

## 基于 PCR 技术检测肠球菌 *esp* 基因的 引物选择及其初步应用

韦玉梅<sup>1</sup>, 何晓青<sup>1</sup>, 程 钢<sup>2</sup>, 李佳素<sup>2</sup>

(1. 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 中南民族大学 生命科学学院, 湖北武汉 430074)

**摘要:** 现今全球水域环境受到人类活动的影响, 粪便污染日趋严重, 因此确定水环境是否存在粪便污染对公众健康、环境治理等方面具有重要意义。以人类肠道致病病原体肠球菌中的 *esp* 基因作为检测水体中人类粪便污染的分子标记, 从 3 对具有代表性的引物中选择最佳引物, 建立 PCR 检测方法, 得到了较佳的 PCR 反应条件, 并初步应用于湖北武汉地区南湖水中的肠球菌检测。结果表明: 利用引物对 2 可扩增出 *esp* 基因片段, 其最佳退火温度为 52℃。同时在南湖水样中能够检测到阳性结果, 证明了引物对 2 扩增 *esp* 基因的可靠性。

**关键词:** MST; 水环境; 肠球菌; *esp* 基因 PCR

**中图分类号:** R515

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-2767(2011)04-0006-04

**收稿日期:** 2011-01-29

**基金项目:** 国家水体污染控制与治理科技重大专项资助项目(2009ZX07527-005); 国家“863”资助项目(2008AA062501), 中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室开放基金资助项目(2009-001)

**第一作者简介:** 韦玉梅(1988-), 女, 广西壮族自治区南宁市人, 硕士, 从事水环境中病原微生物的检测资助项目研究。E-mail: weiyumei.beijing@gmail.com。

**通讯作者:** 何晓青(1977-), 女, 湖北随州人, 副教授, 从事水环境中病原微生物的定性和定量分析及健康风险研究。E-mail: lenahe@bjfu.edu.cn。

现今全球水域环境——湖泊、河流、海岸等周围人类活动日益频繁, 随之引发的粪便污染日益严重<sup>[1-2]</sup>。20 世纪 90 年代初期, 欧美国家地区兴起一种新型的识别粪便污染源的技术——微生物源示踪 (Microbial Source Tracking, MST)。MST 是一种利用宿主生化特性、遗传多样性及其特异性代谢产物来确定粪便污染来源的新方法。它的出现弥补了传统检测技术的不足, 不仅可以正确识别粪便污染来源, 又可以评价单一污染源

- [11] 丁海燕, 郑茂波, 徐英博, 等. 一个大穗型小麦-黑麦异代换系的细胞学和 SSR 鉴定[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(2): 202-205.
- [12] 苑泽宁, 徐香玲, 李集临. 小麦-黑麦代换系间杂交后代染

色体易位的研究[J]. 植物研究, 2004, 24(2): 224-226.

- [13] 张利国, 张楠楠, 李集临. 利用小麦-黑麦代换系间杂交创制易位系的研究[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2006, 22(1): 86-88.

## Study on Breeding High Yield Wheat by the Hybridization of Two Different Wheat-Rye Substitution Lines

DING Hai-yan<sup>1</sup>, ZHANG Li-min<sup>2</sup>, ZHENG Mao-bo<sup>3</sup>, LI Ji-lin<sup>4</sup>

(1. Daqing Normal University, Daqing, Heilongjiang 163712; 2. Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 3. Harbin University, Harbin, Heilongjiang 150086; 4. Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

**Abstract:** In order to create high yield wheat with big ears which have very important value in wheat breeding and production, the lines with big ears and multispikelets in the crossing between wheat-rye substitution line 5A/5R and 6A/6R were selected. 7 lines were obtained: 09-4, 09-5, 09-7, 09-8, 09-9, 09-10, 09-11. By field observation and cytological analysis, these lines were useful for the genetic stability and fertility and dry and disease resistance and they had multispikelets with more number of grains per ear, higher grain weight, more ears per plant as well as other good characters. The results showed that these lines had very important value in production and wheat breeding.

**Key words:** wheat; rye; substitution line; hybridization

的贡献力,最终为水体污染的风险研究、分配每日的污染贡献量和制定最佳管理方案等提供科学依据<sup>[3]</sup>。MST 技术追踪粪便污染指示物可分为化学指示物、微生物指示物和真核生物指示物 3 种类型<sup>[4]</sup>。在微生物指示物中,以检测水体中大肠杆菌和肠球菌为主。大肠杆菌来源广、分布广,不利于确定粪便污染来源,具有一定的局限性。而肠球菌(*enterococcus*)是革兰氏阳性菌,广泛分布于自然环境和人类或动物的肠道中,它主要从粪便、尿液、血液等样本中分离得到,临床上感染肠球菌通常会引发人体腹泻<sup>[5]</sup>、感染性心内膜炎<sup>[6]</sup>等疾病。水环境中肠球菌常用作指示粪便污染情况。尤其是在海洋环境和娱乐用水中,它能充当潜在健康风险和游泳相关的肠胃炎的指示标记<sup>[7-8]</sup>。因此,检测水环境中的肠球菌能有效指示粪便污染情况、评价公众健康风险,并对环境治理等方面具有重要的意义。

传统检测肠球菌的选择性培养的方法,操作复杂,耗时长,培养基成本高<sup>[9]</sup>。与传统方法不同,肠球菌的毒力因子中 *esp* 基因的检出率较高<sup>[10]</sup>,利用 *esp* 基因指示肠球菌存在具有良好的可靠性。*esp* 基因是编码肠球菌表面蛋白的基因,位于肠球菌染色体上,基因结构非常独特,核心区由多个碱基重复序列组成;其中,5'端是 1~3 个 A 片段的核苷酸序列重复,3'端是占整个 *esp* 基因 31%,高度保守的 3~9 个 C 片段的序列,两个 B 片段序列位于 A 和 C 片段的序列之后,基因水平的同源重组决定了重复片段核苷酸序列重复出现的次数<sup>[11]</sup>。因此,根据重复片段 A 或其它相对保守的区域设计引物,摸索适宜 PCR 的条件建立阳性对照达到对环境样品中肠球菌的检测。目前,肠球菌 *esp* 基因作为粪便污染指示的工具在国外常有报道<sup>[12-14]</sup>。但国内尚无此方面报道,现以特异性基因 *esp* 基因作为肠球菌的分子标记,

将使用 3 种不同文献报道的引物对,其中引物对 1 用于国外研究文献中水环境样本中屎肠球菌的 *esp* 基因的检测<sup>[7]</sup>;引物对 2 用于医院内粪便样本肠球菌的 *esp* 基因的检测<sup>[15]</sup>;引物对 3 则旨在扩增肠球菌 *esp* 基因的重复片段 A<sup>[10]</sup>,从这 3 种引物中选择恰当引物建立相对快速、操作简单的 PCR 法检测肠球菌,同时探讨不同引物对在建立 PCR 法阳性对照的可靠性,并将有效引物应用于实际水环境样品肠球菌的检测。旨在建立 *esp* 基因检测方法,从而达到检测环境水样中肠球菌,并指示粪便污染情况的目的。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

供试菌株 CGMCC 1.2136(*Enterococcus faecium*)、CGMCC 1.125(*Enterococcus faecalis*)、CGMCC 1.2135 (*Enterococcus faecalis*)、CGMCC 1.2025(*Enterococcus faecium*)均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center,CGMCC),只有菌株 CGMCC 1.2135(*Enterococcus faecalis*)含有 *esp* 基因。活化菌株后,挑取单菌落至 20 mL LB 液中,37℃培养约 13 h。紫外分光光度计测定 OD<sub>600</sub> 在 0.6~0.8 范围内适宜。

1.2 总 DNA 的提取

采用天根细菌基因组提取试剂盒,根据操作说明书,各取 2 mL 菌液提取总 DNA。提取的 DNA 用微量核酸蛋白质分析仪 Qubit Fluorometer(Invitrogen,美国)检测纯度。若吸光值 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 在 1.8~2.0,则表明用试剂盒提取的 DNA 纯度较高。

1.3 引物的选取

据文献报道,选取 3 对较常用且具代表性的引物分别用于试验(见表 1)。

表 1 选用的 3 对代表性引物

引物对名称	引物序列	预期扩增片段长度
1	F:5'-TATGAAAGCAACAGCACAAAGT T-3' R:5'-ACGTCGAAAGTTCGATTTC-3'	680 bp
2	F:5'-GGTCACAAAGCCCAACTTGT-3' R:5'-ACGTCGAAAGTTCGATTTC-3'	407 bp
3	F:5'-TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC-3' R:5'-CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG-3'	A 重复片段

### 1.4 PCR 检测

PCR 反应设为 50  $\mu\text{L}$  体系,其中包括 10 $\times$  PCR Buffer 5  $\mu\text{L}$ ,2.5 mol $\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP Mixture 4  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Primers 1  $\mu\text{L}$ ,5U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$  TaKa-Ra Ex Tapase 0.25  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板 5  $\mu\text{L}$ ,补足 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件见表 2。反应结

束后,用经 Goldview 染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,紫外灯下观察结果。切胶,采用 AXYGEn DNA 回收试剂盒回收纯化 PCR 产物,送往华大基因公司测序,并在互联网上用 Blast 软件对序列进行查询和比较。根据 PCR 结果,确定最佳引物、阳性对照菌株和较适反应条件。

表 2 不同引物的 PCR 反应条件

引物对	PCR 反应条件	T <sub>m</sub> (退火温度梯度)
1	95℃ 15 min,94℃ 1 min,退火 1 min,72℃ 1 min,35 个循环,72℃ 10 min,4℃。	53℃、55℃、58℃
2	95℃ 15 min,94℃ 0.5 min,退火 0.5 min,72℃ 1 min,30 个循环,72℃ 7 min,4℃。	52℃、56℃、58℃
3	95℃ 15 min,94℃ 40 s,退火 40 s,72℃ 40 s,35 个循环,72℃ 7 min,4℃。	53℃、56℃、58℃

### 1.5 最低检测限的确定

将阳性菌株的总 DNA 模板浓度依次稀释到 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 倍,选用最佳引物和较适反应条件进行 PCR 反应检测,以确定能检测到阳性结果的最低检测浓度。

### 1.6 南湖水样中检测肠球菌的初步应用

根据 EPA method 1 600<sup>[7]</sup> 改进,用无菌、干燥的采样瓶取南湖水样 1 L,0.45  $\mu\text{m}\times 47\text{ mm}$  微孔滤膜富集,无菌水洗脱膜上菌群,并将其全部接种到 LB 液中,37℃ 摇床培养 12 h,按照天根细菌基因组提取试剂盒提取南湖水样总 DNA,利用最佳引物和较适反应条件进行 PCR 反应检测。

度为 52℃(见图 2)。经回收条带测序可知,其长度为 370 bp,进行 Blast 序列比对,比对结果与 *esp* 基因序列的相似度达到 93% 以上,证明引物对 2 扩增出的序列为 *esp* 基因。引物对 3 PCR 结果为阳性,经测序可知,其长度为 384 bp(见图 3)。

## 2 结果与分析

### 2.1 较佳引物的确定及 PCR 反应

利用 3 对引物分别对 4 株菌株进行 PCR 检测。引物对 1 PCR 结果为阴性,说明未检测到阳性菌株(见图 1);引物对 2 PCR 结果为阳性,即菌 CGMCC 1. 2135 (*Enterococcus faecalis*)。同时,当 PCR 反应条件 T<sub>m</sub> 为 52℃ 时,阳性条带最亮,说明引物对 2 可检测到阳性菌株,其较佳退火温

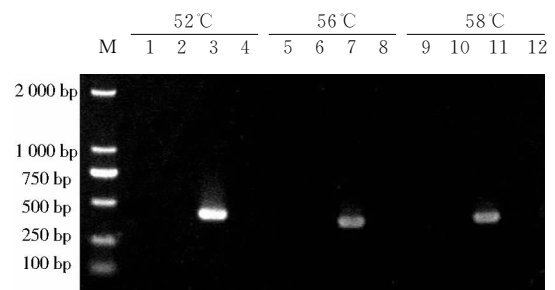


图 2 4 种菌株 *esp* 基因检测(引物对 2)

M:Marker 2000;泳道 1、5、9:CGMCC 1. 2136;泳道 2、6、10:CGMCC 1. 125;泳道 3、7、11:CGMCC 1. 2135;泳道 4、8、12:CGMCC 1. 2025

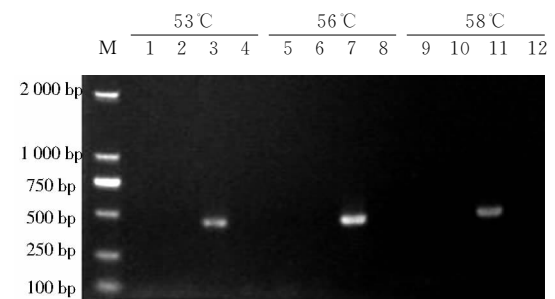


图 3 4 种菌株 *esp* 基因检测(引物对 3)

M:Marker 2000;泳道 1、5、9:CGMCC 1. 2136;泳道 2、6、10:CGMCC 1. 125;泳道 3、7、11:CGMCC 1. 2135;泳道 4、8、12:CGMCC 1. 2025

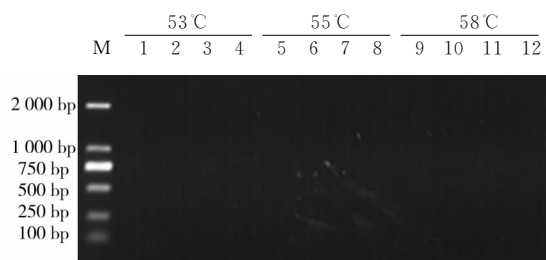


图 1 4 种菌株 *esp* 基因检测(引物对 1)

M:Marker 2000;泳道 1、5、9:CGMCC 1. 2136;泳道 2、6、10:CGMCC 1. 125;泳道 3、7、11:CGMCC 1. 2135;泳道 4、8、12:CGMCC 1. 2025

### 2.2 最低检测限的确定

经 Qubit Fluorometer 测定,菌 CGMCC 1. 213 5模板总 DNA 为 2.34 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ,依次稀释到 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 倍后,PCR 反应检测结果

表明,能检测到 *esp* 基因的最低模板限为  $2.34 \times 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (见表 3)。

表 3 最低检测限的测定

模板稀释倍数	0	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
浓度/ $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	2.34	$2.34 \times 10^{-1}$	$2.34 \times 10^{-2}$	$2.34 \times 10^{-3}$	$2.34 \times 10^{-4}$
PCR 反应	+	+	+	+	-

注:“+”表示 PCR 反应可检出,“-”表示 PCR 反应无检出。

2.3 南湖水样的初步应用

根据南湖地形和周边排水情况,设置 6 个南湖水采样点,其检测结果见图 4。其中 2 号、5 号采样点出现明显的阳性条带,3 号、6 号出现较弱的阳性条带。经测序后进行 Blast 序列比对后,其序列与 *esp* 基因序列相似度达 93% 以上。

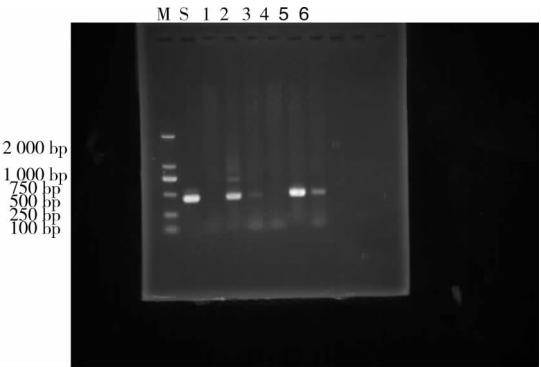


图 4 南湖水样检测结果(引物对 2)

M:Marker 2000;S:阳性对照-菌 CGMCC 1.2135;泳道 1:采样点 1;泳道 2:采样点 2;泳道 3:采样点 3;泳道 4:采样点 4;泳道 5:采样点 5;泳道 6:采样点 6

3 讨论

该文基于 MST 方法,利用肠球菌 *esp* 基因指示水环境中的粪便污染情况——人源粪便污染和动物源粪便污染。这两类污染会对人类健康造成一定程度的威胁,甚至是直接危害。同时,引入 3 对代表性引物并对其在 PCR 检测中的可靠性进行讨论。

*esp* 基因作为检测水环境中肠球菌的分子标记在美国、澳大利亚已见报道<sup>[6,10]</sup>,两者使用引物对 1 特异性扩增粪肠球菌的 *esp* 基因,用于水环境样本的检测,反应水环境中人源粪便污染的情况。该研究使用引物对 1 时,未能扩增出 *esp* 基因,这可能是所选取阳性对照菌株的不同造成的。文献中以 *Enterococcus faecium* C68 菌株作为 PCR 反应的阳性对照<sup>[8]</sup>,但该菌株无法获得从而无法确定引物对 1 的正确性。而引物对 2 可扩增

屎肠球菌和粪肠球菌的 *esp* 基因,因此选择引物对 2 作为代表性引物对用于研究。试验结果表明,引物对 2 可检测到 *esp* 基因阳性菌株(菌 CG-MCC 1.2135),并在  $T_m$  值为  $52^\circ\text{C}$  时条带最亮。经回收测序知其长度为 370 bp,其序列与 *esp* 基因序列相似度达 93% 以上。而程梅等检测医院粪便样本中的肠球菌得到的 *esp* 片段长度的 407 bp<sup>[15]</sup>,这可能是因为 *esp* 基因含有多个重复片段,不同菌株重复片段的拷贝数不同<sup>[11]</sup>。肠球菌属内诸多菌株都含有 *esp* 基因,也可能是由于不同菌株 *esp* 基因结构存在着差异,导致相似度为 93%。因此,在 PCR 反应时引物对 2 识别的扩增起始点不同,从而使得试验的 PCR 产物片段相对较短。由于该研究的 PCR 产物核心序列与 *esp* 基因的一个编码前体蛋白的基因相同,故可以将其作为阳性对照。吴敏等研究表明在多种毒力因子中 *esp* 基因的检出率较高<sup>[10]</sup>,故利用其引物进行 PCR 检测,试验结果表明,引物对 3 仅能扩增约 384 bp 的片段,这与吴敏等报道的约 800 bp 的 A 重复片段相差较大,故引物对 3 也不适用。

在南湖水样的初步应用中,湖北武汉地区的南湖附近有住宅楼、学校、街区等,人类活动频繁,导致南湖水质逐年下降。通过设置 6 个南湖采样点采集水样,使用引物对 2 检测到的阳性结果为采样点 2 号和 5 号,其 PCR 产物序列与 *esp* 基因序列的相似度达 93% 以上,证明引物对 2 具有一定的可靠性。同时也表明南湖水样中存在肠球菌,即存在粪便污染。3 号、6 号采样点的弱阳性结果,可能由该采样点肠球菌的浓度较低导致。这些采样点受到粪便污染的程度还需进一步进行定量试验说明。这些结论为解决检测南湖水粪便污染情况提供了技术支持和理论依据。PCR 方法检测南湖水样肠球菌 *esp* 基因的成功,也为将该方法应用于环境中其它水体肠球菌的检测提供技术基础;并以操作相对简单、耗时短、充分利用分子标记的优势,在监测粪便污染中有着广阔的应用前景。

4 结论

该研究使用 3 对不同引物对 *esp* 基因进行扩增,确定了最佳引物、阳性对照菌株及最适 PCR 反应条件,并对其最低检测限进行确定,最后成功应用于南湖水样检测。试验结果表明,PCR 方法

的阳性对照为菌 CGMCC 1.2135,由引物对 2 检出,检测限为  $2.34 \times 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。同时在实际水样的初步检测中取得了较好的阳性结果,为进一步在环境中检测肠球菌提供了技术支持和理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Szewzyk U, Szewzyk R, Manz W, et al. Microbiological safety of drinking water[J]. Annu Rev Microbiol, 2000, 54: 81-127.
- [2] Yan T, Sadowsky M J. Determining sources of fecal bacteria in waterways[J]. Environ Monit Assess, 2007, 129(1-3): 97-106.
- [3] 王耀兵, 苏洁, 杨玉敏, 等. 一种粪便污染源识别新技术——微生物源示踪[J]. 海洋环境科学, 2008(S2): 122-128.
- [4] Balleste E, Bonjoch X, Belanche L A, et al. Molecular indicators used in the development of predictive models for microbial source tracking[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(6): 1789-1795.
- [5] 张劲松, 李卫军. 肠球菌医院感染[J]. 中国感染控制杂志, 2005(3): 281-286.
- [6] 羽晓瑜, 强华. 肠球菌感染内膜炎中粪肠球菌毒力因子的作用[J]. 中国微生态学, 2007(1): 114-115.
- [7] Scott T M, Jenkins T M, Lukasik J, et al. Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution[J]. Environmental Science and Technology, 2005, 39(1): 283-287.
- [8] Wong M, Kumar L, Jenkins T M, et al. Evaluation of public health risks at recreational beaches in Lake Michigan via detection of enteric viruses and a human-specific bacteriological marker[J]. Water Res, 2009, 43(4): 1137-1149.
- [9] EPA. Method 1600: Enterococci in water by membrane filtration using membrane-enterococcus Indoxyl- $\beta$ -D-Glucoside Agar(mEI)[R]. Washington DC: EPA, 2002.
- [10] 吴敏. 粪肠球菌和屎肠球菌毒力基因、PAI 相关基因及耐药性分析[D]. 广州: 南方医科大学, 2008.
- [11] 李静, 马勋. 肠球菌生物膜形成及与 *esp* 基因关系的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2008(3): 241-244.
- [12] Ahmed W, Stewart J, Powell D, et al. T. Evaluation of the host-specificity and prevalence of enterococci surface protein(*esp*) marker in sewage and its application for sourcing human fecal pollution[J]. J Environ Qual, 2008, 37(4): 1583-1588.
- [13] Abdelzaher A M, Wright M E, Ortega C, et al. Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(3): 724-732.
- [14] Kim S-Y, Lee J E, Lee S, et al. Characterization of *Enterococcus* spp. from human and animal feces using 16 S rRNA sequences, the *esp* gene, and PFGE for microbial source tracking in Korea[J]. Environmental Science and Technology, 2010, 44(9): 3423-3428.
- [15] 程梅, 高良, 梅亚林. 肠球菌 *Esp* 基因检测及其致病作用[J]. 江西医学检验, 2006(3): 217-218.

## Primers Selection and Its Application of Detecting the *Enterococcus esp* Gene based on PCR Method

WEI Yu-mei<sup>1</sup>, HE Xiao-qing<sup>1</sup>, CHENG Gang<sup>2</sup>, LI Jia-su<sup>2</sup>

(1. Biological Sciences and Technology College of Beijing Forestry University, Beijing 100083; 2. Life Science College of South Central University for Nationalities, Wuhan, Hubei 430078)

**Abstract:** Nowadays the global water environment has been seriously threatened by human activities, and the fecal contamination become increasingly serious. Therefore to ascertain whether the water environment suffer from fecal pollution is significant for public health and environmental management etc. In this paper, *esp* gene located in the pathogenic bacteria, *enterococcus*, in human enteric canal was introduced to work as a molecular marker for detecting human fecal pollution in water environment. And three pairs of typical primers were discussed in PCR method. Then the optimum primers and PCR reaction conditions were obtained and were applied to detect Nanhu water samples in Wuhan, Hubei province. The result indicated that the sequence of *esp* gene could be amplified by the optimum primers, and its optimum annealing temperature was 52℃. Meanwhile, the water samples in Nanhu which showed the positive results in *enterococcus* detection verified the reliability of the optimum primers.

**Key words:** water environment; MST; *enterococcus*; *esp* gene; PCR detection