

# 肉类中大肠杆菌 O157:H7 多重 PCR 检测方法的建立

徐晓可<sup>1,2</sup> 吴清平<sup>1\*</sup> 周艳红<sup>1</sup> 张菊梅<sup>1</sup> 杨小鹃<sup>1</sup>

(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:** 以编码大肠杆菌 O157 抗原的 *rfbE* 基因、编码 H7 抗原的 *fliC* 基因以及编码毒力因子的 *eaeA* 基因为靶基因, 选择 3 对引物, 建立并优化了检测大肠杆菌 O157:H7 的多重 PCR 体系, 扩增产物分别为 291 bp、625 bp、368 bp, 采用 30 株细菌验证了该多重 PCR 具有特异性。PCR 检测的灵敏度在 DNA 水平上达到 91.35 pg; 在存在干扰菌鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的情况下, 当起始污染量为 1.4 CFU/mL 时, 37 °C 培养 6 h 即可检出。在 30 份肉类样品中, 有 3 份检出了大肠杆菌 O157:H7。本研究建立的多重 PCR 方法可特异、灵敏地实现对大肠杆菌 O157:H7 的检测。

**关键词:** 大肠杆菌 O157:H7, 多重 PCR, 肉类

## Specific and Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Meat by a Multiplex PCR

XU Xiao-Ke<sup>1,2</sup> WU Qing-Ping<sup>1\*</sup> ZHOU Yan-Hong<sup>1</sup> ZHANG Ju-Mei<sup>1</sup> YANG Xiao-Juan<sup>1</sup>

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

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

**Abstract:** A multiplex PCR assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 was developed by using 3 sets of primers that specifically amplify segments of the *rfbE*、*fliC* and *eaeA* genes. The target genes fragment of the PCR assay were 291 bp, 625 bp and 368 bp, respectively. Analysis of 30 strains demonstrated that this PCR system was specific. The detection limit of the PCR was 91.35 pg with genomic DNA. This multiplex PCR assay did not cross-react with the background *Salmonella typhimurium* and could detect 1.4 CFU/mL in artificial inoculated meat sample after enrichment at 37 °C for 6 h. Three of 30 meat samples were detected positive. These results indicated that the multiplex PCR assay can be used for specific and sensitive detection of *E. coli* O157:H7.

**Keywords:** *Escherichia coli* O157:H7, Multiplex PCR, Meat

大肠杆菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7)是肠出血性大肠杆菌最常见的血清型, 是一种以食物为主要传播途径的致病菌, 可引起出血性结肠炎、溶血性尿毒综合症等疾病, 在世界范围内得到普遍关注。

目前检测大肠杆菌 O157:H7 的方法主要有传统分离培养、免疫学和分子水平的检测。传统分离培养方面, 现有的培养基如山梨醇-麦康凯琼脂已不能很好地满足大肠杆菌 O157:H7 的分离; 显色培养基的特异性也还需提高; 生化鉴定检验时间较长, 且灵敏度较低。免疫学方法如酶联免疫吸附法、乳胶凝集试验等, 虽然可以缩短检测时间, 但会与大肠杆菌的多种血清型出现交叉反应<sup>[1]</sup>。而在分子水平方面, 如 PCR 方法则可以快速、灵敏地检测大肠杆菌 O157:H7。

近年来, 已有文献介绍采用多重 PCR 方法检测 *E. coli* O157:H7<sup>[2, 11-12]</sup>。然而, 这些方法大多侧重于毒力基因而忽视了灵敏度研究, 并且较少应用于实际样品检测。另一方面, *E. coli* O157:H7 的感染剂量低于 10 CFU<sup>[3]</sup>, 且食品中 *E. coli* O157:H7 的污染量一般也很低<sup>[4]</sup>。因此, 建立特异性强且灵敏度高的检测方法显得尤为重要。本研究旨在建立肉类中 *E. coli* O157:H7 特异灵敏的多重 PCR 检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要仪器:** 凝胶成像分析系统 UVI (英国)、PCR 仪 PE2400 (德国)、梯度 PCR 仪 (美国)、核酸蛋白分析仪 DU640 (美国)。

**1.1.2 主要试剂:** Taq 酶、dNTP 购自晶美公司, 各种培养基购自广东环凯微生物科技有限公司。

**1.1.3 引物合成:** 以 *E. coli* O157:H7 特异性很强的 *rfbE* 基因和 *fliC* 基因以及毒性基因 *eaeA* 为靶基因, 利用 Primer5.0 分析引物, 参考文献[5], 委托北京赛百盛技术有限公司合成, 其序列见表 1。

**1.1.4 菌株:** 30 株实验菌株分别是 2 株 *E. coli* O157:H7; 5 株其它血清型 *E. coli*, 包括 *E. coli* 8099、*E. coli* 8739、*E. coli* 25922、*E. coli* 44102、*E. coli* 44113; 23 株其它细菌, 包括产气肠杆菌、阪崎肠杆菌、铜绿假单胞菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌、单增李斯特氏菌、志贺

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

Target gene	Primer sequence(5'→3')	Size
<i>fliC</i>	F: GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC R: CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625 bp
<i>rfbE</i>	F: TGTCCATTATACGGACATCCATG R: CCTATAACGTCATGCCAA AT TGCC	291 bp
<i>eaeA</i>	F: GACTGTCGATGCATCAGGGAAAG R: TTGGAGTATTAACATTAACCCAGG	368 bp

氏菌等。

**1.1.5 样品:** 样品购自超市和集贸市场。

### 1.2 方法

**1.2.1 模板 DNA 制备:** DNA 提取参考刘刚等(2004)的方法<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 多重 PCR 反应:** 优化后, 多重 PCR 体系总体积为 25  $\mu$ L, 其中 10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu$ L, 3.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTP, 200 nmol/L 引物, 1.5 U Taq 酶, 1  $\mu$ L DNA 模板。扩增反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、59 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共进行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 于 4 $^{\circ}$ C 下保存。扩增后的 PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像分析系统 UVI 观察结果并拍照。

**1.2.3 *E. coli* O157:H7 特异性 PCR 分析:** 用于检测该体系特异性的菌株如前所述。

**1.2.4 多重 PCR 敏感性分析:** 1) 基因组灵敏度: 使用核酸蛋白分析仪测定 DNA 含量, 进行 10 倍梯度稀释, 将不同稀释度的 DNA 分别作 PCR 扩增。2) 人工污染样品灵敏度: 混合接种 *E. coli* O157:H7 和 *Salmonella typhimurium*。将计数的 *E. coli* O157:H7 和 *S. typhimurium* 菌悬液进行梯度稀释, 分别取 1 mL 菌悬液人工接种猪肉, 每份 10 g 猪肉样品接种剂量依次为 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup>, 10<sup>0</sup>, 实验设空白 (1 mL 生理盐水) 对照, 猪肉中加入 90 mL 营养肉汤 (NB), 混匀, 37 $^{\circ}$ C 培养, 分别于 6 h 和 10 h 取接种样品进行 PCR 检测。同时对含不同稀释度的菌悬液进行平板计数。

**1.2.5 肉类样品检测:** 无菌操作取 10 g 样品于 90 mL 含 20  $\mu$ g/mL 新生霉素的改良 EC 肉汤, 42 $^{\circ}$ C 培养一段时间, 取适量培养液按 1.2.1 提取 DNA 模板, 进行多重 PCR 检测。

## 2 结果

### 2.1 多重 PCR 反应

本研究选择了 3 个靶基因 *rfbE*、*fliC*、*eaeA*, 在进行单重 PCR 检测的研究基础上, 对多重 PCR 各反应参数进行了优化, 从而确定了最佳反应模式(见图 1)。

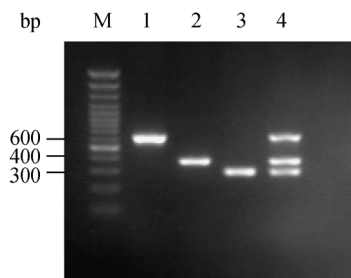


图 1 *E. coli* O157:H7 多重 PCR

Fig. 1 The multiplex PCR of *E. coli* O157:H7

M: 100 bp DNA 分子质量标准; 1: *fliC* 基因; 2: *eaeA* 基因; 3: *rfbE* 基因; 4: 三基因多重 PCR

M: 100 bp DNA ladder; 1: *fliC*; 2: *eaeA*; 3: *rfbE*; 4: Multiplex PCR

### 2.2 PCR 反应的特异性

根据所选择的 3 对特异性 PCR 引物对 30 株常见致病菌进行 PCR 检测, 结果显示, 2 株 *E. coli* O157:H7 均为阳性结果; 28 株其他菌株为阴性(部分结果见图 2)。

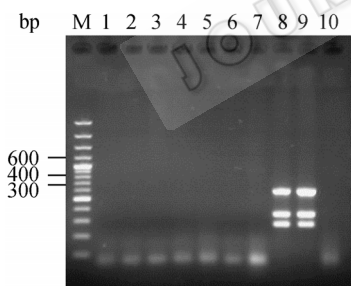


图 2 *E. coli* O157:H7 特异性检测

Fig. 2 Specific detection of *E. coli* O157:H7

M: 100 bp DNA 分子质量标准; 1: 大肠杆菌 8099; 2: 大肠杆菌 8739; 3: 大肠杆菌 25922; 4: 大肠杆菌 44102; 5: 大肠杆菌 44113; 6: 产气肠杆菌; 7: 阪崎肠杆菌; 8: 大肠杆菌 O157:H7 NCTC 12900; 9: 大肠杆菌 O157:H7 DTB20102; 10: 阴性对照(双蒸水)

M: 100bp DNA ladders; 1: *E. coli* 8099; 2: *E. coli* 8739; 3: *E. coli* 25922; 4: *E. coli* 44102; 5: *E. coli* C44113; 6: *Enterobacter aerogenes*; 7: *Enterobacter sakazakii*; 8: *E. coli* O157:H7 NCTC 12900; 9: *E. coli* O157:H7 DTB20102; 10: Negative control (ddH<sub>2</sub>O)

### 2.3 PCR 检测的敏感性

#### 2.3.1 基因组灵敏度: 将不同稀释度的 DNA 进行

PCR 扩增, 结果表明, *E. coli* O157:H7 多重 PCR 检测的敏感性为 91.35 pg (见图 3)。

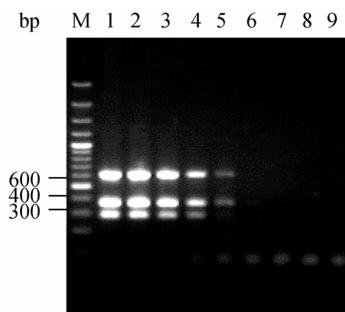


图 3 多重 PCR 检测 *E. coli* O157:H7 的敏感性

Fig. 3 Sensitivity of the PCR for detecting *E. coli* O157:H7

M: 100 bp DNA 分子质量标准; 1-8: DNA 浓度分别为 913.5 ng、91.35 ng、9.135 ng、0.9135 ng、91.35 pg、9.135 pg、0.9135 pg、0.09135 pg; 9: 阴性对照 (双蒸水)

M: 100 bp ladder Marker; 1-8: the DNA with 913.5 ng, 91.35 ng, 9.135 ng, 0.9135 ng, 91.35 pg, 9.135 pg, 0.9135 pg, 0.09135 pg, respectively; 9: Negative control (ddH<sub>2</sub>O)

**2.3.2 人工污染样品灵敏度:** *E. coli* O157:H7 培养液的含菌量为  $1.4 \times 10^5$  CFU/mL ~  $1.4 \times 10^0$  CFU/mL, *S. typhimurium* 培养液的含菌量为  $1.6 \times 10^5$  CFU/mL ~  $1.6 \times 10^0$  CFU/mL。不同培养时间的 PCR 检出情况见图 4, 37℃ 培养 6 h 即可检出目标菌。

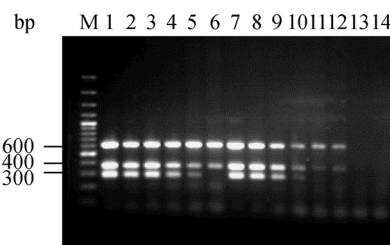


图 4 *E. coli* O157:H7 人工污染猪肉不同培养时间对 PCR 敏感性的影响

Fig. 4 Effects of preincubation times of artificially-contaminated pork on sensitivity of the PCR detection of *E. coli* O157:H7

M: 100 bp DNA 分子质量标准; 1-6: 培养 10 h, 分别为  $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$ ; 7-12: 培养 6 h,  $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$ ; 13: 样品阴性对照; 14: 阴性对照 (双蒸水)

M: 100 bp DNA ladders; 1-6: the pork samples preincubated for 10 h,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ , respectively; 7-12: the pork samples preincubated for 6 h,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$  respectively; 13: Negative control (sample); 14: Negative control (ddH<sub>2</sub>O)

### 2.4 肉类样品检测

从市场和超市采集肉类样品共 30 份, 猪肉 17 份, 鸡肉 8 份, 牛肉 5 份。对实际样品分别进行 *E.*

*coli* O157:H7 检测, 30 份样品中, 有 3 份检出 *E. coli* O157:H7。再将阳性样品的 PCR 产物进行测序, 对序列进行分析, 结果证明与 *E. coli* O157:H7 的同源性达到 98%。

### 3 讨论

近来, 针对 *E. coli* O157:H7 致病性基因的研究已越来越深入, 主要靶基因有 *stx1*、*stx2*、*eaeA*、*rfbE*、*hly*、*uidA*、*fliC* 等<sup>[7-10]</sup>。对于血清型较复杂的 *E. coli* O157:H7, 使用单一 PCR 检测容易出现假阳性, 特异性差, 具有一定的局限性。多重 PCR 可提高特异性, 减少假阳性。选择特异的靶基因并设计出合理的引物对多重 PCR 检测 *E. coli* O157:H7 至关重要。目前多使用共同检测毒力因子基因和 *rfbE*、*fliC* 基因的多重 PCR 方法。Visetsripong 等建立了针对 *rfbE* 和 VT 毒素基因的二重 PCR, 经过 8 h 培养可检测  $10^2$  CFU/25 g 的生肉<sup>[11]</sup>。赵志晶等建立了针对该菌特异的 *fliC*、*rfbE*、SLT I 与 SLT II 基因的四重 PCR, 该方法适用于牛奶样品中 *E. coli* O157:H7 的检测, 经过培养步骤检测限可达 0.1 CFU/mL; 对鸡肉样品的检测敏感性为  $10^4$  CFU/mL<sup>[12]</sup>。迄今为止, 针对肉类食品中 *E. coli* O157:H7 多重 PCR 检测的报道存在灵敏度不高和样品培养时间较长等问题, 原因多种, 如多重 PCR 反应系统中存在引物退火温度的不同和引物间相互干扰等。另外, 食品基质成分复杂, 样品中存在大量竞争菌, 也会大大影响检测的敏感性。

本研究针对 *E. coli* O157:H7 的特异基因 *rfbE*、*fliC* 和 *eaeA*, 在引物的选择时充分应用分子生物学软件进行分析, 从而有效避免了引物退火温度的不同和引物间相互干扰等问题的发生; 同时对多重 PCR 的反应条件进行了优化, 通过调整  $Mg^{2+}$ 、Taq 酶和引物的浓度, 使多重 PCR 具有很好的稳定性和很高的敏感性。检测人工污染的猪肉, 结果显示: 在存在干扰菌的情况下, 37℃ 培养 6 h 即可检出猪肉中菌量为 1.4 CFU/mL 的 *E. coli* O157:H7, 高于 Visetsripong 等报道的  $10^2$  CFU/25 g 的二重 PCR 灵敏度<sup>[11]</sup>。实际样品检测时, 采用选择性培养基培养, 这样可以有效避免非目标菌的竞争, 更有利于目标菌的检出。

结果表明, 本研究建立的多重 PCR 体系能够较好的用于肉类实际样品中 *E. coli* O157:H7 的特异灵

敏检测。本研究检测了 30 份实际样品, 有待于进一步加强实际样品的检测应用。

### 参考文献

- [1] Kehl SC. *Escherichia coli* O157: H7 Diarrhea in the United States: Clinical and Epidemiologic Features. *J Clin Microbiol*, 2002, **40**(8): 2711–2715.
- [2] Pan TM, Chen LM, Su YC. Identification of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR with Primers Specific to the *hlyA*, *eaeA*, *stx1*, *stx2*, *fliC* and *rfb* genes. *J Formos Med Assoc*, 2002, **101**(9): 661–664.
- [3] Paton AW, Panton JC. Detection and characterization of shiga toxicogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, *rfbO157*. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**(2): 598–602.
- [4] Paton AW, Ratcliff RM, Doyle RM, et al. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with shiga like toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**(7): 1622–1627.
- [5] Vladimir C, Avraham R, Konstantin C, et al. Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(7): 3258–3263.
- [6] 刘刚, 翟朝阳. 一种通用的从少量培养液中快速提取细菌染色体 DNA 的方法. *西部医学*, 2004, **16**(2): 111–113.
- [7] Sharma VK, Dean-Nystrom EA. Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimin and Shiga toxins. *Vet Microbiol*, 2003, **93**(3): 247–260.
- [8] Fortin NY, Mulchandani A, Chen W. Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal Biochem*, 2001, **289**(2): 281–288.
- [9] Radu S, Ling OW, Rusul G, et al. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *J Microbiol Methods*, 2001, **46**(2): 131–139.
- [10] Call DR, Brockman FJ, Chandler DP. Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. *Int J Food Microbiol*, 2001, **67**(1-2): 71–80.
- [11] Visetsripong A, Pattaragulwanit K, Thaniyavarn J, et al. Detection of *Escherichia coli* O157: H7 vt and rfb(O157) by multiplex polymerase chain reaction. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2007, **38**(1): 82–90.
- [12] 赵志晶, 刘秀梅. 食品样品中大肠杆菌 O157:H7 复合 PCR 检测方法的研究. *卫生研究*, 2004, **33**(6): 716–719.