

樊琛,徐旺焯,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<sup>1</sup>,徐旺焯<sup>2</sup>,李丹丹<sup>3</sup>,曾庆华<sup>1</sup>

(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<sup>[1-2]</sup>。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*<sup>+</sup> 或 *iss*<sup>-</sup> 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*<sup>+</sup> 而探针检测为 *iss*<sup>-</sup>,或 PCR 检测为 *iss*<sup>-</sup> 而探针检测为 *iss*<sup>+</sup><sup>[3-5]</sup>。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<sup>[4-5]</sup>,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	AGCTATCGTTTAAATTATTATCAC	GTAGGGAGCCCAGAAGTAT
2	CGCGGATCCAGGATTCGCCGTTTTTA	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 °C 温育 10 min,再于 80 °C 温育 10 min,加 80 μL 灭菌三蒸水,-20 °C 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 °C 预变性 5 min;97 °C 1 min、47 °C 1 min、72 °C 30 s,9 个循环;95 °C 1 min、48 °C 1 min、72 °C 30 s,25 个循环;72 °C 10 min;4 °C 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 °C 预变性 5 min;95 °C 30 s、57.5 °C 30 s、72 °C 30 s,28 个循环;72 °C 10 min;4 °C 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 °C 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<sup>[7]</sup>。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,在产生大肠杆菌素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<sup>[8-9]</sup>。大肠杆菌ColV质粒是低拷贝的大质粒<sup>[10-11]</sup>。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, Doetkott 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.