

# 大肠杆菌 F18 菌毛及其亚型的 PCR 鉴定

成大荣 徐建生 孙怀昌 高 崧

(扬州大学兽医学院 扬州 225009)

**摘 要** :F18 菌毛是产肠毒素大肠杆菌(ETEC)与产 verotoxin 细胞毒素大肠杆菌(VTEC)的重要致病因子,可介导细菌对小肠细胞的黏附,并具有 F18ab 和 F18ac 2 个抗原亚型。根据已发表的 F18ab 菌毛 A 亚单位(*FedA/ab*)的基因(*fedA/ab*)设计 3 条引物,建立了 2 种聚合酶链式反应(PCR)扩增方法。通过对 F18ab<sup>+</sup> 大肠杆菌、F18ac<sup>+</sup> 大肠杆菌、K88<sup>+</sup> 大肠杆菌、K99<sup>+</sup> 大肠杆菌、987P<sup>+</sup> 大肠杆菌、F41<sup>+</sup> 大肠杆菌的试验,结果表明所建立的 PCR 方法可特异性鉴定 F18<sup>+</sup> 大肠杆菌并区别其亚型 F18ab 与 F18ac。

**关键词** :大肠杆菌, F18 菌毛, 亚型, PCR 鉴定

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)05-0683-03

F18 菌毛常见于产肠毒素大肠杆菌(*enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)与产 verotoxin 细胞毒素大肠杆菌(*verotoxigenic Escherichia coli*, VTEC)的菌体表面,可介导细菌对小肠细胞的黏附<sup>[1-4]</sup>,是重要的致病因子之一。Rippinger 等根据 F18 的抗原性,将其分为 F18ab 和 F18ac 2 个亚型。其中, a、b/c 是指 F18 的不同抗原因子,有可能是不同抗原决定簇构成的抗原群,而不是指单个的抗原决定簇。与致水肿病大肠杆菌 VTEC 相关的 F107 菌毛属于 F18ab<sup>[5]</sup>;与致断奶仔猪腹泻大肠杆菌 ETEC 相关的 2134P、8199、8813 菌毛属于 F18ac<sup>[6,7]</sup>。目前报道的 F18ab 菌毛基因有 6 个:*fedA*、*fedB*、*fedC*、*fedD*、*fedE* 与 *fedF*<sup>[7]</sup>。其中, *fedA* 编码的主要结构亚单位 *FedA* 构成 F18 菌毛的主干;*fedB*、*fedC*、*fedD* 编码与 F18 菌毛合成、装配、成熟相关的伴侣蛋白或引导蛋白;*fedE* 与 *fedF* 编码 F18 菌毛的次要结构亚单位 *FedE* 和 *FedF* 为 F18 菌毛黏附所必需并影响菌毛的长度<sup>[8,9]</sup>。本实验室已经完成不同来源的 F18<sup>+</sup> 大肠杆菌的 *fedA*、*fedE*、*fedF* 的序列分析,并对其基因多样性进行了详细研究(已另文发表),结果表明, *fedE* 是 F18 菌毛的保守性亚单位,不同菌株的 F18ab 和 F18ac 的 *fedE* 仅有个别碱基差异;*fedF* 之间存在 99.4% 的同源性, *fedA* 之间存在 95.9% ~ 96.5% 的同源性;*fedA/ab* 和 *fedA/ac* 大小分别为 513bp 和 516bp。

F18 菌毛一般为单克隆抗体鉴定,但由于国内尚无针对 F18ab 或 F18ac 亚型的特异性单抗,因此尚未见鉴定其亚型的研究报道。本研究在已经完成 F18ab 或 F18ac 基因分析的基础上,建立了一种快速、敏感和特异的 PCR 鉴定方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 引物:根据 F18ab 菌毛 A 亚单位(*fedA/ab*)基因序列设

计的引物由 TaKaRa 合成,引物 *fedA-1* 和 *fedA-2* 的 5' 端分别引入 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切位点,其序列如下:

引物 *fedA-1*: 5'-CATGATGGATCCATGAAAAGACTAGTGT-TTTATTTCCT-3'; 引物 *fedA-2*: 5'-CATGATGAATTCCTTACTTGT-AGTAACCGCGTAAGCC-3'; 引物 *fedA-3*: 5'-CGTGAACGGTAAACACAGGG-3'。

1.1.2 菌株:F18ab<sup>+</sup> 大肠杆菌的 F107/86 株、D 株;F18ac<sup>+</sup> 大肠杆菌(*Escherichia coli*)的 2134P 株、8199 株、8813 株;K88<sup>+</sup> 大肠杆菌、K99<sup>+</sup> 大肠杆菌、987P<sup>+</sup> 大肠杆菌、F41<sup>+</sup> 大肠杆菌菌株均为扬州大学兽医微生物教研室收藏。

1.1.3 试剂:PCR 试剂盒、DNA Marker DL2000、优质琼脂糖等均购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 模板 DNA 的制备

取 F18ab<sup>+</sup> 大肠杆菌的 F107/86 株、D 株, F18ac<sup>+</sup> 大肠杆菌的 2134P 株、8199 株、8813 株, K88<sup>+</sup> 大肠杆菌、K99<sup>+</sup> 大肠杆菌、987P<sup>+</sup> 大肠杆菌、F41<sup>+</sup> 大肠杆菌(对照),采用热煮沸法分别制备模板 DNA<sup>[10]</sup>。

### 1.3 *fedA* 全基因的 PCR 扩增

各取上述制备的模板 DNA 2 $\mu$ L,引物 *fedA-1*、引物 *fedA-2* 各 2 $\mu$ L(浓度均为 50mmol/L), 4 $\times$  dNTPs 4 $\mu$ L(浓度为 10mmol/L), *Taq* 酶 1 $\mu$ L(5U) 将各种成分在 0.5mL 灭菌 PCR 管内,加 H<sub>2</sub>O 至整个反应体系为 50 $\mu$ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 4min;94 $^{\circ}$ C 1min;56 $^{\circ}$ C 1min;72 $^{\circ}$ C 1min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min;4 $^{\circ}$ C 保存。

### 1.4 *fedA* 基因的双重 PCR 扩增

各取上述制备的模板 DNA 2 $\mu$ L,引物 *fedA-1*、*fedA-2* 和 *fedA-3* 各 2 $\mu$ L(浓度均为 50mmol/L)。其他成分和 PCR 循环参数同上。取 PCR 扩增产物 4 $\mu$ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,以

基金项目:国家 863 计划(2003AA222141)

作者简介:成大荣(1973-)男,江苏省赣榆县人,讲师,预防兽医学博士研究生,主要从事病原微生物学及免疫学研究和教学工作。Tel/Fax 86-514-7972587;E-mail: yzcd@yzcn.net

收稿日期:2004-02-09,修回日期:2004-04-21

DNA Marker DL2000 为参照,溴乙啶染色后在紫外灯下观察扩增片段大小。

## 2 结果

### 2.1 *fedA* 全基因的 PCR 扩增

利用引物 *fedA*-1 和 *fedA*-2 进行的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示,从 F18ab<sup>+</sup> 大肠杆菌的 F107/86 株、D 株, F18ac<sup>+</sup> 大肠杆菌的 2134P 株、8199 株、8813 株均可扩增到约为 520bp 的片段(图 1),与期望的长度大小相当(*fedA*/ab 片段为 513bp, *fedA*/ac 片段为 516bp),而从 K88<sup>+</sup> 大肠杆菌、K99<sup>+</sup> 大肠杆菌、987P<sup>+</sup> 大肠杆菌、F41<sup>+</sup> 大肠杆菌均不能扩增到期望的片段。表明将引物 *fedA*-1 和 *fedA*-2 组合,可特异性鉴定 F18<sup>+</sup> 大肠杆菌。

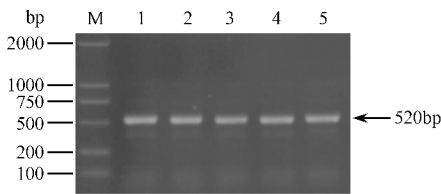


图 1 *fedA* 全序列的 PCR 扩增产物

Fig.1 The PCR products of *fedA* of the tested *E. coli*

M. DNA Marker DL2000 ;1 ~ 2. F107/86 and D respectively ;3 ~ 5. 8813 , 8199 and 2134P respectively.

### 2.2 *fedA* 基因的双重 PCR 扩增

利用引物 *fedA*-1、*fedA*-2 和 *fedA*-3 进行的双重 PCR 扩增结果显示,从 F18ab<sup>+</sup> 大肠杆菌的 F107/86 株、D 株中均可扩增到 2 个大小约为 520bp 和 170bp 的 DNA 片段,与预期大小一致(图 2);从 F18ac<sup>+</sup> 大肠杆菌的 2134P 株、8199 株、8813 株

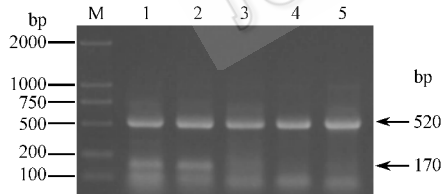


图 2 *fedA* 的双重 PCR 扩增产物

Fig.2 The duplex PCR products of *fedA* of the tested *E. coli*

M. DNA Marker DL2000 ;1 ~ 2. F107/86 and D respectively ;3 ~ 5. 8813 , 8199 and 2134P respectively.

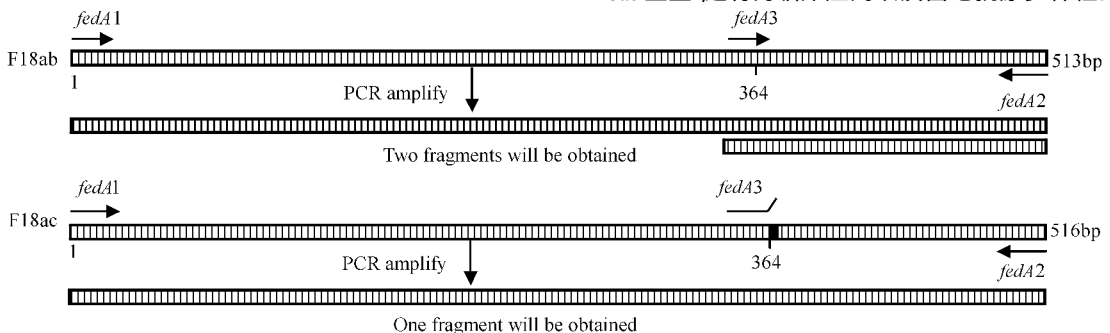


图 3 利用 PCR 方法鉴定菌毛 F18ab 与 F18ac 的策略

Fig.3 The strategy of identifying fimbriae F18ab and F18ac by PCR

均只能扩增到约为 520bp 的片段(图 2),表明将引物 *fedA*-1、*fedA*-2 和 *fedA*-3 组合可特异性鉴别 F18 菌毛的 F18ab 与 F18ac 亚型。

## 3 讨论

F18ab 和 F18ac 是 F18 菌毛的 2 个不同抗原亚型。F18 菌毛是由主要结构亚单位 A 和次要结构亚单位 E、F 所共同组成,本实验室研究结果表明, *fedA*/ac 和 *fedA*/ab 在下列位置均存在 13 个碱基的变异:① 第 92 位碱基的 G→A 转换,② 第 169 位碱基的 A→G 转换,③ 第 176 位碱基的 A→G 转换,④ 第 220、221 位碱基的 G→A 转换和 C→A 颠换,⑤ 第 223、224 位碱基的 AC→CT 转换,⑥ 第 248 位碱基的 A→C 颠换,⑦ 第 312 位碱基的 A→C 颠换(沉默突变),⑧ 第 333 位碱基的 T→C 转换(沉默突变),⑨ 第 364、365 位碱基的 CC 或 CT 的插入突变,⑩ 第 368 位碱基的 C 的插入突变。不仅 *fedA*/ac 与 *fedA*/ab 之间存在着共同的突变,而且不同的 *fedA*/ac 和 *fedA*/ab 之间也存在一定的差异。

本研究所用的 3 条引物是在 F18 菌毛基因多样性研究的基础上设计的(图 3),由于 *fedA*/ac 在第 364-365 位碱基的 CC 或 CT 的插入以及第 368 位碱基的 C 的插入,导致引物 *fedA*3 的 3' 末端有 3 个碱基不能与 *fedA*/ac 基因模板匹配,而引物 *fedA*1、*fedA*2 均能与 *fedA*/ab、*fedA*/ac 匹配,所以按照此设计,利用这 3 条引物的组合应该能从 F18ab<sup>+</sup> 大肠杆菌中扩增到 2 个大小约为 520bp 和 170bp 的 DNA 片段,而只能从 F18ac<sup>+</sup> 大肠杆菌中扩增到 1 个大小约为 520bp DNA 片段。本实验结果证实了引物设计的正确性,且只能从表达 F18<sup>+</sup> 的大肠杆菌中扩增到期望的片段,这表明将引物 *fedA*-1 和 *fedA*-2 组合可特异性鉴定 F18<sup>+</sup> 大肠杆菌,将引物 *fedA*-1、*fedA*-2 和 *fedA*-3 组合可特异性区分 F18 菌毛的 F18ab 与 F18ac 亚型。

大肠杆菌 F18 菌毛一般用单克隆抗体鉴定,但由于国内尚无针对 F18ab 或 F18ac 亚型的特异性单抗,因此未见鉴定其亚型的详细研究。另外由于菌毛在体外表达受到培养条件的限制,即使是 F18<sup>+</sup> 大肠杆菌也不一定能良好地表达菌毛,所以单抗使用具有一定的局限性。本研究建立的 PCR 方法可快速、敏感和特异地检测 F18 菌毛和区分 F18ab 与 F18ac 亚型,这将为临床应用以及菌毛抗原多样性的研究提

供一种有用的手段。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Imberechts H , Bertschinger H U , Nagy B . Fimbrial colonisation factors F18ab and F18ac of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea and edema disease. *Adv Exp Med Biol* , 1997 , **412** :175 - 183 .
- [ 2 ] Fekete P Z , Gerardin J , Jacquemin E , et al . Replicon typing of F18 fimbriae encoding plasmids of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* strains from porcine postweaning diarrhoea and oedema disease. *Vet Microbiol* , 2002 , **85** ( 3 ) :275 - 284 .
- [ 3 ] Nagy B , Whipp S C , Imberechts H , et al . Biological relationship between F18ab and F18ac fimbriae of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs with oedema disease or diarrhea. *Microb Pathog* , 1997 , **22** ( 1 ) :1 - 11 .
- [ 4 ] Hahn E , Wild P , Schraner E M , et al . Structural analysis of F18 fimbriae expressed by porcine toxigenic *Escherichia coli* . *J Struct Biol* , 2000 , **132** ( 3 ) :241 - 250 .
- [ 5 ] Imberechts H , De Greve H , Schlicker C , et al . Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86 , which causes edema disease in pigs , and nucleotide sequence of the F107 major fimbrial subunit gene , *fedA* . *Infect Immun* , 1992 , **60** ( 5 ) :1963 - 1971 .
- [ 6 ] Amorim C R , Matsuura M S , Rosa J C , et al . Purification and characterization of the fimbria F18ac ( 2134P ) isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli* ( ETEC ) . *Vet Microbiol* 2000 , **76** ( 1 ) :41 - 49 .
- [ 7 ] Rippinger P , Bertschinger H U , Imberechts H , et al . Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107 , 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. *Vet Microbiol* , 1995 , **45** ( 4 ) :281 - 295 .
- [ 8 ] Imberechts H , Wild P , Charlier G , et al . Characterization of F18 fimbrial genes *fedE* and *fedF* involved in adhesion and length of enterotoxigenic *Escherichia coli* strain 107/86. *Microb Pathog* , 1996 , **21** ( 3 ) :183 - 192 .
- [ 9 ] Smeds A , Hemmann K , Jakava-Viljanen M , et al . Characterization of the adhesin of *Escherichia coli* F18 fimbriae. *Infect Immun* , 2001 , **69** ( 12 ) :7941 - 7945 .
- [ 10 ] 徐建生 ,成大荣 ,董国雄 ,等 . 利用 PCR 法鉴定产 SLT-II 的大肠杆菌 . 中国预防兽医学报 , 1999 , **21** ( 5 ) :339 - 340 .

## PCR Identification of *Escherichia coli* F18 and It's Subtypes

CHENG Da-Rong\* XU Jian-Sheng SUN Huai-Chang GAO Song

( Department of Veterinary Medicine , Veterinary Medicine College , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China )

**Abstract** : The fimbrial adhesin F18 is frequently found on the surface of enterotoxigenic *Escherichia coli* ( ETEC ) and vero-toxigenic *E. coli* ( VTEC ) strains which are responsible for diarrhea and edema disease in weaned piglets , and it have been implicated as possible virulence factors that mediated bacterial colonization on small intestinal epithelial cells. The F18 adhesin occurs in two serological variants , F18ab and F18ac . Three synthetic oligonucleotide primers derived from the *fedA* gene of F18ab fimbriae were used in polymerase chain reaction ( PCR ) amplification procedure to detect some enteric pathogens , such as F18ab<sup>+</sup> strains , F18ac<sup>+</sup> strains , K88<sup>+</sup> strains , K99<sup>+</sup> strains , 987P<sup>+</sup> strains and F41<sup>+</sup> strains . The results showed that the established PCRs were not only able to identify F18<sup>+</sup> *E. coli* strains , but also to distinguish F18ab<sup>+</sup> and F18ac<sup>+</sup> strains .

**Key words** : *Escherichia coli* , Fimbriae , F18 , Subtype , Identification