

改良分子信标实时 PCR 快速检测大肠杆菌 O₁₅₇:H₇贺连华¹, 扈庆华¹, 石晓路¹, 郑琳琳², 李庆阁², 张佳峰², 庄志雄¹, 刘小立¹, 张顺祥¹, 王冰¹, 吴平芳¹, 刘涛¹

摘要:目的 建立改良分子信标实时 PCR 快速检测大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ 的快速方法。方法 根据 GenBank 公布 O₁₅₇:H₇ 的 rfbE 保守序列, 设计一对引物和改良分子信标探针, 用 FAM 荧光剂标记探针的 5' 端, 建立改良分子信标实时 PCR 检测 O₁₅₇:H₇ 的反应体系, 应用于食物中毒快速诊断和食品微生物检测。结果 共检测 11 种细菌, 只有大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ 有荧光信号, 其余 10 种全无荧光信号, 且与其他细菌无交叉反应, DNA 灵敏度为 64fg, 菌液灵敏度为 59cfu/ml 或 2cfu/PCR 反应体系。应用改良分子信标实时 PCR 反应体系检测 10 株 O₁₅₇:H₇ 均出现特异的荧光信号, 无干扰。对 89 份食品样品进行检测, 5 份 O₁₅₇:H₇ 实时 PCR 阳性, 其余样品为阴性, 检测仅需 2h。5 份阳性样本, 经传统方法培养, 有 3 份检出大肠杆菌 O₁₅₇:H₇。结论 改良分子信标实时 PCR 检测体系快速、灵敏度高, 特异性强, 可用于大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ 食物中毒的快速诊断和食品微生物检测, 为食源性疾病的分子流行病学调查提供新的检测手段。

关键词: 大肠杆菌 O₁₅₇:H₇; 改良分子信标; 实时 PCR

中图分类号: R3781.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2006)05-761-02

Rapid Detection of *E. coli* O₁₅₇:H₇ by using modified beacons and real-time PCR. HE Lian-hua, HU Qing-hua, SHI Xiao-lu, et al. (Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, Guangdong, P. R. China)

Abstract: Objective To establish a method for rapid detection of *E. coli* O₁₅₇:H₇ from samples of contaminated food by using modified molecular beacons and real-time PCR. Methods The primers and modified molecular beacons were designed based on the core sequence of rfbE gene published on GenBank for detection of *E. coli* O₁₅₇:H₇. The probe was labeled with FAM at 5' end. The molecular beacons and primer set was tested against numerous strains from 11 different bacterial species and used for rapid detection and diagnosis of food poisoning. Results For the modified molecular beacons-based real-time PCR assay, the sensitivity was 64fg, 59cfu/ml or 2cfu/PCR reaction. There was no cross-reaction with other bacteria as control. The real-time PCR assay was used to detect 10 *E. coli* O₁₅₇:H₇ and no false signals were observed. 89 food samples were tested and *E. coli* O₁₅₇:H₇ was detected from 5 samples by real time PCR. 3 samples were positive for *E. coli* O₁₅₇:H₇ detected by traditional culture method. The overall test could be finished within 2 hours. Conclusion The modified molecular beacons-based real-time PCR assay is rapid, sensitive and specific for detection of *E. coli* O₁₅₇:H₇ from contaminated food.

Key words: *E. coli* O₁₅₇:H₇; Modified molecular beacon; Real-time PCR

肠出血性大肠杆菌 (*Enterohemorrhagic E. coli*) O₁₅₇:H₇ 是近十年来认识的一种引起人类出血性结肠炎 (Hemorrhagic colitis HC) 和溶血性尿毒综合征 (Hemolytic uremic syndrome HUS) 的肠道致病菌^[1]。由于 E₁₅₇:H₇ 感染剂量极低, 在食入不足 5 个细菌就可引起疾病, 且病情发展快, 死亡率高, 近年在欧美、日本等国已多次爆发流行, 对人类的健康构成了重大的威胁^[2]。我国 1986 年已发现 E₁₅₇:H₇ 感染病人, 并在安徽、江苏等地爆发了食物中毒^[3]。O₁₅₇:H₇ 也可以感染动物, 并在实验动物中引起类似于出血性肠炎或溶血性尿毒综合征等症状, 表明是一种人畜共患病^[4]。

我国目前对 E₁₅₇:H₇ 等病原体大多数是传统的细菌学检测, 细菌从分离、培养、鉴定需要 1 周左右的时间, 耗时耗材, 而且检出率很低, 显然对 E₁₅₇:H₇ 等恶性病原体爆发的诊断不适宜^[5]。自 1995 年美国 PE 公司提出实时 PCR 检测原理后, 实时 PCR 以其快速、定量、无需后电泳、无交叉污染等突出优点而被广泛采用^[6]。其原理为退火阶段, 分子信标与生产的靶序列结合发出荧光, 在延伸阶段则脱离靶序列而不干扰扩增, 随

着循环次数的增加, 与模板结合的分子信标的量亦增加, 最终的荧光强度与模板量成正相关。改良分子信标是在分子信标的基础上提出的一种新型分子探针, 以它为基础建立的实时 PCR 技术可以更好地实现实时 PCR 检测多种致病菌。本文采用改良分子信标技术建立 E₁₅₇:H₇ 的实时 PCR 方法, 和国家标准方法比较, 显示新方法的准确性和灵敏度, 并用于食物中毒快速诊断和食品致病菌筛查。与常规 PCR 方法相比, 由于引物和探针的/双保险, 显示特异性更强, 并具有操作简单、可定量、污染少等优点。

1 材料与方

1.1 实验菌株 包括 1 株沙门氏菌、1 株志贺氏菌、1 株 EPEC、1 株 EIEC、1 株 ETEC、1 株 O₁₅₇:H₇、1 株金黄色葡萄球菌、1 株蜡样芽孢杆菌、1 株李斯特菌、1 株变形杆菌、1 株副溶血性弧菌, 全部菌株均购自中国药品生物制品检定所。

1.2 模板提取 全部菌株经 LB 增菌培养过夜后, 菌体用 500L TEbuffer 悬浮, 加入终浓度为 1% SDS 和 0.12g/L 的蛋白酶 K, 55℃ 作用 1h 后, 用酚-氯仿抽提 DNA。或取 1ml 菌液, 离

心沉淀,制备菌悬液,煮沸,取上清液 5Ll 用于实时 PCR 反应。

113 引物和探针设计 根据 GenBank 公布的 O₁₅₇:H₇ rfbE 的序列并比较分析,自行设计一对引物和探针,引物和探针均由上海 Sangon 公司合成,探针用 FAM 标记。

114 PCR 反应条件 反应总体积为 25Ll,内含 5Ll 模板,2l 5Ll 110CPCR 缓冲液,1l 5mmolMgc12,0l 25mmol/Ld- NTP,1Utaq 酶,25pmol 引物,25pmol 探针。实时 PCR 反应参数为 94e 预变性 5min,40 个循环中 94e 变性 30s,52e 退火 40s,72e 延伸 30s。用 icycle 荧光 PCR 扩增仪(Bio- Rad)检测退火的荧光。

115 结果判断 检测样本 Ct 值小于等于 35l0 时,测定结果有效,可直接报告样本阳性;检测样本 Ct 值大于 35l0 且小于 40 时,重复一次,如果 Ct 值仍小于 40,且曲线有明显的对数增长期,可报告样本阳性,否则报告样本阴性;检测不到样本 Ct 值时,报告样本阴性。

116 特异性检测 用上述 11 种细菌作对照,对 O₁₅₇:H₇ 进行 rfbE 改良分子信标实时 PCR 扩增。取 O₁₅₇:H₇ 作为代表株,包括 DNA 灵敏度分析和菌液灵敏度分析。DNA 灵敏度分析为按常规 DNA 提取方法提取模板 DNA 用 Ultraspec 2000 紫外可见光核酸分析仪(Pharmacia 公司)测 DNA 的浓度。然后进行 5 倍稀释,每个稀释度取 1ul 用于实时 PCR 反应。菌液灵敏度分析为 O₁₅₇:H₇ 增菌后,进行 10 倍稀释,工作 10 个稀释度,然后依次取 10 个稀释度的 1ml 菌液进行实时 PCR 反应。

2 结果

2.1 特异性分析 11 种细菌经改良分子信标体系检测,只有 O₁₅₇:H₇ 有荧光信号其他细菌无荧光信号,DNA 灵敏度为 64fg/Ll,菌液灵敏度为 59cfu/ml 或 2cfu/PCR 反应体系。

2.2 样本检测结果 对 89 份样本以改良分子信标实时 PCR 快速检测结果见表 1。

表 1 89 份样本以改良分子信标实时 PCR O₁₅₇:H₇ 的检出情况

样品种类	份数	阳性份数(%)
猪肉(生)	22	2(9.0)
牛肉(生)	14	1(7.1)
鸡肉(生)	17	1(4.0)
鸭肉(生)	9	0
鱼肉(生)	16	1(6.0)
羊肉(生)	9	0
蔬菜(生)	2	0

对其中 5 份 PCR 法检出 O₁₅₇:H₇ 阳性的样本,用金标法筛选,显示均为强阳性;用传统培养法,检测检出 3 份。

3 讨论

本文在改良分子信标技术的基础上,建立了实时 PCR 快

速检测 O₁₅₇:H₇ 的方法。结果表明此方法检测 DNA 灵敏度为 64fg/ul,菌液灵敏度为 59cfu/ml 或 2cfu/PCR 反应体系,以及特异性强,与对照组 11 种细菌无交叉反应,且操作简单,结果观察直观明了,可一次检测 96 份样品,适用于 O₁₅₇:H₇ 食物中毒的快速诊断和大量样品的检测,无交叉污染。对于大便和呕吐物标本,从样品处理到检测结果只需 2h,对食品样本仅需 1d 时间。在建立单一实时 PCR 快速检测细菌的基础上,最终实现多重实时 PCR 同时诊断 10 种食源性致病菌,满足常见细菌性食物中毒快速诊断的要求。

改良分子信标探针是为了提高杂交效率,在原来分子信标的基础上提出来的。改良分子信标的突出特点是将分子信标的臂部分也作为靶识别序列,而不仅仅是用于形成发夹结构的无关添加序列。对于同样长度的检测靶序列,改良分子信标比分子信标更短,而且由于臂序列不再悬空,因而与靶序列的结合更紧密。改良分子信标比分子信标更易设计且成功率更高,同时对扩增条件要求不严。

本文所建立的实时 PCR 技术快速检测方法,可用于细菌性食物中毒和食品微生物的检验,随着生态环境的变化和抗生素的滥用,许多致病菌引起的临床症状越来越不典型,常常需要同时检测多种细菌才能确定病原。另外在食品微生物检验中,如果只采用单一分子信标体系检测单一细菌,就会出现成本高的缺点。因此,又快又能同时检测多种病原微生物的多重实时 PCR 技术检测多种细菌是未来发展方向。

参考文献:

- [1] Griffin PM andRV Tauxel The epidemiology of infections caused by Escherichia Coli O₁₅₇:H₇, other enterohemorrhagic E1 coli, and the associated hemolytic uremic syndrome[J] Epidemiol Rev, 1991, 13(1): 60~ 981
- [2] Ony J,Zhe- L,Robins- Browne- R, et al Prevalence of verocytotoxinigenic Eshcherichia coli serotype O₁₅₄:H₇ in children with diarrhoea attending a Sydney hospital[J] Jpaediatr Child Health, 1993, 29(3): 185~ 1871
- [3] 徐建国 1 一种出血性大肠杆菌的 PCR 检测方法[J] 中华医学杂志, 1995, 18(2): 225l
- [4] March- SB, Ratnan- Slsorbitol- Macconkey medium for detection of Escherichia coli O₁₅₇:H₇, associated with hemorrhagic colitis[J] J Clin Microbiol, 1986, 23(5): 869~ 8721
- [5] 王崇玉 1 O₁₅₇:H₇ 病原体及临床检测技术的应用[J] 中华医学丛刊杂志, 2002, 11(2): 331
- [6] Mckee- ML, Obrien- AD, Investigation of enterohemorrhagic Escherichia coli O₁₅₇:H₇ adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal E1 coli[J] Infect Immun, 1995, 63(5): 2070~ 20741

收稿日期: 2006- 02- 14

(上接第 780 页)

- [3] 查元新,麻婧,刘俏梅. 3 265 名大学生结核感染状况调查与相关因素分析[J] 贵阳医学院学报, 2005, 30(4): 329~ 331l
- [4] 宋文虎,肖成志,宋礼章 1 结核病学进展[M] 北京:光明日报出版社, 1995, 345~ 351l
- [5] 孙海龙,范国英,刘玮 1 1992~ 2001 年部队肺结核发病特点和趋势分析[J] 解放军预防医学杂志, 2004, 22(3): 164~ 1661

- [6] 李升团,张习坦,韩光红 1 部队肺结核发病因素的病例对照研究[J] 中华流行病学杂志, 1999, 20(4): 208~ 2111
- [7] 刘纯 1 大学新生结核菌素试验调查分析[J] 杭州师范学院学报, 1998, 3: 62~ 641
- [8] 彭玲,卢德超 1 肺结核高危人群的主动发现及对策[J] 中国校医卫生, 1995, 9(5): 3601

收稿日期: 2006- 03- 07