

## 沙门氏菌 ERIC 指纹分析\*

张宏梅<sup>1</sup>, 石磊<sup>2\*\*</sup>, 李琳<sup>2</sup>

(1. 广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006; 2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

**摘要:** 在研究了沙门菌携带的第一类整合子的基因结构的基础上, 采用 ERIC-PCR 方法对第一类整合子的阳性菌株进行基因指纹图谱分析。采用肠杆菌基因间重复一致序列 PCR 扩增的方法对两种不同血清型、整合子阴性与整合子阳性菌株研究基因指纹图谱, 利用遗传距离矩阵, 采用非加权配对法 UPGMA 法做遗传分析的树状图, 进行指纹图谱分析。运用 ERIC-PCR 方法, 可以将第一类整合子阴性、第一类整合子阳性菌株及其结构进行初步鉴定, 同时对于两种不同的血清型也可以得到区分。ERIC 可以作为第一类整合子阳性菌株及其相关血清型进行尝试性的鉴定方法, 这对于研究整合子介导细菌耐药机制的特性具有重要意义。

**关键词:** ERIC; 整合酶; 沙门菌

**中图分类号:** Q 939.121   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1004-390X(2007)04-0467-04

## Fingerprinting Genomes of Class 1 Integron Among *Salmonella* Stains by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR

ZHANG Hong-mei<sup>1</sup>, SHI Lei<sup>2</sup>, LI Lin<sup>2</sup>

(1. Department of Food and Biological Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China;  
2. College of Food and Biological Engineering, South China University of Tehnology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The characterization of class 1 integron among *Salmonella* stains had been well investigated previously. Then fingerprinting genomes of those *Salmonella* stains were studied using ERIC-PCR. Two kinds of serovar strains, integron-positive isolates and integron-negative isolates with different characterization were the samples. The fingerprinting of those strains were investigated by the method of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR. Bendrogram of UPGMA cluster analysis based on polymorphism data was obtained by UPGMA analysis. Five gene types of the strains were classified by the UPGMA analysis according to their fingerprint. The ERIC-PCR fingerprinting was a good method to identify different characterizations of integrons and serovar strains for research of mechanisms of antibiotic resistance in bacteria.

**Key words:** ERIC; integrase; *Salmonella* serotypes

通过研究整合子系统来探讨食源性病原菌中的致病性和耐药性因子, 及其大规模转移扩散和宿主范围内的跃迁是近年来的研究热点。肠杆菌基因间重复一致序列是在肠道细菌基因组中发现的一种基因间重复序列, 具有一定的保守性, 命名为 ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consen-

sus)<sup>[1]</sup>。目前唯一没有发现该序列的菌种为 *Vibrio cholerae*。沙门氏菌作为一种常见的肠道细菌, 其基因中存在该保守序列。在以往的研究中, 通过对沙门氏菌中整合子-耐药基因盒结构系统的分析, 探讨了整合子系统介导细菌的耐药机制<sup>[2,3]</sup>。表明了整合子系统在细菌对环境的适应中起到非

收稿日期: 2006-08-28

修回日期: 2006-11-07

\* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(04020050)。 \*\* 通讯作者 E-mail: leishi@scut.edu.cn

作者简介: 张宏梅(1975-), 女, 黑龙江人, 博士, 主要从事微生物耐药机制研究。

常的重要作用,同时其对菌体的遗传进化也具有重要的意义。研究属于同一种属的沙门氏菌的第一类整合子阳性菌株与整合子阴性菌株在基因指纹图谱上的是否存在差异,是研究整合子对细菌进化影响最直接的方法,本文通过肠杆菌基因间重复一致序列(ERIC)的 PCR 扩增的方法,来分析沙门氏菌中整合子阳性菌株的指纹图谱特征。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

*Salmonella tshiongwe* s 14, *Salmonella tshiongwe* s 126, *Salmonella hadar* s 87 和 *Salmonella tshiongwe* s 191 为第一类整合子阳性菌株。*Salmonella tshiongwe* s 12, *Salmonella tshiongwe* s 16, *Salmonella hadar* s 21, *Salmonella hadar* s 34 为第一类整合子阴性菌株(文中分别以 s 12, s 126, s 87, s 191, s 12, s 16, s 21, 和 s 34 的书写形式来代替上述菌株),以上菌株均来自广州市东山卫生防疫站。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

参照革兰氏阴性菌 DNA 提取方法<sup>[4]</sup>进行。

### 1.3 ERIC-PCR 法测定沙门氏菌指纹图谱的确立

#### 1.3.1 退火温度的选择:

以 ERICp:5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'(大连宝生物公司合成)为引物<sup>[5]</sup>,以 *Salmonella tshiongwe* s191 的提纯 DNA 为模板,在 4 个洁净的 PCR 反应管中依次加入 Ex Taq 10 × buffer 缓冲液 6 μL, dNTP 5 μL, 引物 5 μL, 浓度为 10 pmol/μL, 模板 DNA 3 μL 和 Ex Taq 酶(TAKARA 生物工程公司)0.25 μL。加灭菌的双蒸水到 50 μL。按照下面的条件,在梯度 PCR 仪进行反应:94℃变性 5 min,照下列参数重复 35 个循环,94℃变性 0.5 min,55℃,57℃,59℃或 62℃退火 1.5 min,72℃延伸 2 min;最后延伸 72℃ 5 min。扩增产物在 1.5% 的琼脂糖浓度下凝胶电泳。

#### 1.3.2 酶的选择

选择 *Salmonella tshiongwe* s191 反应模板,按照上述反应,退火温度选择 57℃,分别在 Taq 和 Ex Taq 两种 DNA 聚合酶来进行 ERIC 扩增,其它条件均不改变,通过凝胶电泳图来判断最适退火温度。

#### 1.4 最佳条件下的 ERIC 扩增反应

以 4 株第一类整合子阳性菌株 *Salmonella*

*tshiongwe* s 14, *Salmonella tshiongwe* s 126, *Salmonella hadar* s 87 和 *Salmonella tshiongwe* s 191, 以及 4 株第一类整合子阴性菌株 *Salmonella tshiongwe* s 12, *Salmonella tshiongwe* s 16, *Salmonella hadar* s 21 和 *Salmonella hadar* s 34 为反应模板,在 8 支灭菌的、在 50 μL 的反应体系中加入:Ex Taq 10 × PCR Buffer 6 μL, 10 mol/L dNTP 5 μL, ERICp 5 μL, 模板 DNA 3 μL, Ex Taq DNA Polymerase 0.25 μL, 无菌双蒸水到 50 μL。充分混匀后,按照下列程序进行 PCR 扩增,94℃变性 0.5 min, 57℃退火 1.5 min, 72℃延伸 2 min, 最后延伸 72℃ 5 min。扩增产物在 1.5% 的琼脂糖浓度下凝胶电泳。

### 1.5 相似率的计算

按照最佳反应条 ERI-PCR 扩增 DNA 凝胶电泳的结果,显带的记录方法为:针对某一条带而言有"记做"1", "无"记做"0",只记载清晰易辨的扩增。将所有扩增产生的多态 DNA 扩增带数据输入到数据矩阵。样品间的遗传相似性计算基于该矩阵,采用 Jaccard 的相似系数析方法进行,公式如下<sup>[6]</sup>:

$$\text{相似率 } Fab = \frac{(2 \times Nab)}{(Na + Nb)} \times 100\%$$

其中,  $Nab$  为菌株 a 和 b 之间共有的 DNA 扩增片段数目,  $Na$  为个体 a 具有的 DNA 扩增片段数目,  $Nb$  为个体 b 具有的 DNA 扩增片段数目。

### 1.6 ERIC 扩增 DNA 多态性分析

采用 NTSYSpc 2.1 计算软件,得到 Jaccard 的遗传相似性系数矩阵和遗传距离矩阵,利用遗传距离矩阵,采用非加权配对法 UPGMA 法做遗传分析的树状图。

## 2 结果与分析

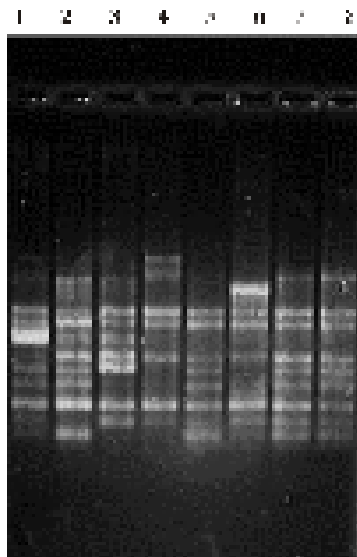
### 2.1 扩增条件的选择

ERIC 序列约 126 bp, 是不完整的回文序列,可以形成茎环结构<sup>[7]</sup>。定位于基因组内可转录的非编码区域或与转录有关的区域,依据此重复序列设计引物,对细菌基因组 DNA 进行扩增,可产生 DNA 指纹图谱(DNA 迁移带)。本试验优化只考虑了两个参数:退火温度和酶的选择。因为 ERICp 为特异性引物,其扩增的条件比较简单。而退火温度是 PCR 特异反应的关键因素,一般来说,在严格的退火温度下,引物与模板结合的 5' 端碱基的错

配几率较低,可以避免其它非特异性产物出现。从不同退火温度下扩增产物的凝胶电泳图可知 57℃ 扩增得到的效果较为理想,条带相对清晰,故选择 57℃ 作为 ERIC - PCR 反应的最佳退火温度。在确定 ERIC - PCR 最优反应条件中,除了退火温度选择外,DNA 聚合酶的种类也是一个重要的影响因素。本试验讨论了 *Taq* DNA 聚合酶和 *Ex Taq* DNA 聚合酶两种酶对 ERIC 反应的影响效果,并从反应产物的凝胶电泳图可知,由 *Ex Taq* DNA 聚合酶的效果较好,这是由于 *Ex Taq* DNA 聚合酶相对 *Taq* DNA 聚合酶具有高保真的 DNA 聚合效果,在 DNA 模板含量相对低的情况下也能将其大量的扩增。同时 *Ex Taq* DNA 聚合酶的聚合能力也大于 *Taq* 酶,使相对较大的片段得以扩增。

2.2 最佳条件下 ERIC 的扩增结果

一般来讲,模板的 DNA 纯度会影响指纹图谱的显示效果。本试验中采用精提菌体 DNA 作为反应模板,所以对模板纯度要求不必再十分严格,故不作特别要求。同时经过重复试验,该条件下的指纹图谱重复性较好。按照前述条件,ERIC - PCR 反应产物的凝胶电泳如图 1 所示。



1: s126; 2: s126; 3: s126; 4: s126; 5: s126; 6: s126; 7: s126; 8: s126

图1 质粒基因间重复序列(ERIC)的扩增产物凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of ERIC

2.3 ERIC 电泳图聚类分析

Jaccard 的相似系数基于被测样间的两两比较,其算式为两两比较的一对 DNA 样品,其 Jac-

card 的相似系数的计算结果只会介于“0”和“1”之间,其中“0”表示两 DNA 样品的所有显带均不同,“1”表示两 DNA 样品的所有显带均相同。各个菌株扩增图谱之间的相似系数如表格 1,基于遗传相似矩阵,得到的 UPGMAN 的聚类图如图 2。

表1 各个菌株扩增图谱之间的相似系数

Tab.1 Similarity index of fingerprint of all isolates

	s 12	s 16	s 21	s 38	s 14	s 87	s 126	s 191
s 12	1							
s 16	0.94	1						
s 21	0.8	0.71	1					
s 38	0.87	0.93	0.77	1				
s 14	0.67	0.57	0.67	0.62	1			
s 87	0.75	0.8	0.77	0.71	0.62	1		
s 126	0.7	0.75	0.57	0.67	0.71	0.67	1	
s 191	0.67	0.71	0.5	0.77	0.5	0.77	0.71	1

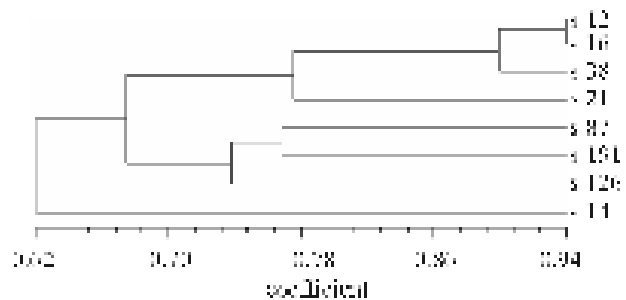


图2 基于DNA多态性指纹的聚类分析图

Fig.2 Dendrogram of UPGMAN cluster analysis based on poly-morphic data

ERIC - PCR 的扩增结果中,在一定范围内,DNA 迁移带的大小和多少代表着 ERIC 重复序列间的距离和重复次数,以此特征进行菌株的基因分型分析。可以从 ERIC 的聚类图上看到,具有同样血清型 - 茨昂威的 s 16 和 s 12,有着高度的遗传相似性,相似系数达到 0.9 以上,它们与另一血清型 - 哈特菌株 s 21 和 s 38,都为第一类整合子阴性菌株,它们之间的具有相对小的遗传距离。对于 s 191 和 s 87 具有相对大的遗传相似性,遗传系数为 0.77,虽然 2 株菌不属于统一血清型,但是它们之间在整合子的特征上,是完全相同的。都含有单拷贝的第一类整合子,而且整合子上含有的都是 *aadA2* 一种耐药基因盒。s 126 为第一类整合阳性菌株,但是第一类整合子的结构和以上两者整合子结构是不同的,而在整合子的拷贝数上,含有两个相

同拷贝的整合子,整合子含有 *aadA5* 和 *dfrA17* 两个耐药基因盒,正如聚类分析的树状图的结果,与前两株菌有较小的遗传距离。但是,在聚类图上,s 14都呈现了与其它菌株不同的基因型,从以前的研究报到的结果中知道,其作为第一类整合子阳性菌株,含有两个不同的整合子,其中一个整合子只含有 *aadA2* 耐药基因盒,而另一个整合子含有 *aadA5* 和 *dfrA17* 两个耐药基因盒。在以上研究结果中,是否整合子在决定基因型中起到比其它表现型更重要的地位,也是一个今后有待探讨的重要问题。需要做进一步的研究。

利用 ERIC-PCR 扩增方法,可以通过设置阳性对照,研究未知菌株的整合子分布情况,甚至可以对其血清型做初步的分析与鉴定,同时还可以进一步对整合子的拷贝数及整合子结在介导细菌耐药构加以有效的区分。这对于研究由整合子介导的细菌耐药性具有重要意义,通过细菌基因型的分析来探讨细菌中含有整合子的结构及特性,提供了另一研究整合子特性的方法,改善了原有菌株逐一 PCR 方法的繁琐性。这些对于研究耐药基因和致病基因在宿主范围的大规模跃迁及病原菌的生物防御具有重要意义。

#### [参考文献]

- [1] HULTON C S, HIGGINS C F. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria[J]. *Mol Microbiol*, 1991, 5:825-830.
- [2] 张宏梅,石磊,李琳,等. 沙门氏菌中第一类整合子的鉴定及特性分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, (3):214-216.
- [3] 张宏梅,石磊,李琳. 细菌耐药基因盒的捕获和表达机理的研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2003, 29:703-705
- [4] SANDVANG D, AARESTRUP F M, JENSEN L B. Characterization of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* typhimurium DT104[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 157:177-181.
- [5] KUMAO T, WILLIAM B T, HIDEO H. Molecular subtyping methods for detection of *Salmonella enterica* serovar oranienburg outbreaks[J]. *Journal Clinical Microbiology*, 2002, 6:2057-2061.
- [6] YU T T, LO H F, HWANG S Y. Genotyping and assessment of genetic relationships in elite polycross breeding cultivars of sweet potato in Taiwan based on SAMPL polymorphisms[J]. *Bot. Bull. Acad. Sin*, 2002, 43:99-105
- [7] 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, 27:24-30.
- [1] HULTON C S, HIGGINS C F. ERIC sequences: a novel