

# 多重 PCR 鉴定不同毒素型的产气荚膜梭菌菌落

赵 耘\* 杜昕波 李伟杰 康 凯 陈 敏

(中国兽医药品监察所 北京 100081)

**摘 要:** 参照文献报道的产气荚膜梭菌 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\tau$ 毒素基因 *cpa*、*cpb*、*etx* 及 *iA* 序列合成了针对 4 种毒素基因的 4 对特异引物, 建立了一种简单的产气荚膜梭菌定型的菌落多重 PCR 方法。结果本所保存的 A, B, C, D, E 各型产气荚膜梭菌参考菌株均扩增出了相应的预期条带, 而诺维氏梭菌、腐败梭菌和破伤风梭菌的扩增均为阴性; 将单个菌落稀释 100 倍利用此菌落多重 PCR 仍能扩增到相应的目的片段。并利用此多重 PCR 对 13 株不同动物来源的产气荚膜梭菌进行了定型鉴定, 并与毒素中和试验鉴定结果进行了比较, 结果表明两种方法具有较高的符合率。本方法的建立对于产气荚膜梭菌的快速检测、定型具有十分重要的意义。

**关键词:** 产气荚膜梭菌, 菌落多重 PCR, 定型, 毒素

## Toxintyping of *Clostridium perfringens* Strains by Colony Multiplex PCR

ZHAO Yun\* DU Xin-Bo LI Wei-Jie KANG Kai CHEN Min

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081)

**Abstract:** Four primers against the genes encoding (*cpa*, *cpb*, *etx*, and *iA*) four major toxins( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\tau$ ) of *Cl. perfringens* were designed and the colony multiplex PCR of identification and genotyping of *Cl. perfringens* strains were developed. *Cl. perfringens* reference strains stored in china institute of veterinary drug control including A, B, C, D and E genotyping were genotyped using the colony multiplex PCR assay. The expected sequences were obtained successfully by the colony multiplex PCR assay. But the sequences were not obtained from *Cl. novyi*, *Cl. septicum* and *Cl. tetani*. The expected sequences were obtained from *Cl. perfringens* individual colony diluted to 100 times with 0.85% saline solution. 13 *Cl. perfringens* strains isolated from diferent animals were genotyped using the colony multiplex PCR assay, and the results were compared with the results of toxins neutranization test in mice. The two assays showed good accordance. These results showed that the development of the colony multiplex PCR is very important for early and fast identification and genotyping of *Cl. perfringens* in china.

**Keywords:** *Clostridium perfringens*, Colony multiplex PCR, Genotype, Toxin

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*), 旧称魏氏梭菌(*Clostridium welchii*)或产气荚膜杆菌

(*Bacillus perfringens*), 在自然界分布极广, 在一定条件下可引起多种严重疾病。产气荚膜梭菌致病作

用主要在于它所产生的 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$  4种毒素<sup>[1]</sup>, 据此产气荚膜梭菌分为A、B、C、D、E 5个型。A型菌主要引起人气性坏疽和食物中毒, 也可引起动物的气性坏疽, 还可引起牛、羔羊、新生羊羔、野山羊、驯鹿、仔猪和家兔等的肠毒血症; B型菌主要引起羔羊痢疾, 还可引起驹、犊牛、羔羊、绵羊和山羊的肠毒血症或坏死性肠炎; C型菌主要是绵羊猝狙的病原, 也能引起羔羊、犊牛、仔猪和绵羊的肠毒血症、坏死性肠炎以及人的坏死性肠炎; D型菌引起羔羊、绵羊、山羊、牛以及灰鼠的肠毒血症; E型菌可致犊牛、羔羊肠毒血症, 但很少发生。

产气荚膜梭菌定型是本菌鉴定的一个重要方面。目前进行产气荚膜梭菌定型的方法主要是针对其产生的毒素进行的中和保护试验, 其方法费时、费力。因此有必要建立快速、简便及特异的检测方法。多重PCR技术是指在同一反应体系中, 加入多对引物, 对多个目的基因同时进行扩增的方法。本研究利用4对特异引物建立了产气荚膜梭菌A、B、C、D、E 5型的菌落多重PCR方法, 并对13株产气荚膜梭菌进行了复核验证, 以期达到快速疾病诊断、细菌鉴定和分型的目的。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

产气荚膜梭菌参考菌株 A 型(C57-1)、B 型(C58-3)、C 型(C59-3)、D 型(C60-3)和 E 型(WE)由中国兽医药品监察所菌种保藏中心保藏; 13 株产气荚膜梭菌(C38、C39、C43、C44、C47、C52、C54、C56、C84、C1134、C1168、C2020 和 C2030)由中国兽医药品监察所菌种保藏中心保藏, 其中 C38、C39、C43、C44、C47、C52、C1134、C2020 和 C2030

菌株为 A 型, C54、C56 菌株为 B 型, C84、C1168 菌株为 D 型, 均为中和试验结果; 诺维梭菌(C61-1)、腐败梭菌(C55-1)、破伤风梭菌(C66-1), 由中国兽医药品监察所菌种保藏中心保藏。

### 1.2 菌株培养

将冻干保存的产气荚膜梭菌、诺维梭菌、腐败梭菌、破伤风梭菌用适量营养肉汤复原溶解, 产气荚膜梭菌、诺维梭菌、腐败梭菌取适量接种厌氧肉肝汤培养基; 破伤风梭菌取适量接种煮肉培养基。37 温箱培养过夜。用接种环钩取培养物适量划线接种在血平板上, 37 厌氧培养 12 h~16 h。将培养物保存于 4 冰箱。其菌落直接作为 PCR 反应的模板。

### 1.3 PCR 引物合成

参照文献[2]报道, 由 invitrogen 公司合成了 4 对针对  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$  毒素编码基因(*cpa*、*cpb*、*etx* 及 *iA*)的特异引物。将各引物浓度稀释至 25 nmol/ $\mu$ L, 置 -20 保存备用。引物的序列、位置及扩增片段大小见表 1。

### 1.4 PCR 扩增

PCR反应总量为 50  $\mu$ L, 取一洁净薄壁PCR管, 依次加入 10  $\times$  PCR缓冲液(含 25 mmol MgCl<sub>2</sub>) 5  $\mu$ L、4 对引物(25 nmol/ $\mu$ L)各 1  $\mu$ L、dNTPs (10 mmol/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L、双蒸水 33  $\mu$ L, 从 4 冰箱取出各菌株血平板培养物, 用灭菌枪头挑取平板上的单个菌落, 悬浮于各 PCR 管, 于 PCR 仪上 94 10 min 预变性, 冰浴 2 min, 分别加入 Taq 酶 (5 U/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, 于 PCR 仪进行如下反应: 94 30 s, 52 30 s, 72 1 min 30 s, 进行 30 个循环; 然后 72 10 min。PCR 完成后取 5  $\mu$ L PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶中 90 伏 30 min~40 min, 用凝胶成像系统观察结果并拍照。

表 1 引物的序列与位置  
Table 1 The sequence and position of primer

基因 Gene	引物序列 The sequence of primer	位置 The position of primer	扩增片段大小 Size (bp)
<i>cpa</i>	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	1438-1457	324
	CCTCTGATACTGTGTAAG	1762-1743	
<i>cpb</i>	GCGAATATGCTGAATCATCTA	871-891	196
	GCAGGAACATTAGTATATCTTC	1067-1046	
<i>etx</i>	GCGGTGATATCCATCTATTC	227-246	665
	CCACTTACTTGTCTACTAAC	882-862	
<i>iA</i>	ACTACTCTCAGACAAGACAG	275-294	446
	CTTTCCTTCTATTACTATACG	721-701	

### 1.5 最佳反应条件的测定

分别利用 4 对引物进行 A、B、C、D、E 5 型菌单项 PCR 方法最佳引物浓度(25  $\mu\text{mol/L}$  和 5  $\mu\text{mol/L}$ ) 及最佳 dNTP 浓度(5 mmol/L, 7.5 mmol/L, 10 mmol/L) 的滴定; 最佳引物浓度及最佳 dNTP 浓度确定后, 将 C58-3 和 WE 两菌株菌落混合, 以最佳引物浓度及最佳 dNTPs 浓度利用梯度 PCR 仪进行多重 PCR 方法最佳退火温度的测定; 确定最佳退火温度后, 以确定的最佳条件进行多重 PCR 方法最佳循环次数的测定。

### 1.6 敏感性测定

将 B 型菌(C58-3)与 E 型菌(WE)两菌株随机挑取的单菌落混合, 菌落溶于 10  $\mu\text{L}$  去离子水后, 进行倍比稀释, 每个稀释度分别取 1  $\mu\text{L}$  作为多重 PCR 反应模板, 进行多重 PCR 扩增, 以检测其敏感性。

### 1.7 特异性测定

利用所选择的最佳条件分别对产气荚膜梭菌各型参考菌株(C57-1、C58-3、C59-3、C60-1 和 WE)、诺维氏梭菌、腐败梭菌和破伤风梭菌进行多重 PCR, 以检测其特异性。

### 1.8 多重 PCR 的初步应用

将本所保存的 13 株产气荚膜梭菌分别进行菌株培养、菌落多重 PCR, 并与毒素中和试验结果进行比较。

## 2 结果

### 2.1 最佳反应条件的测定

**2.1.1 PCR 引物及 dNTP 浓度测定:** 分别对 4 对引物 2 个不同浓度及 dNTP 3 个不同浓度进行棋盘滴定, 对 PCR 产物电泳(电泳图像略)条带亮度与 Marker(可粗略定量)进行了比较, 结果表明引物最佳浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$ , dNTP 最佳浓度为 7.5 mmol/L ~ 10 mmol/L。

**2.1.2 最佳退火温度的测定:** 利用梯度 PCR 测定了 4 种毒素基因多重 PCR 方法最佳退火温度, 分别设定了 10 个梯度, 结果表明最佳退火温度为 47  $^{\circ}\text{C}$ , 在此温度下 4 毒素的条带最清晰(图略)。

**2.1.3 最佳循环次数的测定:** 利用最佳反应条件、最佳退火温度对多重 PCR 方法进行了最佳循环次数的测定, 结果表明循环次数 30 次结果最好(图略)。

### 2.2 敏感性的测定

所选的多重 PCR 最佳条件为: dNTP 为 10 mmol/L; 引物浓度 25  $\mu\text{mol/L}$ ; 循环条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 1 个循环; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环; 将 B 型菌(C58-3)与 E 型菌(WE)两菌株随机挑取的单菌落混合, 菌落溶于 10  $\mu\text{L}$  去离子水后, 进行倍比稀释, 每个稀释度分别取 1  $\mu\text{L}$  作为多重 PCR 反应模板, 然后分别进行多重 PCR, 结果单个菌落稀释 100 倍仍能观察到目的条带(见图 1)。

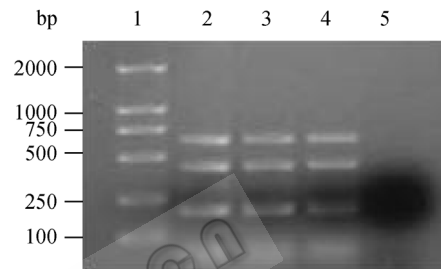


图 1 多重 PCR 敏感性测定结果

Fig. 1 The sensitivity results of the multiplex PCR

1: DL2000 Marker; 2: 10 倍稀释; 3: 100 倍稀释; 4: 1000 倍稀释; 5: 阴性对照

1: DL2000 Marker; 2: Diluted 10 times; 3: Diluted 100 times; 4: Diluted 1000 times; 5: Control

### 2.3 特异性测定

利用所设计的引物及所确定的最佳反应条件分别对产气荚膜梭菌各型参考菌株(C57-1、C58-3、C59-3、C60-3 和 WE)、诺维梭菌、腐败梭菌和破伤风梭菌进行多重 PCR, 结果 5 株产气荚膜梭菌均能扩增出相应的片段, 大小分别为: C57-1 约为 320 bp (预期的为 324 bp); C58-3 为 320 bp、190 bp 和 660 bp (预期的为 324 bp、196 bp 和 665 bp); C59-3 为 320 bp 和 190 bp (预期的为 324 bp 和 196 bp); C60-1 为 320 bp 和 660 bp(预期的为 324 bp 和 665 bp); WE 为 320 bp 和 440 bp(预期的为 324 bp 和 446 bp), 而诺维梭菌、腐败梭菌和破伤风梭菌均未扩增出相应的片段(见图 2)。

### 2.4 菌落多重 PCR 的初步应用

利用所建立的菌落多重 PCR 方法对本所保存的不同来源不同毒素型(中和试验)的产气荚膜梭菌进行鉴定, 结果如图 3 所示 38、39、43、44、47、52、

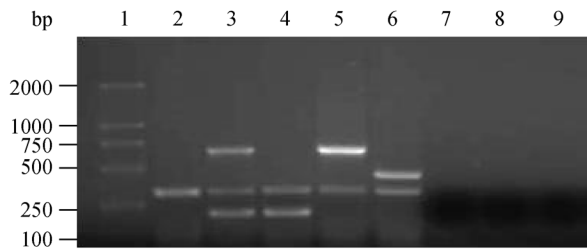


图2 多重PCR特异性测定结果

Fig. 2 The specificity results of the multiplex PCR

1: DL2000 Marker; 2: C57-1; 3: C58-3; 4: C59-3; 5: C60-3; 6: WE;  
7: 诺维梭菌; 8: 腐败梭菌; 9: 破伤风梭菌  
1: DL2000 Marker; 2: C57-1; 3: C58-3; 4: C59-3; 5: C60-3; 6: WE;  
7: *Cl. novyi*; 8: *Cl. septicum*; 9: *Cl. tetani*

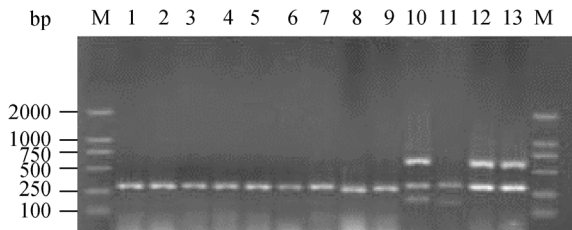


图3 13株产气荚膜梭菌多重PCR结果

Fig. 3 The multiplex PCR results of 13 *Clostridium perfringens* strains

M: DL2000 Marker; 1-9: 38、39、43、44、47、52、1134、2020、2030;  
10: 54; 11: 56; 12: 84; 13: 1168  
M: DL2000 Marker; 1-9: 38、39、43、44、47、52、1134、2020、2030;  
10: 54; 11: 56; 12: 84; 13: 1168

1134、2020、2030菌株扩增出了约320 bp(毒素预期片段为324 bp)的片段, 故而以上9个菌株为A型产气荚膜梭菌; 84、1168菌株扩增出了约320 bp( $\alpha$ 毒素预期片段为324 bp)及650 bp( $\epsilon$ 毒素预期片段为665 bp)的2个片段, 因此84、1168菌株为D型产气荚膜梭菌; 54号菌株扩增出了3个片段, 大小分别约为320 bp( $\alpha$ 毒素预期片段为324 bp)、190 bp( $\beta$ 毒素预期片段为196 bp)及650 bp( $\epsilon$ 毒素预期片段为665 bp), 说明54号菌株为B型产气荚膜梭菌; 56号菌株扩增出了2个片段, 大小分别约为320 bp( $\alpha$ 毒素预期片段为324 bp)及190 bp( $\beta$ 毒素预期片段为196 bp), 而没有扩增出665 bp( $\epsilon$ 毒素)相应片段, 说明56号菌株为C型产气荚膜梭菌。

### 2.5 菌落多重PCR与中和试验比较

从表2可以看出本研究所建立的菌落多重PCR方法与中和试验结果有较高的同源性, 18个菌株2种方法的同源性可达到94.4% (17/18), 结果见表2。

表2 菌落多重PCR与中和试验结果比较  
Table 2 The results of the multiplex PCR and the neutralization test

菌株 Strain	菌落多重PCR结果 The results of the multiplex PCR	中和试验结果 The results of the neutralization test
C57-1	A	A
C58-3	B	B
C59-3	C	C
C60-3	D	D
WE	E	E
38	A	A
39	A	A
43	A	A
44	A	A
47	A	A
52	A	A
54	A	A
56	C	B
84	D	D
1134	A	A
1168	D	D
2020	A	A
2030	A	A

## 3 讨论

产气荚膜梭菌是一种非常重要的引起人和动物发病的病原微生物, 作为条件性致病菌, 广泛分布于自然界; 同时作为动物肠道中的常在菌群之一, 产气荚膜梭菌可导致人和动物的不同类型的疾病, 特别是引起严重的食物中毒。产气荚膜梭菌分为A、B、C、D、E 5个血清型。A型产生 $\alpha$ 毒素, B型产生 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\epsilon$ 毒素, C型产生 $\alpha$ 和 $\beta$ 毒素, D型产生 $\alpha$ 和 $\epsilon$ 毒素, E型产生 $\alpha$ 和 $\tau$ 毒素。迄今为止, 对于产气荚膜梭菌的鉴定及其毒素的分型有很多种, 包括: 动物致死性实验、动物体内中和试验<sup>[3]</sup>、反向间接乳胶凝集试验<sup>[4]</sup>、ELISA<sup>[5]</sup>等方法, 这些方法存在费时、费力, 敏感性较低, 易出现假阳性或假阴性或操作难度大等缺点。因此, 建立特异敏感的PCR诊断方法是非常必要的。本研究利用4对特异引物建立了产气荚膜梭菌A、B、C、D、E 5型菌株的菌落多重PCR方法, 并对13株产气荚膜梭菌进行了验证, 以期达到疾病诊断、细菌鉴定和分型的目的, 同时也为产气荚膜梭菌毒素食物中毒等的检测提供检测工具。

关于产气荚膜梭菌PCR方法的建立和应用, 国外学者早有报道<sup>[6-8]</sup>。但是这些方法需要提取细菌的基因组或制备细菌的裂解液, 操作繁琐, 为此本研究进行了改进, 直接以菌落为模板进行菌落多重PCR, 其原理是在预变性时, 菌体裂解, 从而使核酸释放到反应液中, 作为PCR反应的模板。这节省了大量时间, 同时还具有较高的敏感性和特异性。

产气荚膜梭菌毒素中和试验进行前需要进行菌株所产毒素的滴定, 而产气荚膜梭菌不同的毒素其产毒条件不尽相同, 对培养基的要求也不同, 只有最佳的产毒条件下所培养的菌株产生的毒素进行毒素中和试验结果才可能准确<sup>[9]</sup>。因此对利用动物体内毒素中和试验未知菌株进行定型是非常费力、费时的。而本研究中所采用的菌落多重PCR则不涉及毒素产生条件的控制, 极大地缩短了试验时间。本研究将菌落多重PCR鉴定结果与中和试验结果进行了比较, 结果表现较高的符合率 94.4% (17/18)。

近年来, 产气荚膜梭菌造成的食物中毒例数呈上升趋势, 在美国约占食物中毒病例的 10%, 而非洲其则是第二位造成食物中毒的病原菌<sup>[2]</sup>, 因此本研究所建立的进行该菌快速诊断和定型的菌落多重PCR在食品安全上同样也具有重要的意义。

## 参 考 文 献

[1] 陆承平. 兽医微生物学. 第四版. 北京: 中国农业出版

社, 2007.

- [2] 文其乙, 刘秀梵, 焦新安, 等. 多重聚合酶链反应检测污水中产气荚膜梭菌. 扬州大学学报(自然科学版), 2001, 4(4): 27-30.
- [3] Ganard B, Saint-Jonis B, Cole S T, *et al.* Genomic diversity and organization of virulence gene in pathogenic anaerobic *Clostridium perfringens*. *Molec Biol*, 1992, 6: 1421-1429.
- [4] Stringer MF, Turnbull PCB, Gibert RJ. Application of serological typing to the investigation of outbreaks of *Clostridium perfringens* food poisoning 1970-1975. *Journal of Hygiene*, 1998, 84: 443-456.
- [5] Pons JL, Picorel B, Niel P, *et al.* Esterase electrophoretic polymorphism of human and animal of *Clostridium perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 496-501.
- [6] Kanakaraj R, Harris DL, Songer J G, *et al.* Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. *Vet Microbiol*, 1998, 65: 29-38.
- [7] Katayama SI, Matsushita O, Minami J, *et al.* Comparison of the alpha toxin genes of *Clostridium perfringens* type A and C: evidence for extragenic regulation of transcription. *Infect Immun*, 1993, 61: 457-463.
- [8] Yoo Han sang, Sang Un Lee, Kyoung Yoon Park, *et al.* Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *Journal of clinical Microbiology*, 1996, 23: 13-17.
- [9] 王开功, 文 明, 周碧君, 等. A 型产气荚膜梭菌最佳产毒时间的确定. 中国兽医杂志, 2003, 33(8): 42-44.