典型的扩增曲线,则判定为阴性。

1.7 与商品化PCR试剂盒对比分析

将本研究中检测为阳性的5种致泻大肠埃希氏菌使用商品化PCR试剂盒进行同步对比,分析2种方法的检测结果一致性。

1.8 大量样本验证

将本单位抽查和委托本单位检验的40例肉类、奶产品、动物腹泻物和人工污染样品,分别使用本研究建立的4组实时荧光PCR扩增体系和商品化PCR试剂盒进行同步检测,分析2种方法的检测结果,统计阳性符合率和阴性符合率。

1.9 数据分析

测得的试验数据以 $(X \pm S)$ 来表示,以Excel进行分析。

2 结果与分析

2.1 检测5种致泻大肠埃希氏菌标准储备菌株的结果

设计大肠埃希氏的内参基因 $uidA$ 的引物探针,上游引物为ACTATGCCGGGATCCATCGC,下游引物为CAACAGACGCGTGGTTACAGT,探针为ROX-GTA-ATGCTCTACACCACGCCGAACACCT-BHQ₂,按1.4配制反应体系,ABI 7500 Fast仪器中检测,结果显示(图1),6种致泻大肠埃希氏的标准储备菌株的内参 $uidA$ 基因均有明显的“S”型扩增曲线,并且 C_t 值基本一致,均位于 $15 \sim 35$ ^[22],说明提取的5种致泻大肠埃希氏核酸质量良好,可保障后续试验的有效性。

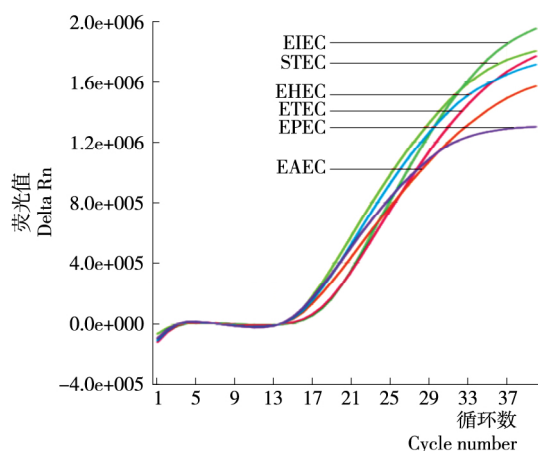


图1 大肠埃希氏菌内参基因 $uidA$ 的扩增图谱

Figure 1 Amplification of $uidA$ gene in *Escherichia coli*

2.2 检测5种致泻大肠埃希氏标准储备菌株毒力基因的结果

将人工合成的12对毒力基因的引物和探针组合至4种反应体系中,对5种大肠埃希氏菌的核酸进行检测,检测结果显示(图2):EPEC与EHEC的4种毒力基因 stx_1 、 stx_2A 、 $bfpB$ 和 $escV$;EAEC的3种毒力基因 $astA$ 、 $aggR$ 和 pic ;EIEC的2种毒力基因 $invE$ 和 $ipaH$;ETEC的3种毒力基因 lt 、 $stIa$ 和 $stIb$ 均有明显的“S”型扩增曲线,且 C_t 值均位于 $15 \sim 35$,说明4个反应体系对5种致泻大肠埃希氏菌核酸检测效果非常好。

2.3 检测4种试剂盒的特异性试验

使用本研究建立的检测方法对常见食源性致病菌:沙门氏菌、副溶血性弧菌、单增李斯特氏菌和阪崎肠杆菌的核酸进行检测,结果显示(表3),沙门氏菌、副溶血性弧菌、单增李斯特氏菌和阪崎肠杆菌中均检测为阴性,说明使用本研究建立的5种致泻大肠埃希氏菌的检测方法特异性强。大肠杆菌O157:H7血清型是EHEC一种代表菌株,其携带EHEC的毒力基因 $escV$,表3显示 $escV$ 基因的检测结果为阳性,进一步验证了本方法的有效性和特异性。

2.4 检测4种试剂盒的灵敏度试验

对不同浓度的5种致泻大肠杆菌进行检测,结果见图3和表4,肠道致病大肠埃希氏菌(EPEC)的检测范围为 $10^6 \sim 10^2$ CFU/mL,检测限 10^2 CFU/mL;产志贺毒素大肠埃希氏菌(STEC)和肠道出血性大肠埃希氏菌(EHEC)的检测范围为 $10^6 \sim 10^2$ CFU/mL,检测限 10^2 CFU/mL;产肠毒素大肠埃希氏菌(EIEC)的检测范围为 $10^6 \sim 10^2$ CFU/mL,检测限 10^2 CFU/mL;肠道致病大肠埃希氏菌(ETEC)的检测范围为 $10^6 \sim 10^2$ CFU/mL,检测限 10^2 CFU/mL;肠道致病大肠埃希氏菌(EAEC)的检测 $10^8 \sim 10^4$ CFU/mL,检测限 10^4 CFU/mL,表明对5种致泻大肠埃希氏菌检测的灵敏度均较高。

将不同浓度的菌液进行扩增,4种试剂盒的扩增曲线见图3,当菌液浓度 <10 CFU/mL时, $escV$ 、 $bfpB$ 、 stx_1 、 $ipaH$ 和 $invE$ 基因均无扩增曲线;当菌液浓度 $<10^2$ CFU/mL时, $aggR$ 基因无扩增曲线;当菌液浓度 $<10^3$ CFU/mL时, $astA$ 和 pic 也无扩增曲线,表示此时的菌液浓度已超出了方法的检出限。因此, $escV$ 、 $bfpB$ 、 stx_1 、 $ipaH$ 和 $invE$ 基因的检出限是 10 CFU/mL; $aggR$ 基因的检出限是 10^2 CFU/mL; $astA$ 和 pic 基因的检出限是 10^3 CFU/mL;而 stx_2A 、 $ipaH$ 和 $stIb$ 基因,菌液浓度 $<10^2$ CFU/mL时还可观察到扩增曲线,且线形较好(见表4)。

2.5 4种试剂盒与普通PCR法的试剂盒比对试验

根据GB 4789.6—2016标准使用多重普通PCR检测

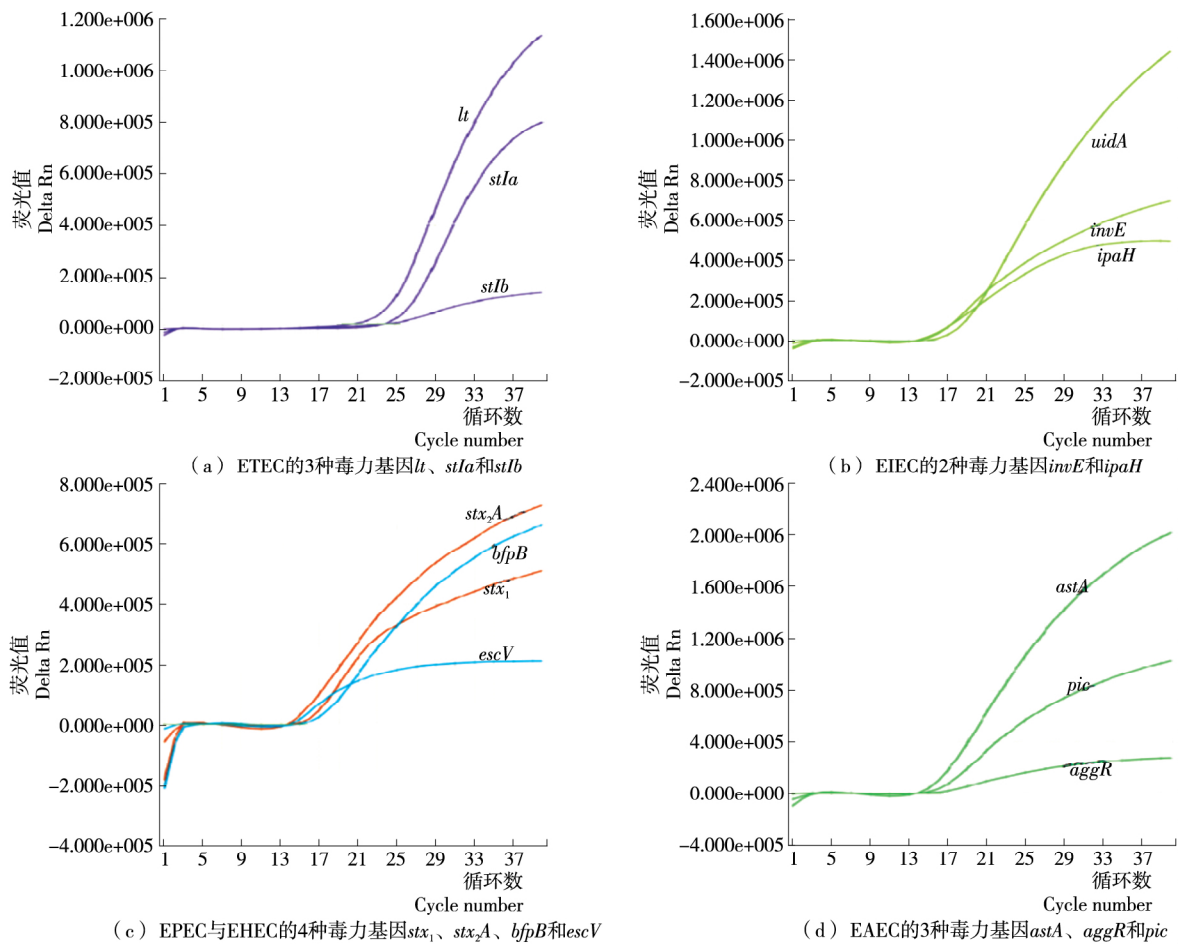


图 2 5 种致泻大肠埃希氏菌携带毒力基因的扩增图谱

Figure 2 Amplification of virulence genes in the five strains of diarrheagenic *Escherichia coli*

表 3 各标准储备菌株毒力基因检测结果[†]

Table 3 Amplify the results of each standard reserve strain

菌株名称	$escV$	$bfpB$	stx_1	stx_2A	$ipaH$	$invE$	lt	$stIa$	$stIb$	$astA$	$aggR$	pic
EPEC	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STEC	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EHEC	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EIEC	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
ETEC	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
EAEC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
大肠埃希氏 O157:H7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
沙门氏菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
副溶血性弧菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
单增李斯特氏菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阪崎肠杆菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

† “+”表示扩增出曲线;“-”表示没有扩增出曲线。

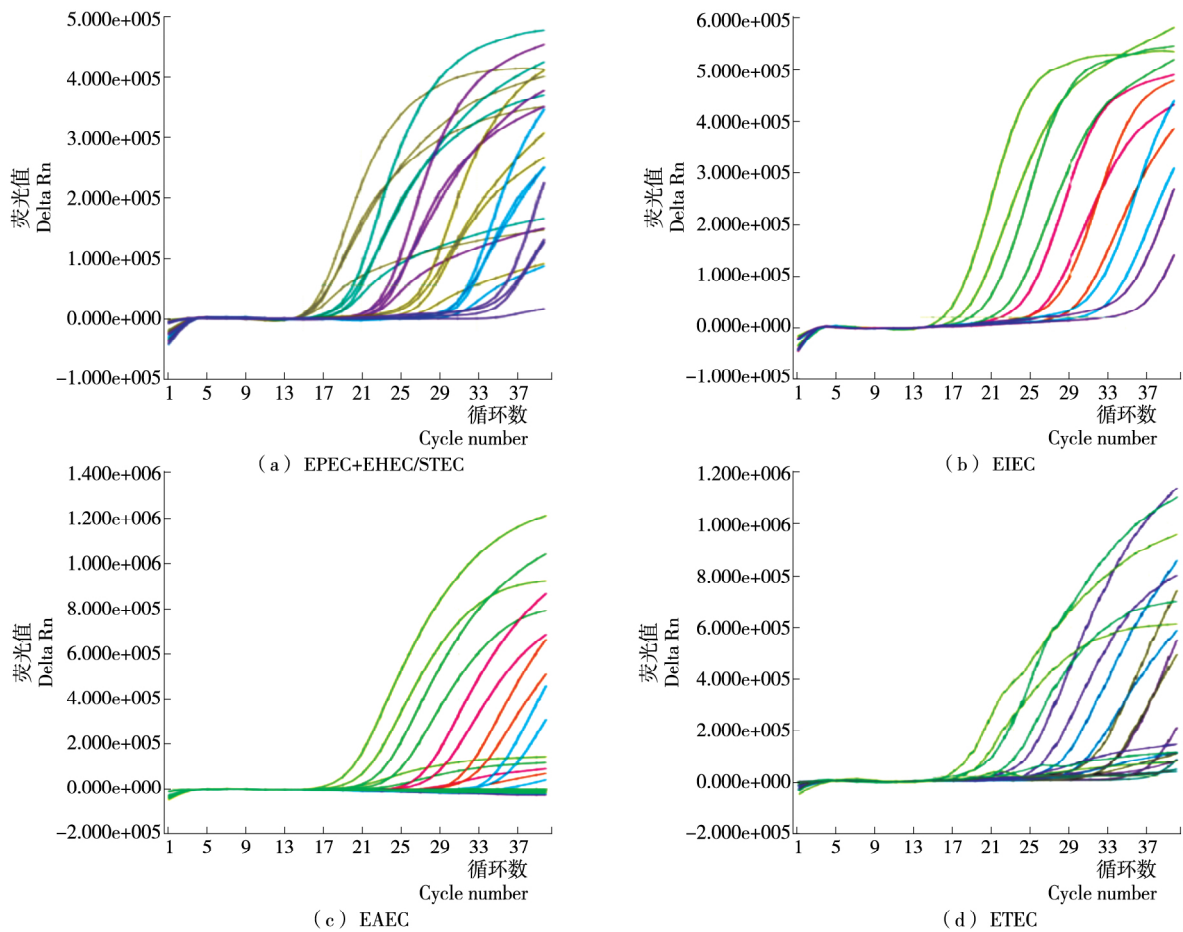


图3 4个试剂盒在不同菌液浓度下的扩增图谱

Figure 3 Four amplification kits were used to analyze the amplification spectra at different concentrations

表4 毒力基因在不同菌液浓度下的 Ct 值

Table 4 Ct values of virulence genes at different concentrations of bacterial fluid

浓度/(CFU · mL ⁻¹)	<i>escV</i>	<i>bfpB</i>	<i>stx₁</i>	<i>stx_{2A}</i>	<i>ipaH</i>	<i>invE</i>
10 ⁸	/	/	/	/	/	/
10 ⁷	/	/	18.5±0.44	18.1±0.17	/	/
10 ⁶	16.3±0.20	17.6±0.36	22.1±0.56	21.4±0.72	16.9±0.17	19.1±0.53
10 ⁵	19.1±0.46	20.4±0.70	25.6±0.96	24.9±0.53	20.2±0.10	22.3±0.44
10 ⁴	22.8±0.62	24.2±0.78	29.5±0.53	29.0±0.56	23.7±0.44	26.6±0.17
10 ³	26.6±0.30	29.5±0.53	32.4±0.62	30.3±0.26	26.7±0.46	29.7±0.72
10 ²	31.1±0.72	33.1±0.56	35.8±0.89	34.1±0.36	29.9±0.96	34.5±0.26
10	/	/	/	35.5±0.61	32.6±0.36	/
浓度/(CFU · mL ⁻¹)	<i>lt</i>	<i>stIa</i>	<i>stIb</i>	<i>astA</i>	<i>aggR</i>	<i>pic</i>
10 ⁸	/	/	/	16.4±0.10	19.4±0.17	17.7±0.17
10 ⁷	/	/	/	19.4±0.26	22.8±0.26	21.0±0.61
10 ⁶	18.7±0.35	16.8±0.87	16.6±0.26	24.5±0.66	24.0±0.56	25.2±0.26
10 ⁵	21.7±0.35	20.0±0.40	19.5±0.35	29.1±0.17	26.9±0.69	29.1±0.20
10 ⁴	25.0±0.26	23.6±0.53	23.2±0.26	32.6±0.17	28.1±0.50	32.3±0.17
10 ³	29.1±0.17	27.4±0.61	26.6±0.17	/	32.4±0.52	/
10 ²	32.1±0.35	31.5±0.36	31.1±0.30	/	/	/
10	/	/	35.1±0.17	/	/	/

试剂盒对 5 种致泻大肠埃希氏菌致病菌进行检测, 结果均为阳性(图 4), 说明本研究建立的方法检测结果与 GB 4789.6—2016 标准中多重普通 PCR 检测的结果一致。根据 GB 4789.6—2016 标准使用多重普通 PCR 检测试剂盒将 5 种致泻大肠埃希氏菌致病菌的所有毒力基因电泳跑出相应的 DNA 条带(见图 4), 在整个过程中耗时较长、操作较繁琐, 也进一步验证了设计的 4 种试剂盒毒力基因的扩增结果与多重普通 PCR 检测试剂盒相一致。

2.6 对污染较严重和人工污染样品进行检测

对抽查和委托检验的肉类、奶的样品, 以及动物腹泻物和人工污染样品等 40 份样品用人工合成的 4 种试剂盒法和商品化的多重普通 PCR 检测试剂盒分别进行检测, 结果显示 2 种方法的结果相一致, 进一步表明建立的

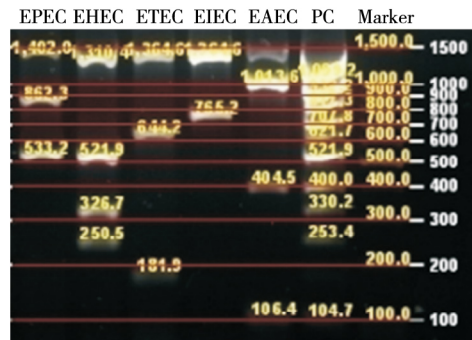


图 4 5 种致泻大肠埃希氏菌多重普通 PCR 检测试剂盒图谱

Figure 4 Multiple common PCR detection kits were used to detect five strains of diarrheagenic *Escherichia coli*

表 5 不同的方法对样品的检测结果

Table 5 Test results of samples in a different way

样品种类	样品数	4 种试剂盒(探针法)		GB 4789.6—2016(普通 PCR)	
		阳性	阴性	阳性	阴性
猪肉	10	0	10	0	10
牛奶	10	0	10	0	10
动物排泄物	10	1	9	1	9
人工污染	10	10	0	10	0

4 种试剂盒方法操作简便、特异性强、灵敏度高, 具有良好的实用性。

3 结论

本研究采用 TaqMan 探针技术的多重 PCR 技术, 针对 5 种致泻大肠埃希氏菌的保守序列, 设计并合成了相关 12 对特异性的毒力基因的引物与荧光探针, 根据设计的条件和原理建立了 4 种 PCR 扩增试剂盒, 采用四色荧光 PCR 技术在全封闭的扩增体系中对 5 种致泻大肠埃希氏菌检测, 其中 1 号试剂盒包括 EPEC 与 EHEC 两种菌, 2 号试剂盒包括 EIEC; 3 号试剂盒包括 ETEC; 4 号试剂盒包括 EAEC。4 种试剂盒不仅可以单独检测 1 种致泻大肠埃希氏菌, 也可以同时检测 5 种致泻大肠埃希氏菌, 检测的灵敏度最高达到 10 CFU/mL, 检测范围达到 $10^8 \sim 10^2$ CFU/mL, 说明该方法有较高的灵敏度; 使用本研究建立的检测方法对常见食源性致病菌进行检测, 结果显示常见的食源性致病菌均检测为阴性, 无扩增曲线, 只有 5 种致泻大肠埃希氏菌和大肠埃希氏 O157:H7 有扩增曲线, 说明使用本研究建立的检测方法有较强的特异性; 对抽查和委托检验的 40 份样品用该方法和商品化的多重普通 PCR 检测试剂盒分别进行检测, 结果显示 2 种方法的结果相一致, 进一步表明该方法具有较高的准确度; 并且可以降低检测成本, 减轻工作量, 避免致癌物给工作人员带来的危害。

本研究克服了以往常规检测中选择性分离、生化鉴定和血清学鉴定中的试验周期耗时较长、操作较繁琐、人为因素干扰等造成检测结果不确定和漏检的缺点; 也克服了使用普通 PCR 中配制扩增体系繁多、跑凝胶电泳、操作较繁琐和引物特异性不高等缺点; *uidA* 基因为大肠埃希氏菌特异性基因^[23], 可以作为初筛去除很多不含大肠埃希氏的样品。但是在使用 4 种试剂盒研究其特异性时, 选取的食源性致病菌种类较少, 涉及的菌种数量面不够广泛; 使用 4 种试剂盒对污染较严重和人工污染样品进行检测时, 对检测的样品量不够, 还需再多的搜集相关样品进行检测来验证 4 种试剂盒的准确性, 拓展它们的实用性; 在多重反应中对每对引物和探针的浓度比例会对灵敏度产生影响, 系统地优化反应体系, 可以在增菌液中目的菌不多或者提取的核酸模板量不多的情况下, 也可以很准确地检测出来, 从而提高阳性检出率^[24]。

参考文献

[1] 燕勇, 高文洁, 吉季梅. 一株极易误检为侵袭性大肠埃希菌 O124:K72 的无丙二酸柠檬酸杆菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(5): 945-946.
 [2] 燕勇, 吉季梅, 张建平. 致泻大肠埃希菌实验室检测工作的探讨与分析[J]. 中国卫生检验, 2007, 17(10): 1 895-1 896.
 [3] 陈芳, 陈云, 杨林, 等. 双重 PCR 检测猪产肠毒素性大肠埃希菌耐热肠毒素基因[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(11):

- 123-124.
- [4] 丁琦. 八种不同血清型肠出血性大肠埃希氏菌多重PCR检测方法的建立及应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- [5] 张铁男, 李继昌, 鲁成武, 等. 3种致泻性大肠埃希氏菌多重PCR检测方法的研究[J]. 中国兽医, 2007, 43(9): 17-19.
- [6] 秦小玄, 朱朝敏. 致泻性大肠杆菌的流行及耐药现状[J]. 儿科药学, 2008, 14(2): 61-64.
- [7] 陈小玲. 与O1群霍乱弧菌多价血清交叉凝集的肠道产毒性大肠埃希氏菌的鉴定[J]. 医学动物防制, 2015(11): 1 289-1 290.
- [8] 姚栋, 张如胜, 欧新华. 多重PCR快速检测3种致泻性大肠埃希菌方法的建立[J]. 国际检验医学, 2015(8): 1 032-1 033.
- [9] 李红, 陈松, 周汉洪, 等. 致泻性大肠埃希菌2种检测方法的比较[J]. 现代预防医学, 2015, 42(20): 3 777-3 779.
- [10] 劳希, 梁炳健, 林静梅. 多重实时荧光PCR检测食品中致泻性大肠埃希菌[J]. 中国城乡企业卫生, 2017(12): 28-31.
- [11] GUION C E, OCHOA T J, WALKER C M, et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(5): 1 752-1 757.
- [12] WEST D M, SPRINGINGS K A, CASSAR C, et al. Rapid detection of *Escherichia coli* virulence factor genes using multiplex real-time TaqMan PCR assays[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 122(3): 323-331.
- [13] YANG Ji-rong, WU Fang-tzy, TSAI Jin-lai, et al. Comparison between O serotyping method and multiplex real-time PCR to identify diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(11): 3 620-3 625.
- [14] PERSSON S, OLSEN K E P, SCHEUTZ F, et al. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory[J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(5): 516-524.
- [15] 金玉娟, 陈应坚, 刘渠, 等. 多重实时荧光PCR检测三种致泻性大肠埃希菌和志贺菌方法的建立[J]. 中国卫生检验, 2013(1): 103-108.
- [16] 金玉娟, 刘渠, 陈应坚, 等. 四种致泻性大肠埃希氏菌实验室检测研究进展[J]. 中国热带医学, 2011, 11(1): 116-118.
- [17] 朱惠芳, 黄巧萍. 1株与志贺氏菌生化相似、抗原相同的大肠埃希氏菌[J]. 实用检验医师, 2014, 6(4): 256-258.
- [18] YOUMANS B P, AJAMI N J, JIANG Zhi-dong, et al. Development and Accuracy of Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays for Detection and Quantification of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Heat Labile and Heat Stable Toxin Genes in Travelers' Diarrhea Samples[J]. American Journal of Tropical Medicine & Hygiene, 2014, 90(1): 124-32.
- [19] FIALHO O B, DE SOUZA E M, DE B D C, et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* using a two-system multiplex-PCR protocol[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2013, 27(2): 155-161.
- [20] 赵爱兰, 熊衍文, 白雪梅, 等. 鉴定五类致泻性大肠埃希菌和志贺菌的多重PCR方法[J]. 疾病监测, 2011, 26(1): 65-67.
- [21] 张红宇, 孟祥晨, 姜博, 等. Taqman三重实时PCR快速检测原料乳中致泻性大肠埃希氏菌[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(10): 108-115.
- [22] 王娉, 袁飞, 杨海荣, 等. 奶液模拟标本中单增李斯特菌real-time PCR检测方法的建立[J]. 卫生研究, 2011, 40(6): 765-768.
- [23] 席美丽, 只帅, 王小璞, 等. 食源性大肠杆菌的PCR检测[J]. 西北农业学报, 2011, 20(12): 188-191.
- [24] 舒畅, 姜琛璐, 钟慈平, 等. 三种食源性致病菌多重PCR检测方法的建立[J]. 食品工业科技, 2014, 35(12): 49-54.

信息窗

欧盟限制食品中的反式脂肪含量

据欧盟官方公报消息,2019年4月25日,欧盟委员会发布(EU)2019/649号条例,限制食品中反式脂肪的含量。具体修订如下:

在(EC)1925/2006法规附件III的B部分中插入了下表:

受限物质	使用条件	其他要求
动物脂肪中天然存在的反式脂肪以外的反式脂肪	面向最终消费者的食品和面向零售的食品中每100g脂肪中最多含2g人造反式脂肪	向其他食品经营者供应非最终消费者食品或非零售食品的食品经营者,应确保向供应的食品经营者提供反式脂肪含量的信息,但动物源性脂肪中天然存在的反式脂肪除外,其含量超过2g/100g。

(来源: <http://news.foodmate.net>)