

实验技术与方法

核酸-免疫层析法快速检测肠道侵袭性大肠埃希氏菌

赵雪龙¹, 夏伟诚², 刘道峰³, 刘成伟³, 山珊², 赖卫华¹

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047; 2. 江西师范大学生命科学院南昌市鄱阳湖湿地微生物资源开发与利用重点实验室, 江西南昌 330022; 3. 江西省疾病预防控制中心江西省源性疾病诊断溯源重点实验室, 江西南昌 330029)

摘要:目的 建立快速检测肠道侵袭性大肠埃希氏菌(EIEC)的核酸-免疫层析方法。方法 利用不对称聚合酶链式反应技术制备目标单链DNA, 结合免疫层析技术分型检测EIEC的毒力基因*invE*和 大肠埃希氏菌标志基因*uidA*。结果 在不对称PCR体系中,*uidA*和*invE*最佳上下游引物比例为1:3, 最佳引物浓度(下游)分别为0.2 μmol/L和0.25 μmol/L, 最佳扩增循环次数为40。本方法最低检测限为 3.97×10^{-3} ng/μL的基因组DNA, 特异性与PCR-凝胶电泳法相当。结论 本方法具有操作简便、快速、成本低、检测结果准确以及特异性良好等优点, 可分型检测EIEC、非EIEC大肠埃希氏菌和非大肠埃希氏菌, 适用于基层实验室使用。

关键词:检测; 肠道侵袭性大肠埃希氏菌; 毒力基因; 免疫层析

中图分类号: R155

文献标识码: A

文章编号: 1004-8456(2022)03-0524-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2022.03.020

Rapid detection of Enteroinvasive *Escherichia coli* by nucleic acid immunochromatographyZHAO Xuelong¹, XIA Weicheng², LIU Daofeng³, LIU Chengwei³, SHAN Shan², LAI Weihua¹

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Jiangxi Nanchang 330047, China; 2. Nanchang Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation & Utilization from Poyang Lake Wetland, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Jiangxi Nanchang 330022, China; 3. Jiangxi Province Centre for Disease Control and Prevention Jiangxi Province Key Laboratory of Diagnosing and Tracing of Foodborne Disease, Jiangxi Nanchang 330029, China)

Abstract: Objective To establish a nucleic acid immunochromatography method for rapid detection of Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). **Methods** The target single-stranded DNA was prepared by asymmetric PCR, the *invE* which was the virulence gene of EIEC and *uidA* which was the marker gene of *Escherichia coli* were detected by immunochromatography. **Results** In the asymmetric PCR system, the optimal ratio of forward and reverse primer for *uidA* and *invE* was 1:3, and the optimal primer concentrations (reverse primer) were 0.2 μmol/L and 0.25 μmol/L, respectively. The optimal cycle number of amplification was 40. The lowest detection limit of this method was 3.97×10^{-3} ng/μL, and the specificity was comparable to that of PCR-gel electrophoresis. **Conclusion** The method which had the advantages of convenience, less time consuming, low detection cost, good accuracy and specificity, was suitable for primary laboratory.

Key words: Detection; enteroinvasive *Escherichia coli*; virulence gene; immunochromatography

大肠埃希氏菌是动物肠道内常见的微生物,其中致泻大肠埃希氏菌(Diarrheagenic *Escherichia*

coli, DEC)可经过污染食物导致人类患病^[1]。肠道侵袭性大肠埃希氏菌(Enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC)是一类能够侵入肠道上皮细胞而引起痢疾样腹泻的大肠埃希氏菌,其生化反应和抗原结构与痢疾志贺氏菌类似^[2]。EIEC侵入上皮细胞的关键基因是侵袭性质粒上的抗原编码基因及其调控基因,如*ipaH*基因和*ipaR*基因(又称为*invE*基因)^[3]。不同型别的DEC形态相似,传统培养法和血清凝集法较难准确区分EIEC与其他型别的DEC^[4]。为此DEC的检测与分型方法由最初常用

收稿日期: 2021-12-14

基金项目: 国家自然科学基金(82003467); 江西省重点研发计划(20192BBGL70053, 20192BBG70069); 江西省自然科学基金面上项目(2020BAB206066); 江西省卫健委科技计划(202130977)

作者简介: 赵雪龙 男 硕士研究生 研究方向为食品有害物质快速检测技术 E-mail: zhaoxl619@163.com

通信作者: 赖卫华 男 教授 研究方向为食品有害物质快速检测技术 E-mail: talktolaiwh@163.com

的基于免疫学检测分型的方法发展为基于分子生物学的检测分型方法。常见的分子分型方法包括脉冲场凝胶电泳分型技术^[5]、多位点序列分型技术^[6]、成簇的规律间隔的短回文重复序列分型技术^[7]、质粒图谱分型技术^[8]和单核苷酸多态性分型技术^[9]等。但是分子分型方法往往需要大型仪器且操作繁琐,不方便基层使用。国家标准通过聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)结合凝胶电泳法检测 DEC 特征毒力基因,实现 5 种 DEC 的分型检测,检测过程操作繁琐、耗时长,且电泳过程中会接触到有毒染料^[3,10]。

免疫层析技术因其具有操作步骤简便、结果判读直观、成本低廉和适合基层等特点,故被广泛地应用于快速检验及诊断行业^[11-12]。基于免疫学的快速检测方法依赖于抗原与抗体的特异性识别,对于细菌或病毒的分型检测具有局限性,如致泻大肠埃希氏菌难以依赖表面抗原的不同进行区分,国家标准分型检测致泻大肠埃希氏菌方法也由基于免疫学法转为分子生物学方法^[3,13]。近年来,核酸作为识别元件被广泛地应用于快速检测中^[14-15]。本研究利用不对称 PCR 技术结合免疫层析法建立一种核酸-免疫层析方法,实现对 EIEC 的分型检测。首先利用不对称 PCR 技术获得标记地高辛的 *uidA* 和标记生物素的 *invE* 单链 DNA 产物,再使用标记 DNA 胶体金探针特异性地识别单链 DNA 产物,最后利用喷有链霉亲和素和抗地高辛抗体的双检测线试纸条对复合物进行检测。所建立的方法可检测 EIEC,并同时检测大肠埃希氏菌,不需大型仪器,操作简单,耗时短,适用于基层使用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源

肠道侵袭性大肠埃希氏菌 CICC2488、肠道聚集性大肠埃希氏菌 CICC24186、肠道致病性大肠埃希氏菌 CICC24189、产肠毒素大肠埃希氏菌 CICC10667、产志贺毒素大肠埃希氏菌 CICC10670、大肠埃希氏菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC6583、单核增生李斯特氏菌 CMCC54009、鼠伤寒沙门氏菌 CM

CC50920、铜绿假单胞杆菌 ATCC9027、副溶血性弧菌 CMCC20030 和枯草芽孢杆菌,ATCC6633 由江西省疾病预防控制中心提供。

1.1.2 主要仪器与试剂

CFX96 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), BE-1200 旋转混合仪(海门市米林贝尔仪器制造有限公司), QT-1 涡旋混合器仪(上海琪特分析仪器有限公司), HGS510 划膜喷金机、切条机(杭州峰航科学仪器有限公司), DHG-9203A 干燥箱(上海精宏实验设备公司), H2100R 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司), Airstream®生物安全柜(新加坡 ESCO 公司), QIAxcel Advanced 全自动实时毛细管电泳仪(德国 QIAGEN 公司), Synergy 超纯水系统(德国 Merker Millipore 公司), LTI-1200W 生化培养箱(日本东京理化公司), 超微量分光光度计(Spectrophotometer K5600, 北京凯奥科技发展有限公司), DYY-8C 凝胶电泳仪(北京六一仪器厂), ChemiDOC™XRS+ 凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司)。

氯金酸、柠檬酸钠、聚乙二醇 20000 (PEG-20000)、吐温-20 均购自美国 Sigma 公司;牛血清白蛋白、链霉亲和素、50×TAE 电泳缓冲液、胰酪大豆胨琼脂培养基(Tryptose soya agar, TSA)、胰酪大豆胨培养基(Tryptic soy broth, TSB)均购自北京索莱宝科技有限公司;抗地高辛单克隆抗体来自武汉艾美捷科技有限公司;DNA marker(500 bp)、2×Taq Plus Master Mix 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;11342-025N 硝酸纤维素膜[流速为 570 mL/(min·cm²)]均购自德国 Sartorius 公司;样本垫、结合垫、吸水纸、PVC 底板均购自上海金标生物技术有限公司;琼脂糖购自瑞士 Lonza 公司;10×Loading Buffer 购自日本 Takara 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计

根据 GB 4789.6—2016《食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》^[1]中 EIEC 标志性毒力基因 *invE* 与大肠埃希氏菌标志基因 *uidA* 的序列进行引物及探针的设计,由上海生工生物工程股份有限公司合成并测序,引物及探针的序列见表 1。

表 1 实验中用到的引物

Table 1 Primers used in the experiment

引物名称	引物序列(5'—3')
<i>invE</i> 上游引物(<i>invE</i> -F)	GTACGCGATCAAGAATCCCTAA
<i>invE</i> 下游引物(<i>invE</i> -R-Biotin)	GCTCTTCTACGAGTGCCATCC-Biotin
<i>invE</i> 金标探针引物(SH- <i>invE</i> -F)	SH-TTTGTACGCGATCAAGAATCCCTAA
<i>uidA</i> 上游引物(<i>uidA</i> -F)	GCGAGGTACGGTAGGAGTTG
<i>uidA</i> 下游引物(<i>uidA</i> -R-Dig)	TCACAGCCAAAAGCCAGACA-Dig
<i>uidA</i> 金标探针引物(SH- <i>uidA</i> -F)	HS-TTGCGAGGTACGGTAGGAGTTG

1.2.2 菌株的培养和DNA模板提取

将菌株在 10 mL TSB 培养基中 37 °C 振荡 (150 r/min) 培养 12 h, 将菌液划线于 TSA 培养基, 置于 37 °C 培养 12 h, 挑取单菌落在 10 mL TSB 培养基中 37 °C 振荡 (150 r/min) 培养 8 h, 离心 10 min (8000 r/min), 弃上清, 超纯水清洗菌体 3 次后溶于 1 mL 超纯水中, 98 °C 加热菌液 10 min, 离心 10 min (8 000 r/min), 取上清, 使用超微量分光光度计测量单菌落扩增菌液的基因组 DNA 的浓度, 将上清液置于 -20 °C 环境保存备用。

1.2.3 胶体金纳米粒子的制备与标记

采用柠檬酸钠还原氯金酸法制备胶体金纳米粒子。将 500 μ L 氯金酸溶液 (2% w/v) 加到 99.5 mL 超纯水中, 加热至沸腾后迅速加入 1.45 mL 的柠檬酸钠溶液 (1% w/v), 同时不断搅拌。当溶液颜色变红时, 继续保持沸腾状态并搅拌 15 min, 移去加热, 继续搅拌至胶体金溶液冷却到室温, 置于 4 °C 储存备用。

取 1 mL 胶体金与 10 μ L 吐温-20 (5% w/v), 置于旋转混合仪室温混匀 3 min, 然后加入 200 μ L PEG-20 000 (5% w/v), 室温混匀 10 min 后加入 200 μ L NaCl 溶液 (2 mol/L), 室温混匀 15 min 后, 加入 200 μ L 巯基修饰的上游引物 (2.5 μ mol/L) 震荡孵育 3.5 h, 最后加入 200 μ L BSA 溶液 (10% w/v) 封闭 1 h, 将标记后的胶体金探针离心 15 min (4 °C, 10 000 r/min), 弃上清后用超纯水复溶到 100 μ L, 置于 4 °C 储存备用。

1.2.4 免疫层析试纸条的制备

利用 HGS510 划膜喷金机在 NC 膜上喷涂链霉亲和素溶液 (2 mg/mL, 0.74 μ L/cm) 作为 T1 检测线, 喷涂抗地高辛抗体 (2 mg/mL, 0.74 μ L/cm) 作为 T2 检测线。两条检测线相距 6 mm, 在 60 mm PVC 底板, 依次贴上 25 mm 95 NC 膜、17 mm 吸水纸、22 mm 样品垫。组装完成后, 用切条机, 切成宽为 4 mm 试纸条, 放在密封袋里, 恒温 37 °C 干燥保存。

1.2.5 不对称PCR体系的建立

以 EIEC 基因组 DNA (1.2.2 提取) 作为模板, 分别对 *uidA* 和 *invE* 进行不对称 PCR。下游引物工作液的浓度为 2 μ mol/L, 反应体系为: 2 \times Taq Plus Master Mix, 10 μ L; 目标菌 DNA 模板, 2 μ L; *uidA* 或 *invE* 上、下游引物 5 μ L, 补充超纯水至 20 μ L。PCR 反应条件为: 95 °C 解链 5 min; 经变性 (95 °C, 30 s)、退火 (58.3 °C, 30 s)、延伸 (72 °C, 30 s) 后经历 40 个循环, 最后在 72 °C 下维持 5 min。PCR 产物经毛细管电泳仪进行观察。实验对不对称 PCR 上、下游引物浓度添加比例 (保持下游引物浓度为 2 μ mol/L 不变), 体系中引物浓度 (保持上下游引物比例为 1:3

不变)、循环次数进行了优化。上游引物浓度与下游引物浓度比例梯度设置为 1:1、1:3、1:5、1:7、1:9; 体系中下游引物终浓度梯度设置为 0.15、0.20、0.25、0.30 和 0.35 μ mol/L; 不对称 PCR 循环数梯度设置为 $n=20、30、40、50、60$ 。

1.2.6 核酸-免疫层析法分型检测不同浓度 EIEC

按照 1.2.2 提取 EIEC 基因组 DNA, 使用超微量分光光度计测量 EIEC 基因组 DNA 的浓度, 梯度稀释基因组 DNA, 分别对 *uidA* 和 *invE* 进行不对称 PCR。将 *uidA* 和 *invE* 的不对称 PCR 产物混合后稀释 25 倍, 取 90 μ L 稀释后的 PCR 产物, 加入 *uidA* 和 *invE* 胶体金探针各 3 μ L, 同时加入 5 μ L 吐温-20 溶液 (50% w/v) 和 5 μ L PEG-20000 (10% w/v), 置于 65 °C 金属浴混合孵育 10 min, 将混合物加入免疫层析试纸条样本垫, 反应 10 min, 使用灰度分析仪读取检测线灰度值。

1.2.7 核酸-免疫层析法分型检测 EIEC

取 1 株 EIEC 和 5 株非 EIEC 大肠埃希氏菌以及 6 株非大肠埃希氏菌菌株作为检测目标物, 按照 1.2.2 提取菌株基因组 DNA, 进行特异性实验, 评价方法的特异性。

1.2.8 国标法分型检测 EIEC

以目标菌基因组 DNA (1.2.2 提取) 作为模板, 分别对 *uidA* 和 *invE* 的基因片段进行 PCR。引物浓度为 2 μ mol/L, 反应体系为: 2 \times Taq Plus Master Mix, 10 μ L; 目标菌 DNA 模板, 2 μ L; *uidA* 或 *invE* 上、下游引物 5 μ L, 补充超纯水至 20 μ L。PCR 反应条件为: 95 °C 解链 5 min; 经变性 (95 °C, 30 s)、退火 (58.3 °C, 30 s)、延伸 (72 °C, 30 s) 后经历 40 个循环, 最后在 72 °C 下维持 5 min。

取 2 g 琼脂糖溶于 100 mL 1 \times TAE 缓冲液中, 加热溶解后加入 4 μ L Gelred 染料, 摇匀后倒入制胶槽中, 冷却。取 5 μ L PCR 产物与 1 μ L Loading buffer 混匀, 加入琼脂糖凝胶上样孔中, 同时以 DNA marker 作为参照。电泳采用 200 V 电压, 100 mA 电流, 电泳 40 min。

1.3 数据处理

采用 Origin 处理胶体金读取仪读取的试纸条灰度值, 并制备出显色强度的柱形图; 采用 Imagelab 处理 Bio-Rad 拍摄的凝胶电泳图像; 采用 QIAxcel Advanced 毛细管电泳仪配套软件直接处理毛细管电泳结果。

2 结果

2.1 *uidA* 和 *invE* 上、下游引物浓度添加比的优化

当 *uidA* 和 *invE* 上、下游引物浓度添加比为 1:1

时,只有目标双链 DNA 产生(图 2),此时 *uidA* 检测线仍然有条带产生,原因可能是由于胶体金探针与 PCR 产物热杂交时,部分双链解链与胶体金探针结合。随着上游引物的比例降低,目标单链开始产生,当 *uidA* 和 *invE* 上游引物与下游引物浓度比为 1:3 时,免疫层析结果(图 1)显示 *uidA* 和 *invE* 的检测线灰度值可达最高,此时单链产量最高(图 2)。当 *uidA* 和 *invE* 的上游引物与下游引物浓度比继续降低时,目标单链 DNA 产量均开始逐渐降低,试纸条的显色强度也在逐渐下降(图 1 和图 2)。由于上游引物是 PCR 的限制性引物,目标单链只有在上游引物耗尽后才会大量产生,但是过少的限制性引物使得制备大量单链的双链模板数量减少,不利于单链的大量制备^[15]。结合图 1 和图 2 可知,*uidA* 和 *invE* 最佳的上下游引物比例均为 1:3。

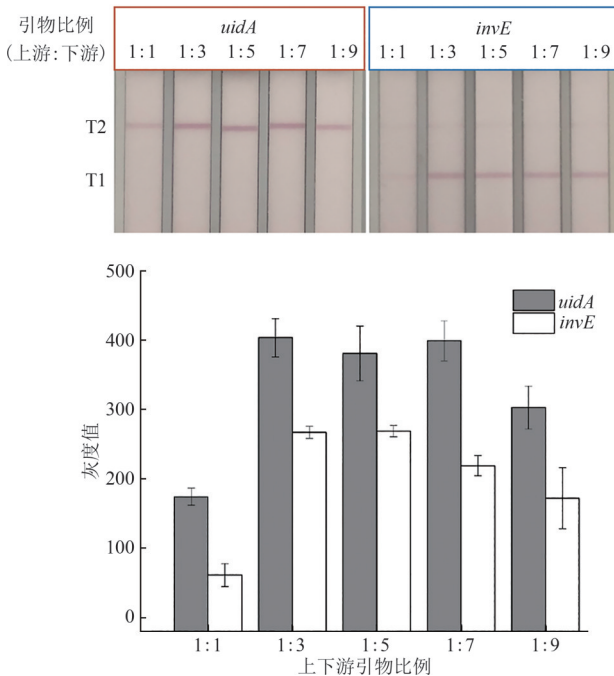


图 1 *uidA* 和 *invE* 不同上、下游引物浓度添加比对检测结果的影响

Figure 1 Influence of *uidA* and *invE* primer concentration addition ratios in different upstream and downstream

2.2 *uidA* 和 *invE* 下游引物浓度的优化

优化不对称 PCR 体系下游引物浓度的结果显示(图 3),随着下游引物浓度的增加,*uidA* 的检测线灰度值随之增高,当 *uidA* 下游引物终浓度为 0.20 $\mu\text{mol/L}$ 时,*uidA* 检测线灰度值 359.9。但当下游引物浓度提升到 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 时阴性对照检测线出现条带,这可能是由于过高浓度的 *uidA* 下游引物导致非特异性反应。随着 *invE* 下游引物浓度的升高,*invE* 检测线灰度值逐渐增大,当 *invE* 下游引物终浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 时,*invE* 的检测线灰度值可达 139.2,

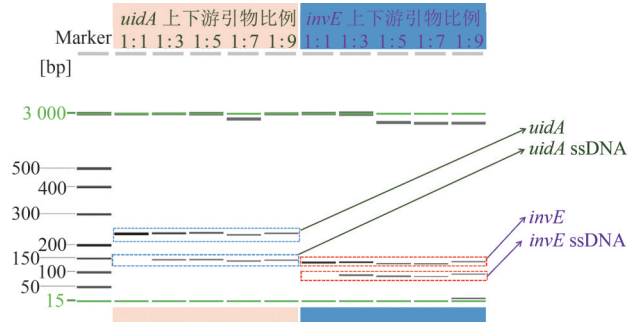
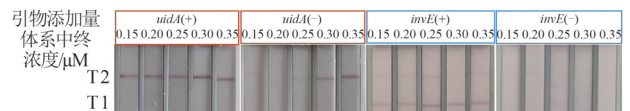


图 2 *uidA* 和 *invE* 不同上、下游引物浓度添加比的不对称 PCR 产物毛细管电泳图

Figure 2 Capillary electrophoresis of asymmetric PCR products with different upstream and downstream primer concentration addition ratios of *uidA* and *invE*



注:“+”表示该组基因阳性;“-”表示该组基因阴性

图 3 *uidA* 和 *invE* 下游引物终浓度对检测线灰度值的影响

Figure 3 Influence of *uidA* and *invE* downstream primer final concentration on gray value of detection line

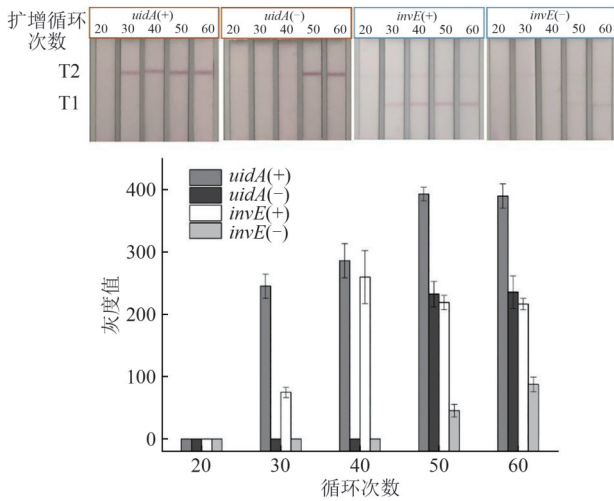
继续提高下游引物的浓度,对免疫层析效果没有显著影响。从图 3 可知,在不对称 PCR 体系中,*uidA* 和 *invE* 最佳引物浓度(下游引物)分别为 0.20 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 *uidA* 和 *invE* 不对称 PCR 循环次数的优化

单链 DNA 产物会在不对称 PCR 循环末期大量产生,增加循环次数可以提高单链 DNA 的产量,但扩增副产物的产量也会随之增加。如图 4 所示,当循环次数为 40 时,*uidA* 和 *invE* 检测线均出现清晰的检测条带,继续增加循环次数,*uidA* 和 *invE* 检测线均出现明显的非特异性条带。不对称 PCR 扩增 *uidA* 和 *invE* 的最佳循环次数为 40。

2.4 核酸-免疫层析法分型检测 EIEC 灵敏度

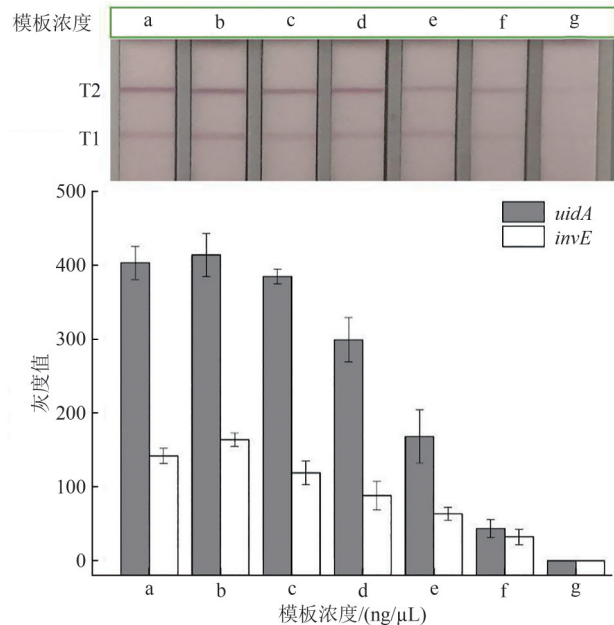
使用超微量分光光度计测得 EIEC 基因组 DNA 的浓度为 379 $\text{ng}/\mu\text{L}$,10 倍梯度稀释模板基因组 DNA,利用核酸-免疫层析法分型检测不同浓度 EIEC 全基因组 DNA。实验结果显示,核酸-免疫层析法分



注：“+”表示该组基因阳性；“-”表示该组基因阴性

图4 *uidA* 和 *invE* 不同循环次数对检测线灰度值的影响

Figure 4 Influence of different cycles of *uidA* and *invE* on gray value of test line



注：a=3.97×10² ng/μL；b=3.97×10¹ ng/μL；c=3.97 ng/μL；d=3.97×10⁻¹ ng/μL；e=3.97×10⁻² ng/μL；f=3.97×10⁻³ ng/μL；g=0 ng/μL

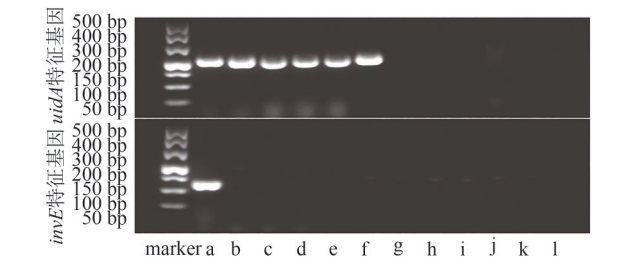
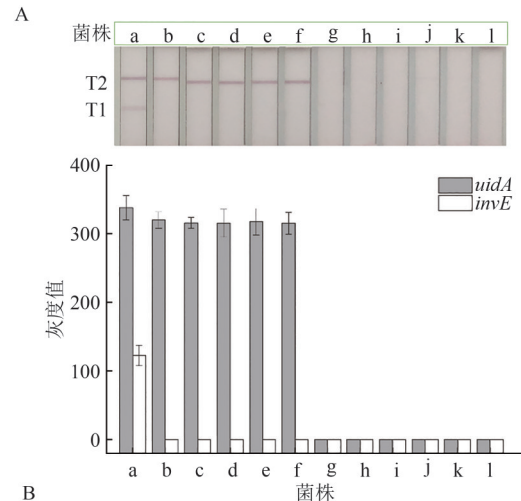
图5 *uidA* 和 *invE* 不同模板浓度对检测线灰度值的影响

Figure 5 Influence of different template concentrations of *uidA* and *invE* on gray value of test line

型检测 EIEC 的最低检测限为 3.97 × 10⁻³ ng/μL 的基因组 DNA。

2.5 核酸-免疫层析法分型检测 EIEC 特异性

为验证本实验建立并优化的快速分型检测 EIEC 法的特异性,选取 12 株菌株提取的基因组 DNA 进行分型检测。结果显示本方法可准确检测到含有 EIEC 标志性毒力基因的菌株,对非 EIEC 的大肠埃希氏菌可以准确地检测出 *uidA* 特征基因(图 6 A),与国标法(GB 4789. 6—2016)检测结果一致(图 6 B)。



注：A 图为采用本方法检测多种菌株的结果图,B 图为采用国标中凝胶电泳法检测相同菌株的结果；a:肠道侵袭性大肠埃希氏菌,b:肠道聚集性大肠埃希氏菌,c:肠道致病性大肠埃希氏菌,d:产肠毒素大肠埃希氏菌,e:产志贺毒素大肠埃希氏菌,f:大肠埃希氏菌,g:金黄色葡萄球菌,h:单核增生李斯特氏菌,i:鼠伤寒沙门氏菌,j:铜绿假单胞杆菌,k:副溶血性弧菌,l:枯草芽孢杆菌

图6 不对称 PCR 结合免疫层析法分型检测 EIEC

Figure 6 EIEC typing by asymmetric PCR combined with immunochromatography

3 讨论

在不对称 PCR 生成单链 DNA 的过程中,当限制性引物(*uidA* 和 *invE* 上游引物)在 PCR 过程中耗尽之后,过量的非限制性引物(*uidA* 和 *invE* 下游引物)以已产生的目标双链 DNA 为模板,开始扩增目标单链 DNA。下游引物(非限制性引物)占比不足会直接导致扩增单链的产量下降,但下游引物(非限制性引物)占比太大,会使得目标双链 DNA 模板产量不足,也会导致单链扩增效率下降^[16]。因此上、下游引物浓度添加比是影响目标单链 DNA 产量的核心因素。本文探究了 *uidA* 和 *invE* 上、下游引物浓度添加比与试纸条显色强度的关系,结果显示两种基因的上游引物与下游引物浓度比为 1:3 时,试纸条显色强度均最强。在不对称 PCR 体系中,引物的投入量是影响 PCR 扩增产量的另一关键因素,投入引物过少会直接导致 PCR 产量不足,而引物投入量过多则容易引起非特异性扩增^[17]。当 *invE* 和 *uidA* 上下游引物的比例为 1:3,随着下游引物浓度的增加,检测线灰度值随之增高,但当 *uidA*

下游引物终浓度 $>0.20\ \mu\text{mol/L}$ 时,会引起试纸条 *uidA* 检测线出现非特异性反应,*invE* 最佳的引物添加量为 $0.25\ \mu\text{mol/L}$ 。在不对称 PCR 过程中,单链 DNA 是从双链扩增完毕之后开始产生的,过多的循环反应次数导致酶活性降低,PCR 过程中出现非特异性扩增概率增加^[15]。实验结果显示 *uidA* 和 *invE* 不对称 PCR 的最佳循环次数为 40 个循环,当循环数 >40 时,试纸条 *uidA* 和 *invE* 检测线均出现非特异性反应。利用本文建立的方法检测 12 株细菌菌株,同时利用国标检测法 GB 4789.6—2016 进行验证,结果显示本方法可准确检测到含有 EIEC 标志性毒力基因的菌株,对另外 5 株非 EIEC 的大肠埃希氏菌可以准确地检测出 *uidA* 基因,方法可直观且特异地区别非大肠埃希氏菌与大肠埃希氏菌以及 EIEC。

本实验通过建立一种基于不对称 PCR 结合免疫层析技术快速分型检测 EIEC 标志性毒力基因 *invE* 和 大肠埃希氏菌标志性基因 *uidA* 的方法,可实现快速、准确、便携分型 EIEC 的目的,同时可以区别检测其他非 EIEC 大肠埃希氏菌以及非大肠埃希氏菌。相较于传统的 PCR 凝胶电泳法,本方法无需配胶、电泳和凝胶成像的繁琐操作,无有毒有害试剂接触,简化了操作过程,利用免疫层析法检测结果只需 20 min,而凝胶电泳所需时间约 1 h^[18]。本文所建立的检测方法具有操作简便、速度快、检测成本低、检测结果准确直观以及特异性良好等优点,适用于基层实验室使用。

参考文献

- [1] GOMES T A T, ELIAS W P, SCALETSKY I C A, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(Suppl 1): 3-30.
- [2] BONA M, MEDEIROS P H, SANTOS A K, et al. Virulence-related genes are associated with clinical and nutritional outcomes of Shigella/Enteroinvasive *Escherichia coli* pathotype infection in children from Brazilian semiarid region: a community case-control study [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2019, 309(2): 151-158.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.6—2016 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, National Medical Products Administration. GB 4789.6—2016 Microbiological examination of food hygiene—Examination of diarrheogenic *Escherichia coli* [S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [4] FRATAMICO P M, DEBROY C, LIU Y H, et al. Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli* [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(1): 644-651.
- [5] 李迎慧, 邱亚群, 洗慧霞, 等. 深圳市腹泻人群致泻性大肠埃希菌流行及病原特征研究[J]. 中华流行病学志, 2016, 37(1): 115-118. LI Y H, QIU Y Q, XIAN H X, et al. Prevalence and pathogenic characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* in people with diarrhea in Shenzhen city [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2016, 37(1): 115-118.
- [6] YU F, CHEN X, ZENG S, et al. Prevalence and genetic diversity of human diarrheagenic *Escherichia coli* isolates by multilocus sequence typing [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2018, 67: 7-13.
- [7] 龙金照, 徐亚珂, 段广才, 等. O26:H11 及 NM 大肠埃希菌 CRISPR 的分子分布特征及其与 stx 噬菌体的关系[J]. 中华流行病学杂志, 2017, 38(7): 944-949. LONG J Z, XU Y K, DUAN G C, et al. Molecular characterization of CRISPR in O26:H11 and NM *Escherichia coli* and its relationship with STX phage [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2017, 38(7): 944-949.
- [8] FAGERGUIST C K, ZARAGOZA W J, CARTER M Q. Top-down proteomic identification of Shiga toxin 1 and 2 from pathogenic *Escherichia coli* using MALDI-TOF-TOF tandem mass spectrometry [J]. Microorganisms, 2019, 7(11): 488.
- [9] MELLOR G E, FEGAN N, GOBIUS K S, et al. Geographically distinct *Escherichia coli* O157 isolates differ by lineage, Shiga toxin genotype, and total Shiga toxin production [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(2): 579-586.
- [10] 赵炜, 方炳雄, 牛宇杰, 等. 3 种常见核酸染料的安全性和灵敏度研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(22): 2954-2955, 2958. ZHAO W, FANG B X, NIU Y J, et al. Study on the safety and sensitivity of three common nucleic acid dyes [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2013, 34(22): 2954-2955, 2958.
- [11] XU S, ZHANG G, FANG B, et al. Lateral flow immunoassay based on polydopamine-coated gold nanoparticles for the sensitive detection of zearalenone in maize [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(34): 31283-31290.
- [12] HUANG Z, PENG J, HAN J, et al. A novel method based on fluorescent magnetic nanobeads for rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Food chemistry, 2019, 276: 333-341.
- [13] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 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]. 北京: 中国标准出版社, 2003. Ministry of Health of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 4789.6—2003 Microbiological examination of food hygiene—Examination of diarrheogenic *Escherichia coli* [S]. Beijing: Standards Press of China, 2003.
- [14] CHEN J, CHEN S, LI F. DNA probes for implementation of multiple molecular computations using a lateral flow strip biosensor as the sensing platform [J]. Analytical chemistry, 2018, 90(17): 10311-10317.
- [15] 山珊, 黄昭鸿, 黄艳梅, 等. 不对称 PCR 技术结合免疫层析

- 法快速检测产志贺毒素大肠埃希氏菌[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 312-318.
- SHAN S, HUANG Z H, HUANG Y M, et al. Rapid detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by asymmetric PCR combined with immunochromatography [J]. Food Science, 2021, 42(2): 312-318.
- [16] 王洪涛, 怀文辉, 茹炳根, 等. 胰岛素突变体合成中不对称PCR条件的探讨[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(3): 125-127.
- WANG H T, HUAI W H, RU B G, et al. Study on asymmetric PCR conditions for synthesis of insulin mutants [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2004, 27(3): 125-127.
- [17] 宋燧. 细菌耐药基因高通量检测方法的建立[D]. 北京: 军事科学院, 2019.
- SONG Y. Development of a high-throughput detection method for bacterial drug resistance genes [D]. Beijing: Academy of military sciences, 2019.
- [18] 景建洲, 赵培培, 王云龙, 等. 利用Agilent 2100 Bioanalyzer检测食源致病性沙门氏菌[J]. 西北农业学报, 2009, 18(3): 296-299.
- JING J Z, ZHAO P P, WANG Y L, et al. Detection of foodborne pathogenic *Salmonella* by Agilent 2100 Bioanalyzer [J]. Journal of Northwest Agricultural Sciences, 2009, 18(3): 296-299.

[上接第473页]

著作或编著:[序号] 主要责任者. 文献题名[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项(版次为第一版的不用标明). 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

举例 图书:[3] 吴阶平, 裘法祖, 黄家驹. 外科学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 82-93.

译著:[4] ZIEGLER E E, FILER L J. 现代营养学[M]. 闻之梅, 陈君石, 译. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 126-129.

著作中的析出文献:[序号] 析出文献主要责任者. 析出文献题名[文献类型标志]//原文献主要责任者. 原文献题名. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年: 析出文献起页-止页.

举例 [5] 白书农. 植物开花研究[M] // 李承森. 植物科学进展. 北京: 高等教育出版社, 1998: 146-163.

会议文献中的析出文献:[序号] 析出文献主要责任者. 析出文献题名[文献类型标志/文献载体标志]//会议文献主要责任者. 会议文献题名: 其他题名信息. 出版地: 出版者, 出版年: 析出文献起页-止页[引用日期]获取和访问路径.

举例 [6] 董家祥, 关仲英, 王兆奎, 等. 重症肝炎的综合基础治疗[C]//张定凤. 第三届全国病毒性肝炎专题学术会议论文汇编, 南宁, 1984. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 203-212.

科技报告: 著录格式同著作或编著。

举例 [7] World Health Organization. Factors regulating the immune response: report of WHO Scientific Group [R]. Geneva: WHO, 1970: 1-74.

法令、条例:[序号] 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 公布日期.

举例 [8] 中华人民共和国全国人民代表大会. 中华人民共和国著作权法[A]. 2012-03-31.

标准:[序号] 主要责任者. 标准名称: 标准编号[文献类型标志]. 出版地: 出版者, 出版年.

举例 [9] 全国文献工作标准化技术委员会第七分委员会. 科学技术期刊编排格式: GB/T 3179—1992 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1992.

电子文献:[序号] 主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志]. 出版地: 出版者, 出版年(更新或修改日期) [引用日期].

获取和访问路径.

举例 [10] 肖钰. 出版业信息迈入快道 [EB/OL]. (2001-12-19) [2002-04-15]. <http://www.creader.com/news/20011219/200112190019.html>.

专利文献:[序号] 专利申请者. 题名: 专利国别, 专利号[P]. 公告或公开日期.

3 声明

本刊已进入中国所有主要期刊数据库, 本刊所付稿酬已包含这些数据库的稿酬。编辑部对来稿将作文字性修改, 若涉及内容修改会与作者商榷。编辑部收到稿件后, 于3个月内通知处理意见。投稿6个月如未收到修稿或录用通知, 作者可自行处理稿件, 所收稿件纸质版概不退还。来稿一经采用, 即收取版面费, 按规定向作者支付稿酬, 并赠送杂志。

4 投稿

投稿请登录《中国食品卫生杂志》网站 <http://www.zgspws.com>, 并同时邮寄单位介绍信和稿件纸版1份(需第一作者、通信作者和副高以上作者签名)。来稿中应有清楚完整的作者通信地址、联系电话和E-mail地址。编辑部地址: 北京市海淀区紫竹院南路17号院3号楼102室《中国食品卫生杂志》编辑部 邮政编码: 100048 电话: 010-68707221 E-mail: spws462@163.com