



1996

## Plasmid profile analysis for enterotoxigenic *Escherichia coli* and detection of heat stable enterotoxin I (STI) gene by polymerase chain reaction

Follow this and additional works at: <https://www.jfda-online.com/journal>

---

### Recommended Citation

Tsen, H.-Y. and Chi, W.-R. (1996) "Plasmid profile analysis for enterotoxigenic *Escherichia coli* and detection of heat stable enterotoxin I (STI) gene by polymerase chain reaction," *Journal of Food and Drug Analysis*: Vol. 4 : Iss. 3 , Article 6.

Available at: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2982>

This Original Article is brought to you for free and open access by Journal of Food and Drug Analysis. It has been accepted for inclusion in Journal of Food and Drug Analysis by an authorized editor of Journal of Food and Drug Analysis.



# 腸毒素型大腸桿菌之質體分析及熱穩定性腸毒素 STI 基因之聚合酶鏈反應檢測

曾浩洋\* 季萬榮

國立中興大學食品科學系

## 摘 要

腸毒素型大腸桿菌 (ETEC) 為引起人畜下痢疾病之主要病原菌，其產生的腸毒素，可分為熱不穩定性腸毒素 (LT) 及熱穩定性腸毒素 (ST)，由於上述引起致病因子之基因，均位於質體上，本研究乃首先探討 ETEC 質體 DNA 之分離方法，並以 0.7% agarose 膠體進行電泳分析，結果發現大部分 ETEC 之質體 DNA，分佈在 2 kb 到 22 kb 之間，以此質體 DNA 做為目標 DNA，並以本研究室發展之 STI 基因檢測用聚合酶鏈反應 (PCR) 引子，進行 PCR 反應結果發現，所有受測 STI 型腸毒素大腸桿菌，皆可產生一分子量 203 bp 之預期產物，由於此質體 DNA 分離方法，簡單快速，應可用於大腸桿菌其他腸毒素基因之檢測。

**關鍵詞：**腸毒素型大腸桿菌，質體 DNA，熱穩定性腸毒素，聚合酶鏈反應。

## 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<sup>(1)</sup>。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 可能產生其中一種或兩種毒素<sup>(2)</sup>。

熱穩定性腸毒素與 LT 不同，其分子量小於 5000 dalton，為不具抗原性之多肽 (polypeptide)。依據其對甲醇之溶解與否，可分為 STI 及 STII<sup>(3)</sup>。STI toxin 根據其來源之不同可再細分為 STIa (STI1) 及 STIb (STI2, 3, 4)；STIa 為分離自人、豬、牛之 ETEC 所產生<sup>(4, 5, 6, 7)</sup>，具 STIb 之 ETEC 則首先分離自巴格達之腹瀉患者<sup>(4, 5)</sup>。

一般常用的腸毒素 ST 之分析方法，係採用結紮之活兔或豬的空腸分析方法 (rabbit or

piglets ligated ileal loop assay)<sup>(8)</sup>，然此法費時，且成本高，較不方便。因此，快速檢測方法，包括免疫分析方法，例如 Klipstein 等人<sup>(9)</sup>所發展之酵素連結免疫分析 (enzyme-linked immunoassay) 方法，以及最近的聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術，皆被應用於 STI 型腸毒素 *E. coli* 之快速檢測工作。在 PCR 之相關報告方面，例如 Horne et al<sup>(10)</sup> 等人發展的 AL133 及 AL82 之 PCR 引子，可用以檢測 STIa 之腸毒素基因，而其 AL134 及 AL82 PCR 引子，則可用於 STIb 型腸毒素基因的檢測；此外，Candrian et al<sup>(11)</sup> 等人發展之 EC01 及 EC02 PCR 引子，則可用於 STI，包括 STIa 及 STIb 之同時檢測，而 Woodward 等人<sup>(12)</sup> 所發展之 PCR 引子，主要則係針對 STIa 型腸毒素基因之檢測而設計。

由於 STI 毒素基因，係存於質體 (plasmid) DNA 上，在從事 PCR 檢測時，目標 DNA 的分

離，須包括質體 DNA 之存在；本研究因此擬先探討腸毒素型大腸桿菌 (ETEC) 之質體 DNA 圖譜 (plasmid profile)，再則應用本研究室自行設計之 STI 型 ETEC 檢測用 PCR 引子，了解其應用於這些質體 DNA 中 STI 型腸毒素基因檢測之可行性。

## 材料與方法

### 一、實驗材料

#### (一) 菌種

本實驗所使用的菌種包括有病原型及非病原型之大腸桿菌，非 *E. coli* 之 *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia* 等腸道菌科細菌 (Enterobacteriaceae) 及其他非腸內菌。其來源包括美國菌種收集中心 (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD., U.S.A.); 疾病控制中心 (CDC, Center for Disease Control, Atlanta, GA., U.S.A.); 美國農業部 (USDA, United State Department of Agriculture); 東京水產大學 (TUF, Tokyo University of Fishes, Tokyo); 國內為食品工業發展研究所菌種保存及研究中心 (CCRC, Culture Collection and Research Center, Hsin-Chu, Taiwan); 屏東技術學院 (PT, National Ping-Tung College of Technology, Ping-Tung, Taiwan); 行政院衛生署藥物食品檢驗局 (NLFD, National Laboratories of Foods and Drugs, Taipei, Taiwan) (表一、二)。

#### (二) PCR 引子

利用由 Genetic computer group (GCG) Inc. 所開發的 Wisconsin sequence analysis software package 進行腸毒素大腸桿菌毒素基因 LT, ST 基因的比對，由低 homology 的區段，找到的聚合酶鏈反應 (PCR) 引子，以 FASTA 程式將其與 Gene Bank/EMBL 之所有 DNA 序列比對，若 3' 端有可能與其他基因配對，則重新尋找之。其 DNA 序列如下：

STI-P1: 5'GGAGGTAAIATGAAIAAIIIAATITT3'

STI-P2: 5'TTACAACAIAITTCACAGCAGTAA3'

STI-P1 之長度為 26 個 base，而 STI-P2 則為 24 個 base，其位置分別為 STI 基因之 -8 至 17 及 171 至 194 base 之位置。

#### (三) *E. coli* 質體 DNA 之分離

採用 Promega 公司 (Madison, WI., U.S.A.) 之 Magic™ Minipreps DNA purification system

進行目標菌 *E. coli* plasmid DNA 的抽取。

取 1.5 ml 之 6-12 小時培養的新鮮菌液，置於微量離心管中，以 Eppendorf (Model 5415 c) 離心機，於 6,000 rpm 離心 5 分鐘，沈降菌體。移除上澄液後，加上 200  $\mu$ l 之細胞懸浮液 (cell resuspension solution; 100  $\mu$ g RNase/ml H<sub>2</sub>O)，振盪混合均勻，以懸浮菌體。然後加入 200  $\mu$ l 之細胞水解液 (cell lysis solution; 0.2N NaOH, 1% sodium dodecyl sulfate) 輕搖混勻，直到溶液澄清。再加入 200  $\mu$ l 的中和液 (neutralization solution; 2.55N KOAC, pH 4.8)。混勻後，以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，將上澄液移至另一新的微量離心管，加入 1 ml 之 Magic™ Minipreps DNA purification resin，小心混勻，以使 DNA 與樹脂結合，隨後將 resin/DNA 混合物取至事先接上已去掉針頭之 3 ml 針筒的 Magic™ minicolumn，小心的輕推過 minicolumn，再加入 2 ml column wash solution 後，輕推使其通過 column。將 minicolumn 移至 1.5 ml 的微量離心管，以極速 (約 12000 rpm) 離心 20 秒，使樹脂乾燥後，再加入 50  $\mu$ l 之 65-70°C 的無菌水或 TE 緩衝液於 minicolumn 中，靜置 30 分鐘，使 DNA 溶出，最後再以極速離心 20 秒，將 DNA 溶液離至新的 eppendorf tube。如此，所得 DNA，貯存於 4°C 或 -20°C 備用。

#### (四) 聚合酶鏈反應 (PCR)

0.5 ml 微量離心管中加入欲增幅之 plasmid DNA 0.5  $\mu$ g 及 10 mM dATP、dTTP、dGTP、dCTP 各 1  $\mu$ l, 10 x PCR buffer 5  $\mu$ l。加入適當濃度的 PCR 引子 (25 pmole each), 0.4 unit Dynazyme (Finnzyme, Riihitontuntie, Finland), 以無菌水加至終體積為 50  $\mu$ l, 最後加入一滴 mineral oil (Sigma)。將反應液表面蓋住，而後將離心管放入 Programable thermal cycler (Gene Amp PCR system 9600, Perkin Elmer, Norwalk, CT., U.S.A.)。先升溫至 94°C，維持 20 秒，使 DNA 分開成單股，再降溫至 64°C，維持 20 秒或 50°C，維持 30 秒，進行黏合作用 (annealing)，接著進行延伸作用 (extension)，於 72°C 進行 30 秒。如此共 30 或 40 個循環，惟最後一次 PCR cycle，其 extension，維持 2 分鐘。之後，取 10 或 15  $\mu$ l 反應物，以 1.5 或 2% agarose 於 1 x TAE buffer 中電泳，經 Ethidium bromide 染色後，置於紫外燈盒上觀察、拍照及記錄。

## 結果與討論

### 一、ETEC 質體 DNA 之製備與分析

由於可導致腹瀉之大腸桿菌 (Diarrheagenic *E. coli*)，其致病因子之基因大部份均位於質體上，例如：ETEC 之吸附因子及腸毒素 (LTI、STI、STII) 之基因，即位於質體

DNA<sup>(2)</sup>。因此本研究曾探討數種 DNA 分離法所製備之 plasmid DNA，以進行 PCR 之可行性。首先利用 Kado 和 Liu<sup>(13)</sup> 之質體 DNA 製備方法以強鹼配合高溫將菌體細胞水解後，再以 phenol-chloroform 純化 DNA。比較不同加熱時間對 DNA 抽取效果之影響，結果並無明顯差異，唯以此法製備質體 DNA，其再現性

**Table 1.** *Escherichia coli* strains used in this study

Lab. No.	Source <sup>a</sup>	Toxin type
<b>Enterotoxigenic <i>E. coli</i></b>		
EWD 299	CCRC 41443 (ATCC 37218)	LTIp
ETEC 01	ATCC 35401	LTIIh+STIIh
ETEC 02	ATCC 43886	LTIIh
ETEC 03	ATCC 43896	STI
ETEC 04	ATCC 33849	LTI
ETEC 05	ATCC 31618	STI
ETEC 06	WHO 103	STI
ETEC 07	WHO 110	LTI+STI
ETEC 08	WHO 112	LTI
ETEC 09	PT 18	LTI+STII
<b>Enterohemorrhagic <i>E. coli</i></b>		
E 7	NLFD 12809	
E 8	NLFD 12810	
E 9	NLFD 12811	SLTII
E 101	NLFD 12812	SLTII
EHEC 02	CCRC 14825	verocytotoxin
EHEC 03	CCRC 13084	verocytotoxin
EHEC 04	CCRC 13086	verocytotoxin
EHEC 08	ATCC 43894	SLTI++SLTII
<b>Enteroinvasive <i>E. coli</i></b>		
EIEC 01	ATCC 43893	
<b>Enteropathogenic <i>E. coli</i></b>		
EPEC 01	NQS 315	
<b>Non Pathogenic <i>E. coli</i></b>		
E 1	CCRC 12570	
E 2	ATCC 25922	

<sup>a</sup>: Sources of bacterial strains are described in Methods. Strains of WHO were obtained from NLFD; CCRC, Culture Collection and Research Center, Hsin-Chu, Taiwan; WHO, World Health Organization; ATCC, American Type Culture Collection; PT, Ping-Tung College of Technology, Ping-Tung, Taiwan; NLFD, Ping-Tung National Laboratory of Foods and Drugs, Taipei, Taiwan; NQS, National Quantitation Service, Taipei, Taiwan.

**Table 2.** PCR assay for STI gene in bacterial strains other than *E. coli*

Strain	Source <sup>a</sup>	PCR
		STI-P1/STI-P2
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 19606	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	ATCC 25405	-
<i>C. diversus</i>	ATCC 27156	-
<i>C. freundii</i>	ATCC 8090	-
	ATCC 10787	-
	CCRC 12291	-
<i>C. koseri</i>	ATCC 25405	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 23566	-
<i>S. enteritidis</i>	ATCC 13076	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	-
	PT	-
<i>E. cloacae</i>	ATCC 23355	-
<i>Erwinia carotovora</i>	CCRC 11298	-
<i>Hafnia alvei</i>	CCRC 10906	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRC 10692	-
	PT	-
<i>Kluyvera ascorbata</i>	CCRC 11645	-
<i>Morganella morganii</i>	CCRC 10706	-
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427	-
<i>Serratia marcescens</i>	CCRC 10768	-
<i>Shigella flexneri</i>	CCRC 10772	-
<i>S. sonnei</i>	CCRC 10773	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CCRC 10807	-
<i>ETEC 03 (control)</i>	ATCC 43896	+

<sup>a</sup>: Bacterial sources are as described in Table 1.

不佳，故不採用。另外，Birnboim 及 Doly<sup>(14)</sup> 之鹼水解法，則無法抽出較大之質體；而大部份引發下痢性 *E. coli* 之攜帶致病因子基因的質體較大，例如：有些腸侵入型 *E. coli* (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC) 之帶有致病基因的質體長度可達 220 kb<sup>(15)</sup>。因此，本研究亦採用 Godson 及 Vapnek 等人<sup>(16)</sup> 所述之方法嘗試製備質體 DNA；此法雖強調其可溫和的抽取大於 15 kb 之 plasmid，然本研究採用此法的結果，亦發現抽出之 DNA 無法做為 PCR 目標 DNA 用。經多次嘗試之後，本研究發現，採用 Magic<sup>TM</sup> Minipreps DNA purification system (Promega, Madison, WI., U.S.A.)，以特殊之樹脂純化 plasmid DNA，所得之質體 DNA 可做

PCR 之用，而其電泳圖譜，則再現性高，且又符合快速之要求。故本研究便採用此法所純化之質體 DNA 作為 PCR 反應的目標基因。

圖一所示為此法所抽出之 ETEC 及其他 *E. coli* 菌株的質體圖譜 (plasmid profile)，由於依此法所得質體圖譜，其 DNA band，亮度及再現性俱佳；因此由之判斷此法所製備之質體 DNA 適合做為 PCR 之目標 DNA 之用。圖一亦可見，ETEC 質體 DNA 之分子量分佈從低於 2 kb，至超過 22 kb，然大部分的質體 DNA，其分子量大抵分佈於 2 kb 到 22 kb 之間。非 ETEC 之 *E. coli* 菌株，如電泳圖上 lane 11, 12, 13 等所示之 E7, E8 等菌株，其質體 DNA 分佈則頗為單純。圖一中含 STI 腸毒素

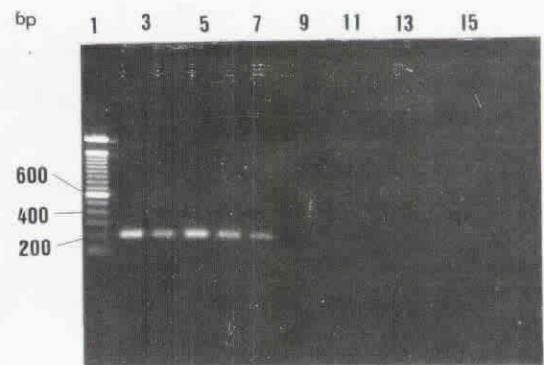


**Figure 1.** Plasmid profiles of *Escherichia coli* strains analyzed by 0.7% agarose gel electrophoresis. Lane 1: HindIII digested  $\lambda$  DNA serving as molecular weight marker, lane 2→14 represent plasmid DNAs isolated from strain EWD 299, ETEC 01, ETEC 02, ETEC 03 (STI), ETEC 04, ETEC 05 (STI), ETEC 06 (STI), ETEC 07 (STI+LT1), ETEC 08, E 7, E 7, E 8, and E 9, respectively.

基因的 ETEC 菌株為 lane 5, 7, 8 及 9 部分, 包括 ETEC03, 05, 06, 07 等菌株, 這些菌株, 具有共同大小的質體 DNA, 如大小接近 22 kb 者。圖一中質體 DNA 分子量之判定, 係以 HindIII 水解之  $\lambda$  DNA 為標準而比較, 而非為 supercoil 狀之 DNA 標準; 由於在抽取、製備質體 DNA 的過程, 一般亦不能保證所製備之質體 DNA 為完整之 supercoil, 因此 Ichiyama 等人<sup>(17)</sup> 在分析金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的質體 DNA 時, 即以  $\lambda$  DNA/HindIII 為標準分子量, 做為對比; 因此, 本研究所示之質體 DNA 分子量大小, 亦以  $\lambda$  DNA/HindIII 為分子量指標而定之。然而, 我們必須指出; 本文所指稱之質體 DNA 分子量, 僅是以  $\lambda$  DNA/HindIII 之 DNA 片段為分子量指標所得參考值, 不一定代表質體 DNA 在菌株中之確切分子量。

## 二、熱穩定性腸毒素型 I (ST I) 大腸桿菌之 PCR 檢測

由於 ETEC 之 STI 基因的差異很大, Candrian 等人<sup>(11)</sup> 指出動物及人類來源之 ETEC 其所具有的 STI 基因 (STIa、STIb) 僅有 70% 的相似性, 而 Patil 等人<sup>(18)</sup> 亦指出: 以 Inosine 取代 ambiguous base 而合成之 PCR 引子, 可有效的進行 PCR, 增幅特定之 DNA 片段而得到預期產物。另外, Candrian 等人<sup>(11)</sup>



**Figure 2.** Detection of heat stable toxin I (STI) gene in *E. coli* plasmid DNA using PCR primer pairs STI-P1/STI-P2. Lane 1, 16: 100 bp ladder (Gen Sura Laboratories, Inc, Del Mar, CA., USA); Lane 2-15: PCR products with target plasmid DNAs obtained from *E. coli* ETEC 01, ETEC 03, ETEC 05, ETEC 06, ETEC 07, ETEC 02, ETEC 04, ETEC 08, ETEC 09, EWD 299, EHEC 02, EIEC 01, EPEC 01 and E 1, respectively. The PCR condition was 94°C/20 sec, 50°C/30 sec and 72°C/30 sec. Total cycles for PCR were 40 and the final extension was performed at 72°C/2 min.

曾設計了一組含 inosine 之 PCR 引子 (EC01/EC02), 可有效的以 PCR 檢測大腸桿菌 STI 基因之存在。本研究另外設計了一組帶有 inosine 之 PCR 引子 (STI-P1/STI-P2) 進行 PCR 最適反應條件之探討。由於含 inosine 之 PCR 引子其黏合溫度無法預期<sup>(19)</sup>, 因此對於自行設計的 STI-P1/STI-P2 引子, 經過了改變黏合溫度、時間等多次之條件探討, 發現其較適黏合溫度、時間為 50°C/30 秒, 其它 denature 及 extension 之溫度、時間, 依材料與方法所述。為了解前述依質體 DNA 分離方法所得之 DNA 是否可做為 PCR 目標 DNA 用, 因此, 以之做為 PCR 之目標 DNA 使用。經 30 或 40 次 PCR 循環, 可使五株帶有 STI 基因的標準菌之質體 DNA 產生預期的 203 bp 之 PCR 產物, 而其他受測菌株, 則無相同 PCR 產物產生 (圖二及表二)。表二中其他菌株之 DNA, 無論依材料與方法中所述 *E. coli* 質體 DNA 分離之方法, 或直接以細胞分解液 (cell lysate)<sup>(17)</sup> 中之 DNA 為目標 DNA, 其結果均為陰性。上述所謂其他菌株包括其他腸毒素型大腸桿菌, 如含熱不穩定性腸毒素 (LT) 之菌株, 及其他病原型 *E. coli* 菌株, 例如 enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) 等, 以及與 *E. coli* 近緣之其他腸內菌科細菌,

包括 *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* 等，則均無任何 PCR 產物之產生。

由於本研究使用之質體 DNA 製備方法，簡單、快速、再現性佳，因此推斷除 STI 基因之檢測外，應可用於其他腸毒素型 *E. coli* 之毒素基因的檢測。

## 誌 謝

本研究 (計劃編號為：DOH 83-TD-058) 承衛生署支助，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. 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.
4. Moseley, S. L., Echeverria, P., Seriwatana, J., Tirapat, C., Chaicumpa, W., Sakuldaipeara, T. and Falkow, S. 1982. Identification of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Using Three Gene Probes. *J. Infect. Dis.* 145:863-869.
5. Moseley, S. L., Hardy, J.N., Huq, M. I., Echeverria, P. and Falkow, S. 1983. Isolation and Nucleotide Sequence Determinations of A Gene Encoding Heat-stable Enterotoxin *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 39:1167-1174.
6. So, M. and McCarthy, B. J. 1980. Nucleotide Sequence of The Bacterial Transposon Tn1681 Encoding A Heat-stable (ST) Toxin and Its Identification in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:4011-4015.
7. Utomporn, P., Seriwatana, J. and Echeverria, P. 1983. Identification of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Swine with Diarrhea in Thailand by Colony Hybridization Using Three Enterotoxin Gene Probes. *J. Clin. Microbiol.* 18:1424-1431.
8. Robertson, D. C., Mcdonel, J. L. and Dorner, F. 1985. *Escherichia coli* Heat-labile Enterotoxin. *Pharmac. Ther.* 28:303-339.
9. 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.
10. Hornes, E., Wasteson, Y. and Olisvik, O. 1991. Detection of *Escherichia coli* Heat-stable Enterotoxin Genes in Pig Stool Specimens by an Immobilized, Colorimetric, Nested Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29:2375-2379.
11. Candrian, U., Furrer, B., Hofflein, C. and Luthy, J. 1991. Use of Inosine-containing Oligonucleotide Primers for Enzymatic Amplification of Different Alleles of the Gene Coding for Heat-stable Toxin Type I of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:955-961.
12. Woodward, M. J., Carroll, 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.
13. Kado, C. I. and Liu, S. T. 1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *J. Bacteriol.* 45:1365-1373.
14. Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513.
15. Andersen, M. R. and Omiecinski, C. J. 1992. Direct Extraction of Bacterial Plasmids from Food for Polymerase Chain Reaction Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*

58:4080-4082.

16. Godson, G. N. and Vapnek, D. 1973. A Simple Method of Preparing Large Amounts of  $\phi \chi 174$  RF I Supercoiled DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 299 : 516.
17. Ichiyama, S., Ohta, M., Shimokatu, K., Kato, N. and Takenchi, J. 1991. Genomic DNA Fingerprinting by Pulsed Field Gel Electrophoresis as an Epidemiological Marker for Study of Nosocomial Infections Caused by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 29:2690-2695.
18. Patil, R. V. and Dekker, E. E. 1990. PCR Detection of an *Escherichia coli* Gene Using Mixed Primers Containing Deoxyinosine at Ambiguous Positions in Degenerate Amino Acid Codons. *Nucleic. Acid Res.* 18:3080-3083
19. Innis, A. M. and Gelfand, D. H. 1990. Optimization of PCRs Ch. 1. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* ( eds ) .Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. pp.3-12, Academic press, Inc. New York.



# Plasmid Profile Analysis for Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Detection of Heat Stable Enterotoxin I (STI) Gene by Polymerase Chain Reaction

HAU-YANG TSEN\* AND WAN-RONG CHI

*Department of Food Science, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.*

## ABSTRACT

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is one of the food pathogens which may cause diarrhea in humans. The enterotoxins produced by ETEC are heat labile toxins (LT) and heat stable toxins (ST). These pathogenic factors are usually encoded on the plasmid DNA of *E. coli* cells. In

this study, *E. coli* plasmid DNA was isolated and subjected to 0.7% agarose gel electrophoretic analysis and the STI gene was detected by polymerase chain reaction (PCR) using new primers. It was found that most of the plasmids from ETEC cells showed molecular weights in the range of 2-22 kb and the PCR primers used specifically amplified a 203 bp fragment.

**Key words:** Enterotoxigenic *E. coli*, plasmid DNA, heat stable toxin I, PCR.