

畜禽肉沙门氏菌和大肠杆菌 O157 多重 PCR 检测研究

杨小鹏^{1,2} 吴清平^{1*} 张菊梅¹ 徐晓可² 李程思^{1,2}

(1. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(2. 广东环凯微生物科技有限公司 广州 510070)

摘要: 沙门氏菌和大肠杆菌O157 都是目前世界公认引起食源性疾病的重要致病菌。本研究针对致病菌传统检测方法耗时长、过程繁琐的缺点,建立了同时检测畜禽肉及其制品中沙门氏菌和大肠杆菌O157 的多重PCR分子检测方法。结果表明:分别针对沙门氏菌侵袭基因*invA*、大肠杆菌O157 抗原基因*rfbE*建立的多重PCR方法可简便、快速、灵敏地实现对沙门氏菌和大肠杆菌O157 的同时检测,整个过程在 9 h~10 h内完成,人工污染猪肉检测限分别达到 2.4×10^2 cfu/mL(沙门氏菌)和 2.2×10^2 cfu/mL(大肠杆菌O157);为食源性致病菌的检测提供了理想手段,有良好的应用前景。

关键词: 畜禽肉, 多重 PCR, 沙门氏菌, 大肠杆菌 O157

Studies on Detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157 in Meat and Other Animal Products by Multiplex PCR Assay

YANG Xiao-Juan^{1,2} WU Qing-Ping^{1*} ZHANG Ju-Mei¹ XU Xiao-Ke² LI Cheng-Si^{1,2}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

(2. Guangdong Huankai Microbial Science and Technology Limited Company, Guangzhou 510070)

Abstract: A rapid multiplex PCR (m-PCR) method that allows the simultaneous detection, in a single tube, of two commonly encountered food-borne pathogens in meat and other animal products was developed. The invasion protein gene (*invA*) of *Salmonella* spp. and *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157 were used as the gene targets. The multiplex PCR assay was specific and rapid, with a turnaround time of 9 h~10 h. While the detection limit is 2.4×10^2 cfu/mL of *Salmonella* spp. and 2.2×10^2 cfu/mL of *E. coli* O157 respectively when detecting the artificially contaminated pork meat with incubation at 37°C for 4 h. The m-PCR assay developed in this study could provide a cost-effective and informative supplement to conventional microbiological methods for routine monitoring of food.

Keywords: Meat, Multiplex PCR, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157

无论在发达国家还是发展中国家, 由病原微生物引起的食源性疾病已成为影响食品安全的重要原因, 给人们健康和社会带来严重危害。沙门氏菌 (*Salmonella* spp.)、大肠杆菌 O157 (*Escherichia coli* O157) 是目前世界公认引起食源性疾病的重要致病菌, 主要通过食物和饮水传播, 肉及肉制品的污染率最高。沙门氏菌感染后可引起胃肠炎、败血症, 大肠杆菌 O157 感染后可并发溶血性尿毒症。目前, 包括我国在内的许多国家对这些致病菌的检验大多仍沿用传统的细菌培养及鉴定方法, 检测周期长、操作繁琐、灵敏度低, 而且每次只能检测出一种致病菌, 面对日益增加的多重混合污染, 目前的诊断方法显得严重滞后。因此, 建立快速敏感和特异的检测方法对于尽快明确致病因素和采取有效的预防和治疗措施都是非常必要的。多重 PCR 技术可以在一个反应管中同时检测多个病原微生物, 具有高效、低成本、速度快等优点, 一经提出, 即得到众多研究者的青睐, 目前已在多种病原微生物的检测中得到了应用。本研究针对致病菌传统检测方法中存在的缺点, 建立同时检测畜禽肉及其制品中沙门氏菌和大肠杆菌 O157 的多重 PCR 检测方法, 为食品安全监控、公共卫生保障及口岸各类食品的检验检疫提供了良好的检测手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 大肠杆菌 10 株, 其中 5 株为大肠杆菌 O157 菌株, 沙门氏菌 10 株, 其它菌株 7 株, 共 27 株菌株。

1.1.2 试剂: Taq 酶、dNTPs 购自晶美生物工程有限公司, 引物由北京赛百胜生物公司合成。

1.1.3 仪器: 凝胶成像分析系统 UV (英国)、PCR 仪 PE2400(德国)、梯度 PCR 仪(美国)、核酸蛋白分析仪 DU640(美国)。

1.2 DNA 抽提

1) 1.5 mL 菌液, 8000 r/min 离心 10 min, 去上清液; 2) 加 567 μ L TE 悬浮沉淀, 并加 30 μ L 100g/L SDS, 3 μ L 20 mg/mL 蛋白酶 K, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h; 3) 加 100 μ L 5 mol/L NaCl, 混匀; 4) 加 80 μ L CTAB/NaCl 溶液, 混匀, 65 $^{\circ}$ C 保温 20 min; 5) 用等体积酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1, V/V/V) 抽提,

10000 r/min 离心 10 min, 将上清液移至干净离心管; 6) 用等体积氯仿: 异戊醇(24:1, V/V) 抽提, 取上清液移至干净离心管中; 7) 加 1 倍体积异丙醇, 颠倒混合, 室温下静置 30 min, 沉淀 DNA; 8) 用玻棒捞出 DNA 沉淀, 70% 乙醇漂洗后, 吸干, 溶解于 100 μ L TE, -20° C 保存。

1.3 多重 PCR 检测及优化

以编码沙门氏菌侵袭蛋白(Invasion protein, Inv) 的主要基因 *invA*^[1,2] 作为检测沙门氏菌的靶基因, 多重 PCR 扩增引物^[3] 碱基序列为: F- ATCGGCGTT ATCCCTTTCTCTGGTG 和 R-ATGTTGTCCTGCCC CTGGTAAGAGA(扩增产物 495 bp); 以编码大肠杆菌 O157 菌株 O157 抗原的特异性基因 *rfbE*^[4] 作为检测大肠杆菌 O157 的靶基因, 多重 PCR 扩增引物^[5] 碱基序列为: F-AACGGTTGCTCTTCATTAG 和 R-GAGACCATCCAATAAGTGTG(扩增产物 678bp)。

以标准菌株 *S.typhi* CMCC50115 和 *E.coli* O157 NCTC12900 提取的等量混合 DNA 为模板, 同时加入两对引物进行多重 PCR 扩增, 对多重 PCR 各反应条件进行优化, 建立最优化反应模式。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并于 UV 凝胶成像系统分析结果。

1.4 多重 PCR 特异性与敏感性检测

在实验收集的 27 株菌株范围内进行引物及多重 PCR 特异性验证, 并测定多重 PCR 纯菌及样品检测灵敏度。

1.5 样品检测

畜禽肉样品采自广东省各地肉菜市场 and 超市, 共 65 份。随机取样 10 g 加入到 90 mL 营养肉汤中, 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 取 1.5 mL 培养物提取 DNA, 进行多重 PCR 检测。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物序列测定

以标准菌株 *S.typhi* CMCC50115 和 *E.coli* O157 NCTC12900 为模板的 PCR 扩增产物测序结果与 GenBank 中序列比较, 同源性达 99%、100%(见表 1)。

2.2 多重 PCR 反应模式的优化结果

加入等量各引物, 利用梯度 PCR 仪, 优化退火温度, 在扩增效果最好的条件下, 再配合其它参数的调节得到最优化的多重 PCR 扩增反应体系和循环

表 1 扩增产物测序结果
Table 1 Sequencing results of PCR products

Sequences deposited	GenBank accession number	Homology rate (Blastn)(%)
<i>S. typhi</i> CMCC50115 <i>InvA</i> 基因	AE008806	100
<i>E. coli</i> O157 NCTC12900 <i>rfbE</i> 基因	S83460	99

条件。多重PCR扩增最佳反应体系(25 μ L): 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 2 mmol/L $MgCl_2$, 240 μ mol/L dNTPs, 两对引物各 200 nmol/L, 2 U Taq酶, 模板 5 μ L。扩增反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C

退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 于 4 $^{\circ}$ C 下保存。

2.3 引物及菌株特异性实验

检测了沙门氏菌(包括鼠伤寒沙门氏菌、甲副伤寒沙门氏菌、乙副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、汤卜逊沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、亚利桑那沙门氏菌)、大肠杆菌、单核细胞增生性李斯特氏菌、副溶血性弧菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、宋内氏志贺氏菌、产气肠杆菌、柠檬酸杆菌、阴沟肠杆菌等, 共 27 株菌株(见表 2)。其中 5 株大肠杆菌 O157 菌株均检测到 *rfbE* 基因, 其它血清型大肠

表 2 实验菌株及引物特异性验证
Table 2 Bacterial strains for the specificity of PCR primers

Strain	Source	<i>rfbE</i>	<i>invA</i>
<i>Escherichia coli</i> O157	NCTC12900	+	-
<i>E. coli</i> O157	ATCC43889	+	-
<i>E. coli</i> O157	GIM 20102	+	-
<i>E. coli</i> O157	GIM 20101	+	-
<i>E. coli</i> O157	GDClQ O157-h	+	-
<i>E. coli</i>	CMCC44113	-	-
<i>E. coli</i>	CMCC44102	-	-
<i>E. coli</i>	ATCC 8739	-	-
<i>E. coli</i>	ATCC25922	-	-
<i>E. coli</i>	8099	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	广临检-52	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	CMCC51592	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CMCC45103	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC8090	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	CMCC45301	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	VPL4-90	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	CMCC50098	-	+
<i>S. typhimurium</i>	CMCC50115	-	+
<i>S. typhi</i>	CMCC50071	-	+
<i>S. paratyphi</i> A	CMCC50093	-	+
<i>S. paratyphi</i> B	CMCC50004	-	+
<i>S. choleraesuis</i>	CMCC50018	-	+
<i>S. thompson</i>	CMCC50023	-	+
<i>S. enteritidis</i>	CMCC30335	-	+
<i>S. arizonae</i>	CMCC47001	-	+
<i>S. typhimurium</i>	GIM20201	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	CMCC54002	-	-

注: NCTC(United Kingdom National Collection of Type Cultures, 英国国立标准菌种收藏所), CMCC(National Center for Medical Culture of Collections, 中国医学细菌保藏管理中心), ATCC(American Type Culture Collection, 美国标准菌种保藏中心), GDClQ(Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, 广东出入境检验检疫局), GIM(Guangdong Institute of Microbiology, 广东省微生物研究所), VPL4-90 (上海市疾病预防控制中心来源菌种)

杆菌未检测到上述基因, 所有非大肠杆菌菌株均未见上述特异性扩增带; 10 株沙门氏菌均检测到 *invA* 基因。图 1、2 显示了两对引物的特异性实验结果, *invA*、*rfbE* 基因的相应扩增片段分别为 495 bp 和 678 bp。

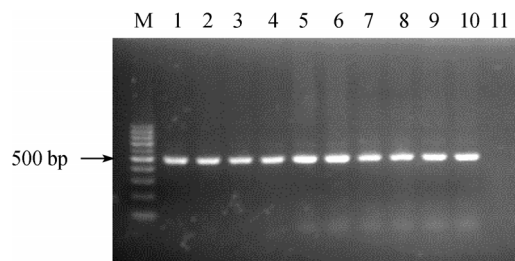


图 1 沙门氏菌引物特异性验证

Fig. 1 Specificity of the *Salmonella* primers

M: 100bp DNA Ladder; 1: *S.typhimurium* CMCC50115; 2: *S. paratyphi* A CMCC 50093; 3: *S. paratyphi* B CMCC50004; 4: *S. typhi* CMCC50071; 5: *S. typhi* CMCC50098; 6: *S. choleraesuis* CMCC50018; 7: *S. tho-mpson* CMCC50023; 8: *S.enteritidis* CMCC30335; 9: *S.arizonae* CMCC47001; 10: *S.typhimurium* GIM20201; 11: Control



图 2 *E.coli* O157 引物特异性验证

Fig. 2 Specificity of the *E.coli* O157 primers

M: DL2000 DNA Ladder; 1: *E.coli* O157 NCTC12900; 2: *E.coli* O157 ATCC43889; 3: *E.coli* O157 GIM20102; 4: *E.coli* O157 GIM20101; 5: *E.coli* O157 GDCIQ O157-h; 6: *E.coli* ATCC44113; 7: *E.coli* CMCC44102; 8: *E.coli* ATCC8739; 9: *E.coli* ATCC25922; 10: *E.coli* 8099; 11: *Yersinia enterocolitica* 广临检-52; 12: *Shigella sonnet* CMCC51592; 13: *Enterobacter aerogenes* CMCC45103; 14: *Citrobacter freundii* ATCC8090; 15: *Enterobacter cloacae* CMCC45301; 16: Control

2.4 敏感性实验

2.4.1 多重 PCR 纯菌 DNA 检测灵敏度的测定:用紫外分光光度计测定抽提的两种细菌 DNA 浓度, 将两种 DNA 等量混合后(混合后两种细菌 DNA 浓度都为 160 ng/μL), 做梯度稀释, 各取 10 μL 为模板进行多重 PCR 扩增, 将可检测到的最高稀释浓度作为多重 PCR 检测的最高检测灵敏度, 则可检测的最高稀释度为 2×10^{-5} , 即可检测到的两种 DNA 各为 32 pg(图 3)。

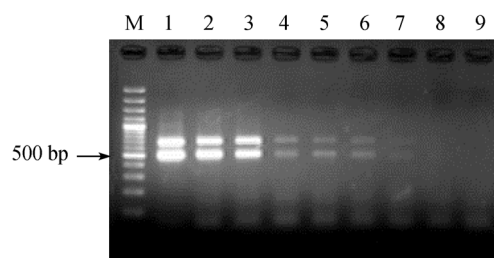


图 3 纯菌 DNA 检测灵敏度

Fig. 3 Sensitivity of the multiplex PCR assay in detecting mixture DNA from *Salmonella* and *E.coli* O157

M: 100 bp DNA Ladder; 1: 160 ng; 2: 16 ng; 3: 1600 pg; 4: 160 pg; 5: 128 pg; 6: 80 pg; 7: 32 pg; 8: 16 pg; 9: Control

2.4.2 人工污染样品检测灵敏度的测定:将标准菌株 *S.typhi* CMCC50115、*E.coli* O157 NCTC12900 的培养液(平板计数结果分别为 2.4×10^9 cfu/mL 和 2.2×10^9 cfu/mL)等量混合后, 做 10 倍梯度稀释, 然后将各个梯度稀释液分别接种到含 10 g 碎猪肉的 90 mL 营养肉汤培养液中, 培养 4 h 后, 提取 DNA 进行多重 PCR 检测。将可检测到的最高稀释浓度作为多重 PCR 在样品中的最高检测灵敏度, 则可检测的最高稀释度为 10^{-7} , 即可检测到的两种菌的浓度分别为: 2.4×10^2 cfu/mL 沙门氏菌和 2.2×10^2 cfu/mL *E.coli* O157 (图 4)。

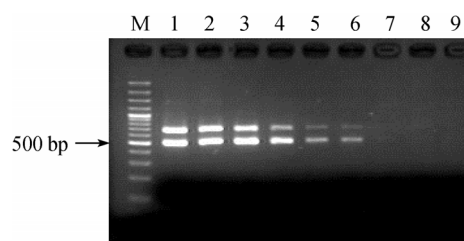


图 4 人工污染样品检测灵敏度

Fig. 4 Detection sensitivity of the multiplex PCR assay in contaminated samples

M: 100 bp DNA Ladder; 1: 2.2×10^7 cfu/mL *E.coli* O157 和 2.4×10^7 cfu/mL *Salmonella*; 2~7: Serial 10-fold dilutions of bacterial mixtures in innocuous meat were processed for multiplex PCR; 8: CK; 9: Control

2.5 样品检测

2.5.1 人工模拟样品检测:为了验证多重 PCR 在样品环境中的特异性, 进行人工模拟样品的检测。实验证明人工污染的猪肉、牛肉、鸡肉都可以准确地检测出所接种的致病菌, 无非特异性扩增, 证明该多重 PCR 对肉品中存在的沙门氏菌和大肠杆菌 O157 有很好的特异性。

2.5.2 实际样品检测:进行了 65 份实际样品检测,包括猪肉 21 份(猪肝、猪肉、猪肠)、鸡肉 33 份(鸡肝、鸡心、鸡肉、鸡翅),牛肉 6 份,羊肉 5 份。多重PCR检测沙门氏菌阳性的 6 份样品,大肠杆菌 O157 阳性的 4 份样品,将阳性样品的扩增产物进行测序,显示与GenBank中标准菌株的同源性达到 98%、100%。

3 讨论

本研究利用多重PCR技术,摸索PCR反应条件,用同一份处理标本和一次PCR扩增同时检测畜禽肉及其制品中沙门氏菌和大肠杆菌 O157,经证明是一种非常有用的方法,为食品中致病菌的检测提供了较好的手段。

选择特异的靶基因和设计出合理的引物对PCR检测致病菌至关重要。国内外报道的大肠杆菌O157 PCR检测方法中, *stx1*、*stx2*、*eaeA*、*hlyA*这4个基因最常用作靶基因,但研究发现不同类的致泻性大肠杆菌有相同的基因片段,这些毒力基因并不是大肠杆菌O157所特有,许多其它大肠杆菌和肠致病性大肠杆菌也含有*eaeA*基因,许多非O157的大肠杆菌与一些肠致病性大肠杆菌菌株都含有*stx*与*hly*基因。因此,单一检测上述基因片段特异性不高,难以确认或排除大肠杆菌O157感染。Bilge^[4]、Leiwang^[6]分别于1996和1998通过研究证实,编码O157抗原的*rfbE*基因其基因序列与其它细菌的类似功能基因的序列没有同源性,为大肠杆菌O157的特异基因。因此,本文的多重PCR中采用了*rfbE*基因做为诊断大肠杆菌O157的标志,实现了对大肠杆菌O157的准确检测。

有文献报道,由于有些细菌的菌体脂多糖中O特异性多糖含有与大肠杆菌O157 O抗原同样的4-氨基-4,6 双脱氧-a-D 甘露糖残基,所以导致O157 抗血清与弗氏柠檬酸杆菌、赫尔曼埃希氏菌、小肠结肠炎耶氏菌、流产布鲁氏菌、阴沟肠杆菌等有交叉凝集现象^[7,8]。本文选取部分这些细菌进行引物特异性验证,结果显示均无目的带扩增(见表1)。

本研究建立的多重PCR人工污染猪肉检测限为 10^2 cfu/mL,与RYC Kong等^[9]建立的灵敏度为 10^2 cfu/mL检测水中6种致病菌的多重PCR技术相当。致病菌的感染剂量都不同,有报道表明,大多数致病菌

的感染剂量都大于 10^3 cfu/mL(g)^[9]。因此,本研究建立的多重PCR技术的检测灵敏度的下限低于致病菌的最低感染剂量,对致病菌的监测具有重要意义。

自从PCR及其改进技术用于微生物检测以来,这一快速、灵敏且特异的方法从DNA分子水平为检测致病菌提供了有效的手段。在今后的应用中,可进一步完善,结合其他技术以提高其敏感性和特异性,可与免疫磁珠颗粒分离技术结合;也可与PCR有关的分型鉴定技术结合,使结果的判定更为精确。总之,随着这一方法的不断完善,其研究会更深入,应用范围会更加广泛,在微生物检测领域将发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Zhao S, Qiayumi S, Friedman S, *et al.* Characterization of *Salmonella enterica* serotype newport isolated from humans and food animals. *J Clin Microbiol*, 2003, **41**(12): 5366-5371.
- [2] 陈金顶, 索青利, 廖明, 等. 沙门氏菌的 *invA* 基因序列分析与分子检测. 中国人兽共患病杂志, 2004, **20**(10): 868-871.
- [3] Cohen ND, Neiberger HL, Megruder ED, *et al.* Genus-specific detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*, 1993, **5**(3): 368-371.
- [4] Bilge SS, James C, Vary, *et al.* Role of the *Escherichia coli* O157 : H7 O Side Chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. *Infect Immun*, 1996, **64**(11): 4795-4801.
- [5] Nagano I, Kunishima M, Itoh Y, *et al.* Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol*, 1998, **42**(5): 371-376.
- [6] Wang L, Reeves PR. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. *Infect Immun*, 1998, **66**(8): 3545-3551.
- [7] Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of shiga to toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111* and *rfbO157*. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**(2): 598-602.
- [8] Perry MB, Bundle DR. Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* strains with those of *Escherichia* O157: H7, *Brucella melitensis* and *Brucella abortus*. *Infect Immun*, 1990, **58**(5): 1391-1395.
- [9] Kong RYC, Lee SKY, Law TWF, *et al.* Rapid detected of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Res*, 2002, **36**(11): 2802-2812.