

肠侵袭性大肠埃希氏菌国家核酸标准样品的研制

那 晗¹, 倪长鹏¹, 刘 宇¹, 吴远高², 徐君怡¹, 郑秋月^{1*}

(1. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001; 2. 塔城出入境检验检疫局, 塔城 834700)

摘 要: **目的** 研制肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品, 并对其均匀性和稳定性进行评价。**方法** 本文研究了肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品的关键制备技术和保存技术, 定值技术和定值方式, 开展均匀性和稳定性试验, 并对食品中肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品的不确定度进行确定; 标准样品采用 PicoGreen DNA 分子荧光定量方法进行定值。多家单位合作定值, 确定标准样品的标准值及其不确定度。**结果** 标准样品均匀性标准不确定度为 0.016 %, 不稳定标准差为 0.0100, 均匀性和稳定性试验结果表明, 本文研制的标准样品均匀且稳定。**结论** 研制出具有溯源性的肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品并获得国家标准样品证书, 可适用于肠侵袭性大肠埃希氏菌的检测和质量控制。

关键词: 肠侵袭性大肠埃希氏菌; 核酸标准样品; 研制

Development of *Enteroinvasive Escherichia coli* nucleic acid reference material

NA Han¹, NI Chang-Peng¹, LIU Yu¹, WU Yuan-Gao², XU Jun-Yi¹, ZHENG Qiu-Yue^{1*}

(1. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China;
2. Xinjiang Tacheng Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tacheng 834700, China)

ABSTRACT: Objective *Enteroinvasive Escherichia Coli*(EIEC) Molecular DNA Reference Material was developed, and uniformity and stability of test were evaluated. **Methods** The key preparation technology, saving technology, certified technique and mode for EIEC Molecular DNA Reference Material were researched, via uniformity and stability test. The uncertainty for EIEC Molecular DNA Reference Material was evaluated in food. The standard value was determined by PicoGreen DNA molecule fluorescence quantitative methods. Standard and uncertainty of reference material was determined by many units cooperation. **Results** Uniformity standard uncertainty of reference material was 0.016 %, unstable standard deviation was 0.0100. The result of uniformity and stability test showed that reference material developed in this study was uniform and stable. **Conclusion** EIEC Molecular DNA Reference Material with the traceability was developed, and certificate of national reference material was obtained. It could be used for quantitative detection and qualitative quality control of EIEC.

KEY WORDS: *Enteroinvasive Escherichia coli*; nucleic acid reference material; research

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201210043)

Fund: Supported by the Public Welfare Industry Scientific Research Projects of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (201210043)

*通讯作者: 郑秋月, 博士, 主要研究方向为生物安全检验检疫。E-mail: zhengqyciq@163.com

*Corresponding author: ZHENG Qiu-Yue, Doctor, Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China. E-mail: zhengqyciq@163.com

1 引言

食品中微生物引起食源性疾病的预防与控制已引起了世界各国关注, 食品中微生物的检测技术是预防与控制的关键技术环节。目前我国食品中微生物的检测仍以传统的病原菌培养、血清抗体检测和生化特征比较等方法为主, 不能满足日益发展的检验检疫工作需要。随着进出口检验检疫行业标准“食品中致病菌检测方法—实时 PCR 法”、“食品中多种致病菌快速检测方法—PCR 法”、“食品中致病菌检测方法—DHPLC 法”^[1-3]等系列分子生物学检测行业标准的发布实施, 简单快速, 灵敏度高的 PCR、实时荧光 PCR 和变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)技术, 正在食品致病菌检测领域开始发挥重要作用^[4]。

目前国内外没有适用于食品中致病菌分子生物学检测用核酸标准样品, 仅有成套分子生物学检测试剂盒中配备的阳性对照品, 价格非常昂贵, 也不具备核酸标准样品的效能, 不能适时地满足检验检疫工作的需要。

本文建立了致病菌核酸标准样品的制备和保存技术, 并进行多家单位联合定值, 确定核酸标准样品的值及不确定度。首次探讨 PicoGreen DNA 分子荧光定量方法应用于致病菌核酸标准样品的定值方式, 首次制备出具有国家标准样品证书的肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品, 以满足食品检测监管和检验检疫工作的需要。

2 材料

2.1 阳性样品来源

制备肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品所用标准菌株来源于美国标准菌种收藏所(American Type Culture Collection), 标准菌株号 ATCC 43893。

2.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒(D9093, 宝生物工程(大连)有限公司), TaqMan Universal Master Mix(ABI 公司), QuantiTTM PicoGreen dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen 公司), 黑色平底 96 孔板(Greiner 公司)。引物和探针在宝生物工程(大连)有限公司合成。

ABI 7500 型实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司), SpectramaxM5 型多功能酶标仪(美国分子仪器公司)。

2.3 方法

2.3.1 菌株活化、增菌培养及细菌基因组 DNA 的提取
肠侵袭性大肠埃希氏菌标准菌株按照 GB/T 4789.6-2003^[5]进行菌株活化、增菌培养。采用 Qiagen 公司的 DNA 提取试剂盒(Qiagen Blood & Cell Culture DNA Maxi Kit), 并按试剂盒操作说明书中步骤提取增菌肉汤基因组 DNA。

2.3.2 定性鉴定与分装保存

将获得的核酸标准样品分装于内置微量管的样品套管中, 分装 400 管, 冷冻干燥; 每管肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品含量为 5 μg 。分装后的样品加贴唯一性标识, 放置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中避光贮存。

2.3.3 均匀性试验

从最终包装 5 μg /管的肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品中, 取随机抽取 15 管样品, 每管样品分成 2 份子样用 PicoGreen DNA 分子荧光定量方法测试, 分析肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品 DNA 的含量。所有试料以随机次序在重复性条件下测试, 即在同一实验室中由相同的人员使用相同的测试方法和仪器在较短时间内测试。检测结果使用方差分析方法进行均匀性评价^[6]。

2.3.4 稳定性试验

所选取的用于稳定性测试的包装好的样品在 $-18\sim-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温条件下历经了长时间保存。随机选取样品进行稳定性试验。第一年每两个月、第二年每三个月进行含量测试。在全部稳定性测试中, 所用人员、仪器、测试方法和实验室都与均匀性测试相同。

2.3.5 定值

采用 PicoGreen DNA 分子荧光定量方法^[7-9]对目标分子 DNA 样品的浓度进行定值。

本实验室与吉林出入境检验检疫局等 8 家单位进行了合作定值。这些实验室分别对目标分子 DNA 样品进行了 6 次的重复测试。

3 结果与讨论

3.1 均匀性检查结果

肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品均匀性评价结果见表 1。两个样品组之间不存在显著差异, 可以认为样品是均匀的。从表 1 可见, 经 F 检验, 计算 F 比为 1.24, 小于查表^[10]所得到的 $F(14,15)=2.42$, 说明

样品是均匀的。样品均匀性标准不确定度为 0.016 %。

3.2 稳定性检查结果

所选取的用于稳定性测试的包装好的样品在 -18~-20 °C 低温条件下历经了长时间保存。随机选取样品进行稳定性试验。第一年每两个月、第二年每三个月进行含量测试, 采用 PicoGreen DNA 分子荧光定量法定值。在全部稳定性测试中, 所用人员、仪器、测试方法和实验室均与均匀性测试相同。稳定性方差分析表见表 2, 不稳定标准差为 0.0100^[11]。

3.3 标准值及其不确定度

本实验室与吉林出入境检验检疫局等 8 家单位进行了合作定值。这 8 家实验室分别对目标分子 DNA 样品进行了 6 次的重复测试。经 Grubbs 检验和 Cochran 检验, 所有数据均可作为定值依据; 经正态性检验, 这些数据符合正态分布。按照 GB/T 15000《标准样品工作导则》^[12]系列国家标准的要求对数据进行统计, 计算金黄色葡萄球菌核酸标准样品的标准值及置信区间, 结果见表 3。

表 1 肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品均匀性评价结果

Table 1 The evaluation results of uniformity for EIEC nucleic acid reference material

方差来源	平方和	自由度	均方	F 比	F 临界值	置信概率	样品间标准差
组间	0.028087	14	0.002006	1.33	2.42	0.95	0.0158
组内	0.022650	15	0.001510			均值标准差	0.0317
总和	0.050737						

结论: 在 95% 置信概率下, 与其他因素对测试结果的影响相比, 样品的不均匀性是可接受的。

表 2 稳定性方差分析表

Table 2 The stability analysis of variance

	平方和	自由度	均方	F 比	F 临界值	置信概率	不稳定标准差
组间	0.0100	6	0.001662	1.32	2.57	0.95	0.0100
组内	0.0265	21	0.001263				
总和	0.0610	27					

表 3 肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品定值结果统计分析表

Table 3 The statistical analysis of constant value result for EIEC nucleic acid reference material

序号	1	2	3	4	5	6	7	8
平均值(X_i , μg)	5.000	5.027	5.003	4.985	4.995	5.020	5.018	4.985
总平均值								
$(\bar{Y} = \frac{1}{P} \sum_{i=1}^P Y_i, \mu\text{g})$					5.004			
平均值标准偏差(s , %)					0.0057			
瓶间不均匀性标准差(%)					0.0158			
不稳定性标准差(%)					0.0100			
合成标准不确定度(%)					0.0195			
扩展不确定度($k=2$, %)					0.04			
正态性检验偏态系数 A					$A=0.12196 [A < (A_{0.95\%}=0.99)]$			
正态性检验峰态系数 B					$B=1.58181 [(B_{1,95\%}=1.46) < B < (B_{1',95\%}=3.70)]$			
异常值检验: Cochran 检验					$C=0.1563 [C < (C_{0.95,6}=0.3600)]$			
异常值检验: Grubbs 检验 1					$\text{Max}(G_n, G_1)=1.6510 [\text{Max}(G_n, G_1) < (G_{0.95,6}=1.887)]$			
异常值检验: Grubbs 检验 2					$\text{Max}(G_n, G_1)=1.4053 [\text{Max}(G_n, G_1) < (G_{0.95,8}=2.126)]$			

4 讨 论

分析定值数据, 正态性检验中, 偏态系数 A 小于 95% 临界值, 峰态系数 B 落于 95% 置信区间内。正态性检验结果表明, 定值数据符合正态分布。异常值检验结果表明, 定值数据中不存在异常值。

从均匀性检验、稳定性检验、定值分析汇总可以看出, 均匀性检验的不确定度较大, 这是由于 PicoGreen DNA 分子荧光定量检测方法目前尚无国家标准方法及国际标准方法, 只是国际通用认可的方法, 可能尚存在不成熟因素。考虑到本研制的核酸标准样品仅作为定性或半定量使用, 因此将均匀性检验、稳定性检验的不确定度引入定值合成不确定度中, 选用 $k=2$, 可满足使用。

将均匀性和稳定性所导致的不确定度与测定不确定度合成^[13-15], 得到结果的合成标准不确定度, 取包含因子为 2, 得到结果的扩展不确定度, 肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品的定值结果为: $(5.00 \pm 0.04) \mu\text{g}$ 。

本文主要针对食品中致病菌核酸定性和定量检测项目, 研究制备食品中肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品。通过对致病菌核酸标准样品的关键制备技术和保存技术的研究, 定值技术和定值方式的研究, 开展均匀性和稳定性试验, 并对食品中致病菌核酸标准样品的不确定度进行深入细致的研究, 最终研制出具有较好均匀性和稳定性的肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品, 以满足食品安全检测的需求, 满足国内外食品微生物检测实验室的需求。

参考文献

- [1] SN/T 1869-2007 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法[S]. SN/T 1869-2007 Rapid detection methods for pathogens in foods - PCR method[S].
- [2] SN/T 1870-2007 食品中致病菌检测方法 实时 PCR 法[S]. SN/T 1870-2007 Detection of pathogens in foods - Real-time PCR method[S].
- [3] SN/T 2641-2010 食品中常见致病菌检测 PCR-DHPLC 法[S]. SN/T 2641-2010 Detection of pathogen in foods -PCR-DHPLC method[S].
- [4] 陈彬, 郑晶, 黄晓蓉, 等. 乳粉中阪崎肠杆菌标准物质的研制[J]. 中国乳品工业, 2012, 12: 16-18.
Chen B, Zheng J, Huang XR, *et al.* Preparation and Certification of reference material for *Enterobacter sakazakii* in the milk powder [J]. China Dairy Ind, 2012, 12: 16-18.
- [5] GB/T 4789.6-2003 食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验[S].
GB/T 4789.6-2003 Microbiological examination of food hygiene-Examination of diarrheogenic *Escherichia coli* [S].
- [6] 萨姆布鲁克 DW 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译, 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
Sambrook J. Molecular cloning laboratory manuals[M]. 3 Edition. Beijing: Science Press, 2002.
- [7] Singer VL, Jones LJ, Yue ST, *et al.* Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation [J]. Anal Biochem, 1997, 1; 249(2): 228-38.
- [8] Blotta I, Prestinaci F, Mirante S, *et al.* Quantitative assay of total dsDNA with PicoGreen reagent and real-time fluorescent detection [J]. Ann Ist Super Sanita, 2005, 41(1): 119-23.
- [9] Tolun G, Myers RS. A real-time DNase assay (ReDA) based on PicoGreen fluorescence [J]. Nucleic Acids Res. 2003, 15, 31(18): e111.
- [10] 刘智敏. 测量统计标准及其在认可认证中的应用[M]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
Liu ZM. Application of statistical standards and measurement in the accreditation and certification [M]. Beijing: China Standard Press, 2001.
- [11] ISO Guide 35:2006. Reference materials-General and statistical principles for certification[S]. International Organization for Standardization, Geneva, 2006.
- [12] GB/T 15000.1~15000.5 标准样品工作导则[S].
GB/T 15000.1~15000.5 National standard, Directives for the Work of Reference Materials[S].
- [13] 郑秋月, 曹际娟, 郭兰. 转基因玉米核酸分子标准样品的研制及适用性验证[C]. 第三届中国能力验证与标准样品论坛, 2012.
Zheng QY, Cao JJ, Guo L. Development and validation of transgenic corn nucleic acid molecules of reference material[C]. The Third Session of The Chinese Ability Verification and Standard Sample Forum, 2012.
- [14] 王长文, 曹际娟, 郑秋月, 等. 制备转基因油菜 RT73 品系国家标准样品[J]. 辽宁师范大学学报, 2010, 33 增刊: 46-47.
Wang CW, Cao JJ, Zheng QY, *et al.* Research of GM rapeseed RT73 line reference material [J]. J Liaoning Norm Univ, 2010, 33, Suppl: 46-47.
- [15] 刘冉, 曹际娟, 郑秋月, 等. 转基因玉米 MON810 品系分子 DNA 国家标准样品的研制[J]. 辽宁师范大学学报, 2010, 33 增刊: 48-49.
Liu R, Cao JJ, Zheng QY, *et al.* Research of GM maize MON810 line molecular DNA reference material [J]. J Liaoning Norm Univ, 2010, 33, Suppl: 48-49.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



那 晗, 硕士, 主要研究方向为食品安全检验。
E-mail: nahanfly@163.com



郑秋月, 博士, 主要研究方向为生物安全检验检疫。
E-mail: zhengqyciq@163.com