



以多套式聚合酶鏈反應同時檢測台中市附近環境 水中熱不穩定性腸毒素LT I和熱穩定性腸毒素 ST II之大腸桿菌

王叔苑 蔡政志 曾浩洋*

國立中興大學 食品科學系

摘 要

腸毒素大腸桿菌產生的毒素，包括熱不穩定性腸毒素 (LT) 及熱穩定性腸毒素 (ST)。這些毒素可引起人畜下痢之疾病。於本研究，我們結合了對大腸桿菌 LT I 及 ST II 腸毒素基因具特異性之二組聚合酶鏈反應 (PCR) 引子，組合為一多套式 PCR 套組，以同時檢測自來水及環境水中 LT I 及 ST II 型腸毒素大腸桿菌之存在。利用 Chromocult coliform agar (CCA)，我們發現台中地區自來水及地下水，不含或僅含 10^0 CFU / ml 之大腸桿菌及 coliform 菌；然四條近台中市之溪流皆含 $10^2 \sim 10^4$ CFU / ml 之高菌數大腸桿菌與 coliform 菌；且其中三條溪流水樣中含 LT I 及 ST II 型大腸桿菌或者只含 ST II 型之大腸桿菌。此結果顯示都市近郊之溪水已遭高量的微生物污染，應該儘速加以注意。

關鍵詞：多套式聚合酶鏈反應套組，熱不穩定性腸毒素 LT I 及熱穩定性腸毒素 ST II 大腸桿菌，環境水。

前 言

腸毒素型大腸桿菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) 為引起人畜下痢疾病的主要病原菌之一⁽¹⁾。ETEC 所產生之腸毒素，可分為熱不穩定性腸毒素 (heat-labile toxin, LT) 及熱穩定性腸毒素 (heat-stable toxin, ST)，ETEC 可能僅產生其中一種或兩種毒素⁽²⁾。

熱不穩定性腸毒素在 65°C 下加熱 30 分鐘，便失去活性⁽³⁾，具抗原性，由一個分子量 25,500 Dalton 之 A 次單位和五個分子量 11,500 Dalton 之 B 次單位所構成。其造成腹瀉的作用機制為 B 次單位接合於腸上皮細胞之受體，使具酵素活性 A 次單位進入細胞質刺激 Adenylate cyclase，使 cAMP 濃度增加，以致於電解質失

去平衡而腹瀉。LT 可分為 LT I 及 LT II，而 LT I 又可依來源宿主不同分為 LT Ip (動物來源) LT Ih (人類來源)⁽⁴⁾。熱穩定性腸毒素可耐 100°C 下加熱 15 分鐘⁽⁵⁾，不具抗原性，分子量小於 5,000 Dalton。依據其對甲醇之溶解與否，可分為 ST I 和 ST II。另外，ST I 對人類，幼鼠及小豬具活性，而 ST II 則主要可引起只對幼豬之下痢⁽⁶⁾。

一般常用的大腸桿菌腸毒素分析試驗方法為採用結紮之活兔或豬的空腸分析法 (rabbit or piglets ligated ideal loop assay)⁽⁷⁾，此法為體內 (in vivo) 進行，較為費時，且成本高，需專門訓練人才及特殊實驗室才有可信的結果。因此，快速檢測之方法相當重要。此法包括免疫分析法，例如 Klipsten⁽⁸⁾ 等人所發展的酵素連結免疫分析 (enzyme-linked immunoassay) 法，以

Journal of Food and Drug Analysis. 1998. 6(2)

及聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術，皆被應用於腸毒素的檢測工作。在 PCR 之相關報告方面，例如 Woodward⁽⁹⁾ 等人發展的 LT 1/LT 2 PCR 引子，可以檢測 LT I 之腸毒素基因；Lortie et al⁽¹⁰⁾ 等人發展的 ST II_f/ST II_r PCR 引子，則針對於檢測 ST II 之腸毒素基因。

由於台灣地狹人稠，都市附近地下水及河川、溪流等可能受到人類或動物排泄物之污染，例如家庭廢水或養殖場、畜牧場排放含動物糞便之污水所污染，而可能因為動物或人類本身感染 ETEC，使得 ETEC 經由糞便的排放而污染河川、溪流，造成下痢疾病的來源。Echeverria 等人⁽¹¹⁾ 及 Lang⁽¹²⁾ 即曾發表城鎮之飲用水源檢測出 ETEC 等病原性大腸桿菌之報告。因此，本篇研究之主要目的係應用本研究室自行設計之 LT I 及 ST II 型 ETEC 檢測用 PCR 引子⁽¹³⁾，組合為多套式聚合酶鏈反應系統 (multiplex PCR)，來檢測台中市附近主要溪流、自來水、湖水及地下水，了解檢測其中之 ETEC 之可行性。

材料與方法

一、實驗材料

(一)菌種

本研究所用菌株，包括 LTI ETEC (菌株 T02；ATCC 43886) 其來源為美國菌種收集中心 (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD., U.S.A.) 及 STII ETEC (菌株 T10；UM 4247) 其來源為加拿大蒙特婁大學 (University of Montreal, Montreal, Canada)。

(二)PCR 引子

利用本研究室已發表之 LT I，ST II 腸毒素基因之檢測用 PCR 引子⁽¹³⁾，組合為雙套式 PCR 行之。引子序列如下：

LT I1: 5'-GCTGACTCTAGACCCCCAG-3'

LT I2: 5'-TGTAACCATCCTCTGCCGGA-3'

ST II1: 5'-CTGTGTGAACATTATAGACAAA-TA-3'

ST II2: 5'-ACCATTATTTGGGCGCCAAAG-3'

上述引子係由台北快興科技公司合成。

(三)檢測水樣

實驗所用環境水取自台中縣(市)之大里溪、頭汴溪、廊仔坑溪及旱溪等四條河流，以及台中市之自來水，台中市中興大學之湖水與地下水。

二、實驗方法

(一)菌體培養

將一白金耳量之目標大腸桿菌接入 3 ml Luria broth (yeast extract 5g, tryptone 10g, NaCl 5g 及 H₂O 1000 ml) 於 37°C 培養 8 小時，部分菌液稀釋，並將菌塗抹於 Luria agar，作為菌數計算或暫時保存。

(二)水樣品中生菌數計算

取 1 ml 之水樣加入 9 ml 無菌水中作連續稀釋，再各取 1 ml 的稀釋菌液加入培養皿當中，以傾倒法 (pour plate) 將 PCA (plate count agar，購自 Difco) 於 45°C 下倒入培養皿，均勻混合，待 PCA 凝固後，於 37°C 隔夜培養並計數。

(三)水樣中 *E. coli* 和 coliform 之總菌數

方法同前述二、(二)，惟所用培養基為 Chromocult coliform agar (CCA)，購自 Merck。

(四)LT I1/LT I2 和 ST II1/ST II2 二對引子組之雙套式聚合酶鏈反應

目標菌 (T02, T10) 經活化後，接一白金耳之菌液於 3 ml Luria broth 中，37°C 培養 8 小時，取適量菌液，進行連續稀釋。取 10 μl 之目標菌菌體懸浮液 (含 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰ cells per 10 μl 之 T02 及 T10 菌液，各取 5 μl 混合) 進行 PCR 反應。PCR 反應條件為取 0.5 ml 微量離心管中加入前述 10 μl 之連續稀釋目標菌液，300 μM dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 1 μl，10 × PCR buffer (10 × :100 mM Tris-HCl, pH 8.8 at 25°C, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1% Triton X-100) 4 μl。另添加 PCR 引子 LT I1/LT I2 各 15 pmole，ST II1/ST II2 各 40

Journal of Food and Drug Analysis, 1998, 6(2)

pmole，以無菌水加至體積為40 µl，最後加入兩滴礦物油 (Sigma) 覆蓋其上。將微量離心管置入 Programable thermocycler (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer, Norwalk, CT., U.S.A.)。先升溫至95 °C，加熱30分鐘將菌體破碎，接著降溫至80 °C，添加10 µl 聚合酶溶液 [0.6 unit Dynazyme (Finnzyme, Riihitontuntie, Finland)，10 × PCR buffer 1 µl，加無菌水至體積10 µl] 使反應終體積為50 µl (Mg²⁺ 離子終濃度2.5 mM)，進行PCR反應。反應條件為94 °C，維持20秒，使DNA分開成單股，再降溫至57 °C，維持20秒，進行黏合作用 (annealing)，接著進行延伸作用 (extension)，於72 °C維持30秒，最後以72 °C維持2分鐘使作用完全。如此進行35個循環，所有過程皆以程式連結。分析時取10 µl 反應產物，以2% agarose 於1 × TAE buffer (50 × TAE buffer : Tris base 242 g, glacial acetic acid 57.1 ml, 0.5 M EDTA, 100 ml, pH 8.0, 加水至1000 ml) 中進行電泳分析，經 ethidium bromide 染色，以 UV box 觀察後拍照並記錄。

(五) 環境水與飲用水之PCR檢測

1. MacConkey broth 之增菌培養

本研究檢測之樣品水為不加或外加 ETEC 之水樣品。因此，將目標菌 (T02, T10) 經活化後，接一白金耳之菌液於3 ml Luria broth 中，37 °C 培養8小時，進行連續稀釋。再將環境水與飲用水分裝多瓶，每瓶100 ml之樣品，分別加入不同菌數 (含10³, 10², 10¹, 10⁰ CFU / ml) 之目標菌 (T02 及 T10)，予以混合，空白組則不加菌液。以10,000 × g 離心10分鐘，傾棄上清液，沉澱物溶於1 ml 無菌水，振盪混勻，全量加入9 ml MacConkey broth 的培養瓶，進行預培養增菌，於37 °C 下培養6或8小時後，取100 µl 之培養液，以去離子水稀釋十倍，取10 µl 進行 Multiplex PCR 反應。

對台中市自來水及中興大學湖水與地下水；使用檢測條件與前述二、(五) 相同。

對台中縣(市)之大里溪、頭汴溪、廊仔坑溪及旱溪之溪水；檢測條件雖與前述二、(四) 相同。唯引子 LT II / LT I2 為各 25 pmole，ST II1 / ST II2 為各 100 pmole。而 Mg²⁺ 離子終濃度 3 mM，黏合作用 (annealing) 溫度為 62 °C，進行 40 個 PCR 循環。

結果與討論

一、水樣中生菌數測定

本研究所取之環境水與自來水經 PCA 計數，每毫升自來水生菌數為 0 CFU，每毫升地下水生菌數為個位數字，即 10⁰ CFU，每毫升湖水生菌數為 10³ ~ 10⁴ CFU，而大里溪、頭汴溪、廊仔坑溪及旱溪之生菌數則各為每毫升 10⁴ ~ 10⁵ CFU、10³ ~ 10⁴ CFU、10² ~ 10³ CFU 及 10⁴ ~ 10⁵ CFU。此結果顯示，除自來水及地下水外，上述河川水及湖水，均為高度污染之環境水。

二、水樣中 *E. coli* 和 coliforms 之總菌數

所取之環境水與飲用水經 CCA 計數，每毫升自來水含 *E. coli* 和 coliforms 之總菌數為 0 CFU，每毫升地下水之 *E. coli* 和 coliforms 之總菌數為 10⁰ CFU；而大里溪、頭汴溪、廊仔坑溪及旱溪之 *E. coli* 和 coliforms 之總菌數則各為每毫升 10³ ~ 10⁴ CFU、10² ~ 10³ CFU、10¹ ~ 10² CFU 及 10² ~ 10³ CFU。由於 *E. coli* 及 coliforms 細菌對環境水之污染，一般認為係動物糞便污染源之指標；上述高污染之數據值得

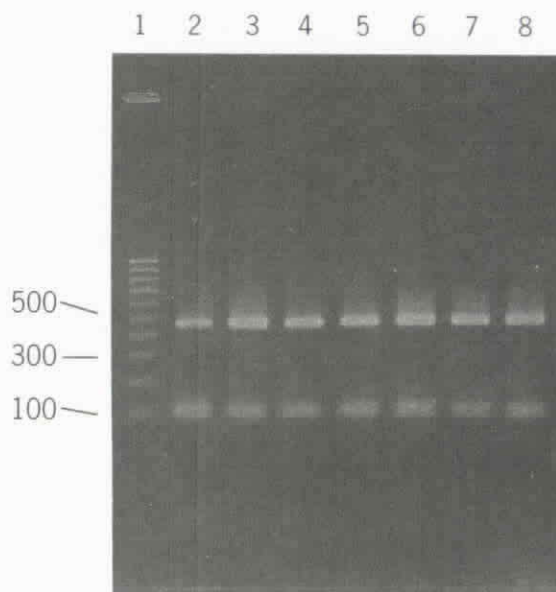


Figure 1. Sensitivity for multiplex PCR detection of ETEC strains using LT II / LT I2 and ST II1 / ST II2 primer pairs.

Lane 1 : 100 bp ladder; Lane 2~8 : 10⁰ to 10⁶ CFU per assay each of ETEC T02 and T10.

注意。

三、多套式PCR套組對ETEC之檢測

本實驗室自行設計之LT I及ST II基因特異性引子其檢測特異性已經證實⁽¹³⁾。而本研究組合之多套式PCR，在ETEC的檢測上，對於所採用之菌株(T02, T10)皆有預期之PCR產物。T02菌株為LT I腸毒素型，產生466 bp的片段；T10菌株則為ST II腸毒素型，可產生104 bp分子量的預期PCR產物。而其PCR靈敏度在未經增殖目標菌之條件下可達 10^0 CFU各目標菌；如圖一所示。

四、環境水與飲用水中目標菌之檢測

如前所述，Echeverria 等人(1991)⁽¹¹⁾與Lang 等人(1994)⁽¹²⁾之報告指出，於城鎮之飲用水源曾檢出ETEC等病原性*E. coli*，因此檢測環境水與飲用水中目標菌之應用性為本研究主要項目。本研究選擇與飲用有關的自來水與地下水進行目標菌之檢測。而為確保水樣品污染菌中微量之目標菌得以檢測出，本研究乃將水樣品中可能之目標菌，另行增菌培養，再進行PCR檢測。培養基則是選用可以選擇性增殖



Figure 2. Sensitivity for PCR detection of ETEC strain T02 (LT I EC) and T10 (ST II EC) in ground water, tap water and pond water. Experimental conditions are as described in Methods. The PCR primers used in multiplex PCR system were LT II / LT I2 and ST III / ST II2.

Lane 1 and 17: 100 bp ladder; lane 2~6: samples inoculated with 0, 10^0 ~ 10^3 CFU of T02 and T10 per 100 ml of ground water; lane 7~11: samples inoculated with 0, 10^0 ~ 10^3 CFU of T02 and T10 per 100 ml of tap water; lane 12~16: samples inoculated with 0, 10^0 ~ 10^3 CFU of T02 and T10 per 100 ml of pond water.

coliform的MacConkey broth。

(一)台中市自來水、地下水及湖水檢驗

經MacConkey broth (37°C, 6小時)預培養後，無論是應用在地下水、自來水或湖水的檢測上，接種菌株T02, T10之樣品水，其檢測靈敏度都可高達 10^0 CFU / 100 ml水。PCR檢測結果，均出現預期之產物，並且無非特異性產物的干擾，如圖二所示。

(二)台中縣(市)之大里溪、頭汴溪、廊仔坑溪及旱溪溪水之檢驗

由於溪流等環境水可能受到外在環境(如家庭廢水，家畜養殖，工業廢水…)的影響，造成水質成分較為複雜，而後影響PCR反應，產生非特異性的干擾。例如接種之目標菌經MacConkey broth (37°C, 8小時)，預培養後，利用原本PCR反應條件結果會有預期之PCR產物只出現一個或無產物可見之現象。此外，干

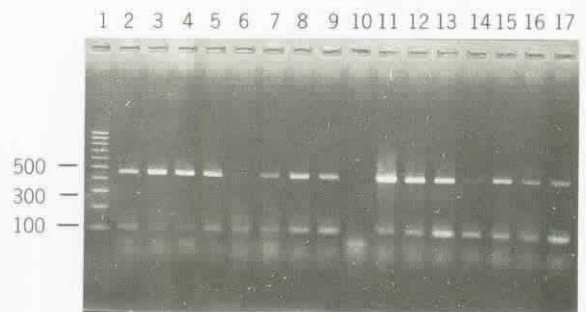


Figure 3. Sensitivity for PCR detection of ETEC cells in Da-Li river, Tou-pan river, Pu-zi-ken river and Han river near Taichung City. Experimental conditions are as described in Methods. The PCR primers used in multiplex PCR system were LT II / LT I2 and ST III / ST II2.

Lane 1: 100 bp ladder; lane 2~5: samples inoculated with 0, 10^0 ~ 10^2 CFU of T02 and T10 per 100 ml of Da-Li river water; lane 6~9: samples inoculated with 0, 10^0 ~ 10^2 CFU of T02 and T10 per 100 ml of Tou-pan river water; lane 10~13: samples inoculated with 0, 10^0 ~ 10^2 CFU of T02 and T10 per 100 ml of Pu-zi-ken river water; lane 14~17: samples inoculated with 0, 10^0 ~ 10^2 CFU of T02 and T10 per 100 ml of Han river water.

Journal of Food and Drug Analysis. 1998. 6(2)

擾性之非特異性PCR產物亦可能產生；因此，我們乃將PCR條件略作調整。例如，1. 將引子LT I1/LT I2調為各25 pmole，ST II1/ST II2各調為100 pmole。2. Mg²⁺離子終濃度調升為3 mM。3. 黏合溫度調升為62°C，企圖減少非特異性產物干擾之現象。4. PCR循環數增為40個循環，以增加預期產物之濃度。其結果顯示，經增菌培養，菌株T02, T10之檢測靈敏度都可達到原菌數10⁰ CFU / 100 ml水樣品，在此低菌數下，均可出現預期之PCR產物。此外，我們發現大里溪，旱溪溪水於不加目標菌之溪水中，居然可檢測出具LT I, ST II腸毒素型基因的ETEC (圖二)。此結果顯示大里溪，旱溪在污染菌數達10³~10⁴及10²~10³ CFU / 100 ml之*E. coli*和coliform之總菌數當中，含有致病性的ETEC，並且為LT I以及ST II腸毒素型。另外，頭汴溪溪水空白組亦可發現具ST II腸毒素型基因的ETEC；廊仔坑溪空白組則無此結果。由此更證明，環境水可以直接經MacConkey broth的預培養，便可檢測出LT I, ST II型ETEC，而上述河川之環境水已遭大腸桿菌之高度污染。

綜上所述，本研究提供了一快速可靠的雙套式PCR檢測套組，得以同時檢測飲用水及環境水中之致病性大腸桿菌；在飲用水及食物中毒之原因了解，以及環境水源污染之調查，本報告所述方法應具有相當之應用價值。

謝 誌

本研究報告承行政院衛生署之支持(計劃編號DOH85-TD-92, DOH86-TD-094)得以完成，特此誌謝。

參考文獻

1. Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155: 377-389.
2. Echeverria, P., Seriwatana, J., Patamaroj, U., Moseley, S. L., McFarland, A., Chityothin, O. and Chaicumpa, W. 1984. Prevalence of heat-stable II enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs, water, and people at farms in Thailand as determined by DNA hybridization. J. Clin. Microbiol. 19: 489-491.
3. Gyles, C. L. and Barnum, D. A. 1969. A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. J. Infect. Dis. 120: 419-426.
4. Echeverria, P., Seriwatana, J., Sethabutr, O. and Chatkaeomrakot, A. 1990. Detection of diarrheogenic *Escherichia coli* using nucleotide probes. In "Gene Probe for Bacteria". 1st ed. Ch.4 pp. 95-141. Macario, A. J. L. ed. Academic Press, Inc. San Diego, California, U. S. A.
5. Scotland, S. M. 1988. Toxins. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 109S-129S.
6. Burgess, M. N., Bywater, R. J., Cowley, C. M., Mullan, N. A. and Newsome, P. M. 1978. Biological evaluation of methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. Infect. Immun. 21: 526-531.
7. Robertson, D. C., McDonel, J. L. and Dorner, F. 1985. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Pharmac. Ther. 28: 303-339.
8. Klipstein, F. A. and Engert, R. F. 1977. Immunological interrelationships between cholerae toxin and the heat-labile and heat-stable enterotoxins of coliform bacteria. Infect. Immun. 18: 110-117.
9. Woodward, M. J., Carrol, P. J. and Wray, C. 1992. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. 31: 251-261.
10. Lortie, L. A., Dubreuil, J. D. and Harel, J. 1991. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (ST b) isolated from humans with diarrhea. J. Infect. Dis. 29: 656-659.
11. Echeverria, P., Orskou, F., Orskou, I., Knutton, S., Scheutz, F., Brown, J. E. and Lexomboon, U. 1991. Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* as a cause of infantile diarrhea in Bangkok. J. Infect. Dis. 164: 550-554.
12. Lang, A. L., Tsai, Y. L., Mayer, C. L., Patton, K. C. and Palmer, C. J. 1994. Multiplex PCR

Journal of Food and Drug Analysis. 1998. 6(2)

for detection of the heat-labile toxin gene and Shiga-like toxin I and II genes in *Escherichia coli* isolated from natural waters. Appl. Environ. Microbiol. 60:3145-3149.

13. Tsen, H. Y., Chi, W. R. and Lin, C. K. 1996.

Use of novel polymerase chain reaction primers for the specific detection of heat-labile toxin I, heat-stable toxin I and II enterotoxigenic *Escherichia coli* in milk. J. Food Protect. 59 : 795-802.

Use of a Multiplex PCR System for the Simultaneous Detection of Heat Labile Toxin I and Heat Stable Toxin II *Escherichia coli* Cells in Environmental Waters Near Taichung City

SHU-WAN WANG, CHENG-CHIH TSAI AND HAU-YANG TSEN*

Department of Food Science, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC

ABSTRACT

The enterotoxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) cells include heat labile (LT) and heat stable toxins (ST). These toxins cause diarrheal in humans and domestic animals. In this study, we combined LT I and ST II gene specific PCR primers into a multiplex PCR system and used this system for the simultaneous detection of LT I and ST II ETEC cells in tap water and environmental waters. Using Chromocult coliform agar (CCA), we found that tap water and underground water were contaminated with 0-10⁰ CFU / ml of *E. coli* and coliform cells while the waters from four rivers near Taichung City were contaminated with 10²-10⁴ CFU / ml of *E. coli* and coliform cells. Furthermore, three of the four river waters were contaminated with LT I / ST II and ST II ETEC cells. The high levels of microfloral contamination in these river waters near an urban area should be attended to urgently.

Key words: multiplex PCR, LT I and ST II enterotoxigenic *E. coli*, environmental waters.