

# 基于实时荧光聚合酶链式反应快速检测食源性 大肠埃希氏菌 O157:H7

任宝红<sup>1,2</sup>, 付燕峰<sup>1,2</sup>, 娄亚坤<sup>1,2</sup>, 苗银萍<sup>1,2</sup>, 曾小宇<sup>1,2</sup>,  
杨楠<sup>1,2</sup>, 姬建生<sup>2,3</sup>, 郭瑞<sup>1,2\*</sup>

[1. 郑州中道生物技术有限公司, 郑州 450001; 2. 国家市场监管重点实验室(食品安全快速检测与智慧监管技术), 郑州 450003; 3. 河南省食品检验研究院, 郑州 450003]

**摘要: 目的** 建立一种快速、灵敏、特异、高效的食源性大肠埃希氏菌 O157:H7 型实时荧光聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测方法。**方法** 针对大肠埃希氏菌 O157:H7 型的 O 抗原特异基因 *rfbE* 保守区域设计特异性引物和探针, 合成基因片段绘制标准曲线, 在菌液基因组 DNA 和质粒双层面调试优化以完成方法的初步建立。其后, 对该方法的特异性、敏感性、重复性等进行全面的质量评估验证。**结果** 该方法特异性 100%; 基因组 DNA 检测敏感性为  $7.11 \times 10^2$  fg/ $\mu$ L; 纯培养物水平检测敏感性为  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL; 重复性变异系数在 0.10%~1.00%之间; 标准曲线相关系数  $r^2$  为 0.9994。**结论** 成功建立了一种性能良好的大肠埃希氏菌 O157:H7 型实时荧光探针 PCR 快速检测方法, 该方法具有灵敏度高、特异性强、扩增时间短, 仅为 35 min 的特点, 可用于疑似大肠埃希氏菌 O157:H7 型污染样品的快速诊断检测。

**关键词:** 大肠埃希氏菌 O157:H7; *rfbE* 保守区域; 实时荧光聚合酶链式反应技术; 探针; 快速扩增

## Rapid detection of food-borne *Escherichia coli* O157:H7 based on real-time fluorescence polymerase chain reaction

RENG Bao-Hong<sup>1,2</sup>, FU Yan-Feng<sup>1,2</sup>, LOU Ya-Kun<sup>1,2</sup>, MIAO Yin-Ping<sup>1,2</sup>,  
ZENG Xiao-Yu<sup>1,2</sup>, YANG Nan<sup>1,2</sup>, JI Jian-Sheng<sup>2,3</sup>, GUO Rui<sup>1,2\*</sup>

[1. Zhengzhou Zhongdao Biotechnology Co., Ltd., Zhengzhou 450001, China; 2. State Key Laboratory of Market Regulation (Food Safety Rapid Testing and Smart Supervision Technology), Zhengzhou 450003, China; 3. Henan Province Food Inspection Research Institute, Zhengzhou 450003, China]

**ABSTRACT: Objective** To establish a rapid, sensitive, specific and efficient real-time polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of food-borne *Escherichia coli* O157:H7. **Methods** Specific primers and probes were designed for the conserved region of the O antigen-specific gene *rfbE* of *E. coli* O157:H7. Standard curves were drawn by synthesizing gene fragments, and double-level debugging and optimization of genomic DNA and plasmid in bacterial solution were performed to complete the preliminary establishment of the method. Then, the specificity, sensitivity and repeatability of the method were evaluated and verified. **Results** The specificity of

基金项目: 河南省市场监督管理局科技计划项目(2022sj25)

Fund: Supported by the Science and Technology Project of Administration for Market Regulation Henan Province (2022sj25)

\*通信作者: 郭瑞, 硕士, 主要研究方向为动物疫病诊断技术的开发与应用。E-mail: aigrz@126.com

\*Corresponding author: GUO Rui, Master, Zhengzhou Zhongdao Biotechnology Co., Ltd., Zhengzhou 450001, China. E-mail: aigrz@126.com

this method was 100%, the sensitivity of genomic DNA was  $7.11 \times 10^2$  fg/ $\mu$ L, the sensitivity of pure culture level was  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL, the coefficient of variation of repeatability was between 0.10% and 1.00%, the correlation coefficient  $r^2$  of the standard curve was 0.9994. **Conclusion** A good real-time fluorescent probe PCR method for rapid detection of *E. coli* O157:H7 is successfully established. The method has the characteristics of high sensitivity, strong specificity and short amplification time (only 35 min), and can be used for the rapid diagnostic detection of suspected *E. coli* O157:H7 contaminated samples.

**KEY WORDS:** *Escherichia coli* O157:H7; *rfbE* conserved region; real-time fluorescent polymerase chain reaction technology; probe; rapid amplification

## 0 引言

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) O157:H7 是肠杆菌科埃希氏菌属的代表血清型, 是一种人兽共患的条件性致病菌<sup>[1]</sup>, 可引起感染性腹泻、出血性结肠炎和溶血性尿毒综合征等疾病, 严重时可致人死亡, 感染量极低, 摄取 10 个活菌即可感染<sup>[2-4]</sup>。

在食品中广泛存在着可能感染人类的大肠埃希氏菌 O157:H7 株, 肉制品、各种蔬菜、生鲜乳、水源以及婴幼儿奶粉等, 都有可能存在该致病菌, 尤其是牛肉及其制品<sup>[5-7]</sup>。国际上, 曾经有多个国家报道大肠埃希氏菌 O157:H7 感染事件, 而且在欧美等发达国家地区相对更为频繁, 可能与他们的食物结构中牛肉及制品占比更高有关<sup>[8-9]</sup>。因此, 大肠埃希氏菌 O157:H7 被列为重点监测致病菌之一, 国内外也制定了多项相关检测标准。

经典的微生物鉴别诊断方法一般是要对疑似感染样品进行增菌培养, 再使用特定鉴别培养基进行鉴别培养, 再结合生化检验等实现诊断, 通常周期长、操作复杂<sup>[10-12]</sup>, 这与食品安全的快速检测需求极其不匹配。荧光聚合酶链式反应技术(polymerase chain reaction, PCR)敏感性高、特异性强、易操作、可数据化, 广泛的应用于病原微生物检测中<sup>[13-16]</sup>。

有效保障食品安全的核心需求之一就是能够快速、准确的实现诊断。不同的分子生物技术在微生物的诊断中均有应用, 也都有不同程度的缺点, 如环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)引物设计难、敏感性低<sup>[17-20]</sup>; 数字 PCR 和高通量测序技术成本较高<sup>[21-23]</sup>; 基因芯片技术不仅仪器昂贵, 而且对技术人员要求严格, 专业性较强<sup>[24-25]</sup>, 相对应用较多的仍是荧光探针技术, 但扩增时间普遍需要 1 h 左右, 时效性有所不足。

因此, 本研究采用在微生物诊断中相对更加高效的荧光探针技术, 通过对靶基因、引物探针、体系、程序等的深度挖掘, 拟实现在 30 min 左右完成扩增的短程序条件下, 建立一种大肠埃希氏菌 O157:H7 的快速荧光 PCR 核酸检测方法, 以期在兼顾成本、敏感性、时效性等方面对食源性大肠埃希氏菌 O157:H7 型的快速检测提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

大肠埃希氏菌 O157:H7(菌种编号: NCTC12900)、大肠埃希氏菌(菌种编号: ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(菌种编号: ATCC6538)、单核细胞增生李斯特菌(菌种编号: ATCC19115)、鼠伤寒沙门氏菌(菌种编号: ATCC14028)、副溶血性弧菌(菌种编号: ATCC17802)(广东环凯微生物科技有限公司)。

#### 1.1.2 试剂与耗材

核酸柱式提取试剂盒(No.20220601)(郑州中道生物技术有限公司); 50 $\times$ superstart fast enzyme /UNG mix、2 $\times$ superstart fast buffer(珠海宝锐生物科技有限公司); LB 营养肉汤培养基(北京奥博星生物技术有限公司); 0.9%氯化钠注射液(河南科伦药业有限公司); TE 缓冲液(pH 8.0, 北京索莱宝科技有限公司)。

#### 1.1.3 仪器与设备

JBZ-D 冷冻恒温振荡培养箱(常州普天仪器制造有限公司); DH-500 电热恒温培养箱(北京中兴伟业仪器有限公司); SW-CJ-1FD 超净工作台(苏洁净化有限公司); BHC-1300IIA2 生物安全柜(阿尔泰实验室设备(北京)有限公司); H1650-W 台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); UV5 Nano 超微量紫外分光光度计[梅特勒托利多科技(中国)有限公司]; Gentier 48E 实时荧光定量 PCR 检测系统(西安天隆科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物、探针设计与合成

基于 National Center for Biotechnology Information 网站收录的大肠埃希氏菌 O157:H7 *rfbE* 基因序列(登录号 S83460.1), 利用 DNAMAN 软件分析比对 *rfbE* 基因的保守区域, 再结合软件 Beacon Designer 8.0 设计引物和探针(见表 1), 同步对应的靶序列为靶基因。委托华大基因合成引物 O157-*rfbE*-F 和 O157-*rfbE*-R、探针 O157-*rfbE*-P、靶基因 pUC57-O157-*rfbE*。

表 1 引物和探针序列信息  
Table 1 Sequences of the primer and probe

引物、探针名称	引物、探针序列(5'-3')	大小
O157- <i>rfbE</i> -F	5'-GAAGCCTTGGTTCTAAATA-3'	139 bp
O157- <i>rfbE</i> -R	5'-GGTCATAAAGTGTTTGGTC-3'	
O157- <i>rfbE</i> -P	FAM-5'-ACCATTCCACCTTCACCTGT AGTAAT-3'-BHQ1	

### 1.2.2 模板 DNA 的制备

将大肠埃希氏菌 O157:H7 菌种经营养琼脂纯化分离,然后挑取单个菌落接种于 LB 营养肉汤培养基中,在 37°C、200 r/min 条件下,摇床中增菌培养 16 h;参照 GB/T 4789.2—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》中平板计数法测定培养菌液浓度。

取 1 mL 培养菌液于 1.5 mL 离心管中,13767×g 离心 5 min,弃上清,用 0.2 mL 氯化钠注射液重悬沉淀,作为样品。利用核酸柱式提取试剂盒并按其说明书步骤提取制备 DNA 模板。使用 UV5 Nano 超微量紫外分光光度计测定制备的 DNA 浓度。

### 1.2.3 大肠埃希氏菌 O157:H7 型实时荧光 PCR 快速检测方法的建立

以大肠埃希氏菌 O157:H7 过夜培养菌液提取的核酸作为阳性核酸模板;对合成质粒 pUC57-O157-*rfbE* 测定浓度,并用 TE 缓冲液稀释至  $1 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L 作为阳性质粒模板;以核酸模板和质粒模板的循环阈值(cycle threshold, Ct)最小为原则,对反应程序、引物浓度、探针浓度等条件,采用矩阵法摸索,优化调试以建立大肠埃希氏菌 O157:H7 型实时荧光 PCR 快速检测方法。

### 1.2.4 标准曲线的建立

将合成质粒 pUC57-O157-*rfbE* 用 TE 缓冲液 10 倍连续梯度稀释,制备  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L 7 个梯度标准浓度模板,同时设立 TE 缓冲液为空白对照。对标准曲线 7 个梯度质粒模板检测,试验进行 3 次平行重复,建立大肠埃希氏菌 O157:H7 型实时荧光 PCR 快速检测方法的标准曲线,分析线性关系。

### 1.2.5 特异性评价

以大肠埃希氏菌 O157:H7、大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、鼠伤寒沙门氏菌、副溶血性弧菌等 6 种菌液样品提取的核酸作为特异性验证核酸模板,使用建立的大肠埃希氏菌 O157:H7 型实时荧光 PCR 快速检测方法,对特异性验证核酸模板进行特异性检测验证。

### 1.2.6 敏感性评价

基因组 DNA 敏感性评价:将提取的大肠埃希氏菌 O157:H7 的基因组 DNA 浓度测定,按 10 倍递增稀释方法稀释成 6 个梯度,对这 6 个梯度进行荧光 PCR 扩增并重复 3 次,能得到明显扩增曲线的最低稀释浓度即为该方法检测体系的敏感性。

纯培养物水平敏感性评价:大肠埃希氏菌 O157:H7 培养 6 h,进行 10 倍梯度稀释,选择  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  这 3 个稀释倍数的菌液进行平板计数。提取基因组 DNA,以 ddH<sub>2</sub>O 为空白对照,分别进行荧光 PCR 扩增并重复 3 次。

### 1.2.7 重复性评价

使用建立的大肠埃希氏菌 O157:H7 型实时荧光 PCR 快速检测方法,对稀释的 6 个梯度核酸模板和阳性质粒模板  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L,分别在第 1 d、第 2 d、第 3 d 进行重复检测。分别统计分析各梯度的 Ct 值平均值( $\bar{X}$ )、标准差(standard deviation, SD)和变异系数(coefficient of variation, CV),验证所建立方法的重复性。

## 1.3 数据处理

采用 Statistical Product and Service Solutions 23.0 软件对试验数据进行统计分析,试验数据以“平均值±标准差”表示,并使用 Origin 9.0 软件绘制标准曲线图。

## 2 结果与分析

### 2.1 大肠埃希氏菌 O157:H7 型荧光 PCR 快速检测方法的建立

本研究经过一系列以大肠埃希氏菌 O157:H7 阳性核酸和合成基因的阳性质粒为模板,对反应程序、引物浓度、探针浓度等条件优化调试。最终确定大肠埃希氏菌 O157:H7 型实时荧光 PCR 快速检测方法的最佳引物终浓度为 400 nmol/L,探针终浓度为 240 nmol/L;反应体系如表 2 所示。反应程序为:95°C/30 s;94°C/8 s,60°C/8 s(收集荧光),40 个循环。

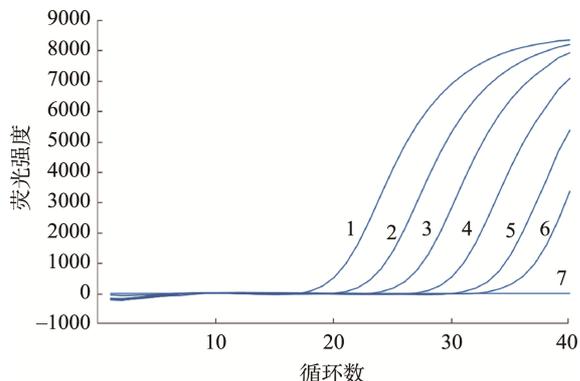
表 2 荧光反应体系  
Table 2 Fluorescence reaction system

成分	用量/ $\mu$ L
O157- <i>rfbE</i> -F	0.2
O157- <i>rfbE</i> -R	0.2
O157- <i>rfbE</i> -P	0.3
50×superstart fast enzyme /UNG mix	0.5
2×superstart fast buffer	12.5
ddH <sub>2</sub> O	6.3
DNA 模板	5.0
总体积	25.0

### 2.2 标准曲线建立

大肠埃希氏菌 O157:H7 型阳性质粒 pUC57-O157-*rfbE* 用 TE 缓冲液 10 倍连续梯度稀释至  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L 7 个梯度,进行实时荧光 PCR 快速检测。结果显示,最低检出量为  $1 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L(见图 1)。以阳性质粒浓度(X, copies/ $\mu$ L)为 X 轴,以 Ct 值(Y)为 Y 轴,绘制回归方程,可得到大肠埃希氏菌 O157:H7 型实时荧光 PCR 标准曲线(见图 2),计算分析相关系数  $r^2=0.9994$ ,回

归方程式  $Y=-3.2353X+40.231$ , 扩增效率  $E$  为 103.7%。说明该方法扩增效率高, 梯度线性关系良好。



注: 扩增曲线图中标注 1~7 代表质粒模板浓度依次为  $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ 。

图 1 荧光 PCR 标准品扩增曲线

Fig.1 Amplification curves of fluorescence PCR for standard plasmid

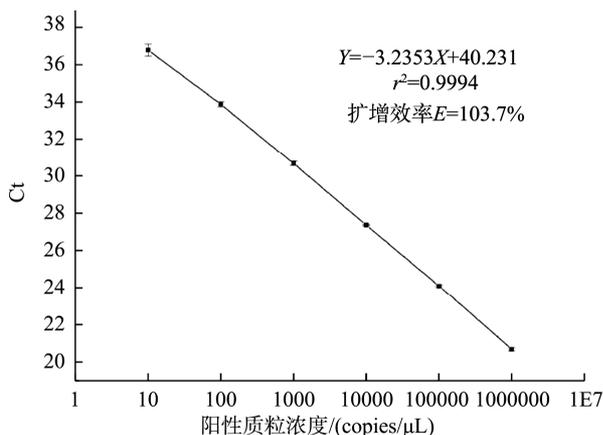


图 2 荧光 PCR 标准曲线

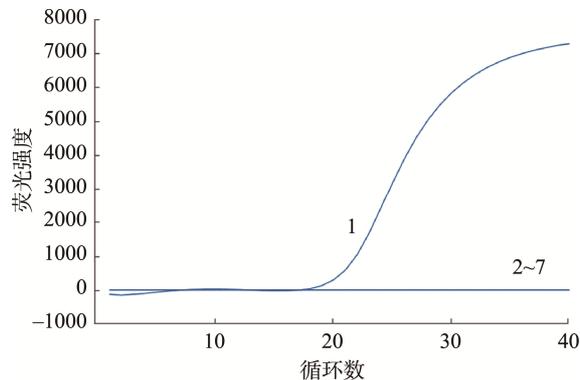
Fig.2 Standard curve of fluorescence PCR

### 2.3 特异性评价

采用大肠埃希氏菌 O157:H7 型实时荧光 PCR 快速检测方法分别以大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、鼠伤寒沙门氏菌、副溶血性弧菌等 5 种菌液样品提取的核酸进行检测, 结果显示均为阴性, 而对大肠埃希氏菌 O157:H7 提取核酸样品检测结果为阳性(见图 3)。试验结果显示该检测方法与常见食源性微生物核酸无交叉反应, 特异性为 100%。

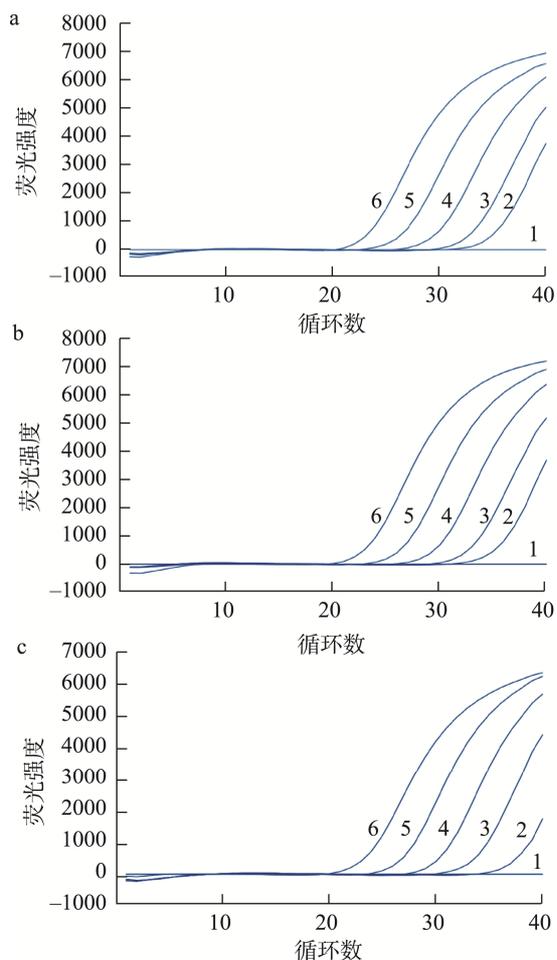
### 2.4 敏感性评价

提取出的菌液基因组 DNA 初始质量浓度为  $7.11 \times 10^6$  fg/ $\mu\text{L}$ , 以 10 倍稀释成 6 个梯度, 最小质量浓度为 71.1 fg/ $\mu\text{L}$ 。对这 6 个梯度进行 3 次荧光 PCR 扩增(见图 4), 结果显示质量浓度为  $7.11 \times 10^2$  fg/ $\mu\text{L}$  能稳定检出(见表 3), 说明该实时荧光 PCR 检测体系的扩增敏感性为  $7.11 \times 10^2$  fg/ $\mu\text{L}$ 。



注: 扩增曲线图中标注 1 为大肠埃希氏菌 O157:H7; 标注 2~7 依次为大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、鼠伤寒沙门氏菌、副溶血性弧菌、空白对照。

图 3 荧光 PCR 检测大肠埃希氏菌 O157:H7 特异性扩增曲线  
Fig.3 Specific amplification curves of *Escherichia coli* O157:H7 by fluorescence PCR



注: a、b、c 为 3 次荧光 PCR 检测扩增曲线, 数字 6~1 分别代表基因组 DNA 质量浓度  $7.11 \times 10^6$ 、 $7.11 \times 10^5$ 、 $7.11 \times 10^4$ 、 $7.11 \times 10^3$ 、 $7.11 \times 10^2$ 、 $7.11 \times 10$  fg/ $\mu\text{L}$ 。

图 4 荧光 PCR 检测大肠埃希氏菌 O157:H7 基因组 DNA 扩增曲线  
Fig.4 Genomic DNA amplification curves of *Escherichia coli* O157:H7 by fluorescence PCR

表 3 DNA 质量浓度与 Ct 值关系

Table 3 Relationship between DNA mass concentration of *Escherichia coli* O157:H7 and Ct value

DNA 质量浓度/(fg/ $\mu$ L)	$7.11 \times 10^6$	$7.11 \times 10^5$	$7.11 \times 10^4$	$7.11 \times 10^3$	$7.11 \times 10^2$	$7.11 \times 10^1$
Ct 值	24.44 $\pm$ 0.16	27.74 $\pm$ 0.04	31.62 $\pm$ 0.26	34.47 $\pm$ 0.23	37.97 $\pm$ 0.94	-

注: -表示未检出,下同。

将培养 6 h 的大肠埃希氏菌 O157:H7 进行平板计数,算得原始菌液浓度为  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL,把原始菌液稀释成  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL,然后 10 倍梯度稀释至  $10^{-5}$  核酸提取,进行 PCR 扩增(见图 5)。在稀释度为  $10^{-4}$  时,3 次荧光 PCR 检测均能稳定检出,而在稀释度为  $10^{-5}$  时,3 个重复有 2 个检出,概率为 66.7%(见表 4)。则判定该实时荧光 PCR 检测体系的纯培养物水平敏感性为  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL。

## 2.5 重复性评价

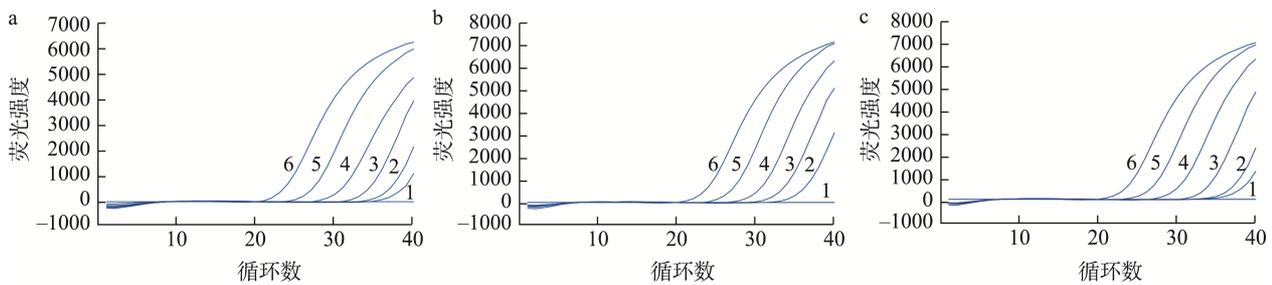
经过对大肠埃希氏菌 O157:H7 稀释的核酸模板  $7.11 \times 10^6 \sim 7.11 \times 10^2$  fg/ $\mu$ L 的 3 重复检验,计算各梯度  $\bar{X}$ 、SD 和 CV,结果显示,该方法各梯度 CV 在 0.20%~0.50% 区间,整体小于 0.5%(见表 5)。说明该方法在核酸层面重复性良好,多次检测数据波动小。

经过对大肠埃希氏菌 O157:H7 阳性质粒模板  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 的 3 重复检验,计算各梯度  $\bar{X}$ 、SD 和 CV,结果显示,该方法各梯度 CV 在 0.10%~1.00% 区间,

整体小于 1.00%(见表 6)。说明该方法在质粒层面重复性良好,多次检测数据波动小。

## 3 讨论与结论

大肠埃希氏菌主要有 O、K、H 3 种抗原,即菌体(O)抗原、鞭毛(H)抗原和荚膜(K)抗原,每一种血清型都只具有这 3 种抗原中一种。O 抗原为细胞壁上的脂多糖,是大肠埃希氏菌血清型分群的基础,具体很好的热稳定性,经高压灭菌 2 h 仍保持其结构完整性<sup>[26]</sup>。大肠埃希氏菌 O157:H7 是重要的出血性大肠杆菌血清型之一,开展其血清型的分子生物学检测方法的研究可实现快速、准确、高效检测,尤其利于应对食品安全紧急突发事件,具有重大意义。在前人研究的基础上,如 WANG 等<sup>[27]</sup>和 BILGE 等<sup>[28]</sup>均对大肠埃希氏菌 O157 中的 *rfbE* 基因进行了研究,发现其序列与其他细菌没有同源性,为大肠埃希氏菌 O157 的 O 抗原编码基因。



注: a、b、c 为 3 次荧光 PCR 检测扩增曲线,数字 6~1 分别代表菌液浓度  $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^3$ 、 $1.0 \times 10^2$ 、 $1.0 \times 10^1$  CFU/mL。

图 5 荧光 PCR 检测大肠埃希氏菌 O157:H7 菌液梯度扩增曲线

Fig.5 Gradient amplification curves of *Escherichia coli* O157:H7 solution by fluorescence PCR

表 4 纯培养物浓度与 Ct 值关系

Table 4 Relationship between pure culture concentration of *Escherichia coli* O157:H7 and Ct value

菌液浓度/(CFU/mL)	$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^1$
Ct 值	24.39 $\pm$ 0.07	28.00 $\pm$ 0.15	31.77 $\pm$ 0.03	35.09 $\pm$ 0.06	38.17 $\pm$ 0.52	-

表 5 荧光 PCR 检测核酸模板组间重复性试验结果

Table 5 Results of inter group repeatability test of nucleic acid template by fluorescence PCR

质量浓度/(fg/ $\mu$ L)	第 1 d	第 2 d	第 3 d	$\bar{X} \pm SD$	CV/%
$7.11 \times 10^6$	24.441	24.348	24.457	24.415 $\pm$ 0.058	0.24
$7.11 \times 10^5$	27.996	27.996	27.801	27.931 $\pm$ 0.113	0.40
$7.11 \times 10^4$	31.043	31.207	31.169	31.140 $\pm$ 0.086	0.27
$7.11 \times 10^3$	35.043	35.129	34.801	34.991 $\pm$ 0.170	0.48
$7.11 \times 10^2$	37.801	37.957	37.879	37.520 $\pm$ 0.078	0.21

表 6 荧光 PCR 检测质粒模板组间重复性试验结果  
Table 6 Results of inter group repeatability test of plasmid template by fluorescence PCR

质粒浓度/(copies/ $\mu$ L)	第 1 d	第 2 d	第 3 d	$\bar{X} \pm SD$	CV/%
$1 \times 10^6$	20.652	20.660	20.598	20.637 $\pm$ 0.034	0.16
$1 \times 10^5$	23.738	24.027	24.121	23.962 $\pm$ 0.200	0.83
$1 \times 10^4$	27.238	27.363	27.379	27.327 $\pm$ 0.077	0.28
$1 \times 10^3$	30.371	30.613	30.598	30.527 $\pm$ 0.136	0.44
$1 \times 10^2$	33.707	33.793	33.801	33.767 $\pm$ 0.052	0.15
$1 \times 10^1$	35.973	36.301	35.965	36.080 $\pm$ 0.192	0.53

本研究选择大肠埃希氏菌 O157:H7 的 O 抗原基因簇的 *rfbE* 基因作为靶基因, 选择其保守区域设计引物和探针, 建立了一种基于荧光探针 PCR 技术的核酸检测方法。根据 NCBI BLAST 分析比对结果, 选择的引物、探针序列与其他基因序列无明显相关性, 与大肠埃希氏菌 O157:H7 对应基因序列完成吻合。建立的荧光探针 PCR 方法对大肠埃希氏菌 O157:H7 菌株和非大肠埃希氏菌 O157:H7 菌株进行检测, 结果表明, 该方法特异性 100%, 与常见食源性微生物金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、鼠伤寒沙门氏菌、副溶血性弧菌等均无交叉反应。刘鑫等<sup>[29]</sup>、黄丽等<sup>[30]</sup>运用 PCR 技术建立的检测牛奶中大肠埃希氏菌 O157:H7 的方法, 特异性较好, 检测极限分别为 100 和  $8.58 \times 10^3$  CFU/mL, 王华健等<sup>[31]</sup>、陈秀琴等<sup>[32]</sup>建立的多重荧光定量 PCR 检测方法中提到大肠埃希氏菌 O157:H7 最低检测灵敏度均均为  $10^4$  copies/ $\mu$ L, 而本研究建立的方法质粒检测敏感性可达 10 copies/ $\mu$ L, 基因组 DNA 敏感性为  $7.11 \times 10^2$  fg/ $\mu$ L, 纯培养物水平敏感性为 100 CFU/mL, 对比可见, 本法的敏感性优异, 同时曲线的扩增效率为 103.7%, 标准曲线相关系数为 0.9994, 且核酸和质粒梯度的重复性 CV 在 0.10%~1.00% 区间, 均小于 1.00%, 适宜于微生物核酸的定量检测分析。

本研究建立的一种大肠埃希氏菌 O157:H7 型荧光探针 PCR 技术的核酸检测方法全程(包括样品前增菌、核酸提取、荧光 PCR 扩增反应)8~16 h 完成, 样品扩增时间提速至 35 min, 与传统细菌分离鉴定方法比较显著缩短检测时间。

综上所述, 本研究针对大肠埃希氏菌 O157:H7 特有 *rfbE* 基因的保守序列, 基于荧光探针 PCR 技术建立的核酸检测方法, 在特异性、敏感性、重复性等方面性能良好, 而且检测时间较短, 可为食源性大肠埃希氏菌 O157:H7 型快速检测提供一种技术支撑。

## 参考文献

- [1] 陈雅君, 王亚宾, 张莉娟, 等. 动物源性肠出血大肠杆菌 O157:H7 及其 3 个毒力基因的多重 PCR 快速检测研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(7): 686-691.  
CHEN YJ, WANG YB, ZHANG LJ, et al. Detection of animal-derived

*Escherichia coli* O157:H7 and its three virulence genes by multiplex PCR technique [J]. Chin J Zoonoses, 2013, 29(7): 686-691.

- [2] GALLI L, BRUSA V, SINGH P, et al. High prevalence of clade 8 *Escherichia coli* O157:H7 isolated from retail meat and butcher shop environment [J]. Infect Genet Evol, 2016, 45: 1-5.
- [3] ZHAO XH, XIN J, LIN Y. Contrast of real-time fluorescent PCR methods for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and of introducing an internal amplification control [J]. Microorganisms, 2019, 7(8): 230
- [4] MU D, ZHOU D, XIE G, et al. The fluorescent probe-based recombinase-aided amplification for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Mol Cell Probe, 2021, 60: 101777.
- [5] ALKA R, VIVEK BR, ARAVIND S, et al. Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157:H7 in food and water [J]. Int J Food Microbiol, 2021, 349: 109233.
- [6] PULIGUNDLA P, LIM S. Approaches against *Escherichia coli* O157:H7 in foods [J]. Foods, 2022, 11: 756.
- [7] World Health Organization. *E. coli* key facts [EB/OL]. [2018-02-07]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> [2022-11-03].
- [8] Centers for disease control and prevention reports of *E. coli* outbreak investigations from 2022 [EB/OL]. [2022-10-07]. <https://www.cdc.gov/ecoli/2022-outbreaks.html> [2022-11-03].
- [9] SHARAPOV UM, WENDEL AM, DAVIS JP, et al. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach: United States, 2006 [J]. J Food Prot, 2016, 79(12): 2024-2030.
- [10] 马雪婷, 冯雨欣, 耿冰雨, 等. 食源性大肠杆菌危害及其检测技术研究进展[J]. 广东化工, 2021, 48(22): 191-193.  
MA XT, FENG YX, GENG BY, et al. Research progress on harm and detection technology of foodborne *Escherichia coli* [J]. Guangdong Chem Ind, 2021, 48(22): 191-193.
- [11] 赵丽, 申玉金, 胡宝翠, 等. 多种不同方法对微生物能力验证样品测试结果的比较及分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(1): 320-325.  
ZHAO L, SHEN YJ, HU BC, et al. Comparison and analysis of microbial proficiency test results by different methods [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(1): 320-325.
- [12] 张巍巍, 冯宝立, 王丽丽. 密云区致泻大肠埃希菌耐药性及耐药基因研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2): 751-756.  
ZHANG WW, FENG BL, WANG LL. Drug resistance and drug resistance genes of diarrheal *Escherichia coli* in Miyun district [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(2): 751-756.
- [13] CHHETRI VS, HAN Y, JANES ME, et al. Evaluation of viability of *Escherichia coli* O157:H7 on chlorine and lactic acid treated spinach leaves using combined propidium monoazide staining and real-time PCR [J]. LWT, 2020, (1): 120-127.
- [14] 陶文靖, 曲连海, 董彬, 等. 乳制品中沙门氏菌分子检测方法的验证研

- 究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2): 576-583.
- TAO WJ, QU LH, DONG B, *et al.* Validation of molecular detection methods for *Salmonella* in dairy [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(2): 576-583.
- [15] 林碧莲, 柯振华, 陈筱婷, 等. 多重实时荧光定量 PCR 快速检测婴幼儿奶粉中沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(11): 4375-4381.
- LIN BL, KE ZH, CHEN XT, *et al.* Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Cronobacter* in infant milk powder by multiplex quantitative real-time PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(11): 4375-4381.
- [16] BAO QZ, TAO BL, ZHONG XZ, *et al.* Rapid and simultaneous quantification of viable *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in milk through multiplex real-time PCR [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(11): 1-10.
- [17] 肖蕊, 李春节, 冯世文, 等. 食源性致病大肠杆菌 O157:H7 毒力基因 *rfbE* 的 LAMP 检测方法的建立[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(12): 5465-5469.
- XIAO R, LI CJ, FENG SW, *et al.* Establishment of an LAMP detection method for the virulence gene *rfbE* of *Escherichia coli* O157:H7 from foodborne pathogens [J]. *Genom Appl Biol*, 2019, 38(12): 5465-5469.
- [18] 马佳睿, 谢婧, 李瑞乾, 等. LAMP 在食源性致病菌检测中的应用进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021, (17): 39-43.
- MA JR, XIE J, LI RQ, *et al.* Application progress on LAMP in detection of food-borne pathogens [J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2021, (17): 39-43.
- [19] 徐文文, 宋惠月, 梁玉林, 等. 环介导等温扩增技术检测不同乳制品常见食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2): 546-551.
- XU WW, SONG HY, LIANG YL, *et al.* Detection of common foodborne pathogens in different dairy loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(2): 546-551.
- [20] 樊晓洁. 食源性致病大肠杆菌 O157:H7 检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(7): 2144-2149.
- FAN XJ. Research progress on detection methods of foodborne pathogenic *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(7): 2144-2149.
- [21] 董莲华, 张玲, 姜君, 等. 大肠杆菌 O157:H7 微滴数字 PCR 定量方法的建立[J]. 分析化学, 2015, (3): 319-324.
- DONG LH, ZHANG L, JIANG J, *et al.* Development of droplet digital polymerase chain reaction for quantifying *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Chin J Anal Chem*, 2015, (3): 319-324.
- [22] 卢海强, 焦新雅, 吴思源, 等. 数字 PCR 在食源性致病菌检测中的应用进展[J]. 生物技术进展, 2021, 11(3): 260-268.
- LU HQ, JIAO XY, WU SY, *et al.* Application progress on the digital PCR in detection of food borne pathogenic bacteria [J]. *Curr Biotechnol*, 2021, 11(3): 260-268.
- [23] 吴怡, 刘露露, 吴永民, 等. 高通量测序检测米线中的食源性致病菌[J]. 食品科学, 2022, 43(6): 347-352.
- WU Y, LIU LL, WU YM, *et al.* Analysis of foodborne pathogenic bacteria in rice noodles by high-throughput 16S rDNA sequencing [J]. *Food Sci*, 2022, 43(6): 347-352.
- [24] 刘莹. 应用基因芯片技术检测食源性腹泻致病大肠杆菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(3): 917-916.
- LIU Y. Detection of pathogenic *Escherichia coli* in food borne diarrhea by gene chip technology [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(3): 917-916.
- [25] 张春. 食源性大肠杆菌检测方法的研究进展[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(8): 18-20.
- ZHANG C. Research progress on detection methods of foodborne *Escherichia coli* [J]. *Cere Oils*, 2021, 34(8): 18-20.
- [26] 陈玲. 江苏地区猪、禽源大肠杆菌 O157 的生物学特性分析及饲料中大肠杆菌 O157:H7 双重 PCR 检测方法的建立[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- CHENG L. Characterization of *Escherichia coli* O157 from pig and poultry in jiangsu and development of duplex PCR method for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in feeds [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.
- [27] WANG L, REEVES PR. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes [J]. *Infect Immun*, 1998, 66(8): 3545-3551.
- [28] BILGE SS, VARY JC, DOWELL SF, *et al.* Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(11): 4795-4801.
- [29] 刘鑫, 姚笛, 郭瑜, 等. 牛乳中大肠杆菌 O157:H7 PCR 检测方法的建立[J]. 农产品加工, 2016, (2): 42-44.
- LIU X, YAO D, GUO Y, *et al.* Establishment of PCR detection method for *Escherichia coli* O157:H7 in milk [J]. *Prod Process*, 2016, (2): 42-44.
- [30] 黄丽, 李玲, 杨攀, 等. PCR 法检测水牛乳中致病性大肠杆菌 O157:H7 的研究[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(4): 46-47, 51.
- HUANG L, LI L, YANG P, *et al.* Study on detection of pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 in buffalo milk by PCR [J]. *China Dairy Ind*, 2016, 44(4): 46-47, 51.
- [31] 王华健, 张宁, 杨威, 等. 3 种食源性致病菌 TaqMan 多重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2022, 53(4): 1201-1209.
- WANG HJ, ZHANG N, YANG W, *et al.* Establishment of a multiplex taqman fluorescence quantitative PCR detection of three foodborne pathogens [J]. *Chin J Vet Sci*, 2022, 53(4): 1201-1209.
- [32] 陈秀琴, 林甦, 郑敏, 等. 生鲜肉中 3 种食源性致病菌 Taqman 多重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 福建畜牧兽医, 2021, 43(3): 22-27.
- CHEN XQ, LIN S, ZHENG M, *et al.* Establishment of a multiplex taqman real-time PCR assay for the simultaneous detection of three foodborne pathogens in fresh meat [J]. *Fujian Anim Hus Vet Med*, 2021, 43(3): 22-27.

(责任编辑: 黄周梅 郑 丽)

## 作者简介

任宝红, 硕士, 主要研究方向为动物疫病诊断技术的开发与应用。  
Email: 373541064@qq.com。

郭 瑞, 硕士, 主要研究方向为动物疫病诊断技术的开发与应用。  
E-mail: aigrzlz@126.com