

基于荧光定量 PCR 技术的当归不同炮制品中大肠埃希菌数量测定方法开发及比较研究

严维花¹, 曹虹虹¹, 郭爽¹, 成铭¹, 白德涛², 陈杰², 毛春芹¹, 李林^{1*}, 陆兔林^{1*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 甘肃中天药业有限责任公司, 甘肃 定西 743000

摘要: 目的 对当归不同炮制品中大肠埃希菌变化进行定量分析。方法 建立荧光定量 PCR 方法, 对当归不同炮制品、不同产地、不同收集企业、不同储藏时间的大肠埃希菌进行定量分析。结果 不同炮制品中大肠埃希菌数量变化为生当归>土炒当归>酒当归; 在不同产地的当归中以甘肃岷县地区所含的大肠埃希菌的数量最少; 与零售企业相比, 生产销售企业的当归和酒当归中大肠埃希菌的数量较少; 不同储藏时间对当归和酒当归中大肠埃希菌数量有一定影响, 随储藏时间的增加, 大肠埃希菌的数量也在增加。对部分代表性样品进行平板计数法与荧光定量 PCR 法比较时发现, 平板计数法结果多呈阴性, 荧光定量 PCR 结果均呈阳性。结论 所建立的荧光定量 PCR 法特异性、灵敏度、可靠性以及报告周期均优于平板计数法, 可为当归不同炮制品中大肠埃希菌的快速、准确定量检测提供有效手段。

关键词: 当归; 炮制品; 大肠埃希菌; 荧光定量 PCR 技术; 储藏时间; 平板计数法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)09-2427-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.018

Development and comparative study of determination of *Escherichia coli* in different processed products of *Angelicae Sinensis Radix* based on fluorescence quantitative PCR

YAN Wei-hua¹, CAO Hong-hong¹, GUO Shuang¹, CHENG Ming¹, BAI De-tao², CHEN Jie², MAO Chun-qin¹, LI Lin¹, LU Tu-lin¹

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Gansu Zhongtian Pharmaceutical Co., Ltd., Dingxi 743000, China

Abstract: Objective To make quantitative analysis for the quantity of *Escherichia coli* in *Angelicae Sinensis Radix* (ASR) and its processed products. **Methods** The fluorescence quantitative PCR method was established to quantitatively analyze *E. coli* in ASR from different processed products, different producing areas, different enterprises and different storage time. **Results** The number of *E. coli* in different processed products was ranked as follows: ASR > ASR stir-frying with soil > ASR stir-frying with wine. And the number of *E. coli* in the three producing areas of ASR in Min County of Gansu Province was less than that in other producing areas. Compared with the retail enterprises, the number of *E. coli* in ASR and ASR stir-frying with wine was less in production and sale enterprises. Different storage time had certain effect on the number of *E. coli* in ASR and ASR stir-frying with wine. With the increase of storage time, the number of *E. coli* also increased. Plate counting method and fluorescence quantitative PCR method were carried out at the same time for some representative samples. The results showed that the results of the plate counting method were mostly negative, and the results of the fluorescence quantitative PCR were positive. **Conclusion** The quantitative fluorescence PCR method established in this paper is superior to the plate counting method in specificity, sensitivity, reliability, and reporting cycle, which can provide an effective method for rapid and accurate quantitative detection of *E. coli* in different processed products of ASR.

收稿日期: 2019-11-15

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1701902); 国家重点研发计划 (2018YFC1707000); 第六批全国老中医药专家学术经验继承 (国中医药人教发 [2017] 29 号)

作者简介: 严维花 (1994—), 女, 在读硕士, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。E-mail: 1987171663@qq.com

*通信作者 李林, 男, 博士, 副教授, 主要从事中药炮制研究。E-mail: lilin_med@163.com

陆兔林, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。E-mail: lutuling2005@126.com

Key words: *Angelica Sinensis Radix*; processed products; *Escherichia coli*; fluorescence quantitative PCR technology; storage time; plate counting method

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 其根入药在我国已有 2 000 余年的历史, 应用非常广泛, 医家喻为“群药之首”, 病家称为“治补两益”^[1]。当归具有补血活血、调经止痛、润肠通便之功效^[2], 现代药理学研究表明, 当归还具有多种药理作用^[3-5]。2014 年中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会将当归纳入药食两用的品种目录中。基于古人对药食两用品种的 4 种主要特征认识: 安全、营养、保健和治疗作用, 其安全性尤为重要^[6]。

大肠埃希菌 *Escherichia coli* (T. Escherich 1885) 是人和动物肠道中的常居菌, 广泛传播于自然环境中。大肠埃希菌大多为条件致病菌, 只有某些血清型毒株的毒力较强, 可引起带血腹泻、腹绞痛、发烧、呕吐、膀胱炎、阑尾炎等表现, 严重危害人类健康^[7-9]。因此, 大肠埃希菌是中药制品微生物限度检查中常需要检测的控制菌。传统培养计数法中常用的大肠菌群 MPN 计数法和大肠菌群平板计数法虽是鉴定和检测大肠埃希菌的“金标准”, 但操作复杂且耗时较长, 不适合大批量中药制品的检测。

随着分子生物学的发展, PCR 技术已经广泛应用于致病菌的检测。荧光定量 PCR 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团或荧光染料, 利用反应过程中荧光信号的强弱变化来实时监测特异性产物的量, 最后通过已知拷贝数的模板建立的标准曲线对未知样品进行绝对定量分析的核酸定量技术^[10-11]。与常规 PCR 相比具有明显优越的灵敏度、特异性和操作简单的特点, 适合对大批量样品进行快速定量检测, 可准确反映样品中大肠埃希菌的携带情况。本研究利用大肠埃希菌特异性引物扩增当归中大肠埃希菌的 16S rDNA-V3 区, 以期建立 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测当归大肠埃希菌数目的方法, 为中药饮片微生物污染风险评估和微生物标准的制定提供数据支持。

1 材料

1.1 仪器与设备

FQD-48A (A4) 型荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测系统、TC-96/G/H (b) C 梯度 PCR 仪, 杭州博日科技有限公司; Allegra 21R 台式高速冷冻离心机, 美国 Beckman 公司; AR5120 电子天平,

美国 Ahoms 公司; MultiTemp III 恒温水浴锅、Hofer MV-25 紫外透射仪, 美国 Amersham Pharmacia 公司; SIM-F140AY65 雪花状制冰机, 日本 Sanyo 公司; 移液器, 德国 Eppendorf 公司; SJ-CJ-1FD 单人单面 (垂直送风) 洁净工作台, 苏州苏洁净化设备有限公司。

1.2 试剂及耗材

AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒, 美国 Axygen 公司; SoilPure 超纯土壤基因组 DNA 快速提取试剂盒、零背景 pTOPO-TA 克隆试剂盒, 北京艾德莱生物科技有限公司; SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒、Hind III, 宝生物工程 (大连) 有限公司; DL2000 DNA Plus Marker、1Kb DNA Ladder Marker, 南京诺唯赞生物技术有限公司; GeLStain, 北京全式金生物技术有限公司; 琼脂糖, 西班牙 Biowest 公司。

1.3 药物

所用当归经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 干燥根经不同炮制方法形成的饮片。其中 S1~S35 为生当归饮片, J1~J24 为酒当归饮片, T1~T17 为土炒当归饮片; S1~S8、J1~J8、T1~T8 为甘肃禾驮乡产地饮片, S9~S13、J9~J13、T9~T13 为甘肃岷县产地饮片, S14~S17、J14~J17、T14~T17 为甘肃渭源产地饮片; S1~S24、J1~J19、T1~T17 为生产销售企业饮片, 其余为不同零售企业饮片; 在生产销售企业中 S1~S17、J1~J17、T1~T17 的储藏时间较短, 为 8 个月, 其余储藏时间较长, S18~S24 储藏时间约为 15 个月, J18~J19 约为 20 个月; 具体产地和生产时间见表 1。

2 方法

2.1 当归微生物 DNA 提取

取当归样品 (粉碎过三号筛) 0.2 g, 按 SoilPure 超纯土壤基因组 DNA 快速提取试剂盒的试验步骤进行 DNA 提取。DNA 样品于 -20 °C 冰箱中保存, 待用。

2.2 引物的设计与合成

根据相应的文献报道^[12-13], 利用引物设计软件 Primer premier 5.0 设计特异性引物, 并将引物序列在 Blast 数据库中进行比对验证, 见表 2。引物委托

表 1 76 批当归的产地来源

Table 1 Origins of 76 batches of ASR

序号	批号	产地	生产时间	序号	批号	产地	生产时间	序号	批号	产地	生产时间
S1	M-1-1	甘肃禾驮乡	2018-03-09	S27	2017081702	甘肃	2017-08-17	J18	1602017	甘肃	2016-02-17
S2	M-1-2	甘肃禾驮乡	2018-03-09	S28	171201	甘肃	2017-12-11	J19	1609054	甘肃	2016-09-23
S3	M-1-3	甘肃禾驮乡	2018-03-09	S29	1706200191	甘肃	2017-06-20	J20	DBB161	甘肃	2017-12-16
S4	M-1-4	甘肃禾驮乡	2018-03-09	S30	1804002	甘肃	2018-04-01	J21	20170813	甘肃	2017-08-13
S5	M-2-1	甘肃禾驮乡	2018-03-09	S31	18010261	甘肃	2018-01-20	J22	171101	甘肃	2017-11-21
S6	M-2-2	甘肃禾驮乡	2018-03-09	S32	20171202	甘肃	2017-12-29	J23	1610260282	甘肃	2016-10-26
S7	M-2-3	甘肃禾驮乡	2018-03-09	S33	20180101	甘肃	2018-01-20	J24	201611103	甘肃	2016-11-03
S8	M-2-4	甘肃禾驮乡	2018-03-20	S34	20171002	甘肃	2017-10-26	T1	M-1-1	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S9	M-3-1	甘肃岷县	2018-03-20	S35	161201	甘肃	2016-12-14	T2	M-1-2	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S10	M-3-2	甘肃岷县	2018-03-20	J1	M-1-1	甘肃禾驮乡	2018-03-09	T3	M-1-3	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S11	M-3-3	甘肃岷县	2018-03-20	J2	M-1-2	甘肃禾驮乡	2018-03-09	T4	M-1-4	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S12	M-3-4	甘肃岷县	2018-03-20	J3	M-1-3	甘肃禾驮乡	2018-03-09	T5	M-2-1	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S13	M-3-5	甘肃岷县	2018-03-20	J4	M-1-4	甘肃禾驮乡	2018-03-09	T6	M-2-2	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S14	W-1-1	甘肃渭源	2018-03-08	J5	M-2-1	甘肃禾驮乡	2018-03-09	T7	M-2-3	甘肃禾驮乡	2018-03-09
S15	W-1-2	甘肃渭源	2018-03-08	J6	M-2-2	甘肃禾驮乡	2018-03-09	T8	M-2-4	甘肃禾驮乡	2018-03-20
S16	W-1-3	甘肃渭源	2018-03-08	J7	M-2-3	甘肃禾驮乡	2018-03-09	T9	M-3-1	甘肃岷县	2018-03-20
S17	W-1-4	甘肃渭源	2018-03-08	J8	M-2-4	甘肃禾驮乡	2018-03-20	T10	M-3-2	甘肃岷县	2018-03-20
S18	1705052	甘肃	2017-05-17	J9	M-3-1	甘肃岷县	2018-03-20	T11	M-3-3	甘肃岷县	2018-03-20
S19	1705054	甘肃	2017-05-16	J10	M-3-2	甘肃岷县	2018-03-20	T12	M-3-4	甘肃岷县	2018-03-20
S20	1709099	甘肃	2017-09-21	J11	M-3-3	甘肃岷县	2018-03-20	T13	M-3-5	甘肃岷县	2018-03-20
S21	1708021	甘肃	2017-08-20	J12	M-3-4	甘肃岷县	2018-03-20	T14	W-1-1	甘肃渭源	2018-03-08
S22	C1605016	甘肃	2016-05-16	J13	M-3-5	甘肃岷县	2018-03-20	T15	W-1-2	甘肃渭源	2018-03-08
S23	1705108	甘肃	2017-05-11	J14	W-1-1	甘肃渭源	2018-03-08	T16	W-1-3	甘肃渭源	2018-03-08
S24	1705109	甘肃	2017-05-31	J15	W-1-2	甘肃渭源	2018-03-08	T17	W-1-4	甘肃渭源	2018-03-08
S25	171002161	甘肃	2017-10-12	J16	W-1-3	甘肃渭源	2018-03-08				
S26	DC5061	甘肃	2017-05-06	J17	W-1-4	甘肃渭源	2018-03-08				

表 2 大肠埃希菌特异性引物

Table 2 Specific primers of *E. coli*

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp
ECO-F	CATGCCGCGTGTATGAAGAA	96
ECO-R	CGGGTAAACGTCAATGAGCAAA	

南京钟鼎生物技术有限公司合成。

2.3 PCR 扩增及电泳

PCR 扩增体系为 25 μL: 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL, 模板 1 μL, 引物 F (10 μmol/L) 0.5 μL, 引物 R (10 μmol/L) 0.5 μL, 10.5 μL ddH₂O。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 修复延伸 7 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳

检查, 电泳条件为 160 V 恒压 30 min。通过凝胶成像系统分析试验结果。PCR 产物用纯化试剂盒进行纯化, 测定质量浓度。具体操作按照说明书进行。纯化产物用于随后的克隆实验。

2.4 目的基因的 TA 克隆

取纯化的 PCR 产物 0.5~8 μL, Ptopo-T Vector 载体 1 μL, 10×Enhancer 1 μL, ddH₂O 至 10 μL, 轻轻混匀, 室温 (20~30 °C) 连接 5 min, 将连接产物加入 100 μL DH5α 感受态细胞中进行重组质粒的转化, 加入 500 μL 不含抗生素的 LB 培养基, 混匀, 37 °C 200 r/min 振荡 30 min, 使细菌充分表达。吸取复苏后细菌, 均匀涂布到含抗氨苄青霉素 (Amp) 的琼脂培养基上, 37 °C 倒置培养过夜, 挑取平板中阳性单菌落, PCR 检测, 并送南京钟鼎生

物技术有限公司进行测序。

2.5 荧光定量 PCR 标准曲线、反应体系

挑选阳性菌株接种到含 Amp 的 LB 培养基中, 37 °C 200 r/min 摇菌过夜。提取质粒, 通过单酶切后, 回收酶切产物。使用微量分光光度计测得标准质粒的浓度, 并计算出标准质粒原液中拷贝数浓度。对标准品进行 10 倍梯度稀释, 然后以标准品为模板进行荧光定量 PCR 反应。反应完成时, 以标准品浓度的对数为横坐标, 阈值循环数 C_t (即每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数) 为纵坐标绘制标准曲线。反应体系为 SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 10 μ L, 正向引物、反向引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L, 模板/基因组 DNA 1 μ L, ddH₂O 至 20 μ L。荧光定量 PCR 反应条件为: 扩增曲线: 94 °C 预变性 30 s; 94 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 12 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 45 次, 72 °C 单点检测信号; 熔解曲线: 72 °C 开始检测, 以 0.5 °C 为台阶温度停留 15 s 采集荧光。

2.6 大肠菌群平板计数方法

根据荧光定量 PCR 法测定结果, 分别从生当归、酒当归以及土炒当归中选择具有代表性的样品进行平板计数法检测。称取 25 g 样品, 放入盛有 225 mL 生理盐水的无菌均质杯内进行稀释操作, 所有操作需保证严格无菌, 取上清液, 即得样品匀液 (1:10)。用 1 mL 微量移液器移取样品匀液 1 mL, 沿管壁缓缓注入至含有 9 mL 生理盐水的无菌试管中, 振荡试管, 使其混合均匀, 制成 1:100 的样品匀液。按上述操作, 依次制成 10 倍递增系列稀释样品匀液。取 1:10 供试液及 3 个连续 10 倍稀释级, 分别取 1 mL 注皿, 平行制备 2 个平皿, 同时取 1 mL 生理盐水加入无菌平皿作空白对照, 在平皿中倒入 15~20 mL 冷却至 46 °C 的结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA), 小心旋转平皿, 将培养基与样液充分混匀, 防止菌落聚团生长, 无法计数。待琼脂凝固后, 再加 3~4 mL VRBA 覆盖平板表层。翻转平板, 置于 (36±1) °C 培养 18~24 h。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取与 PCR 扩增

采用设计的大肠埃希菌引物对大肠埃希菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 结果 (图 1) 显示能得到与预期片段大小相一致 (96 bp) 的 DNA 条带。

3.2 目的片段的克隆与鉴定

回收大肠埃希菌 PCR 产物、连接 Ptopo-T Vector

后转化感受态细胞, 挑取阳性单菌落, 提取重组质粒进行 PCR 鉴定, 结果与预期片段大小相一致。结果见图 2。阳性重组质粒测序结果与 GenBank 上已知菌种相应序列进行比较, 大肠埃希菌扩增片段序列与相应菌株的同源性高度一致, 说明所得标准质粒为所需要的目的质粒。

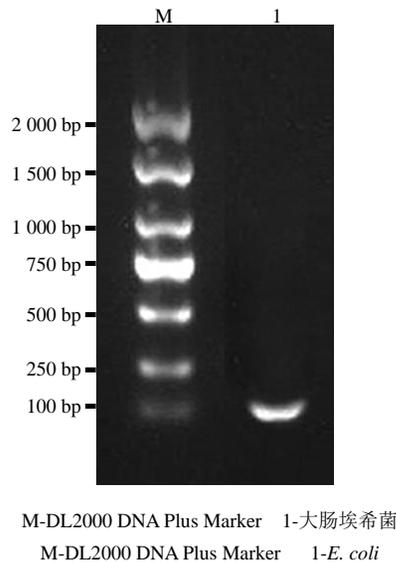


图 1 大肠埃希菌 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *E. coli*

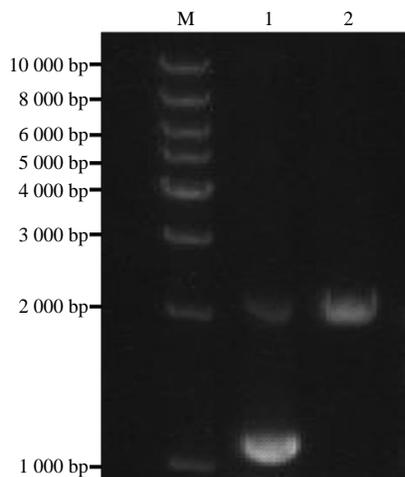


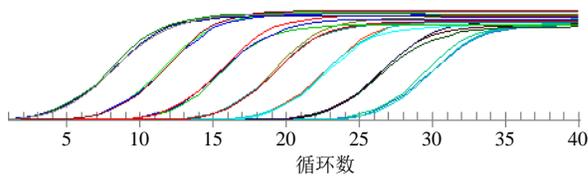
图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by restriction enzyme digestion

3.3 样品大肠埃希菌定量 PCR 的建立

以大肠埃希菌 16 S rDNA 片段重组质粒的梯度稀释度为模板, 进行实时荧光定量 PCR 扩增, 得到

大肠埃希菌的荧光定量扩增曲线(图 3)、标准曲线(图 4)以及熔解曲线(图 5)。从图 3 可见,曲线较光滑,为典型的“S”形曲线,各循环阈值间隔均匀。从图 4 看出,大肠埃希菌 16 S rDNA 片段重组质粒扩增效果较好,线性回归方程为 $Y = -3.595 7 X + 35.392$, $r^2 = 0.999 5$,表明在模板稀释范围内有很好的线性关系。从图 5 可以看出,梯度稀释样品熔解曲线呈现单一熔解峰,未出现其他杂峰,峰值出现在 81.3 °C,表明扩增反应产物特异性良好,且无引物二聚体影响;曲线平稳,说明各浓度质粒的熔解温度均一,扩增产物特异性好。



梯度稀释样品中的每个稀释度有 3 个平行,从左到右标准品浓度依次为 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 copies/ μ L

There were three parallel dilutions for each dilution in the gradient diluted samples, and the concentrations of the standard from left to right were 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 and 1×10^3 copies/ μ L in order

图 3 荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig. 3 Amplification curve of fluorescence quantitative PCR

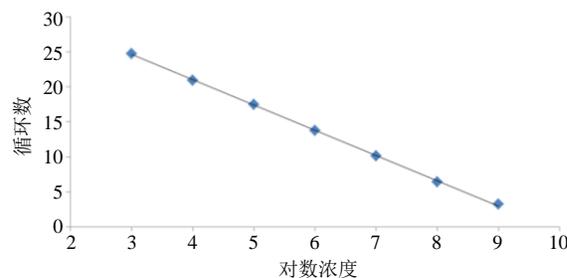
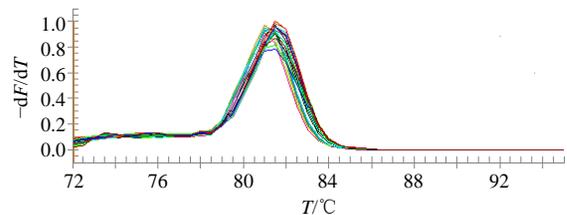


图 4 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 4 Standard curve of fluorescence quantitative PCR



梯度稀释样品的浓度为 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 copies/ μ L

The concentrations of gradient-diluted samples were 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , and 1×10^3 copies/ μ L

图 5 荧光定量 PCR 熔解曲线

Fig. 5 Melting curve of fluorescence quantitative PCR

3.4 样品中大肠埃希菌数目

本实验通过检测大肠埃希菌 16 S rDNA 基因数目来反映当归中大肠埃希菌的数目。结果显示,所有当归样品中均含有大量的 16 S rDNA 基因片段。考虑到大肠埃希菌中 16 S rDNA 基因的拷贝数为 $7^{[14]}$,实验对绝对定量获得的数据进行计算处理,结果见表 3。结果显示与生当归相比,酒当归和土炒当归中大肠埃希菌数量均有所减少,酒当归下降幅度较大。对不同产地当归中大肠埃希菌数量比较分析,发现当归不同炮制品中大肠埃希菌数量均以甘肃岷县最少。对生产销售企业以及不同零售企业的生当归和酒当归中大肠埃希菌数量进行比较分析,结果显示零售企业当归中大肠埃希菌数量多于生产销售企业的。同时对生当归和酒当归中不同储藏时间样品的大肠埃希菌数量进行考察分析,发现储藏时间短的样品,其大肠埃希菌数量相对较少。结果见图 6。

3.5 大肠菌群平板计数方法

选取菌落数在 15~150 cfu/g 的平板,计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落,大肠埃希菌典型菌落为紫红色,菌落周围有红色的胆盐沉淀环,菌落直径为 0.5 mm 或更大。以计数的平板菌落数乘以稀释倍数,即为每克样品中大肠菌群数。实验结果表明,在选定的 10 个样本中仅有生当归样本中的 S8 和 S27 号检测出大肠埃希菌,且数量很少,其余均未检测出。结果见表 4。

4 讨论

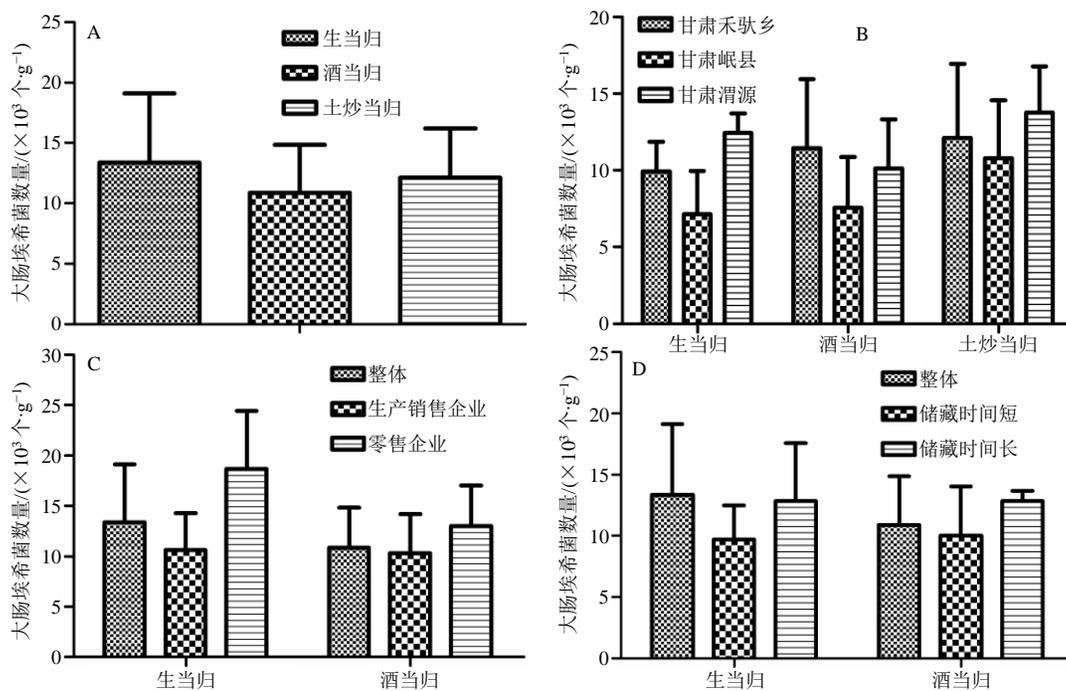
4.1 方法建立的合理性

目前,大肠埃希菌的新型检测方法有酶联免疫分析(ELISA)法^[15]、环介导等温扩增(LAMP)技术^[16]、基因芯片技术^[17]、HPLC 法^[18]等;但 ELISA 法不具备广泛性,且易受待测物质含量、免疫原性、稳定性、结构等诸多因素干扰;LAMP 法由于恒温条件无法进行多重扩增,还要选择合适的特异引物及尽量避免反应体系受污染等问题^[19];基因芯片技术和色谱测定局限性大且费用昂贵。本研究首次尝试利用荧光定量 PCR 检测体系建立当归不同炮制品大肠埃希菌的定量检测方法。由于 16 S rDNA 是细菌的高度保守序列,其可变区在不同细菌之间存在一定程度的差异,具有细菌属或种特异性;选择可变区设计 PCR 特异性引物,则可将标本中的细菌鉴定到属甚至种的水平,是细菌鉴别较为理想的靶序列^[20]。故本研究以大肠埃希菌 16 S rDNA 为切入

表 3 76 批当归样品大肠埃希菌数量 (n = 3)

Table 3 Number of *E. coli* in 76 batches of ASR sample by fluorescence quantitative PCR (n = 3)

样品	大肠埃希菌数量/ (个·g ⁻¹)						
S1	8.18×10 ³	S20	1.04×10 ⁴	J4	9.32×10 ³	J23	1.61×10 ⁴
S2	9.62×10 ³	S21	2.28×10 ⁴	J5	7.96×10 ³	J24	1.15×10 ⁴
S3	1.07×10 ⁴	S22	1.21×10 ⁴	J6	1.50×10 ⁴	T1	7.17×10 ³
S4	7.82×10 ³	S23	1.25×10 ⁴	J7	2.09×10 ⁴	T2	2.08×10 ⁴
S5	8.04×10 ³	S24	1.32×10 ⁴	J8	1.11×10 ⁴	T3	1.00×10 ⁴
S6	1.16×10 ⁴	S25	1.08×10 ⁴	J9	5.81×10 ³	T4	6.81×10 ³
S7	1.01×10 ⁴	S26	2.07×10 ⁴	J10	5.14×10 ³	T5	9.70×10 ³
S8	1.34×10 ⁴	S27	1.90×10 ⁴	J11	7.26×10 ³	T6	1.32×10 ⁴
S9	4.38×10 ³	S28	1.69×10 ⁴	J12	1.33×10 ⁴	T7	1.68×10 ⁴
S10	4.05×10 ³	S29	1.68×10 ⁴	J13	6.25×10 ³	T8	1.26×10 ⁴
S11	8.55×10 ³	S30	1.76×10 ⁴	J14	8.18×10 ³	T9	1.38×10 ⁴
S12	8.18×10 ³	S31	1.66×10 ⁴	J15	8.41×10 ³	T10	5.25×10 ³
S13	1.05×10 ⁴	S32	2.54×10 ⁴	J16	9.14×10 ³	T11	8.43×10 ³
S14	1.31×10 ⁴	S33	1.72×10 ⁴	J17	1.49×10 ⁴	T12	1.32×10 ⁴
S15	1.15×10 ⁴	S34	2.66×10 ⁴	J18	1.23×10 ⁴	T13	1.32×10 ⁴
S16	1.13×10 ⁴	S35	2.57×10 ⁴	J19	1.34×10 ⁴	T14	1.77×10 ⁴
S17	1.39×10 ⁴	J1	7.26×10 ³	J20	1.03×10 ⁴	T15	1.29×10 ⁴
S18	1.09×10 ⁴	J2	9.74×10 ³	J21	1.82×10 ⁴	T16	1.05×10 ⁴
S19	8.04×10 ³	J3	1.04×10 ⁴	J22	8.66×10 ³	T17	1.40×10 ⁴



A-不同炮制品 B-不同产地 C-不同收集企业 D-不同储藏时间

A-different processed products B-different producing areas C-different collection enterprises D-different storage time

图 6 当归样品大肠埃希菌荧光定量 PCR 结果分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Analysis of fluorescence quantitative PCR results of *E. coli* from ASR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 4 10 批当归样品大肠埃希菌数量

Table 4 Number of *E. coli* in 10 batches of ASR samples by plate counting method

样品	大肠埃希菌/(cfu·g ⁻¹)	样品	大肠埃希菌/(cfu·g ⁻¹)
S8	100	J14	0
S10	0	J17	0
S21	0	J23	0
S27	250	T3	0
S32	0	T12	0

点, 将 PCR 产物克隆至 Ptopo-T Vector 载体上, 抽提质粒梯度稀释制备标准品。大肠埃希菌的标准曲线线性回归方程为 $Y = -3.5957X + 35.392$, $r^2 = 0.9995$; 重组质粒 PCR 鉴定和测序分析, 克隆序列与原标准菌株已知序列同源性高度一致, 证实标准品构建成功^[21]。熔解曲线是用来验证以 SYBR Green I 为荧光染料的定量 PCR 扩增的特异性, 利用 SYBR Green I 指示双链 DNA 熔点的性质来分析产物的均一性, 有助于更准确地分析 PCR 定量结果。根据前期实验结果, 在采集荧光前设定一个临界温度 81.3 °C, 使引物处于单链状态, 扩增产物仍为双链结构, 避免引物二聚体对产物荧光值的干扰从而使定量更为准确。

4.2 当归不同炮制品中大肠埃希菌数量分析结果

当归不同炮制品中大肠埃希菌数量存在差异, 酒炙和土炒均能减少大肠埃希菌的数量, 推测其原因是该菌对热抵抗力较弱, 经 55 °C 加热 60 min 或 60 °C 加热 15 min 即可杀灭大部分菌^[22], 且炮制用辅料灶心土在储藏、运输等过程中也有可能被大肠埃希菌污染, 从而在土炒过程中进一步污染当归样品, 因此酒当归大肠埃希菌数量下降程度高于土炒当归。由此可联想到当归饮片在服用前经过煎煮或者冲泡, 一方面可利于有效成分的溶出, 另一方面通过加热的方式可对大肠埃希菌等致病菌有明显的杀灭作用。

4.3 不同产地不同炮制品中大肠埃希菌数量分析结果

全国 95% 以上村庄都没有排水渠道及污水处理系统, 农村地区污水多数以直排的形式入河或者排入坑塘自然下渗, 从而造成河流、土壤及地下水污染^[23], 同时由于我国水资源的紧缺, 大面积的实施污水回灌利用^[24]。在这种情况下, 微生物可以通过地表和土壤进行迁移, 继而污染地表水、土壤和地

下水。大肠埃希菌在土壤中存活能力很强, Hagedorn 等^[25]通过现场试验发现大肠埃希菌可以在土壤中存活 32 d 以上。在本实验中, 当归不同炮制品中大肠埃希菌数量以甘肃岷县最少, 说明在一定程度上甘肃岷县土壤微生物污染程度较小。

4.4 不同收集企业不同炮制品中大肠埃希菌数量分析结果

与不同零售企业相比, 生产销售企业可以在当归药材的种植、采收加工、炮制、运输和储藏等各方面对大肠埃希菌的数目进行控制, 而零售企业在运输存储等过程中容易携带或引入大肠埃希菌, 因此生产销售企业生当归和酒当归中大肠埃希菌的数量与零售企业相比较少。

4.5 不同储藏时间不同炮制品中大肠埃希菌数量分析结果

大肠埃希菌自身生长繁殖速度很快, 在营养丰富的培养基中繁殖一代不到 20 min^[26], 因此, 随着储藏时间的增长, 样品中的大肠埃希菌经过繁殖生长, 其数量也会增加, 表明当归饮片从生产到消费之间时间间隔越久, 受到的污染情况就会越严重。同时现代研究表明当归多糖有活血、调节免疫等显著的生理活性, 是当归补血活血的药理成分之一, 在药材和饮片质量研究中常会将其作为质量控制的指标^[26-27], 而大肠埃希菌能够迅速分解多种糖类, 如葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖等, 并能产酸产气^[28]; 也就是说当归中大肠埃希菌数量越多, 对当归中多糖含量影响就越大, 从而造成当归质量的降低与有效期的缩短。这也提示包括当归饮片在内的中药饮片应明确规定使用年限。

4.6 荧光定量 PCR 法与平板计数法测定大肠埃希菌数量的差异

本研究比较了荧光定量 PCR 法与传统的平板计数法, 结果显示荧光定量 PCR 结果均呈阳性, 而平板计数法结果多呈阴性, 且数量级较荧光定量 PCR 法低 2~3 个数量级, 这与 Castillo 等^[29]的研究结果一致。造成这种差别的原因可能有以下几点: 一是当归样品中大肠埃希菌处于活的非可培养状态 (VBNC) 或样品中有活力的大肠埃希菌太少以至于培养方法不能分离得到; 二是当归样品中可能存在一些灭活菌; 三是当归饮片形状各异, 可能难溶于水, 在平板计数法中不易制成均匀的供试液, 造成取样的不均匀性^[30]; 四是当归醇提取物和水提物、总黄酮醇提液以及当归的有效成分阿魏酸对大肠埃

希菌有一定的抑菌作用^[31-35], 在培养过程中也会杀灭部分大肠埃希菌。与传统的平板计数法相比, 荧光定量 PCR 法不仅灵敏度高, 检测周期短, 操作简单, 还可有效规避部分病原微生物高度变异而出现的大肠埃希菌假阳性结果, 提高准确性; 此外当归中的 VBNC 菌虽失去生长繁殖能力, 但仍旧处于存活状态, 保留原菌的毒力和致病性, 对当归安全构成潜在的威胁^[36], 荧光定量 PCR 对这种细菌的检测能力则可反映当归大肠埃希菌的携带能力。另一方面, 当归经过杀菌虽会残存大量的灭活菌而被荧光定量 PCR 检测出, 但当死活菌比例低于 10^3 时, 样品中的死菌不会影响定量结果^[37], 故本研究在一定程度上可反映当归大肠埃希菌的携带情况。

本实验通过荧光定量 PCR 技术对当归中大肠埃希菌的数目进行定量分析, 实验结果显示不同炮制方法、不同产地、不同收集企业以及不同储藏时间对大肠埃希菌的数量均有一定的影响, 阐述了炮制、产地、包装、储存、运输的重要性; 为当归饮片微生物污染风险评估提供一定数据支持。但本实验中也存在一些不足之处, 其当归样品中大肠埃希菌死菌及其基因组 DNA 的干扰并未扣除, 后续实验将采取叠氮溴化丙锭抑制样品中死菌基因组 DNA PCR 扩增的方式或其他样品前处理的方式从而避免假阳性的结果, 更加准确反映样品中大肠埃希菌的携带情况。

参考文献

- [1] 张建强. 药食同源——岷县当归产业发展的新突破点 [J]. 甘肃高师学报, 2019, 24(2): 125-127.
- [2] 严维花, 曹虹虹, 郭爽, 等. 当归不同炮制品的 UPLC 指纹图谱与多成分含量测定研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2499-2510.
- [3] 王磊, 许小敏, 卢志伟, 等. 当归多糖防护 X 线辐射对大鼠肝脏损伤的研究 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4284-4288.
- [4] Xu R, Xu J, Li Y C, et al. Integrated chemical and transcriptomic analyses unveils synthetic characteristics of different medicinal root parts of *Angelica sinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2020, 12(1): 19-28.
- [5] 闫孟琳, 丁国钰, 丛龙飞, 等. 基于质量标志物的当归血管舒张功效的近红外快速评价 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4538-4546.
- [6] 国家食品药品监督管理局药品认证管理中心. 药品 GMP 指南无菌药品 [M]. 第 2 版. 北京: 北京医药科技出版社, 2011.
- [7] 朱健铭, 翁幸璧, 姜如金, 等. 黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌的转录组影响分析 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1791-1801.
- [8] 夏爱萍, 龚鸿萍, 郑睿行. 微生物对食品安全的危害及其快速检测技术 [J]. 生命科学仪器, 2012, 10(5): 8-12.
- [9] 苏琪, 张萍珍, 唐焯. 大肠杆菌检测方法的研究 [J]. 中小企业管理与科技: 上旬刊, 2014(2): 318-319.
- [10] 郭佳佳, 王立元, 翁美芝, 等. 半夏曲中 4 种优势微生物的荧光定量 PCR 方法的建立 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5130-5135.
- [11] 许明, 伊恒杰, 赵帅, 等. 显齿蛇葡萄实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选与验证 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1192-1198.
- [12] 杜芬芬, 孙晓泽, 刘爱华. 升降散对 DM 大鼠双歧杆菌、大肠杆菌及 IL-6 的影响 [J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(8): 35-38.
- [13] 李江凌, 陈晓晖, 刘锐, 等. 藏猪、长白猪肠道微生物菌群的定量分析及比较研究 [J]. 中国猪业, 2016, 11(3): 61-64.
- [14] Kiss A, Sain B, Venetianer P. The number of rRNA genes in *Escherichia coli* [J]. *FEBS Lett*, 1977, 79(1): 0-79.
- [15] 范治国, 庄惠生, 王倩煜. 医药废水中大肠杆菌抗体制备及检测方法 [J]. 净水技术, 2011, 30(2): 68-71.
- [16] 谷晓红, 谭晴晴, 刘艳艳, 等. 利用环介导等温扩增技术快速检测饮用水中的大肠杆菌 [J]. 山东农业科学, 2017, 49(1): 130-135.
- [17] 饶宝, 唐桂芬, 刘玲玲, 等. 沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的基因芯片检测技术研究 [J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2012, 32(3): 3-5+23.
- [18] 徐君怡, 曹际娟, 郑秋月, 等. 变性高效液相色谱检测食品中致泻性大肠杆菌 [J]. 微生物学报, 2008(11): 1526-1531.
- [19] 董妍, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 食源性大肠杆菌快速检测技术研究进展 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(5): 384-387.
- [20] Sontakke S, Cadenas M B, Maggi R G, et al. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology [J]. *J Microbiol Meth*, 2009, 76(3): 217-225.
- [21] 尹传宝, 陈俊, 朱琦, 等. 大肠杆菌与葡萄球菌实时定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 贵州农业科学, 2010, 38(10): 135-138.
- [22] 赵丽青, 王树峰, 雷质文, 等. 动物源性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. 中国动物检疫, 2008, 25(8): 43-44.
- [23] 谭林立, 许航, 韩晓月. 农村污水处理运营管理模式探讨 [J]. 山东工业技术, 2017, (4): 7-8.
- [24] 黄玉珠, 万红友. 污水土地处理技术的优势及其应用前景 [J]. 环境科学导刊, 2008 (6): 71-75.
- [25] Hagedorn C, Hansen D T, Simonson G H. Survival and

- movement of fecal indicator bacteria in soil under conditions of saturated Flow1 [J]. *J Environ Qual*, 1978, 7(1): 55.
- [26] 聂瑞杰, 王英姿, 孙振阳, 等. 当归饮片生产加工工艺标准化的初步研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(23): 4503-4509.
- [27] Tian S, Hao C, Xu G, *et al.* Optimization conditions for extracting polysaccharide from *Angelica sinensis* and its antioxidant activities [J]. *J Food Drug Anal*, 2017, 25(4): 766.
- [28] 程欲晓. 大肠杆菌快速检测的电化学传感技术及仪器研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2009.
- [29] Castillo M, Susana M, Martín-Orúe, *et al.* Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 114(1/2): 165-170.
- [30] 刘 鹏, 许华玉, 特玉香, 等. 中药饮片微生物限度的考察与思考 [J]. *中国中药杂志*, 2002, 27(8): 71-72.
- [31] 王亚萍, 陈 锴, 李宝莉, 等. 中药体外抑制大肠杆菌实验研究 [J]. *中医学报*, 2017, 32(4): 606-609.
- [32] 李谷才, 魏文亭, 高堂杰, 等. 当归总黄酮提取及其体外抑菌活性研究 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(2): 310-311.
- [33] 何粉霞. 小麦麸皮中阿魏酸的提取、结构修饰及生物活性的研究 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2011.
- [34] 阿来·海拉希, 德丽达·木拉提别克, 迪丽努尔·马力克. 阿魏中阿魏酸的提取方法及抑菌作用研究 [J]. *当代化工*, 2017, 46(12): 2454-2459.
- [35] 赵利利, 李志田, 李彬彬, 等. 阿魏酸对大肠杆菌和蜡状芽孢杆菌产组胺的影响 [J]. *食品工业科技*, 2018, 39(8): 113-118.
- [36] 李聪聪, 余以刚, 邱 杨, 等. PMA-qPCR 方法快速检测活性 *E. coli* O157: H7 [J]. *食品科学*, 2012, 33(22): 217-220.
- [37] Løvdal T, Hovda M B, Björkblom B, *et al.* Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua* [J]. *J Microbiol Meth*, 2011, 85(2): 164-169.