

蜡样芽孢杆菌 ERIC-PCR 分子分型方法的建立

王君^{1,2}, 吴清平², 吴克刚¹, 陈谋通², 张菊梅², 郭伟鹏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, 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)

摘要: 为建立简单快速的蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)基因间重复共有序列 PCR(ERIC-PCR)的分子分型方法, 该研究以 *B. cereus* CMCC 63303 的基因组 DNA 为模板, 并采用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 对影响 ERIC-PCR 反应体系的五个因素(模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTP、Taq DNA 聚合酶、引物)在四个浓度水平上进行优化, 并通过单因素试验确定最佳退火温度, 最后以优化后的反应体系对 50 株 *B. cereus* 分离株进行 ERIC-PCR 分子分型和聚类分析验证其稳定性和分型效果。结果显示应用建立的 ERIC-PCR 反应体系对 50 株分离株扩增均得到了 9~17 条、大小在 200~4000 bp 之间的条带, 并可将其分为 47 个型, 且分辨力达到 0.996, 具有较高稳定性和分辨能力。表明 ERIC-PCR 技术对 *B. cereus* 分型, 具有简便和分辨力高等优点, 可用于食源性 *B. cereus* 分离株的多样性研究。

关键词: 蜡样芽孢杆菌; ERIC-PCR; 分子分型; 遗传多样性分析

文章编号: 1673-9078(2013)7-1696-1701

Establishment of ERIC-PCR Molecular Typing Method for *Bacillus cereus*

WANG Jun^{1,2}, WU Qing-ping², WU Ke-gang¹, CHEN Mou-tong², ZHANG Ju-mei², GUO Wei-peng²

(1. Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, South China State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application; Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: An efficient enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence (ERIC-PCR) molecular typing method was established for *Bacillus cereus*. Based on the template of *B. cereus* CMCC 63303 genomic DNA, the ERIC-PCR amplification system in four levels of five factors (DNA template, Mg^{2+} , dNTP, Taq DNA polymerase and primer) was optimized by orthogonal design $L_{16}(4^5)$. Then the effects of annealing temperature on the amplification system was discussed through single factor experiment and the optimal reaction condition were determined. Fifty *B. cereus* strains were typed using the optimal reaction system and cluster analysis. The ERIC-PCR results exhibited better discriminative results in molecular typing with discrimination index of 0.996. *B. cereus* strains were grouped into 47 types. The ERIC-PCR system was an efficient method for typing and tracking analyses. It was suitable for genetic diversity analysis of foodborne *B. cereus* strains.

Key words: *bacillus cereus*; ERIC-PCR; molecular typing; genetic diversity analysis

蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是一种分布广泛的兼性好氧、中温、产芽孢的条件致病菌。几乎所有种类的食品都曾被报道与 *B. cereus* 引发的食物中毒有关^[1-2]。本实验室近两年开展了全国零售食品中 *B. cereus* 污染调查, 为进一步了解其在食品中的遗传多样性, 研究其分布规律, 找出食源性优势菌株, 需要建立一

收稿日期: 2013-04-07

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2012B090400017); 科技部国际科技合作专项(2013DFH30070)

作者简介: 王君(1986-), 女, 硕士, 研究方向为蜡样芽孢杆菌污染调查和分布规律

通讯作者: 吴清平(1962-), 男, 博士, 研究员, 研究方向食品微生物安全监测与控制技术研究

种简单、稳定、多态性丰富、成本低、适用于 *B. cereus* 的分型方法。过去对 *B. cereus* 分型多采用噬菌体^[3]、血清^[4]等分型方法, 但这些方法操作复杂、成本高且分型粗糙。目前, *B. cereus* 仍以传统生化分型为主, 但它耗时费力、结果重现性差, 且有些菌株不能分型, 很难用于大批量菌株的遗传多样性研究。随着分子生物学技术的发展, 分子分型方法越来越多, 其中 PFGE^[5-6]、RFLP^[7-8]、MLST^[9]、AFLP^[10]、生物芯片^[11]等许多分子技术已成功用于蜡样芽孢杆菌群亲缘关系的分型及鉴定。与以上方法相比, ERIC-PCR^[12]分型具有成本较低, 操作技术简单等优点。近年来我国的廖永红^[13]等人首先对 *B. cereus* 的 ERIC-PCR 体系进行了单因素优化, 并且建立起了适合 *B. cereus* 的

ERIC-PCR 的反应体系,但其反应条件得到的条带多态性不够丰富,导致分辨力不高,难以对大量菌株进行遗传多样性分析。因此,进一步系统优化反应条件则有可能得到更加丰富的电泳条带用于大量 *B. cereus* 分离株的分子分型。本研究以 *B. cereus* 为研究对象,通过系统优化条件建立起一套 ERIC-PCR 分型技术,并对本实验室在广东省食源性致病菌污染调查中分离得到的 50 株 *B. cereus* 分离株进行分子分型,获得了良好的结果。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

B. cereus 标准菌株 CMCC 63301 和 CMCC63303 均由本实验室保藏,其中 CMCC63303 用于 ERIC-PCR 反应体系的优化,50 株蜡样芽孢杆菌分离菌株由本实验室在广东省食源性致病菌污染调查分离所得,均由甘油保藏于 -20 °C 冰箱备用。

1.2 主要仪器设备

Taq DNA 酶(2.5 U/μL)、Mg²⁺ (25 mmol/L)、10×PCR buffer、三磷酸脱氧核糖核苷 dNTPs (2.5 mmol/L)均购于天根生化科技有限公司,DL5000 DNA Marker 购于大连 Takara 公司;Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自上海生工生物工程;ERIC-PCR 通用引物^[13]ERIC-F(ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA C)和 ERIC-R(AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG)由华大基因公司合成;紫外可见分光光度计 BioSpec-nano,日本岛津;梯度 PCR 仪 Tprofessional Standard Gradient,德国 Biometra;电泳仪 EPS 300,上海天能;凝胶成像系统 GE Image Quant 350,美国 GE Healthcare。

1.3 方法

1.3.1 模板 DNA 的制备

采用 Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒(细菌)提取 *B. cereus* 63303 基因组 DNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳测定其质量,紫外分光光度计测定 DNA 的纯度和浓度,并将其稀释至 50 ng/μL,置于 -20 °C 保存。

1.3.2 ERIC-PCR 反应体系与 PCR 扩增程序的初步设定

初步设定 PCR 扩增反应各组分参数为^[13]: 25 μL 反应体系中含 100.00 ng DNA 模板、2.50 mmol/L Mg²⁺、0.20 mmol/L dNTPs、0.80 μmol/L 引物、Taq DNA 聚合酶 1.00 U。

基本扩增程序为^[13]: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 3 min; 35 个循环; 72 °C 再延伸 10 min。PCR 产物 4 °C 保存。

1.3.3 ERIC-PCR 正交实验设计

表 1 *B. cereus* ERIC-PCR 反应因素正交试验水平表

Table 1 Factors and levels of L₁₆(4⁵) orthogonal design for ERIC-PCR amplification system for *B. cereus*

水平	因素				
	模板 DNA/ (ng/25 μL)	Mg ²⁺ / (mmol/L)	Primer/ (μmol/L)	Taq/ (U/25 μL)	dNTPs/ (mmol/L)
1	25.00	3.00	0.20	0.75	0.10
2	50.00	4.00	0.40	1.00	0.20
3	75.00	5.00	0.60	1.25	0.30
4	100.00	6.00	0.80	1.50	0.40

选用 L₁₆(4⁵)正交表,对影响 ERIC-PCR 扩增结果的主要影响因子进行正交设计,正交试验水平表见表 1。根据正交设计进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳。为了提高试验的稳定性,每个处理的试验重复三次,依据条带的强弱和条带的数量对扩增产物电泳结果依次打分,条带数量丰富清晰稳定的最佳产物记 16 分,最差的计 1 分,对试验结果进行评分。最后对正交试验进行方差分析,确定 ERIC-PCR 最佳反应体系。

1.3.4 退火温度的优化

为了确立合适的 *B. cereus* ERIC-PCR 退火温度,共设置了 10 个温度梯度,即 39 °C、41 °C、43 °C、45 °C、47 °C、49 °C、51 °C、53 °C、55 °C、56 °C。运用初步设定的反应体系和基本反应程序,根据扩增结果筛选优化体系的退火温度。

1.3.5 *B. cereus* 分离菌株 ERIC-PCR 指纹图谱构建与分析

以 ERIC-PCR 最优反应体系对广东省食源性致病菌污染调查中从肉与肉制品、速冻食品、熟食、水产品、蔬菜、速冻食品、食用菌和奶制品七类食品中分离得到的 50 株 *B. cereus* 分离株和两株标准菌株进行 PCR 扩增,扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后检测,得到 ERIC-PCR 指纹图谱,应用 Gel-Pro Analyzer 4.0 软件对以上 ERIC-PCR 指纹图谱进行凝胶定量分析,得到各条带的分子量大小,把同样分子量大小的排为同行,得到一个矩阵,按照“有条带的位置记为 1,无条带的位置记为 0”的方法把矩阵转换成 0,1 矩阵,再将其导入聚类软件 NTSYS-pc 进行 UPGMA 聚类,构建聚类树。

使用 Simpson 差异指数 (DI) 来评价不同的分型方法的分辨力。Simpson 差异指数的计算公式为:

$$DI = 1 - 1 / N(N-1) \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

注: N 为样本全部菌株数, n_j 为被归入 j 组的菌株数^[14]。

DI 值的大小可以直接用来比较不同分型方法的分辨力。如果 DI

值大于 0.90, 则可认为这种方法可以很好的区分能力。

2 结果分析

2.1 ERIC-PCR 反应体系的正交试验优化

正交试验方案和试验结果见表 2。表中 I、II、III 三列表示三次重复试验的打分结果。根据打分求出每一因素水平下的数据 K_i 值、 k_i 值和 R 值。 K_i 值为每个因素同一水平下的试验值之和 (包括三次重复), $k_i = K_i/4$, R 为同一因素不同水平间平均值的极差。图 1 为一次正交试验的 PCR 产物电泳图。

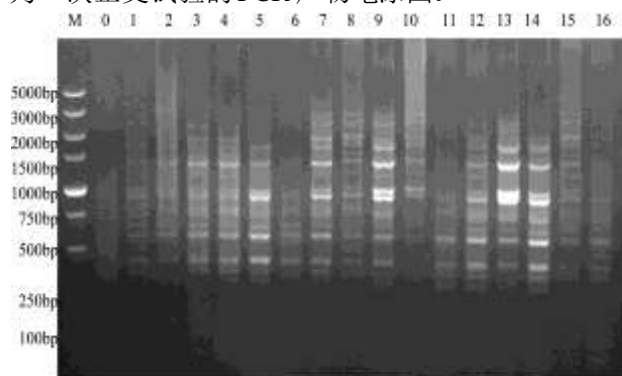


图 1 正交试验 ERIC-PCR 产物电泳结果

Fig.1 Electrophoregrams of ERIC-PCR products obtains from orthogonal experiment

注: M: DL5000 Marker; 0: 空白对照; 1~16: 正交试验 1~16。

从表 2 的极差分析和表 3 的方差分析结果可以看出, 模板 DNA、 Mg^{2+} 、primer、Taq DNA 聚合酶和 dNTP 对 ERIC-PCR 反应体系都存在极显著影响; 同时极差 R 反映了每个因素对 ERIC-PCR 反应的影响程度, R 值越大, 表明该因素对试验结果的影响越显著, 5 个因素对反应体系影响从大到小的顺序依次为 $dNTPs > Taq DNA 聚合酶 > primer > Mg^{2+} > 模板 DNA$ 。

k 值反应了各因素水平对反应体系的影响情况, k 值越大反应水平越好。通过比较各水平的 k 值得出的 ERIC-PCR 反应中 5 因素的最优水平为 A_3 、 B_3 、 C_1 、 D_1 、 E_4 , 得出最优组合为 $A_3B_3C_1D_1E_4$ 。

最终确定 *B. cereus* ERIC-PCR 的最优反应体系为: 25 μ L 反应体系中含 75.00 ng DNA 模板、5.00 mmol/L Mg^{2+} 、0.20 μ mol/L 引物、Taq DNA 聚合酶 0.75 U、0.40 mmol/L dNTPs。

2.2 退火温度对 ERIC-PCR 扩增的影响

退火温度是影响扩增特异性的主要因素之一, 较低的退火温度会使引物与模板错配, 产生非特异性条带; 而过高则会抑制引物和模板结合。从图 2 可以看出, 当退火温度高于 47 $^{\circ}C$ 和低于 41 $^{\circ}C$ 时条带有些模糊, 部分条带缺失。当退火温度为 43~45 $^{\circ}C$ 时, 扩增

的条带数目多、带型清晰、亮度适当, 尤其是 45 $^{\circ}C$ 时效果最佳。最后确定体系的最佳退火温度为 45 $^{\circ}C$ 。

表 2 ERIC-PCR 反应体系正交试验设计表 $L_{16}(4^5)$ 及结果分析

Table 2 $L_{16}(4^5)$ orthogonal design and analysis of the results for

ERIC-PCR system for *B. cereus*

试验号	A	B	C	D	E	结果		
						I	II	III
1	1	1	1	1	1	4	5	5
2	1	2	2	2	2	6	4	4
3	1	3	3	3	3	12	10	10
4	1	4	4	4	4	11	9	9
5	2	1	4	3	2	9	6	7
6	2	2	3	4	1	3	3	1
7	2	3	2	2	4	16	16	16
8	2	4	1	1	3	5	14	12
9	3	1	2	4	3	7	15	14
10	3	2	1	3	4	15	12	15
11	3	3	4	1	1	2	2	2
12	3	4	3	2	2	13	11	11
13	4	1	3	1	4	8	7	6
14	4	2	4	2	3	10	8	8
15	4	3	1	4	2	14	13	13
16	4	4	2	3	1	1	1	3
K_1	89.00	93.00	127.00	123.00	32.00			
K_2	108.00	89.00	103.00	72.00	111.00			
K_3	119.00	126.00	95.00	101.00	125.00			
K_4	92.00	100.00	83.00	112.00	140.00			
k_1	22.25	23.25	31.75	30.75	8.00			
k_2	27.00	22.25	25.75	18.00	27.75			
k_3	29.75	31.50	23.75	25.25	31.25			
k_4	23.00	25.00	20.75	28.00	35.00			
R	7.50	9.25	11.00	12.75	27.00			

注: A: 模板 DNA(0.04 ng/ μ L); B: Mg^{2+} /(mmol/L); C: Primer/(μ mol/L); D: Taq 酶/(U/25 μ L); E: dNTPs/(mmol/L)。

表 3 正交试验各因素间方差分析表

Table 3 The variance analysis for the factors of orthogonal

experiment

因素	偏差平方和	自由度	均方	F 值	F 临界值	显著水平
A	49.50	3.00	16.50	4.58		**
B	69.17	3.00	23.06	6.40	F0.1(3,32)=2.27	**
C	86.33	3.00	28.78	7.98	F0.05(3,32)=2.90	**
D	120.17	3.00	40.06	11.11	F0.01(3,32)=4.47	**
E	579.50	3.00	193.17	53.60		**
误差	115.33	32.00	3.60			
总和	1020.00	47.00				

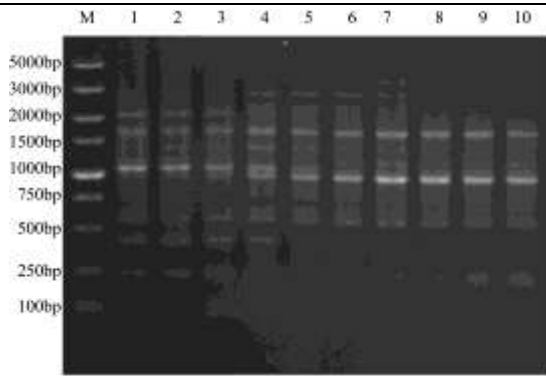


图2 不同退火温度下的扩增结果

Fig.2 Electrophoregram of ERIC-PCR products under different annealing temperatures

注: M: DL5000 Marker; 1~10 对应的退火温度依次为

39、41、43、45、47、49、51、53、55、56 °C

2.3 *B. cereus* 分离株的 ERIC-PCR 指纹图谱分析

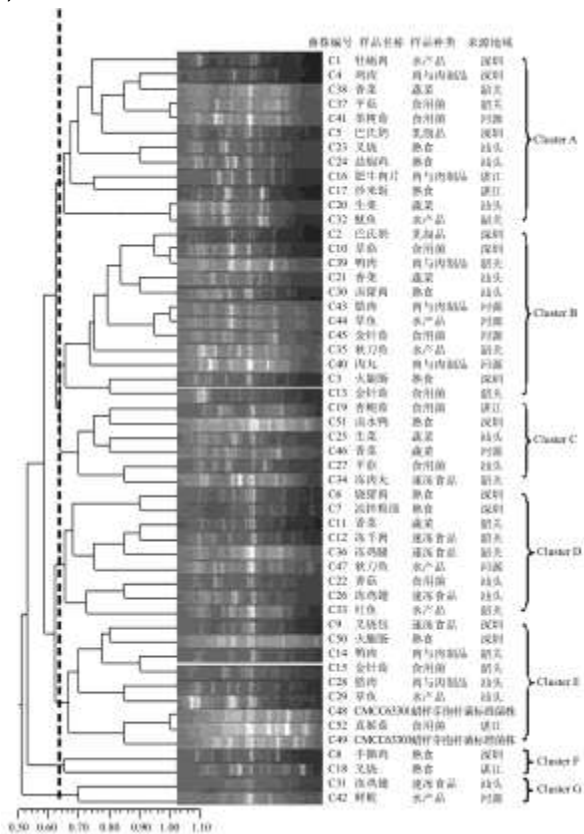


图3 *B. cereus* ERIC-PCR 指纹图谱聚类分析

Fig.3 cluster analysis of ERIC-PCR DNA fingerprints of *B. cereus* strains

注: C1-C47, C50-C52 分别为 50 株 *B. cereus* 分离株, C48-C49 为两株 *B. cereus* 标准菌株。

应用最佳反应体系浓度和最佳退火温度, 对广东省食源性致病菌污染调查中分离得到的 50 株 *B. cereus* 分离株和本实验室保藏的 2 株 *B. cereus* 标准菌株进行 ERIC-PCR 分型, 结果如图 3 所示。ERIC-PCR

指纹图谱显示每株菌能产生 9~17 条、大小在 200~4000 bp 之间的条带, 比廖永红^[3]等人的条带更加丰富, 经三次重复试验结果基本一致, 证明优化的 *B. cereus* ERIC-PCR 反应体系比较稳定可靠, 可应用于食源性 *B. cereus* 分型研究。

从聚类分析结果 (图 3) 可以看出, 50 株分离株可分为 47 个不同的型别, 分辨率系数 DI 为 0.996, 相似系数处于 0.50~1.00 之间, 反映出具有较高的遗传差异性和高度的分辨能力。其中 C37 和 C41, C20 和 C32, C10 和 C39, C43 和 C44, C48 和 C52 菌株两两之间相似系数分别达到 1.00, 可认为是同一型别。当相似系数为 0.64 时, 可分为 7 个聚类簇, A 簇包括 10 个型别, 相似度在 0.64~1.00 之间; B 簇包括 10 个型别, 相似性在 0.66~1.00 之间; C 簇包括 6 个型别, 相似性在 0.70~0.85 之间, D 簇包括 9 个型别, 相似系数在 0.65~0.90 之间, E 簇包括 8 个型别, 相似性均为 0.68~1.00 之间。F 和 G 簇均包括 2 个型别, 相似系数分别为 0.65 和 0.70。

表 4 不同食品来源的菌株在各簇中的分布

Table 4 The distribution of strains from different types of foods in each cluster

簇	肉与肉制品	水产品	速冻食品	熟食	食用菌	蔬菜	奶制品	合计 (菌株数)
A	2	2	0	3	2	2	1	12
B	3	2	0	2	3	1	1	12
C	0	0	1	1	2	2	0	6
D	0	2	3	2	1	1	0	9
E	2	1	1	1	2	0	0	7
F	0	0	0	2	0	0	0	2
G	0	1	1	0	0	0	0	2
合计 (菌株数)	7	8	6	11	10	6	2	50

从食品来源的角度看, 来源于肉与肉制品中的 *B. cereus* 分布在 A、B、E 三个簇, 来源于水产品中的分布在 A、B、D、E、G 五个簇, 来源于速冻食品中的分布在 C、D、E、G 四个簇, 来源于熟食食品中的在 A、B、C、D、E、F 六个簇, 来源于食用菌样品中的分布在 A、B、C、D、E 五个簇, 来源于蔬菜样品中的分布在 A、B、C、D 四个簇, 来源于奶制品的分布在 A、B 两个簇。从表 4 中可以发现, A 和 B 簇是优势菌群, 而且不同食品来源的菌株分散在不同的聚类簇中, 显示了 *B. cereus* 在食品分布中具有高度的遗传多样性。

从来源地域的角度看, 来源于深圳的 *B. cereus* 分布在 A、B、C、D、E、F 五个簇, 来源于湛江的分布

在 A、C、E、F 四个簇, 来源于韶关的分布在 A、B、C、D、E 五个簇, 来源于汕头的分布在 A、B、C、D、E、G 六个簇, 来源于河源的分布在 A、B、C、D、G 五个簇。从表 5 可以直观的看到不同地域来源的菌株在不同簇中均有分布, 显示了广东省内食源性 *B. cereus* 具有高度的遗传多样性。

表 5 不同地域来源的菌株在各簇中的分布

Table 5 The distribution of strains of different geographical sources in each cluster

簇	深圳	湛江	韶关	汕头	河源	合计 (菌株数)
A	3	2	3	3	1	12
B	3	0	3	2	4	12
C	1	1	1	2	1	6
D	2	0	4	2	1	9
E	2	1	2	2	0	7
F	1	1	0	0	0	2
G	0	0	0	1	1	2
合计(菌株数)	12	5	13	12	8	50

3 结论

3.1 与 PFGE、MLST、AFLP 等方法相比, ERIC-PCR 操作简单、成本低、多态性好, 可用于 *B. cereus* 的分型和遗传多样性研究。但 ERIC-PCR 扩增易受 Mg^{2+} 浓度、引物、模板、Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 浓度的影响, 扩增反应条件的变化对 ERIC-PCR 图谱产生较大的影响, 影响分析的准确性和稳定性。同时对于不同的菌种、不同公司的试剂, 体系中要求各组分的浓度也有所不同, 廖永红^[13]等人首先对 *B. cereus* 的 ERIC-PCR 体系进行了单因素优化, 并且建立起了适合 *B. cereus* 的 ERIC-PCR 的反应体系, 但其反应条件得到的条带多态性不够丰富, 导致分辨力不高, 还需要对反应体系进一步优化。

3.2 为了解全国食品中常见食源性致病菌的污染情况及分布规律和遗传多样性, 本实验室对全国各类食品展开污染调查, 收集了大量菌株, 并先后建立起一些食源性致病菌的 ERIC-PCR 分型技术, 叶应旺^[15]等首先成功建立起了阪崎肠杆菌的 ERIC-PCR 优化体系, 之后单增李斯特菌、空肠弯曲杆菌、沙门氏菌 ERIC-PCR 分型优化体系也逐渐建成, 并都取得了良好效果。参照前人的经验, 本研究首先选取 ERIC-PCR 反应体系的五个主要影响因素的 4 个浓度水平对 *B. cereus* 进行正交优化, 从而确定各因素的主次, 各水平的优劣。在退火温度的选择上, 本研究通过设定温度梯度对体系进行优化, 发现 45 °C 时条带清晰而且

丰富, 这有别于文献中^[13]报道的 55 °C, 本实验中 55 °C 时条带虽然清晰, 但条带不够丰富。

3.3 采用优化的 ERIC-PCR 分型体系, 对本实验室广东省食源性致病菌污染调查中采集的肉与肉制品、速冻食品、熟食、水产品、蔬菜、速冻食品、食用菌和奶制品七类食品中分离的 50 个 *B. cereus* 分离株进行分子分型, 得到了条带清晰且丰富的 DNA 指纹图谱, 且三次重复结果一致, 证明优化的 *B. cereus* ERIC-PCR 反应体系比较稳定可靠, 可用于 *B. cereus* 分子分型。从聚类分析结果来看, 50 个分离株可分为 47 个型, 分辨力 DI 为 0.996, 相似系数在 0.50-1.00 之间, 反映出具有较高的遗传多样性和良好的分型效果。相似系数在 0.64 时可将 50 个分离株分为 7 个簇。从不同食品 and 不同地域来源的聚类分布来看, 每个簇中食品种类和地域多样, 从另一个侧面反应了 *B. cereus* 的遗传多样性。该方法具有该方法操作简单, 成本较低, 分型效果好, 克服了传统分型方法的不足, 因此本研究建立的 ERIC-PCR 分型方法适用于大量的食源性蜡样芽孢杆菌的分型研究, 为研究食源性蜡样芽孢杆菌的遗传多样性及其分布规律打下良好的基础。

参考文献

- [1] 周帼萍, 袁志明. 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)污染及其对食品安全的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 357-360
Zhou G P, Yuan Z M. Review on *Bacillus cereus* contamination effects on food safety [J]. Food Science, 2007, 28(3): 357-360
- [2] 张伟伟, 鲁维, 张金兰, 等. 食品中蜡样芽孢杆菌的研究进展[J]. 中国酿造, 2010, 218(5): 1-4
Zhang W W, Lu F, Zhang J L, et al. Research progress of *Bacillus cereus* in food[J]. China Brewing, 2010, 218(5): 1-4
- [3] 王文正. 蜡样芽孢杆菌的噬菌体分型[J]. 医学研究杂志, 1985, 9: 282
Wang W Z. The phage typing of *Bacillus cereus* [J]. Journal of Medical Research, 1985, 9: 282
- [4] 吴光先, 封幼玲, 濮存顺, 等. 我国若干地区 110 株蜡样芽孢杆菌食物中毒菌株生化、血清和噬菌体型的分析[J]. 中国公共卫生, 1986, 5(5): 21-22
Wu G X, Feng Y L, Pu C S, et al. The biotype, serotype, phage-type analysis of 110 *Bacillus cereus* strains of food poisoning in certain regions of China [J]. Chinese Journal of Public Health, 1986, 5(5): 21-22
- [5] Zhong W W, Shou Y L, Yoshida T M, et al. Differentiation of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* by using

- pulsed-field gel electrophoresis [J]. Applied Environmental Microbiology, 2007, 73(10): 3446-3449
- [6] Kuroki R, Kawakami K, Qin L .Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* [J]. Internal medicine. 2009, 48(10): 791-796
- [7] Shangkuan Y H, Yang JF, Lin H C, et al. Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains [J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89: 452-462
- [8] 林一曼,石晓路,邱亚群,等.蜡样芽胞杆菌食物中毒分离株分子分型分析[J].中国公共卫生,2011,27(8):998-999
- Lin Y M, Shi X L, Qiu Y Q. et al. Molecular typing of *Bacillus cereus* strains isolated from food [J]. Chinese Journal of Public Health, 2011, 27(8): 998-999
- [9] Kim K, Cheon E, Wheeler K E, et al. Determination of the most closely related bacillus isolates to *Bacillus anthracis* by multilocus sequence typing. *Yale Journal Biology and Medicine* [J]. 2005, 78(1): 1-14
- [10] Hill K K, Ticknor L O, Okinaka R T, et al. Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(2): 1068-1080.
- [11] Michael EZ, Maureen P K, Andrew C S, et al. Genotyping of *Bacillus cereus* Strains by Microarray-Based Resequencing [J]. PLoS ONE, 2008, 3(7): 1
- [12] 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 QP, Ye Y W, Zhang J M, et al. The structure and function of the ERIC and the application of ERIC-PCR technology [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2006, 16(4): 507-509
- [13] 廖永红,任文雅,孙宝国,等.米醋中蜡状芽孢杆菌 DNA 提取及其 ERIC-PCR 体系建立 [J]. 中国食品学报,2011,11(4): 7-13
- Liao Y H, Ren W Y, Sun B G, et al. Genomic DNA extraction from *Bacillus subtilis* in vinegar precipitation and the optimization of the system of ERIC-PCR [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(4): 7-13
- [14] Nemoy L L, Kotetishvili M, Tigno J, et al. Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-Lactamase-producing *Escherichia coli* isolates [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(4): 1776-1781
- [15] Ye Y, Wu Q, Zhou Y, et al. Analysis of major band of *Enterobacter sakazakii* by ERIC-PCR and development of a species-specific PCR for detection of *E. sakazakii* in dry food samples [J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(3): 392-397