

依赖粪便材料的大熊猫肠道耶尔森氏菌的检测

杨水云 裴渭静 孙飞龙 陈 曦 吴明宇 石晓强

(西安交通大学生命科学与技术学院, 西安, 710049)

吴晓民

(陕西省动物研究所, 西安, 710032)

任建设 贾康胜

(陕西省珍稀野生动物抢救饲养研究中心, 陕西周至, 710400)

关键词: 大熊猫; 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 粪便; 非损伤性取样

中图分类号: S854.1

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2004) 02 - 0182 - 03

Feces-based Detection of *Yersinia enterocolitica* in Intestine of *Ailuropoda melanoleuca* by PCR

YANG Shuiyun PEI Weijing SUN Feilong CHEN Xi WU Mingyu SHI Xiaoqiang

(School of Life Science and Technology, Xi 'An Jiaotong University, Xi 'An, 710049)

WU Xiaomin

(Shaanxi Institute of Zoology, Xi 'An, 710032)

REN Jianshe JIA Kangsheng

(Louguantai Wild Animal Protection and Breeding Center, Zhouzhi, Shaanxi, 710400)

Abstract: It is inevitable to develop noninvasive sampling methods to do studies on giant panda even diagnose the diseases since which is so endangered that it 's impossible to carry out invasive sampling. A noninvasive sampling method to detect the intestinal pathogen, *Yersinia enterocolitica* in feces of pandas based designing PCR primers was established in this study. The main procedures are based on bacteria enrichment and cell lysis before binding the pathogen DNA to silica powder at high concentration of Kalium iodide and neutral pH conditions. Before PCR cycles, the binded DNA is washed with 80 % ethanol and eluted with diluted EDTA buffer. Results showed that the silica-based feces DNA-purification method could remove the inhibitors of PCR so applicable to detect the target pathogen.

Key words: Giant panda; *Yersinia enterocolitica*; Feces; Noninvasive sampling

大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 处于濒危状态的原因很多, 前期研究表明大熊猫患病死亡是其种群数量减少的一个重要原因, 其中以消化系统疾病最为严重^[1]。小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica* 简称 Y. e) 是近年来研究较为广泛的人畜共患菌, 可以引起肠胃炎, 严重腹泻等肠道疾病, 还能引起呼吸道、心血管系统、骨骼、结缔组织和全身性疾病。近年来在患肠道疾病的大熊猫中小肠

结肠炎耶尔森氏菌的检出率有所升高, 该菌严重威胁着大熊猫, 特别是幼体和亚成体的生存^[2,3]。大熊猫一旦发病, 治疗起来困难很多, 因此急需一种快速鉴别诊断病原菌种类的方法, 以便对症下药, 及时治疗。PCR 特异 DNA 片断诊断技术, 敏感特异, 简便快速, 是动物病原菌诊断的理想方法, 因此我们选用 PCR 技术诊断大熊猫的肠道病原菌。

由于大熊猫处于严重濒危境地, 在科研活动中

基金项目: 陕西省林业厅专项基金

作者简介: 杨水云 (1962 -), 女, 副教授, 博士, 主要从事保护遗传学和分子生物技术研究。

收稿日期: 2003 - 04 - 16; 修回日期: 2003 - 09 - 16

已不允许对其进行损伤性取样 (Invasive sampling)^[4]。即便对于患病状态的大熊猫, 疾病诊断的采样也应该朝着非损伤性取样 (Non-invasive sampling) 的方向发展。粪便作为肠道病原菌检测的材料, 具有科学方便等特点。但粪便成分十分复杂且多变, 其中含有已知和未知的 PCR 扩增酶的抑制剂^[5], 使得 PCR 检测工作难以直接进行。因此粪便中模板 DNA 的纯化就成为该检测技术建立的关键所在。

本文围绕以粪便材料作为检测样品时所遇到的困难展开研究, 建立了一套从大熊猫粪便检测肠道病原菌耶尔森氏菌的基因诊断技术。

1 材料与方法

1.1 菌株:

标准小肠结肠炎耶尔森氏菌株购自陕西省临床检测中心, 用普通牛肉膏蛋白胨培养基培养作为已知阳性对照。

1.2 试剂与方法:

1) 引物: 选自耶尔森氏菌保守序列, 由上海生工生物工程公司合成, 其序列为:

Y1: GAA CTC GAT GAT AAC TGG GC,

Y2: TTG GAA GTG GGT TGA ATT GC, 扩增产物 274bp。

2) 菌体裂解液配方:

蛋白酶 K 100 μg , 0.05 mol/L EDTA 400 μl , 1 mol/L Tris (pH8.0) 400 μl , NP-40 20 μl , 双蒸水 900 μl , 分装数管, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

3) 阳性模板制备

将小肠结肠炎耶尔森氏菌在牛肉膏蛋白胨固体培养基中培养过夜后, 制备菌悬液, 取 100 μl 于 1.5 ml 离心管中, 12 000 g 离心 5 min, 弃上清, 将菌体悬浮于 1 ml PBS 缓冲液中, 加入 10 μl 裂解液, 混匀后 55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 30 min, 然后 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min, 如此处理的标本即可作为阳性模板。

4) 模拟带菌粪便的配制

采取正常大熊猫粪便 200 mg 悬浮于 1 ml PBS (pH 7.4) 中, 加入 5 μl 小肠结肠炎耶尔森氏菌悬液, 混匀即形成模拟带菌粪便悬液, 待用。

5) 模拟带菌粪便中病原 DNA 的 SiO₂ 纯化法

由于粪便中含有大量抑制 PCR 扩增的抑制剂, 因此纯化的目的就是除去这些抑制剂, 得到纯的

DNA 溶液。

二氧化硅悬液的预制: 称取 SiO₂ 固体粉末 0.12 g, 装入 1.5 ml Eppendorf 管, 加入 1.0 ml 灭菌去离子水, 充分混匀, 室温下静置 24 h, 去除含有细小微粒的上清, 加入 8M 的 KI 溶液 1ml, 充分混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

二氧化硅纯化粪便 DNA: 取 5 ml 带菌模拟粪便悬液, 在 400 g 离心力下离心 5 min, 把粪渣沉到管底; 转移上清液到另一个离心管, 12 000 g 离心 10 min, 使上清液中的细菌沉到管底; 弃去上清, 加入 200 μl PBS 悬浮沉淀, 再加入 5 μl 菌体裂解液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 30 min, 之后 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min 灭活蛋白酶, 即成粪便裂解混合液; 给 120 μl 左右的裂解混合液中加入 50 μl 二氧化硅悬液和 100 μl 8M KI 溶液, 充分混匀, 静置吸附 10 min; 5 000 g 离心 1 min, 弃去上清, 加入 80% 乙醇洗涤, 5 000 g 离心 1 min, 弃去上清, 55 $^{\circ}\text{C}$ 烘干残留乙醇; 加入 100 μl 去离子水洗脱 DNA, 5 000 g 离心 2 min。上清即为纯化的 DNA 模板溶液, 可以用于 PCR 检测。

6) PCR 扩增及其检测

PCR 反应总体积 30 μl , 其中 DNA 模板 5 μl , 10 \times Reaction Buffer 3 μl , MgCl₂ 1.5 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1U, 引物各 0.2 $\mu\text{mol/L}$, dNTP 各 200 $\mu\text{mol/L}$, 灭菌双蒸水补足 30 μl 。PCR 循环条件为, 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环; 循环完成后 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 延伸。取 10 μl 扩增产物, 常规琼脂糖电泳检测, 在 Beckman 紫外凝胶成像系统下拍照记录。

2 结果与讨论

用上述建立的方法体系, 分别检测了用肺炎克雷伯氏杆菌、肠出血性大肠埃希氏杆菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌制备的模拟粪便, 并同时设立了阴性和阳性对照以及未用 SiO₂ 纯化的 Y.e 模拟粪便裂解混合液做对照, 检测结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出, SiO₂ 纯化的小肠结肠炎耶尔森氏菌的模拟粪便和阳性对照一样, 扩增出了特异的、与预期结果相符的 274 bp 的 DNA 片段, 未见非特异性扩增带; 肠出血性大肠埃希氏杆菌和肺炎克雷伯氏杆菌模拟粪便虽经 SiO₂ 纯化, 但也均未扩增出 DNA 条带; 未经 SiO₂ 纯化的 Y.e 模拟粪便裂解混合液未能扩增出条带。

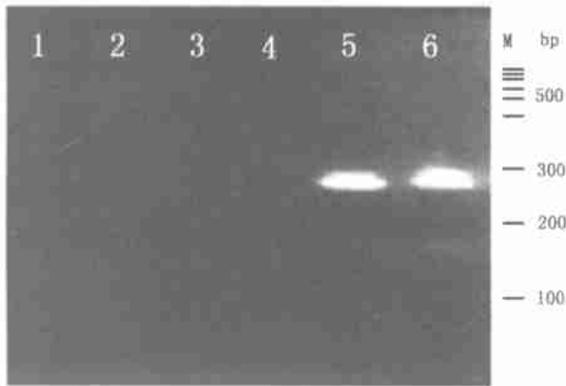


图1 不同处理样品的PCR检测

Fig.1 PCR Results of Differently treated samples

1. 以水替代模板的阴性对照
 2. SiO₂ 纯化的肺炎克雷伯氏杆菌模拟粪便
 3. SiO₂ 纯化的肠出血性大肠埃希氏杆菌模拟粪便
 4. 未经 SiO₂ 纯化的小肠结肠炎耶尔森氏菌模拟粪便
 5. SiO₂ 纯化的小肠结肠炎耶尔森氏菌模拟粪便
 6. 小肠结肠炎耶尔森氏菌纯培养物作阳性对照
- M. M为分子量标准
1. Negative control
 2. SiO₂ method treated model feces with *K. Pneumoniae*
 3. SiO₂ method treated model feces with EHEC
 4. Traditional method treated model feces with *Y. enterocolitica*
 5. SiO₂ method treated model feces with *Y. enterocolitica*
 6. Positive control
- M. Marker

以上结果中,泳道2和3没有扩增出条带,说明 *Y. e* 菌所用的引物是特异的,它可以同易于混合感染的病原菌进行鉴别诊断;泳道4没有扩增出条带说明粪便中的确存在PCR反应的抑制剂,如果不进行纯化,将会得到假阴性结果;泳道5扩增出了与阳性对照相同亮度的条带,说明二氧化硅从粪便中纯化DNA的方法是简便有效的,它可以富集粪便中微量的目标DNA且使其高度纯净,所得DNA可以用于分子生物学实验如PCR之中。

实验结果还表明,本研究建立的依赖粪便材料的大熊猫肠道耶尔森氏菌的检测方法是行之有效的,通过组装各种检测试剂形成试剂盒,可以方便地对生病的大熊猫进行病原菌的诊断。由于PCR技术具有高度的敏感性,因此也可以在未发现病情时,对大熊猫圈舍、环境和肠道可能存在的病原微生物进行普查。

参考文献:

- [1] 邹兴淮,曾鲁军,孙中武. 大熊猫疾病死亡因素分析及其保护对策 [J]. 东北林业大学学报, 1998, 26 (1): 53 - 56.
- [2] 熊焰,李德生,王印. 卧龙自然保护区大熊猫粪样菌群的分离鉴定与分布研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31 (2): 165 - 170.
- [3] 叶志勇,吕文其,刘新华. 大熊猫小肠结肠炎耶尔森氏菌感染及治疗 [J]. 中国兽医杂志, 1998, 24 (8): 11.
- [4] 魏辅文,饶刚,李明. 分子粪便学及其应用——可靠性、局限性和展望 [J]. 兽类学报, 2001, 21 (2): 143 - 154.
- [5] 王戎疆. 粪便DNA分析技术在动物生态学中的应用. 动物学报, 2001, 47 (6): 699 - 703.