

莴苣中两种致泻性大肠杆菌的富集及DNA提取方法的优化

董妍¹, 胡文忠^{2,*}, 何煜波², 姜爱丽², 冯可³, 白雪²

(1.大连工业大学食品学院, 辽宁大连 116034;

2.大连民族学院生命科学学院, 辽宁大连 116600;

3.大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁大连 116024)

摘要:本研究对人工接种肠出血性大肠杆菌O157:H7和肠侵袭性大肠杆菌的莴苣样品中菌体的富集和DNA提取方法进行了优化。研究中比较了不同过滤膜组合对菌体的富集效果,筛选了莴苣样品中细菌DNA提取的最适方法,建立了多重PCR方法检测人工污染莴苣样品。结果表明,采用尼龙膜15 μm+混合膜0.22 μm的组合富集细菌、试剂盒法提取样品中细菌DNA,多重PCR检测的检出限降低10倍,检测时间节省1.5 h。本研究可快速、简便、灵敏的应用于莴苣检测中,具有很高的实际应用价值。

关键词:鲜活农产品,致泻大肠杆菌,富集,DNA提取

Optimized methods for concentration and DNA extraction of two kinds of diarrheagenic *Escherichia coli* in fresh agricultural products

DONG Yan¹, HU Wen-zhong^{2,*}, HE Yu-bo², JIANG Ai-li², FENG Ke³, BAI Xue²

(1.College of Food Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;

2.College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China;

3.College of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract:To optimize the methods for concentration and DNA extraction of two pathogens in artificial lettuce infected with Enterohemorrhagic *E.coli* and Enteroinvasive *E.coli*. This study compared the concentration effect of different kinds of filtration membranes, and selected the best method of DNA extraction to extract the two pathogens in lettuce sample. The multiplex PCR was used to detect the artificial lettuce infected with two pathogens. The results showed that the nylon membrane which had the pore size of 15 μm combined with mixed membrane which had the pore size of 0.22 μm was the best enrichment method. And the best DNA extraction method was selected by using the kit of bacterial genomic DNA extraction. The detection limit of lettuce samples by using multiplex PCR was decreased 10 times. The detection time was saved 1.5 h. The multiplex PCR combined with the optimized method was sensitive, fast and easy. This study had a high practical value.

Key words: fresh agricultural products; diarrheagenic *Escherichia coli*; bacteria concentration; DNA extraction

中图分类号:TS201.3

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2015)20-0260-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.20.046

近年来,致泻性大肠杆菌污染新鲜莴苣的事件常有发生,针对莴苣中致泻性大肠杆菌进行快速检测对保障食品安全是十分必要的。在目前的研究中,检测不同血清型的致泻性大肠杆菌常用传统方法费时、费力,越来越不能满足人们对食品安全的要求,而多重PCR技术因具有高效、灵敏、准确等特点,成

为快速检测食源性致病菌方面的研究热点之一^[1-2]。莴苣中所含致泻性大肠杆菌的数量往往较少,食品基质也会影响致病菌DNA的提取^[3],因此在进行多重PCR检测前对菌体的富集和DNA提取方法进行优化,能够有效降低对检测结果的干扰。翁思聪等^[4]应用复合型增菌培养基使细菌共增长。郝玉芹等^[5]应用

收稿日期:2015-02-02

作者简介:董妍(1989-),女,在读硕士研究生,研究方向:食品安全,E-mail:dong_yan@126.com。

*通讯作者:胡文忠(1959-),男,教授,研究方向:食品科学,E-mail:hwz@dlnu.edu.cn。

基金项目:国家科技支撑计划项目(2012BAD38B05);国家自然科学基金项目(31172009);大连市科技计划项目(2012E13SF106);大连市金州区科技计划项目(2012-A1-049)。

FTA滤膜提取细菌DNA。白莉等^[6]应用免疫磁珠富集肉制品中的致病菌,均为快速检测食品中致病菌提供了参考。在目前的研究中,针对肉类或乳类中致病菌的富集和DNA提取的研究较广泛,多重PCR技术也多应用于这两类食品的检测中,而莴苣等蔬菜中此类研究较少。因此,研究从莴苣中快速获得大量高质量的细菌DNA,以满足检测效率、检出限的要求,具有重要的实际意义^[7-8]。

本研究通过将不同材质和孔径的过滤膜进行组合,对人工接种肠出血性大肠杆菌O157:H7 (Enterohemorrhagic *E.coli*, EHEC)和肠侵袭性大肠杆菌(Enteroinvasive *E.coli*, EIEC)的新鲜莴苣中两种致泻性大肠杆菌进行洗脱富集,结合不同种DNA提取方法的优化结果,应用于多重PCR检测中以提高检测效率和降低检出限,并对EHEC O157:H7及EIEC的相关毒力基因以及两种菌共同的基因设计了三对特异性引物,以期灵敏、准确、快速的检测新鲜莴苣中两种致泻性大肠杆菌提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

肠出血性大肠杆菌O157:H7 CICC 21530、肠侵袭性大肠杆菌CICC 10661、肠产毒性大肠杆菌(Enterotoxigenic *E.coli*, ETEC) CICC 10414、肠致病性大肠杆菌(Enteropathogenic *E.coli*, EPEC) CICC 10372、大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*) CMCC 44102、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) ATCC 14028、乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi* B) CMCC 50094、三株单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) ATCC 19111、ATCC 19112、ATCC 19115、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538、副溶血性弧菌(*Vibrio Parahemolyticus*) CICC 10435 均由大连民族学院生命科学学院食品安全实验室提供;LB培养基 青岛海博生物技术有限公司;多重PCR反应相关试剂及细菌DNA提取试剂盒 均购自宝生物工程(大连)有限公司;Triton X-100等其他试剂 国产分析纯试剂;过滤膜、砂芯过滤器 国产实验材料;过滤膜 材质及孔径见表1;

表1 过滤膜的材质和孔径

| 材质 | 孔径大小(μm) | | |
|------|----------|------|----|
| 聚丙烯膜 | 10 | 20 | 40 |
| 尼龙膜 | 15 | 40 | 60 |
| 混合膜 | 0.22 | 0.45 | |

表2 多重PCR引物序列

| 细菌名称 | 毒力基因 | 核酸序列(5'-3') | 片段大小(bp) |
|--------------|------------------|---|----------|
| EHEC O157:H7 | <i>O-antigen</i> | TTCTAACTCTGGTGTCCGAAAG TAGTCTCCTTACCATCGCTCCCA | 178 |
| EIEC | <i>ipaH</i> | GGTAGGGGTTGTATGCTCGT GTGTATTTCTGTTGTCGGTCACTCA | 303 |
| 大肠杆菌 | <i>uidA</i> | GTGCCACATCACAGTCATAG GGTGCTTACTTTCATCTGCTTC | 446 |

新鲜莴苣 购自大连开发区新玛特超市。

BioSpectrum 310 凝胶成像系统 美国UVP公司; Thermo Arctic PCR仪、酶标仪 Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物的设计与合成 针对EHEC O157:H7的毒力基因*O-antigen*^[9]、EIEC的毒力基因*ipaH*^[10]和所有大肠杆菌共同的基因*uidA*^[11],根据GenBank中公布的相关序列,应用软件Primer Premier 5.0和Oligo 6.0设计3对特异性引物(表2),由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2.2 样品处理及增菌培养 将新鲜莴苣用无菌水洗净后在75%的酒精中浸泡10 min,取出待酒精挥发完全。每份样品称取25 g,加入到225 mL已添加了0.3 g/100 mL的甘露醇和1.0%的乳糖的LB营养肉汤培养基中,取浓度均为10 CFU/mL的EHEC O157:H7和EIEC的菌悬液各1 mL,分别加入到各自的培养基中,37 ℃、180 r/min条件下振荡培养^[7]。培养时间约为12 h,取出后均质,并设置空白对照实验。取适量均质液用无菌生理盐水按10倍梯度稀释至10⁻⁶倍进行菌落计数,其他的均质液备用。

1.2.3 过滤膜组合的选择 每次取约10⁷ CFU/mL的均质液50 mL,先将均质液通过大孔径膜,以截留样品均质后残留的固体等大体积物质,再取滤下的含菌体的培养液通过小孔径膜,使菌体脱离培养液而富集在膜表面上,通过菌落计数对不同材质和孔径的过滤膜进行优化。过滤膜的组合方式分别有以下几种:聚丙烯膜10 μm+混合膜0.22 μm、聚丙烯膜20 μm+混合膜0.22 μm、聚丙烯膜40 μm+混合膜0.22 μm、聚丙烯膜10 μm+混合膜0.45 μm、聚丙烯膜20 μm+混合膜0.45 μm、聚丙烯膜40 μm+混合膜0.45 μm、尼龙膜15 μm+混合膜0.22 μm、尼龙膜40 μm+混合膜0.22 μm、尼龙膜60 μm+混合膜0.22 μm、尼龙膜15 μm+混合膜0.45 μm、尼龙膜40 μm+混合膜0.45 μm、尼龙膜60 μm+混合膜0.45 μm。将富集后的小孔径过滤膜放入5 mL无菌生理盐水中,使用涡旋混合器2400 r/min振荡2 min,然后用玻璃棒刮擦表面1 min^[12],得到菌体的富集液。将不同过滤膜组合的富集液10倍梯度稀释后进行菌落计数,比较富集效果选出最佳过滤膜组合。

1.2.4 基因组DNA的提取

1.2.4.1 水煮法 参照文献[13]并作改进:取1 mL均质液及其梯度稀释液分别离心12000 r/min离心2 min,弃上清,加入400 μL无菌水吹打混匀,12000 r/min离

心1 min, 弃上清, 加入300 μL 无菌水吹打混匀, 煮沸10 min后迅速放在冰上10 min, 12000 r/min离心5 min, 取上清为模板。

1.2.4.2 碱液加热裂解法 参照文献[14]: 取1 mL均质液及其梯度稀释液分别12000 r/min离心10 min, 弃上清, 加入20 mmol/L的NaOH溶液100 μL , 混匀后煮沸10 min, 迅速置于4 $^{\circ}\text{C}$ 中30 min, 12000 r/min离心10 min, 取上清为模板。

1.2.4.3 Triton X-100直接裂解法 参照文献[15]并作改进: 取1 mL均质液及其梯度稀释液分别12000 r/min离心2 min, 弃上清, 加入100 μL 1% Triton X-100, 吹打混匀, 置于室温下10 min, 5000 r/min离心1 min, 取上清为模板。

1.2.4.4 Triton X-100煮沸裂解法 参照文献[15]并作改进: 取1 mL均质液及其梯度稀释液分别加入到100 μL 的1% Triton X-100中, 涡旋振荡1 min混匀后煮沸10 min, 迅速放在冰上10 min, 5000 r/min离心1 min, 取上清为模板。

1.2.4.5 试剂盒法 取1 mL均质液及其梯度稀释液分别按照宝生物工程(大连)有限公司生产的细菌基因组DNA提取试剂盒的说明书进行操作。

1.2.5 DNA提取方法的选择 先应用EHEC O157:H7和EIEC纯菌菌株建立多重PCR反应, 并验证引物特异性。然后对不同提取方法提取的基因组DNA分别进行多重PCR扩增, 以比较应用于多重PCR反应中不同提取方法的检出限, 综合DNA纯度来确定最佳DNA提取方法。同时取不同提取方法提取的模板DNA 2 μL , 经酶标仪测定其在230、260、280 nm波长下的光吸收值, 以超纯水为空白, 每个样品重复三次, 取三次结果的平均值, 比较不同提取方法提取的DNA纯度。

对反应体系进行优化后, 最终多重PCR反应体系确定为: 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ free) 2.5 μL , MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μL , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μL , DNA模板各1 μL , *O-antigen*基因引物(4 $\mu\text{mol/L}$)各1 μL , *ipaH*基因引物各1 μL , *uidA*基因引物各1.25 μL , rTaq DNA聚合酶(5 U/ μL) 0.2 μL , 加RNase-Free Water至25 μL 。对反应条件进行优化后, 最终多重PCR反应条件确定为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 34个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。扩

增产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测, 95 V电泳1 h, 在凝胶成像系统下观察结果。

1.2.6 人工污染新鲜莴苣的检测 应用最佳过滤膜组合对两种浓度均为7.8 $\times 10^7$ CFU/mL的致泻性大肠杆菌均质液及其10倍梯度稀释液分别进行洗脱富集, 使得菌体浓度范围为7.8 $\times 10^7$ ~7.8 $\times 10^1$ CFU/mL(以10倍为梯度)的样品分别经富集处理后得到各自的洗脱液, 然后应用试剂盒法提取上述洗脱液中细菌DNA, 所提取的DNA用于多重PCR方法, 检测检出限并与未经富集样品的检出限对比, 分析富集效果。

1.2.7 实验数据处理与分析 实验数据结果采用Excel2010软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 过滤膜组合的选择

先应用两种不同材质、五种孔径大小的大孔径过滤膜过滤含7.8 $\times 10^7$ CFU/mL致泻性大肠杆菌的样品均质液, 再将含菌体的培养液分别通过两种不同孔径大小的小孔径过滤膜, 通过菌落计数比较各种组合的富集效果(表3), 结果显示尼龙材质的过滤膜的洗脱效果优于聚丙烯材质的过滤膜, 孔径大小为15、40、60 μm 的尼龙过滤膜洗脱细菌的能力大致相同, 孔径大小为0.22 μm 的过滤膜富集细菌的能力优于孔径大小为0.45 μm 的过滤膜, 考虑到大孔径过滤膜的孔径大小关系到其截留能力, 过大的孔径不利于截留样品中残留的大体积固体, 因此选择孔径大小为15 μm 的尼龙过滤膜与孔径大小为0.22 μm 的混合过滤膜组合对两种致泻性大肠杆菌进行洗脱富集。

2.2 DNA提取方法的选择

2.2.1 五种DNA提取方法所得DNA纯度比较 对应用五种提取方法提取的基因组DNA经酶标仪测量其在230、260、280 nm波长下的光吸收值, 计算出的OD₂₆₀/OD₂₃₀比值和OD₂₆₀/OD₂₈₀比值结果见表4。由表4结果可以看出用水煮法、Triton X-100直接裂解法、Triton X-100煮沸裂解法提取DNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀比值均低于1.8, 说明提取的DNA中可能含有较多的蛋白质、酚类等杂质; 碱液加热裂解法和试剂盒法提取的DNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀比值在1.8~2.0的范围内, 说明提取的DNA中含较少的蛋白质、酚类等杂质, 纯度较好。

表3 不同过滤膜组合对细菌的富集效果

Table 3 The concentration effect of bacteria by different combinations of membrane filtration

| 小孔径过滤膜 孔径大小(μm) | 富集后细菌的浓度(CFU/mL) | | | | | |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 聚丙烯膜10 μm | 聚丙烯膜20 μm | 聚丙烯膜40 μm | 尼龙膜15 μm | 尼龙膜40 μm | 尼龙膜60 μm |
| 0.22 | 5.7 $\times 10^7$ | 1.2 $\times 10^8$ | 1.9 $\times 10^8$ | 3.7 $\times 10^8$ | 3.9 $\times 10^8$ | 3.4 $\times 10^8$ |
| 0.45 | 3.9 $\times 10^7$ | 9.6 $\times 10^7$ | 1.0 $\times 10^8$ | 2.2 $\times 10^8$ | 2.1 $\times 10^8$ | 1.9 $\times 10^8$ |

表4 不同提取方法提取细菌DNA纯度的比较

Table 4 Comparison of different extraction method to extract the DNA purity of bacterias

| 比值 | 水煮法 | 碱液加热裂解法 | Triton X-100直接裂解法 | Triton X-100煮沸裂解法 | 试剂盒法 |
|--------------------------------------|------|---------|-------------------|-------------------|------|
| OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ | 1.62 | 1.86 | 0.36 | 1.48 | 2.00 |
| OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀ | 1.04 | 0.89 | 0.26 | 0.97 | 2.15 |

在五种提取方法中,只有用试剂盒法提取的DNA的OD₂₆₀/OD₂₃₀比值高于2.0,说明提取的DNA中去盐较充分,其他的四种方法去盐均不充分。因此,应用试剂盒法提取样品中致泻性大肠杆菌基因组DNA的纯度最好,其次为碱液加热裂解法,水煮法和Triton X-100煮沸裂解法提取DNA的纯度基本一致,Triton X-100直接裂解法提取DNA的纯度最差。

2.2.2 五种DNA提取方法所得DNA多重PCR检出限比较 对两种致泻性大肠杆菌进行多重PCR反应建立的结果见图1,特异性验证结果见图2。在多重PCR反应中,由三条目的条带检测两种致泻性大肠杆菌,在反应中由*O-antigen*基因和*uidA*基因的引物共同鉴定EHEC O157:H7,在178 bp和446 bp处出现两条特异性目的条带,由*ipaH*基因和*uidA*基因的引物共同鉴定EIEC,在303 bp和446 bp处出现两条特异性目的条带,将两种致泻大肠杆菌组合后对三种目的基因进行多重PCR反应,在178、303、446 bp处出现三条特异性目的条带,目的条带与预期大小符合,条带清晰且无非特异性扩增。

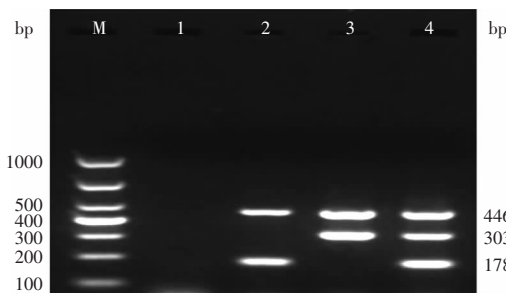


图1 多重PCR反应的建立

Fig.1 Establishment of multiplex PCR

注: M: Marker; 1: 阴性对照; 2: EHEC O157:H7; 3: EIEC; 4: EHEC O157:H7和EIEC。



图2 多重PCR反应特异性验证结果

Fig.2 The specificity of multiple PCR

注: M: Marker; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3: EHEC O157:H7; 4: EIEC; 5: ETEC; 6: EPEC; 7: 大肠杆菌CMCC 44102; 8: 鼠伤寒沙门氏菌; 9: 乙型副伤寒沙门氏菌; 10~12: 单增李斯特菌; 13: 金黄色葡萄球菌; 14: 副溶血性弧菌。

应用五种DNA提取方法对含 7.8×10^7 CFU/mL致泻性大肠杆菌的样品均质液及其10倍梯度稀释液进行基因组DNA的提取,并分别进行多重PCR反应,各种提取方法的检出限检测结果见图3。水煮法提取DNA电泳检测的检出限为 7.8×10^6 CFU/mL,碱液加热裂解法提取DNA电泳检测的检出限为 7.8×10^5 CFU/mL,Triton X-100直接裂解法提取DNA电泳检测的检出

限为 7.8×10^6 CFU/mL,Triton X-100煮沸裂解法提取DNA电泳检测的检出限为 7.8×10^5 CFU/mL,试剂盒法提取DNA电泳检测的检出限为 7.8×10^4 CFU/mL。由不同方法提取的基因组DNA,在多重PCR反应中均可以扩增出目的条带,目的条带与预期大小符合,其中应用试剂盒法提取样品中致泻性大肠杆菌基因组DNA的含量最多,其次为碱液加热裂解法和Triton X-100煮沸裂解法,含量最少的是水煮法和Triton X-

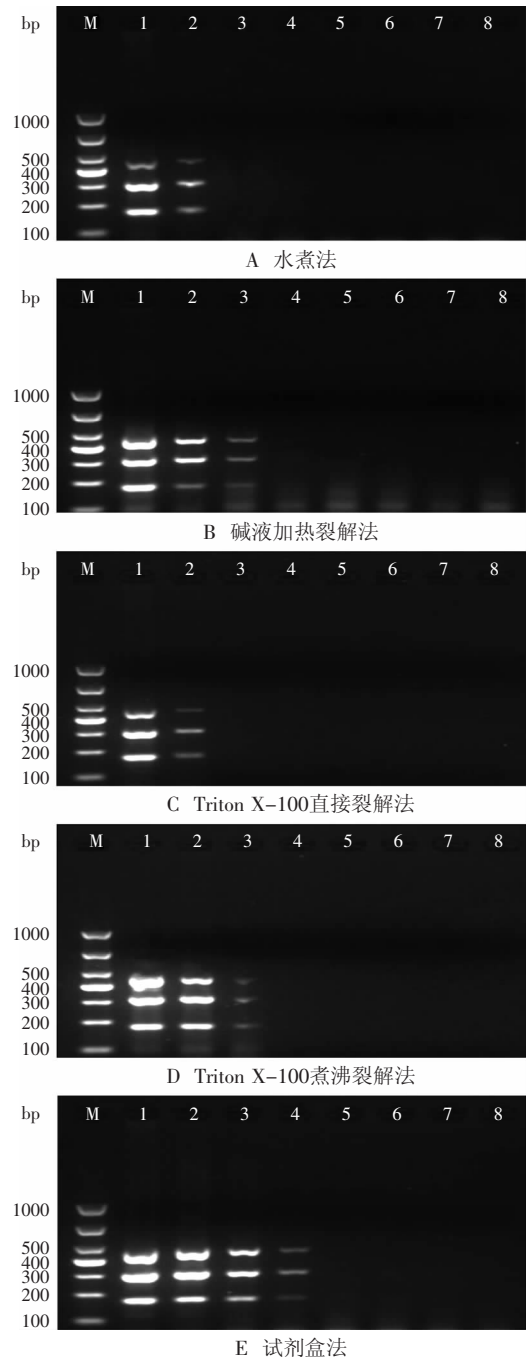


图3 不同DNA提取方法应用于多重PCR方法检出限的比较
Fig.3 Comparison of the detection limit of multiplex PCR by different DNA extraction methods

注: M: Marker; 1: 7.8×10^7 CFU/mL; 2: 7.8×10^6 CFU/mL; 3: 7.8×10^5 CFU/mL; 4: 7.8×10^4 CFU/mL; 5: 7.8×10^3 CFU/mL; 6: 7.8×10^2 CFU/mL; 7: 7.8×10^1 CFU/mL; 8: 阴性对照。

100直接裂解法。综合五种不同的基因组DNA提取方法提取DNA的纯度及提取量,选择试剂盒法对人工接种新鲜莴苣中的EHEC O157:H7和EIEC进行基因组DNA提取。

2.3 人工污染新鲜莴苣的检测

首先应用尼龙膜15 μm+混合膜0.22 μm的过滤膜组合,对含有 7.8×10^7 CFU/mL EHEC O157:H7的样品均质液及其10倍梯度稀释液进行菌体的富集,再应用试剂盒法对各浓度梯度的富集液提取基因组DNA,同样方法处理含有 7.8×10^7 CFU/mL EIEC的样品均质液及其10倍梯度稀释液,用所提取的DNA进行多重PCR扩增,检出限结果见图4,结果显示含原始浓度为 $7.8 \times 10^7 \sim 7.8 \times 10^3$ CFU/mL的菌体样品均质液经尼龙15 μm+混合膜0.22 μm的过滤膜组合富集后用试剂盒法提取DNA,可在多重PCR反应中被检测出。应用优化后方法处理人工接种新鲜莴苣,多重PCR反应可检测出原始浓度最低为 7.8×10^3 CFU/mL的两种致泻性大肠杆菌。而未经菌体富集的人工接种新鲜莴苣样品检出限为 7.8×10^4 CFU/mL。用优化后方法组合处理人工接种新鲜莴苣的检出限降低了10倍,在接种量为10 CFU的条件下,检测时间比未经菌体富集的快1.5 h。

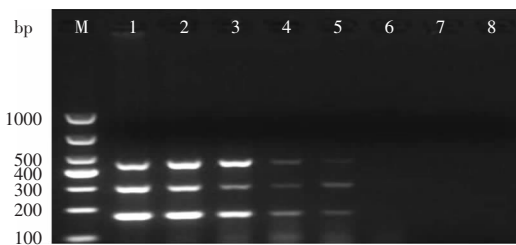


图4 应用优化后方法检测人工接种新鲜莴苣的检出限结果

Fig.4 The detection limit of artificial lettuce infected with two pathogens by the optimized method

注: M: Marker; 1: 7.8×10^7 CFU/mL; 2: 7.8×10^6 CFU/mL;
3: 7.8×10^5 CFU/mL; 4: 7.8×10^4 CFU/mL; 5: 7.8×10^3 CFU/mL;
6: 7.8×10^2 CFU/mL; 7: 7.8×10^1 CFU/mL; 8: 阴性对照。

3 讨论

本研究应用多重PCR检测方法对人工接种EHEC O157:H7和EIEC的新鲜莴苣进行了检测,本研究选取编码EHEC O157:H7O抗原的*O-antigen*基因、编码EIEC侵袭性质粒抗原的*ipaH*基因和编码两种致泻性大肠杆菌产生β-葡萄糖醛酸酶的*uidA*基因为目的基因,设计三条特异性引物检测两种致泻性大肠杆菌,即每种菌由两条特异性引物共同鉴定,避免了假阳性的产生或与其他血清型的致泻性大肠杆菌产生交叉反应,保证了检测方法的准确性,结果显示所建立的多重PCR反应具有良好的特异性。吴家林等^[16]设计了4对特异性引物应用多重PCR方法检测EHEC O157:H7,避免了交叉反应。曲泽慧等^[17]建立的检测产肠毒素大肠杆菌双重PCR检测方法,具有检出率高的优点。

本研究中采用大孔径过滤膜与小孔径富集膜组合的方法对人工接种EHEC O157:H7和EIEC的新鲜

莴苣中两种致泻性大肠杆菌进行洗脱富集,结合试剂盒法提取莴苣样品中的细菌DNA,能够有效降低莴苣样品中两种致泻性大肠杆菌的检出限,节省了检测时间,减少了培养基、食品基质等对多重PCR反应有抑制作用的物质,并且膜过滤方法还具有快速、经济的特点。胡朝友等^[12]应用小孔径过滤膜富集饮用水中的大肠杆菌,应用于TaqMan探针实时荧光PCR检测中,检出限达到1 CFU/mL,低于本研究中的检出限,这可能是由于此文献与本研究的检测方法、样品种类、DNA提取方法、细菌模板DNA和引物之间抑制作用等因素不同,造成了灵敏度上的差异。本研究检测人工接种EHEC O157:H7和EIEC的新鲜莴苣的检出限为 7.8×10^3 CFU/mL,此结果低于舒畅^[3]和王慧等^[18]应用多重PCR方法检测人工污染食品中多种致病菌的检出限,与贺晨^[9]和王艳君等^[20]的结果接近,这种灵敏度上的差异也可能是由于样品种类、细菌富集方法、DNA提取方法、多重PCR反应体系与条件等因素不同造成的^[19]。

4 结论

本研究通过对人工接种新鲜莴苣中两种致泻性大肠杆菌的富集及DNA提取方法优化的研究发现,应用尼龙过滤膜15 μm+混合膜0.22 μm的过滤膜组合对菌体进行富集,采用试剂盒法提取基因组DNA,结合多重PCR方法检测人工接种EHEC O157:H7和EIEC的新鲜莴苣,检出限为 7.8×10^3 CFU/mL,与未经菌体富集的样品相比,检出限降低了10倍,检测时间减少了1.5 h。此方法可快速、特异、灵敏的检测出两种致泻性大肠杆菌,可应用于新鲜莴苣中EHEC O157:H7和EIEC的快速检测。

参考文献

- [1] Son I, Binet R, Maounounen-Laasri A, et al. Detection of five Shiga toxin-producing *Escherichia coli* genes with multiplex PCR[J]. Food Microbiology, 2014, 40: 31-40.
- [2] Kumar A, Grover S, Kumar Batish V. Application of multiplex PCR assay based on uidR and fliCH7 genes for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk[J]. The Journal of general and applied microbiology, 2013, 59(1): 11-19.
- [3] 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.
- [4] 翁思聪, 朱军莉, 冯立芳, 等. 1种选择性富集沙门氏菌, 志贺氏菌, 金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌共增菌培养基SSSV研究[J]. 中国食品学报, 2013(1): 19-28.
- [5] 郝玉芹, 孙皆宜, 李艾, 等. 正交优化多重PCR反应体系检测3种食源性致病菌的研究[J]. 安徽农业科学, 2010(2): 602-605.
- [6] 白莉, 王伟, 胡豫杰, 等. 免疫磁珠富集联合荧光定量PCR快速检测牛肉馅中产志贺毒素大肠埃希菌O26:H11[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(1): 30-35.
- [7] 吕晓萌, 胡文忠, 冯叙桥, 等. PCR法检测大肠杆菌的增殖条件优化研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(17): 134-136.
- [8] Porteous M L A, Armstrong J L A. A simple mini-method to

(下转第270页)

加工、产品运输及贮藏过程中,仍可保持较好品质而不受外界环境温度变化的影响。而且,几种果酱样品的变化趋势相同,具有相似的粘弹性。

3 结论

在普通蛋黄酱中添加一定量的可溶性膳食纤维,可制成具有降低胆固醇、预防高胆固醇血脂功能的蛋黄酱产品。实验优化所得最佳加工工艺条件为:蛋黄11.0%,玉米色拉油74%,RB-SDF 2.0%;搅拌时间为20 min,搅拌速率为4档(14400 r/min)。低胆固醇蛋黄酱中胆固醇含量为1.26 mg/g,低于普通蛋黄酱(2.21 mg/g)。说明添加可溶性膳食纤维能降低胆固醇含量。低胆固醇蛋黄酱与市售的3种蛋黄酱均呈现剪切变稀的弱凝胶性。随着外界环境温度的改变,产品品质受影响小。就四种蛋黄酱样品的稳定性而言,低胆固醇蛋黄酱弱于丘比蛋黄酱和香甜酱,但强于丘比千岛酱。

参考文献

- [1] 边昶. 高胆固醇血症致动脉粥样硬化的若干机制研究[D]. 杭州:浙江大学,2007.
- [2] Froning G, Wehling R, Cuppett S, et al. Extraction of cholesterol and other lipids from dried egg yolk using supercritical

carbondioxide[J]. J Food Sci, 1990,55(1):95-98.

- [3] 蒋丹丹. 高效降解胆固醇菌株的筛选及其在食品中的应用[D]. 北京:中国农业大学,2007:12-58.
- [4] Dietary reference intakes proposed definition of dietary fiber [M]. Washington DC:National Academy Press,2001:1-64.
- [5] Kimura Y, Watanabe K, Okuda H. Effects of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats[J]. J Ethnopharmacol, 1996,54:47-54.
- [6] Carr TP, Wood KJ, Hassel CA, et al. Raising intestinal contents viscosity leads to greater excretion of neutral steroids but not bile acids in hamsters and rats[J]. Nutr Res, 2003,23:91-102.
- [7] 白利,王瑞雪,王际辉,等. 邻苯二甲酸(OPA)法快速测定蛋黄粉中的胆固醇含量[J]. 中国酿造,2010,5:162-164.
- [8] 陆宁,钟瑾. 蛋黄酱加工技术及稳定性研究[J]. 食品科学, 1998,19(5):26-29.
- [9] 杨述,高昕,于甜,等. 4种蛋黄酱的流变学特性比较研究[J]. 食品科学,2011,32(15):121-125.
- [10] 陈海华,许时婴,王璋. 亚麻籽胶的流变性质[J]. 无锡轻工大学学报,2004,23(1):30-35.
- [11] 于甜. 软质食品流变学特性及测量方法的研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2012.

(上接第259页)

- [J]. Advances in Colloid and Interface Science,2009,149(1):19-27.
- [21] 卢辛成,蒋剑春,孙康,等. 氯化锌法制备杉木屑活性炭的研究[J]. 林产化学与工业,2013,33(3):59-63.
- [22] 谭非,王彬元,林金春,等. 微波加热化学活化制备活性炭的优化工艺研究[J]. 生物质化学工程,2010,44(1):1-4.
- [23] 蒋应梯,陈顺伟,庄晓伟. 油茶壳用微波加热磷酸法制活性炭[J]. 生物质化学工程,2011,45(2):34-36.
- [24] 郭磊,余勇,孙雨薇,等. 香榧果壳活性炭的制备工艺及影

响因素研究[J]. 包装与食品机械,2014,32(3):17-21.

- [25] Pereira R G, Veloso C M, Silva N M, et al. Preparation of activated carbons from cocoa shells and siriguela seeds using H₃PO₄ and ZnCl₂ as activating agents for BSA and α-lactalbumin adsorption[J]. Fuel Processing Technology,2014,126(Complete):476-486.
- [26] 刘晓红,王省伟,赵博,等. 核桃果皮基活性炭的氯化锌活化制备及工艺优化[J]. 光谱学与光谱分析,2014,34(12):3350-3353.

(上接第264页)

- extract DNA directly from soil for use with polymerase chain reaction amplification[J]. Current microbiology, 1993,27(2):115-118.
- [9] 李睿,张忠美,戴诗皎,等. 食品中大肠杆菌 O157 的 PCR 检测与 wzy 基因的测序分析[J]. 食品科学,2010(12):193-196.
- [10] Binet R, Deer D M, Uhlfelder S J. Rapid detection of Shigella and Enteroinvasive *Escherichia coli* in produce enrichments by a conventional multiplex PCR assay[J]. Food Microbiology,2014(40):48-54.
- [11] 郝江燕,胡文忠,何煜波,等. 鲜活农产品中大肠杆菌的 PCR 检测[J]. 食品工业科技,2013,34(17):150-153.
- [12] 胡朝友,傅春玲,张宏斌. 饮用水中大肠埃希菌富集和 DNA 提取方法优化[J]. 中国食品卫生杂志,2014,26(1):36-39.
- [13] 邵碧英,陈彬,汤敏英,等. 沙门氏菌 DNA 提取及 PCR 反应条件的优化[J]. 食品科学,2007,28(7):331-334.
- [14] 赵晓丽,李晓霞,刘德华,等. 3种方法对临床菌血症样本

细菌 DNA 提取的比较[J]. 昆明医科大学学报,2014,35(4):117-120.

- [15] 魏华,孙立国,朱晶,等. 不同的 DNA 提取法对两种常见医院感染菌 ERIC-PCR 鉴定的影响研究[J]. 中华医院感染学杂志,2007,17(9):1044-1047.
- [16] 吴家林,肖勇,凌霞,等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 多重 PCR 快速检测研究[J]. 现代预防医学,2009,36(1):117-119.
- [17] 曲泽慧,陈佩佩,张爱芹,等. 产肠毒素大肠杆菌双重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医,2013,40(7):65-68.
- [18] 王慧,朱瑞良,谭燕玲,等. 多重 PCR 检测三种重要食源性致病菌方法的建立及应用[J]. 中国农业科学,2011,44(11):2334-2340.
- [19] 贺晨,孙鸿燕,邵丽筠,等. 4种病原菌多重 PCR 检测方法建立[J]. 中国公共卫生,2011,27(4):525-527.
- [20] 王艳君,张春晖,王玉芬,等. 多重 PCR 检测冷却肉中的 3 种致病菌[J]. 食品与发酵工业,2007,33(3):111-114.