

牛源大肠杆菌 O157:H7 河南分离株的主要毒力基因分析

魏法山¹,曹贝贝²,陶健¹,韩丽²,程慧芳²,胡慧^{1,2*}

(1.河南省产品质量监督检验院,河南 郑州 450004; 2.河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002)

摘要: 为了解河南地区牛源大肠杆菌 (*E. coli*) O157:H7 分离株携带毒力因子的情况,针对大肠杆菌 O157:H7 的 *hlyA*、*eaeA*、*stx1* 和 *stx2* 毒力基因设计合成了 4 对特异性引物,通过 PCR 方法对前期分离的 15 株牛源 *E. coli* O157:H7 的毒力基因进行分析。结果显示,有 6 株牛源 *E. coli* O157:H7 的基因型为 $hlyA^{+}/eaeA^{+}/stx1^{-}/stx2^{+}$,1 株分离株的基因型为 $hlyA^{+}/eaeA^{-}/stx1^{-}/stx2^{+}$,8 株分离株的基因型为 $hlyA^{-}/eaeA^{-}/stx1^{-}/stx2^{-}$ 。表明河南地区牛源 *E. coli* O157:H7 至少有 3 种毒力基因型。

关键词: 牛源; 大肠杆菌 O157:H7; 毒力基因

中图分类号: S685 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2015)07-0132-04

Genetic Analysis of Virulence Genes of *Escherichia coli* O157:H7 from Bovine in Henan Province

WEI Fashan¹, CAO Beibei², TAO Jian¹, HAN Li², CHENG Huifang², HU Hui^{1,2*}

(1. Henan Province Product Quality Supervision and Inspection Center, Zhengzhou 450004, China;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To investigate the distribution of virulence genes of 15 strains of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from bovines in Henan province, four pairs of primers of virulence genes (*hlyA*, *eaeA*, *stx1*, and *stx2*) of *Escherichia coli* O157:H7 were designed and synthesized, and the virulence genes were detected through PCR amplification. The results showed that gene type of six strains were $hlyA^{+}/eaeA^{+}/stx1^{-}/stx2^{+}$, one strain was $hlyA^{+}/eaeA^{-}/stx1^{-}/stx2^{+}$ and the other eight strains isolated were $hlyA^{-}/eaeA^{-}/stx1^{-}/stx2^{-}$, respectively. This result showed that there were at least three virulence genotypes in O157:H7 isolated from bovine in Henan province.

Key words: bovine; *Escherichia coli* O157:H7; virulence genes

大肠杆菌 (*E. coli*) O157:H7 是一种重要的人兽共患传染病病原菌,主要寄生于某些反刍动物的肠道内,通过污染的水源及食物造成人与动物的感染。临床症状主要是腹泻、出血性结肠炎、溶血性尿毒综合征及血栓性血小板减少性紫癜等,严重者可导致死亡,致死率可达 5%~10%^[1]。1982 年,美国首次报道了由 *E. coli* O157:H7 引起的出血性肠炎。

此后,世界各地陆续报道了 *E. coli* O157:H7 引起的感染,并有上升趋势。目前,*E. coli* O157:H7 感染已成为全球性的公共卫生问题^[2-3]。自 1988 年我国江苏徐州首次报道 *E. coli* O157:H7 后,先后从河南、福建、甘肃、浙江、安徽等省人畜以及其他动物中分离到 *E. coli* O157:H7^[4]。因此,对动物源 *E. coli* O157:H7 进行流行病学调查分析具有重要意义。

收稿日期:2015-03-05
基金项目:国家质检总局科技计划项目(2013QK233)
作者简介:魏法山(1976-),男,河南漯河人,研究员,博士,主要从事食品安全检测研究。E-mail:weifashan@aliyun.com
* 通讯作者:胡慧(1976-),女,陕西西乡人,副教授,博士,主要从事动物微生物学与免疫学研究。
E-mail:huhui2001@163.com

E. coli O157:H7 菌株能产生志贺样毒素 (SLT)、紧密黏附素 (Intimin)、溶血素等,编码这些毒素的基因包括志贺菌素 1 基因(*stx1*)、志贺菌素 2 基因(*stx2*)、大肠杆菌黏附与消除基因(*eae*)和肠溶血素基因(*hly*)等^[1]。肠壁细胞糖脂性受体 GB3 介导 SLT 进入宿主细胞后抑制细胞蛋白质的合成。因血管内皮细胞、肠上皮细胞、肾和神经组织细胞等含有丰富的 GB3 受体,故 SLT 毒素对这些细胞都会有毒害作用^[5]。溶血素 hlyA 主要引起肠外疾病,其毒性作用对多种淋巴细胞、粒细胞、红细胞及静脉管状细胞等都有影响^[6],通常引起肠外疾病的大肠杆菌可溶解红细胞。大肠杆菌黏附与消除基因编码一种称为紧密黏附素的外膜蛋白,能促进大肠杆菌黏附于宿主肠上皮细胞,并出现抹平损伤 (attaching and effacing effete, AE)^[3],该毒素能帮助 *E. coli* O157:H7 在肠黏膜定居繁殖,以免被肠道黏膜分泌液及肠蠕动清除。

E. coli O157 的致病性取决于其携带的毒力因子。已有研究表明,一些从动物肠道、粪便以及环境中分离到的 *E. coli* O157 及 *E. coli* O157:H7 并不具有致病性^[7-9]。因此,对临床分离的 *E. coli* O157:H7 进行毒力基因的检测、分析具有重要意义。本试验应用 PCR 方法对牛源 *E. coli* O157:H7 的 4 个主要

毒力基因进行检测、分析,以了解河南地区牛源 *E. coli* O157:H7 分离株毒力因子的携带情况,为深入了解河南省 *E. coli* O157:H7 的流行情况提供信息。

1 材料和方法

1.1 菌株

本次试验使用的 15 株 *E. coli* O157:H7 菌株及阳性对照菌株均由河南农业大学预防兽医学微生物实验室提供。菌株于 30% 甘油中 -70 ℃ 保存,试验时将其在 LB 培养液中活化后使用。

1.2 主要试剂与仪器

2 × PCR *Taq*Mix 购自北京莱博医学科技有限公司;琼脂糖(西班牙进口分装),DNA Marker DL2000 (TaKaRa)购自大连宝生物工程有限公司;其他试剂均为国产分析纯产品。PCR 仪为 PTC-200 型(MJ RESESRCH);紫外凝胶成像仪购自美国 ALPHA INNOTECH。

1.3 引物设计及合成

依据参考文献[10-11]中的毒力基因序列,应用 Primer Premier 5.0 生物软件设计 4 对特异性引物,引物由上海博尚生物技术有限公司合成。各引物序列及扩增长度详见表 1。

表 1 引物序列及扩增长度				
基因	引物	序列(5'→3')	退火温度/℃	片段大小/bp
<i>hlyA</i>	<i>hlyA</i> -F	CACATCGGCTGTTATGCT	55	494
	<i>hlyA</i> -R	TTGCGACTGCTCTTTCTACT		
<i>eaeA</i>	<i>eaeA</i> -F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	61	384
	<i>eaeA</i> -R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
<i>stx2</i>	<i>stx2</i> -F	CCATGACAACGGACAGCAGTT	58.3	779
	<i>stx2</i> -R	CCTGTCAACTGAGCACTTTG		
<i>stx1</i>	<i>stx1</i> -F	ATAAATCGCCATTGCTTGACTAC	52	180
	<i>stx1</i> -R	AGAACGCCCACTGAGATCATC		

1.4 模板制备

菌株于 5 mL 肉汤培养基中培养 10 h,取 1 mL 菌液于无菌离心管中,10 000 r/min 离心 3 min,弃上清。用无菌 ddH₂O 洗涤 2 次,然后加入 500 mL 无菌 ddH₂O 重悬菌体,煮沸 7 min,离心后,上清即为 DNA 模板。

1.5 PCR 扩增

采用 25 μL PCR 反应体系:2 × PCR *Taq*Mix 8 μL,上、下游引物(引物浓度为 20 pmol/μL)各 1 μL,模板 2 μL,ddH₂O 13 μL。按如下程序扩增:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,退火(温度见表 1)1 min,72 ℃ 1 min,共 30 个循环;72 ℃ 10 min。*hlyA*⁺/*eaeA*⁺/*stx2*⁺牛源 *E. coli* O157:H7 作为阳性对照,ddH₂O 作为阴性对照。反应结束后,取 5 μL 扩增产物,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

ddH₂O 作为阴性对照。反应结束后,取 5 μL 扩增产物,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 牛源 *E. coli* O157:H7 分离株的主要毒力基因检测

以 *hlyA*⁺/*eaeA*⁺/*stx2*⁺牛源 *E. coli* O157:H7 为模板进行 PCR 扩增,获得 *hlyA*、*eaeA*、*stx2* 毒力基因片段,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,大小依次为 494 bp、384 bp、779 bp,与预期大小一致。15 株疑似菌株中有 7 株含有毒力基因 *hlyA*(图 1),有 6 株

含有毒力基因 *eaeA* (图 2), 7 株含有毒力基因 *stx2* (图 3), 毒力基因 *stx1* 未检出。

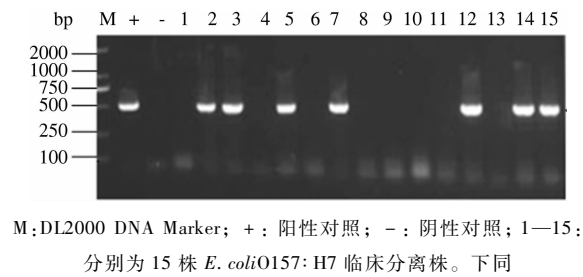


图 1 *E. coli* O157:H7 临床分离株 *hlyA* 基因的 PCR 检测结果



图 2 *E. coli* O157:H7 临床分离株 *eaeA* 基因的 PCR 检测结果

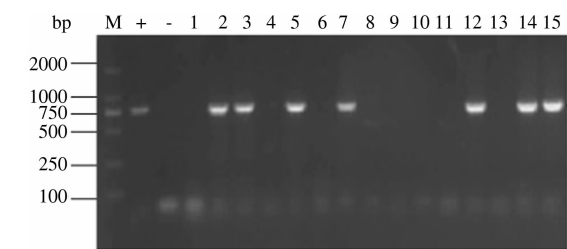


图 3 *E. coli* O157:H7 临床分离株 *stx2* 基因的 PCR 检测结果

2.2 牛源 *E. coli* O157:H7 分离株的毒力基因检出率情况

从表 2 可以看出,15 株 *E. coli* O157:H7 疑似菌株中,毒力基因 *hlyA* 的检出率为 46.67%,毒力基因 *eaeA* 的检出率为 40.00%,毒力基因 *stx2* 的检出率为 46.67%,毒力基因 *stx1* 的检出率为 0。

表 2 15 株 *E. coli* O157:H7 中毒力基因的检出率

毒力基因	阳性菌株数	检出率/%
<i>hlyA</i>	7	46.67
<i>eaeA</i>	6	40.00
<i>stx2</i>	7	46.67
<i>stx1</i>	0	0

2.3 牛源 *E. coli* O157:H7 分离株的毒力基因分布情况

由表 3 可以看出,在 15 株 *E. coli* O157:H7 分离株中,8 株不携带毒力基因,6 株同时携带 *hlyA*、*eaeA* 和 *stx2* 毒力基因,1 株携带 *hlyA* 和 *stx2*。

表 3 15 株 *E. coli* O157:H7 中毒力基因的分布情况

菌株编号	毒力基因			
	<i>hlyA</i>	<i>eaeA</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1</i>
1	-	-	-	-
2	+	+	+	-
3	+	+	+	-
4	-	-	-	-
5	+	+	+	-
6	-	-	-	-
7	+	-	+	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	+	+	+	-
13	-	-	-	-
14	+	+	+	-
15	+	+	+	-

注: + 表示阳性, - 表示阴性。

3 讨论

研究表明,人感染大肠杆菌后发病多与 *eaeA*、*stx1* 和 *stx2* 等毒力基因有关^[12]。本研究结果显示,毒力基因 *hlyA*、*eaeA* 和 *stx2* 广泛存在于 *E. coli* O157:H7 中,各毒力基因的检出率依次为 46.67%、40.00%、46.67%,毒力基因 *stx1* 未检出。15 株 *E. coli* O157:H7 分离株中,有 8 株菌基因型为 *hlyA*⁻/*eaeA*⁻/*stx1*⁻/*stx2*⁻,1 株菌的基因型为 *hlyA*⁺/*eaeA*⁻/*stx1*⁻/*stx2*⁺,6 株菌的基因型为 *hlyA*⁺/*eaeA*⁺/*stx1*⁻/*stx2*⁺。*E. coli* O157:H7 的致病性不是由单一毒力基因所决定的,而是多种毒力基因相互作用的结果。对于其他毒力基因的检测,各毒力基因之间的关系,以及各毒力基因在 *E. coli* O157:H7 致病过程中的相互作用机制,尚待进一步研究。

牛肠道是大肠杆菌 O157:H7 的主要寄宿点^[13]。近年来由 *E. coli* O157:H7 引发的乳品卫生问题时有报道。鉴于 *E. coli* O157:H7 易通过牛奶、污水等途径进入人体,进而引发疾病,因此在乳业生产过程中要特别防范此类情况的发生。国外乳业发达的国家都特别重视 *E. coli* O157:H7 在牛群中的感染状况。所以,我国应加强对奶牛场的管理意识,并同时开展 *E. coli* O157:H7 致病机制的研究和在奶牛中流行情况的调查。

参考文献:

[1] 丁红雷,毛旭虎,邹全明,等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的分子生物学检测方法研究进展[J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册,2005,26(8): 523-525.

(下转第 138 页)

- nontarget invertebrates in aquatic ecosystems[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 1992, 9: 73-98.
- [5] Philip G H, Reddy P M, Sridevi G. Cypermethrin induced *in vivo* alterations in the carbohydrate metabolism of freshwater fish, *Labeo rohita* [J]. Ecotoxicology and Environment Safety, 1995, 31: 173-178.
- [6] Eells J T, Rasmussen J L, Bandettini, P A, *et al.* Differences in the neuroexcitatory actions of pyrethroid insecticides and sodium channel-specific neurotoxins in rat and trout brain synaptosomes [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1993, 123: 107-119.
- [7] Usmani K A, Knowles C O. Toxicity of pyrethroids and effect of synergists to larval and adult *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*, and *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2001, 94: 868-73.
- [8] 王明学, 扶庆, 周志刚, 等. 溴氰菊酯对草鱼早期发育阶段的毒性效应[J]. 水利渔业, 2000, 20(6): 39-40.
- [9] 刘占才, 牛景彦, 王育水, 等. 高效氯氰菊酯对草鱼鳃和脾脏溶菌酶活性的影响[J]. 河南农业科学, 2012, 41(4): 157-160.
- [10] Kamalaveni K V, Gopal U, Sampson D. Aruna Effect of pyrethroids on carbohydrate metabolic pathways in common carp, *Cyprinus carpio* [J]. Pest Management Science, 2001, 57: 1151-1154.
- [11] 孟紫强. 环境毒理学基础[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 361-363.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [13] 陈清西, 颜思旭. 文昌鱼碱性磷酸酶的必需基因研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1986, 25(5): 568-573.
- [14] Clark J R, James M, Patrick J, *et al.* Relative sensitivity of six estuarine fishes to carbophenothi on chloropyrifos and fenvalerate [J]. Ecotoxicology and Environment Safety, 1985, 10: 382-390.
- [15] 王朝晖, 尹伊伟, 许忠能, 等. 8 种拟除虫菊酯农药对稀有(鱼句)鲫的急性、亚急性毒性研究[J]. 应用与环境生物学报, 1998, 4(4): 379-382.
- [16] Velisek J, Wlasow T, Gomulda P, *et al.* Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Veterinarni Medicina, 2006, 51(10): 469-476.
- [17] Stebbing A R D. Tolerance and hormesis-increased resistance to copper in hydroids linked to hormeses [J]. Marine Environmental Research, 2002, 54: 805-809.
- [18] Jee L H, Masroor F, Kang J C. Responses of cypermethrin-induced stress in haematological parameters of Korean rockfish *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf) [J]. Aquaculture Research, 2005, 36: 898-905.
- [19] 皇甫加清, 张耀光, 周传江, 等. 氯氰菊酯暴露对草鱼 4 种器官组织结构的影响[J]. 淡水渔业, 2011, 41(1): 53-57.

(上接第 134 页)

- [2] 张文元. 肠出血性大肠杆菌 O157: H7 毒力因子[J]. 国外医学: 流行病学传染病学分册, 1999, 26(4): 177-179.
- [3] 叶菊莲, 占利, 陆群英, 等. 浙江省 O157 大肠杆菌监测及其分子生物学特性[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(3): 247-251.
- [4] Sarimehmetoglu B, Aksoy M H, Ayaz N D, *et al.* Detection of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR[J]. Food Control, 2009, 20(4): 357-361.
- [5] 胡元玮, 朱淑英, 徐卸佐. 我市首次分离到 O157: H7 大肠杆菌分离株的生化特征、毒力因子与耐药性的探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(1): 131-132.
- [6] 温群文, 段永翔, 刘楚云, 等. 鉴定大肠杆菌 O157: H7 特异基因的 PCR 方法[J]. 实用预防医学, 2007, 14(5): 1562-1564.
- [7] Chapman P A, Siddons C A, Malo A T C, *et al.* A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry [J]. Epidemiology and Infection, 1997, 119: 245-250.
- [8] 周勇, 万成松. 大肠杆菌 O157: H7 的毒力岛与毒力因子的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2006, 34(2): 58-62.
- [9] Wang G, Clark C G, Rodgers F G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157: H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(10): 3613-3619.
- [10] Fagan P K, Hornitzky M A, Bettelheim K A, *et al.* Detection of shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin(*eaeA*), and *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR [J]. Applied Environ Microbiol, 1999, 65(2): 868-872.
- [11] Zhang S X, Liu G, Shao D H, *et al.* Isolation and identification of Shiga toxin type 2 producing and sorbitol-positive *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Chin J Anim Infect Dis, 2011, 19(4): 30-34.
- [12] 丛志慧. O157: H7 型大肠杆菌感染与乳业生产的关系及调控措施[J]. 中国奶牛, 2009(8): 41-44.