

ERIC-PCR 和 Sau-PCR 对单增李斯特菌分型稳定性研究

石磊^{1,2}, 赵一鸣^{1,2}, 张志刚², 闫鹤^{1,2}

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

(2. 肉食品安全生产技术国家重点实验室, 厦门银祥集团有限公司, 福建厦门 361100)

摘要: 为了研究肠杆菌间重复序列-聚合酶链式反应 (ERIC-PCR) 和 Sau-PCR 两种现代分子分型方法对单增李斯特菌 (*LM*) 分型的稳定性, 取分离自广州市菜市场、超市及厦门某食品加工厂不同食品来源的 5 株单增李斯特菌进行实验, 分别将这 5 株单增李斯特菌株进行室温放置培养和传代培养, 提取室温放置培养 24 h、48 h、和 72 h 及传代培养至第 5 代、10 代、15 代和 20 代的基因组 DNA, 然后同时进行 ERIC-PCR 和 Sau-PCR 分型, 观察随着放置时间延长及传代次数增加其指纹图谱的变化。结果显示, 5 株单增李斯特菌在室温放置培养及传代培养后除部分条带发生缺失外均未出现条带增加现象, 整体条带变化不大, 两种分型方法的同源性分别在 92% 和 94% 以上, 表明 ERIC-PCR 和 Sau-PCR 两种分型方法在室温放置培养 72 h 和传代培养 20 代内对单增李斯特菌分型相对比较稳定, 具有流行病学意义。

关键词: 单增李斯特菌; 肠杆菌间重复序列-聚合酶链式反应; Sau-PCR; 稳定性

文章编号: 1673-9078(2015)2-14-18

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.003

Stability of ERIC-PCR and Sau-PCR Techniques on *Listeria monocytogenes*

Typing

SHI Lei^{1,2}, ZHAO Yi-ming^{1,2}, ZHANG Zhi-gang², YAN He^{1,2}

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Xiamen Yinxiang Group CO., Ltd, Xiamen 361100, China)

Abstract: To evaluate the stability of enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) and Sau-PCR for typing of *Listeria monocytogenes* (*LM*), five isolates of *LM* from a local vegetable market in Guangzhou and a food processing plant in Xiamen were cultured. DNA was extracted from the cultures incubated at room temperature after 24, 48, and 72 h. In addition, DNA was extracted from the 5th, 10th, 15th, and 20th subcultures. ERIC-PCR and Sau-PCR were then used for typing and changes in fingerprint diagrams with time and increase in the number of generations in subculture were determined. The results indicated that apart from some missing bands, there were no additional bands after room-temperature culture and subculture. However, there were minor changes in the overall band appearance. The homology of ERIC-PCR and Sau-PCR results was higher than 92% and 94%, respectively, indicating that the two typing methods were stable and had epidemiological significance for typing of *LM* cultures incubated for less than 72 h and 20 generations.

Key words: *Listeria monocytogenes*; enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction; Sau-polymerase chain reaction; stability

单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *LM*) 为革兰氏阳性短杆菌, 被世界卫生组织 (WHO) 称为“四大食源性致病菌”之一。其在自然界中分布广泛, 如肉类、蔬菜、奶制品、水产品中都能检测得到, 而且由于能形成生物被膜其适应能力极强, 在食品生产加工及储存期间都能造成污染, 免疫力低下者及孕妇、新生儿、老人误食这些被污染的食品后, 可能会引起流产、脑膜炎、败血症等, 致死率高达 20%~30%^[1-2]。自 1929 年丹麦首次报道单增李斯特病以后其在全世界范围内不断有爆发。因此对 *LM* 分型溯源, 研究其流行规律很有必要。基因分型技术可以通过比较分离自不同环境或病人的菌株间的指纹图谱进行溯源追踪, 最终确定某疫情的感染源。对单增李斯特菌 (*LM*) 的分型包括传统表型和现代分子分型两大类。传统表型中最常见的是血清分型和噬菌体分型等, 操作简单但分辨力不高且重复性差, 后者是在基因的基础上从遗传学角度进行分型, 分辨力高且重复性好, 主要包

收稿日期: 2014-07-09

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31201363); 广东省自然科学基金 (10451064101005159)

作者简介: 石磊 (1961-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 生物技术与食品安全

括随机引物扩增 (RAPD)、肠杆菌间重复序列 (ERIC-PCR)、多位点序列 (MLST)、脉冲场凝胶电泳 (PFGE)、Sau-PCR 等。然而对致病菌暴发流行的监测常常需要跨越一定的时间,有时还需要不同地区不同实验室之间的分工合作,因此对分型技术的稳定性就提出了要求。分型技术的稳定性是指在菌株的表象或基因发生变化时,分型结果仍然能够很好的解释菌株间的遗传关系或距离,可以分辨出菌株间的不同带型^[3-4]是由于单一菌株短时间内的微小变化引起的还是不相关菌株。菌株表象或基因的改变可能发生在实验室储存或培养期间,或者是菌株在自然界散播时,尤其是放置时间或传代培养增加时。如果分型技术不稳定,那么就不能很好的解释菌株间的流行病学关系,很可能会得到错误的流行病学信息,溯源也会失败,因此分型方法的稳定性显得尤为重要。

1996年,Jersek^[5]首次将ERIC-PCR技术应用到李斯特菌属的鉴定与分型中,获得较好的结果;Sau-PCR则是由Corich和Mattiuzzi在2005年发明的一种全新的分子分型技术,后来被陆续应用到单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌及副溶血弧菌^[6-8]等细菌中,均显示出良好的可分型性和重复性,然而这两种分型方法对单增李斯特菌的稳定性却没有研究过。本文将从广州市和厦门市分离到的5株不同食物来源的LM分别进行室温放置培养和传代培养,提取室温放置24h、48h、和72h及传代培养至第5代、10代、15代和20代的基因组DNA,然后用ERIC-PCR和Sau-PCR两种方法分别进行分型,探讨室温放置培养和传代培养对LM基因型的影响,研究其对LM分型的稳定性。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

5株单增李斯特菌分离自不同采样地点、不同食物来源,分别为广州市菜市场、超市及厦门某食品加工工厂,分离时间从2012年8月至12月。

表1 菌株信息

Table 1 The five LM strains used in this study

菌株编号	采样地点	菌株来源	采样时间	血清型
LM1	广州菜市场一	牛肉丸	2012-8-10	1/2b、3b
LM2	广州菜市场二	排骨	2012-9-11	1/2a、3a
LM3	广州超市一	夹心肉	2012-9-22	1/2c、3c
LM4	广州超市二	猪肉馅	2012-10-20	1/2b、3b
LM5	厦门	瘦肉	2012-12-17	1/2a、3a

1.2 实验仪器和试剂

微量离心机、PCR仪, Thermo公司; 紫外分光光度计、核酸电泳仪、凝胶成像系统, Bio-Rad公司; 恒温水浴锅, 北京市光明医疗仪器厂; 限制性内切酶Sau3AI、Taq polymerase, 2000 bp、5000 bp maker, 电泳级琼脂糖, Takara公司; 脑-心浸取液 (BHI), 广东环凯微生物有限公司; 提DNA试剂盒, 上海生工。

1.3 实验方法

1.3.1 室温放置培养

分别将5株LM菌株接种在BHI培养基上, 放置在室内, 注意远离阳光直射和辐射源, 然后分别提取连续培养24 h、48 h和72 h的基因组DNA, 按照提DNA试剂盒说明书进行操作。提取的DNA于-20℃保存, 用于后续的ERIC-PCR和Sau-PCR分型实验。

1.3.2 传代培养

分别将5株LM菌株接种在BHI培养基上, 37℃进行传代培养。每24 h挑取单菌落到新的培养基上, 记为一代, 分别提取第5代、10代、15代和20代的基因组DNA, 方法同上。

1.3.3 ERIC-PCR 分子分型

所用引物参照Jersek^[5]等。Eric-1: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3', Eric-2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3', 由上海英潍捷基贸易有限公司合成。

PCR扩增体系为: 10×PCR buffer 2.5 μL (pH=8.3); dNTP Mixture (2.5 mM) 2.0 μL、上下引物 (10 μM) 各 2.0 μL、rTaq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL、DNA模板 35 ng, 然后加超纯水至体积为 25 μL。

PCR扩增程序为: 95℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 50℃30 s, 52℃1 min, 72℃延伸1 min, 共循环35次; 最后72℃8 min。

1.3.4 Sau-PCR 分子分型

1.3.4.1 Sau3AI 酶切消化基因组DNA

根据说明书, 在每支pcr管中依次加入约200 ng DNA, 2 μL 10×H buffer缓冲液, 1 μL限制性内切酶Sau3AI, 最后加无菌双蒸水至终体积20 μL, 以上成分混合均匀后, 37℃恒温水浴5 h, 进行基因组DNA酶切消化, 并于-20℃保存备用。

1.3.4.2 PCR扩增

参考相关文献^[9], 选择引物SGAG:CCGCCGCG-GATC-GAG, 退火温度为52℃。

PCR扩增体系为: 10×PCR buffer (已含有Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP Mixture (2.5 mM) 2 μL, 引物 (10 μM) 2.5 μL, 酶切产物 2 μL, rTaq DNA聚合酶 (5 U/μL) 0.125 μL, 加无菌双蒸水至终体积25 μL。

PCR 扩增程序参照文献^[9]共经过三个阶段, 分别为: 填补粘性末端、低严谨性扩增、高严谨性扩增。

1.3.5 产物分析

分别将两种分型方法的产物进行琼脂糖凝胶电泳, 浓度为1.5%, 其中ERIC-PCR所用maker为5000 bp, Sau-PCR为2000 bp, 电泳条件为100 v, 时间约30 min, 经EB染色清水漂洗后, 用Bio-Rad凝胶成像系统进行照胶, 然后使用Quality one 软件采用非加权配对算术平均法 (UPGMA) 做遗传分析的树状图。

2 结果与讨论

2.1 室温放置和传代培养的 ERIC-PCR 分型结果

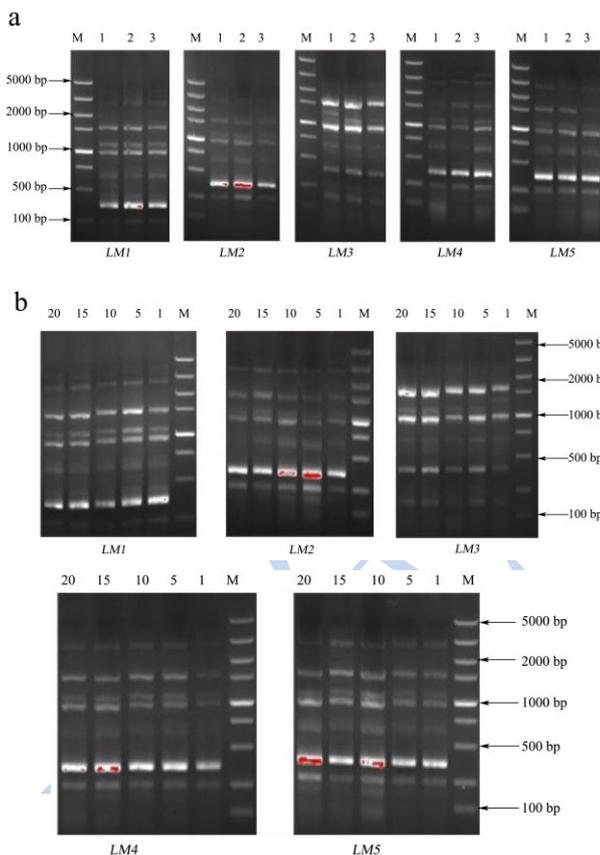


图 1 5 株 LM 在室温放置条件下的 ERIC-PCR 指纹图

Fig.1 ERIC-PCR banding patterns of five LM strains

注: 1、2、3 分别代表培养 24 h、48 h 和 72 h (a); 5 株 LM 在传代培养 20 代、15 代、10 代、5 代及原代时的 ERIC-PCR 指纹图谱 (b)。

据图 1 可见, ERIC-PCR 对 5 株 LM 进行分型时, 每个菌株产生 7~9 条带, 分辨力良好。在室温放置培养下, 由图 1a 可见, LM 3 在培养 72 h 时在 1000~1500 bp 之间有一个条带的缺失, 而其他菌株在 72 h 内除了浓

度、亮度的微小改变外条带几乎没有改变。在传代培养条件下, 由图 1b 可见, LM 2 菌株在传到 20 代时在 500~750 bp 之间有一个条带的缺失, LM 3 在传至 15 代和 20 代时在 1000~1500 bp 之间都有一个条带的缺失, 其他菌株在传代 20 代内, 除了浓度变化未出现条带增加或缺失现象。用 Quantity One 软件对指纹图谱做非加权算术平均组对法 (UPGMA) 分析, 由图 2 可见, 5 株 LM 菌株的同源性均在 92% 以上。如果取 85% 进行聚类分析, 菌株在室温放置 72 h 及传代培养 20 代内仍为同一个基因型, 是相关菌株, 说明 ERIC-PCR 对 LM 在此种条件下分型都是比较稳定的。

而对于随着培养时间延长及传代次数增加条带浓度的变化, 可能是因为 ERIC-PCR 在低严谨性的退火温度进行扩增时, 会造成引物与模板结合时出现碱基错配, 引物相对模板浓度的改变, 在指纹图谱上就表现出一些条带亮度即浓度的改变。

Hyunseok peter Kang^[10]等研究了 ERIC-PCR 对包括革兰氏阴性菌和阳性菌在内的粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、鲍氏菌六种菌分型的稳定性, 结果表明在室温培养 72 h 和传代培养 15 代内, 菌株的条带都是极其相似的, 六种菌株的同源性都在 90% 以上。王秋艳^[11]等在对 1 株志贺菌进行 ERIC-PCR 稳定性研究时发现其对室温放置 30 天内的稳定性为 73%, 在传代培养 30 代内的同源性为 75%, 相比本实验结果偏低, 这可能是由于志贺菌室温放置时间较长、传代培养代数增加的原因。

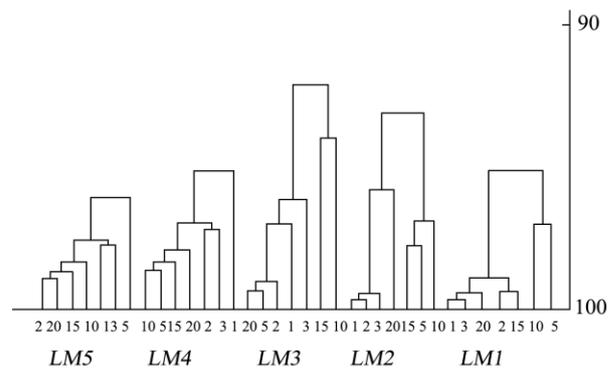


图 2 5 LM 菌株的 ERIC-PCR 聚类分析树谱图

Fig.2 Individual ERIC-PCR dendrograms of five LM strains

注: 1、2、3 分别代表室温放置培养 24 h、48 h 和 72 h; 5、10、15、20 分别代表传代培养代数。

2.2 室温放置和传代培养的 Sau-PCR 分型结果

据图 3 可见, 每个菌株产生 7~10 条带, 说明可用 Sau-PCR 对 LM 进行很好的分型。在室温放置培养下,

由图3a可见, LM 2在培养72h时在100~500 bp之间有两个条带的缺失, 而其他菌株在72 h内条带几乎没有改变。在传代培养条件下, 由图3b可见, LM 2菌株在传到20代时在250~500 bp之间有一个条带的缺失, LM 5传至20代时在250~500 bp之间有两个条带的缺失, 这可能是由于随着培养时间的增长, LM的基因组DNA发生了一些退化。其他菌株在传代20代内, 除了浓度变化未出现条带增加或缺失现象, 分型结果相当稳定。用Quantity One软件对指纹图谱做非加权算术平均组对法(UPGMA)分析, 由图4我们也能得到这样的信息, 5株LM菌株的同源性均在94%以上。说明此分型方法在室温放置72 h以及传20代内, 仍为同一个基因型, 具有流行病学意义。

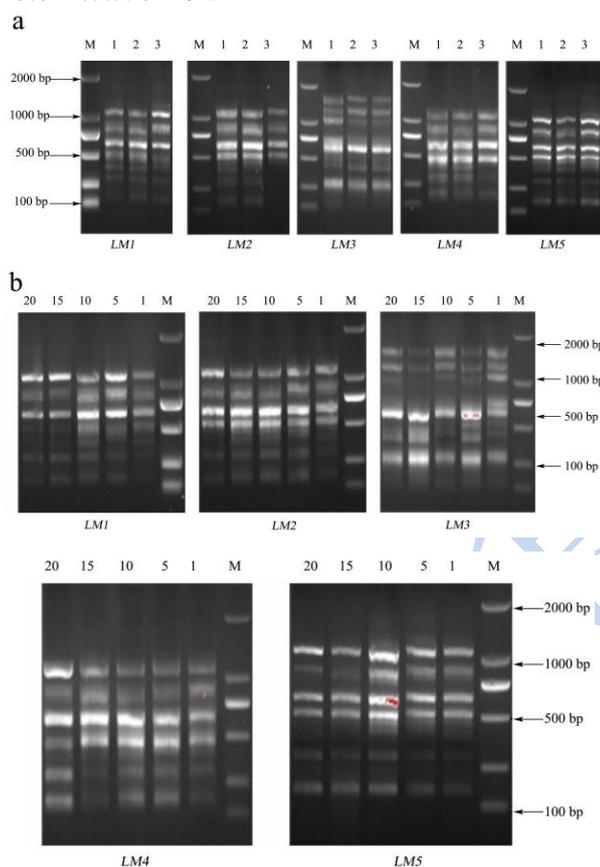


图3 5株 LM在室温放置条件下的 Sau-PCR 指纹图

Fig.3 Sau-PCR banding patterns of five LM strains

注: 1、2、3分别代表培养24 h、48 h和72 h (a); 5株LM在传代培养20代、15代、10代、5代及原代时的Sau-PCR指纹图谱 (b)。

王秋艳^[11]等在2010年第一次研究了Sau-PCR对志贺菌的稳定性, 发现志贺菌在传至20代时基因型几乎没有变化, 同源性为100%, 相比本实验较高, 这可能是由于她只取了一株菌, 样本偏少的原因, 在传至30代和放置30 d时菌株的带型有所变化, 但同源性仍高

达94%。

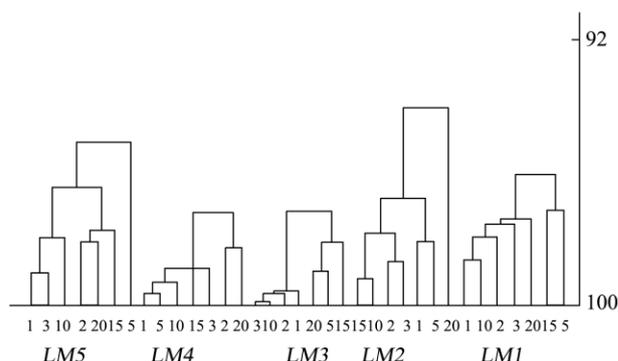


图4 LM菌株的 Sau-PCR 聚类分析树谱图

Fig.4 Individual Sau-PCR dendrograms of five LM strains

注: 1、2、3分别代表室温放置培养24 h、48 h和72 h; 5、10、15、20分别代表传代培养代数。

3 结论

3.1 ERIC-PCR和Sau-PCR两种分子分型方法曾被广泛应用于包括单增李斯特菌在内的各种细菌中^[12-14], 而且都表现出较强的分型能力和溯源性。如Bang-Yuan Chen^[15]等将从鲢鱼表面、内脏、鱼头及生产车间的不同环节分离到的LM用ERIC-PCR分型, 发现鲢鱼的污染主要来自于生产过程而不是鱼本身; 毕水莲、石磊^[8]等用Sau-PCR对广州市一起由副溶血弧菌引起的食物中毒事件进行分型, 发现从病人身上分离到的1株副溶血弧菌与从食物中分离到的2株指纹图谱相同, 从而找到了食物中毒的来源。

3.2 关于ERIC-PCR和Sau-PCR两种分子分型方法对单增李斯特菌的稳定性此前尚未有文献报导, 因此本实验取分离自广州、厦门两个地区不同食物来源的5株LM菌株做了稳定性研究。结果发现在室温放置培养72 h及传代培养20代内, ERIC-PCR和Sau-PCR对单增李斯特菌的同源性分别在92%和94%以上, 后者的稳定性较高可能是因为Sau-PCR技术是基于酶切, 如果基因变异的发生(如点突变或基因重组)不在限制性内切酶的酶切位点上, 或者是插入或缺失的基因片段很小, 在跑胶时不影响迁移速率, 那么也不会表现出肉眼可观测到的带型变化。

3.3 分型技术的稳定性能够保证不同地区、不同实验室之间以及跨度一定的时间段时分型的结果可以有效地进行交流和比较, 这对追踪污染源、阻止流行病大范围的爆发很重要。本实验结果表明ERIC-PCR和Sau-PCR对单增李斯特菌在室温放置培养72 h及传代培养20代内为同一基因型, 分型结果稳定。但如果时间和传代次数增加其对LM稳定性是否会发生变化还

需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Norton D M, Braden C R. Food-borne listeriosis. [M]. Boca Raton: CRC Press, 2007
- [2] 石磊,王文燕,闫鹤.猪肉中单核细胞增生李斯特菌的分离与耐药性研究[J].现代食品科技,2013,29(12):2826-2829
SHI Lei, WANG Wen-yan, YAN He. Isolation and antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* in pork [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(12): 2826-2829
- [3] Nielsen E M, Engberg J, Fussing V. Genotypic and serotypic stability of *Campylobacter jejuni* strains during in vitro and in vivo passage [J]. Int. J. Med. Microbiol., 2001, 291(5): 379-385
- [4] On S L. *In vitro* genotypic variation of *Campylobacter coli* documented by pulsed-field gel electrophoretic DNA profiling: implications for epidemiological studies [J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 165(2): 341-346
- [5] B Jersek, P Gilot, M Gubina. Typing of *Listeria monocytogenes* Strains by repetitive element sequence-based PCR [J]. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1999, 37(1): 103-109
- [6] Cocolin L, Stella S, Nappi R, et al. Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources [J]. Int. J. Food Microbiol., 2005, 103(2): 167-178
- [7] Iacumin L, Comi G, Cantoni C, et al. Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from naturally fermented Italian sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis [J]. Meat Sci., 2006, 74(2): 281-288
- [8] 毕水莲,李琳,张学武,等.Sau-PCR和AILP技术对一起副溶血弧菌引起食物中毒的分型研究[J].食品工业科技, 2009, 30(8):158-161
BI Shui-lian, LI lin, ZHANG Xue-wu, et al. Genotyping methrio Parahaemolyticus from an outbreak of food poisoning by Sau-PCR and AILP [J]. Science and Techology of Food Industry, 2009, 30(8): 158-161
- [9] Corich V, Mattiazzi A, Soldatie, et al. Sau-PCR, a novel amplification technique for genetic fingerprinting of microorganisms [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71(10): 6401-6406
- [10] Hyunseok peter Kang. Stability of repetitive-sequence PCR patterns to with Respect to culture age and subculture frequency[J].Journal of Clinical Mircobiology, 2003, 41(6), 2694-2696
- [11] 王秋艳.三种基因分型技术在病原微生物溯源方面的应用 [D].广州:华南理工大学,2010
Wang Qiu yan. Comparative study of three different genotyping methods in library pathogenic microbial source tracking [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010
- [12] BurrM D, Josephson K, L Pepper I L. An evaluation of ERIC-PCR and AP-PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes [J]. Letters in Applied Microbiology, 1998, 27(1):24-30
- [13] 郑扬云,吴清平,吴克刚,等.空肠弯曲菌分离株ERIC-PCR分型和生化分型的比较研究[J].现代食品科技, 2013, 29(8): 1843-1846
ZHENG Yang-yun, WU Qing-ping, WU Ke-gang, et al. Comparison of the Typing Methods of ERIC-PCR and Biochemical for *Campylobacter jejuni* Isolates [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 1843-1846
- [14] 王君,吴清平,吴克刚,等.蜡样芽孢杆菌ERIC-PCR分子分型方法的建立[J].现代食品科技,2013,29(7):1696-1701
WANG Jun, WU Qing-ping, WU Ke-gang, et al. Establishment of ERIC-PCR Molecular Typing Method for *Bacillus cereus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1696-1701
- [15] Bang-Yuan Chen.Prevalence and containmination patterns of listeria monocytone in catfish processing environment and fresh fillets [J]. Food Microbiology, 2010, 2(27): 645-652