

实验技术与方法

实时荧光定量 PCR 法快速检测食品中大肠埃希菌

胡朝友¹,洪志强¹,张梦寒²

(1. 昆山市疾病预防控制中心,江苏 昆山 215300; 2. 苏州市疾病预防控制中心,江苏 苏州 215004)

摘要:目的 应用实时荧光定量 PCR 技术,结合 3~5 h 的前增菌处理,建立食品中大肠埃希菌的快速、灵敏、定量的检测方法。方法 以大肠埃希菌(ATCC 25922)为参考菌株,对培养基和培养温度进行优化,选择最佳的前增菌培养条件。将不同浓度的参考菌株和样品分别接种前增菌液中培养 3~5 h。采用 Triton-X 100 提取增菌后的 DNA,实时荧光定量 PCR 扩大大肠埃希菌特异性片段。所得 Ct 与对应的原始(增菌前)参考菌株的浓度,建立标准曲线,计算样品中大肠埃希菌的数量。结果 纯培养模式下,经过 3、4 和 5 h 的前增菌后,标准曲线具有很好的线性, r^2 分别为 0.996、0.992 和 0.991,对应的检测限为 136、14 和 1.4 cfu/100 ml;含杂菌培养模式下,NB 和 EC 肉汤 42.0 °C 增菌 4 h 后,建立的标准曲线 r^2 分别为 0.972 和 0.978。在不同食品中该方法的加标回收率为 74.0%~174.0%。结论 3~5 h 的前增菌实时荧光定量 PCR 方法可以快速、灵敏、定量地检测食品中活的大肠埃希菌。

关键词:大肠埃希菌;实时荧光定量 PCR;定量检测;食源性致病菌;食品安全;风险监测

中图分类号:R155; Q93-33 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)04-0399-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.04.011

Detection and quantification of *Escherichia coli* in food using Real-Time PCR method

HU Chao-you, HONG Zhi-qiang, ZHANG Meng-han

(Centers for Diseases Prevention and Control, Jiangsu Kunshan 215300, China)

Abstract: Objective To develop a fast and sensitive Real-Time PCR method with a short (3-5 h) enrichment to detect and quantify *E. coli* in food. **Methods** Experiments were performed with *E. coli* (ATCC 25922) as the reference strain. The optimal enrichment conditions were established from different medium and different temperature. Both quantification calibrators and samples were enriched for 3-5 h in the optimal enrichment medium. DNA was extracted using Triton-X 100 method, and was amplified using an *E. coli*-specific PCR assay targeting the specific gene. Standard curves were created by plotting the cycle threshold (*Ct*) values against the logarithm of the original quantity of reference strain (before enrichment), and samples were calculated from the respective *Ct* value. **Results** Under the conditions of pure *E. coli* growing in NB, standard curves showed a good linearity, with r^2 of 0.996, 0.992 and 0.991 for 3, 4 and 5 h enrichment respectively, and the corresponding limits of detection (*LOD*) were 136, 14 and 1.4 cfu/100 ml, respectively. This method was validated by creating standard curves after the 4 h enrichment in NB and EC with background microorganisms at 42.0 °C, with r^2 of 0.972 and 0.978, respectively. This method also tested the natural and spiked food samples, with a recovery rate from 74.0% to 174.0%. **Conclusion** The Real-Time PCR with 3-5 h enrichment is a rapid, accurate and reliable technique for quantifying the viable *E. coli* cells in food.

Key words: *Escherichia coli*; Real-Time PCR; quantitative detection; foodborne pathogens; food safety; risk monitoring

大肠埃希菌作为食品卫生监测的指示菌,其数量可以用来评价食品受污染的程度^[1]。目前有关食品中大肠埃希菌的计数方法存在检测时间长、鉴

定过程工作量大等缺点,不能及时的对食品安全进行风险评估。实时荧光定量 PCR 具有特异性好和检测速度快等优点,但是实时荧光定量 PCR 方法定量检测食品中致病菌时,需要配合复杂的前处理步骤,所得定量检测结果准确度偏低,灵敏度不够(约 $10^2 \sim 10^4$ cfu/g)^[2-3],不能消除死细菌的影响。依据指数生长期细菌的数目和培养时间存在指数关系,本研究采用 3~5 h 前增菌的方法,准确快速定量测定食品中的大肠埃希菌。

收稿日期:2015-03-11

基金项目:江苏省卫生厅预防医学 2012 年科研课题资助项目(Y2012049);苏州市饮用水安全与水性疾病监测公共服务平台开放实验室开放课题资助项目(SZPT2012001)

作者简介:胡朝友 男 中级检验师 研究方向为微生物检验

E-mail:hu_chaoyou@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

大肠埃希菌(ATCC 25922)、产气肠杆菌(ATCC 13048)、阴沟肠杆菌(CMCC 45301)、变形杆菌(CMCC 49027)、表皮葡萄球菌(CMCC 26069)、蜡样芽胞杆菌(CMCC 63301)均为本实验室保藏。

1.1.2 主要仪器与试剂

7500 荧光定量 PCR 仪、MagMax-96 全自动核酸提取仪均购自美国 ABI,多功能台式高速离心机,带盖水浴锅,拍击式均质器

DreamTaq 2 × PCR Master Mix (美国 Thermo), 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(过滤柱式)、细菌基因组 DNA 磁珠提取试剂盒均购自北京天根公司, NB 肉汤(简称 NB,杭州天和公司), EC 肉汤(EC)、脑心浸液(BHI)、LST 单料(LST)、LB 肉汤(LB)、缓冲蛋白胨水(BPW)、VRBA 琼脂等培养基均购自北京陆桥公司。

1.2 方法

1.2.1 前增菌条件优化

优化条件的设置包括:① 6 种培养基的选择: NB、BHI、LST、LB、BPW 和 EC;② 5 组培养温度的选择:36.0、38.0、40.0、42.0、44.5 °C;③ 增菌时间的选择:3~5 h。通过比较大肠埃希菌在纯培养模式下和在不同浓度杂菌共同生长的模式下,其指数生长情况,以确定最优前增菌条件。培养方式为水浴,松盖,以确保温度稳定和氧气充分。

1.2.2 纯大肠埃希菌计数

大肠埃希菌纯培养物的计数采用 VRBA 平板计数。用 0.85% 生理盐水将增菌液稀释成合适的稀释度,取 1 ml 平板计数,倾注约 10 ml 温度为 48 °C 的 VRBA 琼脂,混匀。凝固后表层再加 5 ml VRBA,凝固后倒置 36 °C 培养 18~24 h 后计数。

1.2.3 生长曲线和代分裂时间

生长曲线通过不同接种时间所对应的大肠埃希菌数来绘制;指数生长曲线则通过不同接种时间所对应的大肠埃希菌数 \log_2 对数转换来绘制。在对大肠埃希菌进行平板计数的同时,相似的指数生长曲线通过 qPCR 方法绘制。指数生长培养物的代分裂时间,根据指数生长曲线的斜率来计算。

1.2.4 DNA 提取

本文采用简单快速的 Triton-X 100 方法作为大肠埃希菌 DNA 提取方法。取 1.0 ml 菌液至 1.5 ml 离心管,12 000 r/min 离心 10 min,吸出 910 μ l 上清;沉淀中加入 10 μ l 10% TritonX-100;100 °C 孵育 10 min,即为 DNA 模板,使用前重悬。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 试验条件

PCR 反应体系:PCR 预混液 12.5 μ l,引物各 400 nmol/L,探针 200 nmol/L,模板 2 μ l,总体积为 25 μ l。空白对照和培养基对照,分别加 2 μ l 的去离子水和培养基代替样品模板。

PCR 扩增程序:94 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火延伸 60 s,40 个循环。

引物设计:试验采用前期研究设计的大肠埃希氏菌特异性单拷贝基因引物和探针 *ydiJ577*^[4],目标片段长度为 91 bp,引物 F: ATTTGGCGAAAATG GCAGTAAC,引物 R: CAGCTATTACGATGCGCAA GTG,探针 P: FAM-TGGAAACCTAATTTTTCGACCA GACGGA-BHQ-1,委托上海生工合成。

1.2.6 标准曲线的建立

纯培养模式下建立标准曲线,采用大肠埃希菌过夜培养物 10 倍梯度稀释液,含菌浓度约 $10^0 \sim 10^7$ cfu/ml,分别取 1 ml 稀释液接种 100 ml NB 肉汤中,重复 3 次,42.0 °C 水浴培养。分别收集增菌时间为 0、3、4 和 5 h 培养液。按上述方法提取 DNA 和实时荧光定量 PCR 扩增。所得 *Ct* 与对应的原始(增菌前)大肠埃希菌 10 倍梯度稀释液的浓度,建立标准曲线。加标样品标准曲线的建立,则采用在无大肠埃希菌盒饭样品(包括:鱼块、虾、猪肉、西红柿炒蛋、白菜和米饭)中,加标制成 10 倍梯度稀释液,分别取 10 ml 稀释液加入到 NB 和 EC 肉汤中,42.0 °C 水浴培养 4 h,实时荧光定量 PCR 方法测定。

1.2.7 样品前处理和样品检测

样品前处理:无菌称取 25 g 待检样品,放入带滤膜的均质袋中,加标样品额外接种不同浓度的杂菌混合物和大肠埃希菌,加入 225 ml 0.85% 灭菌生理盐水。均质器拍打 2 min,吸取 10 ml 过滤后的样品稀释液到 90 ml 的 EC 肉汤中。

样品检测:样品中大肠菌群和大肠埃希菌的培养计数分别采用 GB 4789.3—2010《食品微生物检验 大肠菌群计数》^[5]和 GB 4789.38—2012《食品微生物检验 大肠埃希氏菌计数》^[6]标准方法检测。实时荧光定量 PCR 方法检测,同标准曲线的建立。

1.2.8 检测限及数据处理

实时荧光定量 PCR 方法的检测限定义:在 90% 以上的机率中,实时荧光定量 PCR 反应能够出现阳性扩增信号的最小基因单位(拷贝数)^[7]。由于在 NB 纯培养条件下,试验中 NB 空白对照总会有阳性扩增信号(*Ct* 约为 34),所以本文采用 3 倍空白对照标准偏差的方法计算实时荧光定量 PCR 方法的检测限: $LOD_{PCR} = \text{空白对照的平均值} + 3 \times \text{标准偏差}$ 。

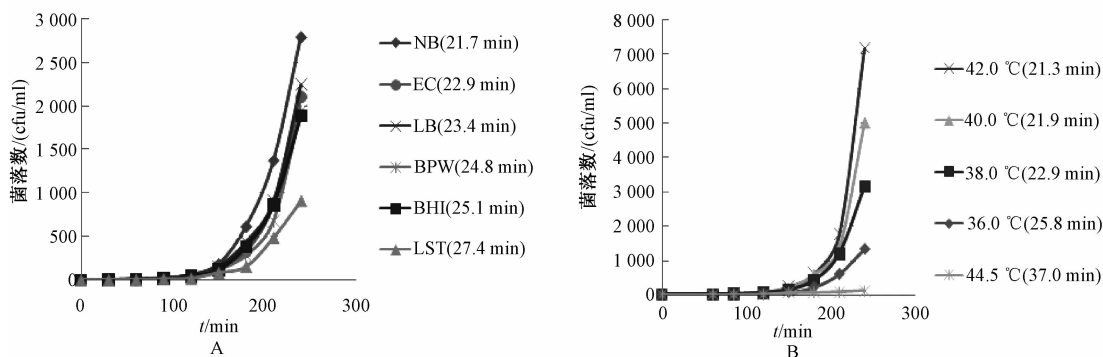
数据计算和统计分析采用 Microsoft Office 2007

Excel 软件。

2 结果与分析

2.1 前增菌条件的优化

不同条件下大肠埃希菌生长曲线和代分裂时间见图 1。37 °C 时,不同培养基对大肠埃希菌指数增长的影响见图 1A。在 NB 中大肠埃希菌的代分



注: A为在37 °C条件下不同的培养基中的生长曲线; B为在营养肉汤中不同温度下的生长曲线; 括号内的数值为代分裂时间

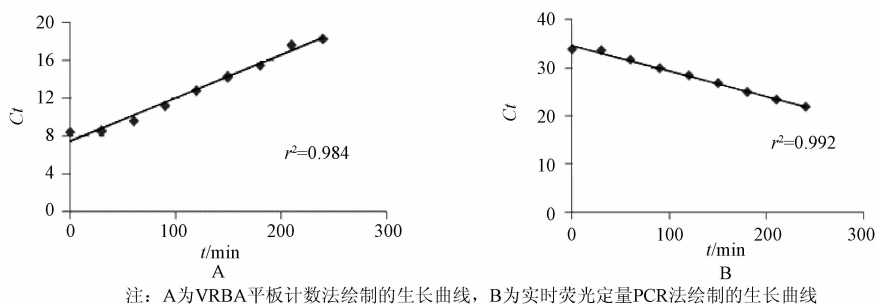
图1 大肠埃希菌在不同条件下的生长曲线

Figure 1 Growth curve of pure *E. coli* growing in different media at different temperatures

2.2 指数生长曲线

纯大肠埃希菌培养模式下,试验预期的典型指数生长曲线见图 2。采用 VRBA 平板计数法建立的指数

生长曲线见图 2A,采用实时荧光定量 PCR 法生长曲线见图 2B,相关系数 (r^2) 显示实时荧光定量 PCR 法比 VRBA 更接近 1.0,说明前者测量方法更精确。



注: A为VRBA平板计数法绘制的生长曲线, B为实时荧光定量PCR法绘制的生长曲线

图2 分别采用不同方法绘制的指数生长曲线

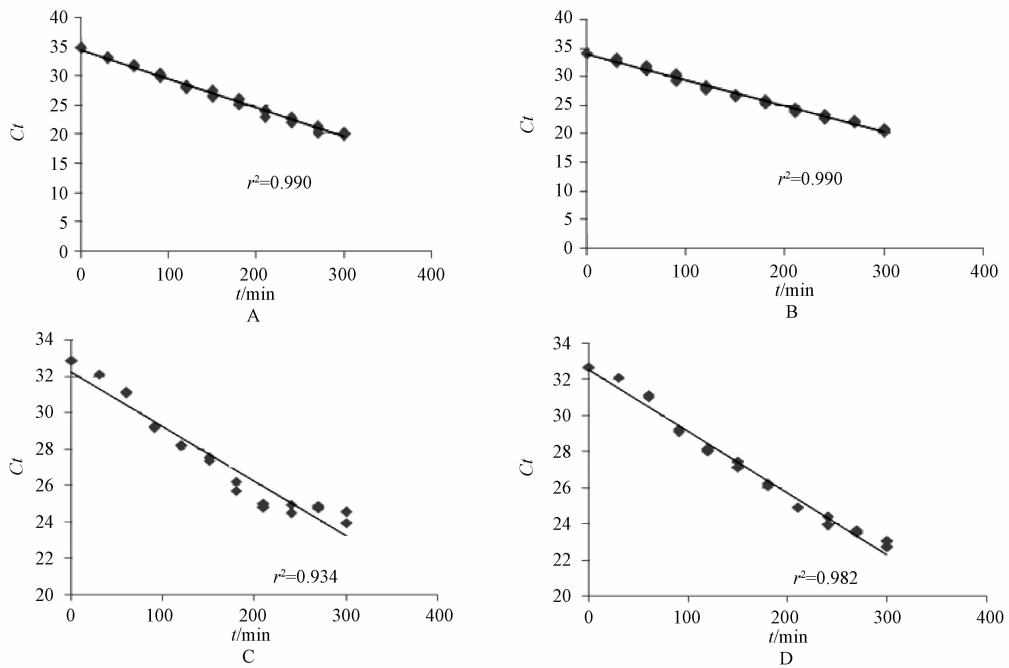
Figure 2 Exponential growth curves of pure *E. coli* were created by the VRBA plate count and by the assay

为了观察杂菌对大肠埃希菌指数生长的影响,将大肠埃希菌与杂菌按不同的比例(1:1, 1:10, 1:100和 1:1 000)分别接种在 NB 和 EC, 42 °C 培养 4 h,所建立的指数生长曲线见图 3(1:10 和 1:100 的图略)。在前增菌后期,在高浓度杂菌的生长竞争的影响下,大肠埃希菌的生长受到抑制,NB 比 EC 更加明显。

2.3 标准曲线

纯培养模式下,4 个不同增菌时间所建立的标准曲线,具体数据见表 1。0 h 前增菌的标准曲线线性最佳, $r^2 = 0.999$,扩增效率 102.2%。由于 NB 空白对照中残留 DNA 本底的影响,检测限为 1.4×10^5 cfu /

100 ml,高于前增菌 5 h 后的检测限 (1.4 cfu/100 ml)。4 h 前增菌有最宽的线性范围,超过 7 个数量级, $4.6 \times 10^1 \sim 4.6 \times 10^7$ cfu/100 ml ($r^2 = 0.992$) (表 1)。5 h 前增菌只有 6 个数量级,原因是高浓度的菌液在超过 4 h 的前增菌后,已步入稳定期。由于采用原始(未增菌前)的浓度代替实际(增菌后)的浓度,导致 PCR 扩增效率偏高(见表 1),但是当结果采用标准曲线的校正后,不会影响定量的准确性。试验发现细菌间存在生长竞争,EC 比 NB 更适合作为污染严重的样品的前增菌液。考虑到受污染的食品样品会有很高浓度的背景细菌,所以将 EC 培养基作为前增菌实时荧光定量 PCR 的首选培养基。



注：A、C为NB中大肠埃希菌与杂菌浓度比分别是1:1和1:1 000；B、D图为EC中大肠埃希菌与杂菌浓度比分别是1:1和1:1 000

图3 在不同培养基中,大肠埃希菌与不同浓度杂菌共同生长的指数生长曲线

Figure 3 Exponential growth curves of *E. coli* growing with different level of background microbial at the ratio of 1:1 and 1:1 000 (*E. coli* to background microbial) were created by the assay in NB and in EC respectively

表1 不同条件下所建立的标准曲线的比较

Table 1 Comparison of standard curves produced from different enrichment conditions

增菌条件	回归方程	r^2	扩增效率 /%	线性范围 ^a /(cfu/100 ml)	培养基对照 ^a /(cfu/100 ml)	LOD_{PCR} /(cfu/100 ml)
0 h,42 ℃,纯 NB	$y = -3.271gx + 44.26$	0.999	102.3	$4.6 \times (10^5 \sim 10^{10})$	$(8.6 \pm 1.7) \times 10^4$	1.4×10^5
3 h,42 ℃,纯 NB	$y = -2.831gx + 34.14$	0.996	125.7	$4.6 \times (10^2 \sim 10^7)$	$(8.1 \pm 1.8) \times 10^1$	136
4 h,42 ℃,纯 NB	$y = -2.661gx + 44.26$	0.992	138.1	$4.6 \times (10^1 \sim 10^7)$	7 ± 2	14
5 h,42 ℃,纯 NB	$y = -2.781gx + 27.3$	0.991	129.1	$4.6 \times (10^0 \sim 10^6)$	<1	1.4
4 h,42 ℃,样品 + NB	$y = -3.211gx + 36.5$	0.990	104.8	$9.0 \times (10^0 \sim 10^6)$	—	—
4 h,42 ℃,样品 + EC	$y = -3.121gx + 37.3$	0.973	109.3	$9.0 \times (10^1 \sim 10^7)$	—	—

注:a表示数值为 $\bar{x} \pm s, n=3$;—表示 $Ct > 40$ 、没有检测到扩增信号或线性效果差

2.4 实际样品中大肠埃希菌检测结果

前增菌实时荧光定量 PCR 方法和培养法检测食品原样(不加标样品)和加标样品的检测结果见表2。前增菌实时荧光定量 PCR 方法的加标回收率为 74.0% ~ 174%。EC 肉汤对照和阴

性样品对照均无扩增,说明采用 EC 前增菌实时荧光定量 PCR 方法,未发现假阳性结果。前增菌时间的选择,主要考虑方法的检测限和样品本身的卫生状况。通常情况下,4 h 的前增菌会比较合适。

表2 培养法和前增菌实时荧光定量 PCR 法检测食品原样和加标样品中大肠埃希菌结果

Table 2 Enumeration of *E. coli* by culture-based methods and enrichment PCR for the natural samples and the spiked samples

样品	培养法(多管发酵法)MPN/g		实时荧光定量 PCR 法(原样)		实时荧光定量 PCR 法(加标样品) ^a		回收率 /% ^c
	大肠菌群	大肠埃希菌	$Ct(\bar{x} \pm s, n=2)$	菌落数/(cfu/g) ^b	$Ct(\bar{x} \pm s, n=2)$	菌落数/(cfu/g) ^b	
小炒肉	<0.3	<0.3	—	0	26.69 ± 0.01	899.9 ± 8.6	92.7
蒸糕	<0.3	<0.3	—	0	25.93 ± 0.51	1 544.0 ± 518	159.0
肉包	24	4.3	32.75 ± 0.18	15.38 ± 1.89	25.74 ± 0.10	1 706.0 ± 113	174.0
西芹炒肉	2.3	2.3	33.43 ± 0.06	91.70 ± 0.37	26.36 ± 0.06	1 124.0 ± 42.7	115.0
萝卜炖排骨	<0.3	<0.3	—	0	26.04 ± 0.56	1 443.0 ± 536	149.0
黄豆炖鸡块	>110	24	30.24 ± 1.08	94.29 ± 63.1	25.90 ± 0.04	1 525.0 ± 36.2	148.0
红烧肉	<0.3	<0.3	—	0	26.48 ± 0.06	1 037.0 ± 39.4	107.0
炸土豆	<0.3	<0.3	—	0	27.10 ± 0.64	717.7 ± 301	74.0
泡菜	>110	2.3	34.45 ^d	4.89	26.72 ± 0.65	924.4 ± 392	94.8
熏鱼	24	9.3	32.40 ± 0.13	19.49 ± 1.76	25.81 ± 0.20	1 568.0 ± 208	160.0
EC(对照)	<0.3	<0.3	—	0	26.08 ± 0.62	1 283.0 ± 378	132.0

注:a为每个样品的加标量均为 970 cfu/g;b表示该方法的回归方程为 $Ct = -3.421g \text{ 菌落数} + 36.8, r^2 = 0.982, Eff\% = 95.81$;c表示回收率 = (加标样品浓度 - 原样浓度)/970 × 100%;d表示该项结果未检出或无效;—表示 $Ct > 40$ 、没有检测到扩增信号或线性效果差

3 讨论

前增菌实时荧光定量 PCR 方法利用细菌在指数增长期,其增长遵循数学指数模型。试验得出的最佳前增菌条件为 EC 培养基中 42 ℃ 水浴松盖增菌 4~5 h。该方法检测实际样品和加标样品具有很高的准确度和可靠性(见表 1、2)。与直接实时荧光定量 PCR 相比,经过前增菌提高了实时荧光定量 PCR 的灵敏度,简化了 DNA 提取步骤,排除了死细菌的干扰。前增菌实时荧光定量 PCR 方法研究食品中大肠埃希菌的定量检测鲜有报道,在试验过程中本研究组也遇到了一些问题:

① DNA 提取方法的选择。为了选择一种简单高效的 DNA 提取方法,前期的试验比较了 4 种方法的线性范围^[8],其排列顺序如下:Triton-X 100 法 > 磁珠法线性 > 水煮法 > 过滤柱吸附法。Triton-X 100 法处理过夜培养物稀释液的线性范围达到 7 个数量级($7.0 \times 10^2 \sim 7.0 \times 10^8$ cfu/ml, $r^2 = 0.998$),整个处理过程简单,始终在同一支离心管中操作,所以 DNA 损失也小。所以将 Triton-X 100 法作为前增菌实时荧光定量 PCR DNA 提取的首选方法,磁珠法备选。

② PCR 反应抑制的问题。食品中存在复杂的基质,像一些血细胞,脂肪等大分子物质会抑制 PCR 反应^[8-10]。前增菌实时荧光定量 PCR 虽然也存在 PCR 反应抑制的可能,但是相比直接 PCR 法,样品在经过均质袋滤膜过滤和前增菌稀释 10^2 倍后,样品中的 PCR 反应抑制物已经明显降低。从加标盒饭样品的标准曲线和其它样品的加标回收率上来看,前增菌实时荧光定量 PCR 结合 Triton-X 100 法提取 DNA 适用于大部分食品样品的检测。在定性 PCR 反应中普遍采用加入内参来监测 PCR 反应的抑制效应,但不适合定量 PCR 反应,原因为内参的加入会与目标片段的扩增形成竞争,影响定量的准确性,而这一现象在低浓度样品时更为严重。试验中可以采用批量样品按比例加做加标回收试验,这样既能监测该类样品中是否存在 PCR 反应抑制物,又能评价方法的准确性。

③ 空白扩增的问题。在试验初期,采用的预混液空白对照均有扩增(*Ct* 值约为 33),可能是预混液中存在大肠埃希菌残留 DNA 片断^[11],后来改为 DreamTaq 实时荧光定量 PCR Master Mix 后问题解

决,而且这个预混液价格便宜。在 NB 培养基中也发现存在死的大肠埃希菌, (*Ct* 值约为 34),这应该是培养基加工过程中污染的,这一现象在 EC 空白对照和阴性对照中并不明显,可能与不同的厂家和更加复杂的配方以及基体中存在的轻微 PCR 抑制物有关。实验玻璃瓶容器清洗后,采用 0.1% 的 H_2O_2 高压灭菌后,瓶壁残留的 DNA 可以全部消化降解。

综上所述,3~5 h 前增菌实时荧光定量 PCR 方法可以灵敏、准确、定量检测食品中大肠埃希菌。该方法检测费用低、操作简便,适合在基层实验室中开展。

参考文献

- [1] 徐进,庞璐. 食品安全微生物学指示菌国内外标准应用的比较分析[J]. 中国食品卫生杂志,2011,23(5):472-477.
- [2] 刘静宇,凌莉,邓翼惠,等. 活的非可培养状态副溶血性弧菌实时荧光逆转录 PCR 检测方法的建立及其毒力研究[J]. 中国食品卫生杂志,2013,25(4):309-314.
- [3] Grys T E, Sloan L M, Rosenblatt J E. Rapid and sensitive detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from nonenriched stool specimens by Real-Time PCR in comparison to enzyme immunoassay and culture[J]. J Clin Microbiol,2009,47(7):2008-2012.
- [4] 胡朝友,傅春玲,陆巧荣,等. TaqMan 探针荧光 PCR 定量检测大肠埃希菌方法研究[J]. 现代预防医学杂志,2014,41(6):1070-1077.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 3—2010 食品微生物检验 大肠菌群计数[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 38—2012 食品微生物检验 大肠埃希氏菌计数[S]. 北京:中国标准出版社,2012.
- [7] Joly P, Falconnet P A, André J, et al. Quantitative Real-Time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation[J]. Appl Environ Microbiol,2006,72(4):2801-2808.
- [8] 胡朝友,傅春玲,张宏斌,等. 饮用水中大肠埃希氏菌富集和 DNA 提取的方法比较[J]. 中国食品卫生杂志,2014,6(1):36-39.
- [9] Bickley J, Short J K, McDowell D G, et al. Polymerase chain reaction(PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions[J]. Lett Appl Microbiol,1996,22(2):153-158.
- [10] Wilson I G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification[J]. Appl Environ Microbiol,1997,63(10):3741-3751.
- [11] Silkie S S, Tolcher M P, Nelson K L. Reagent decontamination to eliminate false-positives in *Escherichia coli* qPCR[J]. J Microbiol Methods,2008,72(3):275-282.