

樊琛,徐旺辉,李丹丹,等. PCR 方法检测大肠杆菌 *iss* 基因的缺陷及改进[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):69-70.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.019

PCR 方法检测大肠杆菌 *iss* 基因的缺陷及改进

樊琛¹, 徐旺辉², 李丹丹³, 曾庆华¹

(1. 聊城大学农学院, 山东聊城 252059; 2. 东北农业大学动物医学院, 黑龙江哈尔滨 150030;
3. 海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 海南海口 570311)

摘要:采用 KOD 酶和 *rTaq* 酶, 分别通过套式 PCR 检测 10 株大肠杆菌 *iss* 基因, 以探讨 PCR 检测大肠杆菌 *iss* 基因的缺陷及改进方法。结果表明, *rTaq* 酶、KOD 酶对大肠杆菌 *iss* 基因 1 次 PCR 检出率分别为 40%、70%, 套式 PCR 检出率分别为 80%、100%; KOD 酶 1 次 PCR 检出率高于 *rTaq* 酶, 但未达 100%, 采用 KOD 酶套式 PCR 可降低大肠杆菌 *iss* 基因的漏检可能性。

关键词:PCR 检测; *iss* 基因; 套式; 检出率; 大肠杆菌

中图分类号: S852.61⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0069-02

iss 基因 (increased serum survival gene) 是编码大肠杆菌补体抗性的基因, 大小为 309 bp, 在人源、禽源大肠杆菌中皆有发现。1979 年, Binns 等从人源大肠杆菌 ColV、I-K94 质粒获得 *iss* 基因表达, 能显著增强含此基因大肠杆菌对 1 日龄雏鸡的毒力, 还能增强转化菌的血清抗性^[1-2]。目前, 国外相关研究者大多将 *iss* 基因检测作为大肠杆菌毒力检测的参考指标之一, 以 1 次 PCR 检测结果 *iss*⁺ 或 *iss*⁻ 来判定 *iss* 基因在大肠杆菌中的存在情况。大肠杆菌 *iss* 基因通常采用 PCR 方法或 DNA 探针方法检测, 这 2 种方法检测结果可能出现不符合性, 即某菌株 PCR 检测可能为 *iss*⁺ 而探针检测为 *iss*⁻, 或 PCR 检测为 *iss*⁻ 而探针检测为 *iss*⁺^[3-5]。而在实际应用中, 多以 PCR 检测结果判定 *iss* 在大肠杆菌中的存在情况。本试验

探讨 PCR 方法检测大肠杆菌 *iss* 基因缺陷的原因和改进方法, 以提高 PCR 检测大肠杆菌 *iss* 基因的准确性。

1 材料与方法

1.1 菌株及其来源

10 株大肠杆菌, 分别采自黑龙江省、山东省、贵州省、新疆维吾尔自治区、北京市等地的鸡场。

1.2 引物合成

参考已发表的禽大肠杆菌 *iss* 基因核酸序列 (GenBank 序列号 AF042279) 及樊琛等的试验结果^[4-5], 设计 2 对引物 (表 1) 进行套式 PCR 检测。

表 1 套式 PCR 检测的引物设计

引物编号	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
1	AGCTATCGTTTAATTATTATCAC	GTAGGGAGCCCAGAAGTAT
2	CGCGGATCCAGGATTCGCGCTTTT	CGCGTCGACCATATCGATGGGCAACTA

1.3 酶类及主要生化试剂

蛋白酶 K、RnaseA、*rTaq* 酶、KOD 酶、T4DNA 连接酶、pMD19-T vector 克隆载体及相关试剂, 均购自宝泰克生物工程公司; DNA 胶回收试剂盒, 购自上海华舜生物工程有限公司; 所用试验试剂均为分析纯。

1.4 大肠杆菌 DNA 提取

将待测菌琼脂板划线分离, 挑取平板上菌落直径 2 mm 的单菌落; 加入 40 μL 裂解液 (10 mmol/L Tris-Cl, pH 值为 7.5, 1 mmol/L EDTA) 和 50 μg/mL 蛋白酶 K, 混匀; 55 ℃ 温育 10 min, 再于 80 ℃ 温育 10 min, 加 80 μL 灭菌三蒸水, -20 ℃ 保存。

1.5 *iss* 基因检测扩增反应体系

iss PCR 扩增反应体系为: 10 × PCR buffer 5 μL、dNTP 4 μL、50 pmol/μL 上游和下游引物各 1 μL、大肠杆菌 DNA 模板 5 μL、灭菌三蒸水 33.5 μL、*rTaq* 酶 0.5 μL, 共 50 μL。套式 PCR 扩增反应体系为: 10 × PCR buffer 5 μL、dNTP 4 μL、50 pmol/μL 上游和下游引物各 1 μL、大肠杆菌 DNA 模板 2 μL、灭菌三蒸水 33.5 μL、*rTaq* 酶 0.5 μL, 共 50 μL。

1.6 扩增反应程序

1.6.1 *rTaq* 酶 PCR 扩增反应程序 97 ℃ 预变性 5 min; 97 ℃ 1 min、47 ℃ 1 min、72 ℃ 30 s, 9 个循环; 95 ℃ 1 min、48 ℃ 1 min、72 ℃ 30 s, 25 个循环; 72 ℃ 10 min; 4 ℃ 保存。重复 2 次。对 PCR 扩增反应未得到目的片段的菌株进行套式 PCR 扩增反应, 反应程序为: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 30 s、57.5 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s, 28 个循环; 72 ℃ 10 min; 4 ℃ 保存。经连接转化, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

1.6.2 KOD 酶 PCR 扩增反应程序 97 ℃ 预变性 5 min;

收稿日期: 2014-11-07

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (编号: 31302128)。

作者简介: 樊琛 (1978—), 女, 山东聊城人, 博士, 副教授, 主要从事病原体分子生物学、食品安全研究。E-mail: fanchen7810@126.com。

97 ℃ 1 min、47 ℃ 1 min、68 ℃ 30 s,9 个循环;95 ℃ 1 min、68 ℃ 1 min、72 ℃ 30 s,25 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保存。重复 1 次。对 PCR 扩增反应未得到目的片段的菌株进行套式 PCR 扩增反应,反应程序为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 30 s、57.5 ℃ 30 s、68 ℃ 30 s,28 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保存。同时做空白对照。经连接转化,送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

2 结果与分析

由表 1 可见,10 株大肠杆菌都含有 *iss* 基因;rTaq 酶 1 次 PCR 检测 4 株菌株为阳性,6 株为阴性,检测率为 40%;套式 PCR 检测出现特异条带,2 株菌株检测为阴性,扩增出的 *iss* 基因经序列测定,其核苷酸序列符合已发表的 *iss* 基因核苷酸序列,rTaq 酶套式 PCR 检出率为 80%;KOD 酶 1 次 PCR 检测 7 株菌株为阳性,3 株为阴性,检出率为 70%,但重复性上有差异,阴性、阳性菌株有所不同,套式 PCR 检测也出现特异条带,10 株大肠杆菌都含有 *iss* 基因,检出率为 100%,扩增出的 *iss* 基因经序列测定,其核苷酸序列与已发表的 *iss* 基因核苷酸序列也相符。

表 1 rTaq 酶、KOD 酶 PCR 检测结果

编号	rTaq 酶		KOD 酶			
	1 次 PCR	套式 PCR	1 次 PCR (重复 1)	1 次 PCR (重复 2)	套式 PCR (重复 1)	套式 PCR (重复 2)
1	-	+	+	-	+	+
2	-	+	-	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
4	-	+	-	-	+	+
5	-	+	-	-	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+

注:“+”表示检测菌株为阳性;“-”表示检测菌株为阴性。

3 结论与讨论

研究发现,*iss* 基因在致病性大肠杆菌中的存在率要高于非致病性大肠杆菌。Johnson 等对 20 株禽大肠杆菌进行 *iss* 基因扩增及致病性试验,结果表明,6 株致病性菌株为 *iss* 基因扩增阳性,14 株非致病性菌株中有 11 株未扩增出 *iss* 基因、3 株扩增出 *iss* 基因^[7]。关于 *iss* 基因的定位,近来普遍认为 *iss* 基因是定位在 ColV 质粒上。有研究表明,在产生大肠菌素 V(colicin V)的菌株中,人血液中有 95.5% 的菌株携带 *iss* 基因,肠道中有 68.8% 的菌株携带 *iss* 基因;禽源大肠杆菌 *iss* 基因与 ColV 同时出现的概率很高,*iss* 基因很可能与 ColV 质粒连在一起^[8-9]。大肠杆菌 ColV 质粒是低拷贝的大质粒^[10-11]。本试验 PCR 所用模板为菌体经蛋白酶 K 消化后的粗提物,菌体消化程度可能影响 PCR 扩增效率,采用常规质粒提取及大质粒提取方法均未获得 ColV 质粒。另外,由于 ColV 质粒在各菌株中的拷贝数可能有所差异,也会导致 ColV

质粒极低拷贝的菌株在 1 次 PCR 时未能扩增出目的条带。

试验结果表明,rTaq 酶与 KOD 酶 1 次 PCR 时,*iss* 基因的检出率分别为 40%、70%,套式 PCR 检出率分别为 80%、100%,KOD 酶检测大肠杆菌 *iss* 基因的检出率均高于 rTaq 酶,KOD 酶对大肠杆菌 *iss* 基因扩增效率优于 rTaq 酶。在重复性方面,KOD 酶 1 次 PCR 检测 10 株菌株中有 2 株菌株出现差异,可能与模板制备中菌体消化裂解程度及操作误差有关;KOD 酶套式 PCR 结果无差异,采用 KOD 酶套式 PCR 检测能降低大肠杆菌 *iss* 基因的漏检率。

参考文献:

[1]Tivendale K A,Noormohammadi A H,Allen J L,et al. The conserved portion of the putative virulence region contributes to virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Microbiology,2009,155(2): 450-460.

[2]Ozawa M,Harada K,Kojima A,et al. Antimicrobial susceptibilities, serogroups, and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan[J]. Avian Diseases,2008,52(3): 392-397.

[3]Skyberg J A,Johnson T J,Johnson J R,et al. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos,grow in human urine, and colonize the murine kidney[J]. Infection and Immunity,2006,74(11): 6287-6292.

[4]樊琛,王亚君,李一经. *iss* 基因与鸡大肠杆菌毒力相关性的分析[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(1):58-61.

[5]Johnson T J,Wannemuehler Y,Doetskott C,et al. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008,46(12): 3987-3996.

[6]樊琛,程霜,刘桂芹,等. 鸡大肠杆菌 *iss* 毒力基因研究进展[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):53-54,128.

[7]Johnson T J,Wannemuehler Y M,Nolan L K. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology,2008,74(8): 2360-2369.

[8]Oguttu J W,Veary C M,Picard J A. Antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry abattoir workers at risk and broilers on antimicrobials[J]. Journal of the South African Veterinary Association,2008,79(4): 161-166.

[9]Chuba P J,Leon M A,Banerjee A,et al. Cloning and DNA sequence of plasmid determinant *iss*, coding for increased serum survival and surface exclusion, which has homology with lambda DNA[J]. Molecular & General Genetics,1989,216(2/3):287-292.

[10]Johnson T J,Giddings C W,Horne S M,et al. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate[J]. Avian Diseases, 2002,46(2):342-352.

[11]Lefebvre B,Gattuso M,Moisan H,et al. Genotype comparison of sorbitol-negative *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens from different commercial farms[J]. Poultry Science,2009,88(7): 1474-1484.