

陳宏銘、朱巧君、陳宗鴻、周玉鳳、李盈霖、陳怡  
臺南市政府衛生局

大腸桿菌是人類和其他溫血動物腸道中的正常菌種，所以食品一旦出現大腸桿菌，即意味著食品直接或間接的被糞便污染，故在衛生學上，常被用做飲水、食品的衛生檢定指標。本研究欲瞭解臺南地區之食品衛生指標菌檢測結果為大腸桿菌陽性菌株之基因型別情況，針對臺南地區抽驗之食品檢體以衛生福利部食品藥物管理署公告方法進行大腸桿菌檢驗，並將大腸桿菌陽性檢體之分離菌株，進一步利用RAPD (Random amplified polymorphism detection)方法進行基因分型研究。本次共分離收集20株大腸桿菌菌株，分別來自5個食品中專檢體及15個食品抽驗檢體，20菌株共可歸納出8種基因型別。從此研究結果可發現食品中所污染之大腸桿菌，其所帶之基因型別皆有不同之現象，未來如可收集到更多陽性菌株進行基因分型，更能進一步確認污染食品之大腸桿菌，其主要之基因型別與污染源追溯。

## 一、前言

大腸桿菌(*Escherichia coli*, 簡稱*E. coli*)為革蘭氏陰性、兼性厭氧桿菌，通常可在溫血動物的下腸道發現它的蹤跡<sup>1</sup>。一般而言，大多數大腸桿菌菌株是無害的，但是某些血清型，如O157:H7若污染食物而被食入，可能會導致宿主嚴重的食物中毒<sup>2</sup>。無害菌株是腸道正常菌群的一部分，可以藉由製造維生素B12及K2使其宿主受益<sup>3</sup>，並防止具有共生關係的病原菌在腸道定植。而大腸桿菌的致病主要是由於糞便口途徑所導致的，因為它們可以在體外存活一段有限的時間，這使得它們成為檢測環境樣品中糞便污染的指標性微生物<sup>4,5</sup>。

RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)是一種PCR反應，但擴增的DNA片段是隨機的。它是由Williams於1990年開發，也稱為AP-PCR (Arbitrary Primed PCR)<sup>6</sup>。它已被廣泛運用於構建各種物種的遺傳圖譜，也適用於遺傳變異研究、物種與生物發育關係等。RAPD的測定原理是以長度約10bp的核苷酸做為隨機引子，其G + C含量則在30%至70%之間，而隨機引子可以與DNA模板序列中產生兩個或更多個互補位點配對，然因為隨機引子長度較短，所以在進行PCR(Polymerase Chain Reaction)的黏合溫度不同下，DNA模板上會有一個位點以上進行放大(amplification)，結果產生不同大小和序列的多個片段，這些片段可藉由電泳分析後，所產生不同的條帶型(band pattern)，以檢測DNA多型性(DNA Polymorphism)。而Williams等人已經證明這組隨機引子可適用於各種生物體的基因組DNA，而且大多數RAPD標記在遺傳上有遵循孟德爾原理<sup>7</sup>。

由於RAPD可應用於物種分析，因此，本篇研究將利用RAPD，對於衛生福利部食品藥物管理署所公告之食品微生物之檢驗方法-大腸桿菌之檢驗<sup>8</sup>及病原性大腸桿菌之檢驗所檢測出的大腸桿菌菌株及非病原性大腸桿菌菌株進行分析。

## 二、材料與方法

### 1. 菌株來源

來自年度食品抽驗檢體依食品微生物之檢驗方法-大腸桿菌之檢驗所檢測出的大腸桿菌陽性菌株共15株及食物中毒案件之抽驗檢體依食品微生物之檢驗方法-病原性大腸桿菌之檢驗所檢測出非病原性大腸桿菌菌株共5株(如表一)。

表一、檢體類別及件數

類別	檢體種類	件數	總件數
年度抽驗	冰品	2	15
	一般食品	13	
食物中毒案件	熟食	4	5
	海鮮類	1	

### 2. DNA萃取

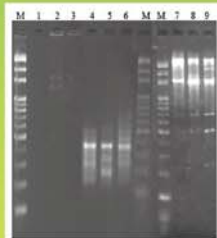
採用市售核酸萃取試劑進行DNA萃取。

### 3. PCR (Polymerase Chain Reaction)

本研究採用Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler，參照文獻找到三組隨機引子(如表二)，依文獻所提供的反應條件及配製方式進行PCR，反應結果如圖一，最後決定以第三組隨機引子進行本研究分析。

表二、本實驗所挑選之隨機引子

隨機引子	參考文獻
1. 5'-CCGCAGCCAA-3'	Aslam M., Nattress F., et al. (2003) <sup>11</sup>
2. 5'-AAG AGC CCG-3'	Salehi T.Z., Madani S. A., et al. (2008) <sup>12</sup>
3. 5'-TGCCGAGCTG-3'	Abou-dobara M. I., et al. (2010) <sup>13</sup>



圖一、依文獻提供之隨機引子及反應條件進行PCR結果。  
M: 100bp DNA Ladder Marker, Lane 1至3: 第一組隨機引子之反應結果, Lane 4至6: 第二組隨機引子之反應結果, Lane 7至9: 第三組隨機引子之反應結果。

Template (20ng/uL)	1 uL
Primer (25pmol/uL)	5 uL
10X Buffer	2.5 uL
dNTP	2 uL
Taq Polymerase	1 uL
H <sub>2</sub> O	13.5 uL
Total	25.0 uL

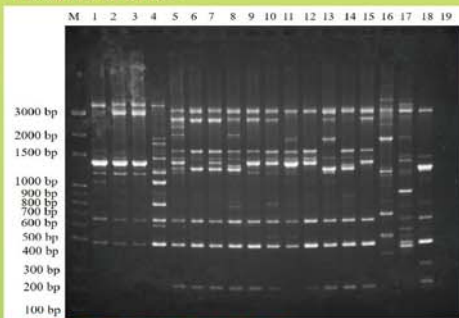
  

Denature	94°C	5 cycles
Annealing	64°C	
Extension	72°C	
45 cycles		
Extention	72°C	

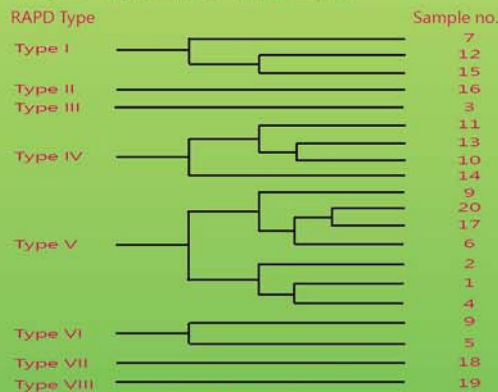
## 三、結果與討論

從實驗結果發現，本研究中20個大腸桿菌菌株經RAPD分析後(因電泳膠尺寸關係，含DNA marker及negative control，只能跑18個菌株DNA，另外兩個菌株DNA電泳圖在此則未放)，主要可分為8型(如圖二、圖三)，在年度抽驗檢體部份

分類屬第I、II、IV、V、VI、VII、VIII型(冰品則為第I、V型)，食物中毒案件屬第III、IV、V型(海鮮類則為第III型)(如表三)。因本次研究所能利用之大腸桿菌菌株數不夠多，以致無法進一步確認RAPD分類結果與檢體類別之關聯性，為利RAPD檢測結果能作為未來實際應用，本實驗室將持續收集更多大腸桿菌檢出菌株，並在預算許可條件下，搭配其它分類方法如PFGE、MLST<sup>14</sup>等進行研究，或許能將食品中所檢出的大腸桿菌菌株進行詳細分類，並嘗試探討食源菌和人體病原菌之關係。



圖二、18個大腸桿菌菌株PCR產物電泳圖。  
M:100bp DNA Ladder Marker, Lane 19:Negative control, Lane 1至3為第I型, Lane 4為第II型, Lane 5為第III型, Lane 6至8及Lane 14為第IV型, Lane 9至12及Lane 15為第V型, Lane 13及Lane 18為第VI型, Lane 16為第VII型, Lane 17為第VIII型。



圖三、樹狀圖-檢體編號所屬之RAPD型別。

表三、檢體類別及件數

類別	檢體種類	件數	RAPD分型
年度抽驗	冰品	2	I, V
	一般食品	13	I, II, IV, V, VI, VII, VIII
食物中毒案件	熟食	4	IV, V
	海鮮類	1	III

## 四、參考文獻

- Tenailon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2010. Vol.8 (3) p207-217.
- Vogt R. L., Dippold L. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June-July 2002. *Public Health Reports*. 2005. Vol.120 (2) p174-8.
- Bentley R., Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological Reviews*. 1982. Vol.46 (3) p241-80.
- Hudault S., Guignot J., Servin A. L. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut*. 2001. Vol.49 (1) p47-55.
- Reid G., Howard J., Gan B. S. Can bacterial interference prevent infection?. *Trends in Microbiology*. 2001. Vol.9 (9) p.424-428.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. 1990. Vol.18(22) p6531-6535.
- Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with Arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*. 1990. vol.18 p7213-7218.
- Qiui J. J. and Li Y. P. Random amplified polymorphic DNA analysis of eel genome. *Cell Research*. 1999. vol.9 p217-223.
- 衛生福利部食品藥物管理署 食品微生物之檢驗方法-大腸桿菌之檢驗(Methods of Test for Food Microorganisms - Test of *Escherichia coli*) 102 年 12 月 20 日 部授食字第 1021951163 號公告修正。
- 衛生福利部食品藥物管理署 食品微生物之檢驗方法-病原性大腸桿菌之檢驗(Methods of Test for Food Microorganisms - Test of Pathogenic *Escherichia coli*) 103 年 12 月 10 日 部授食字第 1031901801 號公告修正。