

文章编号:1000-5404(2012)15-1505-04

论著

4种感染性腹泻病原菌免疫磁珠-多重PCR快速检测体系的建立

何长龙,吴力克,兰林,洪国祜,张娟,张维,毛青 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军感染病研究所)

[摘要] **目的** 基于免疫磁珠分离及多重PCR技术建立出血性大肠埃希菌、福氏志贺菌、空肠弯曲菌、副溶血弧菌的快速检测体系。**方法** 根据出血性大肠埃希菌 uidA、福氏志贺菌 ipaH、空肠弯曲菌 hipo 及副溶血弧菌 tlh 的基因序列设计特异性引物,优化免疫磁珠分离过程及多重PCR扩增中的各个环节,建立上述4种病原菌同步快速扩增体系,并鉴定该体系特异性、敏感性。**结果** 发现 Mg^{2+} 浓度对该体系影响最大,在 Mg^{2+} 浓度为 4 mmol/L 时扩增效率最高;该体系对4种病原菌的敏感性分别为:出血性大肠埃希菌 2.7×10^4 cfu/ml、福氏志贺菌 6.4×10^4 cfu/ml、空肠弯曲菌 7.6×10^4 cfu/ml、副溶血弧菌 3.6×10^4 cfu/ml。**结论** 建立了出血性大肠埃希菌、福氏志贺菌、空肠弯曲菌、副溶血弧菌的免疫磁珠-多重PCR快速检测体系,该体系特异性及敏感性高,检测过程简单,结果稳定,可应用于临床诊断及食品卫生监管中致病菌的快速检测。

[关键词] 感染性腹泻;免疫磁珠;多重PCR

[中图分类号] R372; R378; R446.5

[文献标志码] A

Rapid detection for 4 infectious diarrhea pathogens by immunomagnetic bead-multiplex PCR

He Changlong, Wu Like, Lan Lin, Hong Guohu, Zhang Juan, Zhang Wei, Mao Qing (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella flexneri*, *Campylobacter jejuni* and *Vibrio parahaemolyticus* based on immunomagnetic bead and multiplex PCR. **Methods** Multiplex PCR primers were designed and synthesized respectively according to the fragment sequences of uidA gene from *Escherichia coli* O157:H7, ipaH gene from *Shigella flexneri*, hipo gene from *Campylobacter jejuni* and tlh gene from *Vibrio parahaemolyticus*. By optimizing the process of immunomagnetic bead separation and multiplex PCR strategies, multiplex PCR was used to amplify the 4 target genes of above pathogens. And the sensitivity and specificity of the detection system were identified. **Results** The amplification efficiency was highest when the magnesium ions concentration was 4 mmol/L. The sensitivity for rapid detecting *Escherichia coli* O157:H7 was 2.7×10^4 cfu/ml, for *Shigella flexneri* was 6.4×10^4 cfu/ml, for *Campylobacter jejuni* was 7.6×10^4 cfu/ml, and for *Vibrio parahaemolyticus* was 3.6×10^4 cfu/ml. **Conclusion** An immunomagnetic bead and multiplex PCR detection system for above 4 pathogens is successfully established, with strong specificity, high sensitivity, simple procedures and high efficiency in diagnosis of infectious diarrhea.

[Key words] infectious diarrhea; immunomagnetic bead; multiplex PCR

Supported by the Special Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (08G091). Corresponding author: Mao Qing, Tel: 86-23-68754475, E-mail: qingmao@yahoo.com

出血性大肠埃希菌、福氏志贺菌、空肠弯曲菌、副溶血弧菌是引起细菌性感染性腹泻病的常见病原菌。其广泛流行于我国境内,发病率高、季节性明显,给人们身体健康带来极大的危害。目前这类病原菌的检测

主要依靠传统的细菌学培养,检测周期长、敏感性低^[1]且只能用于单种病原菌鉴定,建立快速、特异、敏感、高通量的检测体系具有重要意义。免疫磁珠^[2-4]能特异高效地吸附目的细菌;多重PCR技术^[5-7]可以同时进行多种病原菌的快速扩增检测,因此将上述两种方法联合应用于细菌快速检测可以大大提高检测效率。本研究将免疫磁珠分离及多重PCR技术联合应

[基金项目] 全军医学科研“十一五”计划专项课题(08G091)

[通信作者] 毛青,电话:(023)68754475, E-mail: qingmao@yahoo.com

用于出血性大肠埃希菌、福氏志贺菌、空肠弯曲菌、副溶血弧菌的快速检测,通过优化反应体系中的重要环节,以期找到一种更省时、更稳定、效率更高的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及来源 4种细菌均购于中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC):出血性大肠埃希菌(21530)、福氏志贺菌(21678)、空肠弯曲菌(22936)、副溶血弧菌(21617)。

1.1.2 主要试剂、仪器 AnaeroPack2.5L微需氧产气袋(日本三菱);磁珠 Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit/Mouse IgG(Invitrogen公司);抗体 Mouse monoclonal [3011] to *E. coli* O157(Abcam, ab20976)、Mouse monoclonal [BDI727] to *Campylobacter jejuni* (Abcam, ab33024)、Rabbit polyclonal to *Shigella* (Abcam, ab65282)、Rabbit polyclonal to *Vibrio parahaemolyticus* K1 + K3 + K4 + K5 + K6 + K7 + K8 (Abcam, ab80032); Platinum® *Taq* 高保真 DNA 聚合酶(Invitrogen公司, C11304); Anaero Pack2.5L 密闭厌氧培养罐(日本三菱); Dynamag-2 磁力架(Invitrogen公司); C1000™ Thermal Cycler PCR 仪(Bio-Rad公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌培养 出血性大肠埃希菌与福氏志贺菌采用 CM0002#培养基(氯化钠 0.5 g, 牛肉膏 0.3 g, 蛋白胨 0.5 g, 琼脂 2.0 g, 水 100 ml, pH 7.0) 37 °C 过夜培养;副溶血弧菌采用 CM0111 培养基(牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 氯化钠 35.0 g, 琼脂 20.0 g, 水 1.0 L, pH 7.2~7.4) 30 °C 过夜培养;空肠弯曲菌用布氏肉汤液体培养基(每 100 毫升培养基里添加 1 ml FBP 浓原液)接种,采用日本三菱公司生产的厌氧罐及匹配的微需氧产气袋形成的微需氧条件,42 °C 孵箱培养 3~5 d。

1.2.2 免疫磁珠的制备及目的细菌 DNA 提取 吸取振荡混匀的磁珠 20 μl (约 1.34×10^7 个)至 1 ml PBS,清洗 3 次,加入 200 μl PBS 重悬浮磁珠,向磁珠悬液中分别加入抗体(大肠杆菌 O157 0.5 μg、福氏志贺菌 1.0 μg、空弯 1.5 μg、副溶血弧菌 5 μl)混匀,4 °C 冷库旋转混匀 2 h, PBS 清洗 3 次,加入细菌悬液,常温翻滚混匀 2 h, PBS 清洗 3 次, 10 mmol/L Tris 清洗 3 次, 50 μl 10 mmol/L Tris 洗下捕获目的细菌的磁珠至另一清洁 1.5 ml 离心管,加入蛋白酶 K (50 μg/ml), 55 °C 消化 2 h, 升温至 100 °C 后煮沸 10 min, 经 10 000 r/min, 4 °C, 3 min 离心, 留取上清直接作为 PCR 扩增模板。

1.2.3 引物组的选择 根据出血性大肠埃希菌 uidA、福氏志贺菌 ipaH、空肠弯曲菌 hipo、副溶血弧菌 tlh 保守序列,通过查阅文献中已成功扩增的引物序列。采用特异性较高,退火温度处在同一区间,产物片段能在凝胶上清晰区分的原则进行组合。

1.2.4 4种病原菌的单基因 PCR 扩增 根据引物 T_m 值,采用 52~62 °C 温度梯度 PCR 进行扩增。反应体系: ddH₂O 13.8 μl, 10 × Buffer 2.0 μl, 4 × dNTPs 0.4 μl (0.2 mmol/L), MgSO₄ 0.8 μl (2 mmol/L), 上下游引物各 0.4 μl (0.2 μmol/L), 模板 DNA 2.0 μl, Platinum® *Taq* 高保真 DNA 聚合酶 0.2 μl (1 U), 总体积 20.0 μl。扩增条件: 94 °C 预变性 2 min, 每个循环 94 °C 变性 30 s, 52~62 °C 梯度退火 30 s, 68 °C 延伸 30 s, 35 个循环, 产物最后 68 °C 延伸 15 min。电泳检测扩增产物,并确定 4 种病原菌共同的退火温度。

1.2.5 多重 PCR 扩增条件优化 对 4 种病原菌单基因 PCR 的反应体系和扩增条件进行优化来实现 4 种基因的同时扩增。反应体系优化为: ddH₂O 26.0 μl, 10 × Buffer 5.0 μl, 4 × dNTPs 1.0 μl (0.2 mmol/L), MgSO₄ 4.0 μl (4 mmol/L), 4 种细菌的上下游引物分别各加 1.0 μl (0.2 μmol/L), 模板 DNA (O157, 志贺, 空肠) 各 1.5 μl、副溶血 1.0 μl, Platinum® *Taq* 高保真 DNA 聚合酶 0.5 μl (2.5 U), 总体积 50.0 μl。扩增条件优化为: 94 °C 预变性 2 min, 每个循环 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 30 s, 40 个循环, 产物最后 68 °C 延伸 15 min。

1.2.6 免疫磁珠-多重 PCR 快速检测体系的抗干扰性实验

留取正常人新鲜粪便标本,将出血性大肠埃希菌、福氏志贺菌、空肠弯曲菌、副溶血弧菌 4 种病原菌悬液任意 2 种分别组合后加入粪便悬液,经磁珠捕获后煮沸法提取细菌 DNA 作为多重 PCR 模板进行扩增。

1.2.7 免疫磁珠分别联合单基因 PCR、四重 PCR 的敏感性实验 对 4 种病原菌的菌悬液分别 10 倍递增稀释 10^8 倍,混匀后取 10 μl 进行细菌平板计数,剩下的菌悬液经磁珠捕获后煮沸法提取 DNA,单基因 PCR 及四重 PCR 分别扩增检测并确定其敏感度。

2 结果

2.1 引物组的确定

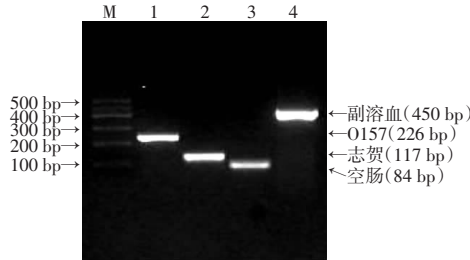
计算引物的退火温度、产物片段大小,分析引物特异性及引物之间相互干扰因素。选择出退火温度处在同一区间、产物大小能在凝胶上区分、经实验证明特异性好的 4 对引物(表 1)组合作为四重 PCR 扩增引物对。

表 1 大肠埃希菌、福氏志贺菌、空肠弯曲菌、副溶血弧菌的 4 种 PCR 扩增引物序列及参数

序号	引物名称	扩增基因	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)	T_m 值	估计可用退火区间(°C)
1	E11	O157 uidA	TTGACCCACACTTTGCCGTAA	226	61.4	50~60
	E12		GCGAAAACCTGTGGAATTGGG		60.4	
2	SH11	志贺 ipaH	CTTGACCCGCTTTCCGATA	117	58.6	48~58
	SH12		AGCGAAAGACTGCTGTCCAAG		59.9	
3	CJhipo 11	空肠 hipo	TGCTTCTTTACTTGTGTGGCTTT	84	60.6	50~60
	CJhipo 12		GCTCCTATGCTTACAACCTGCTGAATT		62.9	
4	VPtlh 21	副溶血 tlh	AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	450	65.0	50~60
	VPtlh 22		GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTCG		57.5	

2.2 免疫磁珠分离病原菌后的单基因 PCR 扩增及敏感性

成功扩增出血性大肠埃希菌 uidA 基因 226 bp, 福氏志贺菌 ipaH 基因 117 bp, 空肠弯曲菌 hipo 基因 84 bp, 副溶血弧菌 tlh 基因 450 bp, 均与预期目的条带一致(图 1)。其敏感性分别达到出血性大肠埃希菌 8.5×10^2 cfu/ml, 福氏志贺菌 2.3×10 cfu/ml, 空肠弯曲菌 5.5×10^2 cfu/ml, 副溶血弧菌 1.6×10 cfu/ml。根据扩增效率, 确定 56 °C 为 4 种病原菌特异性引物多重 PCR 扩增的共同退火温度。

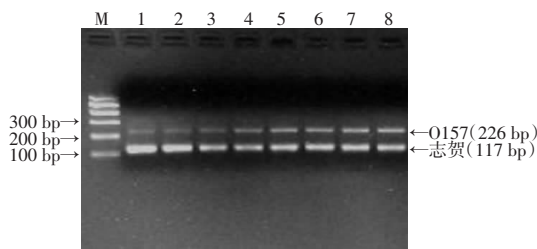


M: 标准; 1: 出血性大肠埃希菌 uidA 基因; 2: 福氏志贺菌 ipaH 基因; 3: 空肠弯曲菌 hipo 基因; 4: 副溶血弧菌 tlh 基因

图 1 免疫磁珠分离 4 种病原菌悬液后的单基因 PCR 扩增电泳结果

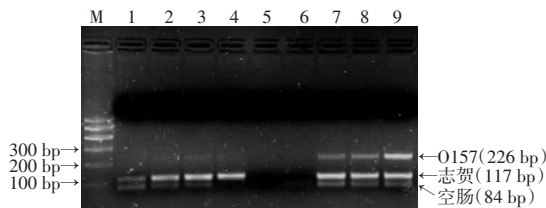
2.3 多重 PCR 条件优化扩增结果

双重 PCR 较易扩增(图 2), 三重 PCR 和四重 PCR 由于体系中成分的增多, 更难把握, 于是我们通过添加 PCR 佐剂甘油和改变 Mg^{2+} 浓度来尝试三重 PCR 的扩增, 最终发现将 Mg^{2+} 浓度提高到 4 mmol/L 时, 成功实现三重 PCR 的扩增, 而甘油对扩增的帮助不大(图 3)。并以三重 PCR 扩增摸索的最优条件, 即将 Mg^{2+} 浓度提高到 4 mmol/L 用于四重 PCR, 最终成功实现扩增(图 4)。



M: 标准; 1: 50.0 °C; 2: 50.7 °C; 3: 52.0 °C; 4: 53.9 °C; 5: 56.3 °C; 6: 58.3 °C; 7: 59.4 °C; 8: 60.0 °C

图 2 不同退火温度对双重 PCR 扩增效率的影响



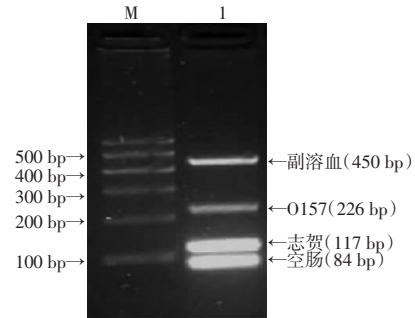
M: 标准; 1: Mg^{2+} (2.0 mmol/L); 2: 5% 甘油; 3: 10% 甘油; 4: 15% 甘油; 5: Mg^{2+} (1.0 mmol/L); 6: Mg^{2+} (1.5 mmol/L); 7: Mg^{2+} (2.5 mmol/L); 8: Mg^{2+} (3.0 mmol/L); 9: Mg^{2+} (4.0 mmol/L)

图 3 甘油浓度、 Mg^{2+} 浓度的改变对三重 PCR 扩增效率的影响

2.4 免疫磁珠-多重 PCR 快速检测体系的抗干扰性实验

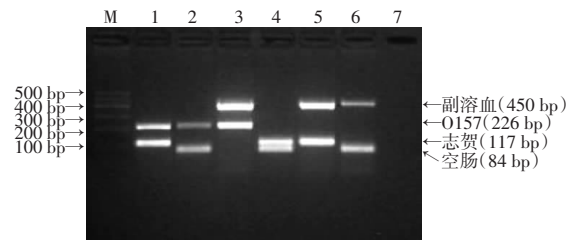
正常人粪便标本加入上述细菌任意 2 种进行染菌实验后,

经磁珠分离及多重 PCR 扩增, 6 种组合结果均与预期相符, 未进行染菌的粪便标本扩增结果为阴性(图 5)。表明该体系具有很强的抗干扰能力。



M: 标准; 1: 四重 PCR (出血性大肠埃希菌 uidA 基因、福氏志贺菌 ipaH 基因、空肠弯曲菌 hipo 基因、副溶血弧菌 tlh 基因)

图 4 四重 PCR 扩增电泳结果

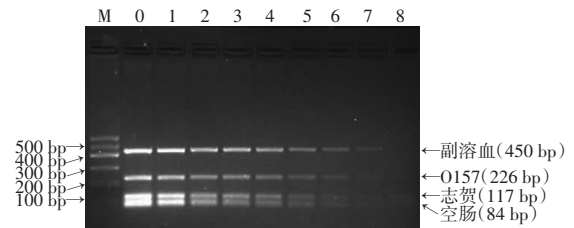


M: 标准; 1: 出血性大肠埃希菌 uidA 基因、福氏志贺菌 ipaH 基因; 2: 出血性大肠埃希菌 uidA 基因、空肠弯曲菌 hipo 基因; 3: 出血性大肠埃希菌 uidA 基因、副溶血弧菌 tlh 基因; 4: 福氏志贺菌 ipaH 基因、空肠弯曲菌 hipo 基因; 5: 福氏志贺菌 ipaH 基因、副溶血弧菌 tlh 基因; 6: 空肠弯曲菌 hipo 基因、副溶血弧菌 tlh 基因; 7: 未进行染菌实验的正常人标本

图 5 免疫磁珠-多重 PCR 快速检测体系的抗干扰性实验结果

2.5 免疫磁珠-多重 PCR 快速检测体系的敏感性实验

4 种细菌悬液分别 10 倍递增稀释 $10^1 \sim 10^8$ 后平板计数结果为出血性大肠埃希菌 2.7×10^8 cfu/ml, 福氏志贺菌 6.4×10^9 cfu/ml, 空肠弯曲菌 7.6×10^9 cfu/ml, 副溶血弧菌 3.6×10^8 cfu/ml。PCR 结果(图 6)显示第 7 泳道稀释 107 倍时能同时检测出 4 种细菌, 第 8 泳道可以检测到福氏志贺菌与空肠弯曲菌。该体系对这 4 种病原菌的敏感性分别为出血性大肠埃希菌 2.7×10 cfu/ml, 福氏志贺菌 6.4×10 cfu/ml, 空肠弯曲菌 7.6×10 cfu/ml, 副溶血弧菌 3.6×10 cfu/ml。



M: 标准; 0: 未稀释菌悬液; 1: 101 稀释; 2: 102 稀释; 3: 103 稀释; 4: 104 稀释; 5: 105 稀释; 6: 106 稀释; 7: 107 稀释; 8: 108 稀释

图 6 免疫磁珠-多重 PCR 快速检测体系的敏感性实验结果

3 讨论

感染性腹泻^[8]是由多种病原微生物及其产物引

起的以腹泻为主要表现的一类肠道传染病。可以引起感染性腹泻的病原微生物种类较多。目前用于临床诊断及食品卫生检测等方面的常规检测方法主要以细菌学培养鉴定为主,通常需经富集培养,形态学观察,生理生化鉴定等过程。操作复杂,过程冗长,且难以发现培养条件苛刻的病原菌,例如本研究涉及的空肠弯曲菌。通过煮沸法直接提取病原菌 DNA 并进行 PCR 扩增,可以大大提高这类细菌的检出效率。

细菌目的基因的筛选对 PCR 检测的特异性非常重要。出血性大肠埃希菌含有 uidA 基因,但不编码 β -葡萄糖苷酸酶,因为 uidA 在 92 位点是 G 残基(而在其他的大肠杆菌中是 T 残基)^[9],利用这一特异的等位基因设计引物可用来鉴别出血性大肠埃希菌和其他的大肠杆菌;福氏志贺菌侵袭性质粒抗原基因(ipaH)具有高度特异性,比其他毒力因子具有更高灵敏度,是侵袭力的特异标志;hipo 是空肠弯曲菌特异的马尿酸氧化酶基因,是区分空肠弯曲菌与其他弯曲菌的重要指标;不耐热溶血毒素(thh)基因是副溶血弧菌主要致病因素,具有种属特异性的特点;我们通过上述 4 种基因选择引物,借此实现出血性大肠埃希菌、福氏志贺菌、空肠弯曲菌、副溶血弧菌的特异性多重 PCR 扩增。

多重 PCR 技术能在单个反应体系里同时扩增多种细菌 DNA,大大节省了检测时间及费用。1988 年,该方法首次报道用于^[10]人类疾病的诊断以来,陆续有研究利用多重 PCR 技术应用于病原菌的检测^[11],为临床腹泻诊断提供了一种高效可行的思路。但是,尽管多重 PCR 技术特异性及敏感性较高,但由于检测样品中干扰杂质众多,其扩增结果并不稳定,找到一种快速稳定的细菌学分离技术是改善多重 PCR 扩增稳定性的关键。免疫磁珠分离技术^[12]能通过包被有单克隆抗体的磁性微球与含有相应抗原的靶物质特异性结合形成新的复合物从而实现细菌的分离,具有相对较高的检测效率和灵敏度,可以用于复杂组分样本中的细菌分离。本研究将免疫磁珠分离技术与多重 PCR 技术结合,建立了 1 套用于出血性大肠埃希菌、福氏志贺菌、空肠弯曲菌、副溶血弧菌的快速检测体系,可以用于临床腹泻的鉴别诊断。经过临床粪便标本实验,表明特异性免疫磁珠能特异高效地分离出目的细菌,克服了粪便标本中食物残渣及脱落上皮细胞等杂质可能造成的影响。在 PCR 反应体系中,佐剂的选择是影响 PCR 的重要因素。本研究中,为了提高多重 PCR 扩增效率,我们采取对反应体系中添加甘油^[13-14]佐剂、调整 Mg^{2+} 浓度、提高 PCR 循环数量等策略,得出当 Mg^{2+} 浓度为 4 mmol/L 时,4 重 PCR 扩增效率最高。在本体系中,这 4 种病原菌的敏感性分别可达到出血性大肠埃希菌 2.7×10^4 cfu/ml,福氏志贺菌 6.4×10^4 cfu/ml,空肠弯曲菌 7.6×10^4 cfu/ml,副溶血弧菌 3.6×10^4 cfu/ml,可

以满足临床常规检测的需要。该体系整个过程不到 10 h,与传统的鉴定方法相比,极大地节约了时间,为突发腹泻事件的及时诊断提供了基础。

本研究将感染性腹泻 4 种常见病原菌组合到一起,建立了免疫磁珠-多重 PCR 快速检测体系,可用于临床腹泻的鉴别诊断。对爆发性的腹泻事件,为临床医生的及时诊断提供了基础。该体系也可用于公共卫生食品监管等领域,有极其重要的应用价值。

参考文献:

- [1] 邵晖,吴玲玲,王伟,等.食品中病原微生物检测方法进展及优缺点评价[J].中国食品工业,2008,(4):40-43.
- [2] Ogden I D, MacRae M, Strachan N J. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in sheep faeces at pasture in Scotland[J]. *J Appl Microbiol*, 2005, 98(3): 646-651.
- [3] Corona-Barrera E, Smith D G, La T, et al. Immunomagnetic separation of the intestinal spirochaetes *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira hyodysenteriae* from porcine faeces[J]. *J Med Microbiol*, 2004, 53(Pt 4): 301-307.
- [4] Whan L, Ball H J, Grant I R, et al. Development of an IMS-PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in water[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2005, 40(4): 269-273.
- [5] Aranda K R, Fagundes-Neto U, Scaletsky I C. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(12): 5849-5853.
- [6] O'Leary J, Corcoran D, Lucey B. Comparison of the EntericBio multiplex PCR system with routine culture for detection of bacterial enteric pathogens[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(11): 3449-3453.
- [7] Kurabachew M, Enger O, Sandaa R A, et al. A multiplex polymerase chain reaction assay for genus-, group- and species-specific detection of mycobacteria[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004, 49(2): 99-104.
- [8] 何长龙,毛青.感染性腹泻常见 6 种病原体研究进展[J].重庆医学,2011,40(34):3511-3513.
- [9] Cebula T A, Payne W L, Feng P, et al. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(1): 248-250.
- [10] Chamberlain J S, Gibbs R A, Rattier J E, et al. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy [M]//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990: 272-281.
- [11] 刘丁,陈萍,李玉红,等.多重 PCR 检测鲍曼不动杆菌氨基糖苷乙酰转移酶相关基因[J].第三军医大学学报,2006,28(23):2320-2322.
- [12] 张宏伟,郑玉梅.免疫磁珠性质及其应用[J].国外医学:免疫学分册,2000,23(1):5-8.
- [13] 郭艳,兰林,何长龙,等.基于 pJFH-1 的 HCV 全基因组扩增方法的建立[J].第三军医大学学报,2011,33(11):1144-1147.
- [14] Yasukawa K, Konishi A, Inouye K. Effects of organic solvents on the reverse transcription reaction catalyzed by reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukemia virus[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(9): 1925-1930.

(收稿:2011-01-21;修回:2011-02-28)

(编辑 王红)