

粪便样品中大肠杆菌多态性分子研究

张美玲 周志华 赵立平*

(上海交通大学生命科学技术学院微生物分子生态学与生态基因组学实验室 上海 200240)

摘要: 以粪便样品中分离到的大肠杆菌为研究对象, 比较了 3 种不同方法在分离鉴定大肠杆菌过程中的应用。首先, 通过传统方法从粪便样品中分离, 筛选和确定了一批大肠杆菌疑似菌株, 再用现代分子生物学方法对待鉴定的大肠杆菌疑似菌株, 已知大肠杆菌 MG1655 以及几种其它细菌进行 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) 分析, 最后利用 ERIC-PCR 技术在个体水平上分析菌株的多样性。结果表明, 所有由传统方法确定的大肠杆菌疑似菌株和 MG1655 都属于同一 ARDRA 型, 并与其它细菌的 ARDRA 条码型不同。这说明 ARDRA 分析得到的结果与传统分析方法的结果吻合, 利用 ARDRA 分析可以区分大肠杆菌和其它肠道细菌。但是在本实验中 ARDRA 分析不能反映大肠杆菌中不同菌株之间的多样性, ERIC-PCR 则可以区分它们。

关键词: 大肠杆菌, ARDRA, ERIC-PCR, 多态性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0005-05

Polymorphism of *Escherichia coli* Isolated from the Fecal

ZHANG Mei-Ling ZHOU Zhi-Hua ZHAO Li-Ping*

(School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240)

Abstract: In this study, three methods for identification of *E. coli* were compared. The conventional method was employed to select and identify the suspicious *E. coli* isolates from a fecal sample. PCR based ARDRA analysis was then carried out to distinguish these *E. coli* isolates, *E. coli* MG1655 and other bacterial species. All the potential *E. coli* isolates and *E. coli* MG1655 had the identical ARDRA banding pattern while the other bacterial species showed the different patterns. The result indicated that the ARDRA analysis was consistent with the traditional method for identification of *E. coli* and could be the practical method for distinguishing *E. coli* from other intestinal bacterial species. The ERIC-PCR analysis provided abundant polymorphism between different *E. coli* isolates, and might be a powerful approach for elucidating the genetic diversity among isolates of the same species.

Key words: *Escherichia coli*, ARDRA, ERIC-PCR, Polymorphism

大肠杆菌普遍存在于人类及温血动物的肠道中。由于在含有沙门氏菌及志贺氏菌的动物粪便中经常可以发现大肠杆菌的“踪迹”, 所以大肠杆菌就作为粪便污染的指示菌, 若食品及饮用水中大肠杆菌超标, 就表明发生了粪便污染^[1]。

对大肠杆菌进行准确鉴定在医药学, 卫生学及生态学中有很重要的意义, 传统的鉴定方法是根据菌落的形态, 染色镜检, 及生理生化反应 (包括乳糖发酵, 靛基质, 甲基红, V-P 试验, 枸橼酸盐) 对分离菌进行检测, 但是这种方法费时费力, 需要多项实验结果, 而且还容易出现误判^[2], 在实际操作中有很大的局限性。

近年来, 现代分子生物学技术的发展使得解决这一难题成为可能。Vanechoutte 等

* 通讯作者 Tel: 021-54744263, E-mail: lpzhao@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2004-05-13, 修回日期: 2004-06-04

利用 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) 对菌进行鉴定^[3]。ARDRA 是基于 PCR 技术选择性扩增 rDNA 片段, 再进行限制性酶切片段长度多态性分析, 由于 rDNA 在种内具有高度保守性而在种间具有一定多态型, 所以该方法已经广泛应用于揭示微生物系统发育关系和种间多样性^[4]。但是由于 ARDRA 分析一般只能区分到属及种的水平, 为了避免这一分析的局限性, 本实验中我们尝试着利用 ERIC-PCR 对各菌株多样性进行分析。

ERIC 序列 (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence) 是首先在肠道细菌基因组中发现的长为 126 bp 的非编码保守重复序列, 此序列一般定位于基因组内可转录的非编码区或与转录有关的区域。ERIC 序列在不同的细菌基因组中的拷贝数和定位都不同, 所以可以通过对 PCR 产物电泳图谱的比较研究, 在种甚至菌株的水平上对样品进行分析^[5,6]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌: 大肠杆菌疑似菌是从一例健康儿童新鲜粪便样品中分离筛选而得; 大肠杆菌 MG1655, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 由本实验室保存; 嗜水产气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 和红平红球菌 (*Rhodococcus* sp.) 是本室从环境中分离所得。

1.1.2 试剂及药品: 琼脂糖, dNTP, *Taq* DNA polymerase 购自上海博采生物技术公司, 溶菌酶, RNase, *Hinf* I, *Csp6* I, EB 溶液, 100bp Marker 均购自上海生工生物工程公司。PCR 扩增所用引物委托上海生工生物工程公司合成。

1.1.3 培养基: 伊红美兰培养基 (EMB): 蛋白胨 10 g, 乳糖 10 g, 伊红 0.4 g, 美兰 0.065 g, 磷酸氢二钾 2 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水定容至 1,000 mL, pH 7.0, 1.0×10^5 Pa 高压灭菌 30 min。LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 蒸馏水定容至 1,000 mL, pH 7.0, 1.0×10^5 Pa 高压灭菌 30 min。

1.1.4 16S rDNA 扩增引物^[7]: 上游引物序列 P0: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游引物序列 P6: 5'-CTACGGCTACCTTGTTCAG-3'。

ERIC PCR 引物^[8]: 上游引物序列 ERIC1R: 5'-ATGTAAGCTCCTCGGGAATCCA-3'; 下游引物序列 ERIC2: 5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGATGCG-3'。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌的筛选: 取 1 g 新鲜的粪便样品, 用 10 mL 无菌的 PBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 , pH 7.4) 悬浮, 再制成稀释度为 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 的悬液, 取 150 μL 悬液涂布伊红美兰选择性平板, 37℃ 培养 24 h 后, 挑选菌落数在 30 ~ 300 之间的平板, 选取有紫黑色金属光泽的典型菌落。在 LB 平板上两次划线纯化以后编号, 挑选单菌落置于甘油管中保存, 用于后续研究。

1.2.2 用传统的方法进行鉴定: (1) 染色镜检: 从筛选到的具有紫黑色金属光泽的典型菌落中随机挑选 10 个菌落进行革兰氏染色。(2) 乳糖发酵试验: 发酵管中装有加了溴甲酚紫指示剂的乳糖蛋白胨液体培养基, 并倒置一德汉氏小套管, 将筛选到的具有紫黑色金属光泽的单菌落接种于该培养基中, 37℃ 培养 24 h。(3) IMViC 反应: 方法参照《食品卫生检验手册》^[9]。

1.2.3 纯菌 DNA 的提取: 方法参照《精编分子生物学实验指南》^[10]。

1.2.4 ARDRA 酶切分析: (1) 16S rDNA 扩增: 以各菌 DNA 为模板, P0 和 P6 为引物, 扩增 16S rDNA 区域, 反应条件: 95℃ 预变性 1.5 min, 先 5 个循环 (95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 4 min), 再 5 个循环 (95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 4 min), 最后经 25 个循环 (95℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 4 min), 72℃ 延伸 10 min, 60℃ 延伸 10 min, 结束反应。(2) 酶切分析: 利用两种限制性内切酶 *Hinf* I 和 *Csp*6 I 分别对所扩增到的 16S rDNA 片段进行酶切分析。20 μ L 酶切体系, 其中 16S rDNA 的扩增产物 500 ng, 限制性内切酶 0.4 μ L, 酶缓冲液 2 μ L。37℃ 温浴 4 h。(3) 电泳: 两种酶切分析的产物经琼脂糖凝胶电泳 (凝胶中含有 0.25 μ g/mL EB) 后用 UVI 成像系统检测照相。(4) 测序: 随机挑选一个分离株的 16S rDNA 进行测序 (委托上海博亚生物公司)。

1.2.5 ERIC-PCR 对所分离到的大肠杆菌进行多样性分析: (1) PCR 扩增: 以 ERIC1R 和 ERIC2 为引物进行 ERIC-PCR 扩增, 反应条件: 95℃ 预变性 7 min, 然后经 30 个循环 (94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 65℃ 8 min)。最后 65℃ 延伸反应 16 min。(2) 电泳: ERIC-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳 (凝胶中含有 0.25 μ g/mL EB) 后用 UVI 成像系统检测照相。

2 结果

2.1 染色镜检及生理生化反应结果

根据传统的筛选方法共得到 52 个具有紫黑色金属光泽的典型菌落, 按分离株编号为 1~52。从中随机挑选的 10 个分离株经过革兰氏染色后全部确定为革兰氏阴性无芽孢短杆菌。52 个分离株在乳糖发酵反应中均可以发酵乳糖产酸产气, IMViC 反应结果均为 + + --, 这些传统的方法可以确定 52 个分离株为大肠杆菌阳性——暂定为大肠杆菌疑似菌。

2.2 ARDRA 分析的结果

首先分析了 MG1655, 30 号 34 号分离株, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Aeromonas*, 和 *Rhodococcus* 的 16S rDNA 全长扩增产物的酶切图谱 (图 1), 电泳图表明 30 号和 34 号与大肠杆菌 MG1655 的酶切图谱一致, 而与其它菌有一定的差异。再分析了 1, 2, 4, 5,

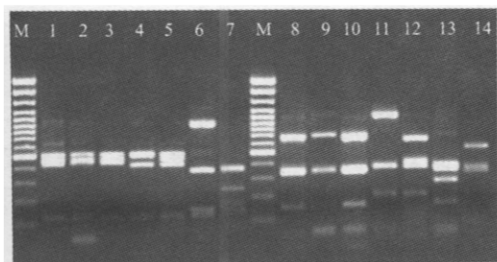


图 1 大肠杆菌疑似菌和其它各菌的 ARDRA 分析电泳图

M DNA marker, 1~7 利用 *Csp*6 I 酶切 MG1655, 30 号分离株, 34 号分离株, *S. aureus*, *B. subtilis*, *A. hydrophila*, *Rhodococcus* sp., 8~14 利用 *Hinf* I 酶切 MG1655, 30 号分离株, 34 号分离株, *S. aureus*, *B. subtilis*, *A. hydrophila*, *Rhodococcus* sp.

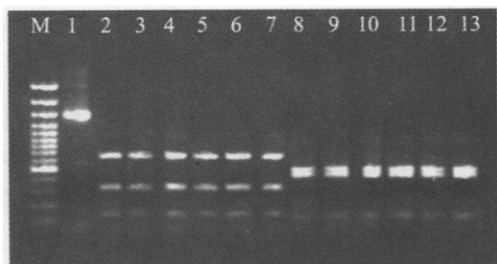


图 2 不同分离株的 ARDRA 电泳图

M DNA marker, 1 阳性对照, 2~7 利用 *Hinf* I 酶切 MG1655, 分离株 1、2、4、5、9、8~13 利用 *Csp*6 I 酶切 MG1655, 分离株 1、2、4、5、9

9, 5 个分离株的 ARDRA 图谱, 结果表明它们与上述分离株及 MG1655 属于同一 ARDRA 型 (图 2), 其它分离株也是同样属于这一类型 (数据省略)。为了进一步验证这些分离株确实为大肠杆菌, 我们又随机抽取一个分离株, 对其 16S rDNA 全长进行测序。结果证实该分离株为大肠杆菌 (与已知大肠杆菌 16S rDNA 序列的同源性为 100%)。结合 ARDRA 分析的结果, 可以断定我们分离到的 52 个疑似菌全为大肠杆菌。从而可以得出 ARDRA 分析与传统分析方法结果一致的结论。

2.3 ERIC-PCR 分析结果

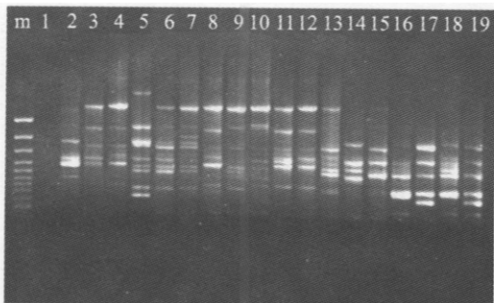


图3 不同分离株的 ERIC-PCR 扩增电泳图
M DNA marker, 1 阴性对照, 2 MG1655, 3~19 分别为 4、1、19、20、21、23、29、31、36、40、46、33、35、37、41、49、51 号分离株

由于一般同种细菌的 rDNA 区域高度保守, 所以我们尝试着用 ERIC-PCR 来反映大肠杆菌不同菌株间的多样性。以各大肠杆菌分离菌株的 DNA 为模板进行 ERIC-PCR 扩增, 扩增产物的电泳图显示大多数分离株间的 ERIC-PCR 图谱有差异, 表明 ERIC-PCR 分析可以揭示非常丰富的个体水平上的多样性。但有些分离株间的图谱却极为相似, 如图 3 中 11 和 12 道 ERIC-PCR 图谱的相似性为 100%, 根据 ERIC-PCR 指纹图谱的异同, 我们可以将这 52 个分离株分成 34 个组。因此, 可以认为各个组内的分离株为同一菌株。

3 讨论

大肠杆菌是食品及药品卫生检测中的一个重要指标, 很多国家都有针对大肠杆菌检测的不同方案。传统的检测大肠杆菌的方法依靠选择性培养基培养, 形态学观察, 生理生化反应, 和免疫学特性^[11]。我国现在食品卫生学中常用的是 IMViC 法, 即吲哚, 甲基红, 伏-普和柠檬酸盐这 4 个反应, 但是由于这种检测方法十分费时, 培养时间长达 24 h 甚至 48 h, 出结果所需的时间长, 有时还要结合其他一些反应如乳糖发酵, 免疫学反应及形态观察才能得出最终结论。我们的研究表明本实验中所分离的 52 个大肠杆菌疑似菌菌落及阳性对照的大肠杆菌株都属于同一 ARDRA 型。因此, 这些 ARDRA 条带可以作为大肠杆菌的分子标记取代传统的分析方法, 快速准确地从疑似菌中鉴定出大肠杆菌。

在医药卫生系统的检测工作, 有时也需要区分大肠杆菌中的不同菌株, 例如, 鉴定出致病大肠杆菌。现在随着 PCR 这一专一快速高效的检测手段的发展, 许多研究就是利用 PCR 技术来检测病原微生物^[12], 例如编码葡萄糖苷酸酶 (GUD) 的 *uidA* 基因和编码谷氨酸脱羧酶 (GAD) 的 *gadA/B* 基因就经常用来做探针检测大肠杆菌^[13,14]。但是这些方法仍会有假阳性出现^[15], 说明针对大肠杆菌或致病大肠杆菌的特异引物还有待于我们进一步发掘。本实验中所使用的 ERIC-PCR 可以将定性的菌在菌株水平上进行分析, 将它们的多样性展现出来, 所以, 我们可以从 ERIC-PCR 指纹图谱入手, 寻找所有大肠杆菌共有的条带, 或致病大肠杆菌所共有的条带, 希望可以设计一种能够专一检测大肠杆菌的方法。这将对医药卫生系统的检测工作提供很大的帮助。

本文以大肠杆菌为例揭示了分子检测方法在微生物鉴别中的应用, 这些方法不受

菌株是否纯培养的限制, 对于一些难于培养或者不知道培养条件的菌株都可以通过扩增其 DNA 的某些片段或者扩增 16S rDNA 全长来实现。这对于发现新的菌株及对已知菌株做进一步的分析有很重要的现实意义。

参 考 文 献

- [1] Gauthier F, Archibald F. *Water Res*, 2001, **35**: 2207 ~ 2218.
- [2] 祝锡林. 中国药事, 1997, **11** (1): 55 ~ 56.
- [3] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. *Nucleic Acids Res*, 1991, **24**: 6823 ~ 6831.
- [4] 陈晓蕾, 张忠泽. 微生物学杂志, 1999, **19** (4): 40 ~ 44.
- [5] Hulton C S J. *Mol Microbiol*, 1991, **5**: 825 ~ 834.
- [6] 陈迎春, 曹又方, 赵立平, 等. 微生物学通报, 2002, **29** (6): 28 ~ 32.
- [7] Di Cello F, Bevivino A, Chiarini L, *et al.* *Appl Environ Microb*, 1997, **63**: 4485 ~ 4493.
- [8] Versalovic J, Koeuth T. *Nucleic Acids Res*, 1991, **24**: 6823 ~ 6831.
- [9] 吕保英主编. 食品卫生检验手册, 微生物检验手册 (第一版). 天津: 天津科技翻译出版公司, 1993.
- [10] 奥伯斯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南 (第一版). 北京: 科学出版社, 1999.
- [11] Min J, Baumann A J. *Anal Biochem*, 2002, **303**: 186 ~ 193.
- [12] Meng J, Doyle M P, Mitchell S E, *et al.* *Int J Food Microbiol*, 1996, **32**: 103 ~ 113.
- [13] Martins M T, Rivera I G, Clark D I, *et al.* *Appl Environ Microb*, 1993, **59**: 2271 ~ 2276.
- [14] McDaniels A E, Rice E W, Reyers A L, *et al.* *Appl Environ Microb*, 1996, **62**: 3350 ~ 3354.
- [15] Green D H, Lewis G D, Rodtong S, *et al.* *J Microbiol Meth*, 1991, **13**: 207 ~ 214.