

常见食源性感染致病菌属、种用 PCR-RFLP 及 PCR-SSCP 技术鉴定探讨

洪帮兴, 江丽芳, 胡玉山, 方丹云, 陶剑平, 晏辉钧
(中山大学基础医学院微生物学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨运用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)和聚合酶链反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)进行食源性感染常见致病菌属种鉴定的可行性。【方法】选择细菌 23S rDNA 基因作为鉴别细菌属的靶基因,通过设计合适的通用引物进行 PCR 扩增,并对 13 属食源性感染常见致病菌和 5 种不同血清型大肠杆菌扩增产物的酶切片段进行 RFLP 分析和 SSCP 分析。【结果】运用通用引物可以扩增出 13 属食源性感染常见致病菌的 23S rDNA 基因 *Hpa* II 酶切产物的 RFLP 分析表明,不同种属的致病菌表现出不同的 RFLP 图谱,利于进行细菌属的鉴定。不同种属食源性感染常见致病菌 SSCP 图谱变异性更大,不利于进行种属间鉴别。对 5 种不同血清型大肠杆菌的 23S rDNA 基因扩增产物的 RFLP 和 SSCP 分析表明,不同血清型大肠杆菌表现出相似的 RFLP 图谱,SSCP 图谱的变异性较大,这有利于进行血清型间鉴别甚至株间的鉴别。【结论】PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 具有应用于食源性感染常见致病菌种、属鉴别诊断的潜力。

关键词: 23S rDNA; 限制性片段长度多态性; 单链构象多态性; 聚合酶链反应; 食源性感染

中图分类号: R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)02-0151-05

Application of PCR-RFLP and PCR-SSCP Techniques in the Genus/Species Discriminative Diagnosis of Foodborne Pathogenic Bacteria

HONG Bang-xing, JIANG Li-fang, HU Yu-shan, FANG Dan-yun, TAO Jian-ping, YAN Hui-jun
(Department of Microbiology, Preclinical Medical School, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To study the feasibility of polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technology in the genus/species discriminative diagnosis of foodborne pathogenic bacteria. 【Methods】 23S rDNA gene was selected as target fragment and universal oligonucleotide primers were designed and synthesized. PCR products of 13 genera of foodborne pathogenic bacteria and 5 serotypes *E.coli* were digested with restriction enzyme *Hpa* II, and analyzed with RFLP and SSCP. 【Results】 23S rDNA gene fragment could be amplified from all the 13 genera of foodborne pathogenic bacteria. RFLP analysis of enzyme product manifested that different genera bacteria show different RFLP enzymogram, which are facilitated to genera discrimination. With respect to SSCP analysis, much more mutate fragment displayed in different genera of foodborne pathogenic bacteria was not benefit to genera discrimination. RFLP analysis of enzymolysis product amplified from 5 serotypes *E.coli* manifested that different serotype *E.coli* display similar RFLP enzymogram. With respect to SSCP analysis, much more mutate fragment displayed in different serotype *E.coli* might be benefit to serotype or strain discrimination. 【Conclusion】 PCR-RFLP and PCR-SSCP are useful in the genus/species discrimination diagnosis of foodborne pathogenic bacteria.

Key words: 23S rDNA; restriction fragment length polymorphism; single strand conformation polymorphism; polymerase chain reaction; foodborne infection

[J SUN Yat-sen Univ (Sci Med), 2005, 26(2):151-155]

收稿日期: 2004-09-11

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(2002B3100105); 深圳市科技立项基金资助项目(200304239)

作者简介: 洪帮兴(1973-), 男, 博士生; 江丽芳, 教授, 博士生导师, 通讯作者. E-mail: jianglf@gzsums.edu.cn

近年来随着食源性感染事件的不断发生,引起食源性感染的致病菌也逐渐表现出多样化^[1]。如何迅速查出食源性感染的致病菌是控制食源性感染的关键。常规分离培养及血清学鉴定往往需要 3~5 d 的时间,延误疾病的治疗和疫情的控制。建立在聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 基础上的限制性片段长度多态性分析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 和单链构象多态性分析 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 技术,就是通过扩增病原菌的特异性基因片段,然后通过酶切分析法、单链构象多态性分析进行属^[2,3]的鉴定、甚至属内种、亚种、血清型的鉴定^[4-6]。SSCP 技术甚至可以检测出基因片段中单个碱基的改变。23S rDNA 在许多细菌的属、种、亚种甚至血清型、株等分类层次上都有不同程度的变异性,常被用于细菌在较低分类层次上的鉴别诊断和流行病学亲缘关系追踪^[7,8],如果检测位置选择恰当,不但可以对各属细菌可以进行鉴定,还可以在种、亚种甚至血清型、株等分类层次上进行鉴定。本文旨在探讨选取 23S rDNA 基因片段,运用 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 进行食源性感染常见致病菌属的鉴定,进行大肠杆菌不同血清型别的鉴定,以期为临床快速鉴别诊断及流行病学调查提供方法依据。

1 材料和方法

1.1 菌株的选择与培养

标准菌株选取引起食源性感染的 13 种 (属) 常见致病菌,它们是: 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)、志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*)、单核增殖性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*)、变形杆菌 (*Proteus vulgaris*)、肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 和空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejune*) (表 1)。选取 6 株 5 种不同血清型大肠杆菌 (均为 ATCC 标准菌株)。以上菌株均为本室保存的标准菌株。将菌株复苏后接种于相应的增菌培养基培养 24 h 后转种至相应的

选择培养基培养 24~36 h。

1.2 菌株 DNA 的提取

纯种菌株接种 LB 平板 37 °C 培养 24 h 后,挑取 2~3 个单个菌落与 100 μL 灭菌纯水研磨混匀,95 °C 10 min,Minispin069 离心机 10 000 ×g 离心 1 min,取上清作为 DNA 模板。

1.3 23S rDNA 基因扩增引物的选择

从 GenBank 中提取 40 种细菌的 23S rDNA 基因序列,运用 DNASTAR 软件进行排序,选取细菌变异区两端保守区进行引物设计,预计扩增产物占全长基因的 2/3 以利于细菌的变异性分析。它们是: P_{上游} 5' ACCAGGATTTTGGCTTAGAAG3' (对应于大肠杆菌 23S rDNA 基因 1051-1071 位核苷酸); P_{下游} 5' CACTTACCCCGACAAGG AAT3' (对应于大肠杆菌 23S rDNA 基因 1957-1938 位核苷酸)。扩增长度约为 900 bp。

1.4 23S rDNA 基因片段的扩增与纯化

50 μL 的 PCR 反应体系中含 10×PCR buffer 5 μL, 20 mmol/L dNTP 4 μL, 2 mmol/L MgCl₂ 3 μL, 上、下游引物各 25 pmol (1 μL), 菌株 DNA 模板 1 μL, Taq 酶 5 U (1 μL), 补加灭菌蒸馏水至 50 μL。为扩增出所有目的菌株 23S rDNA 基因片段,扩增过程分为二步,第一步 95 °C 变性 5 min, 95 °C 40 s, 48 °C 40 s, 72 °C 50 s 循环 5 次以扩增引物与模板不完全配对菌株的 23S rDNA 基因片段, 95 °C 40 s, 53 °C 45 s, 72 °C 50 s 循环 25 次, 72 °C 延伸 10 min 以扩增出所有目的菌株的 23S rDNA 基因片段。PCR 产物的纯化采用上海生工公司的 PCR 纯化试剂盒进行,按说明书进行操作。

1.5 23S rDNA 基因片段扩增产物的酶切

运用 DNASTAR 软件,寻找扩增片段内的酶切位点,为便于进行 SSCP 分析,要求酶切后片段大小小于 400 bp。结果选取限制性内切酶 Hpa II 进行 23S rDNA 基因扩增片段的酶切分析。20 μL 酶切反应体系含 10×酶切缓冲液 2 μL, 1 mg/mL BSA 2 μL, PCR 纯化产物 3 μL (1 μg), 限制性内切酶 1 μL (3~4 U), 补足 ddH₂O 至 20 μL, 在 37 °C 酶切 2.5 h。

1.6 RFLP 分析

按文献[9]进行。酶切产物在 80 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶 60 V 电泳 2 h, 电泳结束后,用快速银染法染色,具体是:将电泳后的聚丙烯酰胺凝胶置固定液 1 (体积分数 10% 乙酸) 中固定 30 min,

用纯水洗 3 次,每次 2 min,然后置银染色液(1 g/L AgNO₃,体积分数 0.036 %甲醛)中染色 20 min,轻轻摇动,用纯水洗 5~10 s,在显色液(25 g/L 碳酸钠,体积分数 0.036 %甲醛,0.02 g/L 硫代硫酸钠)中显色 3~10 min 至所需深度。终止液(14.6 g/L EDTA)终止 10 min,固定液 2(体积分数 28.8 %乙醇,体积分数 16.7%甘油)固定 10 min,室温干燥 2 h,观察结果并照相。

1.7 SSCP 分析

5 μL 酶切产物与 5 μL 变性液 (5 mmol/L EDTA, 0.5 g/L 溴酚兰,0.5 g/L 二甲苯青 FF 溶于甲酰胺中)混匀,95 °C 变性 7 min,立即置冰上放置 10 min,取 3~4 μL 加样于 100 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶(8.3 cm × 7.5 cm),在 Bio-Rad 电泳仪上 4 °C 100 V 电泳 30 min,280 V 电泳 60 min。电泳结束后进行快速银染法染色,照相并保存。

2 结 果

2.1 23S rDNA 基因片段的扩增

选择 23S rDNA 基因片段的保守区设计 PCR 通用引物,对于扩增 23S rDNA 基因片段的通用引物,由于引物与模板配对的程度不同,通过调整

PCR 扩增条件,可以在同一条件下扩增出所有目的菌株的基因片段,但 PCR 产物的量不同(图 1)。

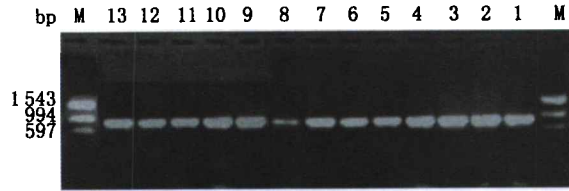


图 1 13 属细菌 23S rDNA 基因片段的扩增

Fig.1 Amplification of 23S rDNA gene fragment of 13 genera bacteria

M: PCR ladder; 1: *Escherichia coli*; 2: *Salmonella enterica*; 3: *Shigella dysenteriae*; 4: *Vibrio cholerae*; 5: *Vibrio parahaemolyticus*; 6: *Staphylococcus aureus*; 7: *Bacillus cereus*; 8: *Proteus vulgaris*; 9: *Yersinia enterocolitica*; 10: *Clostridium perfringens*; 11: *Clostridium botulinum*; 12: *Listeria monocytogenes*; 13: *Campylobacter jejune*

2.2 23S rDNA 基因片段的酶切

为便于 RFLP 和 SSCP 分析,在选择酶切位点时,选择扩增片段内含有多个切点的限制性内切酶,运用 DNASTAR 软件,寻找扩增片段内的酶切位点。结果选取 *Hpa* II 进行 23S rDNA 基因扩增片段的酶切分析。扩增产物酶切后酶切片段的的大小见表 1。

表 1 本研究所用菌株及扩增片段 *Hpa* II 酶分析一览

Table 1 Bacteria strains and *Hpa* II digestion fragments in our study

Bacterium No.	Bacterium name	23S rDNA accession number	<i>Hpa</i> II number	Digestion fragments
1	<i>Escherichia coli</i>	V00331	7	247,149,166,36,339,6,51,37
2	<i>Salmonella enterica</i>	U77919	7	247,149,166,36,339,6,51,37
3	<i>Shigella dysenteriae</i>	NC004741	7	247,149,166,36,339,6,51,37
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	X68425	4	84,117,246,323,94
5	<i>Vibrio cholerae</i>	AE003852	4	244,201,339,57,37
6	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NC004603	5	245,201,339,6,53,37
7	<i>Bacillus cereus</i>	X94448	5	84,85,9,27,559,94
8	<i>Clostridium botulinum</i>	X65602	2	84,667,94
9	<i>Clostridium perfringens</i>	BA000016	3	152,441,164,94
10	<i>Proteus vulgaris</i>	AJ549516	4	467,16,36,338,71
11	<i>Yersinia enterocolitica</i>	U77925	6	247,149,16,36,342,57,37
12	<i>Campylobacter jejune</i>	X94448	2	164,623,94
13	<i>Listeria monocytogenes</i>	X64533	4	84,86,36,566,94

2.3 13 属食源性感染常见致病菌 23S rDNA 基因片段扩增产物的 RFLP 和 SSCP 分析

对 13 属食源性感染常见致病菌 23S rDNA 基因片段扩增产物经 *Hpa* II 酶切后 RFLP 分析结果

见图 2。13 属细菌均有其特异的 RFLP 图谱,每种细菌酶切产物的大小均与预期结果一致(表 1)。从 RFLP 图谱还可以得出,大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌的图谱相似,说明它们之间的同源性高

于其它细菌,其间的亲缘关系较近。同理,霍乱弧菌和副溶血弧菌的酶切图谱相似,在分类上应属于同一科。不同科或属之间的酶切图谱差异较大,如球菌类的葡萄球菌属与肠杆菌科各属细菌之间。

SSCP分析结果表明,每种细菌经酶切后出现比 RFLP 更多的条带,这一方面可能是由于细菌中存在不同的 23S rDNA 基因拷贝,在多拷贝基因中存在不同的变异,另一方面,酶切产物的单链与双链的同时存在。同时,对于 RFLP 相似的图谱(如肠杆菌科的大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌及弧菌科的霍乱弧菌和副溶血弧菌),在 SSCP 图谱中表现出更大的变异性,这有利于对这些细菌进行进一步的鉴别。

2.4 大肠杆菌不同血清型 23S rDNA 基因片段扩增产物的 RFLP 和 SSCP 分析

对 6 株 5 种不同血清型大肠杆菌 23S rDNA 基因片段扩增产物经 *Hpa* II 酶切后 RFLP 分析结果表明,6 株细菌均有其特异的 RFLP 图谱,其中肠侵袭性大肠杆菌(enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC)与肠集聚性大肠杆菌(enteroaggressive *Escherichia coli*, EA_{gg}EC)RFLP 图谱与其他 3 种血清型 RFLP 图谱差异较大,而肠产毒性大肠杆菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)、肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)和肠致病性大肠杆菌(enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)的 RFLP 图谱相似,所有 5 种不同血清型大肠杆菌 RFLP 图谱在一些条带是

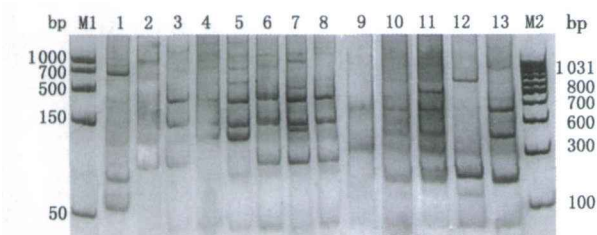


图 2 13 属细菌 23S rDNA 基因扩增产物的 *Hpa* II 酶切 RFLP 分析

Fig.2 RFLP analysis of 23S rDNA gene fragment of 13 genera bacteria after digestion with restriction enzyme *Hpa* II

M1:50 bp DNA marker; 1: *Bacillus cereus*; 2: *Campylobacter jejune*; 3: *Staphylococcus aureus*; 4: *Vibrio parahaemolyticus*; 5: *Vibrio cholerae*; 6: *Shigella dysenteriae*; 7: *Salmonella enterica*; 8: *Escherichia coli*; 9: *Proteus vulgaris*; 10: *Clostridium botulinum*; 11: *Clostridium perfringens*; 12: *Listeria monocytogenes*; 13: *Yersinia enterocolitica*; M2: 100 bp DNA marker

不变的(图 2)。

SSCP 分析结果见图 3, 每种血清型大肠杆菌经酶切后出现比 RFLP 更多的条带, 这一方面可能是由于细菌中存在不同的 23S rDNA 基因拷贝, 在多拷贝基因中存在不同的变异, 另一方面, 酶切产物的单链与双链的同时存在。对于具有相似 RFLP 图谱的 ETEC、EHEC 和 EPEC, 在相应的 SSCP 分析图谱中, EHEC 在 100 ~ 300 bp 间出现不同的带型, EPEC 在 100 bp 左右出现不同的带型, 这有助于区分这 3 个血清型大肠杆菌。对于 EIEC 与 EA_{gg}EC 大肠杆菌, 在 SSCP 图谱中仍表现与其他血清型大肠杆菌不同。在同一血清型(如 ETEC)的不同分离株中, 可出现略有不同的图谱, 这可能是不同分离株间出现了核苷酸的变异所致。

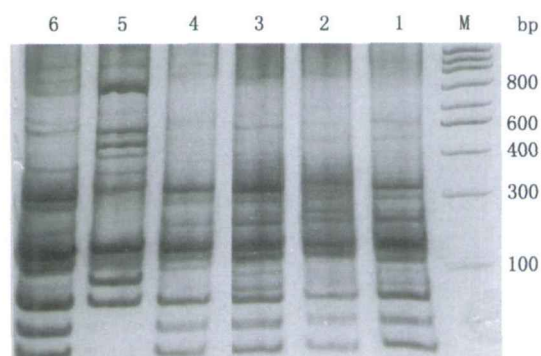


图 3 大肠杆菌 23S rDNA 基因片段扩增产物 *Hpa* II 酶切的 SSCP 分析

Fig.3 SSCP analysis of 23S rDNA gene fragment of *Escherichia coli* after digestion with restriction enzyme *Hpa* II

M:100 bp DNA marker; 1: ETEC; 2:EHEC; 3:EPEC; 4:ETEC; 5: EA_{gg}EC; 6:EIEC

3 讨论

运用 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 进行基因突变和变异性分析已在很多方面进行了广泛的应用。RFLP 可以对细菌的基因型进行初步的分析, SSCP 可以检测到基因的点突变水平, 可以利用简单 RFLP 技术对临床巴尔通氏体属的 4 个亚种进行快速区分^[2], 利用 PCR-SSCP 技术可以对沙门氏菌的不同血清型进行快速鉴定^[4]。

对食源性感染常见致病菌的检测, 有很多方法可以进行, 但常规培养法往往需要几天的时间,

且后续的分离及血清学鉴定需要更长的时间,一方面延误了病情的治疗,疫情的控制,另一方面,由于对菌株的遗传特性不能快速做出诊断,很难从流行病学上追溯其来源及与其它菌株的遗传关系,不利于在流行病学方面控制食源性感染的发生。

本研究通过 RFLP 和 SSCP 的结合,分析了其在 13 属常见致病菌中的意义。首先运用细菌通用保守基因 23S rDNA 作为靶基因,选取其中的特异区段作为鉴定片段,通过 PCR 扩增使靶信号放大,选择该片段内的多位点限制性内切酶进行酶切,每属细菌都有其特征性的 RFLP 图谱,据此可以进行初步鉴定。即使某属细菌在酶切位点发生变异,但不影响其它位点的酶切效果,依然可以进行种属属性的鉴定,这在肠杆菌科三属细菌(大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌)及弧菌科中都有体现。单个位点的变异可以使大肠杆菌、志贺氏菌与沙门氏菌区分开来,但 3 者的 RFLP 图谱是相似的,说明其在亲缘关系上接近,但变异又可以使它们区分开来,对于霍乱弧菌和副溶血弧菌的 RFLP 图谱也是典型的例证。

本研究同时分析了 RFLP 和 SSCP 技术在大肠杆菌不同血清型鉴别中的可行性。每种血清型大肠杆菌都有其相似的 RFLP 图谱,不同血清型大肠杆菌的 SSCP 图谱是有一定差异的,根据这种差异一方面反映了不同血清型基因的变异性,可以将不同的血清型进一步区分开来。这为建立在属、种甚至血清型水平鉴别诊断的寡核苷酸芯片技术奠定了基础^[10]。同时,在同一血清型的不同分离株间,也会出现个别的核苷酸变异现象,这在流行病学研究上有重要的意义。

参考文献:

[1] Hall JA, Goulding JS, Bean NH, *et al.* Epidemiologic profiling: evaluating foodborne outbreaks for which no pathogen was isolated by routine laboratory testing;

United States, 1982-9[J]. *Epidemiol Infect*, 2001,127(3):381-7.

- [2] Matar GM, Koehler JE, Malcolm G, *et al.* Identification of *Bartonella* species directly in clinical specimens by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment [J]. *J Clin Microbiol*, 1999,37(12):4045-7.
- [3] Scheinert P, Krausse R, Ullmann U, *et al.* Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of 16S-23S rRNA spacer[J]. *J Microbiol Methods*, 1996,(26): 103-17.
- [4] Nair S, Lin TK, Pang T, *et al.* Characterization of *Salmonella* serovars by PCR-single strand conformation polymorphism analysis[J]. *J Clin Microbiol*, 2002,40(7): 2346-51.
- [5] Botelho BA, Bando SY, Trabulsi LR, *et al.* Identification of EPEC and non-EPEC serotypes in the EPEC serogroups by PCR-RFLP analysis of *flaC* gene [J]. *J Microbiol Methods*, 2003,54(1):87-93.
- [6] Hein I, Mach RL, Farnleitner AH, *et al.* Application of single-strain conformation polymorphism and denaturing gradient gel electrophoresis for *fla* sequence type of campylobacter jejune [J]. *J Microbiol Methods*, 2003, (52):305-13.
- [7] Schmalenberger A, Schwieger F, Tebbe CC. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001(67):3557-63.
- [8] 洪帮兴,江丽芳,胡玉山,等.23S rRNA 基因序列分析及其在细菌鉴别诊断中的应用[J]. *中华微生物学免疫学杂志*,2004,24(3):241-4.
- [9] 卢圣栋. 分子生物学实验技术[M]. 第2版. 北京:中国协和医科大学出版社,1999. 85-8.
- [10] Hong BX, Jiang LF, Hu YS, *et al.* Application of oligonucleotide array technology for the rapid detection of pathogenic bacteria of foodborne infections [J]. *J Microbiol Methods*, 2004,58(3): 403-11.

(编辑 张敏瑞)