

MGB(Minor Groove Binder)复合探针二重 实时定量 PCR 检测大肠杆菌 O157 *

朱向玲^{1,2} 严亚贤^{1* *} 陆承平^{1,2} 刘佩红³ 王建³ 沈莉萍³

(上海交通大学农业与生物学院 上海 201101) (南京农业大学动物医学院 南京 210095)

(上海市畜牧兽医站 上海 201103)

摘要 :以大肠杆菌 O157 *rfbE* 和 *stx2* 为待检靶基因,设计两对引物和两条 MGB 探针,*rfbE* 和 *stx2* 探针 5'端分别用 FAM 和 VIC 基团标记,3'端均用 Taqman-MGB 标记。建立并优化了检测大肠杆菌 O157 的二重荧光定量 PCR 方法,可检测的最低 DNA 浓度是 10 拷贝/ μ L。实验中 O157 菌株检测结果均为 *rfbE* 阳性,而非 O157 菌株检测结果均为阴性。重复性实验中,批间差异小于 80%,批内差异小于 70%。实验结果显示此二重荧光定量 PCR 方法可对分离的可疑大肠杆菌 O157 菌株进行快速鉴定,同时得知菌株是否携带 *stx2* 毒力基因,有利于菌株毒力强弱的判定。

关键词 :大肠杆菌 O157, 荧光定量 PCR, MGB 探针, *rfbE*, *stx2*

中图分类号:Q93-3 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0897-04

Application of Duplex Real-time PCR for Detection of *Escherichia coli* O157 by Using MGB Fluorescence Probe *

ZHU Xiang-Ling^{1,2} YAN Ya-Xian^{1* *} LU Cheng-Ping^{1,2} LIU Pei-Hong³ WANG Jian³ SHEN Li-Ping³

(Agricultural and Biological College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101)

(Veterinary College of Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

(Shanghai Animal Husbandry and Veterinary Station, Shanghai 201103)

Abstract :A duplex real-time PCR, based on Taqman hybridization probes technology, were developed and applied to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. Two pairs of primer and two probes were designed for detection *rfbE* and *stx2* genes. the *rfbE* probe was 5' end labeled with FAM) and 3' end labeled with Taqman-MGB. The *stx2* probe was 5' end labeled with VIC and 3' end labeled with Taqman-MGB. The detection limits of the sensitivity assays were 10¹ copies/ μ L of DNA; the qualitative consensus PCR assay indicated all *Escherichia coli* O157 were found *rfbE* positive and did not detect DNA from non- O157 isolates. In the duplicated experiment, coefficients of variation intra-assay and inter-assay over the dynamic range of the MGB probe assays were lower than 70% and 80%, respectively. These results show that this duplex real-time PCR can detect the *Escherichia coli* O157 and *stx2* gene from samples rapidly, and that the virulence of the strains were known.

Key words :*Escherichia coli* O157, Duplex real-time PCR, MGB probe, *rfbE*, *stx2*

肠出血性大肠杆菌(EHEC)O157可引起腹泻、出血性肠炎(HC),严重的可引起溶血性尿毒综合征(HUS),血栓形成性血小板减少性紫癜(TTP),其中并发HUS和TTP者死亡率高达80%左右,危害十分严重^[1]。O157的感染剂量极低,食入不足10个细菌能在短时间内迅速繁殖引起疾病^[2]。因此,急需建立一种快速、敏感的检测方法,以有效预防大肠杆菌O157感染。

大肠杆菌O157特异性基因的检测是鉴定大肠杆菌O157的必需指标。*rfbE*基因编码大肠杆菌O157菌体O抗原特异合成酶,参与O抗原脂多糖的生物合成,是鉴定大肠杆菌O157的依据^[3]。类志贺毒素(Shiga-like toxin)也称为志贺毒素(Shiga toxin, Stx),由于该毒素可致Vero细胞病变,因此也称为Vero毒素,目前专家推荐统一使用志贺毒素(Stx),它是大肠杆菌O157的主要毒力因子之一,现

* 上海市科技兴农重点攻关项目(No. 沪农科攻字(2004)第11-4号),上海市科委项目(NO.05d05012)

** 通讯作者 Tel: 021-64789734, E-mail: yanyaxian@sjtu.edu.cn

收稿日期:2006-12-11, 修回日期:2007-05-08

已证实 Stx 毒素与溶血性尿毒综合征相关, Stx 有 Stx 1 和 Stx 2, Stx2 对人的肾脏微血管内皮细胞的毒性作用比 Stx1 强 1000 倍, 因此本文将 *stx2* 基因作为 O157 毒力指标。近年来, 实时定量 PCR 技术发展迅速, 已广泛应用于多个领域, 在反应体系中加入染料或特异性探针, 能实时监控反应的进程, 无需通过 PCR 反应后的电泳和 EB 染色^[4], 即可观察到产物的量, 并可对样本中的微生物进行准确的定性和定量。Taqman-MGB(MGB-Minor Groove Binder, 小沟结合物) 探针法是高度特异的定量 PCR 技术, 由于探针和模板是特异性结合, 所以荧光信号的强弱代表模板的数量, 适合在同一个反应体系中对多个目的基因进行定量。因此本试验采用 Taqman-MGB 探针建立了二重荧光定量 PCR 检测大肠杆菌 O157。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

Mastermix 购于北京鼎国生物技术有限公司, 引物和探针由上海基康生物技术有限公司合成, 琼脂糖(Agarose), LB 培养基均购自上海生工生物工程有限公司, 实时荧光定量 PCR 仪(OPTICON 2 型, MJ Research 公司)

1.2 菌株

63 株临床分离可疑菌株是由本实验室及上海市畜牧兽医站从临床动物样本中分离所得, 经生化鉴定和血清学鉴定 13 株为大肠杆菌 O157, 50 株为非 O157 大肠杆菌。阴性对照为本实验室保存的链球菌、粘质沙雷氏菌、沙门氏菌和非 O157 大肠杆菌。阳性对照为大肠杆菌 O157 ATCC 43889, 由本实验室保存。

1.3 引物和 MGB 探针的设计合成

以 *rfbE* 和 *stx2* 基因作为待检靶基因, 通过比对已经发表的肠出血性大肠杆菌 O157 的特异性序列, 设计了两条 MGB 探针和两对引物, 以 *rfbE* 为靶基因的探针, 5' 端用 FAM(6-羧基荧光素) 基团标记^[5], 3' 端用 Taqman-MGB 标记, 以 *stx2* 为靶基因的探针, 5' 端用 VIC 基团标记, 3' 端用 Taqman-MGB 标记(表 1)。

1.4 *rfbE*、*stx2* 基因的克隆

以大肠杆菌标准菌株 DNA 为模板, 分别扩增 *rfbE*、*stx2* 目的基因, PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电

泳, 采用小量胶回收试剂盒从 PCR 产物中回收目的基因, 保存以备构建重组质粒。

表 1 二重荧光定量 PCR 的引物和探针

| 引物和探针 | 序列 (5'-3') | 产物长度 (bp) | T _m 值 (°C) |
|--------------------|---------------------------|--------------|--------------------------|
| <i>rfbE</i> -F | CTAGGACCGCAGAGAAAGAGA | 107 | 59 |
| <i>rfbE</i> -R | TTCGAGTACATTGGCATCGT | | 59 |
| probe- <i>rfbE</i> | ATTAAGGAATCACCTTGCAGAT | | 69 |
| <i>stx2</i> -F | ACCACATCGGTGTCTGTATTAAACC | 144 | 59 |
| <i>stx2</i> -R | AACGAACCCGGCCACATATA | | 59 |
| probe- <i>stx2</i> | TTTGCTCAATAATCAGACGAA | | 69 |

1.5 重组质粒(标准样品)的构建

将 pMD 18-T Vector 和目的 DNA 以 1:3 的比例连接, 16°C 11h, 连接产物转化 DH5 α 感受态大肠杆菌细胞。将已转化的感受态大肠杆菌涂布在含有氨苄青霉素(100 μ g/mL) 的培养基上, 37°C 培养 12h ~ 16h。挑取阳性菌落, 于含有氨苄青霉素(100 μ g/mL) 的 LB 中震荡培养 37°C 12h ~ 16h, 菌液提取质粒, 采用 *Eco*R I、*Pst* I 双酶切后 PCR 鉴定。此重组质粒作为二重荧光定量 PCR 的标准样品。

1.6 二重荧光定量 PCR 反应体系和反应条件的确立

以 58°C 为起始退火温度, 1°C 为幅度逐渐上调和下调, 以确定最佳退火温度。*rfbE*、*stx2* 的探针起始浓度均为 0.5 μ mol/L, 引物起始浓度均为 0.5 μ mol/L, 逐步改变探针和引物的浓度使 *rfbE*、*stx2* 的扩增效率最接近。

1.7 特异性

用经生化鉴定和血清学鉴定为阳性的 13 株 O157 大肠杆菌、50 株非 O157 大肠杆菌, 以及阴性和阳性对照作荧光定量 PCR, 比较检测结果。

1.8 敏感性

将标准样品重组质粒作 10 倍比稀释, 稀释至 10 拷贝/ μ L。大肠杆菌 O157 标准株用碱裂解法和煮沸法提取基因组, 作 10 倍比稀释, 同时将大肠杆菌 O157 标准株的纯培养液作 10 倍比稀释, 对以上各稀释度进行荧光定量 PCR, 以确定反应能检测出的最低拷贝数。

1.9 单一和双重荧光定量 PCR 检测结果比较^[6]

以不同稀释度的大肠杆菌 O157 标准株作为待

检样品,进行单一和双重荧光定量 PCR,单一和双重反应中模板、引物、探针浓度,PCR 循环参数均一致。比较双重 PCR 是否存在干扰。

1.10 动力学范围^[7]

将标准样品重组质粒作 10 倍比稀释,分别以浓度为 10 拷贝/ μL ~ 10^{11} 拷贝/ μL 的标准样品作为模板,得出的结果进行分析,确定一个线性范围。

1.11 重复性

1.11.1 批内差异:分别以浓度为 10 拷贝/ μL ~ 10^{11} 拷贝/ μL 的标准样品作为模板,每个稀释度的标准样品作 5 个重复,进行荧光定量 PCR,对结果进行统计学分析,计算每个稀释度 CT 值和拷贝数的标准偏差(s)与变异系数(CV)。

1.11.2 批间差异:分别以浓度为 10 拷贝/ μL ~ 10^{11} 拷贝/ μL 的标准样品作为模板,每次 PCR 每个稀释度作一管,作 5 次重复,对结果进行统计学分析,计算每个稀释度 CT 值和拷贝数的标准偏差(s)与变异系数(CV)。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

PCR 扩增产物电泳后在 100bp 和 150bp 处有可见的目的条带。采用 *EcoR* I、*Pst* I 双酶切后电泳结果在 150bp 和 200bp 处有可见条带,与目的条带大小一致。将已确定插入目的片断的重组质粒,提取重组质粒 DNA 作 10 倍比稀释,重复 3 次测 OD 值,取平均值,按照以下公式计算质粒的拷贝数。

$$\text{copies}/\mu\text{L} = \frac{6 \times 10^{23} \times \text{OD 值}^{[8]}}{\text{分子量}}$$

2.2 二重荧光定量 PCR 反应体系和反应条件的确立

PCR 反应体系为 20 μL , 10 μL Mastermix(2 \times), 0.5 $\mu\text{mol/L}$ *rfbE-F*, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ *rfbE-R*, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ *stx2-F*, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ *stx2-R*, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ Probe-*rfbE*, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ probe-*stx2*, 3.2 μL 水, 2 μL 模板。循环条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 4min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 共循环 50 次。60 $^{\circ}\text{C}$ 读取荧光值,此反应体系获得检测结果稳定。

2.3 特异性

用建立的荧光定量 PCR 对 63 株临床分离菌进行检测,阳性和阴性对照均成立,检测结果为 13 株为大肠杆菌 O157, 50 株为非 O157 大肠杆菌,与血清

学的检测结果的阴阳性符合率均达 100%,假阳性率为 0%。

2.4 敏感性

分别用 10 倍比稀释的标准样品、碱裂解法、煮沸法提取的基因组,以及 10 倍比稀释的细菌纯培养液作为基因扩增的模板,进行荧光定量 PCR,此反应体系能检测出的最低 DNA 浓度为 10 拷贝/ μL 。

2.5 单一和双重荧光定量 PCR 检测结果比较

在动力学范围内,单一和双重荧光定量 PCR 的 CT 值接近,表明双重 PCR 反应体系已最优化,两种荧光探针无相互干扰。

2.6 动力学范围

当检测的模板浓度在 10^2 拷贝/ μL ~ 10^{11} 拷贝/ μL 之间时,相关系数为 0.996,所得到的实验结果比较准确,见图 1。即 DNA 浓度在 10^2 拷贝/ μL ~ 10^{11} 拷贝/ μL 之间时,所得的荧光曲线与所检测的靶基因浓度之间具有较好的相关性。

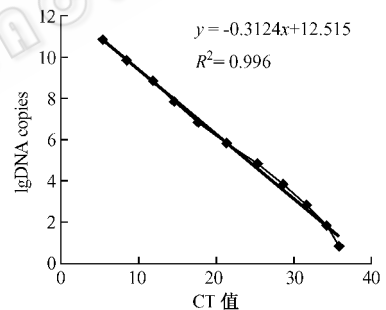


图 1 10 拷贝/ μL ~ 10^{11} 拷贝/ μL DNA 标准曲线

2.7 重复性

2.7.1 批内差异:由图 2 可知,所有稀释度的变异系数均小于 100%,即批内差异较小,在动力学范围内具有较好的重复性。

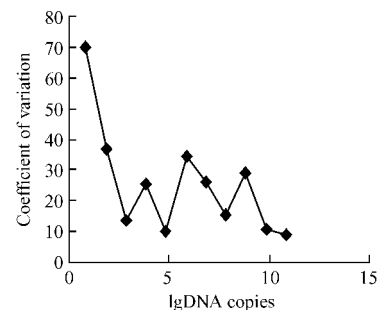


图 2 批内试验的变异系数(%)

2.7.2 批间差异:由图 3 可知,所有稀释度的变异系数均小于 100%,即批间差异较小,在动力学范围内具有较好的重复性。

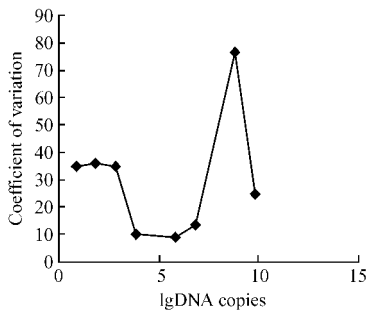


图3 批间试验的变异系数(%)

3 讨论

近年来 荧光定量 PCR 已广泛应用于生物、医药等各个领域,国内已有报道运用荧光定量 PCR 对大肠杆菌 O157 进行检测^[9,10],本文所建立的方法与之相比有以下特点:1)设计、合成了两条 MGB 探针,具有更高的特异性和敏感性。2)建立的二重荧光定量方法,在一个体系中能同时检测两种基因,可以有效的节约成本,并更能体现快速。结果表明本实验所建立的荧光定量 PCR 敏感性高,双重 PCR 两种荧光探针无相互干扰,当 DNA 浓度为 10 拷贝/ μL ~ 10^{11} 拷贝/ μL 时,批内和批间差异分别小于 70% 和 80%,实验结果稳定,且特异性强。

本文设计了两条 MGB 探针,5'端分别用 FAM 和 VIC 标记,3'端用非荧光淬灭基团标记,建立的检测方法具有更高的特异性和敏感性。在实验过程中采用了 3 种方法处理模板:水煮法、碱裂解法提取 DNA 和直接用细菌培养液作为模板。当样本中的细菌含量较低时,用碱裂解法提取模板过程中,会损失大量的基因组,不能作到准确定量,此时用水煮法提模板或直接用细菌培养液作为模板较好。

当样本中的细菌含量较高时,其中含抑制 PCR 反应的物质相对较高,用碱裂解法提取模板可除去大部分抑制物,有利于提高 PCR 扩增效率。由实验可知当样品的 CT 值在 15 ~ 30 时,定量相对准确,如果样本中细菌的含量过高,可适当稀释,以提高准确性。实验中标准样品是纯化的重组质粒,成分比较单一,而且重组质粒的长度较细菌基因组短,此外,通常待检样本中含有较多的抑制 PCR 反应物,因此,标准品的扩增效率比未知样品的扩增效率高很多,这就需要在建立二重 PCR 反应体系时充分优化,使待检样品和标准品的扩增效率接近,本实验中二重荧光定量 PCR 与单一 PCR 的扩增结果一致,表明所建立的检测体系已得到了很好的优化。

参考文献

- [1] Riley L W, Remis R S, Helgerson SD, et al. N Engl J Med, 1983, **308**: 681 ~ 683.
- [2] Paton AW, Paton JC. J Clin Microbiol, 1998, **36**(2): 598.
- [3] Patricia MD, Sima SB, Narelle F, et al. J Clin Microbiol, 1998, **36**(6): 1801 ~ 1804.
- [4] Ken JY, Karen CJ, Stephen D, et al. Molecular and Cellular probes, 2003, **17**: 275.
- [5] Vijay KS, Evelyn A DN. Veterinary Microbiology, 2003, **93**: 249.
- [6] Karen CJ, Ken JY, Stephen DW. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**(10): 6327 ~ 6333.
- [7] Nicola D, Gabriella E, Vito M, et al. Journal of Virological Methods, 2006, **133**: 92 ~ 99.
- [8] Sebastien M, Deborah DC, Michel S, et al. Journal of Microbiological Methods, 2005, **60**: 79.
- [9] 陈苏红, 张敏力, 张政, 等. 解放军预防医学杂志, 2005, **23**(6): 403.
- [10] 朱海, 杨泽, 李小燕, 等. 现代预防医学, 2006, **33**(8): 1437 ~ 1439.