

通用引物 PCR 方法在地表水病原菌检测中的应用

刘永军¹, 张崇森¹, 王晓昌¹, 孙 茵¹, 薛小平²

1. 西安建筑科技大学 环境与市政工程学院, 西北水资源与环境生态教育部重点实验室, 陕西 西安 710055

2. 西北工业大学 生命科学院, 陕西 西安 710072

摘要: 为了探索通用引物 PCR 方法在地表水病原细菌检测中的应用价值, 利用 16S rRNA 基因的高度保守性, 设计并合成细菌的通用引物, 采用合成的引物扩增参考菌株及西安市区不同地表水样, 并对 PCR 产物分别进行序列测定及序列同源性分析, 同时检测水样中的细菌总数和粪大肠杆菌浓度。结果显示, 通用引物扩增 4 种参考菌株, 320 bp 处均可得到清晰的电泳条带, 其特异性通过序列测定及同源性分析得到进一步验证; 通用引物 PCR 可检出 250 ng/L 的埃希氏大肠杆菌标准菌株 DNA, 其 PCR 检测的灵敏度可达 0.275 CFU/mL; 用通用引物对西安市区不同地表水样进行 PCR 扩增, 其中渭河、兴庆湖、大唐芙蓉园北湖、北石桥污水处理厂出水样品 320 bp 处都得到了清晰的电泳条带, 而黑河水样没有条带; 与之相对应的粪大肠杆菌群检测结果显示, 只有北石桥污水处理厂出水和兴庆湖水样有粪大肠杆菌检出。

关键词: 通用引物; 病原菌; 聚合酶链式反应 (PCR); 地表水

中图分类号: R123, X832

文献标识码: A

文章编号: 1001-6929(2007)02-0089-05

Application of Pathogenic Bacteria Detection in Surface Water by Universal Primer PCR Method

LIU Yong-jun¹, ZHANG Chong-miao¹, WANG Xiao-chang¹, SUN Yin¹, XUE Xiao-ping²

1. College of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Key Laboratory of Northwest Water Resources, Environment and Ecology, Ministry of Education, Xi'an 710055, China

2. Faculty of Life Science, Northwest Polytechnical University, Xi'an 710072, China

Abstract: In order to investigate the application values of polymerase chain reaction (PCR) technique in detection of pathogenic bacteria in surface water, the universal primers were designed and synthesized according to the high conservation of 16S rRNA gene. The DNA of bacteria from several water bodies and secondary effluent in the urban area of Xi'an City were extracted and then amplified with the primers, and sequencing and homology analyses of the PCR production were conducted. As a result, the PCR products of the 4 reference strains were identified at 320 bp on the electrophoregrams, and they were further verified by sequencing and homology analyses. The detection limit of the total DNA of *E. coli* reference strain was about 250 ng/L and the sensibility of PCR detection was up to 0.275 CFU/mL. Regarding different water samples, limpid electrophoresis strips were identified at 320 bp for 1 river and 2 lakes in the urban area, as well as the secondary effluent from a domestic wastewater treatment plant, all of which are believed to be under the influence of domestic pollution, while no strip was identified for another river water which is the well protected source for potable water supply. Bacteria enumeration was also conducted by conventional culture method for comparison. Regarding fecal coliform, it was only detected from the secondary effluent and a polluted lake.

Key words: universal primer; pathogenic bacteria; polymerase chain reaction; surface water

城市污染的加重使更多未经处理的污水直接排

放到地表环境,从而引发人类多种疾病甚至死亡,这在发展中国家尤为严重。尤其是通过水域传播的疾病,如伤寒、霍乱、旅行中常见的腹泻等,都是由致病细菌引起的。由此,水域性病原菌的常规监测,对于公共健康来说非常重要。但由于缺乏精确和费用低廉的检测方法,使得预防和控制水域传染病暴发受到阻碍。

收稿日期: 2006-07-20

基金项目: 国家自然科学基金重大国际合作项目 (50621140001); 国家自然科学基金资助项目 (50478048)

作者简介: 刘永军 (1969-), 男, 陕西横山人, 副教授, 博士。

对于水体中病原菌的检测主要基于选择性培养和标准的生物化学方法.但这些方法存在一系列的缺陷:①水体中的病原细菌通常含量很少,取样和计数过程可能导致较大误差^[1];②细菌培养方法通常费时、费力,检测单一;③环境中的病原微生物,有些很难培养甚至不能培养,却仍然能致病^[2].传统方法采用埃希氏大肠杆菌作为粪便污染的指示生物,但近年来该方法也遭到质疑.流行病学资料表明,埃希氏大肠杆菌或粪大肠杆菌与志贺氏痢疾杆菌、霍乱弧菌、沙门氏菌等其他病原菌引起的水域传染病没有直接联系^[3].这些病原菌都有潜在的致病风险,却没有被列入常规水质评价指标之内.很明显,传统的水质检测方法不仅落后,更重要的是不能为公共健康提供可靠的保护.近年来发展起来一系列免疫学方法,用于检测沙门氏菌^[4]、霍乱弧菌^[5]等病原菌.遗憾的是这些方法的灵敏度不稳定,并且影响因素很多.而基于 PCR 的方法发展迅速,先后产生了核酸探针和 PCR 扩增方法,免疫捕捉 PCR,实时 PCR,多重 PCR 等方法^[6-8].但这些方法或者检测单一,或者过程复杂,或者花费昂贵,而不能用于实验室常规检测.

设计通用引物进行 PCR 检测的方法,已在医学界和生物界得到应用,这种方法只需设计一对引物,即可完成某一大类微生物的综合检测^[9-11].但是,该方法还没有应用到水环境病原菌的检测中.笔者旨在探索用通用引物 PCR 方法快速检测地表水中的多种病原菌,为进一步对水体进行风险评价奠定基础.

1 材料和方法

1.1 参考菌株与培养基

痢疾、霍乱、伤寒、肠炎是常见的水域传染病,针对这些疾病选用志贺氏痢疾杆菌 (*Shigella dysenteriae*),霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*),沙门氏菌 (*Salmonella typhmuri*) 和埃希氏大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 作为参考菌株.菌株由陕西省微生物研究所提供.培养基为固体 LB 培养基(10 g/L 蛋白胨,5 g/L NaCl,5 g/L 酵母浸膏,1.5 g/L 琼脂粉)和 LB 肉汤培养基(10 g/L 蛋白胨,5 g/L NaCl,5 g/L 酵母浸膏).

1.2 地表水样

选取西安市区 5 处地表水进行采样,采样断面分别设置在出水区(兴庆湖和大唐芙蓉园北湖)、出水口(黑河进入曲江水厂处)、排污区下游(黑河)以及污水处理厂二级出水口(北石桥污水处理厂),采样位点为水深 1/2 处,每月取样 2 次.表 1 列出了 5

个水样的性质和所在的位置.

表 1 地表水样的水体性质

水体	位置	水体用途	备注
黑河	市区	纳污水体	不定期受到严重污染
黑河	市郊	供水水源	受到良好保护
兴庆湖	市区	景观用水	曾受到严重污染,正在治理
北石桥污水处理厂	市区	二级出水	未消毒
北湖(大唐芙蓉园)	市区	景观用水	新建景观用水

1.3 细菌 DNA 的提取

参考菌株培养液或地表水水样用灭菌离心管离心(5 000 r/min,10 min)后,弃去上清液;沉淀用 1 mL 无菌水重悬;细菌 DNA 的提取方法^[12]为:加入 1.08 mL 的 DNA 提取液,8 μ L 蛋白酶 K,37 $^{\circ}$ C 下水浴 30 min;在混合液中加入 0.12 mL 10 % (质量分数)的 SDS,65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h;离心(5 000 r/min,10 min)后取上清;上清液中加入 0.6 mL 的氯仿/异戊醇(V(氯仿):V(异戊醇)为 24:1),振荡混匀,离心(5 000 r/min,10 min);取上清液后,加入 0.6 倍体积的异丙醇,-20 $^{\circ}$ C 沉淀 20 min 后,离心(10 000 r/min,10 min);弃去异丙醇,加入 0.3 mL 70 % (体积分数)的乙醇,振荡,离心(8 000 r/min,5 min);吹干乙醇,加入 30 μ L 无菌水重悬.提取的 DNA 用于 PCR 分析.

1.4 引物的设计和合成

以细菌 16S rRNA 基因为靶序列,根据细菌 16S rRNA 基因的高度保守性,设计志贺氏痢疾杆菌 (*Shigella dysenteriae*),霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*),沙门氏菌 (*Salmonella typhmuri*) 和埃希氏大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的通用引物,设计的通用引物序列如下:5'-aaggcgacgatccctagctggtctgagaggatga/c-3' (246~280 bp, *E. coli* 16S rRNA);5'-gcttgccagatcatcagatgcaggtccagggtgagc-3' (521~556 bp, *E. coli* 16S rRNA).引物由上海申能博彩公司合成.

1.5 PCR 扩增和 PCR 产物分析

PCR 扩增反应体系总体积 50 μ L,内含 dNTP 0.2 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.5 U,1 $\times$ PCR Buffer,2.0 mmol/L MgCl₂,上下游引物分别为 0.1 mmol/L,DNA 模板 2 μ L. PCR 扩增条件如下:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min.阴性对照中,用灭菌双蒸水代替 DNA 模板. PCR 产物通过 2 % (质量分数)的凝胶电泳分析(含 0.5 mg/mL 溴化乙啶),用凝胶成像系统 1 000(Bio - Rad)成像. PCR 产物回收纯化(PCR 回收试剂盒,华美生物工程公司产品)后,送至上海申能博彩公司测序,序列测定结果用 DNA - STAR 软件

(Perkin Elmer, Norwalk, Conn, USA) 进行同源性分析。

1.6 PCR 灵敏度试验

用 LB 培养基平板计数法测得埃希氏大肠杆菌培养液中的细菌浓度。将培养液用灭菌蒸馏水梯度稀释,稀释后的菌液离心(7 000 r/min, 20 min)后,回收菌体,并用灭菌蒸馏水洗涤 3 次,用苯酚-氯仿提取 DNA。然后,对各个稀释度的 DNA 进行通用引物 PCR 扩增,研究用通用引物 PCR 方法的细菌检测底限。同样,取 2.5 mg/L 埃希氏大肠杆菌染色体 DNA,用灭菌蒸馏水梯度稀释后,用通用引物进行 PCR 扩增。研究通用引物 PCR 扩增的灵敏度。

1.7 细菌总数和粪大肠杆菌计数

细菌总数:将水样梯度稀释,选取合适的稀释度接种到 LB 固体培养基上,37 °C 恒温培养 24 h。

粪大肠杆菌:选取适量的水样,经 0.45 μm 微孔滤膜抽滤,细菌被截留在膜上,将该滤膜贴于 M-FC 培养基上(10 g/L 胰胨,5 g/L 蛋白胨,3 g/L 酵母浸膏,5 g/L 氯化钠,12.5 g/L 乳糖,1.5 g/L 胆盐 3 号,1% (质量分数) 苯胺蓝水溶液 10 mL,1% (质量分数) 玫瑰色酸水溶液 10 mL),44.5 °C 恒温培养 24 h,粪大肠杆菌群菌落在 M-FC 培养基上呈蓝色或蓝绿色,记数呈蓝或蓝绿色的菌落,计算出每 L 水样中的粪大肠杆菌群数。

2 结果

2.1 通用引物的设计

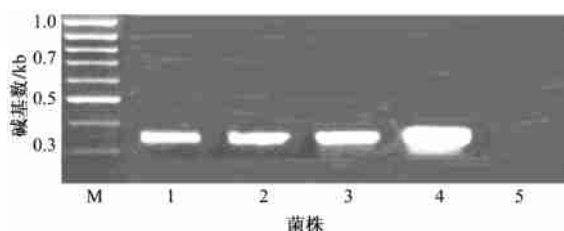
将 1.4 节所设计的通用引物序列提交 Genebank 进行同源性比对,BLAST 结果(略)显示,与通用引物互补的序列绝大多数是参考菌株不同株系的 16S rRNA 基因片段,也有极少量未知菌株的核酸序列。表明所设计的通用引物对这 4 种参考菌株表现出极高的特异性。

2.2 通用引物 PCR 扩增

以 4 种参考菌株的总 DNA 为模板,利用通用引物进行 PCR 扩增,产物经凝胶电泳分析,在 320 bp 处均得到了清晰的电泳条带,如图 1 所示。扩增产物经纯化后进行核酸序列测定。测序结果与 Genebank 中 4 种病原菌的 16S rRNA 的基因序列比较,其相似度在 99% 以上。结果证明,该通用引物对目标基因片段有很好的特异性,能够用于特异性检测 4 种目标菌株。

2.3 通用引物 PCR 条件优化

影响目标基因序列 PCR 扩增的特异性和灵敏度的因素有很多,如退火温度,引物浓度, MgCl₂ 浓度,延



菌株:M—DNA 标记;1—*Shigella dysenteriae*;2—*Vibrio cholerae*;
3—*Salmonella typhimurium*;4—*Escherichia coli*;5—阴性对照

图 1 4 种参考菌株通用引物 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of the four reference strains

伸时间以及 Taq 聚合酶的用量和质量等^[13]。优化的目的是使 PCR 扩增的特异性增强、敏感性提高。

通过对 3 种 Taq 聚合酶的 PCR 试验比较得出, Hotstar Taq 聚合酶(Qiagen 公司)的效果最好,非特异性条带最少(结果略)。同时,用埃希氏大肠杆菌(*Escherichia coli*)的 DNA 模板试验了最佳引物浓度, MgCl₂ 浓度和 PCR 延伸时间,结果如图 2 所示。图 2(a)为 c(引物)分别为 0.5, 1.0 和 1.5 μmol/L 时得到不同亮度的电泳条带。结果显示,最佳 c(引物)为 1 μmol/L。图 2(b)为加入 c(MgCl₂) 分别为 1.0, 2.0 和 3.0 mmol/L 时得到的电泳条带。结果显示, c(MgCl₂) 为 2.0 mmol/L 时最为理想。图 2(c)为延伸时间分别为 0.5, 1.0 和 1.5 min 时得到的电泳条带。结果显示,最佳延伸时间为 1.0 min。

2.4 通用引物 PCR 检测灵敏度试验

经过平板计数,计算出埃希氏大肠杆菌参考菌株细菌培养液中细菌浓度为 2.75×10^4 CFU/mL。对菌液进行梯度稀释后,回收细菌并提取细菌总 DNA。各稀释度通用引物 PCR 扩增结果如图 3 所示。埃希氏大肠杆菌的最低检测限为 2.75×10^{-1} CFU/mL(见图 3(a), 第 6 泳道);将 2.5 mg/L 埃希氏大肠杆菌总 DNA 用灭菌蒸馏水梯度稀释后,用通用引物进行 PCR 扩增,结果显示,细菌总 DNA 的通用引物 PCR 检测限是 250 ng/L(见图 3(b), 第 5 泳道)。4 次试验都得到了同样的结果。

2.5 不同地表水样的通用引物 PCR 检测与传统细菌学分析

根据以上建立的通用引物 PCR 病原细菌检测方法,对西安市 5 处地表水样(采样点见表 1)进行了通用引物 PCR 检测,同时还检测了水样的细菌总数和粪大肠杆菌数量作为比较。PCR 检测结果如图 4 所示,结果表明,5 个水样中除了 2 号水样以外,其余 4 个水样都得到阳性信号。阳性信号从强到弱依

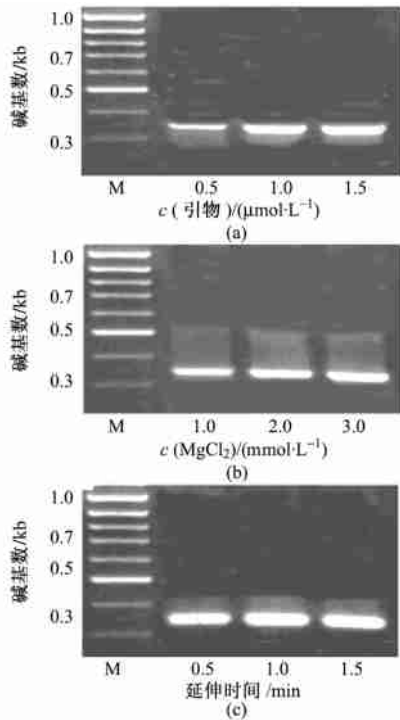


图 2 PCR 扩增条件优化试验结果

Fig. 2 PCR amplification condition optimizing results

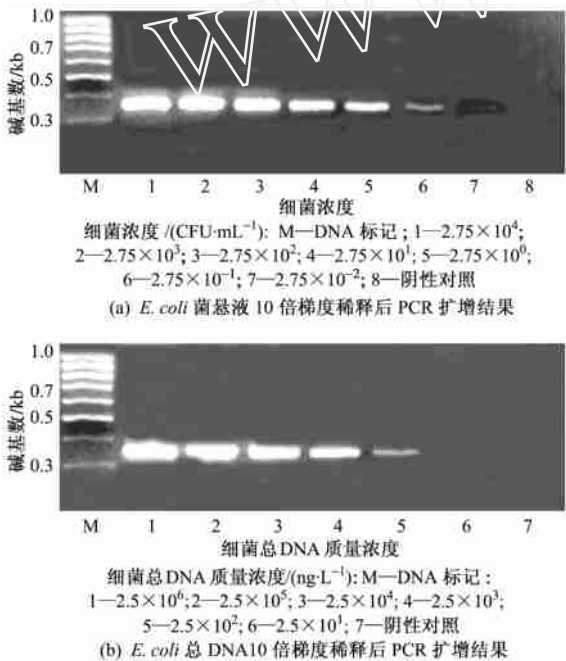
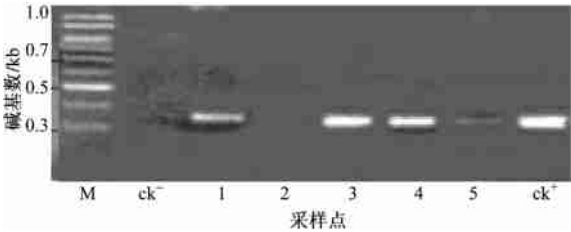


图 3 通用引物 PCR 灵敏度检测

Fig. 3 The PCR sensibility detection of the universal primer

次是 4 号 > 3 号 > 1 号 > 5 号,反映了 4 个水样受病原细菌污染的程度不同.对西安市 5 处地表水样的传统细菌学的检测结果如图 5 所示,结果表明,5 个水样的细菌总数由多到少依次为 4 号 > 1 号 > 5 号 > 3 号 > 2 号,对于粪大肠杆菌,只从 3 号和 4 号

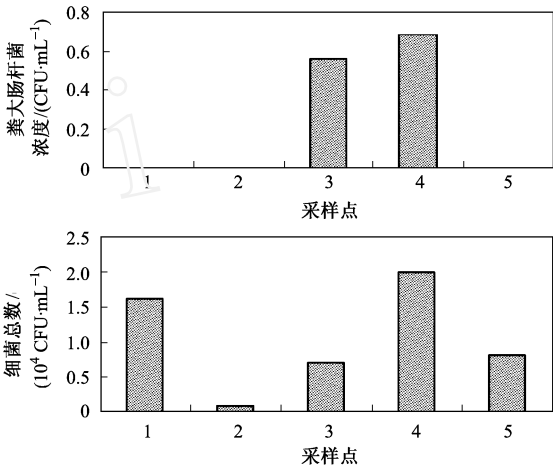
水样两处地表水中检测到,其余 3 个水样均未检测到粪大肠杆菌.



采样点:ck⁻—阴性对照;1—渭河;2—黑河;
3—兴庆湖;4—北石桥污水处理厂;
5—北湖(大唐芙蓉园);ck⁺—阳性对照

图 4 不同地表水样病原细菌 PCR 检测结果

Fig. 4 PCR detection results of surface water sample



采样点:1—渭河;2—黑河;3—兴庆湖;
4—北石桥污水处理厂;5—北湖(大唐芙蓉园)

图 5 不同地表水样中细菌总数以及
粪大肠杆菌检测结果

Fig. 5 Enumeration of total bacteria and faecal
coliform in surface water samples

从图 5 可见,2 号水样的细菌学水质指标较好,细菌总数不到 1 000 CFU/mL,没有检测到粪大肠杆菌,PCR 检测结果呈阴性.该水样取自受到良好保护的供水水源——黑河.4 号水样取自生活污水处理厂未经消毒的二级出水,PCR 方法扩增出来的条带最亮,并且细菌总数和粪大肠杆菌浓度都很高(分别为 2.0×10^4 和 0.7 CFU/mL).3 号水样 PCR 分析出的条带也很亮,检测到的粪大肠杆菌浓度较高(0.55 CFU/mL),该水样取自兴庆湖,该湖曾受到生活污水的严重污染,不久前进行过清污,加强了污染源控制.但试验结果表明该湖仍然不能满足细菌学水质要求.1 号水样取自渭河,该河有城市污水和工业废水排入,虽然传统方法没有检测到粪大肠杆菌,但是细

菌总数非常高,为 1.6×10^4 CFU/mL,PCR 分析同样显示阳性。5 号水样取自风景区的人工湖,与 1 号水样相比,其细菌总数较少,PCR 条带的亮度也较弱。

3 讨论与结论

引物设计是 PCR 特异性反应的关键,PCR 产物的特异性取决于引物与模板 DNA 互补的程度^[13]。笔者选用志贺氏痢疾杆菌、霍乱弧菌、沙门氏菌和埃希氏大肠杆菌这 4 种病原菌作为目标菌株,因为这 4 种病原菌可能导致水域传染疾病,如痢疾、霍乱、伤寒和肠胃炎。根据 4 个目标菌株 16S rRNA 基因的高保守性设计了这对通用引物。BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)分析结果发现(序列相似性结果未显示),与通用引物互补的序列大多数是目标菌株不同株系的 16S rRNA 基因片段,同时也存在极少量未知菌株的核酸序列。表明所设计的通用引物对目标菌株表现出很高的特异性,用 PCR 扩增均可得到清晰的电泳条带,可以用来检测水体中志贺氏痢疾杆菌、霍乱弧菌、沙门氏菌和埃希氏大肠杆菌。

PCR 试验的灵敏度同样也很重要。通过对埃希氏大肠杆菌的梯度稀释,在细菌浓度小于或等于 2.75×10^{-2} CFU/mL,染色体 DNA 浓度小于或等于 25 ng/L 时,看不到电泳条带。因此,将检测下限确定为 27.5×10^{-2} CFU/mL 和 250 ng/L DNA。通常,吸入的病原菌浓度超过 10 CFU/mL 时会引起传染病^[14]。所以可以认为该通用引物的 PCR 实验,对于病原风险评价具有很高的灵敏度。但是,据报道,PCR 方法可以检测到 1~100 ng/L 经提纯的细菌 DNA,或者 $1 \times 10^{-2} \sim 20 \times 10^{-2}$ CFU/mL 的细菌数量^[15-16],比该实验的灵敏度要高。对于通用引物 PCR 的检测灵敏度还需进一步提高。

对于试验选用的 5 处地表水,如果单用粪大肠杆菌作为指示,只有 3 号和 4 号水样呈阳性反应而被认为可能受到病原菌感染。PCR 方法分析的结果与之相一致,即 2 个水样都得到清晰的阳性信号。因此,可认为,受到粪大肠杆菌污染的水样,能被该通用引物检测出来。而 1 号和 5 号水样虽未检出粪大肠杆菌,但是 PCR 分析得到阳性结果,其信号强度较 3 号和 4 号水样有所减弱,尤其是 5 号水样的信号更弱。较为合理的解释是,这 2 个水样虽未被粪大肠杆菌污染,但仍然受到其他病原菌的侵袭,如痢疾杆菌、霍乱弧菌和沙门氏菌。2 号水样的细菌总数非常低,粪大肠杆菌检测和 PCR 分析都呈阴性反应,可认为没有受到病原菌的污染。

试验结果可进一步证实,粪大肠杆菌或埃希氏大肠杆菌与病原菌并没有很好的对应关系。而从公共健康的角度来看,笔者提出的通用引物 PCR 方法,比传统的粪大肠杆菌计数法更能反映水体病原体污染的实际情况。PCR 方法,因为其快速、灵敏可为传统的病原菌监测提供强有力的补充。但是,目前该方法还不能替代传统的方法,因为可检测到的菌株还有限,定量分析也比较难,还需要做进一步研究。

参考文献:

- [1] Fleisher J M. Conducting recreational water quality surveys: some problems and suggested remedies[J]. Mar Pollut Bull, 1990, 21(12): 562—567.
- [2] Roszak D B, Colwell R R. Survival strategies of bacteria in the natural environment[J]. Microbiol Rev, 1987, 51: 365—379.
- [3] Rahman I, Shahamat M, Chowdhury M A, et al. Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(1): 115—120.
- [4] Cheesebrough S, Donnelly C. The use of rapid *Salmonella* latex serogrouping test (Spectate) to assist in the confirmation of ELISA-based rapid salmonella screening tests[J]. Lett Appl Microbiol, 1996, 22(5): 378—380.
- [5] Hazelegel W C, Beumer R R, Rombouts F M. The use of latex agglutination tests for determining *Campylobacter* species[J]. Lett Appl Microbiol, 1992, 14: 181—184.
- [6] Hoofar J, Ahrens P, Radstrom P. Automated 50 nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(9): 3429—3435.
- [7] Nogva H K, Bergh A, Holck A, et al. Application of the 50-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(9): 4029—4036.
- [8] Kong R Y C, Lee S K Y, Law T W F, et al. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR[J]. Water Res, 2002, 36: 2802—2812.
- [9] Abur Halaweh M, Bates J, Patel B K. Rapid detection and differentiation of pathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by real-time PCR[J]. Res Microbiol, 2005, 156(1): 107—114.
- [10] Bader J A, Shoemaker C A, Klesius P H. Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16S rRNA gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare*[J]. J Microbiol Methods, 2003, 52(2): 209—220.
- [11] Scaramozzino N, Grance J M, Jouan A, et al. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(5): 1922—1927.
- [12] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Short protocols in molecular biology[M]. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1995.
- [13] Linton D, Lawson A J, Owen R J, et al. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35: 2568—2572.
- [14] USEPA. Guidelines for water reuse[M]. Washington DC: United States Environmental Protection Agency, 1992.
- [15] Mahon J, Murphy C K, Jones P W, et al. Comparison of multiplex PCR and standard bacteriological methods of detecting *Salmonella* on chicken skin[J]. Lett Appl Microbiol, 1994, 19(3): 169—172.
- [16] Villalobo E, Torres A. PCR for detection of *Shigella* spp. in mayonnaise[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(4): 1242—1245.

(编辑:潘风云)