

# 三对引物同时 PCR 分型检测产毒素大肠杆菌的方法及在分子流行病学研究中的应用

蔡庆 王蔚 陈友纯 林万明

**摘要** 在产毒素大肠杆菌(ETEC)肠毒素基因内设计合成三对引物,建立了三对引物同时 PCR 检测 ETEC 的方法,一次 PCR 即可扩增出 627bp(LTh)、240bp(ST Ia)和 169bp(ST Ib)三种肠毒素基因片段,可同时分型检测出 LTh、ST Ia、ST Ib、LTh-ST Ia、LTh-ST Ib 五种基因型的 ETEC,与非 ETEC 对照菌无交叉反应,最小检出量为 10cfu,显示了很高的特异性和敏感性。将建立的方法用于山东省六县市 623 例大肠杆菌致泻标本的检测,阳性率为 40.3%,并能鉴别 ETEC 的基因型,为 ETEC 腹泻的分子流行病学研究提供了有效的检测手段。

**关键词** 产毒素大肠杆菌 腹泻 聚合酶链反应

**Study on the Molecular Epidemiology of Diarrhea Caused by Enterotoxigenic Escherichia coli, Using Polymerase Chain Reaction with Multiple Primer Pairs** Cai Qing, Wang Wei, Chen You - chun, et al.  
Research Center of Clinical Molecular Biology, Genetal Hospital Air Force of PLA, Beijing 100036

**Abstract** A Polymerase Chain Reaction (PCR) method has been developed for detecting *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC). Three different sets of oligonucleotide primer were simultaneously used to amplify the enterotoxin genes of heat - labile (LTh) and heat - stable (STIa and STIb) enterotoxins of ETEC. These primers amplified the 627, 240 or 169 base pair DNA fragments from LTh, STIa and STIb genes of the reference ETEC strains, respectively. Five types of ETEC strains corresponding to the LTh, STIa, STIb, LTh - STIa, or LTh - STIb genotypes were distinguished by a single procedure of PCR, using the mixture of the three sets of primers. There was no cross - reaction with the non - ETEC strains. The lowest detection level was 10 cfu. A total number of 623 stool specimens of diarrheal patients from Shangdong Province induced by *E. coli* were examined by PCR and the positive rate of ETEC was 40.3%. The results indicated that PCR is a rapid, sensitive and specific method for detecting ETEC.

**Key words** *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) Diarrhea Polymerase chain reaction

在发展中国家,产肠毒素大肠杆菌(ETEC)是急性感染性腹泻的重要病原,与人类腹泻关系最密切的为 LTh、ST Ia 和 ST Ib 肠毒素菌株。聚合酶链反应(PCR)技术的出现为本病的研究和检测提供了快速简便、敏感特异的方法。笔者在 ETEC 肠毒素基因内合成三对引物,建立了三对引物同时 PCR 分型检测 ETEC 五种基因型的方法,并在山东省六县市用于 ETEC 的分子流行病学调查。

## 材料和方法

一、菌株:标准参考菌株见附表。

二、临床标本的收集与处理:从山东省济南、德州、曲阜、潍坊、莱芜、苍山六县市医院收集临床急性腹泻患者粪便,得到 623 例大肠杆菌致泻标本。每份粪便标本约 200mg 悬于 1ml 生理盐水,分别划种 MacConKey、SS 和碱性琼脂培养基,以监测沙门氏菌、志贺氏菌、寄生虫等常见肠道致泻因子及霍乱弧菌。从 MacConKey 培养基上分别挑取 10 个大肠杆菌

菌落用于常规的 Y1 肾上腺细胞和乳鼠试验。另从 MacConKey 培养基的菌落稠密处刮取两环菌苔悬于 500 $\mu$ l 生理盐水,取 10 $\mu$ l 该悬液于 40 $\mu$ l 双蒸水中,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10min,10 000r/min 离心 5min,取 10 $\mu$ l 上清作为 PCR 模板。

三、PCR 引物:三对引物位于 ETEC 肠毒素基因区内<sup>[1~3]</sup>,由本室 ABI 391 DNA 合成仪合成。

四、PCR 扩增:50 $\mu$ l 反应体系中含 10 $\times$  Buffer 5 $\mu$ l,4 种 dNTP 各 200 $\mu$ mol/L,引物各 0.2 $\mu$ mol/L,TaqDNA 聚合酶 2U,模板 10 $\mu$ l。PCR 循环参数为 94 $^{\circ}$ C 1min,58 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,循环 30 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

附表 实验用菌株

菌株	遗传型	PCR 结果
<i>E. coli</i> C600(EWD299)	LTh <sup>+</sup>	+
<i>E. coli</i> C600(pMM030)	LTh <sup>+</sup>	+
<i>E. coli</i> C600(PRIT10036)	STIa <sup>+</sup>	+
<i>E. coli</i> C600(PSLM004)	STIb <sup>+</sup>	+
<i>E. coli</i> C600(PKAD008)	LTh <sup>+</sup> STIa <sup>+</sup> STIb <sup>+</sup>	+
ETEC 44813	LTh <sup>+</sup> STIa <sup>+</sup> STIb <sup>+</sup>	+
ETEC 19449	LTh <sup>+</sup> STIb <sup>+</sup>	+
ETEC 142	LTh <sup>+</sup>	+
ETEC 130	STIb <sup>+</sup>	+
<i>E. coli</i> C600		-
EIEC O29:K		-
EPEC O119H6		-
EHEC O157 H7		-
霍乱弧菌 569B	CT <sup>+</sup>	+
El Tor 178	CT <sup>+</sup>	+
痢疾志贺氏菌 480011		-
福氏志贺氏菌 480086		-
鲍氏志贺氏菌 480165		-
宋内氏志贺氏菌 48025-11		-
伤寒沙门氏菌 460691		-
肠炎沙门氏菌 50041		-
小肠结肠炎耶尔森菌 O:3 52301		-

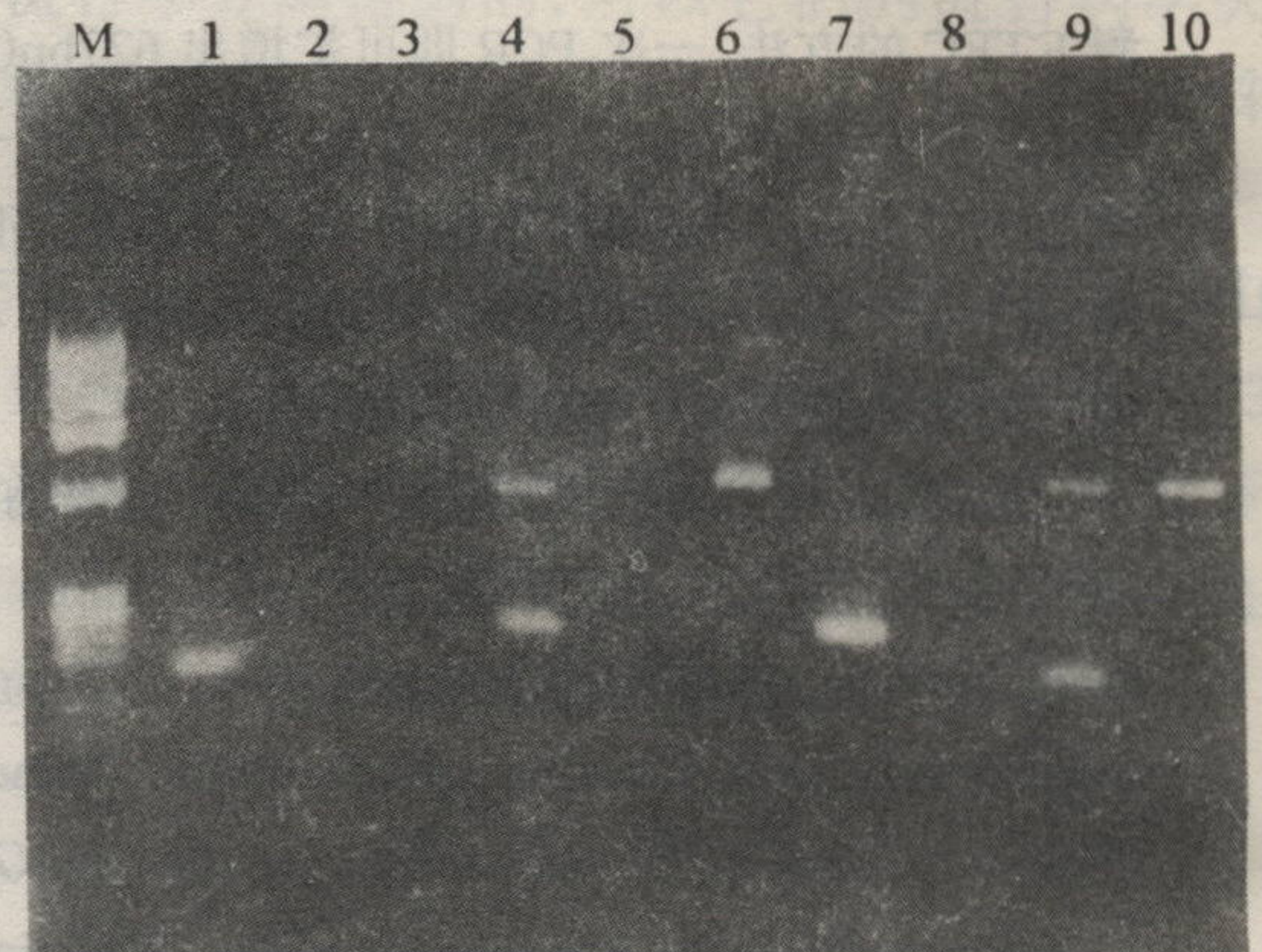
注:表中 ETEC44813、ETEC19449、ETEC130、ETEC142 由军事医学科学院生物工程研究所提供,其余菌株均为本研究室保存菌株。

五、PCR 扩增产物的检测:取 10 $\mu$ l 扩增产物,经 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果,用  $\Phi$ X174/HaeIII 作为分子量标准。

### 结 果

一、PCR 的特异性:用引物分别对标准菌

株进行扩增,阳性菌株产生 627bp(LTh)、240bp(ST Ia)、169bp(ST Ib)三种 DNA 区带,产物长度与设计相符。产 CT 肠毒素的霍乱弧菌也能扩增出 627bp 的片段,痢疾志贺氏菌、伤寒沙门氏菌等非 ETEC 菌株无扩增条带(附图)。



附图 PCR 检测 ETEC 特异性试验结果

M.  $\Phi$ X174/HaeIII 1. STIb 2. EPEC 3. 痢疾志贺氏菌  
4. LTh-STIa 5. EIEC 6. LTh 7. STIa 8. 伤寒沙门氏菌  
9. LTh-STIb 10. LTh

二、PCR 的敏感性:10 倍系列稀释标准 ETEC 菌株,等量取各稀释度菌液为模板进行 PCR,同时作活菌计数,结果 10 个菌体细胞的反应体系可见扩增条带。

三、PCR 检测临床腹泻粪便标本的结果:

1. PCR 与常规方法检测结果的比较:对山东省六县市 623 份大肠杆菌致泻标本用常规方法和 PCR 法进行 ETEC 检测,结果常规方法阳性率为 38.0% (237/623),PCR 法阳性率为 40.3% (251/623),PCR 法的检出率略高于常规方法。

2. ETEC 检测类型:在 251 份 PCR 阳性标本中,能准确区分出 ETEC 的五种基因型,其中 LTh 为 21.5% (134/623),ST Ia 为 4.8% (30/623),ST Ib 为 12.1% (75/623),LTh-ST Ia 为 0.6% (4/623),LTh-ST Ib 为 1.3% (8/623)。表明山东省夏天 ETEC 感染以 LTh 为主,其次为 ST Ib、ST Ia,LT-ST 较少,未发现

ST Ib 和 ST Ia 同时阳性的菌株,也未发现有霍乱弧菌感染。

3. 不同地区的检测率:山东省六县市 ETEC 检测率以济南和潍坊两地区较低(分别为 24.7% 和 26.5%),曲阜地区较高(63.5%)。不同类型肠毒素 ETEC 在各地区的分布没有明显差异,均以 LT 为主,LT 和 ST 同时阳性的 ETEC 所占比例较低。

4. 市区、郊区和农村的检测率:将患者家庭住址分为市区、郊区和农村三个不同地区,结果三者 ETEC 阳性率无显著差异,但 LTh 的阳性率市区高于郊区,反之 ST Ia 的阳性率郊区高于市区。

## 讨 论

常规检测 ETEC 的方法主要有 Y 肾上腺细胞毒力试验(测 LT)、乳鼠灌胃试验(测 ST)以及免疫溶血试验等,这些方法费时费力费材,特异性和敏感性低。核酸探针杂交技术也存在着操作繁琐和费时的缺点,不能适应临床检测和分子流行病学调查的要求。本文在 ETEC 肠毒素基因内合成三对引物,建立了三对引物同时 PCR 检测 ETEC 的方法,其敏感性可测到 10cfu 的细菌,与非 ETEC 菌(除霍乱弧菌)无交叉反应,表明建立的 PCR 方法具有较高的灵敏度和特异性。且一次 PCR 即可对人类常见的三种 ETEC 肠毒素分型,操作快速简便,能满足临床检测和大规模分子流行病学调查。

霍乱弧菌的 CT 肠毒素基因与 ETEC LTh 基因序列有很高的同源性,LTh 引物能以 CT 基因为模板扩增出 627bp 的区带,但该扩增片段无 Hind III 酶切位点,LTh 扩增片段则可被 Hind III 酶切成 481bp 和 146bp 两个片段,使两种细菌得以鉴别。

本文建立的用于 PCR 检测的临床腹泻粪便处理方法能被实验室所接受,划种碱性琼脂培养基能鉴别出霍乱弧菌,能避免 Hind III 酶切 LTh 扩增产物的麻烦。以 MacConkey 平板培养物作模板有效地防止了粪便杂质对 PCR 的干扰。双蒸水煮沸裂解菌体细胞简便易行,不需成本费用,比常用的溶菌酶蛋白酶 K 处理标本更适用于实际应用。

用建立的 PCR 方法对山东省夏季 ETEC 腹泻进行了分子流行病学调查,为该地区 ETEC 流行趋势提供了第一手资料,为进一步研究 ETEC 腹泻提供了依据。本文结果与国外有关报道相似,ST Ia 多见于郊区农村,原因可能是农村生活条件和卫生习惯不同于城市。夏季腹泻,尤其是旅游地区,ETEC 占有相当的比例,应引起有关部门的注意,进一步改善餐饮业的卫生条件显然十分必要。

笔者建立了三对引物同时 PCR 检测 ETEC 的方法,能准确对 ETEC 分型,具有敏感特异和快速简便的特点,这为临床检验和分子流行病学的调查提供了有效工具。

## 参 考 文 献

- 1 Yamamoto T, Yokota T. Sequence of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* pathogenic for human. *J Bacteriol*, 1983, 155:728.
- 2 So M, McCarthy BJ. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77:4011.
- 3 Moseley SL, Hardy JW, Huq MI, et al. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1983, 39:1167.

(收稿:1997-02-25 修回:1997-03-11)