

含扩增内对照的霍乱毒素基因 *ctx* 和不耐热肠毒素基因 *elt* 三重 real-time PCR 检测体系的建立

李杰 阚飙 张京云

【摘要】 目的 建立一个含扩增内对照(IAC)的三重 TaqMan real-time PCR 体系,以检测霍乱毒素基因 *ctxA* 和肠产毒性大肠埃希菌的不耐热肠毒素基因 *elt*。方法 针对 *ctxA*、*elt* 和 IAC 设计引物和探针,进行灵敏性和特异性分析,评价三重反应之间的互相影响。结果 该检测体系灵敏度为 *ctxA* 每个反应 94 拷贝, *elt* 每个反应 79 拷贝,扩增效率分别为 94.7% 与 98.1%。*ctxA* 与 *elt* 拷贝数比例为 1:1 ~ 1:10 时,二者均能良好扩增;*elt* 或 *ctxA* 的量是 IAC 的 100 倍以上时, IAC 扩增受到抑制。结论 该检测体系具有良好的灵敏性和特异性,可以用于腹泻粪便中感染病原菌的检测,其中内对照检测可以提示粪便样本中是否存在 PCR 抑制因子。

【关键词】 霍乱毒素; 不耐热肠毒素; 实时荧光定量聚合酶链式反应

Establishment of a triplex real-time PCR for the detection of cholera toxin gene *ctx* and heat labile enterotoxin gene *elt* Li Jie, Kan Biao, Zhang Jingyun. State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: Zhang Jingyun, Email: zhangjingyun@icdc.cn

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2013ZX-100040101).

【Abstract】 **Objective** To establish a triplex TaqMan real-time PCR system containing internal amplification control (IAC) to detect cholera toxin gene *ctxA* and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) heat-labile enterotoxin gene *elt*. **Methods** Primers and probes were designed based on the sequences of *ctxA*, *elt* and IAC. Both sensitivity and specificity were analyzed and interactions between different reactions were evaluated. **Results** This system showed that the sensitivity of *ctxA* was 94 copies/reaction while the *elt* 79 copies/reaction and the amplification efficiency were 94.7% and 98.1%, respectively. Under the ratio of copy numbers on gene *ctxA* to *elt* as between 1:1-1:10, when both targets were detected, with impact was less on each other. However, when the amount of *elt* or *ctxA* was 100 times of IAC, the amplification of IAC was significantly inhibited. **Conclusion** This system showed both satisfactory sensitivity and specificity, thus could be used to detect pathogenic bacteria in diarrhea stools. The detection of IAC could prompt the presence of PCR inhibitors in samples being tested.

【Key words】 Cholera toxin; Heat-labile enterotoxin; Real-time PCR

霍乱弧菌基因 *ctxAB* 编码的霍乱毒素(CT)在其致病性上发挥了重要作用。肠产毒性大肠埃希菌(ETEC)引起腹泻主要通过定植于小肠并分泌不耐热肠毒素(LT)和/或耐热肠毒素(ST)。CT 和 LT 均为细菌蛋白毒素家族成员,通过 G 蛋白的 ADP-核

糖基化而发挥毒性^[1]。在免疫学上和基因水平上,CT 和 LT 有一定程度的相似性。为了快速、可靠地检测这两种致腹泻肠毒素,本研究建立三重 real-time PCR 体系,检测 CT 和 LT 的编码基因,同时加入扩增内对照以监测扩增体系的运行。

材料与方法

1. 实验菌株:霍乱弧菌 44 株、ETEC 38 株、其他致泻性大肠埃希菌 12 株、沙门菌 24 株、志贺菌 12 株、嗜水气单胞菌 18 株、拟态弧菌 1 株、副溶血弧菌

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.06.023

基金项目:国家科技重大专项(2013ZX-100040101)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所腹泻病室 传染病预防控制国家重点实验室

通信作者:张京云, Email: zhangjingyun@icdc.cn

1 株、河弧菌 1 株。菌株均经生化鉴定。

2. 模板制备:用无菌枪尖或牙签挑取单菌落于 50 μl 灭菌去离子水中,煮沸 10 min 后冰浴 3 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清用作检测模板。-20 ℃ 保存备用。

3. 引物和探针的设计:以霍乱弧菌 N16961 基因 *ctxA* 和大肠埃希菌 ETEC_118-5 的 *elt* 基因序列为模板,以软件 Beacon Designer 8 设计引物和探针(表 1)。对细菌模板,同时采用表 2 中的引物进行普通 PCR 检测,确认三重 real-time PCR 体系的检测结果。

4. 标准品的制备:分别以霍乱弧菌 N16961 和 ETEC 菌株 1047 为模板,用引物 *ctxF/R* 和 *ltF/R* 进行 PCR 扩增,将扩增产物连接到载体 pMD18-T (TaKaRa),构建质粒 pMD18T-ct 和 pMD18T-lt。质粒经测序确定插入片段的序列。测定质粒 DNA 的浓度,按公式换算成质粒拷贝数(即被检测基因的拷贝数):

$$\text{质粒拷贝数}/\mu\text{l} = \frac{\text{浓度}(\text{ng}/\mu\text{l}) \times \text{阿佛加德罗常数} \times 10^{-9}}{660 \times \text{质粒碱基数}}$$

用去离子水将 pMD18T-lt 稀释为 $7.9 \times 10^0 \sim 7.9 \times 10^8$ copy/μl, pMD18T-ct 稀释为 $9.4 \times 10^0 \sim 9.4 \times 10^8$ copy/μl, 用作 real-time PCR 检测体系的标准品。

5. 内对照质粒的构建:利用文献[2]中的 IAC 序列,由宝生物工程(大连)有限公司合成 200 bp 的 DNA 序列,并连接到载体 pMD18-T,构建质粒 pMD18T-IAC。用去离子水将质粒稀释为 500

copy/μl, 用作扩增的内对照模板。

6. 反应体系和反应条件:单一引物反应体系: Premix Ex Taq(Probe qPCR)(2×) 10 μl, PCR 上、下游引物和探针(10 μmol/L)各 0.4 μl, 模板 1 μl, 加灭菌蒸馏水至终体积 20 μl。三重反应体系的组成: Premix Ex Taq(Probe qPCR)(2×) 10 μl, 引物 *ltF*、*ltR*、*ctxF*、*ctxR*、*IACF*、*IACR*(10 μmol/L)各 0.4 μl, 探针 *ltP*、*ctxP*、*IACP*(10 μmol/L)各 0.4 μl, 内对照质粒(500 copy/μl) 1 μl, 模板 1 μl, 加灭菌蒸馏水至终体积 20 μl。反应条件:95 ℃ 预变性 3 min, 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火和延伸 30 s, 共 40 个循环。以三重体系检测霍乱弧菌 44 株、ETEC 38 株、其他致泻性大肠埃希菌 12 株、沙门菌 24 株、志贺菌 12 株、嗜水气单胞菌 18 株、拟态弧菌 1 株、副溶血弧菌 1 株、河弧菌 1 株,验证体系的特异性。

7. 检测下限的评价:以质粒系列浓度梯度为模板,每个浓度梯度取 1 μl 进行 real-time PCR, 每个浓度梯度做 5 个平行样。能够测出 5 个平行样品的最低模板浓度为相应反应的检测下限。以质粒浓度的 log 值为横坐标,以相应的 *Ct* 值为纵坐标,绘制 real-time PCR 标准曲线,计算 *r* 和扩增效率。

结 果

1. 单一引物的检测:反应体系中仅含有 *elt* 的引物探针时,对 pMD18T-lt 倍比稀释物进行检测。当质粒浓度为 $\geq 7.9 \times 10^1$ copy/μl 时,每个浓度梯度的 5 个平行样均扩增阳性;当质粒浓度为 7.9×10^0 copy/μl 时,每个浓度梯度的 5 个平行样不全扩增,故 *elt* 基因的检测下限为 7.9×10^1 copy/μl。反应体系中仅含有 *ctxA* 的引物探针时,对 pMD18T-ct 倍比稀释物进行检测。当质粒浓度为 $\geq 9.4 \times 10^1$ copy/μl 时,每个浓度梯度的 5 个平行样均扩增阳性;当质粒浓度为 9.4×10^0 copy/μl 时,每个浓度梯度的 5 个平行样不全扩增,故 *ctxA* 基因的检测下限为 9.4×10^1 copy/μl。

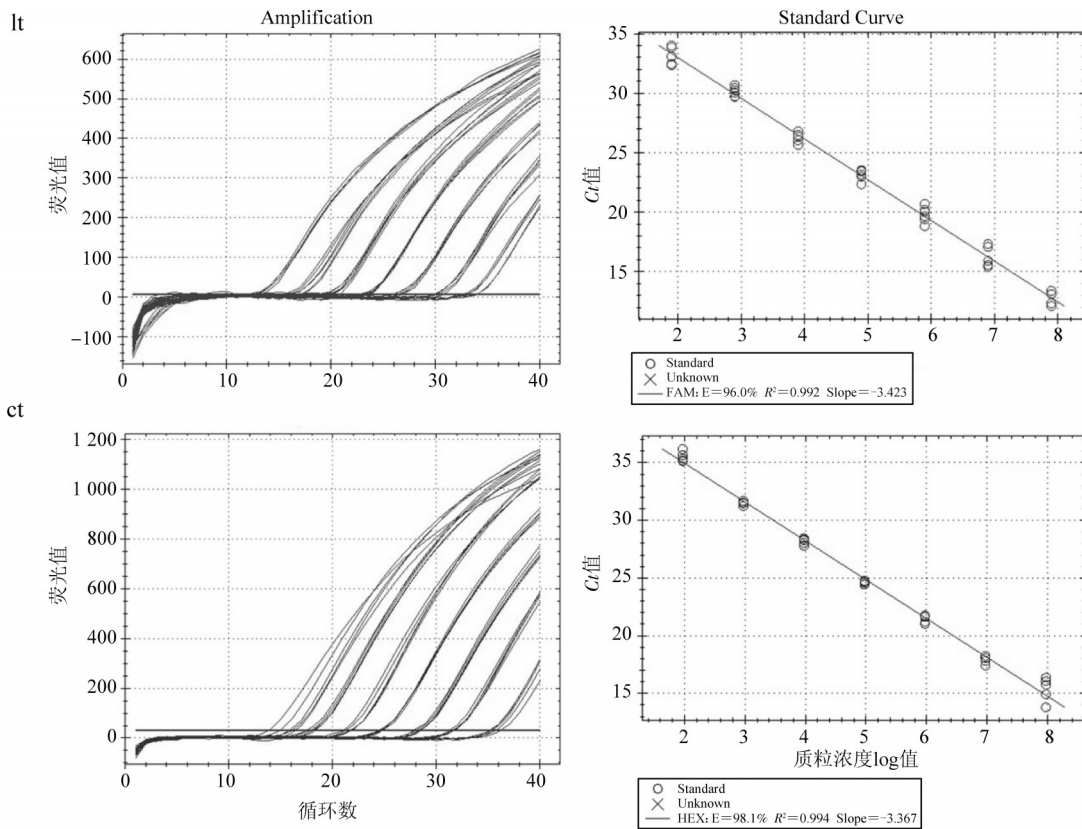
以质粒浓度的 log 值为横坐标,以相应的 *Ct* 值为纵坐标,绘制 real-time PCR 标准曲线。当质粒的浓度在 $10^1 \sim 10^7$ copy/μl 时,质粒浓度的对数值与 *Ct* 值具有非常好的相关性(r^2 值均为 99%),扩增效率分别为 96.0% 与 98.1%(图 1)。

表 1 *elt* 及 *ctxA* 引物和探针的序列

靶基因	引物或探针	序列(5'~3')	产物长度(bp)	GenBank 登录号
<i>elt</i>	ltP	6'-FAM-TGGATTCATCATGCACCACAAGG-BHQ-1	92	JX504011
	ltF	CAAGCTTGGAGAGAAGAA		
	ltR	TCCTCATTACAAGTATCACC		
<i>ctxA</i>	ctxP	HEX-ACTCACTCTGTCCTCTTGGCA-BHQ-1	90	AE003852
	ctxF	GACCTCCTGATGAAATAAAG		
	ctxR	GGTTGATATTCATTTGAGTAC		
IAC	IACP	CY5-CGATGCACTCCAGTCTCCTA-BHQ-2	148	FJ357008 ^[2]
	IACF	CCTAGCTTGGTAGAATCG		
	IACR	GAGCAATCGAACCATCTTA		

表 2 确认检测结果所用的引物

靶标	引物	序列(5'~3')	参考文献
<i>elt</i>	ltF	GGCGACAGATTATACCGTGC	[3]
	ltR	CGGTCTCTATATCCCTGTT	
<i>ctx</i>	L-CTX	CTCAGACGGGATTGTAGGCACG	[4]
	R-CTX	TCTATCTCTGTAGCCGGTATTACG	



注:质粒模板的浓度分别为 pMD18T-lt: 7.9×10^1 copy/ μ l, pMD18T-ct: 9.4×10^1 copy/ μ l

图1 单一引物的 real-time PCR 扩增曲线(左)及标准曲线(右)

2. 三重反应体系中存在单一模板时的检测效果评价:用三重反应体系分别检测 pMD18T-lt 和 pMD18T-ct 的倍比稀释物,检测效果类似单一引物的反应体系。*elt* 基因的检测下限为 7.9×10^1 copy/ μ l, *ctxA* 基因的检测下限为 9.4×10^1 copy/ μ l。real-time PCR 标准曲线显示,当质粒的浓度为 $10^1 \sim 10^7$ copy/ μ l 时,质粒浓度的对数值与 Ct 值相关(r^2 均为 99%),引物的扩增效率分别为 98.1% 与 94.7%(图 2)。

3. 三重体系中同时存在 >2 种模板时的检测效果:三重反应体系中 IAC 浓度固定为每个反应管 500 拷贝。将 pMD18T-ct 倍比稀释物(9.4×10^5 copy/ μ l) 和 pMD18T-lt 倍比稀释物(7.9×10^5 copy/ μ l) 的各个浓度进行组合,以三重反应体系进行检测,比较 3 个位点 Ct 值的变化,评价不同模板之间的互相影响。结果显示,*elt* 浓度比 *ctxA* 高 100 倍以上时,*ctxA* 的扩增受到明显抑制;*ctxA* 浓度比 *elt* 高 10 倍以上时,*elt* 的扩增受到明显抑制;*ctxA/elt* 比例为 1:1 ~ 1:10 时,二者的互相影响较小。*elt* 或 *ctxA* 的量是 IAC 的 >100 倍时,IAC 扩增受到显著抑制($Ct > 33$);*elt* 或 *ctxA* 与 IAC 的比例为 10:1 ~ 1:10 时,模板对 IAC 扩增的影响较小,IAC 的 Ct 值为 30 ~ 32。

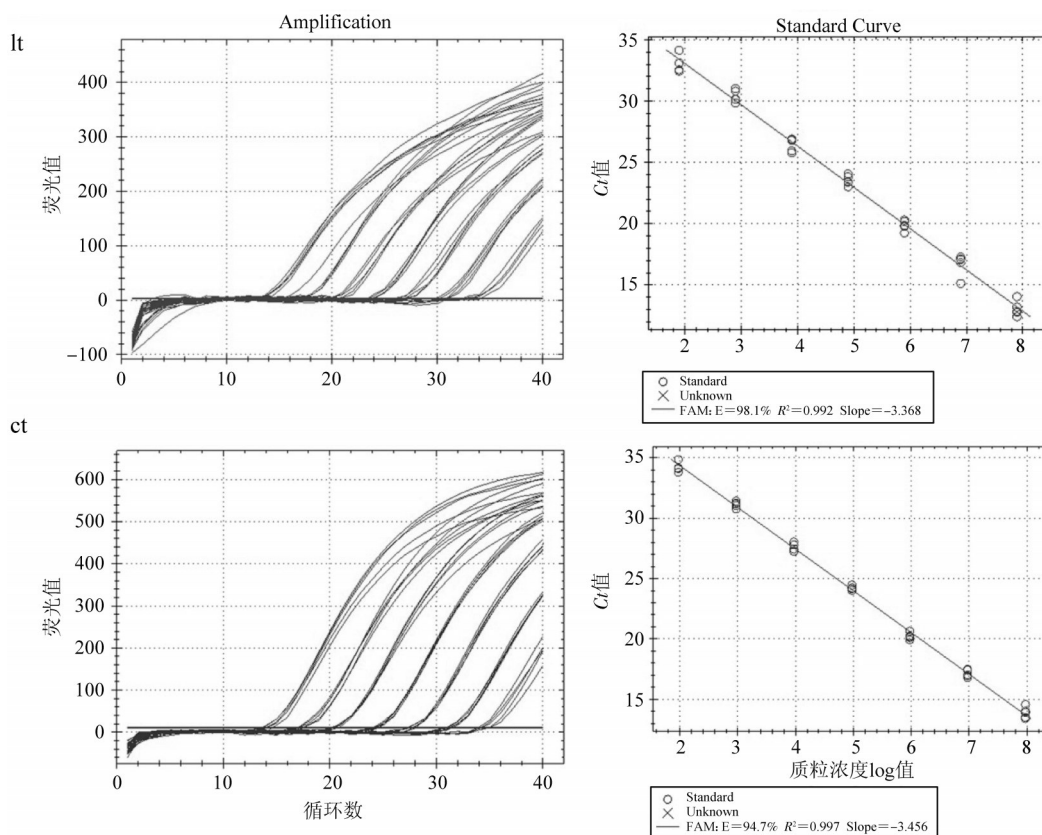
4. 三重体系的特异性:选取一组菌株,包括

EPEC 38 株、霍乱弧菌 44 株、其他致泻性大肠埃希菌 12 株、沙门菌 24 株、志贺菌 12 株、嗜水气单胞菌 18 株、拟态弧菌 1 株、副溶血弧菌 1 株、河弧菌 1 株,以建立的三重体系进行检测。38 株 EPEC 中,23 株 *elt* 阳性,所有菌株 *ctxA* 阴性;44 株霍乱弧菌中,42 株 *ctxA* 阳性,2 株 *ctxA* 阴性,所有菌株 *elt* 阴性;其他菌株 *elt* 和 *ctxA* 均为阴性,只有 IAC 阳性。以表 2 中引物对菌株进行扩增,结果与三重反应体系一致。

讨 论

快速准确的确定腹泻病原,对腹泻疫情的控制有重要意义。霍乱弧菌的 CT 和 EPEC 的 LT 肠毒素在免疫学和基因水平上都高度相似。本研究建立了三重 real-time PCR 检测体系,可以同时检测 CT 和 LT 的编码基因,同时以内对照 IAC 监测扩增效果。

反应体系中仅含有一个靶标的引物和探针时,检测灵敏度:*elt* 每个反应 7.9×10^1 拷贝,*ctxA* 每个反应 9.4×10^1 拷贝。当每个反应中加入的模板少于 10 拷贝时,检测的 Ct 值在 35 左右,5 次重复检测中个别检测的 $Ct > 35$ 而被判断为阴性。三重反应体系的灵敏度与单重体系相同。在单重和三重反应体系中,当质粒的浓度在 10^1 copy/ μ l 时,质粒浓度的对



注:同图1

图2 三重体系中只有一种模板时的real-time PCR扩增曲线(左)及标准曲线(右)

数值与Ct值有较好的相关性,引物扩增效率良好。此体系灵敏性与文献报道的数据基本相当^[5, 6]。

多重体系的各个反应之间存在互相影响,一个靶标的大量扩增往往会对其他位点的扩增产生抑制。IAC是用作扩增的内对照。为减少IAC对其他2个位点扩增能力的影响,本研究将每个反应体系中IAC浓度统一为500拷贝,单一引物体系对此浓度IAC模板扩增的Ct值约为30。三重体系同时检测*ctxA*和*elt*,*ctxA*:*elt*为1:1~1:10时,两个靶标都能良好扩增,二者互相影响较小;如果*ctxA*浓度比*elt*高10倍以上,或*elt*浓度比*ctxA*高100倍以上,浓度低的靶标其扩增受到明显抑制。不同模板量对IAC扩增也有影响,*elt*或*ctxA*的量是IAC的100倍以上时,IAC扩增显著被抑制(Ct>33)。体系中所加的IAC对低水平的*ctxA*和*elt*模板扩增没有明显影响。*elt*或/和*ctxA*扩增良好时,IAC的扩增可能会被抑制,显示为阴性;*elt*和*ctxA*均阴性时,IAC应该得到扩增,显示为阳性;如果3个靶标均扩增阴性,提示体系中存在扩增抑制因素。

本研究以151株菌进行体系的特异性评价。这些菌株包括产毒性和非产毒性霍乱弧菌、*elt*阳性和阴性的EPEC、其他致泻性大肠埃希菌、沙门菌、志

贺菌、嗜水气单胞菌、拟态弧菌、副溶血弧菌和河弧菌。三重体系的检测结果与普通PCR检测结果一致,证明本体系的特异性良好。

参 考 文 献

- [1] Burnette WN. AB5 ADP-ribosylating toxins: comparative anatomy and physiology[J]. Structure, 1994, 2(3): 151-158.
- [2] Deer DM, Lampel KA, González-Escalona N. A versatile internal control for use as DNA in real-time PCR and as RNA in real-time reverse transcription PCR assays[J]. Lett Appl Microbiol, 2010, 50(4): 366-372.
- [3] Stacy-Phipps S, Mecca JJ, Weiss JB. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(5): 1054-1059.
- [4] Brasher CW, DePaola A, Jones DD, et al. Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR [J]. Curr Microbiol, 1998, 37(2): 101-107.
- [5] Tebbs RS, Brzoska PM, Furtado MR, et al. Design and validation of a novel multiplex real-time PCR assay for *Vibrio* pathogen detection[J]. J Food Prot, 2011, 74(6): 939-948.
- [6] Hidaka A, Hokyo T, Arikawa K, et al. Multiplex real-time PCR for exhaustive detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* [J]. J Appl Microbiol, 2009, 106(2): 410-420.

(收稿日期:2014-02-10)

(本文编辑:万玉立)