

变性高效液相色谱检测食品中致泻性大肠杆菌

徐君怡¹, 曹际娟^{1*}, 郑秋月¹, 赵昕¹, 闫平平²

(¹ 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116015)

(² 辽宁师范大学生命科学院, 大连 116021)

摘要:【目的】应用多聚酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 结合变性高效液相色谱 (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC) 技术建立食品中致泻性大肠杆菌的快速检测方法。【方法】分别根据 4 种致泻性大肠杆菌的特异性毒力因子基因序列设计引物, PCR 扩增产物经变性高效液相色谱进行快速检测。以肠产毒性大肠杆菌等 32 株试验菌株做特异性检测; 4 种致泻性大肠杆菌标准菌株稀释成不同梯度, 做灵敏度检测。【结果】试验结果表明该方法有很好的特异性, 且灵敏度高, 检测限可达到: 肠产毒性大肠杆菌 27 CFU/mL、肠致病性大肠杆菌 33 CFU/mL、肠出血性大肠杆菌 25 CFU/mL、肠侵袭性大肠杆菌 42 CFU/mL。【结论】该方法可以快速、准确地检测食品中的致泻性大肠杆菌, 是食品中病原菌检测的新技术和新方法。

关键词: 致泻性大肠杆菌; 多聚酶链式反应; PCR; 变性高效液相色谱; DHPLC

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1526-06

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 是人和动物肠道中的重要菌群, 通常情况下不致病。但是, 环境中也存在一些能够导致人类腹泻的大肠杆菌, 被通称为致泻性大肠杆菌或致病性大肠杆菌^[1]。这些致泻性的大肠杆菌可根据其特异性毒力因子进行分类, 并且只能通过该特性进行区分。因此, 对致泻性大肠杆菌的鉴定首先是分离并确认是否是大肠杆菌, 然后再进行毒力因子的鉴别。致泻性大肠杆菌包括: 肠产毒性大肠杆菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)、肠致病性大肠杆菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)、肠出血性大肠杆菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)、肠侵袭性大肠杆菌 (enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC)、肠聚集性大肠杆菌 (enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC)、肠弥漫黏附性大肠杆菌 (Diffusely adherent *Escherichia coli*, DAEC) 和其他一些至今尚未明确分类的菌株^[1,2]。其中, 只有前 4 种与食物和水生疾病有关。

肠致病性大肠杆菌是引起全球婴幼儿急、慢性腹泻和成人散发腹泻的一类重要病原菌。其毒力岛编码宿主肠内细胞黏附和脱落损伤 (attaching and effacing lesions, AE 损伤) 的所有基因^[3]。肠产毒性大肠杆菌是发展中国家婴儿腹泻的重要病因, 也是儿童、成人以及旅游者腹泻的病因之一, 其菌株可产生耐热毒素 (heat stable enterotoxin, ST) 或/和不耐热毒素 (heat labile enterotoxin, LT)^[2]。肠出血性大肠杆菌是全球重要的病原菌^[4], 该菌能产生一种黏附素可使细菌黏附在盲肠上, 并产生志贺氏样毒素 Stx1 (Shiga-like toxin 1, Stx1) 和 Stx2 (Shiga-like toxin 2, Stx2)^[5]。感染此病菌的人会出现严重腹泻、便血、发烧、腹痛等病症, 病情严重者更会感染肾衰竭并发症, 甚至导致死亡。肠侵袭性大肠杆菌具有与志贺氏菌同样毒力, 可侵入大肠上皮细胞, 形成局部炎症和溃疡^[6]。

对于食源性致病菌的检测主要有经典的培养鉴定方法、酶联免疫吸附试验、多聚酶链式反应 (PCR)、

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划课题 (2006BAK02A13)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-411-82863963; Fax: +86-411-82867690; E-mail: cjj0909@sina.com

作者简介: 徐君怡 (1979-), 女, 辽宁大连人, 中级工程师, 硕士, 目前从事生物安全检验、研究工作。E-mail: skyxjy@yahoo.com

收稿日期: 2008-05-19; 修回日期: 2008-07-03

DNA 杂交技术及实时 PCR 技术等。目前仍然主要采用常规增菌培养、生化鉴定的方法,大多要耗费 6~8 d 时间,而且程序复杂,所用试剂繁多,费时费力,检测灵敏度低,假阴性比较严重。

变性高效液相色谱技术(DHPLC)作为近几年才发展起来的新技术,一些领域已建立了快速、自动化核酸分析新方法^[7-9]。DHPLC 利用样品分子通过离子对固定相亲和力的差异,在用流动相洗脱时,不同大小或者不同序列的核苷酸片段分子在固定相上移动速率不同而达到分离的目的^[10]。因此,可利用 DHPLC 区分不同长度 DNA 片段的特点,根据各种食源性致病菌特有基因序列,设计引物进行 PCR 扩增,用 DHPLC 分析检测,一次可同时分析数百个样本,达到快速检测食品中病原微生物的目的。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒(TakaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction kit)、Taq 酶及 PCR 缓冲液等试剂均购自 TaKaRa 公司;普通 PCR 仪 PE24000(PerkinElmer 公司,美国);变性高效液相色谱仪 NAV-99-4500(Transgenomic 公司,美国);高速离心机 centrifuge 5804(Eppendorf 公司,德国)。

1.1.2 菌种:本研究所用标准菌株分别购自美国 ATCC 标准生物制品收藏中心和中国医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC),其他菌株为本实验室分离鉴定获得的分离株(表 1)。

表 1 试验菌种及其编号
Table 1 Tested strains and strains number

Bacterial strain	No. of strains showing positive PCR result/No. of strains tested			
	<i>bfp</i>	<i>lt</i>	<i>rfbE</i>	<i>ial</i>
<i>Enteropathogenic E. coli</i>				
O111:nm ATCC 43887	1/1	0/1	0/1	0/1
O86:K61 CIQ ^a	1/1	0/1	0/1	0/1
O26:K60 CIQ	2/2	0/2	0/2	0/2
O44:K74 CIQ	1/1	0/1	0/1	0/1
O119:K69 CIQ	1/1	0/1	0/1	0/1
O114:K90 CIQ	2/2	0/2	0/2	0/2
<i>Enterotoxigenic E. coli</i>				
O78:H11 ATCC 35401	0/1	1/1	0/1	0/1
O78:K80 CIQ	0/2	2/2	0/2	0/2
O25:K19 CIQ	0/1	1/1	0/1	0/1
<i>Enterohemorrhagic E. coli</i>				
O157:H7 ATCC 35150	0/1	0/1	1/1	0/1
O157:H7 CIQ	0/1	0/1	1/1	0/1
<i>Enteroinvasive E. coli</i>				
O124:nm ATCC 43893	0/1	0/1	0/1	1/1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8379	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Escherichia coli</i> CIQ	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>Salmonella. typhimurium</i> ATCC 49416	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Salmonella. cholerae</i> ATCC 10708	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Salmonella. enteritidis</i> ATCC 13076	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29245	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Proteus vulgaris</i> CMCC 49027	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	0/1	0/1	0/1	0/1

a CIQ, Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of China.

1.2 引物及目的基因的选择

参考相关文献^[1]确定目的基因,经设计、筛选挑取特异性引物,用这些引物对各细菌的基因组 DNA 进行 PCR 扩增检测其特异性,最终确定用于检测的目的基因及其引物见表 2。

1.3 反应体系优化

对各种致泻性大肠杆菌进行选择培养,提取基因组 DNA。各个引物对进行相同条件反应,摸索出最佳模板浓度和引物浓度,然后进行 *Taq* 酶、 Mg^{2+} 、循环条件等因素的优化,确定最佳反应体系。

表 2 目的基因及其引物序列
Table 2 Primers used in this study for amplification of diarrheagenic *E.coli* genes

Strain	Gene	Primer sequence (5'→3')	Size of product/bp
enterotoxigenic <i>E.coli</i>	<i>lt</i>	GCACACGCAGCTCCTCAGTC TCCTTCATCCTTTCAATGGCTTT	218
enteropathogenic <i>E.coli</i>	<i>bfp</i>	GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT	294
enterohemorrhagic <i>E.coli</i>	<i>rfbE</i>	ATTGCGCTGAAGCCTTTG CGAGTACATTGGCATCGTG	499
enteroinvasive <i>E.coli</i>	<i>ial</i>	CTGGATGGTATGGTGAGG GGAGGCCAACAAATTATTCC	320

1.4 特异性试验

取表 1 中所列试验菌种,经培养后分别提取基因组 DNA,建立一个模板库。按照 1.4.1 PCR 扩增条件和 1.4.2 DHPLC 分析条件进行病原菌的 PCR-DHPLC 特异性试验。

1.4.1 PCR 扩增条件: PCR 反应采用 25 μ L 体系,反应条件:94 3 min;94 60 s,60 60 s,72 60 s,35 个循环;72 7 min 结束反应;4 保存反应产物。

1.4.2 DHPLC 分析条件: 色谱柱:PS-DVB & C18 DNASep 色谱柱(4.6 mm \times 50 mm,粒度 3 μ m);柱温:50 ;流动相:缓冲溶液 A 浓度为 50.2%,缓冲溶液 B 浓度为 49.8%;流速:0.9 mL/min;检测器:荧光检测器(光源:150W Xenon 灯;激发谱带宽:15 nm;发射谱带宽:15.3 nm;检测灵敏度:在波长 350 nm 积分 2 s);上样量:PCR 产物 5 μ L。

1.5 灵敏度试验

分别取肠产毒性大肠杆菌(EPEC)ATCC 35401、肠致病性大肠杆菌(EPEC)ATCC 43887、肠出血性大肠杆菌(EHEC)ATCC 35150、肠侵袭性大肠杆菌(EIEC)ATCC 43893 标准菌株在 36 培养 24 h,测其 OD 值,估计其菌数,然后按 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 等倍数梯度稀释,取几个适宜梯度的菌液进行平板计数,重复 2 次,取平均值确定其菌浓度。每个梯度菌液采用试剂盒提取法制备模板 DNA,进行 PCR-DHPLC 检测,将检测结果与平板计数结果比较,确定反应体系的灵敏度。

1.6 食品检测模型试验

对食品样品进行 PCR 实测试验,并同时同时进行细菌分离培养鉴定,以验证 PCR 检测结果。

2 结果

2.1 优化的反应体系

经过优化得到的最佳反应体系为:10 \times PCR 缓冲液 2 μ L、上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L、dNTP(10 mmol/L)2 μ L、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.2 μ L、水 16.8 μ L、模板 DNA 2 μ L,加 dH₂O 补足 25 μ L。最佳反应条件 94 3 min;94 60 s,60 60 s,72 60 s,35 个循环;72 7 min 结束反应;4 保存反应产物。

2.2 特异性试验

取表 1 中所列的大肠埃希氏菌等 32 株试验菌种的基因组 DNA 为模板,分别以 *bfp*、*lt*、*rfbE*、*ial* 为目的基因进行 PCR 扩增,用 DHPLC 分析检测,4 种不同类型的致泻性大肠杆菌 DHPLC 特异性检测图谱如图 1A-D 所示,箭头所指的峰型为各致泻性大肠杆菌的特异性吸收峰。结果显示:以 *bfp* 为目的基因进行检测,6 种血清型的 8 株肠致病性大肠杆菌(EPEC)全部扩增出了目的片段,而其他非 EPEC 菌株则全部为阴性结果(图 1-A);以 *lt* 为目的基因进行检测,3 个血清型的 4 株肠产毒性大肠杆菌(EPEC)全部扩增出了目的片段,而非 EPEC 菌株则全部为阴性结果(图 1-B);以 *rfbE* 为目的基因进行检测,2 株肠出血性大肠杆菌(EHEC)O157:H7 全部扩增出了目的片段,而非 EHEC 菌株则全部为阴性结果(图 1-C)。以 *ial* 为目的基因进行检测,1 株肠侵袭性大肠杆菌(EIEC)扩增得到目的片段,其余非 EIEC 菌株全部为阴性结果(图 1-D)。具体结果如表 1 所示。上述结果表明:本实验设计的 4 种引物适用于 PCR-DHPLC 检测致泻性大肠杆菌,具有很高的种间特异性。

图 1 4 种不同类型的致泻性大肠杆菌 DHPLC 特异性检测图谱

Fig. 1 DHPLC chart of enteroinvasive *E.coli*. A: enteropathogenic *E.coli*; B: enterotoxigenic *E.coli*; C: enterohemorrhagic *E.coli*; D: enteroinvasive *E.coli*.

2.3 灵敏度试验

分别对肠产毒性大肠杆菌(ETEC)ATCC 35401、肠致病性大肠杆菌(EPEC)ATCC 43887、肠出血性大肠杆菌(EHEC)ATCC 35150、肠侵袭性大肠杆菌

(EIEC) ATCC 43893 标准菌株在 36 培养 24 h, 按 1.5 所述的灵敏度试验方法进行平板计数, 同时提取制备模板 DNA 进行 PCR-DHPLC 检测。试验结果表明, 本研究所建立的方法可检测出 10^{-7} 浓度的

致泻性大肠杆菌标准菌株,即检测灵敏度可达到:肠产毒性大肠杆菌(EPEC ATCC 35401) 27 CFU/mL、肠致病性大肠杆菌(EPEC ATCC 43887)33 CFU/mL、肠出血性大肠杆菌(EHEC ATCC 35150)25 CFU/mL、肠侵袭性大肠杆菌(EIEC ATCC 43893)42 CFU/mL。

2.4 食品检测试验

2007年10月至2008年5月,将本方法建立的致泻性大肠杆菌PCR-DHPLC检测体系用于9大类1256份进出口农畜产食品样品中致泻性大肠杆菌的实际检验,同时采用国家标准方法(GB/T 4789.6-2003)进行比较。经统计,用PCR-DHPLC方法检出的21份阳性样本采用经典的国家标准(GB)方法验证,均证实为阳性。PCR-DHPLC方法检测出的阴性结果与GB方法结果符合且耗时较短。试验中PCR-DHPLC方法吻合率为100%,显示该方法具有广泛而且良好的适用性。致泻性大肠杆菌采用PCR-DHPLC和GB两种方法检测结果的比较见表3。

表3 采用PCR-DHPLC和GB方法对致泻性大肠杆菌检测结果的比较

Table 3 Comparison of the results of diarrheagenic *E. coli* detection with PCR-DHPLC method and GB method

Statistical result	PCR-DHPLC method	GB method
Positive result	EPEC 9	EPEC 9
	EPEC 11	EPEC 11
	EHEC 0	EHEC 0
	EIEC 1	EIEC 1
Negative result	1235	1235
Positive%	1.67%	1.67%
Total	1256	1256

3 讨论

致泻性大肠杆菌传统检测方法操作繁琐,包括增菌、生理生化鉴定、血清学鉴定和肠毒素鉴定等操作,所需检验时间长;而且病原菌在食品样品中存在的数量相对较少,使用常规的检测方法对该病原菌的检测和计数都非常困难。目前国内外常用的快速检测方法也都存在着一定的局限性和不足:如荧光免疫检测法(VIDAS)只能检测肠出血性大肠杆菌O157:H7,检测成本高,且存在着假阳性结果;实时荧光PCR技术具有特异性强,灵敏度高优势,却存在检测成本高,荧光探针保存时间短等不足。PCR-凝胶电泳检测技术虽然检测成本低,但结果仅靠凝胶上的条带大小判断,如果产物条带较弱,扩增片段大小相差不多时,很难通过肉眼得到准确结果。PCR-DHPLC这一新型

检测技术,融合了PCR快捷、特异和DHPLC灵敏、实时、高通量的优势,操作安全且可同时检测数个样品,使检测效率和检测效果都大大提高。

意大利的Franciosa等^[11]报道了利用变性高效液相色谱鉴定肉毒杆菌神经毒素的A、B、E和F型基因的研究,并指出DHPLC技术可以用于食品病原微生物的检测。Hurtle等^[8]利用DHPLC能够分析rRNA序列变化的特性,建立了鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)和炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)的特异性吸收谱图,为这两种菌的高通量检测提供了新的方法。有关微生物DHPLC检测技术的研究,在国内文献中主要在医学、畜牧领域有研究报道。如顾颖等^[12]报道在应用变性高效液相色谱进行高通量筛查基因突变的研究中,利用DHPLC对已知序列的含外显子7的斑马鱼P53基因片段PCR产物进行了突变检测。刘妹等^[13]研究了使用不同样品稀释液及变性高效液相色谱(DHPLC)梯度条件对定量检测PER1基因表达的影响。国内利用DHPLC方法检测食品微生物技术的研究还未见相关报道。本研究中主要采用非变性DHPLC技术,建立食品中致泻性大肠杆菌的特异性吸收谱图,是国内利用PCR-DHPLC方法对病原微生物进行快速检测的创新性研究。

在检验检疫工作中,非标准的快速检测方法只能做为标准方法的辅助手段,用于大批量样品的高通量筛选、检测,最后检测结果的确还是要参照国家标准和行业标准的规定进行。在本研究中,用PCR-DHPLC方法检出的21份阳性样本采用经典的国家标准(GB)方法验证,均证实为阳性;PCR-DHPLC方法检测出的阴性结果与GB方法检测结果也完全符合。试验中PCR-DHPLC方法吻合率为100%,显示该方法具有广泛而且良好的适用性。

引物的设计是PCR-DHPLC检测技术的核心所在,直接影响到检测方法的特异性及灵敏度。在引物设计过程中,我们力求用生物信息学的手段从理论上避免背景和非特异产物的产生,同时在设计中考虑到引物的长度、二级结构、GC含量等因素可能会对扩增产生的影响,以确保其在反应过程中能有效的与模板结合,提高扩增效率,增加检测的灵敏度。本实验通过对4种致泻性大肠杆菌特异基因片段的筛选、PCR引物的设计、反应体系的建立和优化,建立了快速高效的食品中致泻性大肠杆菌PCR-DHPLC检测方法,完全适用于对食品中致泻性大肠杆菌的快速检测。

参 考 文 献

- [1] Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol*, 1998, 11: 132–201.
- [2] Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteroinvasive, entero- hemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis*, 1987, 155: 377–389.
- [3] Jerse AE, Yu J, Tall BD, *et al*. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 7839–7843.
- [4] Tesh V. Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: role of molecular crosstalk. *Trends Microbiol*, 1998, 6: 228–233.
- [5] Tesh VL, O'Brien AD. The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Mol Microbiol*, 1991, 5: 1817–1822.
- [6] 王冰, 修志龙, 唐焕文. 致病性大肠杆菌 O157: H7 的基本特性与基因组研究进展. 自然杂志(Chinese Journal of Nature), 2003, 25: 164–166.
- [7] Barlaan EA, Sugimori M, Furukawa S, *et al*. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Microbiol Methods*, 2005, 61(3): 399–412.
- [8] Hurtle W, Shoemaker D, Henchal E, *et al*. Denaturing HPLC for identifying bacteria. *Biotechniques*, 2002, 33(2): 386–391.
- [9] Hurtle W, Bode E, Kaplan RS, *et al*. Use of denaturing high-performance liquid chromatography to identify *Bacillus anthracis* by analysis of the 16S-23S rRNA interspacer region and *gyrA* gene. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(10): 4758–4766.
- [10] Colosimo A, Guida V, Flex E, *et al*. Use of DHPLC for rapid screening of recombinant clones. *Biotechniques*, 2003, 34: 706–708.
- [11] Franciosa G, Pourshaban M, De Luca A, *et al*. Identification of type A, B, E, and F botulinum neurotoxin genes and of botulinum neurotoxicogenic clostridia by denaturing high-performance liquid chromatography. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 4170–4176.
- [12] 顾颖, 李延, 陈蔚丰, 等. 变性高效液相色谱在大通量筛查基因突变中的应用. 环境化学(Environmental Chemistry), 2006, 25(3): 336–339.
- [13] 刘姝, 蔡彦宁, 冯秀丽, 等. 改进竞争性 RT-PCR 法在定量 PER1 基因表达中的应用. 基础医学与临床(Basic & Clinic Medicine), 2005, 25(5): 409–413.

Denaturing high-performance liquid chromatography for identifying four categories of diarrheagenic *Escherichia coli*

Junyi Xu, Jijuan Cao^{*}, Qiuyue Zheng, Xin Zhao, Pingping Yan

⁽¹⁾Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of China, Dalian 116001, China

⁽²⁾College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116021, China

Abstract: [Objective] We report a new molecular technique for the analysis of four categories of diarrheagenic *Escherichia coli* based on the separation of PCR-amplified target fragments by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). [Methods] Enteropathogenic *E. coli*, enterotoxigenic *E. coli*, enterohemorrhagic *E. coli* and enteroinvasive *E. coli* were identified by analyzing four specific virulence genes. [Results] A total of 32 bacterial strains were tested, giving no false-positive or false negative results. The detection limits were as low as: ETEC 27 CFU/mL, EPEC 33 CFU/mL, EHEC 25 CFU/mL and EIEC 42 CFU/mL. [Conclusion] The data suggest that PCR-DHPLC will be useful for diarrheagenic *Escherichia coli* detection and identification.

Keywords: diarrheagenic *Escherichia coli*; Polymerase Chain Reaction; PCR; denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)

Supported by the Key Projects in the National Science and Technology Pillar Program in the Eleventh Five-year Plan Period (2006BAK02A13)

^{*}Corresponding author. Tel/Fax: +86-411-82863963; Fax: +86-411-82867690; E-mail: cjj0909@sina.com

Received: 19 May 2008/ Revised: 3 July 2008