

空肠弯曲菌分离株 ERIC-PCR 分型和生化分型的比较研究

郑扬云^{1,2}, 吴清平², 吴克刚¹, 吴葵^{2,3}, 张菊梅²

(1. 广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510006) (2. 广东省微生物研究所, 广东省华南应用微生物重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东广州 510070) (3. 中国科学院南海海洋研究所, 广东广州 510632)

摘要: 建立空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 的 ERIC-PCR 分子生物学分型技术, 比较 ERIC-PCR 分型和生化分型的分型效果。从菌株 TY1273 出发, 运用 $L_{16}(5^4)$ 正交试验, 对 Mg^{2+} 、dNTPs、引物和 TaqDNA 聚合酶浓度等因素在较大范围水平内进行反应体系条件摸索, 得到一个初步的优化体系; 在此基础上进行单因素的进一步小范围水平内的微调优化, 得到最终的优化体系; 最后以优化的 ERIC-PCR 方法对 24 株 *C. jejuni* 分离株分型; 同时根据 API Campy 生化反应结果进行生化分型, 比较 ERIC-PCR 分子分型方法和生化分型方法。结果显示 ERIC-PCR 方法将 24 株菌扩增均得到大小在 100 bp~3000 bp 之间的条带, 并可将其分为 22 个基因型, 分辨系数为 0.92, 具有较高的分辨力。生化分型将 24 株菌分为 19 个生化型, 显示了菌株基因的多样性。表明 ERIC-PCR 技术比生化分型能更好的体现菌株的遗传多样性, 且具有简便和分辨力高等优点, 可用于 *C. jejuni* 的多样性研究。

关键词: 空肠弯曲菌; ERIC-PCR; 分子分型; 生化分型

文章编号: 1673-9078(2013)8-1843-1850

Comparison of the Typing Methods of ERIC-PCR and Biochemical for *Campylobacter jejuni* Isolates

ZHENG Yang-yun^{1,2}, WU Qing-ping², WU Ke-gang¹, WU Kui^{2,3}, ZHANG Ju-mei²

(1. Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China) (2. Guangdong Institute of Microbiology; State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China; Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application; Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology; Guangzhou 510070, China) (3. South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To establish an ERIC-PCR molecular typing method for *Campylobacter jejuni* genotyping, the subtyping effect of ERIC-PCR and biochemical typing methods were compared. $L_{16}(5^4)$ orthogonal text was designed with four factors of Mg^{2+} , dNTPs, primers, TaqDNA polymerase concentration to explore the suitable reaction conditions in a wide range. Then three factors (except the primers), template concentration and annealing temperature were further optimized in a small range for final optimization. The optimized ERIC-PCR method was used to type the 24 *C. jejuni* isolates. According to the results of biochemical reactions to biochemical type the strains, the ERIC-PCR molecular typing method was compared with biochemical typing method. *C. jejuni* strains were grouped into 22 types. The ERIC-PCR method exhibited better discriminative results in molecular typing with discrimination index of 0.92. The *C. jejuni* isolates were classified to 19 biochemical types by biochemical typing method, which showed the diversity of genes in the strains. The ERIC-PCR subtyping method showed the genetic diversity of the strains better than biochemical typing method, which was an efficient method for typing and tracking analyses. It was suitable for genetic diversity analysis of *C. jejuni* strains.

Key words: *Campylobacter jejuni*; ERIC-PCR; molecular typing; biochemical typing

收稿日期: 2013-05-15

通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 主要从事微生物安全检测与控制研究

基金项目: 国家国际科技合作专项 (2013DFH30070); 广东省教育部产学研

结合项目 (2012B090400017)

空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 是近年来广受国内外学者重视的一种人兽共患病原菌。*C. jejuni* 是一种革兰氏阴性菌、微需氧 (最适生长环境是 5% O₂、10% CO₂ 和 85% N₂) 和不发酵糖类的嗜热型弯曲菌,其在显微镜下呈现海鸥展翅状、弯曲菌状。*C. jejuni* 广泛分布在温带、亚热带和热带的国家及地区,常通过感染的禽畜污染肉类、牛奶等食物。常规的流行病学方法一般不能非常准确地确定其传染源,因此分型研究就成为追溯 *C. jejuni* 传染源,调查其传播途径的主要手段^[1]。

在过去几十年中应用于 *C. jejuni* 分型方法很多,包括生物分型、血清学分型等,近年来随着分子生物学技术的发展,分子分型方法越来越多的应用于 *C. jejuni* 的分型。ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) 是肠道细菌基因组中发现的一种基因间重复序列,ERIC-PCR 是基于 ERIC 核心的高度保守序列设计引物进行 PCR,具有快速、简便等优点。目前 ERIC-PCR 已经普遍用于副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)^[2]、单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)^[3]、沙门氏菌 (*Salmonella spp.*)^[4]、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)^[5] 等肠道致病菌的分子分型研究。1994 年 Giesendorf 等^[6] 已经成功应用 ERIC-PCR 对 *C. jejuni* 进行流行病学方面的分型研究,Weijtens 等^[7] 1997 年也证明了 ERIC-PCR 对弯曲菌具有很好的分辨力。但是本实验室按参考文献中的反应条件进行试验时得不到预期效果,扩增图谱的多态性差,无法进行后续分析。考虑到 ERIC-PCR 作为一种半随机 PCR,其反应受很多因素影响,特别是 PCR 反应体系所用试剂,因此本论文在利用目前 PCR 实验常用生物试剂的基础上,优化反应条件后建立 *C. jejuni* 的 ERIC-PCR 分型方法,然后对本实验室分离到 *C. jejuni* 菌株进行 ERIC-PCR 分型和生化分型,比较两种分型方法,以期为本研究团队进行全国污染调查分离的 *C. jejuni* 菌株进行分型溯源研究提供可行的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

C. jejuni 菌株(包括优化条件用菌株 TY1273 和验证用菌株)为本实验室从食品和鸡、鸭肠道样品中用 Skirrow 琼脂培养基分离、API Campy 生化鉴定获得,并已用 PCR 方法鉴定^[8]。细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒购自广州东盛生物技术有限公司, Mg²⁺ (25 mmol/L)、dNTPs (each 2.50 mmol/L)、TaqDNA 酶 (5

U/μL)、10×Taq Buffer 购自天根生化科技有限公司。细菌分离相关培养基购自广东环凯微生物科技有限公司,培养细菌所用厌氧培养盒和微需氧产气剂购自日本三菱公司,生化鉴定的相关试剂购自生物梅里埃中国有限公司。引物 ERIC1R (ATGTAAGCTCCTGGGG ATTAC) 和 ERIC2R (AAGTAAGTGACTGGGGT GAGCG)^[9] 由华大基因合成。

1.2 模板 DNA 的提取

挑取单菌落过夜培养、扩菌,离心收集细菌,然后按照细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒说明提取基因组, -20 °C 保存备用。

1.3 ERIC-PCR 反应体系摸索试验

针对反应体系中的 Mg²⁺、dNTPs、引物和 TaqDNA 聚合酶 4 个因素,参考 L₁₆(5⁴) 正交表进行 4 因素 4 水平试验 (表 1, 表 4), 并进行 3 次重复,每一反应体系中含模板 DNA 50 ng, 将每种处理组合在 3 次重复试验中均得到稳定扩增的条带数目进行记录。

表 1 摸索试验因素-水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	Mg ²⁺ (/nmol/25 μL)	dNTPs (/nmol/25 μL)	rTaq (/U/25 μL)	Primers (/pmol/25 μL)
1	25	2.50	1.00	10
2	50	5.00	2.00	20
3	75	7.50	3.00	30
4	100	10.00	4.00	40

1.4 ERIC-PCR 条件优化试验

在 25 μL 体系中,将模板量分别设为 8、24、40、80、120、160、200、240、400 和 560 ng,其它条件保持一致,对模板量进行优化;将 Mg²⁺ 浓度分别设为 1.50、2.00、2.50、3.00、3.50、4.00、5.00、6.00、7.00、8.00 和 9.00 mmol/L,其它条件保持一致,对 Mg²⁺ 浓度进行优化;将 TaqDNA 酶量分别设为 0.50、1.00、1.50、2.00、3.00、3.50、4.00 和 4.50 U,其它条件保持一致,对 TaqDNA 酶量进行优化;将 dNTPs 浓度分别设为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.50、0.60 和 0.70 mmol/L,其它条件保持一致,对 dNTPs 浓度进行优化;将退火温度分别设为 26 °C、28.4 °C、31.2 °C、34.3 °C、35.6 °C、36.8 °C、38 °C、40 °C、42.4 °C、45.2 °C、46.8 °C 和 48.2 °C,其它条件保持一致,对退火温度进行优化。PCR 扩增结果经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,使用凝胶成像仪分析观察 DNA 指纹图谱。

1.5 ERIC-PCR 反应体系的稳定性试验

运用 TY1273 菌株对所建立的 ERIC-PCR 反应体系进行不同时间的 4 次重复试验, 以验证所建立体系的稳定性。

1.6 ERIC-PCR 反应体系的应用

利用建立的 ERIC-PCR 反应体系对本实验室从全国食源性病原菌空肠弯曲菌污染调查中分离到的 24 株 *C. jejuni* (其来源及 API 鉴定结果见表 2) 进行扩增, 以验证此体系的稳定性, 以用于对 *C. jejuni* 进行分型研究。

1.7 *C. jejuni* 分离株的生化分型

以 API Campy 鉴定的 21 个生化反应 (见图 1, 表 3) 结果为基础用聚类分析软件 NTsys 2.10e 进行聚类分析。

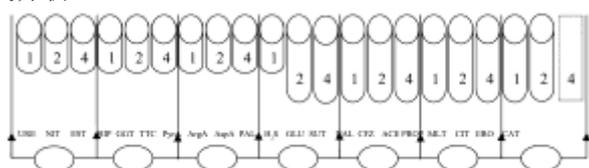


图 1 API Campy 生化鉴定报告单示意图

Fig.1 Report of API Campy biochemical identification

2 结果与分析

2.1 ERIC-PCR 反应体系摸索试验

按 1.3 中所述方法对正交试验结果进行检测 (图 2)。由图 2 可知, 组合 9、15 扩增效果较好, 条带多, 重复试验结果显示 15 号组合 3 次扩增中均保持良好的稳定性。同时发现 Mg^{2+} 浓度变化表现出明显差异, Mg^{2+} 浓度高的组合扩增效果明显高于 Mg^{2+} 浓度低的, 但是 Mg^{2+} 浓度高的稳定性差。将每种组合在 3 次重复

试验中稳定出现的条带数进行计数, 结果见表 4。由表 4 可知组合 15 在重复试验中比较稳定出现的条带数最多, 为了得到一个更准确的体系, 因此决定在此组合的基础上进行进一步的单因素优化试验。

表 2 空肠弯曲菌分离株来源

Table 2 Sources of *C. jejuni* strains

菌株	来源	反应编号	鉴定
CJ01	上海鸡肠	6711144	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ02	上海鸡肠	6711004	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ03	上海鸡肉	4701104	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>doylei</i>
CJ04	上海鸡肉	4711144	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ05	上海鸭肉	4711004	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>doylei</i>
CJ06	上海鸭肉	4711004	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>doylei</i>
CJ07	合肥鸭肠	4511144	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ08	合肥鸭肠	6511144	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ09	合肥鸭肠	6101144	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ10	南昌鸡肠	6511746	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ11	昆明鸡肠	6531104	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ12	昆明鸡肠	4100004	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>doylei</i>
CJ13	兰州鸡肠	4501004	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>doylei</i>
CJ14	兰州鸡肠	4501004	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>doylei</i>
CJ15	兰州鸡肠	4501004	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>doylei</i>
CJ16	兰州鸡肉	6731304	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ17	兰州鸡肉	6721706	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ18	太原鸡肠	6721547	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ19	太原鸡肠	6510744	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ20	太原鸭肠	6511106	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ21	太原鸭肠	6501706	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ22	太原鸭肠	6501706	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ23	太原鸭肉	6501704	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>
CJ24	太原鸭肉	6501706	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>

表 3 API Campy 生化反应表

Table 3 Results of API Campy biochemical reaction

测定	反应	测定	反应	测定	反应
URE	脲酶	ArgA	L-精氨酸芳酰胺酶	CFZ	四唑乙酰去乙酸硫撑甲酰氨头孢菌素 (敏感性)
NIT	硝酸盐还原	AspA	L-天冬氨酸芳酰胺酶	ACE	乙酸盐 (同化)
EST	酯酶	PAL	碱性磷酸酶	PROP	丙酸盐 (同化)
HIP	马尿酸盐	H2S	H2S 的产生	MLT	苹果酸盐 (同化)
GGT	γ -谷酰基转移酶	GLU	葡萄糖 (同化)	CIT	柠檬酸盐 (同化)
TTC	三苯四唑化氯的还原	SUT	琥珀酸盐 (同化)	ERO	红霉素 (敏感性)
PyrA	吡咯酮烷芳酰胺酶	NAL	茶啉酮酸 (敏感性)	CAT	触酶

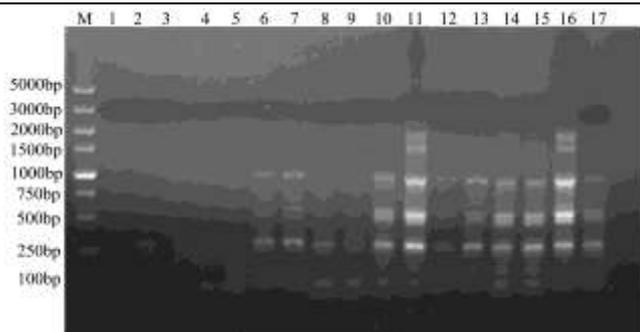


图2 ERIC-PCR 正交设计处理结果 (2.0%琼脂糖)

Fig.2 Electrophoresis products of ERIC-PCR orthogonal design

注: M: DL500; 1: blank; 2~17: 16 groups of orthogonal text.

表4 ERIC-PCR 反应摸索试验设计 $L_{16}(5^4)$

Table 4 Orthogonal design for ERIC-PCR reaction $L_{16}(5^4)$

试验号	Mg ²⁺	dNTPs	rTaq	Primers	空列	扩增条带数
1	1	1	1	1	1	0
2	1	2	2	2	2	0
3	1	3	3	3	3	0
4	1	4	4	4	4	0
5	2	1	3	2	4	3
6	2	2	4	1	3	3
7	2	3	1	4	2	1
8	2	4	2	3	1	1
9	3	1	4	3	2	4
10	3	2	3	4	1	5
11	3	3	2	1	4	3
12	3	4	1	2	3	4
13	4	1	2	4	3	4
14	4	2	1	3	4	4
15	4	3	4	2	1	6
16	4	4	3	1	2	4

2.2 ERIC-PCR 体系优化试验

2.2.1 模板量的确定

由图3可见,模板量在8 ng时扩增效果较差,在24~120 ng时不影响PCR效果。随着模板量的增加,PCR有些条带变暗。因此模板量可选择在24~120 ng之间。

2.2.2 Mg²⁺浓度的确定

在25 μL体系中模板量为100 ng的基础上,由图4可见,Mg²⁺浓度在1.50~3.00 mmol/L时,PCR扩增的条带数量增加且条带清晰。当Mg²⁺浓度大于3.00 mmol/L时,随着Mg²⁺浓度的增加,PCR扩增的条带数量变多,但考虑Mg²⁺浓度过高会影响体系的稳定

性,因此选择Mg²⁺浓度3.00 mmol/L为体系的最佳浓度。

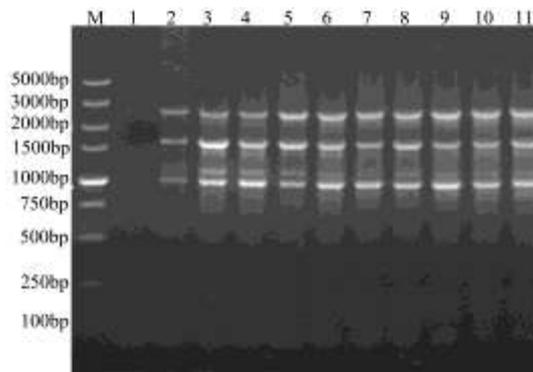


图3 不同模板量的ERIC-PCR电泳图

Fig.3 Electrophoresis of ERIC-PCR products amplified with different template concentrations

注: M: DL5000; 1: blank; 2: 8 ng; 3: 24 ng; 4: 40 ng; 5: 80 ng; 6: 120 ng; 7: 160 ng; 8: 200 ng; 9: 240 ng; 10: 400 ng; 11: 560 ng。

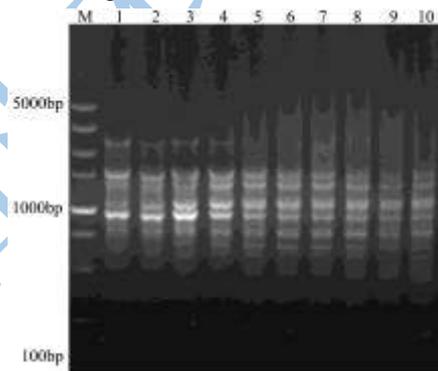


图4 不同Mg²⁺浓度的ERIC-PCR电泳图

Fig.4 Electrophoresis of ERIC-PCR products amplified with different Mg²⁺ concentration

注: M: DL5000; 1: 1.50 mmol/L; 2: 2.00 mmol/L; 3: 2.50 mmol/L; 4: 3.00 mmol/L; 5: 4.00 mmol/L; 6: 5.00 mmol/L; 7: 6.00 mmol/L; 8: 7.00 mmol/L; 9: 8.00 mmol/L; 10: 9.00 mmol/L。

2.2.3 TaqDNA 酶量的确定

在25 μL体系中模板量为50 ng和最佳Mg²⁺浓度3.00 mmol/L的基础上,由图5可见,TaqDNA酶的量在0.50~3.50 U时对于PCR扩增效果并没有太大的影响,但是可以看出在0.50 U和1.00 U时扩增的750 bp左右的条带并没有分开太明显,而从1.50 U以上时扩增效果就差不多一样;而在大于3.50 U时可以明显看出扩增的效果变差,条带的多态性变少。因此从扩增的效果和原材料成本出发,选择25 μL反应体系中1.50 U的TaqDNA酶量为最适量。

2.2.4 dNTPs 浓度的确定

在25 μL体系中模板量为50 ng和最佳Mg²⁺浓度

3.00 mmol/L、TaqDNA 酶量 1.50 U 的基础上, 由图 6 可见, 随着 dNTPs 浓度的增加, 扩增条带增多且条带变亮, 但是在浓度大于 4.00 mmol/L 时扩增效果变差, 因此从扩增效果方面选择 dNTPs 浓度 0.25 mmol/L 为体系的最佳浓度。

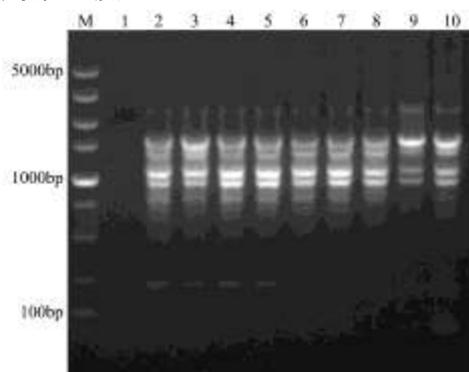


图 5 不同 TaqDNA 聚合酶量的 ERIC-PCR 电泳图

Fig.5 Electrophoresis of ERIC-PCR products amplified with different TaqDNA polymerase's concentrations

注: DL5000; 1: blank; 2: 0.50 U; 3: 1.00 U; 1.50 U; 5: 2.00 U; 6: 2.50 U; 7: 3.00 U; 8: 3.50 U; 9: 4.00 U; 10: 4.50 U

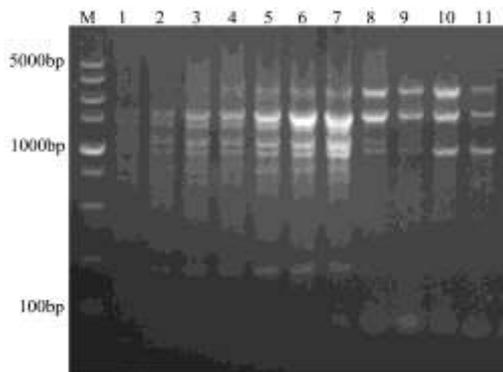


图 6 不同 dNTPs 浓度的 ERIC-PCR 电泳图

Fig.6 Electrophoresis of ERIC-PCR products amplified with different dNTPs concentrations

注: M: DL5000; 1: 0.05 mmol/L; 2: 0.10 mmol/L; 3: 0.15 mmol/L; 4: 0.20 mmol/L; 5: 0.25 mmol/L; 6: 0.30 mmol/L; 7: 0.35 mmol/L; 8: 0.40 mmol/L; 9: 0.50 mmol/L; 10: 0.60 mmol/L; 11: 0.70 mmol/L。

2.2.5 退火温度的确定

由图 7 可见, 当退火温度在 26 °C~38 °C 之间时, 随着温度的降低, PCR 扩增的多态性增加, 但是条带清晰度下降; 当退火温度大于 38 °C 时扩增效果变差, 条带多态性变少, 而在 46.8 °C 时扩增条带急剧减少, 以至于温度在 48.2 °C 以后基本都无条带扩出。由此可知, *C. jejuni* 扩增的退火温度在 36.8 °C 以下时较好, 根据扩增效果选择 35 °C 为反应程序的最佳退火温度。

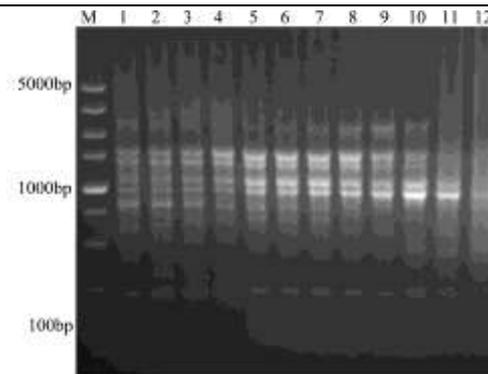


图 7 不同退火温度的 ERIC-PCR 电泳图

Fig.7 Electrophoresis of ERIC-PCR products amplified with different annealing temperature

注: DL5000; 1: 26 °C; 2: 28.4 °C; 3: 31.2 °C; 4: 34.3 °C; 5: 35.6 °C; 6: 36.8 °C; 7: 38 °C; 8: 40 °C; 9: 42.4 °C; 10: 45.2 °C; 11: 46.8 °C; 12: 48.2 °C。

2.3 ERIC-PCR 体系的建立及稳定性

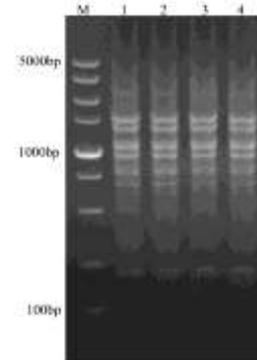


图 8 ERIC-PCR 重复性实验电泳图

Fig.8 Repeatability test of electrophoresis of ERIC-PCR products amplified

由 2.2.1~2.2.5 的优化试验可知, 最终建立的 *C. jejuni* 的 ERIC-PCR 反应体系 (25 μL): 模板量 24~120 ng, Mg²⁺浓度为 3.00 mmol/L, TaqDNA 酶为 1.50 U, dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L, 引物 (10 μmol/L) 各 0.80 μmol/L, 10×PCR Buffer 2.50 μL, 其余用超纯水补齐。反应程序: 94 °C 预变性 3 min、94 °C 变性 30 s、35 °C 退火 1 min、72 °C 延伸 4 min, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

用所建立的 ERIC-PCR 反应条件在不同时间进行 4 次重复试验以验证体系的稳定性, 其电泳结果 (图 8) 显示建立的 ERIC-PCR 方法具有较好的稳定性, 表明其可用于 *C. jejuni* 的分型。

2.4 ERIC-PCR 反应体系的应用

利用所建立的 ERIC-PCR 反应体系对本实验室

所分离的 24 株 *C. jejuni* 进行扩增, 得到条带丰富分辨率良好的 *C. jejuni* DNA 指纹图谱 (图 9)。将电泳结果用聚类软件 Gel-Pro Analyzer 4.0 进行分析 (图 10), 软件分析显示 24 株 *C. jejuni* 可分为 22 个型, 相似性在 0.52~1.00 之间, 表明分离株具有较高的遗传差异性, 其中 CJ07 与 CJ08 (同一来源), CJ13 与 CJ15 菌株 (同一来源) 两两之间的相似性到达 1.00, 可认为是同一分子型别。当相似系数达到 0.56 时, 24 株 *C. jejuni* 可分为 4 簇, 簇 I 中包含了 1 个型; 簇 II 中包含了 7 个型共 17 株 *C. jejuni* 分离株, 分别来源于 9 个样品; 簇 III 中包含了 1 个型 3 株菌, 来源于太原市两个样品; 簇 IV 中包含 2 个型, 均来源于太原市的鸭肠样品。从图 8 中可以看出, 同一样品来源菌株之间的相似性基本都大于 0.80, 但并不一定是 1.00, 这表明 ERIC-PCR 可以很好的显示出菌株基因之间存在的差异性; 但也可以看出不同样品来源的菌株存在不同的基因型, 这显示了较高的多样性。另外, 上海市同一样品中菌株之间的相似性小于 0.80, 这表明上海市同一个样品中可能感染几种不同的 *C. jejuni*。

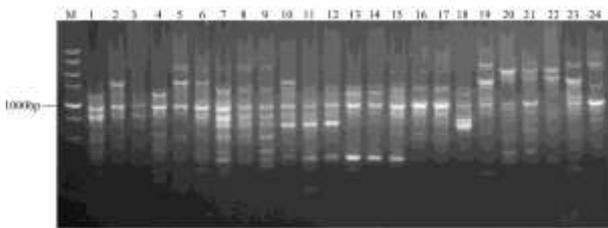


图 9 ERIC-PCR 反应体系的扩增效果

Fig.9 Electrophoresis results by the ERIC-PCR reaction system

注: M: DL5000; 1~24: *C. jejuni* isolates.

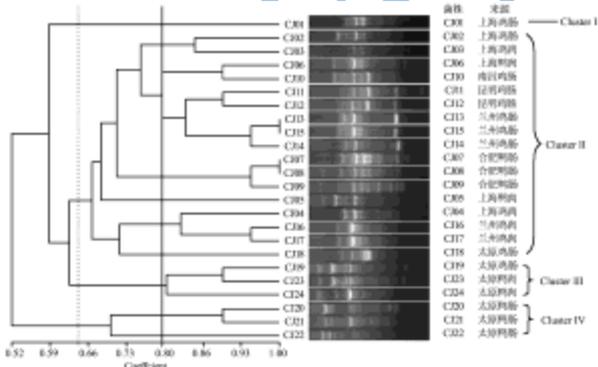


图 10 24 株 *C. jejuni* 分离株 ERIC-PCR 分型结果

Fig.10 Results of ERIC-PCR typing of 24 *C. jejuni* strains

以相似性 0.80 为界进行分型, 可以将这 22 个型的 *C. jejuni* 分为 11 个类群, 本方法样本间的分辨系数为 0.92, 当分辨系数大于 0.90 时, 可以认为该方法具有很好的分辨能力, 因此该方法具有较高的分辨力。ERIC-PCR 分型的不同反映了菌株之间基因上的差

异, 而菌株生化型的不同也与基因相关。因此, 本试验将进行 24 株菌株的生化分型, 以评价 ERIC-PCR 分型方法的效果。

2.5 *C. jejuni* 分离株生化分型的结果

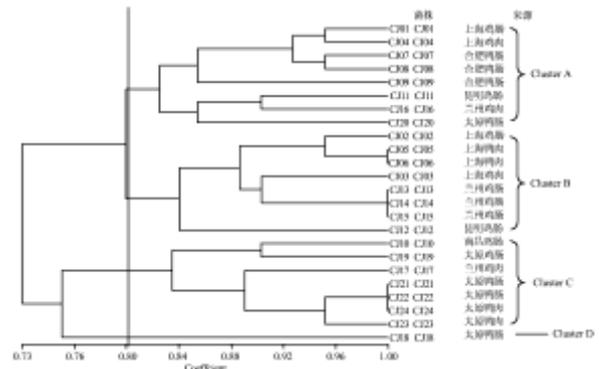


图 11 24 株 *C. jejuni* 分离株生化分型结果

Fig.11 Results of biochemical typing of 24 *C. jejuni* strains

以 API Campy 的生化反应结果进行生化分型, 24 株 *C. jejuni* 的 EST、HIP 和 CAT 反应实验全为阳性, 有 18 个实验结果不同, 用 NTsys 2.10 软件进行聚类分析 (见图 11), 以相似性 0.80 为界, 24 株 *C. jejuni* 可分为 4 类群 19 个生化型, 其中鉴定为 *C. jejuni* subsp *doylei* 亚型的菌株均分布在簇 B 当中, 而 API 鉴定为 *C. jejuni* subsp *jejuni* 亚型的菌株则在 4 个簇中均有分布, 其中 CJ18 单独组成簇 B。

3 结论

3.1 传统的 *C. jejuni* 分型主要是依据表型特征, 但是大部分方法对于区分不同的 *C. jejuni* 菌株并没有太好的效果。在近年来的报道中, 细菌基因组重复序列 PCR 技术 (rep-PCR)^[10]、脉冲场凝胶电泳技术 (PFGE)^[11]、随机扩增多态性 DNA 标记技术 (RAPD)^[12]、和多位点序列分型技术 (MLST)^[13] 等方法被越来越多的用于 *C. jejuni* 的分型, 但是 AFLP、RFLP、RAPD 分型等均存在 DNA 纯度要求高、分辨率低、重复性差、实验室间分型结果可比性差等诸多不足, 另外 PFGE 目前虽然被认为是 *C. jejuni* 分辨率最高的一种分型方法, 但是其存在成本高、操作繁琐、需菌量大、需要专门的仪器和技术人员操作等局限性, 与以上各种分型技术相比, ERIC-PCR 有着操作简单, 稳定性高的优势, 在分子溯源方面具有一定的应用前景。

3.2 ERIC-PCR 是一种有效的细菌基因分型方法, 本实验室利用 ERIC-PCR 进行了常见食源性病原菌分型研究, 取得了良好的分型效果, 如叶应旺等 (2008~2009)^[14,15] 用 ERIC-PCR 对阪崎肠杆菌进行了分型研究, 目前本实验室还在建立单增李斯特菌、蜡

芽孢杆菌和铜绿假单胞菌等致病菌的 ERIC-PCR 分型方法,旨在建立常见肠道致病菌的指纹图谱库用于溯源。目前已经建立的方法表明 ERIC-PCR 适用于单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌的分子分型。但建立方法时发现反应体系和循环参数对扩增效果有较大的影响,因此优化反应条件,建立标准方法非常必要。作者在初期试验中参考一些国外已经建立的 *C. jejuni* ERIC-PCR 方法的反应体系^[6,7],但是扩增出的图谱较差无法进行下一步分析,因此本实验室在参照其它肠道菌的 ERIC-PCR 体系的基础上设计了 1 组 4 因素 4 水平的正交试验,选择其中扩增最好的反应体系,在此基础上考虑到各因素间的相互作用,再进一步对各个因素进行单独的梯度优化试验,同时为了能够准确的反映各因素对 PCR 扩增效果的影响,将每个梯度试验的梯度范围扩大,最终建立了一套稳定、高效的 ERIC-PCR 分型反应体系。本文采用正交试验确定开始的反应体系,为后面单因素条件的摸索打下基础,也避免了一开始的盲目摸索,节省了预实验摸索时间。

3.3 从 ERIC-PCR 的优化过程可以看出, Mg^{2+} 、dNTPs 和退火温度对于 *C. jejuni* 的 ERIC-PCR 扩增效果有明显的影响。研究表明, Mg^{2+} 浓度为 3.00 mmol/L、退火温度为 35 °C 时,扩增产物的电泳图谱条带最清晰、明亮。这与目前文献^[6, 16]报道的并不一致,但是 Mg^{2+} 浓度过低时会导致图谱的多态性差,而退火温度过低时,不易获得稳定的图谱,经我们反复试验证实 Mg^{2+} 浓度为 3.00 mmol/L、退火温度为 35 °C 时条带最完整。将所建立的 ERIC-PCR 反应体系进行 3 次重复试验,得到了稳定性较好的图谱,最后应用于本实验室从样品中分离到的 *C. jejuni* 菌株进行分子分型,得到了条带丰富和多样性较好的 DNA 指纹图谱。另外,聚类分析结果显示所建立的方法具有较高的分辨力,这表明所建立的体系适用于 *C. jejuni* 的分子分型,为用 ERIC-PCR 进行 *C. jejuni* 溯源提供了参考,该优化 ERIC-PCR 方法将应用于本实验室正在进行的全国食品 *C. jejuni* 污染调查。

3.4 ERIC-PCR 分型的不同反映了基因上的差异,而细菌生化型的不同也与基因差异相关。生化反应是细菌利用自身酶系统分解、同化底物的能力,同一亚种细菌不同株之间也会有差异。本研究中,24 株 *C. jejuni* 分成了 19 个生化型,其中 CJ05 和 CJ06, CJ13、CJ14 和 CJ15, CJ21、CJ22 和 CJ24 分别具有相同的生化型,而这些具有相同生化型的菌株通过 ERIC-PCR 分型并不是都具有相同的基因型,其中 CJ13 和 CJ15 具有相同的基因型且与 CJ14 之间的相似性大于 0.93,而

其余菌株之间的基因相似性都小于 0.80,这表明 ERIC-PCR 方法可以显示相同生化型的菌株之间基因上的差异性。本实验建立的 ERIC-PCR 分型方法将 24 株 *C. jejuni* 分为 22 个基因型,其型别较生化型多。另外,ERIC-PCR 分型中同一样品来源菌株的相似性基本都大于 0.80,与菌株之间的相似性大于 0.80 时,菌株可能来源于同一来源或是同一株菌的理论是一致的,这表明 ERIC-PCR 可以用于 *C. jejuni* 的溯源分析,而利用生化分型进行溯源有一定的难度。

3.5 研究表明,ERIC-PCR 分型方法的分辨力和分型溯源能力优于生化分型,且具有稳定、简便的优点,可用于本实验室食品污染调查分离到的 *C. jejuni* 菌株的遗传多样性研究和溯源研究,在 *C. jejuni* 分型研究方面具有一定的应用前景。

参考文献

- [1] 杨志刚,陈阿琴.空肠弯曲菌基因分型的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2007,10:20-22
Yang Z G, Chen A Q. Advances in research on *Campylobacter jejuni* genotyping [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2007, 10: 20-22
- [2] 杨元斌,徐景野,宋启发,等.副溶血性弧菌 ERIC-PCR 分型技术研究[J].中国卫生检验杂志,2011,21(7):1613-1616
Yang Y B, Xu J Y, Song Q F, et al. Study on construction and application of ERIC-PCR method for typing *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2011, 21(7): 1613-1616
- [3] 郭润芳,柯晓静,韩军,等.单核增生李斯特菌 ERIC-PCR 分子分型方法的建立[J].河北农业大学学报,2010,33(4):67-70
Guo R F, Ke X J, Han J, et al. Molecular typing methods of ERIC-PCR for *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2010, 33(4): 67-70
- [4] 朱恒文,方艳红,王元兰,等.肉鸡屠宰加工生产链中沙门氏菌的污染调查及 ERIC-PCR 溯源[J].食品科学,2012,33(17):48-53
Zhu H W, Fang Y H, Wang Y F, et al. Investigation of *Salmonella* Contamination in Broiler Slaughter and Processing Chain and ERIC-PCR Analysis of Its Sources [J]. Food Science, 2012, 33(17): 48-53
- [5] 何力,傅玲琳,冯立芳,等.大肠埃希氏菌 ERIC-PCR 指纹图谱构建及贝类污染微生物源示踪[J].中国食品学报,2012,12(8):163-168
He L, Fu L L, Feng L F, et al. ERIC-PCR Fingerprinting of Fecal *Escherichia Coli* and Microbial Source Tracking in Non-point Pollution of the Shellfish Culture Area of East

- China Sea [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(8): 163-168
- [6] Giesendorf B A, Goossens H, Niesters H G, et al. Polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting for epidemiological studies on *Campylobacter* spp [J]. Medical Microbiology, 1994, 40(2): 141-147
- [7] Meijters M J, Van der Plas J, Bijker P G, et al. The transmission of campylobacter in piggerie; an epidemiological study [J]. Applied Microbiology, 1997, 83(6): 693-698
- [8] 何蕊, 黄金林, 许海燕, 等. 弯曲菌多重 PCR 检测方法的建立及其初步应用[J]. 扬州大学学报, 2007, 28(1): 5-8
He R, Huang J L, Xu H Y, et al. Development and application of multiplex PCR assay for the detection of *Campylobacter* spp. [J]. Journal of Yangzhou University, 2007, 28(1): 5-8
- [9] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes [J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(24): 6823-6831
- [10] Behringer M, Miller W G, Oyarzabal O A. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by *flaA*-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR [J]. Microbiological Methods, 2011, 84(2): 194-201
- [11] Melero B, Juntunen P, Hänninen M L, et al. Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates [J]. Food Microbiology, 2012, 32(1): 124-128
- [12] Adzitey F, Rusul G, Huda N, et al. Prevalence, antibiotic resistance and RAPD typing of *Campylobacter* species isolated from ducks, their rearing and processing environments in Penang, Malaysia [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 154(3): 197-205
- [13] De Haan C P, Kivistö R I, Hakkinen M, et al. Multilocus sequence types of Finnish bovine *Campylobacter jejuni* isolates and their attribution to human infections [J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 200
- [14] Ye Y W, Wu Q P, Zhou Y H, et al. Analysis of major band of *Enterobacter sakazakii* by ERIC-PCR and development of a species-specific PCR for detection of *Ent. sakazakii* in dry food samples [J]. Microbiological Methods, 2008, 75(3): 392-397
- [15] Ye Y W, Jiang Y L, Fan T F, et al. Resistance characterization, virulence factors, and ERIC-PCR fingerprinting of *Aeromonas veronii* strains isolated from diseased *Trionyx sinensis* [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2012, 9(11): 1053-1055
- [16] Wilson M K, Lane A B, Law B F, et al. Analysis of the pan genome of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from poultry by pulsed-field gel electrophoresis, multilocus sequence typing (MLST), and repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR) reveals different discriminatory capabilities [J]. Microbial Ecology, 2009, 58(4): 843-855