

# Detection of Virulence Factor Delta by PCR and Biochemical Methods to Identify Heat-Labile Enterotoxigenic *Escherichia coli*-Caused Diarrhoea

Yushu Zheng

College of Medical, Veterinary & Life Science, University of Glasgow, Scotland  
Email: mdnorman@163.com

Received: Feb. 19<sup>th</sup>, 2020; accepted: Mar. 4<sup>th</sup>, 2020; published: Mar. 11<sup>th</sup>, 2020

---

## Abstract

**Objective:** To investigate expressions and clinical significance of determining the molecular characteristic and identify the virulence profile of the ETEC and heat-labile (LT) enterotoxin producing ETEC can be identified by examining the presence of the virulence gene *eltA*. **Methods:** By using RT-PCR, two *E. coli* strains were confirmed to be the LT producing ETEC. The passive latex agglutination was allowed to test the presence of the LT toxin in the specimens. **Results:** In this study, both samples 1 and 3 specifically expressed the *eltA* gene, the sample 3 from child with diarrhoea was positive for the latex agglutination. **Conclusion:** It was highly likely that child was infected by LT producing ETEC stain.

## Keywords

Enterotoxigenic *Escherichia Coli*, RT-PCR, Heat-Labile Enterotoxin, Children's Diarrhoea

---

# 生化方法检测毒力因子以诊断热不稳定肠毒素大肠杆菌导致的腹泻

郑钰树

格拉斯哥大学医学兽医学与生命科学院, 苏格兰  
Email: mdnorman@163.com

收稿日期: 2020年2月19日; 录用日期: 2020年3月4日; 发布日期: 2020年3月11日

## 摘要

目的：探讨PCR及生物化学方法对确定EPEC的分子特性和毒力谱的重要意义，并通过检测毒力基因*eltA*的存在诊断热不稳定(LT)肠毒素产生的EPEC导致的腹泻。方法：采用RT-PCR方法，确认两株大肠杆菌为热不稳定的EPEC。被动胶乳凝集实验将被用来测试样品中LT毒素的存在。结果：在这项研究中，样本1和样本3均表达*eltA*基因，乳胶凝集显示样本3的呈阳性。结论：染色结果提示此腹泻儿童极有可能感染了热不稳定的EPEC。

## 关键词

肠毒素大肠杆菌， RT-PCR， 热不稳定肠毒素， 儿童腹泻

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

腹泻是世界上五岁以下儿童的第二大死因。每年，全球约有 17 亿例腹泻病，约有 525,000 名儿童死于该病。肠毒素大肠杆菌(EPEC)是儿童腹泻相关死亡的 5 大致病性病原菌之一[1]。EPEC 的传播与粪便通过受污染的食物或水经口传播有关[1]。在非洲、亚洲和拉丁美洲的中低收入国家，EPEC 的流行率很高[1]。EPEC 菌株通过产生热稳定(ST)、热不稳定(LT)肠毒素或两种毒素的组合[2]引起急性腹泻。

ST 肠毒素是一种小的非免疫原性肽，在 100°C时稳定[3]。ST 与内源性鸟苷和尿鸟苷具有相似的一级和三级结构[4]。这允许 ST 与肠道刷缘的鸟苷酸环化酶 C (GC-C)受体结合，鸟苷酸环化酶 C 是内源性配体鸟苷和尿鸟苷的受体[5]。ST 结合介导 GC-C 受体构象变化，导致细胞内信使环 GMP (cGMP)增加[6]。结果，肠道电解质平衡被破坏，因为钠和氯离子的吸收减少，碳酸氢盐和氯离子的分泌增加[6]。

LT 肠毒素是一种异六聚体毒素，由催化 A 亚基(LT-A)和五聚体 B 亚基(LT-B) [7]组成。毒性 A 亚基由 *eltA* 基因编码，由 A1 和 A2 结构域组成，由一个二硫键连接[8]。B 亚基无毒，编码为 *eltB* 基因。B 亚基与 *Vibrio cholerae* [9]生产的霍乱毒素(CT)的 B 亚基有大约 80%的同源性。LT-B 也与 CT 结合的受体相同[7]。五个 LT-B 亚单位排列成五聚环并与肠上皮细胞表面的五个单唾液酸神经节苷脂受体(GM1)结合[7]。结合到 GM1 后，LT 全脂毒素通过内向网(ER)逆行内吞作用而内化。然后，LT-A 的 A1 结构域被转移到细胞质中，随后激活膜结合 GTPase 的  $G_s\alpha$ 单位。 $G_s\alpha$ 单位的 ADP-核糖基化永久激活腺苷酸环化酶产生 cAMP。因此，升高的细胞内 cAMP 激活蛋白激酶 A (PKA)，抑制钠氢交换器(NHE<sub>2</sub> 和 NHE<sub>3</sub>)吸收钠离子，以增加囊性纤维化跨膜调节器(CFTR)分泌氯离子[10]。cAMP 水平的升高也会激活 NF- $\kappa$ B 和促 EPEC 粘附的有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路[11]。

不同的分子和生化技术已经被用来鉴定病原体的不同毒力因子。本研究采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和被动乳胶凝集试验检测不同培养物和样品中 LT 肠毒素产生的 EPEC 染色。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 样品 DNA 制备

本研究共制备了 4 个 DNA 模板样品，4 份样本均来源于临床区提供的腹泻儿童患者样本采集。对于

每个样品，用接种环刮取大肠杆菌菌落，并在 50  $\mu\text{l}$  水中稀释。为了溶解细胞膜并从细菌中释放 DNA，将细菌悬液在 94 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 10 分钟。为了去除细胞碎片，将细菌裂解物在冰上孵育 3 分钟，并在台式微凝胶中 4 $^{\circ}\text{C}$ ，10,000 rpm 离心 5 分钟。收集含有 DNA 的上清液进行 RT-PCR。

## 2.2. RT-PCR

RT-PCR 使用最终浓度为 0.05  $\text{u}/\mu\text{l}$  的 Taq DNA 聚合酶、75 mM TrisHCl (pH 8.8)、20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.01% (v/v) Tween<sup>®</sup>20、0.2 mM dNTPs、各 400 nM 的 *eltA* 基因特异性正向(5'-AGCATCGCCA TTATATGC-3')和反向(5'-GAGAGGATAGTAACGCCG-3')引物的 PCR 混合物进行[12]。每 25  $\mu\text{l}$  RT-PCR 反应用 10  $\mu\text{l}$  样品 DNA 模板。阳性(+ve)对照组，每 25  $\mu\text{l}$  的 RT-PCR 反应中使用 50 ng 含 *eltA* 基因的质粒。而阴性对照组未使用模板。RT-PCR 条件如下：DNA 模板在 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 4 min，然后进行 35 个周期的 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s；55 $^{\circ}\text{C}$  30 s；72 $^{\circ}\text{C}$  1 min 重复，最后一次延长至 72 $^{\circ}\text{C}$  7 min，然后保持 4 $^{\circ}\text{C}$ ，每个样品单独重复 6 次。

## 2.3. 凝胶电泳和分析

将 RT-PCR 产物装载到 SyberSafe 染色的 1% 琼脂糖凝胶上。在同一凝胶上运行一个 1 kbp 的带有标准 DNA 片段的 DNA 梯来估计扩增产物的大小。凝胶在 80 V 下运行。凝胶在透照仪上进行评估，并记录凝胶图像进行分析。

## 2.4. 胶乳凝集试验

用胶乳凝集法[13]检测四份标本上清液中热不稳定肠毒素的存在情况。对于每个样品，将 100  $\mu\text{l}$  培养上清液与 100  $\mu\text{l}$  GM1 神经节苷脂包被乳胶珠混合。在室温下孵育 2 分钟后，在黑色背景下观察到凝集。用热不稳定肠毒素重组大肠杆菌培养上清作为阳性对照。以大肠杆菌菌株为培养上清液，以缺乏热不稳定肠毒素为阴性对照。每个样品分别重复 21 次进行乳胶凝集分析。

## 3. 结果

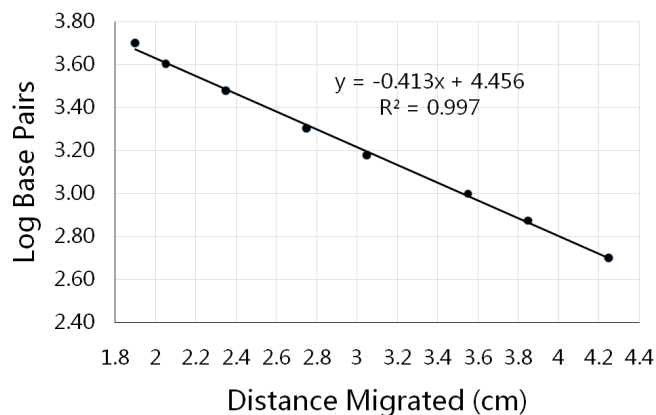
### 3.1. 检测阳性对照组经 RT-PCR 扩增的 *eltA* DNA 片段大小

生成标准曲线来估计 *eltA* 扩增子的大小。为了建立一个标准曲线，选择了一些标准 DNA 片段大小，并测量了它们在凝胶中迁移的距离(表 1)。标准曲线( $y = -0.4137x + 4.4568$ ;  $R^2 = 0.9979$ )是根据标准片段在琼脂糖凝胶槽(Well)中迁移的距离绘制的对数对(图 1)。阳性对照组，扩增的 *eltA*-DNA 片段从槽(Well)中向下迁移 3.70 cm，估计片段大小为 843 对碱基。

**Table 1.** Distance migrated by standard DNA fragments and the DNA fragment amplified by RT-PCR

**表 1.** 标准 DNA 片段与 RT-PCR 扩增的 DNA 片段的距离迁移

Standard DNA fragment (base pairs)	Log base pairs	Distance migrated in the gel (cm)
500	2.70	4.25
750	2.88	3.85
1000	3.00	3.55
1500	3.18	3.05
2000	3.30	2.75
3000	3.48	2.35
4000	3.60	2.05
5000	3.70	1.90
DNA fragment amplified by RT-PCR in +ve control		3.70



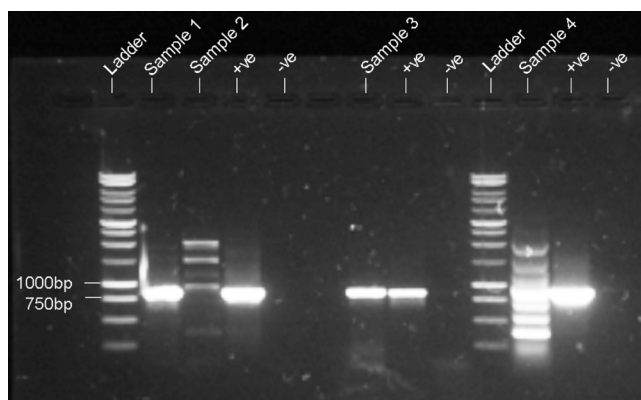
**Figure 1.** Log base pairs of standard DNA fragments vs distance migrated in the agarose gel. The linear line  $y = -0.413x + 4.4568$  was used to estimate the DNA fragment size amplified by RT-PCR; where,  $x$  = distance migrated by the DNA fragment and  $y = \log_{10}$  (base pairs); and the linear regression coefficient of determination  $R^2 = 0.9979$

**图 1.** 琼脂糖凝胶中标准 DNA 片段的对数碱基对与迁移距离的关系。用直线  $y = -0.4137x + 4.4568$  估计 RT-PCR 扩增的 DNA 片段大小，其中  $x$  = DNA 片段迁移的距离， $y = \log_{10}$  (碱基对)，测定的线性回归系数  $R^2 = 0.9979$

### 3.2. 用 RT-PCR 方法分析不同标本中 *eltA* 基因的表达

在样本 1 和样本 3 中，RT-PCR 后只检测到一个片段大小，扩增片段 DNA 的大小在 750~1000 bp 之间。通过使用标准曲线，样本 1 和样本 3 中的扩增子大小为 843 个碱基对，与阳性对照中的扩增子大小相同(图 2)。结果表明，样本 1 和样本 3 均表达 *eltA* 基因。而对于样本 2 和 4，观察到多个大小的 DNA 片段(图 2)。尽管 RT-PCR 后 2 号样本中发现了多个 DNA 片段大小，但 2 号样本中的 DNA 片段大小与阳性对照组中的 DNA 片段大小不符。因此，样本 2 没有 *eltA* 基因。然而，在样本 4 中，在不同的 DNA 片段大小中，有一条 DNA 带的大小与阳性对照相同。由于阴性对照中未发现 843 bp 的 DNA 片段，因此样品 4 中的 DNA 扩增不是由于 PCR 污染所致。虽然在样本 4 中发现了 843 bp 的 DNA 片段，但无法确定样本 4 是否含有 *eltA* 基因。这是因为 PCR 扩增后观察到多条带。

为了验证结果，对所有样品重复 6 次(表 2)。在样本 1 中发现了一致的结果(表 2)。对于样本 2 和样本 4，大多数结果一致，在 RT-PCR 后观察到多条带。对于样本 3，六次重复中有两次是不同的。在其中一个重复(Repeat 3)中，未检测到 DNA 片段；在另一个重复(Repeat 5)中观察到多条带(表 2)。



**Figure 2.** Analysis of *eltA* gene expression in different samples as determined by RT-PCR. Each well was indicated by the product that was loaded. The Ladder contained DNA fragments with standard molecular weights. Positive control was indicated by +ve and negative control was indicated by -ve

**图 2.** RT-PCR 检测不同样本中 *eltA* 基因表达。每个条带上都显示了标准分子量的 DNA 片段。阳性对照用 +ve 表示，阴性对照用 -ve 表示

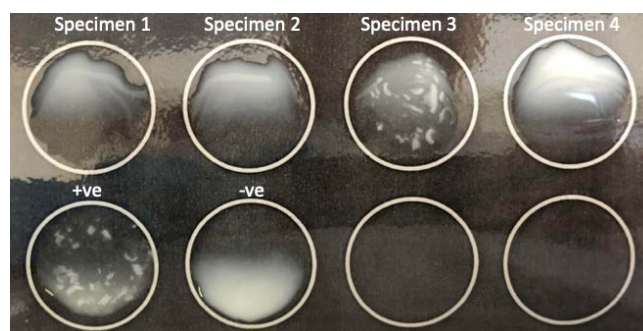
**Table 2.** Summarized results of *eltA* RT-PCR from 6 independent repeats**表 2.** 总结了 6 个独立重复序列的 *eltA* RT-PCR 结果

	Sample 1	+ve	-ve	Sample 2	+ve	-ve	Sample 3	+ve	-ve	Sample 4	+ve	-ve
Repeat 1	+	/	/	MB	+	-	+	+	-	MB	+	-
Repeat 2	+	+	+	< 500 bp	-	-	+	+	+	MB	+	MB
Repeat 3	+	+	-	MB	+	-	-	/	/	MB	-	-
Repeat 4	+	+	-	MB	+	-	+	+	-	MB	+	-
Repeat 5	+	+	-	MB	+	-	MB	+	-	-	+	-
Repeat 6	+	+	-	MB	+	-	+	+	-	MB	+	-

+表明 *eltA* 特异性 DNA 片段大小为 843 bp, 与阳性对照相同; -, 表明 RT-PCR 后未检测到 DNA 片段大小; MB, 多波段。

### 3.3. 被动胶乳凝集法检测不耐热肠毒素

对腹泻患儿上清液共 4 份进行凝集试验。乳胶凝集试验结果表明, 样品 3 对 GM1 凝集呈阳性, 而样品 1、2 和 4 对 GM1 凝集呈阴性(图 3)。独立测试 21 次后, 所有样品的结果一致。



**Figure 3.** A representative result of the analysis of the heat-labile enterotoxin with latex agglutination assay. Agglutination of the GM1 ganglioside-coated latex beads was evident by the clumps in the supernatants. Positive control was indicated by +ve and negative control was indicated by -ve

**图 3.** 用胶乳凝集法分析热不稳定肠毒素的代表性结果。GM1 神经节苷脂包被乳胶珠在上清液中的凝集明显。阳性对照用+ve 表示, 阴性对照用-ve 表示

## 4. 讨论

在许多发展中国家, ETEC 是引起急性腹泻的常见原因, 尤其是儿童[14]。确定和鉴定 ETEC 的毒力是非常重要的。本研究采用 RT-PCR 技术, 结合毒力基因 *eltA* 的特异性引物, 对产 LT 的 ETEC 菌株进行了鉴定。在两株大肠杆菌中发现了该毒力基因的存在, 并证实这两株大肠杆菌是产 LT 的 ETEC。尽管大多数结果在重复中是一致的, 但在一些重复中观察到了阴性或阳性的故障。在处理样本和执行测试时, 很可能是人为错误。在一些样本中发现多个扩增子大小, 这很可能是由于引物设计。这个问题可以通过使用更特异的引物来解决。此外, 多重 PCR 检测可在单一反应中检测和鉴别 ETEC 菌株和少数其他腹泻病原体[4]。

用被动胶乳凝集法鉴定 LT 毒素的产生。在本研究中, 有一个样本的乳胶凝集呈阳性, 很可能是产生 LT 的 ETCE。

在本研究中, 产生 LT 的 ETCE 的患病率为 25%。由于样本量较小, 患病率可能较高。被动胶乳凝集试验方法简单、成本低, 凝集反应结果一致、直观。然而, GM1 神经节苷脂涂覆的乳胶珠可以与

*V. cholerae* [7]产生的霍乱毒素(CT)交叉反应。相反的被动胶乳凝集试验或使用特定的抗 LT 抗体可以提供更准确的结果来区分 CT 和 LT 毒素之间的差异。

综上所述,通过 RT-PCR 鉴定细菌中的毒力基因或分析样品中 LT 毒素的存在,可以鉴定热不稳定(LT)肠毒素产生的 ETEC 导致的腹泻。

## 参考文献

- [1] Hosangadi, D., Smith, P.G. and Giersing, B.K. (2017) Considerations for Using ETEC and Shigella Disease Burden Estimates to Guide Vaccine Development Strategy. *Vaccine*, **37**, 7372-7380. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.083>
- [2] Wolf, M.K. (1997) Occurrence, Distribution, and Associations of O and H Serogroups, Colonization Factor Antigens, and Toxins of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**, 569-84. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.4.569>
- [3] Dubreuil, J.D., Isaacson, R.E. and Schifferli, D.M. (2016) Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, **7**. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016>
- [4] Rodas, C., Iniguez, V., Qadri, F., Wiklund, G., Svennerholm, A.M. and Sjoling, A. (2009) Development of Multiplex PCR Assays for Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Colonization Factors and Toxins. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**, 1218-1220. <https://doi.org/10.1128/JCM.00316-09>
- [5] Hasegawa, M. and Shimonishi, Y. (2005) Recognition and Signal Transduction Mechanism of *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin and Its Receptor, Guanylate Cyclase C. *The Journal of Peptide Research*, **65**, 261-271. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2005.00218.x>
- [6] Field, M. (2003) Intestinal Ion Transport and the Pathophysiology of Diarrhea. *Journal of Clinical Investigation*, **111**, 931-943. <https://doi.org/10.1172/JCI200318326>
- [7] Mudrak, B. and Kuehn, M.J. (2010) Heat-Labile Enterotoxin: Beyond G(m1) Binding. *Toxins*, **2**, 1445-1470. <https://doi.org/10.3390/toxins2061445>
- [8] Sixma, T.K., Pronk, S.E., Kalk, K.H., Wartna, E.S., Van Zanten, B.A., Witholt, B. and Hol, W.G. (1991) Crystal Structure of a Cholera Toxin-Related Heat-Labile Enterotoxin from *E. coli*. *Nature*, **351**, 371-377. <https://doi.org/10.1038/351371a0>
- [9] Domenighini, M., Pizza, M., Jobling, M.G., Holmes, R.K. and Rappuoli, R. (1995) Identification of Errors among Database Sequence Entries and Comparison of Correct Amino Acid Sequences for the Heat-Labile Enterotoxins of *Escherichia coli* and *Vibrio Cholerae*. *Molecular Microbiology*, **15**, 1165-1167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02289.x>
- [10] Viswanathan, V.K., Hodges, K. and Hecht, G. (2009) Enteric Infection Meets Intestinal Function: How Bacterial Pathogens Cause Diarrhoea. *Nature Reviews Microbiology*, **7**, 110-1109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2053>
- [11] Wang, X., Gao, X. and Hardwidge, P.R. (2012) Heat-Labile Enterotoxin-Induced Activation of NF-kappaB and MAPK Pathways in Intestinal Epithelial Cells Impacts Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Adherence. *Cellular Microbiology*, **14**, 1231-1241. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01793.x>
- [12] Kashefiyeh, M., Habib, Z., et al. (2013) Frequency of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates Harboring eltB and eltA Genes in Diarrheal Specimens among Children Younger than 5 Years in Tabriz Hospitals. [https://www.researchgate.net/publication/288478025\\_Frequency\\_of\\_enterotoxigenic\\_Escherichia\\_coli\\_isolates\\_harboring\\_eltB\\_and\\_eltA\\_genes\\_in\\_diarrheal\\_specimens\\_among\\_children\\_younger\\_than\\_5\\_years\\_in\\_Tabriz\\_hospitals](https://www.researchgate.net/publication/288478025_Frequency_of_enterotoxigenic_Escherichia_coli_isolates_harboring_eltB_and_eltA_genes_in_diarrheal_specimens_among_children_younger_than_5_years_in_Tabriz_hospitals)
- [13] March, S.B. and Ratnam, S. (1989) Latex Agglutination Test for Detection of *Escherichia coli* Serotype O157. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**, 1675-1677. <https://doi.org/10.1128/JCM.27.7.1675-1677.1989>
- [14] World Health Organization (2017) Diarrhoeal Disease. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>