

应用基因芯片技术检测食源性腹泻致病大肠杆菌

刘 莹^{*}

(廊坊市疾病预防控制中心, 微生物检验科, 廊坊 065000)

摘 要: **目的** 基因芯片技术在食源性致病大肠杆菌检测中的建立与应用。**方法** 对菌株进行预处理, 通过溴化十六烷基三甲铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)方法提取细菌中的基因组 DNA 并去除其中的杂质, 利用提取的基因组设计引物序列和探针序列, 设计完成后对致病大肠杆菌致病大肠杆菌就基因芯片进行杂交与洗涤, 使用扫描仪对处理过的基因芯片进行扫描实现食源性致病大肠杆菌的检测。**结果** 在病原菌按不同程度稀释的情况下, 与传统的病原分离鉴定检测方法相比, 将基因芯片技术应用在食源性致病大肠杆菌检测中, 能够明显的检测出荧光标记的病原菌。**结论** 该方法的灵敏度更高, 可以解决传统的致病大肠杆菌检测方法灵敏度较低, 病原处于较低的感染状态时难以检出的问题。

关键词: 基因芯片; 食源性病原菌; 大肠杆菌; 病菌检测

Detection of pathogenic *Escherichia coli* in food borne diarrhea by gene chip technology

LIU Ying^{*}

(Langfang City Center for Disease Control and Prevention, Microbiology Inspection Division, Langfang 065000, China)

ABSTRACT: Objective To Establish and apply on gene chip technology in the detection of foodborne pathogenic *Escherichia coli*. **Methods** The strain was pretreated, genomic DNA of the bacteria was extracted by CTAB method and the impurities were removed. The extracted genome was used to design the primer sequence and the probe sequence. After design, the *Escherichia coli* pathogen gene chip was hybridized and washed, and the scan was performed. Scanning processed gene chip with a scanner to detect the pathogenic bacteria of the food-borne *Escherichia coli*. **Results** When the pathogens were diluted to varying degrees, compared with the traditional pathogen isolation and identification method, the detection method of the food-borne *Escherichia coli* pathogen using gene chip technology could detect the fluorescently labeled pathogens obviously. **Conclusion** This method has higher sensitivity and can solve the problems that the traditional method of detecting pathogenic *Escherichia coli* is low in sensitivity and difficult to detect when the pathogen is in low infection state.

KEY WORDS: gene chip; foodborne pathogen; *Escherichia coli*; pathogen detection

基金项目: 廊坊市科技支撑计划项目(2018013083)

Fund: Supported by Langfang Science and Technology Support Plan Project (2018013083)

*通讯作者: 刘莹, 主要研究方向为食源性疾病微生物检验。E-mail: liuying00425@163.com

*Corresponding author: LIU Ying, Center for Disease Control and Prevention, No.121 Heping Road, Guangyang District, Langfang City, Hebei Province, Langfang 065000, China. E-mail: liuying00425@163.com

1 引言

随着现代社会信息化、快捷化的发展,食物样式越来越多,人们越来越重视食品安全问题。近年来由食源性致病大肠杆菌引起的食品安全事故层出不穷,因此预防和控制由病菌污染引发的食品安全事故发生是重点问题^[1]。研究食源性致病大肠杆菌检测方法是应对食品安全问题的至关重要的环节。

常见的对食源性致病大肠杆菌检测的方法有病原分离鉴定、血清中和实验、聚合酶链反应和琼脂扩散实验等,这些方法由于操作简单而被广泛使用,但是所需的检测时限较长、灵敏度不高^[2]。而基因芯片技术作为一种新型的高新技术,利用杂交测序的方法可以同时获取和分析大量分子信息,具有多样品并行处理能力,并且污染较少。

因此本文探究基因芯片技术在食源性致病大肠杆菌检测中的建立与应用,利用基因芯片技术,以基因探针为基础,对每一个探针上的荧光信号进行检测,确定食源性致病大肠杆菌。以期提升致病大肠杆菌检测的灵敏度。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

2.1.1 实验材料

实验材料为中国生物药品研究所提供的大肠杆菌,菌株数量为 10 株。

2.1.2 实验试剂

无水乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);氯化钠(分析纯,天津市鼎盛鑫化工有限公司);氯仿(色谱纯,武汉卡诺斯化工科技有限公司);异戊醇(化学纯,济南鲁东化工有限公司)。

2.1.3 实验仪器

KJ-201B 型振荡器(上海亚荣生化仪器厂);微膜过滤器(南京科捷分析仪器有限公司);MyBath 型水浴器(京金恒祥仪器有限公司);3-18K 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 食源性致病大肠杆菌检测的建立

(1) 菌株的预处理

食源性致病大肠杆菌检测中,一般不能直接对生物样本进行检测,必须对样品进行预处理,依据 SN/T 2075-2008 标准,将大肠杆菌接种在肉膏蛋白胨培养基试管斜面上,保存在 4℃ 的冰箱内,静置 6~8 h^[3]。之后将其从冰箱取出,用 75%酒精棉球对安瓿瓶进行消毒,为了使安瓿瓶顶端破裂,使用酒精灯对安瓿瓶的顶端加热,在安瓿管灼热的顶端滴加 1 滴无菌生理盐水,后去除掉已经残破的安瓿管顶端。用无菌接种环挑取单菌落接种在 LB 液

体培养基中, LB 培养基是由胰蛋白胨、酵母提取物和氯化钠按一定比例混合而成,是大肠杆菌的常用培养基^[4]。接种在 LB 液体培养基中,在常温状态下,以 120 r/min 转速振荡 18~24 h,后对其进行下一步操作,如图 1。

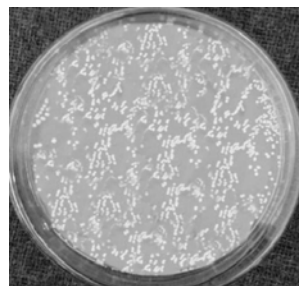


图 1 大肠杆菌在 LB 培养基的菌落形态

Fig.1 Colony morphology of *E. coli* in LB medium

(2) 细菌基因组的提取及测定

将菌株接种 LB 液体培养基振荡培养后,取 1~2 mL 以 8000 r/min 转速离心 5 min,使菌体沉淀,之后将上部分清液去除掉^[5]。将沉淀后的菌体溶于一定容量的 TE 缓冲溶液中。该溶液的容量需利用公式计算,公式如下:

$$V_{TE} = \frac{\rho_0 \cdot \omega_0}{\sum_{i=1}^n M_i} \quad (1)$$

公式(1)中 M_i 表示菌株的质量, i 表示样品数量,其取值范围为 $0 < i < n$, ρ_0 表示溶液密度, ω_0 表示质量分数。

该溶液是由蛋白质、磷酸盐缓冲体系和重碳酸盐缓冲体系组成,用来维持酸碱平衡,对细菌中的 DNA 的碱基有一定的保护作用,处在三羟甲基氨基甲烷 EDTA 液(Tris EDTA, TE)液体中的细菌,其 DNA 不易被破坏其完整性或产生开环断裂^[6]。将溶液振荡混匀,在 37℃ 条件下用溶菌酶、蛋白酶和 SDS 水浴 1~3 h。

使用溴化十六烷基三甲铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)方法提取细菌基因组,CTAB 是一种阳离子去污剂,其化学结构如下图 2 所示。

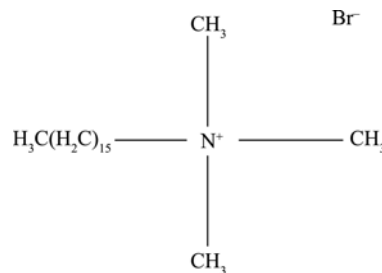


图 2 CTAB 化学结构式

Fig.2 Chemical structure formula of CTAB

在特定的溶液中,它能够与蛋白质和多聚糖形成复合物,再通过有机溶剂提取,去除细菌中蛋白、酚类和多

糖杂质后, 加入乙醇沉淀, 就可将核酸提取出来, 也就是 DNA^[7]。

向水浴后的样品中加入氯化钠混匀, 再加入 CTAB 混匀, 混匀后经过高转速(3500 r/min)离心 5 min, 将上层水清理掉, 加入等体积的氯仿和异戊醇充分混匀, 常温静置 5 min, 重新洗涤, 再一次静置将乙醇完全挥发掉, 加入 TE 溶液溶解 DNA 沉淀, 4℃贮存, 备用^[8]。整体过程如图 3。

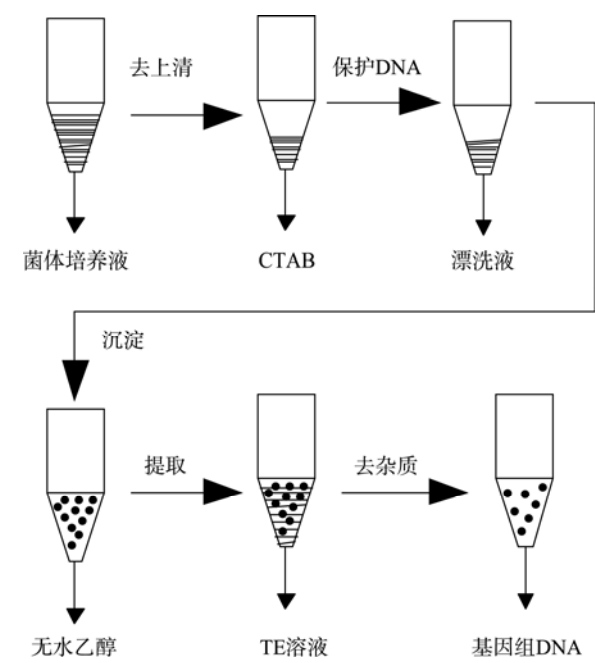


图 3 细菌基因组提取过程
Fig.3 Bacterial genome extraction process

利用琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的完整性, 当 DNA 样品中含有其它污染物时, 会影响后续检测的准确测定。通过 $OD_{260/280}$ 比值来估计 DNA 的纯度并进行处理, 将提取的基因组 DNA 加入比色杯中, 测试核酸浓度及纯度^[9]。若测得的吸光光度比值 1.8~2.0 之间, 则表明提取的基因组 DNA 质量特别好, 若比值若大于 2.0 或小于 1.8, 则需采取相应的措施去除杂质^[10]。

(3) 引物和探针的设计

利用基因芯片技术进行食源性致病大肠杆菌检测, 选择 DNA 基因和 *gyrb* 基因作为靶基因, DNA 基因是携带有遗传信息的 DNA 序列, 而 *gyrb* 基因是普遍存在于细菌内编码 DNA 促旋酶中的基因, 将 DNA 基因与 *gyrb* 基因作为靶基因可有效提高大肠杆菌的检测准确性。在 NCBI 数据库查找大肠杆菌科的序列, 经过对比后, 设计芯片检测探针序列^[11]。以 DNA 基因为靶基因的通用引物在上游引物的一端标记荧光基因, 以 *gyrb* 基因为靶基因的通用引物上下游引物均标记荧光基因^[12]。具体的引物和探针序列如下表所示。

表 1 基因芯片检测探针序列
Table 1 Probe sequence for gene microarray detection

名称	编号	基因定位	探针序列
大肠杆菌	B1	DNA	CTGCGGTAACGTACTAGCG
	B2	<i>gyrb</i>	TACACGCTTGATATGGCCT
	B3	<i>gyrb</i>	CGACAATCACGCAGACGTT

(4) 致病大肠杆菌基因芯片杂交与洗涤

基因芯片技术利用杂交测序方法, 通过探针和样品的靶序列进行分子杂交, 根据杂交图谱排列出靶 DNA 的序列, 进行测定。

芯片杂交前, 对基片上进行预杂交处理。在芯片的平面块中滴加均匀的预杂交液, 之后盖上玻片在室温下预杂交 1 h^[13]。完成后, 将杂交盒中的芯片取出, 放入特定容量的双蒸水中进行漂洗, 一般漂洗 2~3 次, 使杂交液去除干净, 放入冷冻离心机中离心甩干。

使用晶芯芯片围栏粘贴工具对预杂交处理后的芯片进行围栏粘贴, 使芯片上的样品在稳定的湿度和温度条件下, 反应始终保持均一, 避免样品之间的交叉感染, 提高杂交反应质量。将围栏试验纸撤去后, 对位置进行检查, 确定后为保证粘贴牢固对其反复按压^[14]。

在晶芯基因芯片杂交盒的两端各加入一定量的双蒸水, 将点样后的芯片放在杂交盒中, 使用的杂交炉的温度保持在 48℃, 将杂交盒放置在杂交炉中, 对杂交盒中的芯片表面进行预热, 防止荧光背景的干扰。

根据公式设置杂交体系, 公式如下:

$$G=\lambda\sum_{i=1}^nM_i\cdot g$$
 (2)

公式(2)中 λ 表示病原菌的存活适合度, g 表示杂交因子, 杂交体系 G 的单位为 μL , 其中含有相同容量标记的 DNA 引物和 1 nmol/L 的荧光质控探针, 将杂交液在 95℃下变性 5 min 后, 立即静置在冰上进行冷却, 待温度降低后将杂交液加入到基因芯片矩阵上, 再一次放入杂交炉中, 在 48℃的条件下杂交 2 h。

因从杂交炉中取出的基因芯片上存在未杂交的成分, 如果不去除的话会使背景值过高, 所以对基因芯片进行洗涤操作。配置好 3 管洗液, 将其放置在水浴锅中预热, 防止出现沉淀物。对每张基因芯片进行快速抽动, 大约 20 次后浸泡在洗液中, 将盖玻片撤除, 防止剧烈振荡。在常温条件下, 将基因芯片在洗液 1 中 5 min, 洗液 2 中 5 min, 洗液 3 中 3 min, 最后在双蒸水中 1 min。将芯片取出后静置在避光的离心管中, 利用冷冻离心机进行甩干, 甩干后将基因芯片搁置在避光盒中扫描备用, 为防止荧光信号对着时间杂交信号延长而减弱, 以上操作及扫描工作在同一天完成。

(5) 致病大肠杆菌基因芯片扫描

使用共聚焦激光扫描仪对基因芯片进行扫描, 使用设置好的荧光颜色进行扫描, 提取每个探针的荧光信号强度值, 并计算每个探针荧光信号平均值, 之后通过阈值将信号低下的探针去除掉, 只有高于阈值和阳性参照探针信号值的 10% 的探针信号才被视为有效信号。当存在有效信号的基因芯片质控位点为绿色荧光, 阳性杂交质控位点也出现明显的绿色荧光, 可判定为检测该种细菌。

2.2.2 致病大肠杆菌检测实验

(1) 实验准备

实验所需的菌株为大肠杆菌, 共 10 株, 保存在 4℃ 的冰箱内。实验过程中所需的试剂有 SDS、氯化钠、溶菌酶、酚、蛋白酶。基因芯片点样液、CTAB、TB 溶液和 LB 溶液等。

(2) 主要设备及参数

实验中主要使用共聚焦激光扫描仪进行扫描, 如下图所示。

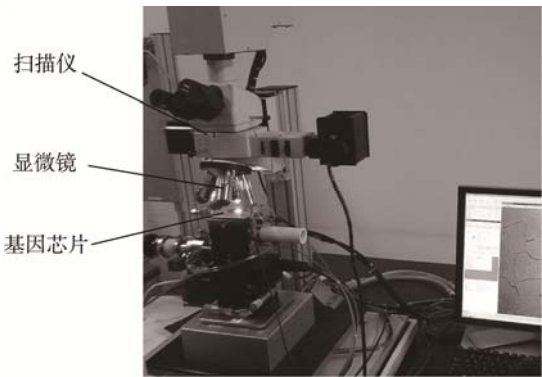


图 4 激光扫描仪实物图
Fig.4 Real picture of laser scanner

该设备相关参数如表 2 所示。

表 2 实验设备相关参数
Table 2 Related parameters of experimental equipment

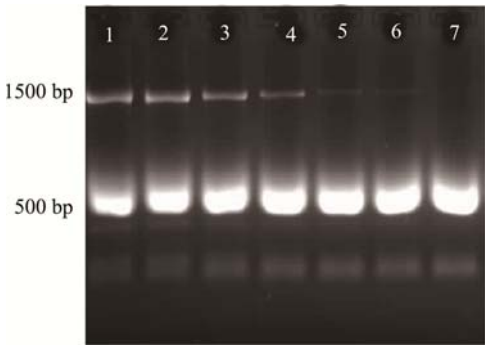
名称	参数
荧光属性	绿色 532 nm 单色荧光
扫描分辨率	10 μm
PWT 调节范围	PMT550-PMT700
功率增益	100%

3 结果与分析

将大肠杆菌的基因组 DNA 用超纯水, 按照 10 倍梯度稀释, 共做 6 个稀释度, 以不同的稀释度 DNA 为模板进行电泳, 调节相同的电泳电压, 根据电泳条带强度判断基因

芯片技术的检测方法和传统的病原分离鉴定检测方法的敏感性, 电泳条带越明显则强度越高, 说明检测方法灵敏度越强。

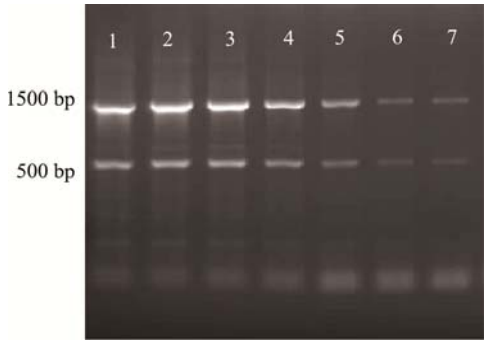
在紫外灯下观察结果, 细菌基因组 DNA 发射的荧光效果越明显, 检测致病大肠杆菌的灵敏度越高。图 5 和图 6 中第一组是未稀释的实验样品, 后面 6 组是按照 10 倍递增稀释的样品, 纵向观察 2 图, 可以看出, 电泳电压处于 1500 bp 时, 2 种检测方法的检测结果相差较小, 但是当电泳电压调整到 500 bp 时, 图 5 中的检测结果比图 6 中的检测结果更明显, 而且随着稀释程度加大, 依然能够明显的检测出图 5 中的结果, 而图 6 的结果随着稀释程度的加大, 检测效果越来越弱, 趋近于消失。说明病原处于较低的感染状态时, 两者方法相比, 使用基因芯片技术的检测方法效果更明显, 灵敏度更高。



注: 1: DNA Land; 2~7: 大肠杆菌原浓度 $\times 10^{-1}$ ~原浓度 $\times 10^{-6}$ 。

图 5 基因芯片技术检测灵敏度结果

Fig.5 Sensitivity test results of gene chip technique



注: 1: DNA Land; 2~7: 大肠杆菌原浓度 $\times 10^{-1}$ ~原浓度 $\times 10^{-6}$ 。

图 6 传统方法检测灵敏度结果

Fig.6 Sensitivity test results of traditional methods

4 结 论

基因芯片技术是近几年发展起来的高新技术, 被广泛应用于生物学中的各个领域。将基因芯片技术应用在食源性致病大肠杆菌检测中, 将 DNA 作为引物设计探针, 并进行检测实验。实验主要对比了传统方法与基因芯片技术

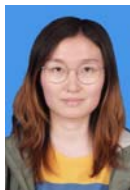
检测方法对致病大肠杆菌检测的灵敏度。从实验结果中可以看出明显看出基于基因芯片技术的检测方法灵敏度是更高的。这由于本次研究通过CTAB方法提取细菌中的基因组DNA并去除其中的杂质,并对致病大肠杆菌基因芯片进行杂交与洗涤,使得基因组杂质更少,提升了检测方法的灵敏度。相信随着基因芯片技术的不断升级,基因芯片技术会有更广阔的发展空间。

参考文献

- [1] 刘思渊, 古少鹏, 隋志伟, 等. 流式分析技术快速定量检测牛乳中大肠杆菌 O157: H7[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 302–306.
- Liu SY, Gu SP, Sui ZW, *et al.* Rapid and quantitative detection of *Escherichia coli* O157: H7 in milk by flow analysis technique [J]. Food Sci, 2018, 39(6): 302–306.
- [2] 张子龙, 李深伟, 邱瑾, 等. 高通量基因芯片在压载水中检测致病菌的应用[J]. 上海海洋大学学报, 2018, 27(3): 431–437.
- Zhang ZL, Li SW, Qiu J, *et al.* Application of high-throughput gene chip in detecting pathogenic bacteria in ballast water [J]. J Shanghai Ocean Univ, 2018, 27(3): 431–437.
- [3] 冯可, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 鲜切果蔬中4种病原微生物多重PCR检测技术[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 276–283.
- Feng K, Hu WZ, Jiang AL, *et al.* Multiplex PCR detection of four pathogenic microorganisms in fresh-cut fruits and vegetables [J]. Food Sci, 2018, 39(6): 276–283.
- [4] 邓健康, 牛晓娟, 刘亚青, 等. 基于核酸外切酶III信号放大的比率型荧光传感器检测致病菌基因[J]. 分析化学, 2018, (5): 743–749.
- Deng JK, Niu XJ, Liu YQ, *et al.* Detection of pathogenic bacteria genes based on exonuclease III signal amplification ratio-type fluorescence sensor [J]. Chin J Anal Chem, 2018, (5): 743–749.
- [5] 崔强, 赵治国, 李菁雯, 等. 微生物检验技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(21): 218–222.
- Cui Q, Zhao ZG, Li JW, *et al.* Progress in microbial testing technology [J]. Food Res Dev, 2018, 39(21): 218–222.
- [6] 王丹吉, 刘巧, 卢鹏, 等. 基因芯片技术快速检测结核分枝杆菌耐药性的临床应用研究[J]. 现代预防医学, 2018, 45(11): 133–137.
- Wang DJ, Liu Q, Lu P, *et al.* Clinical application of rapid detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by gene chip technology [J]. Mod Pre Med, 2018, 45(11): 133–137.
- [7] 向华, 文翼平, 杨国淋, 等. 基因芯片检测技术在禽类病原检测方面的研究进展[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(1): 190–194.
- Xiang H, Wen YP, Yang GL, *et al.* Research progress of gene chip detection technology in poultry pathogen detection [J]. Chin J Vet Med, 2019, 39(1): 190–194.
- [8] 罗宁, 王群, 张小龙, 等. 10种猪常见病毒基因芯片检测方法的建立及初步应用[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(10): 192–203.
- Luo N, Wang Q, Zhang XL, *et al.* Establishment and preliminary application of 10 common porcine viral gene chip detection methods [J]. J Anim Husb Vet Med, 2018, 49(10): 192–203.
- [9] 吴凤笋, 吕玉金, 刘玲玲, 等. 猪细小病毒检测基因芯片的构建及初步应用[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(1): 37–39.
- Wu FS, Lv YJ, Liu LL, *et al.* Construction and preliminary application of porcine parvovirus detection gene chip [J]. Chin J Vet Med, 2018, 54(1): 37–39.
- [10] 申进玲, 赵丽娜, 韩伟, 等. 弯曲菌快速检测技术研究及应用进展[J]. 食品科学, 2018, 39(23): 322–329.
- Shen JL, Zhao LN, Han W, *et al.* Research and application progress of rapid detection technology of campylobacter [J]. Food Sci, 2018, 39(23): 322–329.
- [11] 吴瑜凡, 王翔, 崔思宇, 等. 潜在食源性致病菌弓形菌在食品中的分布及检测研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(7): 56–61.
- Wu YF, Wang X, Cui SY, *et al.* Progress in the distribution and detection of potential foodborne pathogenic bacteria *Toxoplasma gondii* in foods [J]. Food Sci, 2019, 40(7): 56–61.
- [12] 胡金强, 魏向珂, 黄润娜, 等. 食源性致病菌 RPA 检测技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 91–96.
- Hu JQ, Wei XY, Huang RN, *et al.* Research progress on RPA detection technology of foodborne pathogenic bacteria [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(7): 91–96.
- [13] 朱旭慧, 周俞, 侯红艳, 等. 急性腹泻患儿致泻性大肠埃希菌流行病学研究和耐药性分析[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(3): 214–218.
- Zhu XH, Zhou Y, Hou HY, *et al.* Epidemiological study and drug resistance analysis of diarrhea-causing *Escherichia coli* in children with acute diarrhea [J]. Chin J Lab Med, 2019, 42(3): 214–218.
- [14] 许国洋, 沈克飞, 徐登峰, 等. 重庆地区兔腹泻病原菌分离鉴定及检测方法的建立[J]. 西北农业学报, 2018, 27(8): 25–31.
- Xu GY, Shen KF, Xu DF, *et al.* Establishment and identification of pathogens for rabbit diarrhea in Chongqing [J]. Acta Agric Boreali-occident Sin, 2018, 27(8): 25–31.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



刘莹, 主要研究方向为食源性疾病微生物检验。
E-mail: liuying00425@163.com