

# 猪大肠埃希菌肠毒素基因的多重 PCR 检测

陈芳, 王丙云, 杨林, 黄良宗, 刘为民, 马春全

(佛山科学技术学院 动物医学系, 广东 佛山 528000)

**摘要:**以产肠毒素性大肠埃希菌(*Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)耐热肠毒素(STa、STb)基因和不耐热肠毒素(LT)基因保守序列为靶序列,设计合成了3对可扩增目的片段为182、108和336 bp的引物,建立了检测ETEC耐热肠毒素基因和不耐热肠毒素基因的多重PCR方法.该方法对肠出血性大肠埃希菌(EHEC) EDL933、猪链球菌*Streptococcus*、鼠伤寒沙门氏杆菌*Salmonella typhimrium*和猪肺疫巴氏杆菌*Pasteurella pneumotropica*的检测结果均为阴性,并且能检测到 $10^2$  cfu/mL稀释度的标准菌.对11株分离自广东佛山地区腹泻仔猪的待检菌株进行检测,结果为:含STa基因的菌株为5株;含STb基因为2株;含LT基因为3株,其中2株同时具有STb和LT基因.结果表明:该方法的特异性和敏感性较高,可用于ETEC的临床快速诊断和流行病学调查.

**关键词:**产肠毒素性大肠埃希菌(ETEC);耐热肠毒素(STa、STb)基因;不耐热肠毒素(LT)基因;多重PCR;猪  
**中图分类号:**S852.612 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-411X(2009)03-0122-03

## Detection of Enterotoxin Genes of *Escherichia coli* from Piglets by Multiplex-PCR Assay

CHEN Fang, WANG Bing-yun, YANG Lin, HUANG Liang-zong, LIU Wei-min, MA Chun-quan  
(Department of Animal Medicine, Foshan University, Foshan 528000, China)

**Abstract:** A method based on the polymerase chain reaction (PCR) was developed to detect heat-stable enterotoxin (STa, STb) genes and heat-labile enterotoxin (LT) gene from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). The PCR primers were designed according to the conserved sequence of STa, STb and LT genes and the expected sizes of PCR-amplified productions were 182, 108 and 336 bp, respectively. This method was used to detect enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) EDL933, *Streptococcus*, *Salmonella typhimrium* and *Pasteurella pneumotropica* strain, none was found to contain STa, STb and LT genes homologous sequences, and standard strains of  $10^2$  cfu/mL can be detected. Among 11 *E. coli* strains isolated from piglets with diarrhea which came from Foshan in Guangdong, 5 carried the gene for STa homologous sequences, 2 possessed the gene for STb, 3 carried the gene for LT, 2 of which carried simultaneously the genes for STb and LT. The results confirmed that this PCR method show high specificity and sensitivity for rapid detection of enterotoxin genes and epidemiological investigation of *E. coli* strains.

**Key words:** enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC); heat-stable enterotoxins (STa and STb) genes; heat-labile enterotoxin (LT) gene; multiplex-PCR; swine

产肠毒素性大肠埃希菌(*Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)是致猪腹泻的主要病原菌之一,这主要与其具有产肠毒素能力和粘附性菌毛有关, ETEC产生2类肠毒素,一类为耐热肠毒素(STa、STb),一类为不耐热肠毒素(LT). STa能激活小肠细胞膜刷状缘绒毛上的颗粒性鸟苷酸环化酶(GC), GC

收稿日期:2009-02-26

作者简介:陈芳(1972—),女,讲师,华南农业大学在职博士研究生;通讯作者:马春全(1962—),男,教授,博士, E-mail: machunquan@263.net

基金项目:广东省科技计划项目(2005B20201015);佛山市科技发展专项资金(03020011);佛山科学技术学院重点课题

与STa受体可能通过细胞骨架成分紧密相连,引起上皮细胞内环化的一磷酸鸟苷(cGMP)增多,导致肠腔内电解质和水滞留引起腹泻<sup>[1-3]</sup>. LT毒素致病的机理主要是A亚基可激活腺苷酸环化酶,引发细胞内水、电解质失衡,造成脱水性腹泻<sup>[4-6]</sup>. 检测ETEC肠毒素对大肠埃希菌性腹泻病的诊断具有重要意义,本试验旨在基因水平上建立检测ETEC 3种肠毒素基因的新方法.

1 材料与方法

1.1 标准菌株和待检菌株

ETEC标准菌株C83902(STb<sup>+</sup>, LT<sup>+</sup>)、987P(STa<sup>+</sup>)购自中国兽药监察所,肠出血性大肠埃希菌(EHEC) EDL933、猪链球菌 *Streptococcus*、鼠伤寒沙门氏杆菌 *Salmonella typhimrium* 和猪肺炎巴氏杆菌 *Pasteurella pneumotropica* 由佛山科学技术学院预防兽医学广东省重点实验室保存,11株待检大肠埃希菌分离株分离自广东佛山各大猪场的仔猪黄、白痢病料.

1.2 主要试剂

rTaq酶、蛋白酶K(proteinase K)、dNTPs、DNA Marker DL2000为广州美津生物技术有限公司产品.

1.3 细菌培养及DNA模板的制备

用参考文献[7]中经典的CTAB方法提取模板DNA. 干燥后的DNA中加入100 μL TE缓冲液,混匀,-20℃保存备用.

1.4 引物的设计和合成

根据已发表的大肠埃希菌STa、STb基因和LT基因序列,选取结构基因内保守区段为目的片段,用Primer Premier 5.0软件设计了3对特异性引物,预期扩增出182、108和336 bp目的片段,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成. 序列见表1.

表1 PCR引物序列

| Tab.1 Nucleotide sequences of synthetic primers |      |                               |          |
|-------------------------------------------------|------|-------------------------------|----------|
| 毒素基因                                            | 引物   | 引物序列                          | PCR产物/bp |
| STa基因                                           | STa+ | 5'-GCTTCTCTATTATGTTTCCGCAC-3' | 182      |
|                                                 | STa- | 5'-GCAGCAGACGCAGGATAAC-3'     |          |
| STb基因                                           | STb+ | 5'-TCTTCTTCCCTCTATGTTGCTC-3'  | 108      |
|                                                 | STb- | 5'-CGTTGCTTGGCTACTTGTGTAT-3'  |          |
| LT基因                                            | LT+  | 5'-CCGCTACCGTGCTGACTAC-3'     | 336      |
|                                                 | LT-  | 5'-ACCGCAGTAACCTCATGTAT-3'    |          |

1.5 多重PCR反应体系的优化

多重PCR反应采用50 μL反应体系进行优化,优化后体系各成分分别为10×PCR buffer(1×) 5 μL, dNTPs(0.2 mmol/L)5 μL,混合引物6 μL(每种引物终浓度为0.5 μmol/L),C83902、987P标准菌株

DNA模板2 μL, rTaq(2.5 u) 0.5 μL,加dd H<sub>2</sub>O至50 μL. 扩增程序为94℃预变性5 min,94℃变性45 s,54℃退火30 s,72℃延伸30 s,共30个循环,72℃延伸7 min,4℃保存. 以灭菌超纯水为阴性对照.

1.6 多重PCR方法的特异性试验

以C83902、987P标准菌株为阳性对照,对EHEC EDL933、猪链球菌、鼠伤寒沙门氏杆菌和猪肺炎巴氏杆菌按1.5方法优化后的条件进行多重PCR扩增,鉴定其特异性.

1.7 多重PCR方法的敏感性试验

将标准菌株C83902、987P 37℃振荡(140 r/min)培养13~15 h,培养菌液(10<sup>5</sup> cfu/mL)进行倍比稀释,分别对10~10<sup>5</sup> cfu/mL不同稀释度的菌液按1.5条件进行PCR扩增,测定多重PCR方法的敏感性.

1.8 多重PCR产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定

采用常规琼脂糖凝胶电泳法进行电泳,PCR反应结束后取9 μL反应液,加1 μL 10×loading buffer混匀后上样于16 g/L琼脂糖凝胶,120 V,90 mA电泳20~25 min,用凝胶成像系统记录结果.

1.9 ETEC标准菌PCR产物测序

将标准菌株PCR回收纯化产物取50 μL,送上海生物工程技术有限公司纯化及测序.

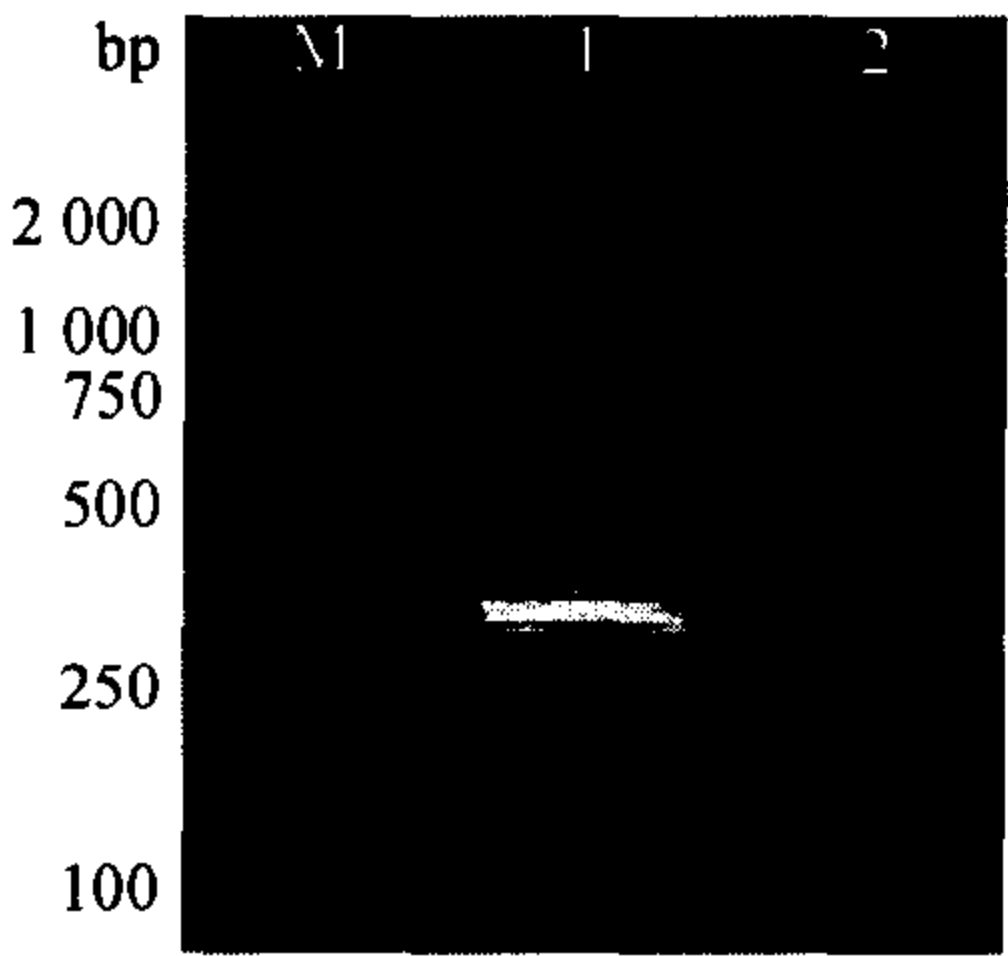
1.10 对待检菌株的PCR检测

按照1.5优化PCR方法,对11种待检菌株进行三重PCR检测.

2 结果

2.1 多重PCR反应体系的优化建立

标准菌株阳性对照组扩增出目的条带,灭菌超纯水阴性对照无条带(图1).



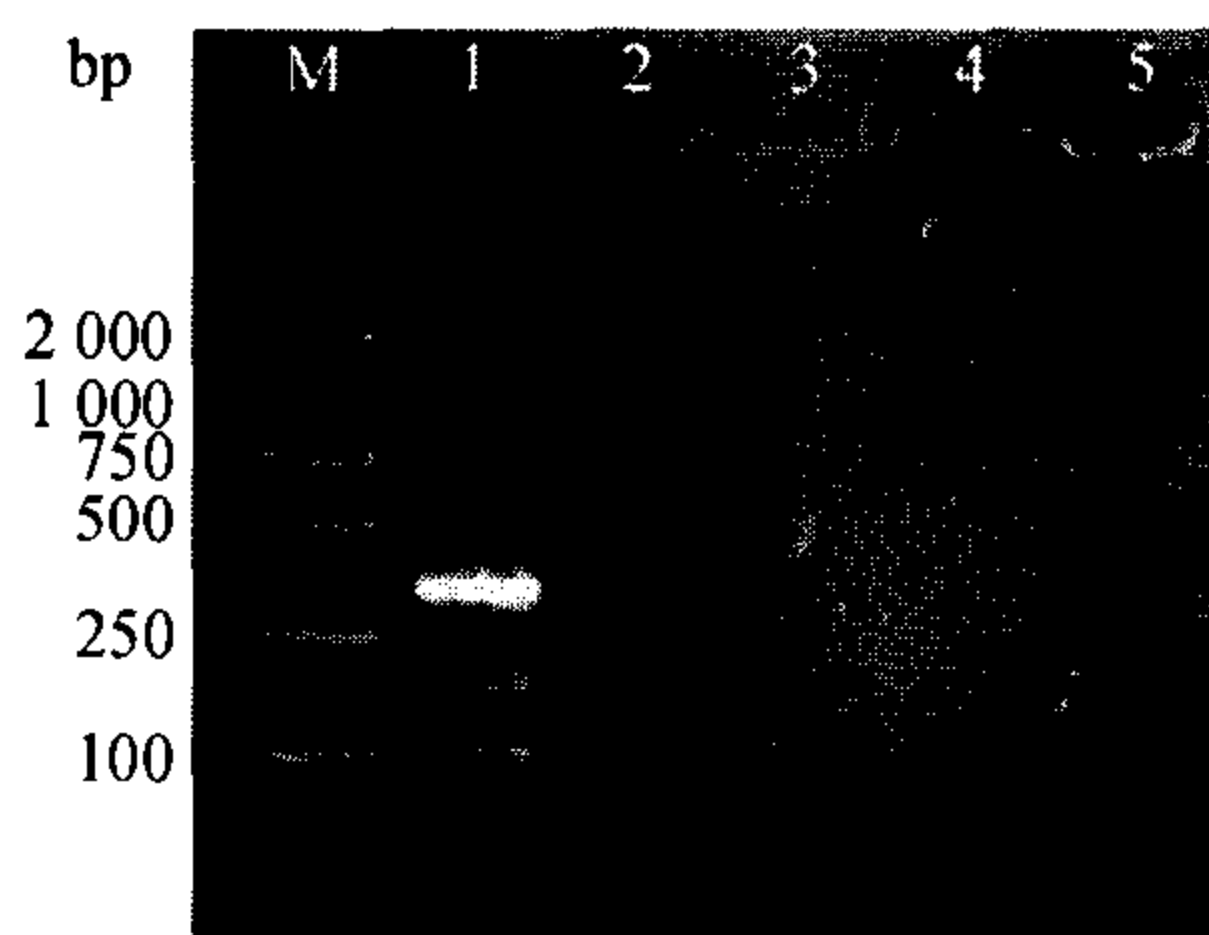
M: DNA Marker DL2000; 1: C83902、987P标准菌株阳性对照; 2: 灭菌超纯水阴性对照

图1 多重PCR反应优化试验结果

Fig.1 Optimized experimental results by multiplex-PCR

2.2 多重PCR特异性试验结果

除标准菌株阳性对照组扩增出目的条带外,其他均无条带(图2).



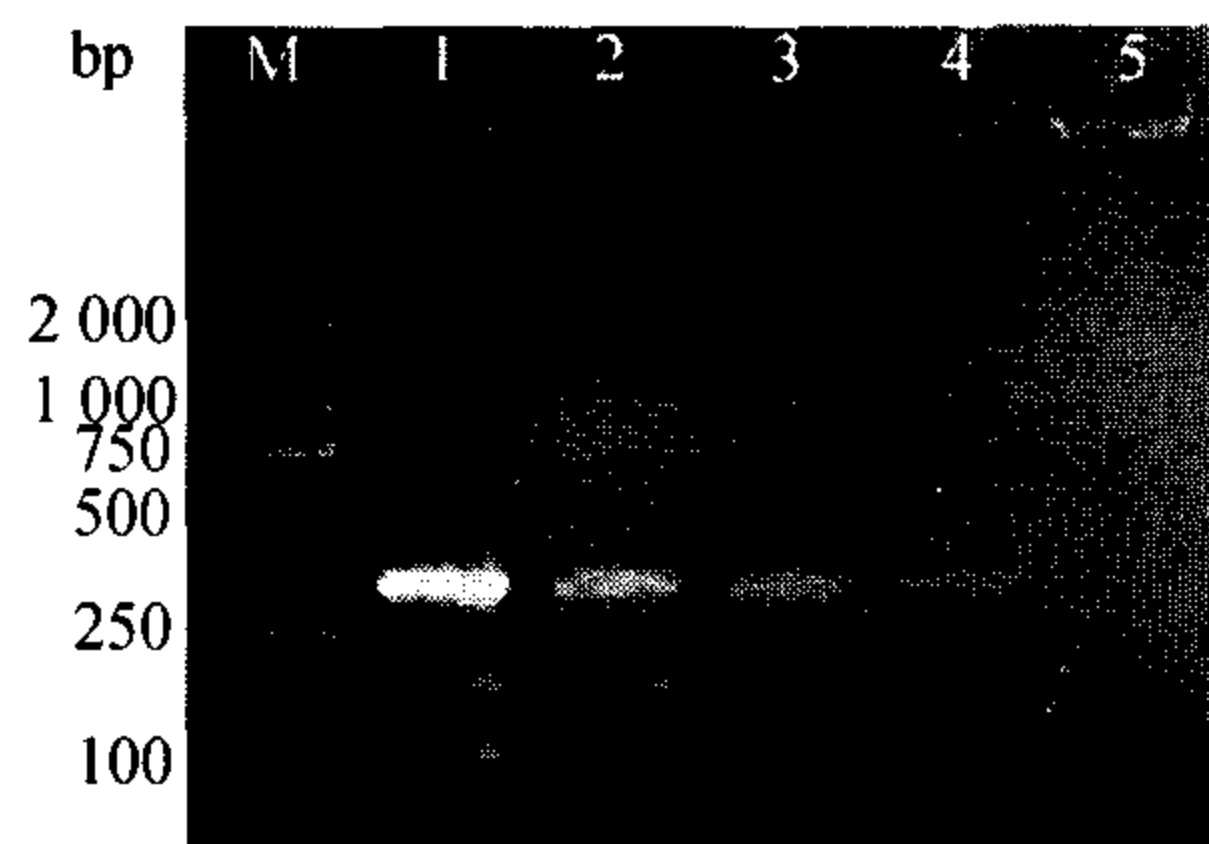
M: DNA Marker DL2000; 1: C83902, 987P 标准菌株阳性对照组; 2: (EHEC) EDL933; 3: 猪链球菌; 4: 鼠伤寒沙门氏杆菌; 5: 猪肺炎巴氏杆菌

图2 多重 PCR 特异性试验结果

Fig. 2 Specific detection of enterotoxin genes by multiplex-PCR

### 2.3 多重 PCR 敏感性试验结果

经对不同稀释度的标准菌株培养物进行多重 PCR 检测,该方法能检测到  $10^2$  cfu/mL 稀释度的标准菌(图3)。



M: DNA Marker DL2000; 1~5 分别为:  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  cfu/mL

图3 多重 PCR 敏感性试验结果

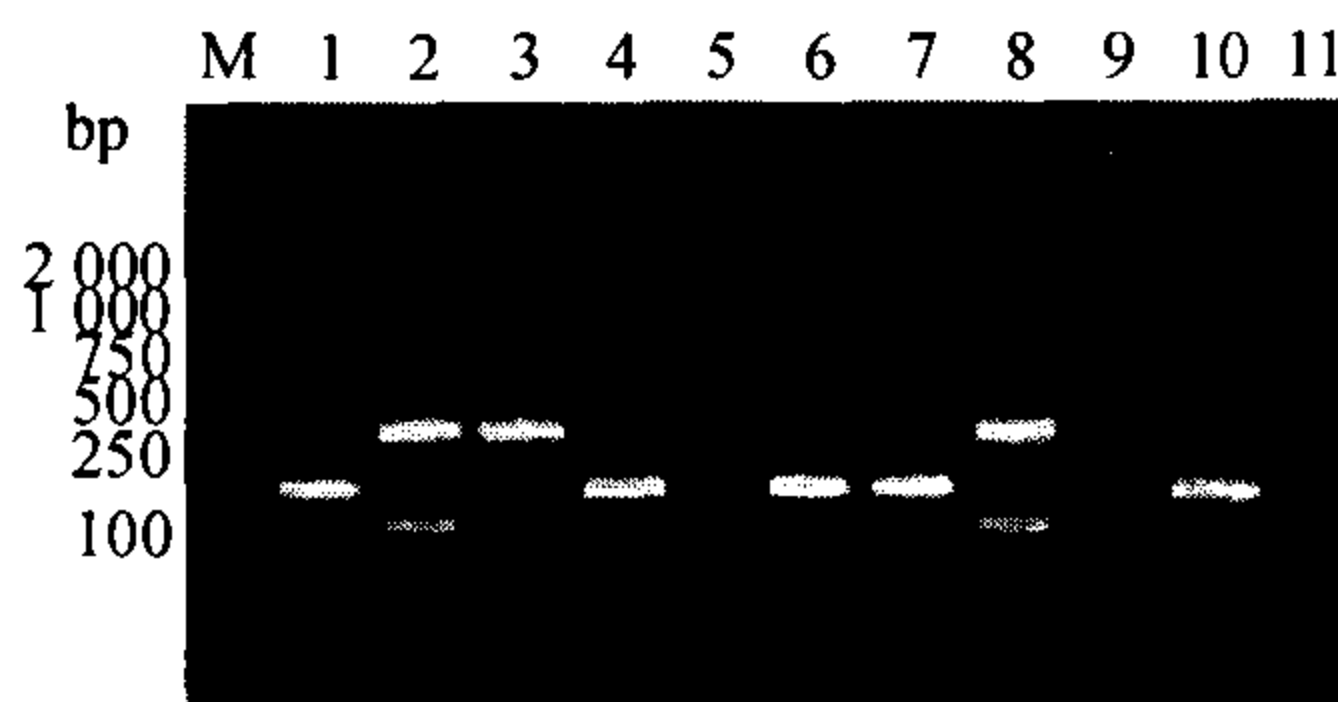
Fig. 3 Sensitivity detection of enterotoxin genes by multiplex-PCR

### 2.4 ETEC 标准菌多重 PCR 产物测序结果

多重 PCR 测序结果与 GeneBank 报道的猪大肠埃希菌 STa、STb 基因和 LT 基因的保守区序列 (M25607、M35586、M15361) 相似性分别为 98.3%、97.6% 和 99.2%。

### 2.5 待检菌株多重 PCR 检测结果

经多重 PCR 检测,11 个待检菌株中含有 STa 基因 5 株,含 STb 基因 2 株,含 LT 基因 3 株,其中 2 株同时具有 STb 和 LT 基因(图4)。



M: DNA Marker DL2000; 1, 4, 6, 7, 10: STa;

2, 8: STb + LT; 3: LT; 5, 9, 11: 阴性

图4 待检菌株毒素基因多重 PCR 检测结果

Fig. 4 Detection of enterotoxin genes of 11 *Escherichia coli* strains by multiplex-PCR

## 3 讨论

ETEC 是引起猪腹泻的主要致病菌,ETEC 和一般大肠埃希菌用细菌培养和生化反应难以区分,血清鉴定不够敏感和特异,故主要依据检测肠毒素的有无鉴定 ETEC<sup>[8]</sup>。目前常规检测猪源大肠埃希菌毒素的方法操作繁琐,检测时间长,而应用本研究建立的 PCR 扩增系统,通过检测毒素基因来检测 ETEC,该方法对 (EHEC) EDL933、猪链球菌、鼠伤寒沙门氏杆菌和猪肺炎巴氏杆菌的检测结果均为阴性,并且能检测到  $10^2$  cfu/mL 稀释度的标准菌。因此多重 PCR 不仅有较高特异性、敏感性,而且操作简便,为临床提供了一个更为快速、灵敏的测定大肠埃希菌肠毒素基因的方法,也可用于该病的流行病学调查。

陈芳等<sup>[9]</sup>对 15 株分离自广东佛山地区腹泻仔猪的待检菌株进行不耐热肠毒素基因的单项 PCR 检测,引物同本研究一致,检测结果有 3 株 LT 基因阳性。而本研究对与文献[9]同批 11 株菌株进行肠毒素基因的三重 PCR 检测,结果为 STa 基因 5 株,STb 基因 2 株,LT 基因 3 株,其中 2 株同时具有 STb 和 LT 基因,因此多重 PCR 检测肠毒素基因比单项 PCR 具有快速、准确、操作简便、不漏检等优点。

### 参考文献:

- [1] RAN Xue-qin, LIN Jian-bin, WANG Jia-fu. Prevalence of Shiga toxin-and enterotoxin-producing *Escherichia coli* in patients and animals in Guizhou, China[J]. 微生物学报, 2008, 48(6): 796-799.
- [2] WALDMAN S A, KUNO T, KAMISAKI Y, et al. Intestinal receptor for heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* is tightly coupled to a novel form of particulate granulate cycles [J]. Infect Immun, 1996, 51: 320.
- [3] 王玉炯, 许崇波. 大肠杆菌耐热性肠毒素(ST)的分子生物学研究进展[J]. 宁夏大学学报: 自然科学版, 2001, 22(3): 331-336.
- [4] 郑继平, 张兆山. 肠毒素大肠杆菌疫苗研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2003, 31(1): 51-54.
- [5] 张雪寒, 何孔旺, 张书霞. 产肠毒素性大肠杆菌肠毒素的研究概况[J]. 动物医学进展, 2003, 24(3): 38-40.
- [6] 张越南, 张彦明, 张怀喜. 大肠杆菌毒力因子研究概况[J]. 动物医学进展, 2004, 25(4): 26-29.
- [7] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 461-498.
- [8] 陈祥, 高崧, 王雷, 等. 多重 PCR 检测猪源大肠杆菌毒素基因[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2003, 24(3): 12-14.
- [9] 陈芳, 池仕红, 马春全, 等. 猪大肠杆菌不耐热肠毒素基因的 PCR 检测[J]. 广东畜牧兽医科技, 2007, 32(6): 32-33.

【责任编辑 柴 焰】