

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.10.009

基于 HAND 系统 5 种致腹泻大肠杆菌 多重实时 PCR 初筛方法的建立

Establishment of multiplex real-time PCR assays based on HAND system
for the preliminary screening of five diarrheagenic *Escherichia coli*

钟宜科¹ 王永霞¹ 赵彤¹ 贺晓明²

ZHONG Yi-ke¹ WANG Yong-xia¹ ZHAO Tong¹ HE Xiao-ming²

郭建树² 刘威² 邹大阳²

GUO Jian-shu² LIU Wei² ZOU Da-yang²

(1. 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 河北 邯郸 056038;

2. 中国人民解放军疾病预防控制中心, 北京 100000)

(1. Hebei University of Engineering, College of Life Sciences and Food Engineering, Handan, Hebei 056038, China;

2. Chinese PLA Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100000, China)

摘要:以实验室 17 株种属关系较近的菌株进行特异性评价,通过溶解曲线 T_m 值对扩增产物进行分析表明,该方法具有高特异性,可同时检出 5 种致泻性大肠杆菌 EAEC (*aggR*)、EHEC/EPEC (*eae*)、ETEC (*LT*) 和 EIEC (*ipaH*) 的相关毒力基因。粪便模拟样本试验表明,其敏感性达 $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL。建立的多重实时 PCR 检测方法适用于 5 种致泻性大肠杆菌的初步筛选。

关键词:致泻性大肠杆菌;多重实时 PCR;一管化

Abstract: The specificity of this method was evaluated by testing 17 species closely related bacteria in the laboratory, and the amplification product was analyzed by the T_m value of the dissolution curve, which had good specificity and could detect five different virulence genes: *aggR* for EAEC, *eae* for EHEC and EPEC, *LT* for ETEC, *ipaH* for EIEC in the same reaction tube. The fecal simulated samples showed that the sensitivity reached $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL. The multiplex real-time PCR detection method established in this experiment is suitable for the preliminary screening of five kinds of *Escherichia coli*.

Keywords: diarrheagenic *Escherichia coli*; multiplex real-time PCR; one tube

近 20 年,食源性疾病的发病率明显增加,已成为全球主要的公共问题之一^[1],而腹泻病占全球食源性疾病 50% 以上^[2]。大肠杆菌为主要致病性细菌之一^[3],根据致病机制及临床表现,常见的致腹泻大肠杆菌有 5 类:肠致病性大肠杆菌(*Enteropathogenic E. coli*, EPEC)、肠产毒性大肠杆菌(*Enterotoxigenic E. coli*, ETEC)、肠侵袭性大肠杆菌(*Enteroinvasive E. coli*, EIEC)、肠出血性大肠杆菌(*Enterohemorrhagic E. coli*, EHEC)和肠黏附性大肠杆菌(*Enteroadherent E. coli*, EAEC)^[4]。

传统的病菌检测方法操作复杂、耗时长;免疫学检测方法灵敏度不足,易造成假阴性。由于多重实时 SYBR Green PCR 由多种不同引物混合,很难克服多种引物间的相互干扰及引物二聚体的形成,使得反应体系扩增效率不均衡,稳定性差,造成结果不准确。而 HAND 系统,即相同标签辅助无引物二聚体系统(Homo-Tag Assisted Non-Dimer System, HANDS)^[5],是为了消除和减少引物二聚体的产生而设计的试验方法,以此提高检测结果的特异性^[6]。

试验拟通过 HAND 系统设计一种同源加尾引物在一管内能够同时检测 5 种大肠杆菌,可有效减少反应中二聚体及非特异性扩增的出现,且检测结果准确性高的方法。

基金项目:国家科技重大专项(编号:2018ZX10713-003);河北省邯郸市科技攻关项目(编号:1722201063-3)

作者简介:钟宜科,男,河北工程大学在读硕士研究生。

通信作者:刘威(1985—),男,中国人民解放军疾病预防控制中心副研究员,博士。E-mail: liuwei5269@qq.com

邹大阳(1987—),男,中国人民解放军疾病预防控制中心助理研究员,博士。

E-mail: zoudayang666@163.com

收稿日期:2019-05-29

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 引物

详见表 1、2。

1.1.2 试剂

乙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

引物:生工生物工程(上海)股份有限公司;

预混 SuperReal PreMix Plus(2×)、双蒸水、琼脂糖、D2000 DNA Marker、细菌基因组 DNA 提取试剂盒和粪便基因组 DNA 提取试剂盒购:天根生化科技(北京)有限公司;

10 000× Gelred;美国 Biotium 公司;

表 1 普通引物
Table 1 Common primers

菌株	目标基因	引物名字	引物序列(5'→3')	Genbank	位置	扩增片段长度	参考文献
ETEC	LT	LT-F	TTACGGCGT TACTATCCTCTCTA	X83966	233-255	275	[7]
		LT-R	GGTCTCGGT CAGATATGTGATTC		507-485		
EHEC 和 EPEC	eae	eae-F	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA	Z11541	899-924	102	[8]
		eae-R	CTCATGCGGAAATAGCCGTTA		1000-980		
EIEC	ipaH	ipaH-F	CTCTCAGAGGGTGGCTGACC	M32063	1672-1691	90	[9]
		ipaH-R	TCACGCATCACCTGTGCA		1761-1744		
EAEC	aggR	aggR-F	GTATACACAAAAGAAGGAAGCAATA	Z18751	202-226	221	[10]
		aggR-R	TTTGACCAATTCGGACAAC		422-404		

表 2 加尾引物及多重实时 PCR 溶解曲线 T_m 值[†]

Table 2 Tail primers and multiple real-time PCR dissolution curve T_m values ($n=10$)

菌株	目标基因	引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段长度	T_m
ETEC	LT	Tag-LT-F	GGAGGAAGGGTTAAGTGT TATTACGGCGT TACTATCCTCTCTA	315	82.20±0.250
		Tag-LT-R	GGAGGAAGGGTTAAGTGT TAGGTCTCGGT CAGATATGTGATTC		
EHEC 和 EPEC	eae	Tag-eae-F	GGAGGAAGGGTTAAGTGT TACATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA	142	81.05±0.150
		Tag-eae-R	GGAGGAAGGGTTAAGTGT TACTCATGCGGAAATAGCCGTTA		
EIEC	ipaH	Tag-ipaH-F	GGAGGAAGGGTTAAGTGT TACTCTCAGAGGGTGGCTGACC	130	86.45±0.105
		Tag-ipaH-R	GGAGGAAGGGTTAAGTGT TATCACGCATCACCTGTGCA		
EAEC	aggR	Tag-aggR-F	GGAGGAAGGGTTAAGTGT TAGTATACACAAAAGAAGGAAGCAATA	261	80.50±0.150
		Tag-aggR-R	GGAGGAAGGGTTAAGTGT TATTGACCAATTCGGACAAC		
尾巴引物		Tag-1	GGAGGAAGGGTTAAGTGT TTA		

[†] F. 正向引物;R. 反向引物。

10× loading buffer: 宝日医生物技术(北京)有限公司;

营养肉汤(NB)、营养琼脂(NA):北京陆桥技术股份有限公司。

1.1.3 仪器与设备

荧光定量 PCR 仪:CFX384 型,美国伯乐公司;

凝胶成像:GelDoc XR Biorad 型,美国伯乐公司;

荧光计:Invitroge Qubit 3 型,美国赛默飞世尔科技公司;

生物安全柜:1300 系列 II 级 A2 型,美国赛默飞世尔

科技公司;

小型台式离心机:5424 型,德国 Eppendorf 公司;

涡旋振荡器:VORTEX-5 型,江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 将甘油保存的菌株,划线于 NA 培养基上,37 °C 过夜培养,然后挑取单菌落,接种于 5 mL NB 培养基中,37 °C,180 r/min,过夜培养。

1.2.2 DNA 模板制备 取 1.2.1 细菌培养液 2 mL,离心取沉淀;向菌体沉淀中分别加入 200 μL GA、20 μL Pro-

teinaseK, 220 μL GB, 振荡, 70 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min; 加 220 μL 无水乙醇振荡混匀; 将细菌培养液离心所得溶液及絮状沉淀加入吸附柱中, 离心, 倒掉废液; 向吸附柱中加入 500 μL GD, 离心, 倒掉废液; 向吸附柱中加入 600 μL PW, 离心, 倒掉废液, 吸附柱 CB3 放入收集管中; 将吸附柱置于室温放置数分钟; 将吸附柱 CB3 转入干净离心管中, 向吸附膜滴加 100 μL TE, 离心, 将溶液收集到离心管中, 利用 Invitrogen Qubit 3 荧光计进行浓度测定, 然后稀释冻存备用。

1.2.3 单重实时 PCR 的建立 最终反应体系和反应程序: 单重实时 PCR 反应体系 (20 μL) 为 2 \times SYBR Green Mix 10 μL , 尾巴引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL 、上下游加尾引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.1 μL , 模板 2 μL , 双蒸水补足至 20 μL ; PCR 循环参数为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min 后; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 进行 35 个循环; 溶解曲线温度 65~95 $^{\circ}\text{C}$, 间隔 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 每 5 s 读数。

1.2.4 多重实时 PCR 建立 反应体系见表 3, 为了证明加尾系统能有效减少二聚体和非特异性扩增, 同时利用普通引物进行扩增, 反应体系见表 4, 两种扩增程序同 1.2.3, 琼脂糖凝胶电泳对比扩增产物。考虑到实际疫情爆发时, 样本中通常只有一种病原, 而同一反应体系中出现多种扩增靶序列时, 溶解曲线表现为多个连续的波峰, 不利于结果判断, 故每种反应体系只加入一种菌株 DNA 模板。

表 3 加尾引物反应体系

Table 3 Tail primer reaction system

反应体系	体积/ μL
2 \times SYBR Green Mix	10.0
Tag-1(10 $\mu\text{mol/L}$)	2.0
正向加尾引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.2(<i>aggk</i>), 0.1(<i>LT</i> , <i>eae</i> , <i>ipaH</i>)
反向加尾引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.2(<i>aggk</i>), 0.1(<i>LT</i> , <i>eae</i> , <i>ipaH</i>)
模板	2.0
ddH ₂ O	5.0
总体系	20.0

表 4 普通引物反应体系

Table 4 Common primer reaction system

反应体系	体积/ μL
2 \times SYBR Green Mix	10
正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1(<i>aggR</i> , <i>LT</i> , <i>eae</i> , <i>ipaH</i>)
反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1(<i>aggR</i> , <i>LT</i> , <i>eae</i> , <i>ipaH</i>)
模板	2
ddH ₂ O	2
总体系	20

1.2.5 多重 PCR 的特异性 对实验室保存的 17 株种属关系较近的菌进行检测, DNA 提取同 1.2.2, PCR 体系同 1.2.4, PCR 反应程序同 1.2.3, 生成扩增曲线及溶解曲线, 评价其特异性。

1.2.6 多重实时 PCR 的重复性、稳定性 每株菌进行 10 次重复, 对结果进行统计学分析, 计算 *C_t* 值的标准偏差 (*SD*) 及变异系数 (*CV*)^[11]。

1.2.7 粪便模拟样本检测

(1) 菌株的培养: 将甘油保存的菌株, 划线于营养肉汤琼脂培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 然后挑取单菌落, 接种于 5 mL 营养肉汤培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min, 过夜培养。用生理盐水调至麦氏浊度为 1 (菌浓度约为 3 \times 10⁸ CFU/mL)^[12], 然后进行 10 倍稀释, 使其终浓度为 3 \times 10³ CFU/mL。

(2) 粪便处理: 取 3 g 健康人粪便于 30 mL PBS 中, 混匀备用。

(3) 粪便模拟标本: 将 1.2.7(1) 的菌液与 1.2.7(2) 的粪便溶液按 1:1 (体积比) 进行混匀, 备用。

(4) 样本检测: 用 DNA 提取试剂盒进行粪便模拟标本 DNA 提取, 用 1.2.5 中多重荧光定量 PCR 反应体系及反应程序进行模拟标本的检测。

1.3 数据处理

运用 Excel 2010 对试验数据进行分析, 所有数据以 ($\bar{x} \pm SD$) 形式表示。

2 结果与分析

2.1 加尾引物单重荧光 PCR 的建立

由图 1 可知, 扩增产物目的条带单一, 与预期大小一致; 荧光曲线图呈现典型的“S”型曲线, 溶解曲线单一峰, 无非特异扩增。

2.2 多重实时 PCR 的建立

2.2.1 普通引物 由图 2(a) 可知, 普通引物具有良好扩增效率; 图 2(b) 中 EAEC(*aggR*)、EHEC(*eae*) 及 ETEC(*LT*) 溶解曲线峰不单一、阴性对照出现假阳性; 图 2(c) 中 A、D 泳道出现两条带, 其中一条为目的片段, 另一条为 100 bp 左右的非目的片段; 上述结果均表明普通引物产生了非特异性扩增。

2.2.2 加尾引物 由图 3 可知, 加尾引物具有良好的扩增效率, 4 对引物溶解曲线具有单一溶解峰, 阴性对照无非特异性扩增和二聚体的产生, 琼脂糖凝胶电泳进一步证实了加尾引物可有效减少二聚体。

对比图 2、3 可知, 在多重荧光定量 PCR 体系中, 加尾引物的特异性高于普通引物。

2.3 多重实时 PCR 的特异性

由表 5 可知, 1 株 EPEC、2 株 EHEC、1 株 EIEC、1 株 ETEC、1 株 EAEC 及 1 株志贺氏菌呈现阳性结果, 其余

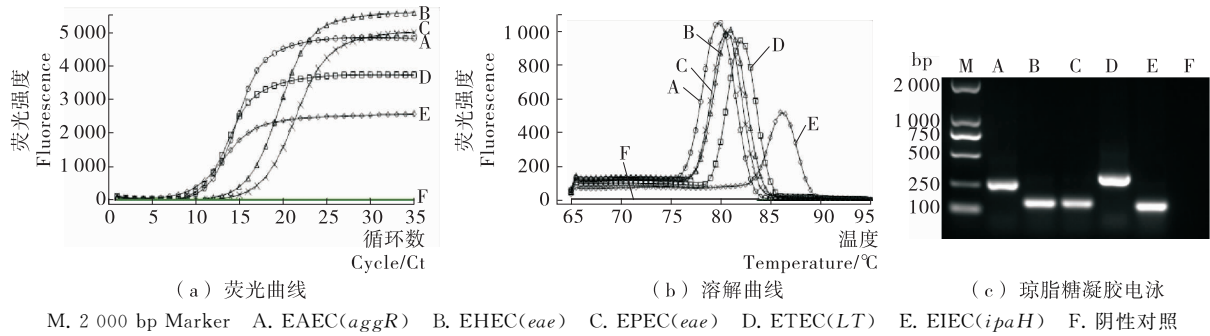


Figure 1 Single PCR fluorescence curve and agarose gel electrophoresis

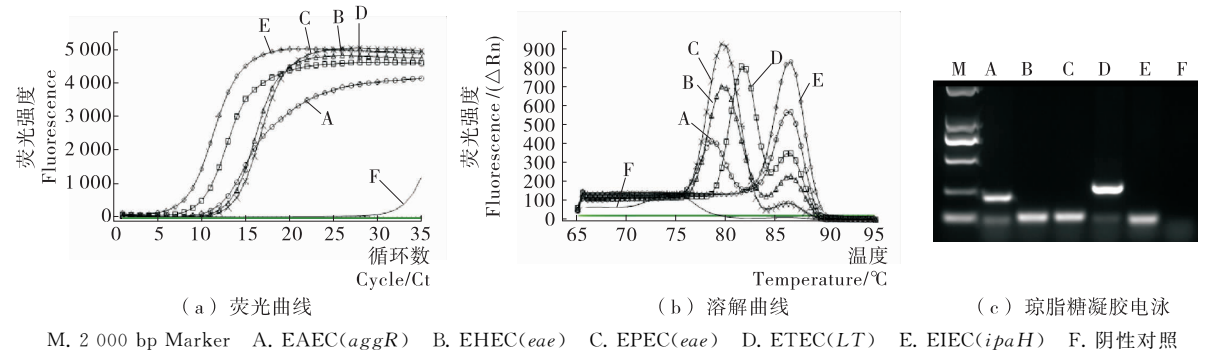


Figure 2 普通引物多重实时 PCR 扩增曲线及电泳图

Figure 2 Multiplex real-time PCR fluorescence curves and agarose gel electrophoresis of common primer

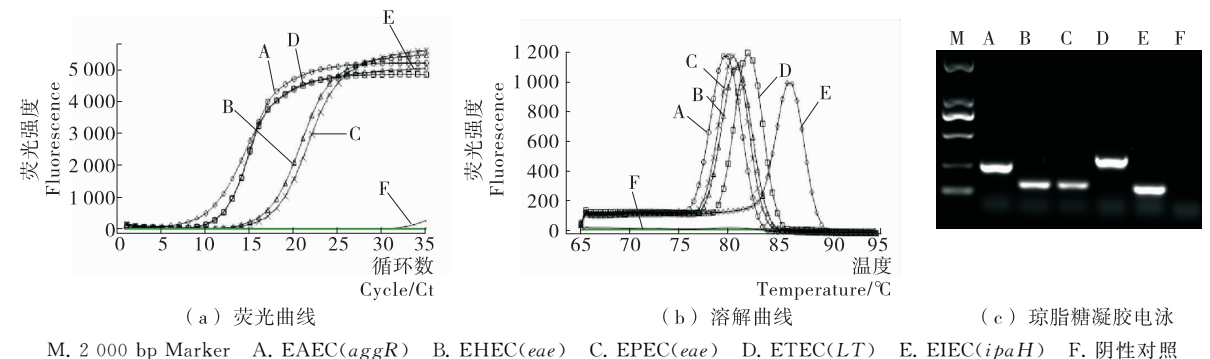


Figure 3 加尾引物多重实时 PCR 扩增曲线及电泳图

Figure 3 Multiplex real-time PCR fluorescence curves and agarose gel electrophoresis of tail primer

均为阴性。

Duttas 等^[13]研究表明, *eae* 引物既能扩增 EHEC 也能扩增 EPEC。志贺氏菌与 EIEC 具有类似的基因组特征和临床表现, 研究^[13]发现几乎所有引物未能区分志贺氏菌与肠侵袭性大肠杆菌。 *ipaH* 引物为 EIEC 与志贺氏菌群所共有引物, 试验中针对 EIEC 的 *ipaH* 引物也能扩增志贺氏菌, 在实际检测中可能无法区分这两种细菌。

2.4 多重实时 PCR 的重复性、稳定性

由图 4 可知, 每种大肠杆菌扩增曲线与溶解曲线基本一致, 而表 6 中, 5 种大肠杆菌 $Ct < 5\%$, 表明其具有良

好的重复性与稳定性。

2.5 粪便模拟样本检测

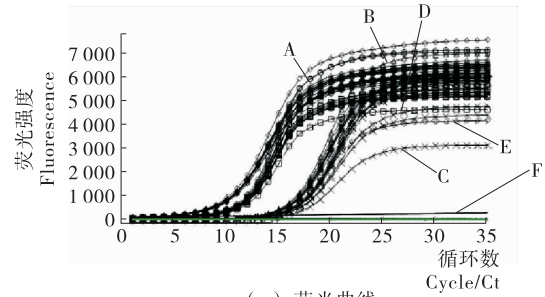
由图 5 可知, EAEC、EHEC、EPEC、ETEC、EIEC 检测灵敏度分别为 10^5 , 10^5 , 10^6 , 10^4 , 10^5 CFU/mL, 试验建立的多重 PCR 敏感性为 10^5 CFU/mL 左右。由于体系中有多个引物存在, 可能影响试验的敏感性, 而模拟样本较复杂, 含有粪便中的各种 DNA 模板。而在腹泻粪便样本中往往需进一步增菌培养, 菌液浓度远高于试验方法检测的最低限, 对检测结果无影响。此外试验方法检测的特异性不受复杂样本影响, 可保证结果的正确性。

表 5 多重实时 PCR 菌株的测定[†]

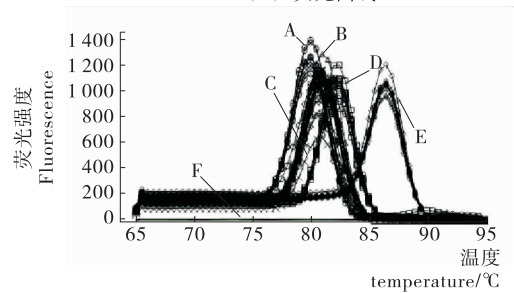
Table 5 Determination of multiplex real-time PCR strains

菌株	每对引物 PCR 结果			
	<i>LT</i>	<i>eae</i>	<i>ipaH</i>	<i>aggR</i>
EPEC	—	+	—	—
EHEC	—	+	—	—
EIEC	—	—	+	—
福氏志贺氏菌	—	—	+	—
EAEC	—	—	—	+
肠炎沙门氏菌	—	—	—	—
鼠伤寒沙门氏菌	—	—	—	—
ETEC	+	—	—	—
副溶血弧菌	—	—	—	—
EHEC	—	+	—	—
结肠弯曲菌	—	—	—	—
金黄色葡萄球菌	—	—	—	—
类志贺邻单胞菌	—	—	—	—
霍乱弧菌	—	—	—	—
假结核耶尔森菌	—	—	—	—
小肠结肠炎耶尔森菌	—	—	—	—
副溶血弧菌	—	—	—	—

† “—”为阴性结果;“+”为阳性结果。



(a) 荧光曲线



(b) 溶解曲线

A. EAEC (*aggR*); B. EHEC (*eae*); C. EPEC (*eae*); D. ETEC (*LT*); E. EIEC (*ipaH*); F. 阴性对照

图 4 5 种大肠杆菌多重实时 PCR 重复性扩增曲线

Figure 4 Reproducible amplification curves and dissolution curves of multiplex real-time PCR for five kinds of *Escherichia coli*

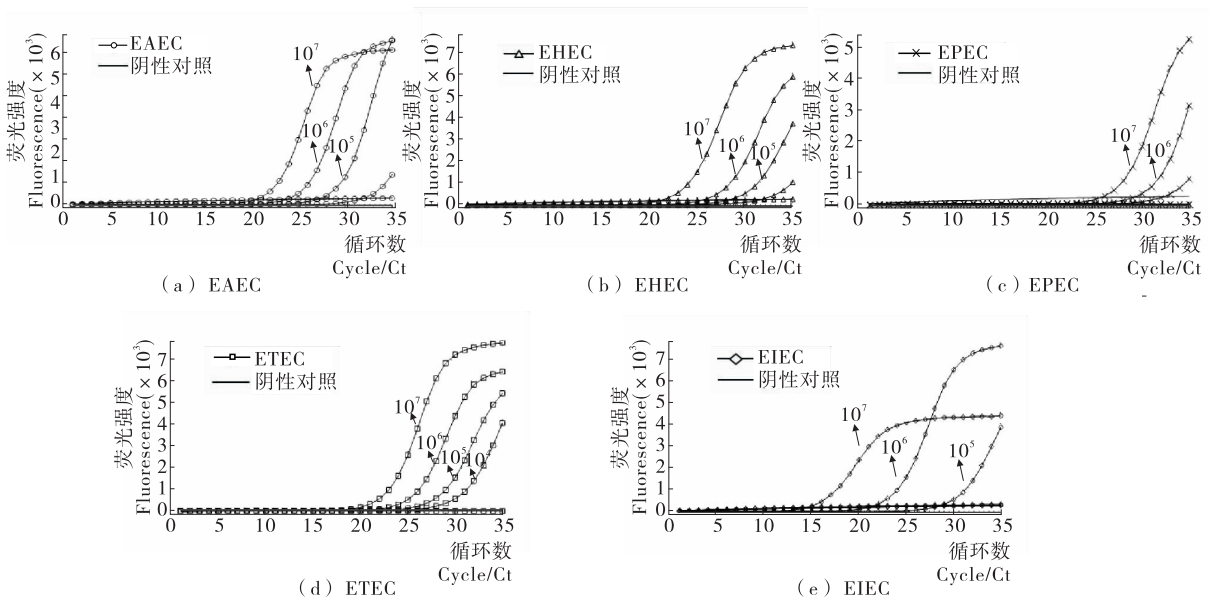


图 5 5 种大肠杆菌模拟样本敏感性

Figure 5 Sensitivity of five simulated samples of *Escherichia coli*

表 6 5 种大肠杆菌多重实时 PCR 的重复性、稳定性

Table 6 Repeatability and stability of five *Escherichia coli* multiplex real-time PCR

菌株	<i>Ct</i>	CV/%	菌株	<i>Ct</i>	CV/%
EAEC	10.558±0.196 051	2	ETEC	10.791±0.198 567	2
EHEC	15.492±0.224 491	1	EIEC	8.406±0.149 947	2
EPEC	16.533±0.424 336	3			

3 结论

将 HAND 系统与多重实时 PCR 结合,建立了一种在单管内能同时检测 5 种致泻性大肠杆菌的快速检测方法,敏感性为 $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL。相比于常规多重实时 PCR 检测,该方法明显降低了非特异性扩增,具有更高的特异性。试验克服了核酸检测中特异性的问题,避免了假阳性的产生,提高了检测的准确性,满足对致泻性大肠杆菌的初步筛选。但试验方法的敏感性较低,后续可通过增加检测循环数和筛选更优引物以提高检测限。

参考文献

- [1] OLIVER S P, JAYARAO B M, ALMEIDA R A. Food-borne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2005, 2(2): 115-129.
- [2] 赵怀龙, 付留杰, 唐功臣. 我国主要的食源性致病菌[J]. 医学动物防制, 2012, 28(11): 1 212-1 216.
- [3] COHEN M B, NATARO J P, BERNSTEIN D I, et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: A prospective controlled study[J]. Journal of Pediatrics, 2005, 146(1): 1-61.
- [4] GUION C E, OCHOA T J, WALKER C M, et al. Detection of diarrheagenic escherichia coli by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(5): 1 752-1 757.
- [5] BROWNIE J. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(16): 3 235-3 241.
- [6] 滕勇勇. 基于 HAND 系统的腹泻病原体多重 PCR 检测方法的建立和应用研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2014: 15-16.
- [7] FURRER B, CANDRIAN U. Detection and identification of *E. coli* producing heat labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 10(1): 31-34.
- [8] NIELSEN E M, ANDERSEN M T. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(7): 2 884-2 893.
- [9] FUKUSHIMA H, KAWASE J, ETOH Y, et al. Simultaneous screening of 24 target genes of foodborne pathogens in 35 foodborne outbreaks using multiplex real-time SYBR green PCR analysis[J]. International Journal of Microbiology, 2010, 2 010(6): 1-18.
- [10] JUN K, YOSHIKI E, TETSUYA I, et al. An improved multiplex real-time SYBR green PCR assay for analysis of 24 target genes from 16 bacterial species in fecal DNA samples from patients with foodborne illnesses[J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2016, 69(3): 191-201.
- [11] 刘宽. 食源性致病菌多重荧光定量 PCR 检测体系的建立[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018: 33.
- [12] ANDREWS J M. Determination of minimum inhibitory concentrations[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, 48(1): 5-16.
- [13] DUTTA S, CHATTERJEE A, DUTTA P, et al. Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhoea in Calcutta, In dia[J]. Journal of Medical Microbiology, 2001, 50(8): 667.

信息窗

美国修订氟啉虫胺脒在大米和鳄梨中的残留限量

据美国联邦公报消息,2019年10月25日,美国环保署发布 2019-23384 号条例,修订氟啉虫胺脒(sulfoxaflor)在大米和鳄梨中的残留限量。

美国环保署就氟啉虫胺脒毒理性、致癌性等方面进行了风险评估,最终得出结论认为,以下残留限量是安全的。

商品	Parts per million(mg/kg)
鳄梨	0.15
大米(谷物)	5.00
大米(带壳)	15.00

据了解本规定于 2019 年 10 月 25 日起生效,反对或听证要求需在 2019 年 12 月 24 日前提交。

(来源: <http://news.foodmate.net>)