

• 论 著 •

# 多重 PCR 快速检测 3 种致泻性大肠埃希菌方法的建立

姚 栋, 张如胜, 欧新华

(长沙市疾病预防控制中心微生物所, 湖南长沙 410001)

**摘要:**目的 利用多重聚合酶链反应(PCR)技术, 建立一种可以同时快速检测肠致病性大肠埃希菌(EPEC)、肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC)、肠出血性大肠埃希菌(EHEC)3 种致泻性大肠埃希菌的多重 PCR 方法。方法 根据 EPEC 的 eae 基因、EIEC 的 ipaH 基因、EHEC 的 stx1 基因筛选设计引物, 建立多重 PCR 检测体系, 并对 PCR 反应体系和条件进行优化。结果 设计的 3 对 PCR 引物均能特异地扩增出相应的目的基因, 该多重 PCR 体系能同时检测 3 种目的菌, 特异度强。结论 初步建立了一种能够同时快速检测 3 种致泻性大肠埃希菌的多重 PCR 检测方法, 可用于食品安全及食物中毒事件的快速筛查。

**关键词:**致泻性大肠埃希菌; 多重聚合酶链反应; 快速检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.08.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)08-1032-02

## Study of a multiplex PCR method for the detection of three Diarrheagenic Escherichia coli

Yao Dong, Zhang Rusheng, Ou Xinhua

(Department of Microbiology, Changsha Centre for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410001, China)

**Abstract: Objective** To establish a multiplex polymerase chain reaction(PCR) method for rapid detection of three kinds of diarrheagenic Escherichia coli(EPEC, EIEC, EHEC) simultaneously. **Methods** The eae gene of EPEC, ipaH gene of EIEC and stx1 gene of EHEC were selected to design primers; the reaction system and condition were adjusted to optimize the multiplex PCR system. **Results** The target gene fragments were amplified correctly with these primers. The three target bacteria could be detected at the same time by multiplex PCR. **Conclusion** A rapid multiplex PCR system were successfully established for detection of three diarrheagenic Escherichia coli, and this system could be suitable for rapid screening in food safety.

**Key words:** diarrheagenic Escherichia coli; multiplex polymerase chain reaction; rapid detection

感染性腹泻为一组广泛存在并流行于世界各地的胃肠道传染病,也是当今全球性的重要的公共卫生问题之一。致泻性大肠埃希菌(DEC)是引起腹泻的常见病原菌之一,全球范围均可见,给发展中国家带来重大的公共卫生负担<sup>[1]</sup>。DEC 主要包括肠致病性大肠埃希菌(EPEC)、肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC)、肠出血性大肠埃希菌(EHEC)等 6 类<sup>[2]</sup>。如何快速准确地鉴别 DEC 是一直存在的难题。传统的选择性分离培养、生化鉴定和血清分型可以初步鉴定 DEC,但常规培养费时、费力,且近几年由于临床治疗对细菌的损伤和耐药的出现,导致其血清和生化分型不明显,另外由于其血清型分型众多和交叉凝集现象,也存在漏检和假阳性的结果<sup>[3]</sup>。随着分子生物学的发展,聚合酶链反应(PCR)方法因其特异度强、灵敏度高、简便快速的特点被广泛应用于致病菌的检测,本研究针对 EPEC、EIEC、EHEC 的 3 个毒力基因设计特异度引物,以建立一种可以同时快速、准确地检测这 3 类 DEC 的多重 PCR 方法。

### 1 材料与与方法

**1.1 菌株及来源** 本实验所用菌株均来自本实验室分离保存及自购标准菌株,其中 EIEC 菌株 2 株、EPEC 菌株 6 株、EHEC 菌株 1 株;金黄色葡萄球菌标准菌株(CMCC-26003-25)、英诺克李斯特菌(GIM1.230)、单核细胞增生李斯特菌(CMCC-54002)、大肠杆菌、痢疾志贺菌(CMCC-51252)、奇异变形杆菌(CMCC-49005)、铜绿假单胞菌、福氏志贺菌(CMCC-51572)、猪沙门菌、鼠伤寒沙门菌(CMCC-50115)、副溶血性弧菌、蜡样芽孢杆菌。

**1.2 仪器与试剂** PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司),DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪表厂),凝胶成像系统仪(美国 Bio-Rad

公司)。通用型核酸提取试剂盒购自广州华银生物有限公司,分子生物学试剂购自 TAKARA 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 菌株复苏与核酸提取** 所用菌株均在营养肉汤内经 37℃ 复苏 18 h 后提取核酸。采用广州华银通用型核酸提取试剂盒提取细菌 DNA,具体操作方法参照试剂盒说明书进行。

**1.3.2 引物设计与合成** 选择 eae 基因作为 EPEC 检测的靶基因,ipaH 基因作为 EIEC 的靶基因,stx1 基因作为 EHEC 的靶基因,BLAST 比对后选择相对保守区域设计合成引物,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列表

基因名称	引物序列	目的片段 (bp)
eae-F	5'-CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC-3'	881
eae-R	5'-CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G-3'	
ipaH-F	5'-GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C-3'	280
ipaH-R	5'-GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC-3'	
stx1-F	5'-CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG-3'	348
stx1-R	5'-CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG-3'	

**1.3.3 单重 PCR 扩增** 为验证所设计的各条引物,分别以 EPEC、EIEC、EHEC 菌株 DNA 为模板,PCR 扩增 eae、ipaH、stx1 目的基因。PCR 扩增反应体系:总体积 25 μL,含 2 μL 的 DNA 模板、2.5 μL 的 10×PCR 缓冲液、2 mmol/L 的氯化镁(MgCl<sub>2</sub>)、50 nmol/L 引物、0.2 mmol/L 的三磷酸脱氧核糖核

苷(dNTP)、2 U 的 Taq DNA 聚合酶。反应条件:95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 60 s,55 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 60 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,并测序验证扩增产物的正确性。

**1.3.4 引物特异性检测** 选取金黄色葡萄球菌标准株、大肠杆菌、英诺克李斯特菌、单核细胞增生李斯特菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、福氏志贺菌、鼠伤寒沙门菌、副溶血性弧菌、蜡芽孢杆菌等常见腹泻病原菌增菌后提取 DNA 作为模板进行引物特异性 PCR 扩增,反应体系及条件同前,以验证引物的特异性。

**1.3.5 多重 PCR 条件优化** 根据文献[4]报道的多重 PCR 方法进行优化,各引物以 1:1:1 的方式混合,采用 50 μL 扩增体系,含 5 μL 的 DNA 模板、5 μL 的 10×PCR 缓冲液、5 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub>、100 nmol/L 引物(每条)、0.5 mmol/L 的 dNTP,5 U 的 Taq DNA 聚合酶。反应条件:95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 60 s,52 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 60 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。同时使用其他参照菌株验证其特异性。

**2 结果**

**2.1 单重 PCR 结果及引物特异性检测** 分别以 3 种 DEC 阳性菌株为模板扩增目的基因,均能得到特异的扩增条带,产物大小与理论相符,测序结果与目的基因一致(见图 1),说明这 3 对引物能正确扩增各目的片段。为检测引物的特异性,分别以其他菌株 DNA 为模板进行扩增,结果均为阴性(见图 1),说明扩增具有很好的特异性。



M 为 DNA 分子量标准品;1 为金黄色葡萄球菌;2 为 EIEC;3 为蜡芽孢杆菌;4 为 EHEC;5 为大肠杆菌;6 为福氏志贺菌;7 为鼠伤寒沙门菌;8 为单核细胞增生李斯特菌;9 为副溶血性弧菌;10 为铜绿假单胞菌;11 为奇异变形杆菌;12 为英诺克李斯特菌;13 为 EPEC。

**图 1 单重 PCR 检测结果**



M 为 DNA 分子量标准品;5、6、9、10、37、38 为 EPEC;18、21 为 EIEC;22 为 EHEC;1~4、7、8、11~17、19、20、23~36、39、40 为其他肠道致病菌。

**图 2 3 种 DEC 多重 PCR 扩增结果**

**2.2 多重 PCR 结果及特异性验证** 将各引物按 1:1:1 混合、PCR 扩增条件优化后,分别以上述阳性菌株和其他参照菌株 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增,结果见图 2。所有阳性菌株均扩增出相应大小的目的片段,结果与单重 PCR 一致;而其他参照菌株结果均为阴性。

**3 讨论**

DEC 是引起腹泻的重要病原菌之一,在国内外腹泻患者中的检出率都很高,然而因其血清型很多,给临床诊断带来不便[5]。近几年,PCR 以其特异性及灵敏度高、省时、省力等优点被广泛应用于微生物的检测和鉴定等领域;在此基础上发展的多重 PCR 因可以同时检测多种目的基因而成为研究的一个热点[6]。多重 PCR 检测方法的灵敏度和特异性高低主要取决于相应检测靶位点的选择和特异性引物的设计。虽然对各型 DEC 多重 PCR 的研究很多,但目前尚无公认的灵敏、特异的 DEC 多重 PCR 检测试剂盒[7]。

参考国内外相关文献报道,本研究选择 EPEC 菌株引起组织细胞病理损伤的 eae 基因,EHEC 菌株分泌志贺毒素的 stx1 基因,EIEC 菌株产毒素的 ipaH 基因作为引物设计的靶基因,利用 GenBank 公用数据库进行致病菌相关序列和引物的 BLAST 比对和筛选,选择其相对保守区域设计了 3 对特异性引物,单重 PCR 验证所设计的引物扩增效率高、特异性强,其他肠道菌均无非特异性扩增。而多重 PCR 由于需要在同一个反应体系中加入 2 对或以上的引物,容易出现引物之间的结合、互补及相互竞争等,导致多重 PCR 反应体系和条件的建立更复杂。在本研究建立的 3 重 PCR 反应体系中,3 对引物以 1:1:1 的方式混合,将反应体系中 Mg<sup>2+</sup> 浓度提高为 5 mmol/L,退火温度稍降低为 52 °C 后,获得了较好的实验效果,通过一次 PCR 反应即可检测 3 种目标病原菌的基因片段,具有高通量的优点,提高了检测效率,且特异性强。

综上所述,该方法省时、省力,所需仪器设备简单,特别适合基层实验室使用,在疾病控制相关实验室和临床中具有较高的实际应用价值。

**参考文献**

- [1] Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli[J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(1):142-201.
- [2] 周萍. 细菌感染性腹泻研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2006, 7(4):359-361.
- [3] 金玉娟, 刘渠, 陈应坚, 等. 四种致泻性大肠埃希菌实验室检测研究进展[J]. 中国热带医学, 2011, 11(1):116-118.
- [4] Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, et al. Multiplex PCR: critical parameters and step by step protocol[J]. Biotechniques, 1997, 23(3):504-511.
- [5] 黄芳, 邓瑛, 曲梅, 等. 2010 年北京市感染性腹泻病原学检测分析[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(9):820-824.
- [6] Fratamico PM, Bhunia AK, Smith JL. Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology[M]. Norwich: Caister Academic Press, 2005:395-4101.
- [7] 王文娟, 赵宏坤. 大肠埃希 O157: H7 等致病菌多重 PCR 法快速检测试剂盒的研制[J]. 中国食品学报, 2011, 11(3):144-151.

(收稿日期:2015-01-03)