

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (6) :696 - 702; 4 June 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.06.013

## 禽致病性大肠杆菌毒力基因多重 PCR 方法的建立和应用

孟庆美<sup>1,2</sup>, 王少辉<sup>2</sup>, 韩先干<sup>2</sup>, 韩月<sup>2</sup>, 丁铲<sup>2</sup>, 戴建君<sup>1\*</sup>, 于圣青<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

<sup>2</sup>中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

**摘要:**【目的】建立禽致病性大肠杆菌 (*Avian pathogenic Escherichia coli*, APEC) 黏附相关基因、侵袭及毒素相关基因、抗血清存活相关基因及铁转运相关基因的多重 PCR 方法, 实现禽致病性大肠杆菌毒力基因的简便、快速检测。【方法】根据 GenBank 公布的基因序列, 设计合成 18 对特异性引物, 通过条件优化, 建立四组多重 PCR 体系, 并通过模板倍比稀释检测各组多重 PCR 的灵敏性。利用多重 PCR 检测 100 株 APEC 毒力基因的分布, 验证多重 PCR 方法的可行性。【结果】根据 PCR 扩增片段大小判定, 上述四组多重 PCR 体系均能同时扩增出该组中的各个毒力基因, 且灵敏度分别为:  $10^3$  CFU、 $10^3$  CFU、 $10^5$  CFU、 $10^5$  CFU 细菌和 1ng、1ng、10ng、10ng DNA。100 株 APEC 的毒力因子检测结果显示, 多重 PCR 和单基因 PCR 结果一致。【结论】建立的四组多重 PCR 方法能够简便、快速地检测禽致病性大肠杆菌的毒力基因, 可用于毒力基因的鉴定以及流行病学调查。

**关键词:** 禽致病性大肠杆菌, 毒力基因, 多重 PCR, 检测

**中图分类号:** Q93      **文章编号:** 0001-6209 (2014) 06-0696-07

禽致病性大肠杆菌 (*Avian pathogenic Escherichia coli*, APEC) 属于肠道外大肠杆菌, 由其引起的鸡、火鸡及其他禽类的急、慢性传染病统称为禽大肠杆菌病, 该病的临床病症复杂多样, 常见的有心包炎、肝周炎、气囊炎、卵黄性腹膜炎、输卵管炎、脐炎、关节炎、全眼球炎、肿头综合症、肉芽肿、败血症等, 有时甚至能引起脑炎<sup>[1-4]</sup>。自 1894 年首次报道了鸡大肠杆菌病以来, 世界许多养禽国家和地区都陆续报道了本病的发生<sup>[5]</sup>。随着集约化养禽业的迅速发展, 该病发病率呈上升趋势, 成为了制约世界养禽业健康发展的重要细菌性疾病。

毒力因子即致病因子, 是致病菌致病过程中的重要因素, 多种毒力因子共同作用而引发相关疾病。

目前, 已发现 APEC 和其他肠道外致病性大肠杆菌具有很多相同的毒力因子, 如菌毛黏附素 (如 I 型、P 菌毛等) 和非菌毛黏附素 (Curli 菌毛)、侵袭素、抗血清存活因子 (外膜蛋白、脂多糖、Iss 蛋白、大肠杆菌素 V 和 K 荚膜等)、铁摄取系统 (耶尔森菌素、气杆菌素等)、溶血素 (温度敏感性血凝素、溶血素 E 等) 和空泡形成毒素等<sup>[6]</sup>。越来越多的试验提示 APEC 是人 ExPEC (NMEC 和 UPEC) 的毒力基因的贮库。因此, 加强对我国禽致病性大肠杆菌的长期监测和研究, 对养禽业和公共卫生具有重要意义<sup>[7]</sup>。本研究根据 APEC 的 18 个毒力基因建立了 4 组多重 PCR 方法, 能够快速检测 APEC 的毒力基因, 省时省力, 弥补了单基因 PCR 检测方法的不足。

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81201266, 31370045, 31072161); 公益性行业 (农业) 专项: 家禽主要细菌病防控技术研究与示范 (201303044)

\* 通信作者。于圣青, Tel: +86-21-34293461, E-mail: yus@shvri.ac.cn; 戴建君, Tel: +86-25-84396566, E-mail: daijianjun@njau.edu.cn

**作者简介:** 孟庆美 (1989 -), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 从事兽医微生物方面的研究。E-mail: mqm89@163.com

**收稿日期:** 2013-09-18; **修回日期:** 2013-12-18

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 禽致病性大肠杆菌菌株 APEC01 和 DE719 均由本实验室分离和保存, 作为本研究中的阳性模板。100 株 APEC 菌株均为本实验室分离保存<sup>[8-9]</sup>, 其中包括 31 株大肠杆菌 A 进化群菌株, 22 株大肠杆菌 B1 进化群菌株, 33 株大肠杆菌 B2 进化群菌株, 14 株大肠杆菌 D 进化群菌株。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 2 × PCRmix、DNA marker

购自北京康为世纪生物科技有限公司; 细菌基因组提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; GeneJET Gel Extraction Kit 购自 Thermo 公司; PCR 仪、低温冷冻离心机购自 Eppendorf 公司; 分光光度计购自 BIO-RAD 公司; 电泳仪及全自动凝胶成像处理系统购自上海天能科技有限公司。

**1.1.3 引物:** 根据文献 [7] 报道, 选择 18 个禽致病性大肠杆菌毒力基因进行检测。根据 GenBank 公布的基因序列, 设计合成特异性引物 (表 1) 由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

表 1. APEC 毒力基因多重 PCR 引物

Table 1. Primers used for the multiplex PCR of virulence-associated genes in APEC strains

gene	description	sequence (5' → 3')	c (primer) / (μmol/L)	product size /bp	usage	reference
<i>aatA</i>	APEC autotransporter gene A	F: CATAGGCGTTTCTCTTTCGGAT	0.3	1226	multiplex PCR 1	[10]
		R: CCTGTCTGCATACAGATTCGTT	0.3			
<i>papC</i>	pilus associated with pyelonephritis	F: GCTGATATCACGACGTCAGT	0.2	768	multiplex PCR 1	present study
		R: GTCAACAAGAAGACGTTCC	0.2			
<i>tsh</i>	temperature-sensitive haemagglutinin	F: GTCTGTACAGCTCTGTGTTTC	0.3	598	multiplex PCR 1	present study
		R: ATAGGATGACAGGCTACCGAC	0.3			
<i>fimC</i>	type 1 fimbriae (D-mannose-specific adhesin)	F: GCCGATGGTGATAAAGGATGG	0.2	475	multiplex PCR 1	present study
		R: GGGTAAGTGGCCATAATCA	0.2			
<i>mat</i>	meningitis-associated and temperature regulated fimbriae	F: CGACCTGGTCAGCAACAGCC	0.2	238	multiplex PCR 1	present study
		R: TCCAGCCCCACATTCAGTGT	0.2			
<i>ibeB</i>	invasion of brain endothelium	F: GTTCTCACTCAGCCAGAACG	0.3	1172	multiplex PCR 2	present study
		R: CATCCAGCACTTCCAGATAAC	0.3			
<i>vat</i>	vacuolating autotransporter toxin	F: TCCATGCCTCAACGCTCAGAG	0.2	939	multiplex PCR 2	present study
		R: CTGTTGTCACTGTCGTAACG	0.2			
<i>yijp</i>	invasin of brain endothelium	F: TGGCTTGATTCTGCATCCGAT	0.2	517	multiplex PCR 2	present study
		R: CATCGTCTGCTGGTTGGTGAT	0.2			
<i>ibeA</i>	invasin of brain endothelium	F: GTATGACCGTGGGAACAAGAG	0.2	321	multiplex PCR 2	present study
		R: TGGCAATAGCAGCGGACGTC	0.2			
<i>ompA</i>	outer membrane protein	F: AGCTATCCGGATTGCAGTG	0.2	919	multiplex PCR 3	[7]
		R: GGTGTTGCCAGTAACCGG	0.2			
<i>neuC</i>	K1 capsular polysaccharide	F: GGTGGTACATCCGGGATGTC	0.2	792	multiplex PCR 3	present study
		R: CATGGTGCTGAAAAGACATTAGC	0.2			
<i>cva/</i> <i>cvi</i>	structural genes of colicin V operon	F: TCCAAGCGGACCCCTTATAG	0.2	598	multiplex PCR 3	[7]
		R: CGCAGCATAAGTTCCATGCT	0.2			
<i>iss</i>	increased serum survival	F: ATCACATAGGATTCTGCCG	0.4	309	multiplex PCR 3	[7]
		R: CAGCGGAGTATAGATGCCA	0.4			
<i>iroN</i>	catechololate siderophore receptor	F: CCTCCGACGATGATAATGACG	0.2	866	multiplex PCR 4	present study
		R: GATACCATTATGCCAATGCC	0.2			
<i>fyuA</i>	ferric yersinia uptake	F: ATGTGAAACTGCGTCTGGCG	0.2	728	multiplex PCR 4	present study
		R: CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	0.2			
<i>iucD</i>	aerobactin synthesis	F: GAAGCATATGACACAATCCCTG	0.2	613	multiplex PCR 4	present study
		R: CAGACTGAAGTCATCACGCC	0.2			
<i>irp2</i>	iron-repressible protein	F: CTGATGAACTCACTCGCTATCC	0.2	440	multiplex PCR 4	present study
		R: AGCATCTCTGGCTCTGCTC	0.2			
<i>chuA</i>	heme receptor gene	F: GACGAACCAACGGTCAGGAT	0.2	278	multiplex PCR 4	[7]
		R: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	0.2			

## 1.2 基因组的制备

APEC O1 和 DE719 的基因组 DNA 根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行提取。

## 1.3 多重 PCR 反应体系的建立

首先建立并优化单个毒力基因 PCR 反应体系, 优化实验设计如下:

PCR 反应体系:  $2 \times \text{PCRmix}$  12.5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各取 0.8  $\mu\text{L}$ , 模板(菌液) 2.0  $\mu\text{L}$ , 最后加灭菌超纯水至 25  $\mu\text{L}$ 。多重 PCR 体系 1 中的基因以 APEC O1 为模板, 其余基因以 DE719 为模板(表 1), 超纯水作空白对照。PCR 反应条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $95^\circ\text{C}$  50 s,  $55^\circ\text{C}$  50 s,  $72^\circ\text{C}$  80 s, 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  10 min。

建立单个毒力基因 PCR 反应体系后, 将 18 个毒力基因分为 4 组多重 PCR 进行扩增(表 1), 多重 PCR 体系 1 以 APEC O1 为模板, 其余以 DE719 为模板, 分别调整引物浓度和 PCR 反应退火温度等参数对多重 PCR 体系进行组合和条件优化。反应体系及参数如下:  $2 \times \text{PCRmix}$  12.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$  或菌体模板 2  $\mu\text{L}$ , 各引物量如下述, 超纯水补至 25  $\mu\text{L}$ 。多重 PCR 体系 1(黏附相关基因)中 *aatA*、*tsh* 上下游引物各 0.75  $\mu\text{L}$ , *papC*、*fimC*、*mat* 上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ; 多重 PCR 体系 2(侵袭及毒素相关基因)中 *ibeB* 上下游引物各 0.75  $\mu\text{L}$ , *vat*、*yjip*、*ibeA* 上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ; 多重 PCR 体系 3(抗血清存活因子相关基因)中 *ompA*、*neuC* 及 *cva/cvi* 上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , *iss* 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ; 多重 PCR 体系 4(铁转运相关基因)中 *iroN*、*fyuA*、*iucD*、*irp*、*chuA* 上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ (上述引物浓度均为 10 pmol/ $\mu\text{L}$ )。PCR 反应参数为:  $95^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $95^\circ\text{C}$ , 50 s;  $55^\circ\text{C}$  50s;  $72^\circ\text{C}$  80 s, 30 次循环;  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min。

## 1.4 多重 PCR 敏感性试验

**1.4.1 菌液敏感性试验:** 将 APEC O1、DE719 菌液用双蒸水洗一遍后重悬, 将两者的初始浓度调至  $5 \times 10^8$  CFU/mL, 依次十倍稀释至  $5 \times 10^2$  CFU/mL, 取 2  $\mu\text{L}$  做模板, 对应菌数依次为  $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10$ 、1 CFU。

**1.4.2 基因组 DNA 敏感性试验:** 分别提取 APEC O1、DE719 的基因组 DNA, 依次稀释至以下浓度: 100 ng/ $\mu\text{L}$ 、50 ng/ $\mu\text{L}$ 、10 ng/ $\mu\text{L}$ 、1 ng/ $\mu\text{L}$ 、500 pg/ $\mu\text{L}$ 、10 pg/ $\mu\text{L}$ 、1 pg/ $\mu\text{L}$ 、0.1 pg/ $\mu\text{L}$ , 各取

1  $\mu\text{L}$  作为模板进行 PCR 反应。

## 1.5 PCR 产物的鉴定

**1.5.1 琼脂糖凝胶电泳:** 取 8  $\mu\text{L}$  扩增产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶, 120V 恒压电泳 30 min, 在紫外灯下观察, 使用全自动凝胶成像系统记录实验结果。

**1.5.2 PCR 产物测序:** 单基因 PCR 产物及多重 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 采用 GeneJET Gel Extraction Kit 回收目的片段, 送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

## 1.6 APEC 毒力基因分布率检测

应用多重 PCR 方法对本实验室保存的 100 株 APEC 菌株进行检测, 验证所建立的多重 PCR 方法。

## 2 结果

### 2.1 多重 PCR 方法的建立

以禽致病性大肠杆菌 APEC O1 和 DE719 为模板, 用设计的引物分别建立单个毒力基因的 PCR 检测体系。结果显示, 用上述引物对建立的 PCR 可特异性扩增出目的条带, 且与预期扩增基因片段大小一致(图 1)。而以鼠伤寒沙门氏菌(CVCC 3384)、肠炎沙门氏菌(CVCC 1805)、鸡白痢沙门氏菌(CVCC 519)、鸭沙门氏菌(CAU 0118)、鸭疫里默氏杆菌(CH3)、禽巴氏杆菌(CVCC 493)、鸡毒支原体(CVCC 1651)、禽支原体(CVCC 274)、金黄色葡萄球菌(CVCC 543)、禽波氏菌(ATCC 菌株 IPDH 591-77)和金黄色葡萄球菌等菌株为模板进行扩增, 均未观察到相应扩增产物, 表明引物有较好的特异性(结果未显示)。

在单基因 PCR 的基础上进行多重 PCR 检测体系组合和条件优化。实验发现, 反应体系中引物浓度和退火温度是目的基因均得到有效扩增的关键。本研究分别摸索了不同引物浓度、PCR 反应退火温度等参数, 最终确定的各引物最佳浓度见表 1, PCR 反应程序:  $95^\circ\text{C}$  5 min;  $95^\circ\text{C}$  50 s,  $55^\circ\text{C}$  50 s,  $72^\circ\text{C}$  80 s, 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  10 min。将目的基因测序结果与 APEC O1 及 DE719 毒力基因序列进行比对, 同源性均为 100%。说明在上述条件下, 18 个毒力基因均得到了有效特异的扩增(图 2)。

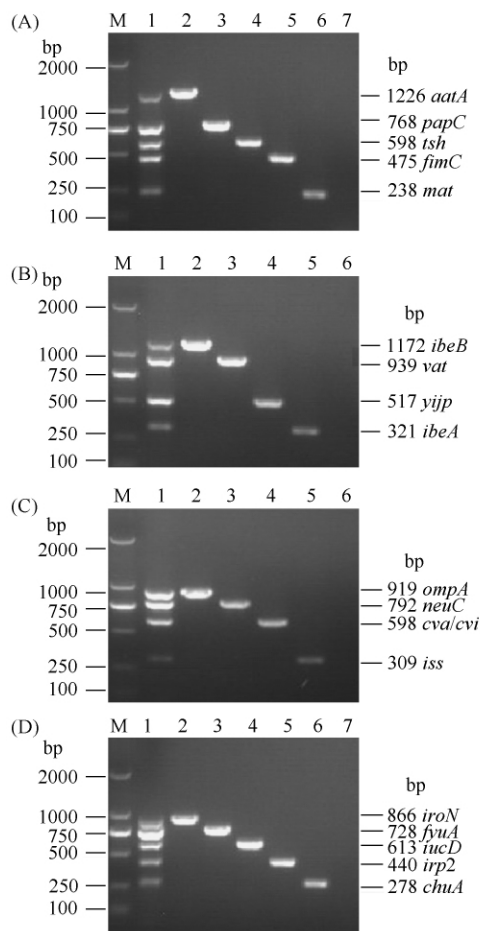


图 1. 禽致病性大肠杆菌毒力基因多重 PCR 的建立

Figure 1. Development of multiplex PCR for detection of APEC virulence genes. (A) Lane 1: Products of multiplex PCR 1; Lane 2-6: Products of *aatA*, *papC*, *tsh*, *fimC*, *mat* genes; Lane 7: Negative control (B) Lane 1: Products of multiplex PCR 2; Lane 2-5: Products of *ibeB*, *vat*, *yijp*, *ibeA* genes; Lane 6: Negative control Lane (C) Lane 1: Products of multiplex PCR 3; Lane 2-5: Products of *ompA*, *neuC*, *cva/cvi*, *iss* genes; Lane 6: Negative control (D) Lane 1: Products of multiplex PCR 4; Lane 2-6: Products of *iroN*, *fyuA*, *iucD*, *irp2*, *chuA* genes; Lane 7: Negative control Lane M: DNA Marker.

## 2.2 多重 PCR 敏感性检测结果

**2.2.1 菌液敏感性试验:** 分别以倍比稀释的 APEC01 和 DE719 为模板进行多重 PCR 扩增。结果显示, 多重 PCR 反应体系 1、2、3、4 的敏感性依次为  $10^3$ 、 $10^3$ 、 $10^5$ 、 $10^5$  CFU (图 2), PCR 扩增结果见表 2。

**2.2.2 基因组 DNA 敏感性试验:** 分别以稀释的 APEC01、DE719 基因组 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增, 多重 PCR 反应体系 1、2、3、4 的敏感性依次为

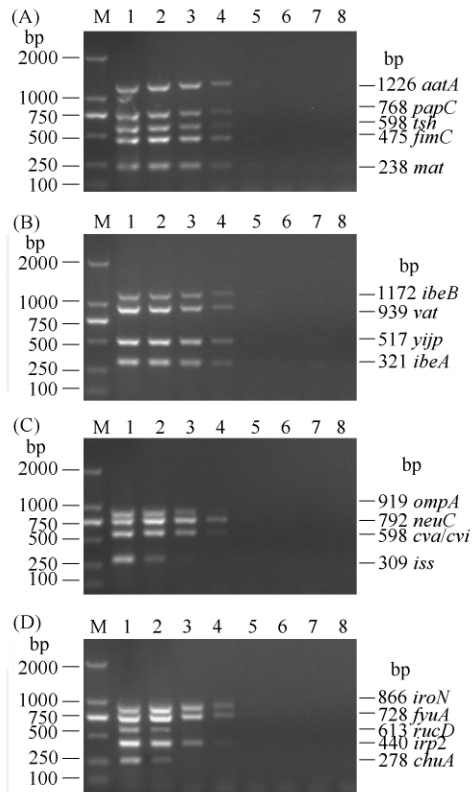


图 2. 多重 PCR 菌液敏感性试验

Figure 2. Sensitivity test of multiplex PCR using bacteria. (A) Products of multiplex PCR 1; (B) Products of multiplex PCR 2; (C) Products of multiplex PCR 3; (D) Products of multiplex PCR 4; M: DNA Marker; lane 1:  $10^6$  CFU; lane 2:  $10^5$  CFU; lane 3:  $10^4$  CFU; lane 4:  $10^3$  CFU; lane 5:  $10^2$  CFU; lane 6: 10 CFU; lane 7: 1 CFU; lane 8: negative control.

1、1、10、10 ng (图 3)。

## 2.3 APEC 毒力基因分布率检测

应用所建立的多重 PCR 方法对 100 株 APEC 分离株进行检测, PCR 统计结果见表 2。结果表明, 在这 18 个毒力基因中, 除 *papC* (2%)、*vat* (3%)、*ibeA* (5%) 及 *neuC* (4%) 外, 其余 14 个毒力基因均有较高的分布率, 分别为 *aatA* (44%)、*tsh* (47%)、*fimC* (85%)、*mat* (83%)、*ibeB* (100%)、*yijp* (98%)、*ompA* (85%)、*cva/cvi* (68%)、*iss* (79%)、*iroN* (70%)、*fyuA* (22%)、*iucD* (72%)、*irp2* (26%) 和 *chuA* (47%)。分析大肠杆菌系统进化分群和毒力基因的分布之间的联系, 结果表明, 大部分毒力基因在大肠杆菌进化群中均有分布, 且大部分毒力基因在大肠杆菌进化群 B2 及 D 中分布率较高, 和国内外研究结果一致<sup>[11-12]</sup>。

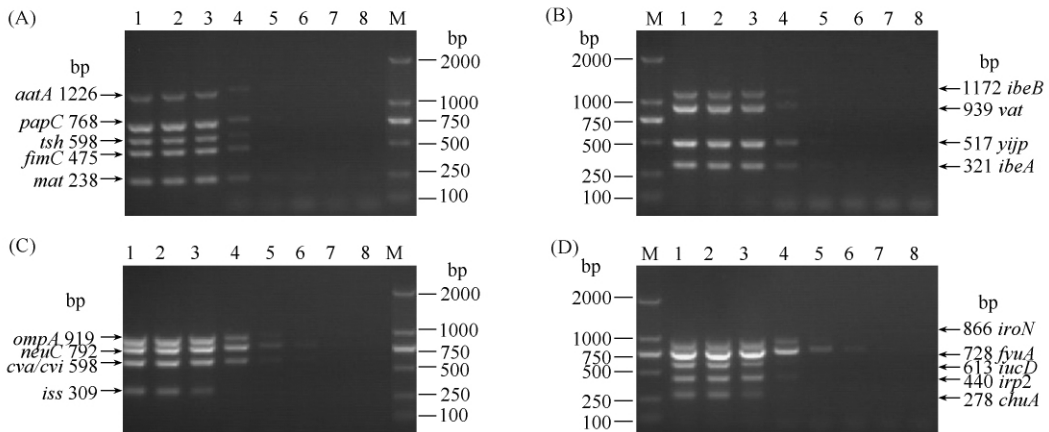


图 3. 多重 PCR 基因组 DNA 敏感性试验

Figure 3. Sensitivity test of multiplex PCR using DNA. (A) Products of multiplex PCR 1; (B) Products of multiplex PCR2; (C) Products of multiplex PCR 3; (D) Products of multiplex PCR 4; M: DNA Marker; Lane1: 100ng; Lane2: 50ng; Lane 3: 10ng; Lane 4: 1ng; Lane 5: 100pg; Lane 6: 10pg; Lane 7: 1pg; Lane 8: Negative control.

表 2. APEC 分离株毒力基因分布

Table 2. Distribution of virulence genes in APEC isolates

gene	group				sum (n = 100)
	A (n = 31)	B1 (n = 22)	B2 (n = 33)	D (n = 14)	
<i>aatA</i>	9 (29%)	3 (13.6%)	22 (66.7%)	10 (71.4%)	44 (44%)
<i>papC</i>	0 (0)	0 (0)	1 (3.0%)	1 (7.1%)	2 (2%)
<i>tsh</i>	16 (51.6%)	3 (13.6%)	23 (69.7%)	5 (35.7%)	47 (47%)
<i>fimC</i>	31 (100%)	10 (45.5%)	33 (100%)	11 (78.6%)	85 (85%)
<i>mat</i>	26 (83.9%)	12 (54.5%)	32 (97.0%)	13 (92.9%)	83 (83%)
<i>ibeB</i>	31 (100%)	22 (100%)	33 (100%)	14 (100%)	100 (100%)
<i>vat</i>	0 (0)	0 (0)	3 (9.1%)	0 (0)	3 (3%)
<i>yijp</i>	31 (100%)	22 (100%)	32 (97.0%)	13 (92.9%)	98 (98%)
<i>ibeA</i>	1 (3.2%)	1 (4.5%)	3 (9.0%)	0 (0)	5 (5%)
<i>ompA</i>	27 (87.1%)	22 (100%)	25 (75.8%)	11 (78.6%)	85 (85%)
<i>neuC</i>	1 (3.2%)	0 (0)	3 (9.1%)	0 (0)	4 (4%)
<i>cva/cvi</i>	22 (71.0%)	18 (81.8%)	19 (57.6%)	9 (64.3%)	68 (68%)
<i>iss</i>	20 (64.5%)	16 (72.7%)	32 (97.0%)	11 (78.6%)	79 (79%)
<i>iroN</i>	20 (64.5%)	13 (59.1%)	29 (87.9%)	8 (57.1%)	70 (70%)
<i>fyuA</i>	4 (12.9%)	0 (0)	12 (36.4%)	6 (42.9%)	22 (22%)
<i>iucD</i>	19 (61.3%)	13 (59.1%)	31 (94.0%)	9 (64.3%)	72 (72%)
<i>irp2</i>	6 (19.4%)	1 (4.5%)	13 (39.4%)	6 (42.9%)	26 (26%)
<i>chuA</i>	0 (0)	0 (0)	33 (100%)	14 (100%)	47 (47%)

### 3 讨论

禽致病性大肠杆菌病是危害养禽业的重要细菌病,给养禽业带来严重威胁和造成重大经济损失,毒力因子在 APEC 的致病过程中发挥着重要作用。黏附素与相应特异性受体结合使细菌定植于宿主细胞表面,免于非特异性屏障的清除,进而在细菌的定植、侵入及维持中发挥主要作用<sup>[13]</sup>。侵袭素能使 APEC 侵入脑血管内皮细胞从而突破血脑屏障引起脑膜炎,同时还参与生物被膜的形成<sup>[4]</sup>。摄铁系统

能通过对铁的摄取来调节细菌毒力因子的表达,摄铁能力的大小关系着细菌致病性的强弱<sup>[14]</sup>。抗血清存活因子可通过增强菌株抗血清的杀菌作用而增强 *E. coli* KI 的毒力<sup>[15]</sup>。空泡形成毒素 (Vat) 则是 APEC 进入血液并在血液中存活所需的毒力因子<sup>[16]</sup>,并参与败血症的发生。国内外的分子流行病学调查显示, APEC 的致病性与其毒力因子密切相关。Christa 等通过比较分析 APEC、EPEC、EHEC、ETEC、UPEC 以及非致病性大肠杆菌的毒力基因,证实 APEC 至少含有 4 个以下 *astA*、*iss*、*irp2*、*papC*、*iucD*、*tsh*、*vat*、*cva/cvi* 毒力基因,而禽非致病性大肠

杆菌则含有少于 3 个毒力基因<sup>[17]</sup>。因此,对 APEC 中毒力基因的监测具有重要的生物学意义。

目前,多采用单基因 PCR,其优点是可以分别设定反应参数保证扩增效率较高,且能分别检测相近大小的基因,但单基因 PCR 一次只能检测一种病原或一个基因,当需检测多种病原或多个基因时,则费时费力,且成本大大增加。而多重 PCR 反应可节约试剂、反应时间和电泳时间,同时各对引物在扩增时的竞争使检测具有较低的假阳性率。因此,与单基因 PCR 方法相比,多重 PCR 方法具有更准确、高效、经济的特点。

然而,关于采用多重 PCR 方法进行 APEC 多种毒力基因检测的研究,国内外鲜有报道。本研究根据文献报道,选择了 18 个 APEC 毒力基因,分别设计了 18 对特异性引物,为方便日常检测的统计与分析,将这 18 个毒力基因按照黏附相关基因、侵袭及毒素相关基因、抗血清存活相关基因及铁转运相关基因分为 4 组。通过常规 PCR 扩增单个基因,摸索各个基因的扩增条件,检验引物的特异性。但当单个基因均得到有效扩增时,组合后的扩增结果并未达到预期效果,仅第三组的全部基因得到成功扩增,第一组的 *mat*、第二组的 *ibeB*、*vat*、*yjip* 及第四组的 *irp2* 扩增失败。经温度梯度摸索,结果仍未得到改善。将每组设计成一系列仅减少其中一对引物的多重 PCR,以确定引起引物间严重干扰的引物,并重新设计。然后根据目的条带的亮度,摸索出最佳引物浓度配比,使每个目的基因都能得到足够的扩增量。经过以上条件优化成功建立了四组多重 PCR 方法,并调整其敏感性能够满足检测需要。利用本研究建立的多重 PCR 方法对 100 株 APEC 的毒力因子进行检测,结果显示多重 PCR 和单基因 PCR 结果一致,结果可靠,可用于 APEC 毒力基因检测。本文分析 100 株禽致病性大肠杆菌分离株的毒力基因检测结果,发现 *fimC* (85%)、*mat* (83%)、*ibeB* (100%)、*yjip* (98%)、*ompA* (85%)、*cva/cvi* (68%)、*iss* (79%)、*iroN* (70%) 和 *iucD* (72%) 毒力基因的分布率较高,和国内外报道基本一致<sup>[17]</sup>。

综上所述,本研究建立的多重 PCR 方法可从 APEC 分离菌株中检测出这 18 个毒力基因,且特异性强,准确性好,敏感度较高,可应用于 APEC 的诊断及分子流行病学调查。

## 参考文献

[1] 陆承平. 兽医微生物学. 第四版. 北京:中国农业出版

社,2007: 99-107.

- [2] Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, 1999, 30 (2-3): 299-316.
- [3] Ewers C, Janssen T, Wieler LH. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 2003, 116 (9-10): 381-395.
- [4] Wang S, Niu C, Shi Z, Xia Y, Yaqoob M, Dai J, Lu C. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 2011, 79 (1): 279-287.
- [5] Bhavsar AP G J, Finlay BB. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature*, 2007, 449 (7164): 827-834.
- [6] Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8 (1): 26-38.
- [7] Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, Antao EM, Laturmus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, Bohnke U, Steinruck H, Philipp HC, Wieler LH. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*, 2007, 297 (3): 163-176.
- [8] Chen W, Han X, He L, Hu Q, Yu S. Characterization of duck pathogenic *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2010, 18 (2): 34-40. (in Chinese).  
陈文静, 韩先干, 何亮, 胡青海, 于圣青. 鸭致病性大肠杆菌的分离鉴定及其生物学特性分析. 中国动物传染病学报, 2010, 18 (2): 34-40.
- [9] Bai H, Ji JH, Han X, Gong J, Dong H, Ding C, Qi K, Yu S. Characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* isolated from Jiangsu and Anhui provinces. *Microbiology China*, 2013, 40 (7): 1315-1322. (in Chinese).  
白灏, 冀辉, 韩先干, 龚建森, 董洪亮, 丁铎, 祁克宗, 于圣青. 禽致病性大肠杆菌江苏、安徽分离株的生物学特性分析. 微生物学通报, 2013, 40 (7): 1315-1322.
- [10] Wang S, Xia Y, Dai J, Shi Z, Kou Y, Li H, Bao Y, Lu C. Novel roles for autotransporter adhesin AatA of avian pathogenic *Escherichia coli*: colonization during infection and cell aggregation. *Immunology and Medical Microbiology*, 2011, 63 (3): 328-338.
- [11] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (10): 4555-4558.
- [12] Wang S, Dai J, Lu C. Distribution of putative virulence genes of Avian pathogenic *Escherichia coli* IMT5155 in *E.*

*coli* strains isolated from human and animal. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (7): 972-978. (in Chinese).

王少辉, 戴建君, 陆承平. 禽致病性大肠杆菌 IMT5155 疑似毒力基因在人源及动物源大肠杆菌中的分布. *微生物学报*, 2011, 51 (7): 972-978.

- [13] La Ragione RM, Sayers AR, Woodward MJ. The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old-chick model. *Epidemiology and Infection*, 2000, 124 (3): 351-363.
- [14] Russo TA, McFadden CD, Carlino-MacDonald UB, Beanan JM, Barnard TJ, Johnson JR. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 2002, 70 (12): 7156-7160.

[15] Prasadarao NV, Wass CA, Weiser JN, Stins MF, Huang SH. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 1996, 64 (1): 146-153.

[16] Welch RABV, Plunkett G 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz DC, Perna NT, Mobley HL, Donnenberg MS, Blattner FR. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99 (26): 17020-17024.

[17] Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp H C, Wieler H. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Disease*, 2005, 49 (2): 269-273.

## Multiplex PCR assay for detection of virulence genes in Avian pathogenic *Escherichia coli*

Qingmei Meng<sup>1,2</sup>, Shaohui Wang<sup>2</sup>, Xianghan Han<sup>2</sup>, Yue Han<sup>2</sup>, Chan Ding<sup>2</sup>, Jianjun Dai<sup>1\*</sup>, Shengqing Yu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

**Abstract:** [Objective] To efficiently study the virulence genes distribution of Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), we developed four multiplex PCR to detect adhesin-associated genes, invasin and toxin-associated genes, serum resistance-associated genes and iron acquisition-associated genes. [Methods] According to gene sequences published in GenBank, we designed and synthesized 18 specific primer pairs, which were used in the four multiplex PCR. Then, we determined the sensitivity of multiplex PCR using diluted bacterial or DNA templates. To verify the feasibility of these multiplex PCR, we determined the distribution of virulence genes in 100 APEC isolates using these multiplex PCR. [Results] According to the results of PCR, we can conclude that each of the 18 genes was exactly and effectively amplified in the four multiplex PCR. The sensitivities of these four multiplex PCR were  $10^3$  Colony forming units (CFU),  $10^3$  CFU,  $10^5$  CFU,  $10^5$  CFU bacteria and 1ng, 1ng, 10ng and 10ng DNA, respectively. Furthermore, the results multiplex PCR for virulence genes distribution in 100 APEC were same as the single PCR. [Conclusion] These results suggest that multiplex PCR developed in this study could efficiently detect the virulence genes of APEC, which was a useful and rapid technique for epidemiological investigation.

**Keywords:** Avian pathogenic *Escherichia coli*, virulence genes, multiplex PCR, detection

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81201266, 31370045, 31072161) and by the Chinese Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201303044)

\* Corresponding author. Shengqing Yu, Tel: +86-21-34293461, E-mail: yus@shvri.ac.cn; Jianjun Dai, Tel: +86-25-84396566, E-mail: daijianjun@njau.edu.cn

Received: 18 September 2013 / Revised: 18 December 2013