

不同培养基及培养条件对单增李斯特菌 ERIC-PCR 分子分型的影响

赵晨晖, 丁承超, 刘箐

(上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要: 本研究以实验室保存的 26 株李斯特氏菌为实验对象, 通过 ERIC-PCR 和凝胶电泳技术对其展开基因分型, 并根据分型结果选取不同亚型菌株, 进而考虑改变细菌培养条件来探究不同培养基对李斯特菌 ERIC-PCR 分子分型结果的影响。实验结果初步表明, 实验室 26 株李斯特菌至少可分成 11 个主要基因类群, 其中 I 型菌株最多占有 8 株, 而 III、VII、VIII、IX、X 以及 XI 型均最少, 各占 1 株; 同时发现, 培养基及培养条件的改变会对 LM87、LM109 (野生型单增李斯特菌) 分型结果产生影响, 且这些菌株分型均最少。由此推断, 不同的营养机制和培养条件可能会对李斯特菌的基因组稳定性或基因表达带来潜在影响, 因此无论是在对 LM 致病机理的基础研究过程中还是对其进行分子分型鉴定, 都必须考虑其寄主来源以及培养条件。

关键词: 培养基; 单核细胞增生性李斯特菌; ERIC-PCR; 分子分型

文章篇号: 1673-9078(2017)5-115-120

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.019

Influence of Different Medium Conditions on Molecular Typing of *Listeria monocytogenes* by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR

ZHAO Chen-hui, DING Cheng-chao, LIU Qing

(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: Twenty-six strains of *Listeria* spp. stored in the laboratory were used as the experimental object here, and the enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) and gel electrophoresis techniques were applied to genotyping. Furthermore, according to the typing results, strains of different subtypes were selected, and the effects of different medium conditions on the results of ERIC-PCR molecular typing of *Listeria* spp. were explored by changing the culture conditions. The preliminary test results showed that 26 strains of *Listeria* spp. in the laboratory could be subdivided into at least 11 genotypes, and the number of the strains belonging to genotype I was the highest, whereas the numbers of strains belonging to genotypes III, VII, VIII, IX, X, and XI were the lowest. In addition, the results revealed that the changes in medium and culture conditions affected the typing results of LM89 and LM109 (wild-type *Listeria monocytogenes*), which belong to the genotypes with the lowest number of strains. From this preliminary study, it can be concluded that different nutritional conditions and culture conditions may have an impact on the genomic stability or gene expression of *Listeria* spp. Therefore, the host source and culture conditions must be taken into account during basic research on *L. monocytogenes* pathogenicity and its molecular typing.

Key words: medium; *Listeria monocytogenes*; enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction; molecular typing

单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种最常见的食源性致病菌^[1], 它在自然界中分布广泛^[2], 在绝大多数食品中也都有其踪迹^[3], 并能引起人畜共患性李斯特菌病^[4]。根据李

收稿日期: 2016-07-12

基金项目: “科技创新行动计划”长三角科技联合攻关领域项目 (15395810900); 上海市科委高校能力建设项目 (13430502400)

作者简介: 赵晨晖 (1992-), 男, 本科生, 研究方向: 食品质量与安全

通讯作者: 刘箐 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食源性致病菌致病机理及控制研究

斯特菌具有特定表面抗原这一特性, 再通过凝集反应^[5], LM 至少被分成了 13 种血清型^[6], 因而, 目前对 LM 流行病学调查仍以血清分型等传统免疫学分型技术为主^[7]。但随着分子生物学技术的日新月异, 细菌分子分型的日渐普及并表现出相当的优势, 相比之下普通的血清分型技术存在分辨力相对粗放、受现有商业鉴定血清限制、对新发生的血清型无法准确分型等问题^[8-10], 已不能满足常规研究需求。分子分型是一种新兴的流行病学调查技术, 它不仅克服了血清分型等传统方法的不足, 还能从遗传的角度对其可能存在

的规律性进行探讨。其中,基于肠杆菌基因间高度保守重复序列(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)的ERIC-PCR分子分型技术尤为常见^[11]。与普通PCR不同的是,ERIC-PCR电泳图谱能够反映出各类致病菌整个基因组的组成,具有分辨率高、稳定、重复性好等特点^[12]。并且,利用ERIC-PCR技术能对致病菌进行基因组多态性分析,可用于致病菌基因分型、致病菌耐药谱与基因型之间的关系研究、流行病学调查和传染源追踪等^[13]。

本研究采用ERIC-PCR技术先对实验室内保存的26株李斯特菌进行基因分型,随后根据分型结果,用三种不同的李斯特菌培养基对各个不同亚型的菌体进行传代培养,提取其基因组DNA后,再次进行ERIC-PCR扩增。通过建立每种LM在不同培养基及

培养条件下的DNA指纹图谱,并进行比对,初步研究培养基及培养条件对细菌基因组ERIC序列稳定性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株,本研究共采用26株李斯特菌进行实验,菌株来源自美国模式培养物保藏所(ATCC)、中国医学细菌菌种保藏管理中心(CMCC)、中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)以及本实验室自行分离得到(野生型),四种不同途径获得的菌株均由本实验室保存,详表1。

表1 本实验所用李斯特菌株

Table 1 *Listeria* strains used in this study

实验室编号	菌株	标准编号/来源
LM5	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 43251
LM6	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 13932
LM7	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 19112
LM8	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 19114
LM9	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 19116
LM10	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 19117
LM11	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 19115
LM33	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	CMCC 54002
LM41	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	CICC 21633
LM43	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	野生型(单腿,马鞍山疾控编号)
LM44	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	野生型(蟑螂,马鞍山疾控编号)
LM85	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	野生型(国京菜场鸡爪)
LM86	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	野生型(连阴菜场鸡腿)
LM87	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	野生型(引翔港菜场鸡翅)
LM88	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	野生型(凤城菜场鸡爪)
LM89	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	野生型(国太菜场鸡爪)
LM90	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	野生型(双辽菜场鸡翅)
LM91	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	野生型(国太菜场鸡腿)
LM92	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	野生型(心诚菜场鸡胗)
LM94	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	野生型(阜新菜场鸡翅)
LM95	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	野生型(扬州菜场鸡翅)
LM109	单增李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	野生型(HS2014026)
英 111	英诺克李斯特菌 (<i>Listeria innocua</i>)	CICC 10297
伊 112	伊氏李斯特菌 (<i>Listeria ivanovii</i>)	CICC 21663
格 113	格式李斯特菌 (<i>Listeria grayi</i>)	CICC 21670
威 114	威氏李斯特菌 (<i>Listeria weshimeri</i>)	CICC 21672

脑心浸出液肉汤培养基(BHI)、李氏增菌肉汤基础培养基(LB)、李斯特氏菌显色培养基、琼脂粉均

购自北京陆桥技术有限责任公司;细菌基因组提取试剂盒,购自博日科技生物有限责任公司;扩增缓冲液

(10×Buffer)、脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP)、LA Taq DNA 聚合酶 (LA Taq Polymerase) 等均购自生工生物工程股份有限公司。

1.2 仪器与设备

LRH-70 生化恒温培养箱购自上海一恒科技有限公司; G560E 振荡器购自上海凡劲仪器设备有限公司; Gene Amp® PCR system 9700、凝胶成像系统均购自基因有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌 DNA 提取

取于 -80 °C、20% 甘油保存的 26 株菌种, 接种于 BHI 营养肉汤中并置于 37 °C 摇床中复苏; 之后划线接种于 BHI 琼脂平板上 (四区划线分离法), 完毕后用封口带密封培养皿, 并倒置于 37 °C 的恒温培养箱中培养 24 h。分别挑取单菌落, 接种于 BHI 液体培养基中, 37 °C 增菌 24 h, 使用生工生物细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 并按试剂盒内说明书提取 DNA。完毕后, 使用移液枪移取 2 μL 提取的李斯特菌 DNA 液于微量生化测定仪 (NanoDrop 2000c) 上, 以试剂盒内 TE 缓冲液为空白样, 入样测定其浓度及 OD_{260/280} 值。

1.3.2 ERIC-PCR 扩增方法

所用引物参照 Jersek 等^[14]对李斯特菌分型稳定性研究设计, 正向引物 Eric-1: ATGTAAGCTCCTGGGG ATTACAC, 反向引物 Eric-2: AAGTAAGTGACTGG GGTGAGCG, 均由生工生物工程股份有限公司合成。

PCR 反应体系的总体积为 25 μL, 其中 10×LA PCR Buffer II 2.5 μL, dNTP Mixture(2.5 mM) 2 μL, LA Taq DNA Polymerase (5 U/μL) 0.25 μL, 引物 ERIC-1 (100 μM) 2 μL; ERIC-2 (100 μM) 2 μL, ddH₂O 13.25 μL, 最后菌体 DNA 模板 3 μL。混匀后放入 Gene Amp® PCR system 9700 内进行扩增。

PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 3 s, 92 °C 继续变性 30 s, 50 °C 退火 1 min, 65 °C 延伸 5 min, 共循环 30 次; 最后 65 °C 保温 10 min。PCR 扩增产物电泳条件: 1.5% 琼脂糖凝胶; 电压 120 V; 时间 40 min。

1.3.3 ERIC-PCR 分型方法

经凝胶成像仪拍照后, 使用 Gel-Pro analyzer 4.0 凝胶定量分析软件中的“泳道分析”和“DNA 分析”进行扩增泳带分析, 得到分子量计算结果表, 并将该表中的数值采用有或无的方法, 以“1”和“0”的方式记录汇总在 Excel 表格中。即如果当样品的扩增带存在时赋值为“1”, 不存在时赋值为“0”。最后, 通过

NTsys2.10e 软件进行分析, 得到 Jaccard 的遗传相似性系数矩阵和遗传距离矩阵, 采用非加权配对法 (UPGMA 法) 做遗传分析的聚类树状图。凡相似度大于 0.84 者为同一亚型, 小于 0.84 者为不同的基因型^[15]。

1.3.4 不同培养条件下单增李斯特菌的 ERIC-PCR 图谱建立

根据初步基因分型结果, 在无菌操作条件下挑取各菌株单菌落, 分别接种于国标李氏 I 液 (LB₁) 培养基、李氏 II 液 (LB₂) 培养基以及 BHI 培养基中。各培养 3 代后, 提取细菌 DNA 组、ERIC-PCR 扩增以及进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3.5 验证实验

为验证电泳结果的可靠性, 对改变培养基后图谱产生变化的菌株于李斯特菌显色培养基上划线鉴定, 以确保该菌没有被污染。之后继续将该菌株分别以 BHI、LB₁ 和 LB₂ 营养肉汤为增菌液在 37 °C 摇床中培养 24 h (培养至第四代), 并再次按照上述方法进行实验, 结束后取出琼脂糖凝胶, 在凝胶成像仪上观察最终结果。

2 结果与讨论

2.1 26 株菌种 ERIC-PCR 分型

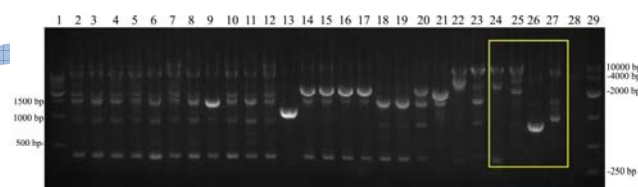


图1 李斯特菌 Eric-PCR 指纹图谱

Fig.1 ERIC-PCR fingerprints of *Listeria* strains

注: 上图从左至右依次为 1 号泳道: DL5000 Marker; 2 号泳道: LM5 (ATCC 43251); 3 号泳道: LM6 (ATCC 13932); 4 号泳道: LM11 (ATCC 19115); 5 号泳道: LM92 (野生型); 6 号泳道: LM43 (野生型); 7 号泳道: LM90 (野生型); 8 号泳道: LM91 (野生型); 9 号泳道: LM85 (野生型); 10 号泳道: LM33 (CMCC 54002); 11 号泳道: LM41 (CICC 21633); 12 号泳道: LM95 (野生型); 13 号泳道: LM87 (野生型); 14 号泳道: LM10 (ATCC 19117); 15 号泳道: LM7 (ATCC 19112); 16 号泳道: LM89 (野生型); 17 号泳道: LM88 (野生型); 18 号泳道: LM86 (野生型); 19 号泳道: LM44 (野生型); 20 号泳道: LM8 (ATCC 19114); 21 号泳道: LM94 (野生型); 22 号泳道: LM109 (野生型); 23 号泳道: LM9 (ATCC 19116); 24 号泳道: 111 英诺克李斯特菌 CICC 10297; 25 号泳道: 112 伊氏李斯特菌 CICC 21663; 26 号泳道: 113 格式李斯

特菌 CICC 21670; 27 号泳道: 114 威氏李斯特菌 CICC 21672; 28 号泳道: 阴性对照; 29 号泳道: DL10000 Marker。

实验结果证明,来自不同途径的 26 株李斯特菌经过 ERIC-PCR 扩增后,得到多种不同类型的 DNA 指纹图谱。从图 1 中可见,每个编号菌株其 ERIC-PCR 扩增产物均能达 2~8 条带,另外,绝大多数单增李斯特菌均可扩增得到 1500 bp 左右的 DNA 条带,其中 24~27 号泳道 4 株李斯特菌(111 号英诺克李斯特菌 CICC 10297、112 号伊氏李斯特菌 CICC 21663、113 号格式李斯特菌 CICC 21670 以及 114 号威氏李斯特菌 CICC 21672)指纹图谱带型则差异较大,呈现出明显的 DNA 多态性。

2.2 26 株菌种指纹图谱聚类分析

聚类分析结果表明,26 株李斯特菌分成了至少 11 个不同的基因类群,在图右侧分别标记为 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X 以及 XI 型。其中 I 型菌株最多占有 8 株,其余依次为 V 型为 4 株,II 型和 VI 型各占有 3 株,IV 型为 2 株;而 III、VII、VIII、IX、X 以及 XI 型均最少,仅各占 1 株。如图 2。

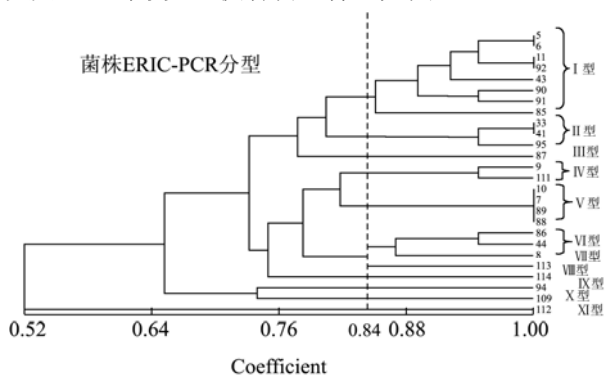


图 2 26 株李斯特菌指纹图谱聚类分型图

Fig.2 A dendrogram based on UPGMA cluster analysis of ERIC-PCR data from the 26 *Listeria* strains

由图 2 可知,菌株实验室编号为 LM5 和 LM6, LM11 和 LM92, LM33 和 LM41, LM10、LM7、LM89 和 LM88, 这些可能为同一亚型菌株。以聚类分析结果最小相似度 0.52 为分型基准可见,与 LM5 有超过 50% 相似度的菌株占 26 株中的绝大多数,而仅有 112 号伊氏李斯特菌(CICC 21663)具有独立的 ERIC-PCR 分子分型。因此,除了选出伊氏以及英、格、威这四株无害李斯特氏菌外,再从剩余几组相同分型结果各选出一株,即最终确定:英 111 (ATCC 19114)、伊 112(CICC 21663)、格 113(CICC 21670)、威 114(CICC 21672)、LM6 (ATCC 13932)、LM33 (CMCC 54002)、LM87、LM10 (ATCC 19117)、LM86、LM94 以及 LM109,共 11 株菌株分别代表 11 个不同的基因类群,

研究不同培养基对其基因组间特定重复序列 (ERIC) 的影响。

2.3 培养基条件对李斯特菌 ERIC-PCR 分型结果的影响

对经传代培养后的 11 株李斯特菌进行第二次 ERIC-PCR 实验,结果显示,LM6 (ATCC 13932)、LM10 (ATCC 19117)、LM33 (CMCC 54002)、LM86、111 号英诺克李斯特菌 (ATCC 19114)、112 号伊氏李斯特菌 (CICC 21663)、113 号格式李斯特菌 (CICC 21670) 以及 114 号威氏李斯特菌 (CICC 21672), 这些菌株并没有由于培养基条件的改变而发生 ERIC-PCR 分子分型的变化。但其中,14~16 号泳道经 LB₂ 培养的 87 号 LM 出现了明显不同于该菌在 BHI、LB₁ 中培养后扩增的结果; 20~22 号泳道经 LB₁ 培养的 109 号 LM 也有区别于该菌在 BHI、LB₂ 中培养后扩增的结果; 此外,17~19 号泳道经 LB₂ 培养的 94 号 LM 仅在 2000 bp 处扩增出了一个条带,可能存在不完全扩增的情况。因此,考虑对 LM87、LM94 以及 LM109 进行第三次 ERIC-PCR 实验,以确定培养基条件的改变是否会对其基因分型结果产生影响。如图 3~4。

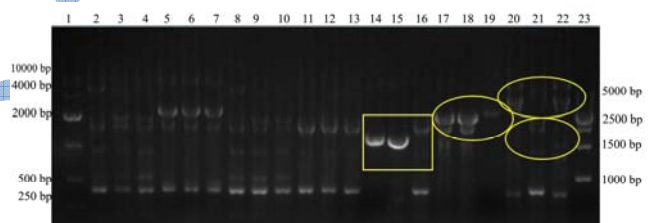


图 3 在不同培养基中李斯特菌 Eric-PCR 指纹图谱

Fig.3 Eric-PCR fingerprints of *Listeria* strains in different media

注: 上图从左至右依次为 1 号泳道: DL10000 Marker; 2 号泳道: LM6 (ATCC 13932)-BHI 平板; 3 号泳道: LM6 (ATCC 13932)-LB₁ 平板; 4 号泳道: LM6 (ATCC 13932)-LB₂ 平板; 5 号泳道: LM10 (ATCC 19117)-BHI 平板; 6 号泳道: LM10 (ATCC 19117)-LB₁ 平板; 7 号泳道: LM10 (ATCC 19117)-LB₂ 平板; 8 号泳道: LM33 (CMCC 54002)-BHI 平板; 9 号泳道: LM33 (CMCC 54002)-LB₁ 平板; 10 号泳道: LM33 (CMCC 54002)-LB₂ 平板; 11 号泳道: LM86 (野生型)-BHI 平板; 12 号泳道: LM86 (野生型)-LB₁ 平板; 13 号泳道: LM86 (野生型)-LB₂ 平板; 14 号泳道: LM87 (野生型)-BHI 平板; 15 号泳道: LM87 (野生型)-LB₁ 平板; 16 号泳道: LM87 (野生型)-LB₂ 平板; 17 号泳道: LM94 (野生型)-BHI 平板; 18 号泳道: LM94 (野生型)-LB₁ 平板; 19 号泳道: LM94 (野生

型)-LB₂ 平板; 20 号泳道: LM109 (野生型)-BHI 平板; 21 号泳道: LM109 (野生型)-LB₁ 平板; 22 号泳道: LM109 (野生型)-LB₂ 平板; 23 号泳道: DL500 Marker。

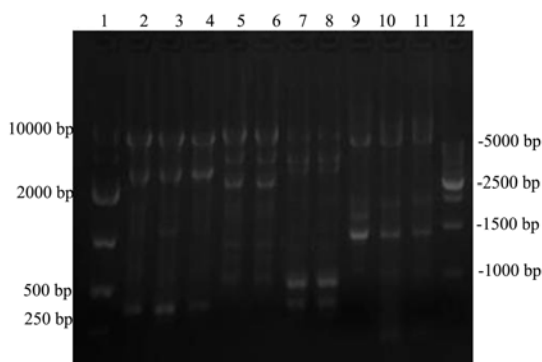


图4 在不同培养基中李斯特菌 Eric-PCR 指纹图谱

Fig.4 Eric-PCR fingerprints of *Listeria* strains in different media

注: 上图从左至右依次为 1 号泳道: DL10000 Marker; 2 号泳道: 111 英诺克李斯特菌 (CICC 10297) -BHI 平板; 3 号泳道: 111 英诺克李斯特菌 (CICC 10297) -LB₁ 平板; 4 号泳道: 111 英诺克李斯特菌 (CICC 10297) -LB₂ 平板; 5 号泳道: 112 伊氏李斯特菌 (CICC 21663) -BHI 平板; 6 号泳道: 112 伊氏李斯特菌 (CICC 21663) -LB₁ 平板; 7 号泳道: 113 格式李斯特菌 (CICC 21670) -BHI 平板; 8 号泳道: 113 格式李斯特菌 (CICC 21670) -LB₂ 平板; 9 号泳道: 114 威氏李斯特菌 (CICC 21672)-BHI 平板; 10 号泳道: 114 威氏李斯特菌 (CICC 21672) -LB₁ 平板; 11 号泳道: 114 威氏李斯特菌 (CICC 21672) -LB₂ 平板; 12 号泳道: DL500 Marker。

2.4 验证实验结果 (第三次 ERIC-PCR 扩增)

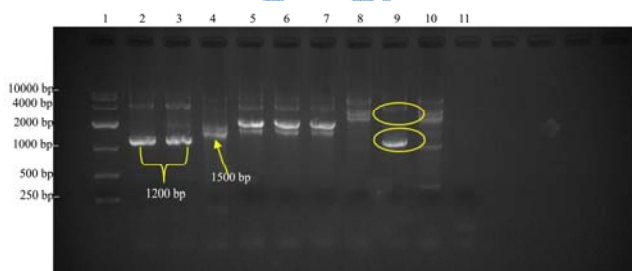


图5 单增李斯特菌 Eric-PCR 指纹验证图谱

Fig.5 Eric-PCR fingerprints of *L. monocytogenes* strains in the confirmatory experiment

注: 上图泳道从左至右依次为 1 号泳道: DL10000 Marker; 2 号泳道: 野生型 LM87 培养于 BHI; 3 号泳道: 野生型 LM87 培养于 LB₁; 4 号泳道: 野生型 LM87 培养于 LB₂; 5 号泳道: 野生型 LM94 培养于 BHI; 6 号泳道: 野生型 LM94 培养于 LB₁; 7 号泳道: 野生型 LM94 培养于 LB₂; 8 号泳道: 野生型 LM109 培养于 BHI; 9 号泳道: 野生型 LM109 培养于 LB₁; 10 号泳道: 野生型 LM109 培养于 LB₂; 11 号泳道: 阴性对照样。

如图 5, ERIC-PCR 最终结果显示: BHI、国标 LB₁、LB₂ 三种不同培养基均对 LM94 扩增结果无显著差异, 但其对 LM87 和 LM109 扩增结果与第二次 ERIC-PCR 实验结果相似, 扩增出的 DNA 图谱间仍存在一定差异性。

其中对 LM87 扩增结果可以从图 2~4 看出, 4 号泳道在 2000~1000 bp 之间有一个约 1500 bp 的条带, 而 2 号和 3 号泳道此区间内的条带却为 1200 bp, 且在亮度上 4 号泳道出现的条带也不及 2、3 号泳道亮。这说明 LM87 经国标 LB₂ 培养扩增出的特征条带不同于 BHI 和国标 LB₁。

对 LM109 扩增结果可以从图中 8~10 看出, 9 号泳道在 4000~2000 bp 之间有两个条带的缺失, 而其在 1000 bp 处的条带要明显亮于 8 号和 10 号泳道, 此外三者除了浓度、亮度的微小改变外条带再无明显不同。这说明 LM109 经国标 LB₁ 培养扩增出的特征条带不同于 BHI 和国标 LB₂。

由此可以初步推断, 培养基条件改变会对某些单增李斯特菌基因组间特定重复序列 (ERIC) 产生变化。

3 结论

3.1 对比从 ERIC-PCR 分型结果中选取的不同亚型菌株在不同培养基中培养后扩增得到的指纹图谱, 可以发现, 绝对大多数李斯特氏菌并不会因为培养基条件的改变而对其基因组中 ERIC 扩增序列产生变化, 简而言之, 培养基条件一般不会对 ERIC 分型结果产生影响。但是, 本研究发现不同培养基条件对 LM87 和 LM109 的 ERIC 分型结果产生了影响。其中 LM87 经国标 LB₂ 培养基培养后扩增出的条带不同于 BHI 和国标 LB₁; LM109 经国标 LB₁ 培养基培养后扩增出的条带也不同于 BHI 和国标 LB₂。

3.2 鉴于本次研究中实验方法和菌种自身存在的客观因素, 主要表现为不同菌属的李斯特菌在国标培养基 (LB_{1/2}) 中的生长有差异, 导致提取的细菌基因组 DNA 样本浓度也有比较明显的差异, 而 PCR 技术是有其最低检测限, 过低的样本浓度可能会发生漏检的情况^[16]。因此可以将实验中分子分型结果发生的变化分为两种情况, 若是条带数目增多或者条带大小、亮度明显改变则比较好解释为是分子分型发生了变化; 若是条带数目减少, 则很可能是其样本浓度过低导致未检出, 而不一定是基因组发生变化。从实验结果 LM87/109 在不同培养基中扩增出的 ERIC 图谱的差异性上看, 主要体现在被扩增条带大小及亮度上, 如 LM109 经 LB₁ 培养扩增出的图谱在 1000 bp 处的条带要明显亮于其在 BHI 和 LB₂ 中的, 因此可以肯定的

是本次实验结果属前一种情况,即分子分型结果发生了改变。

3.3 此外值得注意的是,本研究中经不同培养基培养 PCR 扩增后获得相同 DNA 条带的 LM 菌株,也不能简单地认为培养基条件的改变不会对它们 DNA 产生影响。由于 ERIC-PCR-AGE 指纹图谱中具有相同迁移速度的 DNA 片段^[17],只能断定它们的相对分子量相同,却不能确定它们的 DNA 碱基对序列也相同,因此相同位置的 DNA 条带也可能包含不同 DNA 序列^[18],还需对具有相同 DNA 条带 LM 进行更深入的基因测序工作,方可得出明确结论。

3.4 基于上述讨论,培养基条件的改变可以对单增李斯特菌 ERIC-PCR 分子分型的结果产生差异。因此,无论是在对 LM 致病机理的基础研究过程中还是对其进行分子分型鉴定,都必须考虑其寄主来源以及培养条件,但最终导致 ERIC-PCR 扩增结果出现不同的原因以及其是否会对细菌基因组 DNA 产生影响还有待今后的研究给予补正。

参考文献

- [1] Norton D M, Braden C R. Foodborne listeriosis [J]. Boca Raton: CRC Press, 2007: 305-306
- [2] 相洪琴. 食品安全与食源性疾病预防[J]. 医学研究通讯, 2005, 34(6): 71-73
XIANG Hong-qin. Food safety and foodborne disease control [J]. Bulletin of Medical Research, 2005, 34(6): 71-73
- [3] 刘秀英, 胡怡秀. 全球食源性疾病现状[J]. 国外医学卫生学分册, 2003, 30(4): 199-205
LIU Xiu-ying, HU Yi-xiu. Global foodborne disease status [J]. Foreign Medical Sciences (Section of Hygiene), 2003, 30(4): 199-205
- [4] 崔焕忠, 乔立桥, 王义冲. 单核细胞增生性李斯特菌的主要毒力因子及其致病机理[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(1): 128-133
CUI Huan-zhong, QIAO Li-qiao, WANG Yi-chong. Main virulence factors and pathogenesis mechanism of *Listeria monocytogenes* [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2010, 37(1): 128-133
- [5] 张红芝, 顾其芳, 刘威, 等. 2009-2012 年上海市副溶血性弧菌血清分型研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(4): 363-366
ZHANG Hong-zhi, GU Qi-fang, LIU Wei, et al. Study on the serotype of *Vibrio parahaemolyticus* isolates during 2009-2012 in Shanghai [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2013, 25(4): 363-366
- [6] Kathariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective [J]. J. Food Prot., 2002, 65(11): 1811-1829
- [7] Sharples G J, Lloyd R G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes [J]. Nucleic Acid Res., 1990, 18(22): 6503-6508
- [8] Hulton C S J, Higgins C F, et al. ERIC sequence: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria [J]. Molecular Microbiology, 1991, 5(4): 825-834
- [9] 吴清平, 叶应旺, 张菊梅, 等. ERIC 结构功能及 ERIC-PCR 技术的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(4): 507-509
WU Qing-ping, YE Ying-wang, ZHANG Ju-mei, et al. ERIC structure and application of ERIC-PCR technology [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2006, 16(4): 507-509
- [10] 李艳琴, 孙永艳, 崔丽方, 等. ERIC-PCR 在人工混合菌体系中的检出灵敏度[J]. 微生物学通报, 2004, 31(4): 61-64
LI Yan-qin, SUN Yong-yan, CUI Li-fang, et al. The sensitivity of ERIC-PCR in the mixed bacteria system [J]. Microbiology, 2004, 31(4): 61-64
- [11] 刘博婷. ERIC-PCR 的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(8): 49-51
LIU Bo-ting. Research progress in enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2010, 31(8): 49-51
- [12] 石磊, 赵一鸣, 张志刚, 等. ERIC-PCR 和 Sau-PCR 对单增李斯特菌分型稳定性研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(2): 14-18
SHI Lei, ZHAO Yi-ming, ZHANG Zhi-gang, et al. Stability of ERIC-PCR and Sau-PCR techniques on *Listeria monocytogenes* typing [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(2): 14-18
- [13] 潘微微. 探究 PCR 及其改进技术在食品检测中的应用[J]. 中外食品工业月刊, 2014, 2: 14
PAN Wei-wei. Explore the application in food detection by PCR and its improved technology [J]. Sino-foreign Food Industry, 2014, 2: 14
- [14] Jersek B, Gilot P, Gubina M, et al. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1993, 37(1): 103-109
- [15] 金莉莉, 王秋雨, 侯潇. ERIC-PCR 技术在李斯特氏菌种、菌株鉴定中的应用[J]. 遗传, 2003, 25(2): 195-197
JIN Li-li, WANG Qiu-yu, HOU Xiao. ERIC-PCR on identification of listeria species and strain [J]. Hereditas (Beijing), 2003, 25(2): 195-197

- [16] Jalali M, Abedi D. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 122(3): 336-340
- [17] Mead P S, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States [J]. Emerging Infectious Diseases, 1999, 5(5): 607-625
- [18] Lunden J M, Autio T J, Korkeala H J. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine [J]. J. Food Prot., 2002, 65(7): 1129-1133

现代食品科技