

## 实验技术与方法

## 饮用水中大肠埃希菌富集和 DNA 提取方法优化

胡朝友<sup>1,2</sup>, 傅春玲<sup>2</sup>, 张宏斌<sup>1</sup>

(1. 昆山市疾病预防控制中心, 江苏 昆山 215300; 2. 苏州大学, 江苏 苏州 215000)

**摘要:**目的 建立一种灵敏、可靠、快速对水中大肠埃希菌富集和 DNA 提取的最佳方法组合, 以便应用 TaqMan 探针实时荧光 PCR 技术进行定量检测。方法 膜过滤洗脱环节, 采用 3 种不同的方法进行富集洗脱, 通过平板计数法比较各方法富集洗脱效果; DNA 提取环节, 采用 4 种方法进行 DNA 提取。所得 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增, 定量检测 DNA 拷贝数, 比较各方法的 DNA 提取效率; 并采用最优的方法组合, 对模拟水样进行膜过滤和 DNA 提取, 考察全过程的回收率和灵敏度。结果 采用加表皮葡萄球菌过滤 + 漩涡混合器 + 玻璃棒刮擦洗脱方法 (C 法), 洗脱效率能达到 75% ~ 93%; TritonX-100 法和磁珠法的线性范围达到 6 个数量级稀释度 ( $10^0 \sim 10^{-5}$ ),  $r^2$  分别为 0.998 和 0.999, 然而, TritonX-100 法更省时, 更简便, 经济性更好。采用该最优的方法组合, 其全过程的回收率为 79.7% ~ 104.0% 且灵敏度达到 1 cfu/ml。结论 C 法 + Triton-100 法组合可以快速、准确、经济地对饮用水中大肠埃希菌进行富集和 DNA 提取。

**关键词:** 大肠埃希菌; 细菌富集; DNA 提取; 饮用水; 食品安全; 食源性致病菌

中图分类号: R155.5; R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)01-0036-04

### Optimized methods for *Escherichia coli* concentration and DNA extraction in drinking water

HU Chao-you, FU Chun-ling, ZHANG Hong-bin

(Kunshan Centers for Diseases Control and Prevention, Jiangsu Kunshan 215300, China)

**Abstract: Objective** To establish an optimized method combination, which was sensitive, accurate and rapid for *Escherichia coli* enrichment and DNA extraction, so that we can use a real-time qPCR method (TaqMan probe) for detection and enumeration of *Escherichia coli* in drinking water. **Methods** In membrane filtration-elution step, the bacteria particles were concentrated by three different methods, and the recovery of *E. coli* was estimated quantitatively by Enumerating CFU on plate agar. In DNA extraction step, the genomic DNA were extracted with four different methods, and the TaqMan PCR assay was used to amplify and measure the recovery of the extracted DNA. **Results** The recovery of *E. coli* eluted from the membrane was 76%–93% by using C-method (filtrating with *Staph. epidermidis* + vortex washing + glass rod scraping). Of the four extraction protocols, Triton-100 and beads extraction method had the same linear range ( $10^0 - 10^{-5}$ ),  $r^2$ : 0.998 and 0.999 respectively. However, the first method had significantly lower cost and time consuming. The recovery of *E. coli* from water was 79.7%–104.0%, and the sensitivity of qPCR was 1 cfu/ml for the whole processing using the optimal methods for DNA extraction. **Conclusion** The optimal method combination (C method + TritonX-100 method) was rapid, accurate and economic for *E. coli* enrichment from water and DNA extraction.

**Key words:** *Escherichia coli*; bacteria enrichment; DNA extraction; drinking water; food safety; food-borne pathogen

应用 TaqMan 探针实时荧光 PCR 定量方法检测水中大肠埃希菌时, 需要对饮用水中的细菌进行富

集和 DNA 提取, 以便提高方法检测限。由于定量检测方法的特殊要求, 选择的方法组合必须满足富集效率高、DNA 提取回收率高等条件。膜过滤具有富集效率高、快速、成本低的特点, 是饮用水中进行微生物富集的首选方法<sup>[1-3]</sup>, 但是由于滤膜的微孔分子筛吸附效应, 从滤膜上洗脱富集的细菌却成了棘手的问题, 特别是在对低浓度细菌的水样进行富集时, 洗脱效果严重影响回收率。本研究在膜过滤洗脱环节采用了漩涡混合器洗脱 (A 法)、A 法加玻璃棒辅助洗脱 (B 法)、B 法加表皮葡萄球菌过滤 (C

收稿日期: 2013-09-09

基金项目: 江苏省卫生厅预防医学 2012 年科研课题资助项目 (Y2012049); 苏州市饮用水安全与水性疾病监测公共服务平台开放实验室开放课题资助项目 (SZPT2012001)

作者简介: 胡朝友 男 中级检验师 主要研究方向为微生物检验  
E-mail: hu\_chaoyou@163.com

通讯作者: 傅春玲 女 副教授 主要研究方向为食品营养与卫生  
E-mail: Fuchunling@suda.edu.cn

法);在 DNA 提取环节采用如下四种方法:水煮法、TritonX-100 法、柱过滤式试剂盒法、磁珠试剂盒法。通过比较各方法的细菌富集 DNA 提取效果,寻找出一种较为理想的能够满足后续定量检测的方法组合:C 法 + TritonX-100 法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 试 验 菌 株

大肠埃希菌(ATCC 25922)购自广东环凯,表皮葡萄球菌为本实验室保藏。

#### 1.1.2 仪 器 与 试 剂

7500 荧光定量 PCR 仪、X-22R 多功能台式高速离心机、膜过滤装置(Milliflex),全自动核酸提取仪(MagMax-96,ABI)。DreamTaq PCR Master Mix(2X, Thermo-Fermentas)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒(过滤柱式)、细菌基因组 DNA 磁珠提取试剂盒(均购自北京天根)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 膜 过 滤

模拟水样配制:过夜大肠埃希菌肉汤培养液,经梯度稀释后,取不同数量级的稀释液 1 ml 接种 200 ~ 1 000 ml 的本市自来水中,配成不同浓度的大肠埃希菌污染的模拟水样,加标浓度采用 VRBA 平板 36 °C 培养 18 h,计数。

滤膜的选择:分别采用孔径 0.22、0.45 μm 滤膜过滤模拟水样后,取下滤膜,紧贴在 VRBA 平板上,36 °C 培养 18 h,计数。将各组滤膜所得结果与平板计数结果进行成组 *t* 检验,比较各滤膜的过滤富集效果。

#### 1.2.2 膜 洗 脱

混合器洗脱(A 法):将滤膜置于预先加 10 ml 洗脱液(生理盐水)的直径为 20 mm 的玻璃管中,漩涡混合器,3 000 r/min 剧烈震荡 2 min。洗脱液细菌浓度用 VRBA 琼脂平板培养计数。

A 法加玻璃棒辅助洗脱(B 法):在 A 法基础上配合玻璃棒刮擦滤膜表面,后续步骤同上接种平板计数。

B 法加表皮葡萄球菌过滤(C 法):水样加表皮葡萄球菌(过夜肉汤培养物 5 ml)进行膜过滤后,采用 B 法洗脱,步骤同上。

#### 1.2.3 DNA 提 取

简化水煮法:参照文献[4],略有改动。取 1.0 ml 菌液至 1.5 ml 离心管中,12 000 r/m 离心 10 min。吸去 900 μl 上清液,重悬沉淀,100 °C 孵育 10 min,即为 DNA 模板,使用前重悬。

TritonX-100:取 1.0 ml 菌液至 1.5 ml 离心管,

12 000 r/m 离心 10 min,吸去 910 μl 上清液,于沉淀中加入 10 μl 10% TritonX-100,100 °C 孵育 10 min,即为 DNA 模板,使用前重悬。

柱过滤式试剂盒法、磁珠试剂盒法按照天根公司产品说明书操作。

#### 1.2.4 DNA 拷 贝 数 定 量 检 测

选取单拷贝 *uidA* 基因作为扩增目的片段,参照文献[5]的引物探针序列,上游引物 F: CAACGAAGT AACTGGCAGA,下游引物 R: CATTACGCTG CGATGGAT,探针 P: FAM-CCCGC CGGGA ATGGTGATTA C-BHQ1(上海生工合成),目的片段长度为 121 bp,PCR 反应体系:PCR 预混液 12.5 μl,引物各 400 nmol/L,探针 200 nmol/L,模板 2 μl,总体积为 25 μl。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 3 min;95 °C 30 s,60 °C 60 s,40 个循环。采用实时荧光 PCR<sup>[6]</sup>,利用 CT 值与原始模板拷贝数的对数成比例的函数关系,通过梯度稀释大肠埃希菌标准品构建标准曲线,定量检测 DNA 拷贝数,比较各方法 DNA 提取效率。

## 2 结 果

### 2.1 滤 膜 的 选 择

分别用三种不同滤膜,过滤加有(27.1 ± 3.2) cfu (VRBA 平板计数)大肠埃希菌的模拟水样,重复 10 次,表 1 结果显示,0.45 μm 滤膜(国产某品牌)的细菌截留率明显偏低,0.22 μm 滤膜(国产某品牌)和 0.45 μm (Millipore)滤膜结果相当,但后者过滤体积更大,以下试验均采用 0.45 μm (Millipore)滤膜过滤。

表 1 三种不同滤膜过滤效果比较

Table 1 Comparison the effect of three different membrane

滤膜/μm	filtration methods			P 值
	最大过滤体积 <sup>a</sup> /ml	截留细菌数/cfu	截留率 <sup>b</sup> /%	
0.22(国产某品牌)	900	24.0 ± 5.1	88.5	<i>P</i> > 0.01
0.45(国产某品牌)	1 700	17.8 ± 3.1	66.8	<i>P</i> < 0.01 *
0.45(Millipore)	2 200	23.9 ± 4.5	88.2	<i>P</i> > 0.01

注:a 表示 10 min 最大过滤体积;b 表示加标量为 27.1 cfu;\* 表示该组截留结果与平板计数法结果间比较差异有统计学意义

### 2.2 三 种 膜 洗 脱 方 法 的 回 收 率 比 较

C 法明显优于 A 法和 B 法,在加标量为 1.0 × 10<sup>4</sup> ~ 1.0 × 10<sup>9</sup> cfu 的模拟水样中,C 法膜洗脱效率能达到 75% ~ 93%,而 A 法膜洗脱效率最低,不足 10%,见图 1。

### 2.3 DNA 提 取 方 法 比 较

取 10<sup>0</sup> ~ 10<sup>-5</sup> 6 个数量级的大肠埃希菌梯度稀释液,分别采用四种方法进行 DNA 提取,表 2 结果显示,简化水煮法提取效率偏低,扩增效率只有

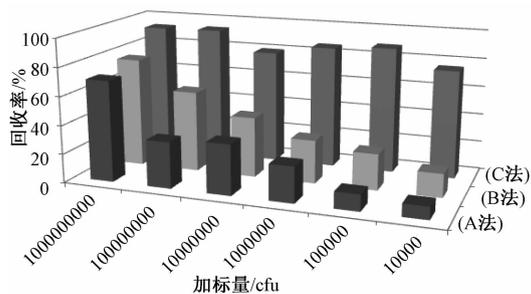


图 1 三种膜洗脱方法处理不同加标量模拟水样的回收率  
Figure 1 The recovery obtained by three different membrane elution methods from simulate water

表 2 四种 DNA 提取方法效果比较

Table 2 Comparison of four DNA extraction methods

方法	标准曲线	$r^2$	扩增效率/%	线性范围 <sup>a</sup> /(copy/ $\mu$ l)	综合评定 <sup>b</sup>
简化水煮法	$y = -4.831gx + 35.5$	0.992	61.1	$7.0 \times 10^5 \sim 7.0 \times 10^1$	不适用
Triton 法	$y = -3.821gx + 32.1$	0.996 ~ 0.998	82.6 ~ 95.8	$7.0 \times 10^6 \sim 7.0 \times 10^1$	最优方法
过滤柱试剂盒法	$y = -2.781gx + 31.1$	0.994	128.0	$7.0 \times 10^6 \sim 7.0 \times 10^3$	不适用
磁珠试剂盒法	$y = -3.481gx + 32.6$	0.999	92.7	$7.0 \times 10^6 \sim 7.0 \times 10^1$	备用方法

注: a 表示原液浓度:  $7.0 \times 10^8$  cfu/ml, 梯度稀释液采用表皮葡萄球菌液稀释, 上样体积为 2  $\mu$ l; b 表示考虑的因素主要为方法学指标, 以及提取时间(手工时间/总耗时)费用等

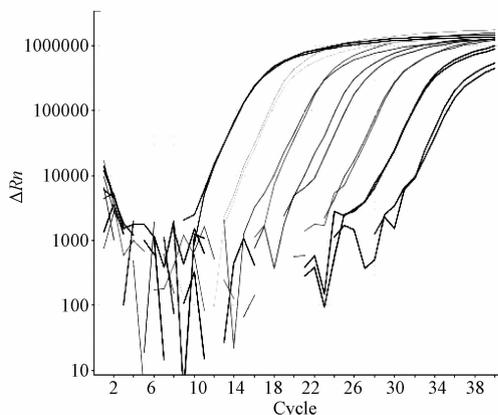
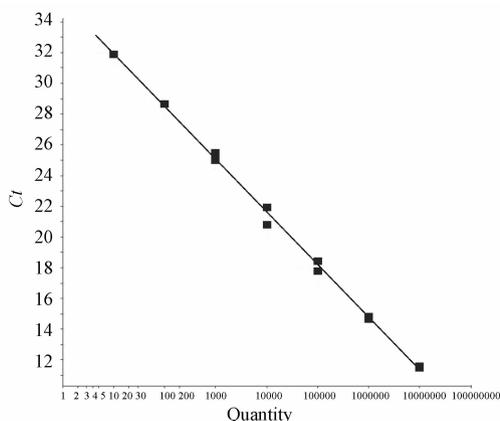


图 2 采用 TritonX-100 法提 DNA 建立的标准曲线及扩增图

Figure 2 Standard curve and amplification plot obtained by QPCR from 10-fold serial dilutions of escherichia coli, which DNA extracted by TritonX-100 method

2.5 回收率

采用最优方法组合(C法 + TritonX-100法), 对总体积为 1 000 ml 不同浓度的模拟水样, 进行富集

61.1%; 过滤柱试剂盒法不适用于低浓度目标菌的提取, 线性范围为  $10^0 \sim 10^{-3}$ ; Triton 法与磁珠试剂盒法在定量检测技术指标上相当, 线性范围均达到 6 个数量级, 均能满足后续荧光 PCR 定量检测, 但前者更简便, 更快, 经济性更好, 故评为最优方法。

2.4 DNA 拷贝数定量检测结果

含大肠埃希菌浓度分别为  $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^9$  cfu/ml 标准系列, 采用 Triton 法提取 DNA, 重复 2 次, RT-qPCR 测定拷贝数, 建立的标准曲线,  $r^2 = 0.998$ , Eff% = 95.8, 见图 2。

和 DNA 提取, 全过程的回收率为 79.7% ~ 104.0%, 检测限达到 1.0 cfu/ml, 见表 3。

表 3 最优方法组合处理模拟水样的总回收率

Table 3 The total recovery for water pre-processing by using the optimal methods

加标量/cfu	模拟水样浓度 <sup>a</sup> /(cfu/ml)	$Ct$ 值 <sup>b</sup> /( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )	实测值 /(copy/ $\mu$ l)	换算原水样浓度 /(cfu/ml)	总回收率 /%
$1.0 \times 10^8$	$1.0 \times 10^5$	$14.90 \pm 0.20$	$(9.25 \pm 1.20) \times 10^5$	$9.2 \times 10^4$	92.5
$1.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^4$	$18.24 \pm 0.44$	$(9.85 \pm 3.10) \times 10^4$	$9.8 \times 10^3$	98.5
$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^3$	$21.60 \pm 0.39$	$(1.04 \pm 0.27) \times 10^4$	$1.0 \times 10^3$	104.0
$1.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^2$	$25.10 \pm 0.72$	$(8.02 \pm 1.18) \times 10^2$	80.2	80.2
$1.0 \times 10^4$	10.0	$28.80 \pm 0.09$	$79.70 \pm 4.5$	8.0	79.7
$1.0 \times 10^3$	1.0	$31.10 \pm 0.36$	$18.40 \pm 4.3$	1.8	184.0*
空白对照 <sup>c</sup>	0.0	—	0.00	0.0	—

注: a 表示水样体积为 1 000 ml; b 表示前处理浓缩  $10^4$  倍; c 表示不加大肠埃希菌的自来水, 其他操作均相同; — 表示  $Ct$  值  $> 40$ ; \* 表示回收率偏高, 是由于扩增曲线 S 型欠佳, 导致  $Ct$  值计算时误差偏大, 故不能准确定量, 只作为检测下限判断依据

### 3 讨论

微孔滤膜过滤具有过滤体积大、速度快、细菌截留率高等优点,非常适合用于处理后的饮用水中细菌富集。表 1 中,国产某品牌滤膜价格上有优势,但孔径 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜在细菌截留率上偏低,0.22  $\mu\text{m}$  滤膜和 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore 滤膜的细菌截留数,与平板计数法结果比较差异无统计学意义,均可以满足定量检测的要求,但 Millipore 滤膜过滤体积更大,相比检测限更低。

本试验采用过玻璃珠击打<sup>[7]</sup>、超声波振荡<sup>[8]</sup>、肉汤洗脱<sup>[9]</sup>、滤膜反向抽滤、滤膜反向悬空离心等方法,低浓度目标菌的洗脱效果均不理想;棉签几乎可以完全擦拭滤膜上细菌,但是棉签擦拭后的细菌大部分会包裹在棉花内,即使将擦拭的棉花高速离心,其离心力还是不足以使其摆脱棉花束缚。试验最终选择在水样中加入高浓度的杂菌过滤,有效地提高了低浓度目标菌的洗脱率,使洗脱效率稳定在 74%~95% 的水平(见图 1)。试验中出现总回收率 > 100% (104.0%) 的情况(见表 3),是因为试验的重复次数偏少,主要由吸样误差和仪器测量误差造成。

由于滤膜的微孔分子筛吸附效应在低浓度细菌过滤时,对洗脱效率的影响更明显(见图 1),所以如果在膜过滤时加入高浓度的杂菌,可提高低浓度目标菌洗脱效率。表皮葡萄球菌为革兰氏阳性球菌,在肉汤中易培养,在 VRBA 平板上不生长,不影响大肠埃希菌计数,也不影响后续 PCR 反应的特异性和灵敏度(见表 3)。

DNA 提取方法必须满足 PCR 定量检测时线性范围宽、扩增效率高的要求。提取的 DNA 不一定要纯,但要求无 PCR 反应抑制物,且回收率要高。TritonX-100 法和磁珠法能满足后续荧光 PCR 定量检测,但 Triton 法处理时间仅需 20 min,操作便捷性和费用与水煮法相当,故综合评定 TritonX-100 法为

最优提取方法。

采用 C 法 + TritonX-100 法方法组合,膜过滤浓缩 100 倍 × 洗脱液离心浓缩 10 倍 × DNA 提取浓缩 10 倍,前处理浓缩倍数达到  $10^4$  倍,使得 PCR 定量检测水中大肠埃希菌的检测限降到 1 cfu/ml(见表 3),前处理时间 < 0.5 h,且操作简便、费用低,是一种较为理想的能够满足后续 PCR 定量检测的前处理方法组合。

### 参考文献

- [1] Gilgen M, Germann D, Lüthy J, et al. Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples[J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 37(2-3): 189-199.
- [2] MA J F, Naranjo J, Gerba C P. Evaluation of MK filters for recovery of enteroviruses from tap water [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(6): 1974-1977.
- [3] 张崇森, 刘永军, 王晓昌, 等. 环境水体中肠道病毒浓缩方法的比较[J]. 中国给水排水, 2007, 23(7): 36-39.
- [4] 魏华, 孙立国, 朱晶, 等. 不同的 DNA 提取法对两种常见医院感染菌 ERIC-PCR 鉴定的影响研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(9): 1044-1047.
- [5] Chern E C, Siefing S, Paar J, et al. Comparison of quantitative PCR assays for *Escherichia coli* targeting ribosomal RNA and single copy genes[J]. Applied Microbiology, 2010, 52(3): 298-306.
- [6] Heid C A, Stevens J, Livak K J, et al. Real time quantitative PCR [J]. Genome Res, 1996, 6: 986-994.
- [7] Noble R T, Blackwood A D, Griffith J F, et al. Comparison of rapid quantitative PCR-based and conventional culture-based methods for enumeration of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in recreational waters [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(22): 7437-7443.
- [8] Joly P, Falconnet P A, André J, et al. Quantitative real-time legionella PCR for environmental water samples; data interpretation [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(4): 2801-2808.
- [9] 张崇森, 刘永军, 王晓昌, 等. 环境水体中肠道病毒的膜吸附洗脱浓缩方法研究[J]. 环境科学, 2007, 28(7): 1543-1547.

· 请示批复 ·

## 国家卫生计生委办公厅关于中链甘油三酯有关问题的复函

中国食品工业协会:

你协会《关于请批准中链甘油三酯作为普通食品原料管理的请示》(中国食协[2013]23号)收悉。经研究,现函复如下:

中链甘油三酯即中链脂肪,天然存在于棕榈仁油、椰子油等食品和母乳中,是膳食脂肪的来源之一,主要成分是“辛,癸酸甘油酯”。根据食品安全国家标准《特殊医学用途婴儿配方食品通则》(GB 25596—2010)和食品安全国家标准《食品添加剂使用标准》(GB 2760—2011)的规定,中链甘油三酯可作为食品原料或乳化剂使用。中链甘油三酯作为食品原料使用时,应当按照《食用植物油卫生标准》(GB 2716—2005)执行;作为乳化剂使用时,应当符合食品安全国家标准《食品添加剂 辛,癸酸甘油酯》(GB 28302—2012)的规定。

专此函复。

国家卫生计生委办公厅  
二〇一三年十二月二十日