3 种致泻大肠埃希氏菌多重 PCR 检测试剂盒的研制与效用评价

周杨[1]，万强[1]，蔡芷荷[2]，卢勉飞[1]，杨绪伟[1]，吴清平[3]，李健顺[2]
（1.广东环凯微生物科技有限公司，广东广州 510663）（2.广东环凯生物科技有限公司，广东肇庆 526238）
（3.广东省微生物研究所，广东广州 510070）

摘要：本研究为了研制一种多重 PCR 检测试剂盒，用于对肠道致病性大肠埃希氏菌（Enteropathogenic *Escherichia coli*，EPEC）、产志贺毒素大肠埃希氏菌（Shigatoxin-producing *E. coli*，STEC）和肠道出血性大肠埃希氏菌（Enterohemorrhagic *E. coli*，EHEC）3 种 DEC（Diarrheagenic *E. coli*，DEC）的快速检测。优化所涉及的多重 PCR 检测体系和构建相应的检测试剂盒，其中的主要检测试剂采用冻干工艺，评价该试剂盒的检测特异性、灵敏度、重复性以及保质期。结果表明，本研究成功建立了针对于 3 种 DEC 的检测体系 EP 和检测体系 ST; 3 种 DEC 标准菌株和分离菌株均出现明显的目标基因条带，而其他种类 DEC 标准菌株和分离菌株均未出现目标基因条带；该试剂盒检测管 EP 和检测管 ST 的检出限分别可达到 1.5×10^3 cfu/mL 和 2.1×10^3 cfu/mL，且二者检测重复率均为 100%；该试剂盒可在 4 ℃条件下保存 12 个月，也可在 42 ℃环境运输 120 h，期间其检测效力不受影响。本研究研制的试剂盒性能好，检测结果稳定、可靠，适用于食品中 3 种 DEC 的快速检测。

关键词：致泻大肠埃希氏菌；多重 PCR 检测试剂盒；实效性评价
文章篇号：1673-9078(2020)12-243-251 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0616

Development and Evaluation of Multiplex PCR Detection Kit for Detection of Three Types of Diarrheagenic *Escherichia coli*

ZHOU Yang[1], WAN Qiang[1], CAI Zhi-he[2], LU Mian-fei[1], YANG Xu-wei[1], WU Qing-ping[3], LI Jian-shun[2]
(1.Guangdong Huankai Microbial Science and Technology Company Limited, Guangzhou 510663, China)
(2.Guangdong Huankai Biological Science and Technology Company Limited, Zhaoqing 526238, China)
(3.Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: In order to develop a multiplex PCR detection kit for detecting three types of Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC), which includes Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Shigatoxin-producing *E. coli* (STEC) and Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), multiplex PCR reaction system was optimized and their components of the kit were confirmed. The main detection reagents were produced into powder pattern by freeze drying technology, and the specificity, sensitivity, repeatability and shelf life of the kit were evaluated. The results showed that EP and ST reaction systems were successfully established for detection of three types of DEC. All standard strains and isolated strains belonging to the three types of DEC were detected positive and presented obvious specific amplification bands, while other types of DEC were all detected negative. The limit of detection of detection tube EP and ST in the kit were calculated to 1.5×10^3 cfu/mL and 2.1×10^3 cfu/mL, respectively, and the testing accordance rates were all 100%. The kit can be stored under 4°C condition for 12 months and transported under 42 ℃ condition for 120 h without efficacy loss. In conclusion, the kit had a good performance with stable and reliable

引文格式：
周杨,万强,蔡芷荷,等.3 种致泻大肠埃希氏菌多重 PCR 检测试剂盒的研制与效用评价[J].现代食品科技,2020,36(12):243-251
ZHOU Yang, WAN Qiang, CAI Zhi-he, et al. Development and evaluation of multiplex PCR detection kit for detection of three types of diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 243-251

收稿日期：2020-07-02
基金项目：国家重点研发计划项目(2018YFC1604201)；肇庆市引进西江创新团队项目（肇人才领 2018-8）；广东省自然科学基金项目（2017A030310090）
作者简介：周杨（1988-），男，硕士研究生，工程师，研究方向：食源性致病菌检测技术
通讯作者：吴清平（1962-），男，博士，研究员，中国工程院院士，研究方向：食品微生物安全检测及控制技术

detection results, and it could be applicable for rapid detection of three types of DEC in food samples.

Key words: diarrheagenic *Escherichia coli*; multiplex PCR detection kit; effectiveness evaluation

大肠埃希氏菌（*Escherichia coli*）普遍存在于人和动物肠道中，有些可作为正常寄居菌群，为宿主提供营养功能相关的代谢物质，但有些致病性的大肠埃希氏菌可引发胃肠道感染，致使机体出现感染性腹泻病症，该类大肠埃希氏菌即为致泻大肠埃希氏菌（DEC）[1,2]。在全球范围内，感染性腹泻属于常见的胃肠道传染性疾病，其爆发频率高、涉及面广、危害大，严重威胁到人们的身体健康，而 DEC 是感染性腹泻发生的主要病原菌之一，加之 DEC 普遍存在于水、土壤以及植物等各种自然环境中，而被其污染的水源和食物又是重要的感染源，因此在食品安全和公共卫生领域，DEC 属于被重点监测的对象[3-6]。一般根据 DEC 的流行病学特点、致病机理以及血清型别等，可将其分为 6 种类型，具体包括肠道致病性大肠埃希氏菌（EPEC）、产志贺毒素大肠埃希氏菌（STEC）、肠道出血性大肠埃希氏菌（EHEC）、肠道集聚性大肠埃希氏菌（Enteroaggregative *E. coli*，EAEC）、产肠毒素大肠埃希氏菌（Enterotoxigenic *E. coli*，ETEC）和肠道侵袭性大肠埃希氏菌（Enteroinvasive *E. coli*，EIEC）[7-10]，因此，在实际检测工作中对未知类型的 DEC 进行分型、鉴定至关重要。当前，一般通过传统的增菌分离培养、生化鉴定试验、血清学试验等方法检测食源性的 DEC，但多存在检测周期长，流程繁杂、诊断血清获取困难以及检测成本高等弊端。

随着分子检测技术的不断发展，PCR 技术所涉及的仪器、试剂耗材以及操作规范等各个方面已十分完善，加之其具备高敏感度、特异性好、耗时短等优点，因而在食品安全领域被普遍应用于多种微生物的检测、鉴定，如在国家标准 GB 4789.6-2016[10]、GB 4789.12-2016[11]和 GB 4789.36-2016[12]中均有明文规定，可通过 PCR 方法对相关微生物进行鉴定以及毒力基因分析等。根据 GB 4789.6-2016 中给出的 DEC PCR 确认试验方法，通过 PCR 方法检测待检菌携带的不同目标基因类型，即可有效鉴定其具体型别，不过期间会针对于每份检测样品进行至少 12 次单重 PCR 扩增反应（即对应至少 12 个目标基因），由于 PCR 反应体系配制繁琐以及经电泳条带大小判定结果存在不确定性等因素，从而会影响到整个检测流程的顺利进行，同时消耗更多的人力、物力等成本。多重 PCR 技术主要通过向同一反应体系中加入多对引物，可扩增出对应的多个 DNA 片段，从而实现同时对多个目标基因的检测、筛选[13-15]，因此可显著提升整个检测工作效率。本研究参照 GB 4789.6-2016[10]，主要采用其给出的目标基因及引物，开发了检测 3 种 DEC（包括 EPEC、STEC 和 EHEC）的多重 PCR 检测试剂盒，并测试该试剂盒的特异性、灵敏度、重复性以及保质期等效用指标，为在实际生产活动中对 EPEC、STEC 和 EHEC 的监控、溯源等提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 菌株

10 株 DEC 标准菌株：EPEC CICC24189、EPEC CMCC(B)43206、EIEC CICC24188、ETEC CMCC(B)43208、ETEC CICC10667、EHEC CMCC(B)43207、EHEC CICC24187、EAEC CICC24186、STEC CICC10670、EIEC CMCC(B)44825。14 株非 DEC 标准菌株：产气肠杆菌（*Enterobacter aerogenes*）ATCC13048、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）ATCC25923、蜡样芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）ATCC6633、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）CMCC(B)10104、弗氏柠檬酸杆菌（*Citrobacter freundii*）ATCC43864、粪肠球菌（*Enterococcus faecali*）ATCC29212、大肠埃希氏菌（*E. coli*）CMCC(B)44102、鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）ATCC14028、福氏志贺氏菌（*Shigella flexneri*）CMCC(B)51572、大肠埃希氏菌 O157:H7（*E. coli* O157:H7）NCTC12900、伤寒沙门氏菌（*S. typhi*）CMCC(B)50071、乙型溶血性链球菌（*Streptococcus hemolytic-β*）ATCC21059、英诺克李斯特菌（*Listeria innocua*）ATCC33090、单核细胞增生李斯特菌（*L. monocytogenes*）ATCC19115。另外有 12 株分离菌株（包括 *E. coli*、STEC/EHEC 和 EPEC 3 类）。上述菌株均由广东环凯微生物科技有限公司提供。

1.2 主要试剂与仪器

引物合成，生工生物工程(上海)股份有限公司；*Taq* DNA Polymerase、dNTPs 和 DNA Marker 100bp Ladder Plus，广州东盛生物科技有限公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒，天根生化科技（北京）有限公司；$(NH4)_2SO_4$、Tris-HCl 以及 Triton X-100 等，国药集团化学试剂有限公司；EPEC-STEC-EHEC 多重 PCR 检测试剂盒共 8 批次（批次包括 20190308、

20190410 、 20190513 、 20190607 、 20190709 、 20190813、20190911、20191008）、胰蛋白胨大豆肉汤（TSB）和营养琼脂平板、恒温培养箱，广东环凯微生物科技有限公司；PCR 仪，德国 Biometra 公司；台式高速离心机，德国 Sigma 公司；稳压稳流电泳仪，上海天能科技有限公司；凝胶成像分析系统，英国 UVItec 公司；螺旋接种仪，英国 Don Whitley Scientific 公司；超微量分光光度计，德国 Implen 公司。

1.3 方法

1.3.1 多重 PCR 检测体系建立

根据 GB 4789.6-2016[10]中给出的 12 个目标基因在 6 种 DEC 中的分布，可通过检测 *uidA*、*bfpB*、*escV*、*stx2* 和 *stx1* 5 个目标基因有无（见表 1 和图 1），即可判断被测试菌株是否为 EPEC、STEC 和 EHEC，选取以上 5 个目标基因对应的 PCR 引物，见表 2。设计目标基因 *uidA* 和 *bfpB* 为检测体系 EP，目标基因 *escV*、*stx2* 和 *stx1* 为检测体系 ST，经单因素控制变量法，以 EPEC（CICC24189）和 STEC（CICC10670）各自精提取 DNA 作为反应模板，分别测试该 PCR 检测体系中涉及到的不同因素（包括不同目标基因引物浓度配比、反应循环数以及退火温度）具体数据值梯度，如设置目标基因 *uidA* 反应浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 μmol/L，并综合分析以上所有测试结果，进而获取最优的检测体系 EP 和检测体系 ST。

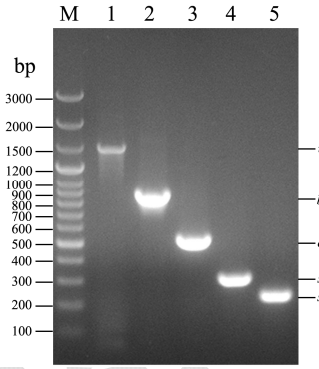

图 1 3 种致泻大肠埃希氏菌目标基因条带电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of target genes for three types of DEC

注：1~5 表示不同目标基因分别为 *uidA*、*bfpB*、*escV*、*stx2* 和 *stx1*；M 表示 100 bp Ladder Plus。

表 1 3 种致泻大肠埃希氏菌目标基因条带与型别对照表

Table 1 Comparison table of target genes and types for three kinds of DEC

致泻大肠埃希氏菌类别	目标条带的种类组合
EPEC	*bfpB*(+/-)，*escV*(+)，*stx1*(-)，*stx2*(-)，*uidA**(+/-)
STEC/EHEC	*escV*(+/-)，*stx1*(+)，*stx2*(-)，*bfpB*(-)，*uidA**(+/-)
	escV(+/-)，*stx1*(-)，*stx2*(+)，*bfpB*(-)，*uidA**(+/-)
	escV(+/-)，*stx1*(+)，*stx2*(+)，*bfpB*(-)，*uidA**(+/-)

注：+表示有；-表示无；*表示 97%以上大肠埃希氏菌为 *uidA* 阳性。

表 2 3 种致泻大肠埃希氏菌目标基因引物序列

Table 2 Primer sequences of target genes for three types of DEC

引物名称	序列	PCR 扩增产物大小/bp
uidA-F	5′-ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC-3′	1487
uidA-R	5′-AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG-3′	
bfpB-F	5′-GACACCTCATTGCTGAAGTCG-3′	910
bfpB-R	5′-CCAGAACACCTCCGTTATGC-3′	
escV-F	5′-ATTCTGGCTCTCTTCTTCTTTATGGCTG-3′	544
escV-R	5′-CGTCCCCTTTTACAAACTTCATCGC-3′	
stx2-F	5′-GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAG-3′	324
stx2-R	5′-AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC-3′	
stx1-F	5′-CGATGTTACGGTTTGTTACTGTGACAGC-3′	244
stx1-R	5′-AATGCCACGCTTCCCAGAATTG-3′	

1.3.2 试剂盒制备

（1）检测管试剂制备：根据上述优化得到的检测体系 EP 和检测体系 ST，分别制备其对应的检测管 EP 和检测管 ST，即在无菌环境下分别配制检测管 EP 和检测管 ST 对应的组分混合液（如 DNA 聚合酶和冻干保护剂等），并分装于 PCR 8 联管中，后经常规冷冻干燥程序进行干燥得到；（2）阳性对照制备：经试剂盒精提取 CICC24189 和 CICC10670 对应 DNA，并将

2 者以一定比例混合，分装于螺旋盖离心管中，后经常规冷冻干燥程序进行干燥成型得到；（3）阴性对照制备：经试剂盒精提取 CMCC(B)44102 对应 DNA，并将其以一定浓度分装于螺旋盖离心管中，后经常规冷冻干燥程序进行干燥成型得到；（4）复溶液制备：由$(NH4)_2SO_4$、Tris-HCl 以及 Triton X-100 等以一定比例混合，并分装于螺旋盖离心管中；（5）裂解液制备：由 Tris-HCl（pH 8.5）和 SDS 等以一定比例混合，并分装于螺旋盖离心管中；（6）6×Loading buffer 制备：由二甲苯腈蓝 FF 和溴酚蓝等以一定比例混合，并分装于螺旋盖离心管中。将上述 7 种实际管组装成试剂盒，规格为 24 Test/盒。

1.3.3 DNA 样品制备

经热裂解法制备所需的 DNA 样品，具体为：挑取不同的标准菌株和分离菌株各自琼脂平板菌落，充分悬浮于 30 μL 裂解液中，99 ℃热裂解 15 min，后经 12000 r/min 离心 10 min，取其上清，即为对应的 DNA 样品，并可在-20 ℃储存待用。

1.3.4 特异性试验

分别制备不同的标准菌菌株和分离菌株对应的 DNA 样品，并经本试剂盒进行测试，期间，以上每份检测样品设置 3 个平行测试。

1.3.5 灵敏度试验

（1）纯 DNA 测试：取 CICC24189 精提取 DNA，经无菌水梯度稀释 10、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7 和 10^8 倍，并依次作为 8 份样品经本试剂盒中检测管 EP 测试（每份 DNA 样品取 2 μL），且每份检测样品设置 3 个平行测试，其中，测定该稀释 10 倍样品对应浓度为 2.8×10 ng/μL；取 CICC10670 精提取 DNA，经无菌水梯度稀释 10、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7 和 10^8 倍，并依次作为 8 份样品（每份样品取 2 μL）经本试剂盒中检测管 ST 测试，同样设置 3 个平行测试，其中，测定该稀释 10 倍样品对应浓度为 4.5×10 ng/μL。

（2）纯培养菌测试：取标准菌株 CICC24189 琼脂平板新鲜培养菌落，充分悬浮于 30 mL 无菌生理盐水中，经无菌生理盐水梯度稀释 10、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7 和 10^8 倍，并各取该 8 个梯度稀释菌液 100 μL 制备相应的 DNA 样品（具体操作为，取稀释菌液 100 μL 于无菌 PCR 管中，6 000 r/min 离心 5 min，弃上清，后加入 30 μL 裂解液，充分悬浮，后续参照 1.3.3），后经本试剂盒中检测管 EP 测试该 8 份 DNA 样品，且每份检测样品设置 3 个平行测试，另外，参照 GB 4789.2-2016[16]，各取该 8 个梯度稀释菌液 100 μL 进行螺旋平板法计数；取标准菌株 CICC10670 琼脂平板菌落，同样进行上述操作，后经本试剂盒中检测管 ST 测试该制备得到的 8 份 DNA 样品，同样设置 3 个平行测试，另外，同样各取该 8 个梯度稀释菌液 100 μL 进行螺旋平板法计数[10]。对比以上本试剂盒检测结果和螺旋计数结果，并推算其最低检验限，即本试剂盒最低检验限（cfu/mL）=（可有效检测到的最高稀释倍数的 100 μL 稀释菌液其含菌量）/15[17]。

1.3.6 重复性试验

随机取以上不同生产批次的试剂盒 8 盒，以 1.3.5 中各自测试得到的纯 DNA 灵敏度对应的 DNA 浓度样品作为阳性检测样品，以试剂盒中阴性对照作为阴性检测样品，分别测试检测管 EP 检测管 ST，期间安排不同的操作者、实验室、检测设备和检测时间，每份检测样品设置 10 个平行测试，比较其检测结果，其中，重复率=检测结果与预期符合数/检测总数×100%。

1.3.7 保质期验证

随机取以上不同生产批次的试剂盒 5 盒，存储于 4 ℃条件下，期间分别于储存 3、6、9 和 12 个月后取出，经 1.3.6 中的阳性检测样品分别测试检测管 EP 检测管 ST。模拟运输储存：随机取以上不同生产批次的试剂盒 5 盒，存储于 42 ℃条件下，期间分别于储存 24、48、72 和 96 h 后取出，经 1.3.6 中的阳性检测样品分别测试检测管 EP 检测管 ST。以上每份检测样品设置 10 个平行测试，后评价其结果，检测效率=检测结果为阳性例数/总检测例数×100%[15]。

2 结果与讨论

2.1 多重 PCR 检测体系建立

多重 PCR 方法可经同一检测体系实现对多个目标基因的同时检测，期间简化了整个操作流程，如检测体系（反应 buffer、$MgCl_2$、*Taq* DNA Polymerase 以及 dNTPs 等）的多次配制、不同检测管的区分读取以及检测样品的反复加入等，从而有效减少了检测出错率以及过多的人力、物力消耗。根据 GB 4789.6-2016[10]，需要通过普通 PCR 方法对多达 12 个目标基因逐一完成检测，才能做出最终判断，因此采用其对应的多重 PCR 检测方法十分必要。此外，多重 PCR 检测体系中的多对引物之间可能会有相互作用，进而影响到目标基因的扩增效率，因此需要对不同引物的浓度进行必要优化[18,19]。本研究根据 3 种 DEC 对应的目标基因和各自片段大小（见表 1、2），通过对目标基因不同引物浓度配比优化，确立 20 μL 体积的检测

体系 EP 和检测体系 ST（均包括 PCR buffer、*Taq* DNA Polymerase 以及不同引物等组分），其中，目标基因 *uidA*、*bfpB*、*escV*、*stx2* 和 *stx1* 其各自引物反应终浓度依次取 0.4、0.3、0.4、0.4 和 0.5 μmol/L，具体见图 2。PCR 反应条件为：94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，59 ℃ 30 s，72 ℃ 90 s，35 个循环；72 ℃ 5 min。

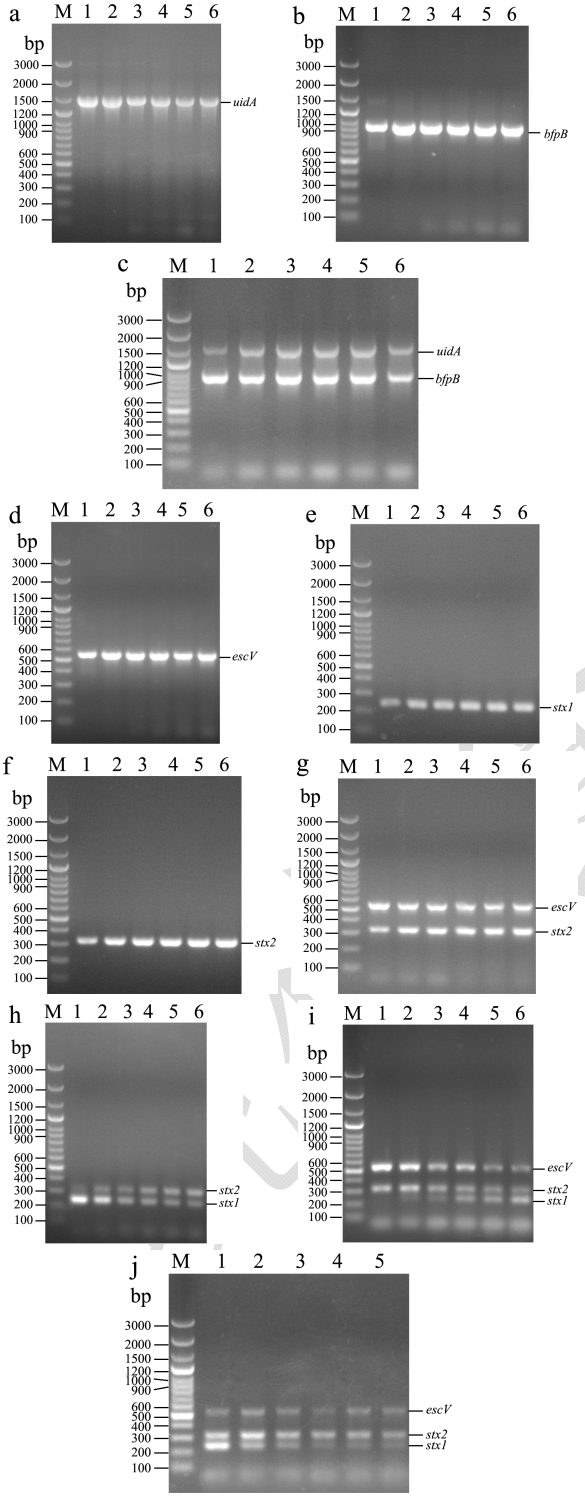

图 2 多重 PCR 检测体系中不同引物浓度测试

Fig.2 Different concentration tests of different primers for the multiplex PCR reaction system

注：a 表示 *uidA* 单重引物浓度梯度扩增；b 表示 *bfpB* 单重引物浓度梯度扩增；c 表示 *bfpB* 引物浓度为 0.3 μmol/L，*uidA* 引物浓度梯度扩增；d 表示 *escV* 单重引物浓度梯度扩增；e 表示 *stx1* 单重引物浓度梯度扩增；f 表示 *stx2* 单重引物浓度梯度扩增；g 表示 *escV* 引物浓度为 0.4 μmol/L，*stx2* 引物浓度梯度扩增；h 表示 *stx1* 引物浓度为 0.5 μmol/L，*stx2* 引物浓度梯度扩增；i 表示 *escV* 引物浓度为 0.4 μmol/L，*stx2* 引物浓度为 0.4 μmol/L，*stx1* 引物浓度梯度扩增；j 表示 *stx1* 引物浓度为 0.5 μmol/L，*stx2* 引物浓度为 0.4 μmol/L，*stx1* 引物浓度梯度扩增；1~6 表示各个测试的引物浓度梯度依次为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 μmol/L；M 表示 100 bp Ladder Plus。

2.2 特异性试验

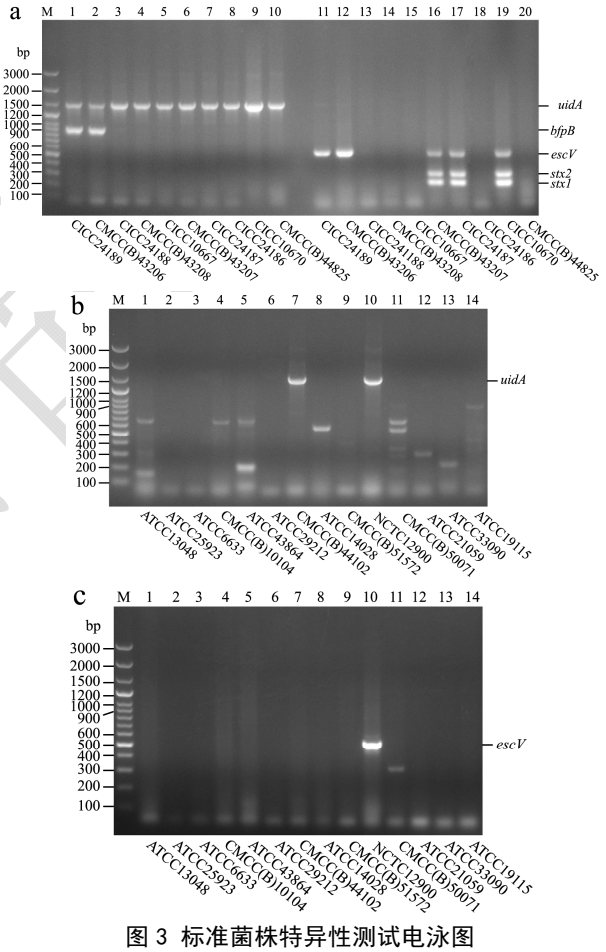

图 3 标准菌株特异性测试电泳图

Fig.3 Electrophoretogram of standard strain specificity test

注：a 表示 10 株 DEC 标准菌株样品测试结果，其中，1~10 表示检测管 EP 对应结果，11~20 表示检测管 ST 对应结果；b 表示检测管 EP 对应的 14 株非 DEC 标准菌株样品测试结果；c 表示检测管 ST 对应的 14 株非 DEC 标准菌株样品测试结果；M 表示 100 bp Ladder Plus。

测试 10 株 DEC 标准菌株样品，显示 EPEC、STEC 和 EHEC 样品均在相应位置出现明显的目标基因条带，而其他类型的 DEC 样品仅出现目标基因

uidA 对应条带，见图 3a；测试 14 株非 DEC 标准菌株样品，显示 CMCC(B)44102 和 NCTC12900 样品出现目标基因 *uidA* 对应条带，NCTC12900 样品出现目标基因 *escV* 对应条带，而其他样品均未出现目标基因条带，见图 3b 和 3c；测试 12 株分离菌株样品，检测结果与原始检测信息完全一致，见表 3。对于众多不同的待检样品，经琼脂糖凝胶电泳观测其对应的多重（四重、五重甚至是更多重）PCR 扩增产物时，很可能会产生非特异性的条带而造成结果误判[20]（尤其是该非特异性条带与目标基因条带位置相近的情形），本研究将涉及的 5 个目标基因（*uidA*、*bfpB*、*escV*、*stx2* 和 *stx1*）分别列入双重 PCR 检测体系 EP 和三重 PCR 检测体系 ST 中，可大大降低非特异性条带出现的几率，同时也可提高各个目标基因的扩增效率，进而更加方便于结果判读，如图 3b 和图 3c 中显示有多条扩增条带出现，而本研究的两种检测体系可将这些条带有效区分为目标基因条带和非特异性条带。

表 3 12 株分离菌株鉴定结果

Table 3 Results of specificity

分离菌株编号	原始信息	检出目标基因	检测结果
149224	*E. coli*	*uidA*	*E. coli*
149188	*E. coli*	*uidA*	*E. coli*
149302	*E. coli*	*uidA*	*E. coli*
149183	*E. coli*	*uidA*	*E. coli*
14901959	STEC/EHEC	*escV*，*stx1*，*uidA*	STEC/EHEC
14901960	STEC/EHEC	*escV*，*stx1*，*uidA*	STEC/EHEC
133-1-1	STEC/EHEC	*escV*，*stx2*，*uidA*	STEC/EHEC
465-1-2	*E. coli*	*uidA*	*E. coli*
3403B1	STEC/EHEC	*stx1*，*uidA*	STEC/EHEC
3025B1	STEC/EHEC	*stx2*，*uidA*	STEC/EHEC
3466A3	EPEC	*escV*，*uidA*	EPEC
1711-2	EPEC	*escV*，*uidA*	EPEC

当前也有较多与 DEC 多重 PCR 检测技术相关的报道和产品，例如：胡安妥等[14]建立了 DEC 多重荧光 PCR 检测方法和天津生物芯片技术有限责任公司开发的 DEC PCR 荧光探针法检测试剂盒，均需要配置相应的荧光定量 PCR 仪，其总的检测成本远高于本研究方法；姚栋等[21]和张明明等[22]均建立了用于 DEC 检测的多重 PCR 方法，期间也可直接通过琼脂糖凝胶电泳观测结果，但均未指出避免非特异性条带干扰的有效措施；北京卓诚惠生生物科技股份有限公司开发的致泻性大肠埃希氏菌多重 PCR 检测试剂盒，可经一管式 12 重 PCR 扩增完成对 6 种 DEC 的鉴定，但期间必须通过毛细管电泳方法观测结果，其操作要求较琼脂糖凝胶电泳更高，也未见对检测结果中可能出现非特异性条带干扰的相关说明。鉴于以上，本研究方法更具备操作简便、成本低以及结果准确的特点。

2.3 灵敏度试验

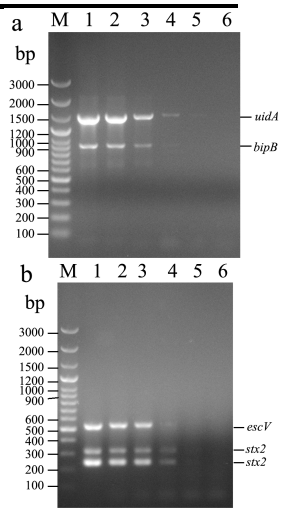

图 4 纯 DNA 灵敏度测试电泳图

Fig.4 Electrophoretogram of purified DNA sensitivity test

注：a 表示检测管 EP 对应的纯 DNA 灵敏度测试结果，其中，1~6 表示梯度稀释的纯 DNA 浓度依次为 2.8×10、2.8、2.8×10^{-1}、2.8×10^{-2}、2.8×10^{-3}、2.8×10^{-4} ng/μL；b 表示检测管 ST 对应的纯 DNA 灵敏度测试结果，其中，1~6 表示梯度稀

释的纯 DNA 浓度依次为 4.5×10、4.5、4.5×10^{-1}、4.5×10^{-2}、4.5×10^{-3}、4.5×10^{-4} ng/μL；M 表示 100 bp Ladder Plus。

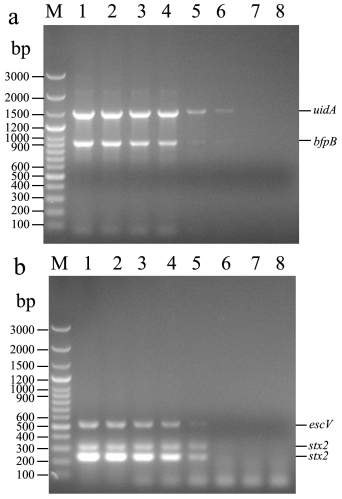

图 5 纯培养菌灵敏度测试电泳图

Fig.5 Electrophoretogram of pure bacterial culture sensitivity test

注：a 表示检测管 EP 对应的纯培养菌灵敏度测试结果，其中，1~8 表示梯度稀释的纯培养菌浓度依次为 1.5×10^{6}、1.5×10^{5}、1.5×10^{4}、1.5×10^{3}、1.5×10^{2}、1.5×10、1.5、0 cfu/mL；b 表示检测管 ST 对应的纯培养菌灵敏度测试结果，其中，1~8 表示梯度稀释的纯培养菌浓度依次为 2.1×10^{6}、2.1×10^{5}、2.1×10^{4}、2.1×10^{3}、2.1×10^{2}、2.1×10、2.1、0 cfu/mL；M 表示 100 bp Ladder Plus。

CICC24189 精提取 DNA 浓度在 2.8×10^{-1}~2.8×10^{1} ng/μL 时，检测管 EP 均出现明显的目标基因条带（*uidA* 和 *bfpB*），显示其灵敏度可达到 2.8×10^{-1} ng/μL，见图 4a；CICC10670 精提取 DNA 浓度在 4.5×10^{-1}~4.5×10 ng/μL 时，检测管 ST 均出现明显的目标基因条带（*escV*、*stx2* 和 *stx1*），显示其灵敏度可达到 4.5×10 ng/μL，见图 4b。CICC24189 纯培养菌在 1.5×10^{3}~1.5×10^{6} cfu/mL 时，检测管 EP 均出现明显的目标基因条带，显示其检出限可达到 1.5×10^{3} cfu/mL，见图 5a；CICC10670 纯培养菌在 2.1×10^{3}~2.1×10^{6} cfu/mL 时，检测管 ST 均出现明显的目标基因条带，显示其检出限可达到 2.1×10^{3} cfu/mL，见图 5b。

2.4 重复性验证

在不同操作者、实验室、检测设备和检测时间下，该试剂盒检测重复率均为 100%，见表 4。

2.5 保质期验证

该试剂盒于 4 ℃条件下存储 3、6、9 和 12 个月后的检测效率均为 100%；于 42 ℃条件下存储 24、48、72、96 和 120 h 后的检测效率均为 100%。见表 5。根据本单位之前的研究、应用成果（期间也报道了相关的干粉化分子检测试剂盒的研制[17,23]），本研究同样研制了针对于 EPEC、STEC 和 EHEC 的干粉化多重 PCR 检测试剂盒，与当前市场上的同类产品相比，可避免冷链运输、低温储存以及使用时反复冻融等工序，大大降低了其总体使用成本。同时，本研究也证实了该试剂盒检测重复性好，可在 42 ℃环境模拟运输 120 h 且其检测效力不受影响，在 4 ℃环境可保存长达 12 个月。基于上述思路，本单位同样也开发了针对于另外 3 种 DEC（包括 EAEC、ETEC 和 EIEC）的多重 PCR 检测试剂盒，其各自也同样具备较好的检测效果，在本文中就不做详细论述。

表 4 重复性实验结果[阴性结果例数:阳性结果例数（n:n）]

Table 4 Results of intra-batch repeatability

操作条件	检测管 EP		检测管 ST		检测重复率/%
	阴性检测样品	阳性检测样品	阴性检测样品	阳性检测样品	
操作者 1	10: 0	0: 10	10: 0	0: 10	
操作者 2	10: 0	0: 10	10: 0	0: 10	100
操作者 3	10: 0	0: 10	10: 0	0: 10	
实验室 1	10: 0	0: 10	10: 0	0: 10	
实验室 2	10: 0	0: 10	10: 0	0: 10	100
实验室 3	10: 0	0: 10	10: 0	0: 10	
检测设备 1	10: 0	0: 10	10: 0	0: 10	
检测设备 2	10: 0	0: 10	10: 0	0: 10	100
检测设备 3	10: 0	0: 10	10: 0	0: 10	
检测时间 1	10: 0	0: 10	10: 0	0: 10	
检测时间 2	10: 0	0: 10	10: 0	0: 10	100
检测时间 3	10: 0	0: 10	10: 0	0: 10	

表 5 保质期试验结果

Table 5 Results of shelf life stability

参数		检测结果为阳性例数:总检测例数(n: n)		检测效率/%
		检测管 EP	检测管 ST	
时间/月	3	10: 10	10: 10	100
	6	10: 10	10: 10	100
	9	10: 10	10: 10	100
	12	10: 10	10: 10	100
时间/h	24	10: 10	10: 10	100
	48	10: 10	10: 10	100
	72	10: 10	10: 10	100
	96	10: 10	10: 10	100

3 结论

本研究严格参照 GB 4789.6-2016 给出的 DEC PCR 确认试验方法，以 3 种 DEC（包括 EPEC、STEC 和 EHEC）的鉴定为例，根据其对应的目标基因和各自扩增产物片段大小，对不同引物浓度进行配比优化，从而建立了检测体系 EP 和检测体系 ST。主要采用冻干工艺，构建了针对于 EPEC、STEC 和 EHEC 的干粉化多重 PCR 检测试剂盒，并通过系列试验评价了该试剂盒的应用实效性。总体上，该试剂盒具备检测特异性好、灵敏度佳、重复性好、操作简单以及成本低等优点，为食品中 EPEC、STEC 和 EHEC 的快速检测、鉴定提供便利。

参考文献

[1] Salmani H, Azarnezhad A, Fayazi M R, et al. Pathotypic and phylogenetic study of diarrheagenic *Escherichia coli* and Uropathogenic *E. coli* using multiplex polymerase chain reaction [J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2016, 9(2): e28331

[2] Riveros M, Garcia W, Garcia C, et al. Molecular and phenotypic characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from bacteremic children [J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2017, 97(5): 1329-1336

[3] 董洪燕,杨建国,马智龙,等.泰州市腹泻病人中致泻大肠埃希氏菌感染状况及病原学特征分析[J].现代预防医学,2016, 43(2):333-337
DONG Hong-yan, YANG Jian-guo, MA Zhi-long, et al. Infection status and etiology analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* from Taizhou in 2013 [J]. Modern Preventive Medicine, 2016, 43(2): 333-337

[4] Huang Z, Pan H, Zhang P, et al. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of diarrheagenic *Escherichia coli* in Shanghai, China [J]. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2016, 35(8): 835-839

[5] Lei L, Rehman M U, Huang S, et al. Antimicrobial resistance and prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC), in Diarrheic Yaks of Tibetan Plateau, China [J]. Acta Tropica, 2018, 182: 111-114

[6] 崔学文.食品安全标准中致泻大肠埃希氏菌解读[N].中国市场监管报,2020-06-04(8)
CUI Xue-wen. Interpretation of Escherichia coli in food safety standards [N]. China Market Regulation News, 2020-06-04(8)

[7] Ramadan H, Awad A, Ateya A. Detection of phenotypes, virulence genes and phylotypes of avian pathogenic and human diarrheagenic *Escherichia coli* in Egypt [J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2016, 10(6): 584-591

[8] Nejma S B, Zaafrane M H, Hassine F, et al. Etiology of acute diarrhea in Tunisian children with Emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence and identification of E. coli virulence markers [J]. Iranian Journal of Public Health, 2014, 43(7): 947-960

[9] Derakhshandeh A, Firouzi R, Naziri Z. Phylogenetic group determination of faecal Escherichia coli and comparative analysis among different hosts [J]. Iranian Journal of Veterinary Research, 2014, 15(46): 13-17

[10] GB4789.6-2016,食品微生物学检验:致泻大肠埃希氏菌检验[S]
GB 4789.6-2016, Microbiological Examination of Food Hygiene-Examination of Diarrheogenic *Escherichia coli* [S]

[11] GB4789.12-2016,食品微生物学检验:肉毒梭菌及肉毒毒素检验[S]
GB 4789.12-2016, Microbiological Examination of Food Hygiene-examination of *Clostridium botulinum* and botulinus toxin [S]

[12] GB4789.36-2016,食品微生物学检验:大肠埃希氏菌O157:H7/NM检验[S]
GB 4789.36-2016, Microbiological Examination of Food Hygiene-Examination of *Escherichia coli* O157:H7/NM [S]

[13] Kabir M R, Hossain M A, Paul S K, et al. Multiplex polymerase chain reaction for rapid identification of diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. Mymensingh Medical Journal, 2012, 21(3): 404-410

[14] 胡安妥,王娉,张彩霞,等.5 类致泻性大肠埃希氏菌多重荧光PCR检测方法的建立[J].食品科学,2018,39(22):249-255
HU An-tuo, WANG Ping, ZHANG Cai-xia, et al. Establishment of multiplex real-time PCR assay to detect five strains of diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. Food Science, 2018, 39(22): 249-255

[15] Pattanshetty S, Kotrashetti V S, Bhat K, et al. Multiplex polymerase chain reaction detection of selected bacterial species from symptomatic and asymptomatic non-vital teeth with primary endodontic infections [J]. Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 2018, 9(2): e12312

[16] GB4789.2-2016,食品安全国家标准食品微生物学检验:菌落总数测定[S]
GB 4789.2-2016, National Food Safety Standard Food Microbiological Examination: Aerobic Plate Count [S]

[17] 周杨,万强,蔡芷荷,等.食品中克罗诺杆菌属双重 PCR 检测试剂盒的评价[J].微生物学通报,2019,46(9):2282-2291
ZHOU Yang, WAN Qiang, CAI Zhi-he, et al. Evaluation of duplex PCR detection kit for detection of *Cronobacter* in food samples [J]. Microbiology China, 2019, 46(9): 2282-2291

[18] Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach [J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2002, 16: 47-51

[19] Zhang W, Zhang Z, Fan G, et al. Development and application of a universal and simplified multiplex RT-PCR assay to detect five potato viruses [J]. Journal of General Plant Pathology, 2016, 83: 33-45

[20] Nagaraj S, Ramlal S, Kingston J, et al. Thermostabilization of indigenous multiplex polymerase chain reaction reagents for detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2018, 51(2): 191-198

[21] 姚栋,张如胜,欧新华.多重 PCR 快速检测 3 种致泻性大肠埃希菌方法的建立[J].国际检验医学杂志,2015,36(8):1032-1033
YAO Dong, ZHANG Ru-sheng, OU Xin-hua. Study of a multiplex PCR method for the detection of 3 Diarrheagenic Escherichia coli [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2015, 36(8): 1032-1033

[22] 张明明,梁美丹,黄志深,等.6 类致泻大肠埃希氏菌多重 PCR 检测体系的建立[J].食品安全质量检测学报,2019,10(14):4667-4672
ZHANG Ming-ming, LIANG Mei-dan, HUANG Zhi-shen, et al. Establishment of multiplex PCR detection method for 6 strains of diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(14): 4667-4672

[23] 周杨,万强,蔡芷荷,等.基于环介导恒温扩增技术的大肠杆菌O157:H7 快速检测试剂盒的评价[J].微生物学通报,2017,44(8): 1996-2004
ZHOU Yang, WAN Qiang, CAI Zhi-he, et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification-based kits for rapid detection of *E. coli* O157:H7 [J]. Microbiology China, 2017, 44(8): 1996-2004

（上接第 233 页）

[18] Cook M T, Tzortzis G, Charalampopoulos D, et al. Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria [J]. Biomacromolecules, 2011, 12(7): 2834-2840

[19] 张灿,吴彩娥,范龚健,等.植物蛋白微胶囊对益生菌包埋的研究进展[J].食品工业科技,2017,38(5):385-389
ZHANG Can, WU Cai-e, FAN Gong-jian, et al. Progress in the research of plant protein materials for probiotics encapsulation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(5): 385-389

[20] Khoramnia A, Abdullah N, Liew S L, et al. Enhancement of viability of a probiotic *Lactobacillus* strain for poultry during freeze-drying and storage using the response surface methodology [J]. Animal Science Journal, 2011, 82(1): 127-135