

# 食源性单增李斯特菌的 ERIC-PCR 和 Sau-PCR 分型研究

ERIC-PCR and Sau-PCR analysis of food-borne *Listeria monocytogenes*

赵一鸣<sup>1,2</sup> 石磊<sup>1,2</sup> 孟赫诚<sup>1,2</sup> 张志刚<sup>2</sup> 闫鹤<sup>1,2</sup>

ZHAO Yi-ming<sup>1,2</sup> SHI Lei<sup>1,2</sup> MENG He-cheng<sup>1,2</sup> ZHANG Zhi-gang<sup>2</sup> YAN He<sup>1,2</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640; 2. 福建省厦门银祥集团有限公司, 福建 厦门 361100)

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 2. Xiamen Yinxiang Group CO., Ltd, Xiamen, Fujian 361100, China)

**摘要:**对从广州市天河区超市和菜市场及厦门某食品加工厂分离得到的单增李斯特菌进行 ERIC-PCR 和 Sau-PCR 检测, 进行溯源研究及遗传多样性分析。ERIC-PCR 将 22 株单增李斯特菌共分为 8 个基因型, 其中以 h 型为主, 共有 8 株菌。Sau-PCR 方法将这批菌分为 7 个基因型, 主要型别为 E 型和 G 型, 二者共占 50%。两种分型方法的结果呈现出一定的差异与关联, 使用两种不同分型方法进行综合分析, 有助于更好地认识单核细胞增生李斯特菌(LM)菌株间的遗传关系和流行病学特点。

**关键词:**单增李斯特菌; ERIC-PCR; Sau-PCR; 溯源研究; 遗传多样性

**Abstract:** To investigate the distribution of serotypes, genetic relativity and epidemiological characteristic of *Listeria monocytogenes* (LM). 22 LM strains isolated from Guangzhou and Xiamen were investigated by ERIC-PCR and Sau-PCR. Results of ERIC-PCR showed that these strains were distributed in 8 patterns (a-h). The main pattern was pattern h, and the number of strains was 8. Genotyping using Sau-PCR showed that all tested strains were grouped into 7 clusters (A-G). These results indicated the genetic relativity and epidemiological characteristic of different LM food-borne isolates.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; ERIC-PCR; Sau-PCR; tracing; multigenic types

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)为革兰氏阳性短杆菌, 是一种重要的食源性致病菌, 可引起人和动物多种疾病, 主要表现为流产、脑膜炎、败血症等, 易感人群为新生儿、孕妇、老年人以及免疫功能缺陷者。其在

自然界中分布广泛, 如土壤、污水、饲料、动物、人和动物的粪便中等, 而且在食品加工生产过程和存贮期间对很多食品(如蛋白质含量丰富的蛋类及奶酪、生猪肉以及肉制品、即食食品等)都有不同程度的污染<sup>[1]</sup>, 该菌对外界环境适应能力极强, 在不利因素如低温、高渗透压、酸性环境、抗菌物质中仍能生长<sup>[2]</sup>。大多数发达国家人类李斯特菌病发生率约为每 100 万人 2~15 例, 死亡率为 20%~30%<sup>[3]</sup>。分型技术是流行病学调查的有力工具, 它根据细菌的生化特点或基因组成, 能够分析不同来源菌株间的关系, 如分析从病人和环境分离到的菌株是否为相关菌株, 同时还能为追踪溯源提供证据, 如查找食物中毒或流行性疾病爆发的感染源。Seong-Keun Byun 等<sup>[4]</sup>采用血清分型和 RAPD 分型方法分析了从韩国国内和进口肉类中分离到的 54 株单增李斯特菌, 结果表明从美国进口牛肉中以及从丹麦猪肉中分离到的菌株分别与从韩国国内牛肉和猪肉中分离到的菌株有很大的相关性。毕水莲等<sup>[5]</sup>运用 Sau-PCR 和 AFLP 两种分型方法对广州一起由副溶血弧菌引起的食物中毒事件进行分型分析后发现, 1 株人源分离菌与 2 株食源性分离菌株为同一型别, 表明此次食物中毒事件是由同一株副溶血弧菌所引起的。通过分型溯源试验, 研究单增李斯特菌(LM)流行病学特点和规律, 对预防单增李斯特菌流行及大范围的爆发具有及其重要的意义。

目前, 针对单增李斯特菌(LM)流行病学方法的研究, 传统上多以表型分析为主, 最常见的是血清分型, 其次为噬菌体分型等<sup>[6-8]</sup>, 这些传统分型方法不仅重复性差且分辨力不高, 因此通常存在较大的误差<sup>[9,10]</sup>。近 20 年间发展起来的分子分型技术是新兴起的流行病学调查方法, 它以 DNA 为基础, 在克服传统分型方法不足的基础上, 还可以从遗传学角度对细菌的流行规律进行探讨。其中, 肠杆菌间共有重复

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(编号: 31201363);

广东省自然科学基金(编号: 10451064101005159)

作者简介: 赵一鸣(1989—), 女, 华南理工大学在读硕士研究生。

E-mail: zhaoyiming1129@126.com

收稿日期: 2014-09-26

序列 (enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC-PCR) 首先应用于大肠杆菌中<sup>[11]</sup>, 之后逐渐扩展到其他常见的人类病原菌中, 如沙门氏菌以及副溶血性弧菌等<sup>[12-15]</sup>。1996 年, JerSek<sup>[16]</sup> 将该技术用于李斯特菌属的鉴定与分型, 之后该技术逐渐发展起来。2005 年, Corich 等<sup>[17]</sup> 发明了一种全新的分型技术——Sau-PCR。该项技术是基于 AFLP 和 RAPD 发展起来的, 它既克服了 RAPD 的重复性差和 AFLP 操作繁琐等特点, 同时又具备 AFLP 稳定性好和 RAPD 简便快捷等优点。本研究拟结合 ERIC-PCR 和 Sau-PCR 两种现代分型技术对从广州市天河区菜市场、超市及厦门某食品加工厂采集到的肉制品中分离得到的 22 株单增李斯特菌进行基因分型, 以了解单增李斯特菌各菌株间的遗传相关性 & 流行病学特点。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

22 株单增李斯特菌 (表 1) 分离自广州市天河区菜市场、超市及厦门某养殖场采集到的肉制品起止时间为 2012 年 8 月至 12 月。

表 1 菌株信息<sup>†</sup>  
Table 1 The information of 22 LM strains

菌株编号	采样地点	来源	血清型	是否含 Tn916
LM1	市场一	肉丸	1/2b (或 3b)	+
LM2	市场一	瘦肉	1/2a (或 3a)	+
LM3	超市一	无公害瘦肉	1/2a (或 3a)	+
LM4	市场二	瘦肉	1/2a (或 3a)	+
LM5	市场一	瘦肉	1/2a (或 3a)	+
LM6	超市一	猪肉滑	1/2c (或 3c)	+
LM7	超市二	猪肉馅	1/2b (或 3b)	+
LM8	超市二	瘦肉	1/2b (或 3b)	+
LM9	厦门	瘦肉	1/2a (或 3a)	+
LM10	厦门	瘦肉	1/2a (或 3a)	+
LM11	厦门	瘦肉	1/2a (或 3a)	+
LM12	厦门	瘦肉	1/2c (或 3c)	+
LM13	市场一	瘦肉	1/2b (或 3b)	—
LM14	超市一	夹心肉	1/2c (或 3c)	—
LM15	超市一	无公害瘦肉	1/2b (或 3b)	—
LM16	厦门	瘦肉	1/2a (或 3a)	—
LM17	市场一	排骨	1/2b (或 3b)	—
LM18	市场一	排骨	1/2c (或 3c)	—
LM19	市场一	排骨	1/2b (或 3b)	—
LM20	市场一	排骨	1/2a (或 3a)	—
LM21	超市一	排骨	1/2b (或 3b)	—
LM22	市场一	瘦肉	1/2a (或 3a)	—

<sup>†</sup> +: 阳性; —: 阴性。

1.2 仪器和试剂

PCR 仪: T100 型, 美国 Thermo 公司;  
紫外分光光度计: SmartSpec Plus 型, 美国 Bio-Rad 公司;  
凝胶成像系统: GelDocEQ 型, 美国 Bio-Rad 公司;  
限制性内切酶 SAU3AI; 150 U, 大连宝生物工程有限公司 (Takara);  
Taq polymerase; 250 U, 大连宝生物工程有限公司 (Takara);  
DNA 试剂盒: 中国美基公司 (Magen)。

1.3 试验方法

1.3.1 LM 全基因组 DNA 的提取 从 -80 ℃ 冰箱取 80% 甘油保存的 LM 冻存管, 接种于 BHI 平板上, 在 37 ℃ 下培养 24 h 后, 挑取单菌落接种于 3 mL BHI 液体培养基中, 在 37 ℃ 下摇床培养至对数期 ( $OD_{600}=0.8$ )。然后参照 DNA 试剂盒说明书, 提取单增李斯特菌基因组 DNA。

1.3.2 ERIC-PCR ERIC-PCR 引物设计参考文献<sup>[18]</sup>。Eric-F: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3', Eric-R: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3', 由上海英潍捷基贸易有限公司合成, 采用 PAGE 方式进行纯化。

PCR 扩增体系为: 10×PCR buffer 2.5 μL (pH=8.3); dNTP Mixture (2.5 mM) 2.0 μL、上下引物 (10 μM) 各 2.0 μL、rTaq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL、DNA 模板 35 ng, 然后加超纯水至体积为 25 μL。

PCR 扩增程序为: 95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 50 ℃ 30 s, 52 ℃ 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 共循环 35 次; 最后 72 ℃ 8 min, 4 ℃ 无穷大。

1.3.3 Sau-PCR 分型方法

(1) Sau3AI 酶切消化基因组 DNA: 按照说明书, 在每支 pcr 管中依次加入约 200 ng DNA, 2 μL 10×H buffer 缓冲液, 1 μL 限制性内切酶 Sau3AI, 最后加无菌双蒸水至终体积 20 μL, 以上成分混合均匀后, 37 ℃ 恒温水浴 5 h, 进行基因组 DNA 酶切消化, 并于 -20 ℃ 保存备用。

(2) 引物设计与筛选: 参考文献<sup>[13]</sup>, 引物序列见表 2, 纯化方式为 PAGE, 由上海英潍捷基贸易有限公司合成。

表 2 引物序列及高严谨扩增时退火温度  
Table 2 Primers used in this study and annealing temperatures for the high-stringency step of Sau-PCR amplification

引物名称	序列 (5-3)	长度/bp	退火温度/℃
SAUT	CCGCCGCG-GATC-T	13	44
STG	CCGCCGCG-GATC-TG	14	48
SAG	CCGCCGCG-GATC-AG	14	48
SGAG	CCGCCGCG-GATC-GAG	15	52

(3) PCR 反应体系:在每支 0.2 mL EP 管中加入 10× PCR buffer(含有  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ L,dNTP Mixture(2.5 mM) 2  $\mu$ L,引物(10  $\mu$ M) 2.5  $\mu$ L,酶切产 2  $\mu$ L,rTaq DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.125  $\mu$ L,加无菌双蒸水至终体积 25  $\mu$ L。

(4) PCR 扩增程序:根据文献[13]共分为填补粘性末端、低严谨性扩增、高严谨性扩增 3 个阶段,其中高严谨性扩增阶段各不同引物的退火温度见表 2。

(5) 产物分析:分别将 ERIC-PCR 和 SAU-PCR 产物加入到 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳,电泳条件为 100 V,约

30 min,然后经 EB 染色 10 min,清水漂洗 5 min 后,使用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行照胶,使用 Quality one 软件采用非加权配对法(UPGMA)做遗传分析的树状图。

2 结果与讨论

2.1 ERIC-PCR 分型结果

22 株 LM 菌株用 ERIC-PCR 方法均显示出良好的分型能力,每株产生 4~8 条泳带,结果见图 1。将所有 LM 菌株的 ERIC-PCR 图谱结果用 Quantity One 软件采用非加权配对法(UPGMA)做遗传分析的树状图。

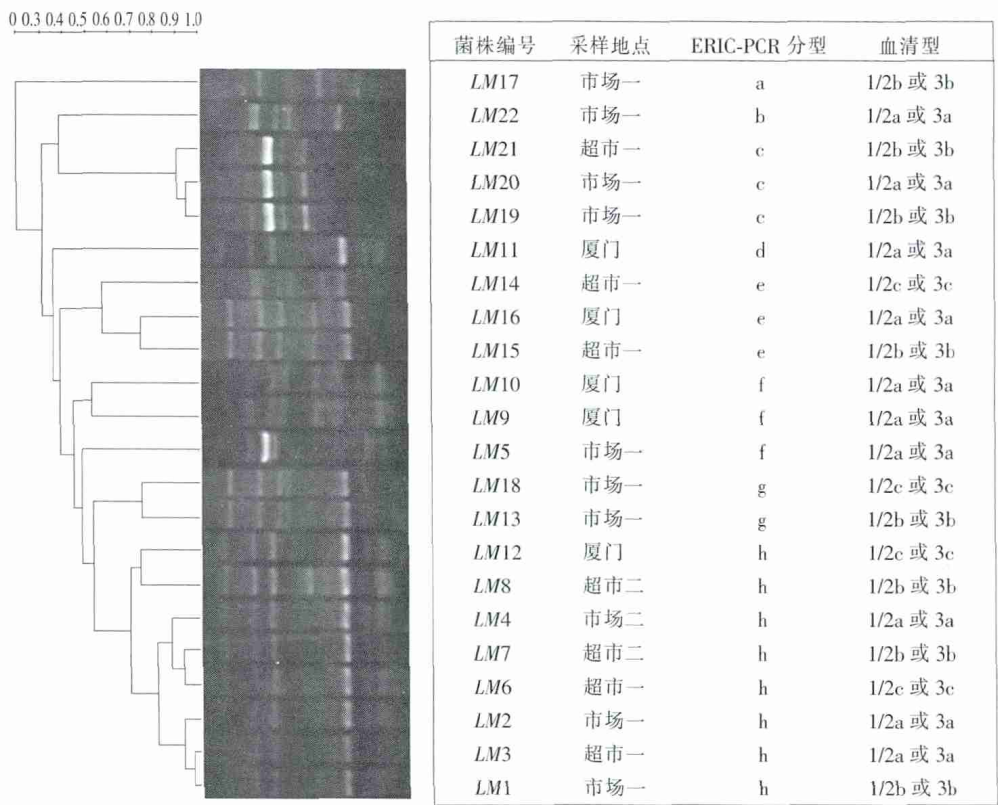


图 1 单增李斯特菌的 ERIC-PCR 图谱以及聚类分析图

Figure 1 The dendrogram of ERIC-PCR patterns and serotype for LM

从本次所研究菌株的 ERIC-PCR 聚类分析图谱来看:

(1) 22 株 LM 共分为 a~h 8 个型别。主要型别为 h 型,共有 8 株,除其中一株分离自厦门外其他菌株都分离自广州,说明其为广州地区肉类污染的主要基因型。c、e、f 型别各有 3 株,其余几个型别菌株的数量则比较分散,说明这些菌株的基因型不紧密相关,表现出高度的遗传多样性。

(2) 菌株 LM13 和 LM18 都属 g 型,分离自同一地区不同食物来源,且采集时间不同,说明此菌在一段时间内在该地区长期存在。分离自市场一的 9 株 LM 共有 6 中不同的基因型,这揭示在同一地点有可能存在不同基因型的单增李斯特菌;分离自厦门某食品加工厂的 5 株菌有 4 种基因型,这可能是由于这些生猪肉来自于不同养殖场的原因。h 型在 5 个不同的地点都有分离得到,这说明该型别菌株分布比较广泛,污染食品较多。

(3) 此外,不同采样点分离得到的 LM 表现出不同的聚

类特点。例如,分离自市场一的 LM 主要是 c 型、g 型和 h 型,分离自超市二的则都是 h 型。

以上分析表明,ERIC-PCR 分子分型技术可以把不同来源的 LM 菌株进行分型,从而实现溯源的目的。

2.2 Sau-PCR 引物筛选结果

为筛选出对本次试验菌株分型效果最佳的引物,共选取了 4 条引物(见表 2)。图 2 显示了不同引物对菌株 LM4 分型的结果。由图 2 可知,4 条引物扩增出来的条带大小都在 100~2 000 bp,然而只有 1 泳道即 SGAG 扩增出来的条带较为清晰,没有重叠现象,且数目为 7 条,比较适宜结果分析,因此最有利于分型。

2.3 Sau-PCR 分型结果

22 株 LM 菌株用 Sau-PCR 方法均显示出良好的分型能力,每株产生 4~8 条泳带,结果见图 3。将所有 LM 菌株的 Sau-PCR 图谱结果用 QuantityOne 软件采用非加权配对法



(UPGMA)做遗传分析的树状图。

从本次所研究菌株的 *Sau*-PCR 聚类分析图谱来看：

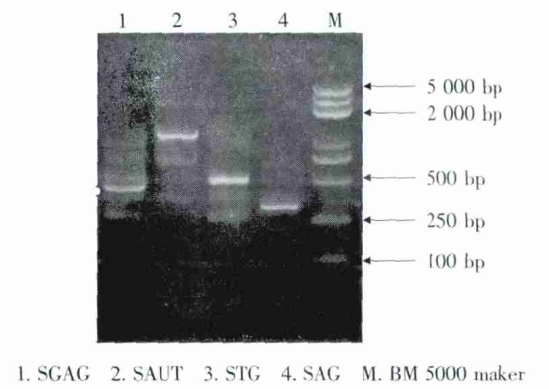


图 2 不同引物对 LM4 的 *Sau*-PCR 分型结果  
Figure 2 The *Sau*-PCR results of LM4 generated by different primers

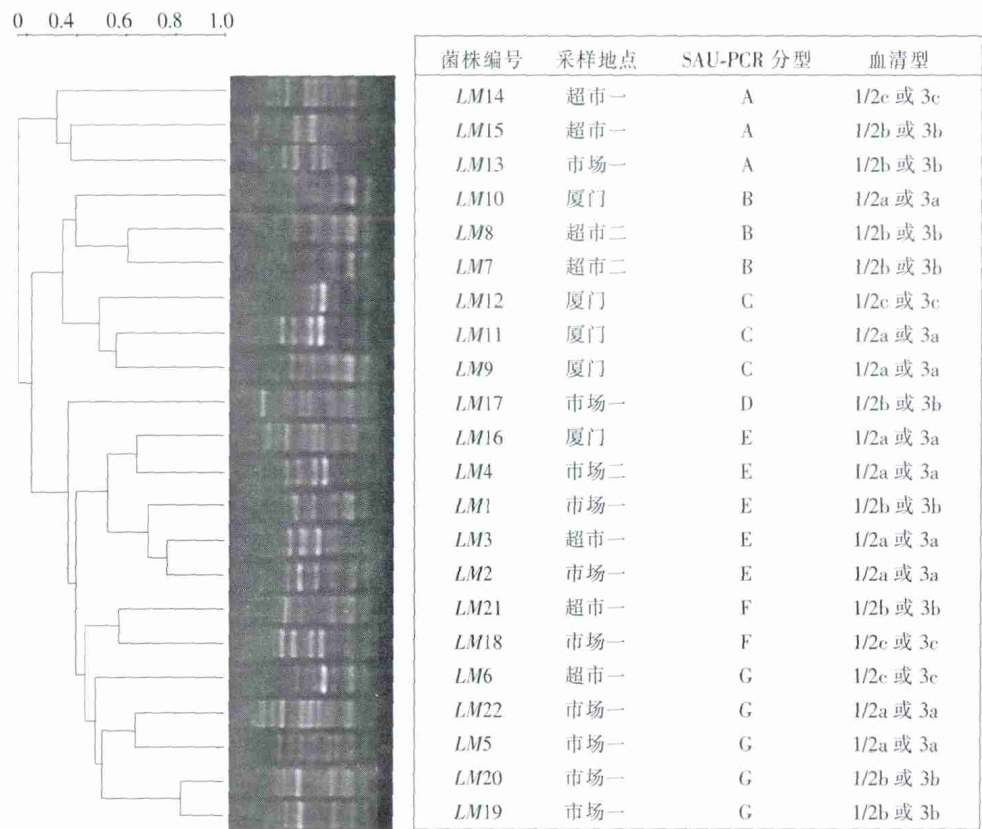


图 3 LM 的 *Sau*-PCR 图谱及聚类分析图  
Figure 3 The dendrogram of *Sau*-PCR patterns and serotype for LM

3 结论

本研究采用了两种现代分型技术对 22 株 LM 进行分型，其分型结果有差异又有关联。ERIC-PCR 和 *Sau*-PCR 分别将 22 株 LM 分为了 8 个和 7 个不同的基因型，分离自市场一的 9 株 LM 都分为了 5 种型别，显示了良好的多态性。ERIC-PCR 在 5 个不同的采集地点都分离到了 h 型，*Sau*-PCR 在 4 个不同的采集点都分离到了 E 型，说明存在着潜

(1) 22 株 LM 共分为 A~E 7 个型别，其中 E 型和 G 型为主要型别，二者占 50%，其余的基因型之间条带差异则相对较大，表明这些菌株之间的基因型相关性不大。如分离自市场一的 9 株 LM 菌株来自 5 种不同的基因型，证明分离自不同食物样品中的 LM 具有多个克隆株，其污染源是很广泛的。

(2) 分析菌株来源与条带图谱发现，分离自不同来源的 LM 菌株之间有相同的谱型，从市场一不同时期和不同样品中分离到了 4 株 G 型，从超市二不同食品中分离到的两株 LM 都是 B 型，这说明同一污染源可以交叉污染同一地区不同食品。

(3) 从广州市市场一、市场二、超市一及厦门某食品加工厂都分离到了 E 型，这说明此种基因型的单增李斯特菌广泛存在于食品中。这些现象都应该引起食品卫生相关部门的重视。

在的菌株大范围传播的可能性，同时这两种方法也都能将血清型区分开来，表现出较好的分型能力，说明两者可以用于单增李斯特菌的分型研究。但 ERIC-PCR 的稳定性不如 *Sau*-PCR，而 *Sau*-PCR 由于要用到限制性内切酶酶切因此花费和耗时都比 ERIC-PCR 多。在实际应用中，应根据不同的分型目的和条件需求，选择不同的分型方法。本试验将两种不同分型方法结合起来进行比较，可以更深入的了解单增李斯特菌的遗传关联性及其流行爆发的特点，有助于更好地对

LM 进行监控及其污染源进行追踪,进而避免李斯特菌的爆发。

### 参考文献

- 1 闫鹤,王彬,师宝忠,等.单核细胞增生李斯特菌血清型、耐药性研究[J].中国抗生素杂志,2010,35(10):774~778
- 2 陈玉贞,侯配斌,贾静,等.2007 年~2009 年山东省生肉中单增李斯特菌的耐药性及分子分型分析[J].中国卫生检验杂志,2012,22(2):267~269.
- 3 姜晓冰,石磊.单核细胞增生李斯特菌脉冲场凝胶电泳分型[J].食品与机械,2009,25(3):84~86.
- 4 Seong-Keun Byun, Suk Chan Jung, Han Sang Yoo. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 69(3): 227~235.
- 5 毕水莲,李琳,石磊,等. Sau-PCR 和 AILP 技术对一起副溶血弧菌引起食物中毒的分型研究[J].食品工业科技,2009(9):158~161.
- 6 Liu D Y, Lawrence M L, Gorski L, et al. *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains belonging to lineages I and III possess distinct molecular features[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(1): 214~217.
- 7 Loessner M J. Improved procedure for bacteriophage typing of *Listeria* strains and evaluation of new phages[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(3): 882~884.
- 8 Graves L M, Swaminathan B, Reeves M W, et al. Comparison of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1994, 32(12): 2 936~2 943.
- 9 M Tamburro, G Ripabelli, I Fanelli, et al. Typing of *listeria monocytogenes* strains isolated in Italy by *inlA* gene characterization and evaluation of a new cost-effective approach to antisera for serotyping[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 4(1): 1 602~1 609.
- 10 Bang-Yuan Chen, Rajkumar Pyla, Rajkumar Pyla, et al. Prevalence and contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in catfish processing environment and fresh fillets [J]. Food Microbiology, 2010, 27(2): 645~652.
- 11 Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(24): 6 823~6 831.
- 12 Burr M D, Josephson K L, Pepper I L. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes[J]. Letters in Applied Microbiology, 1998, 27(1): 24~30.
- 13 狄慧玲,石磊.食源性沙门氏菌 Sau-PCR 基因分型研究[J].食品与机械,2008,24(3):87~89.
- 14 金莉莉,董雪,王秋雨,等.沈阳市副溶血弧菌重复序列 PCR 分型[J].中国公共卫生,2008(3):351~353.
- 15 丁久法,潘迎捷,陈洪友,等.副溶血性弧菌 ERIC-PCR 分型及毒力基因检测研究[J].食品工业科技,2010(8):137~141.
- 16 B Jersek, P Gilot, M Gubina. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(1): 103~109.
- 17 Corich V, Mattiazzi A, Soldati E, et al. Sau-PCR, a novel amplification technique for genetic fingerprinting of microorganisms [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(10): 6 401~6 406.
- 18 刘海泉,朱颖,姜文洁,等.ERIC-PCR 技术对单增李斯特菌的溯源分析[J].食品工业科技,2013,34(8):49~51.

### 信息窗

## 转基因、毒豆芽等入选 2014 年度食品安全热点事

中国食品科学技术学会 1 月 13 日召开“2014 年食品安全热点科学解读媒体沟通会”。会上公布了 2014 年度 12 个国内最具有代表性的食品安全热点问题,并邀请中国工程院院士陈君石、庞国芳等专家对热点食品安全事件进行解读。

据了解,12 个食品安全事件由中国经济网食品安全舆情研究所选送,综合分析各大门户网站新闻点击量、微博传播量、网帖评论量等数据筛选而出。这 12 个食品安全热点事件为:福喜事件、转基因、微生物污染、台湾馊水油(地沟油)、食品添加剂、国产婴幼儿配方奶粉、毒豆芽、现

代牧业、食品掺假、铝超标、大连海参含抗生素、食品监管体制改革。

中国食品科学技术学会理事长孟素荷教授表示,对 2014 年 12 个食品安全热点词的解读,不再是对一个事件简单的“是”或“不是”,而是在媒体关注的热点中,提炼出热点关键词,并找出一些带共性的问题,由学术界给予科学、准确、专业的解读。力图以中国食品安全的新视角,直面食品安全的持久战。

(来源:www.foodmate.net)