

实验技术与方法

空肠和结肠弯曲菌鞭毛蛋白基因 *flaA* 的检测

杨毓环 洪锦春 张巧姬

(福建省疾病预防控制中心,福建 福州 350001)

摘要:目的 运用一种快速、敏感、特异的检测空肠和结肠弯曲菌的方法。方法 以空肠和结肠弯曲菌所共有特异的鞭毛蛋白基因 *flaA* 的一段高度保守序列为引物,用 PCR 法扩增 *flaA* 基因上的一段约 1 700 bp 的片段。用该引物对空肠和结肠弯曲菌的标准株、福建省的食品分离株进行 PCR 扩增检测,并同时检测该 PCR 方法的敏感性。结果 扩增片段表现出极好的特异性,2 株空肠和结肠弯曲菌标准菌株、8 株分离自不同食品样品的空肠弯曲菌和结肠弯曲菌菌株均为阳性,且敏感性实验显示该 PCR 方法的反应体系最低检出菌量为 6 CFU。结论 该方法快速、敏感、特异,可用于突发性食物中毒和暴发感染的调查。

关键词:弯曲杆菌,空肠;弯曲杆菌,结肠;聚合酶链反应

Detection of *flaA* of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by PCR

YANG YU-huan, HONG Jin-chun, ZHANG Qiao-ji

(Fujian provincial Center for Disease Control and Prevention, Fujian Fuzhou 350001, China)

Abstract: **Objective** To seek a fast, sensitive and specific method for detection of *C. jejuni* and *C. coli* in foods. **Method** The highly conserved consensus sequences in *flaA* of *C. jejuni* and *C. coli* were selected as primers to amplify a 1 700 bp fragment in the standard strains of *C. jejuni* and *C. coli* and the isolated strains from foods in Fujian Province. **Results** The sensitivity of PCR was determined. Specific fragments were obtained from standard strains of *C. jejuni* and *C. coli*, 4 isolated strains of *C. jejuni* and 4 isolated strains of *C. coli* from foods. A minimum of 6 CFU could be detected in the PCR reaction system. **Conclusion** Detection of *flaA* by PCR could detect *C. jejuni* and *C. coli* rapidly with high sensitivity and specificity and could be applied for investigations during emergency of food poisoning and outbreak of infection.

Key word: *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter coli*; Polymerase Chain Reaction

弯曲菌广泛分布于自然界,主要寄生于哺乳动物和禽类肠道中,通过食物和水、牛奶等引起人类感染和食物中毒,对人类致病的主要是空肠弯曲菌和结肠弯曲菌,以空肠弯曲菌感染更为多见。弯曲菌感染引起的腹泻在许多国家呈上升的趋势,甚至超过了沙门菌和志贺菌^[1]。WHO 已将弯曲菌肠炎列为最常见的肠道传染病之一。急性弯曲菌感染还可以引发反应性关节炎、菌血症、人类自身免疫性外周神经疾病即格林巴利综合征 (GBS) 等。尽管弯曲菌的流行已引起各国广泛关注,但由于其爆发少、病死率低,传统的培养分离方法费时、费力,且实验室培养条件苛刻,在可疑菌落挑取上至关重要,需要经验丰富的检验人员,因此许多实验室未开展该项检测。传统的培养分离方法不能满足对弯曲菌及时、快速、灵敏检测的需要,不利于突发事件的处理。以 PCR 技术为代表的基因检测方法由于其快速且操作简

单、可重复性好,且具有较高的敏感性、特异性,正在被实验室广泛应用。本实验室在参考国外文献的基础上^[2,3],选择以空肠和结肠弯曲菌共有的特异鞭毛蛋白基因 *flaA* 的一段高度保守 DNA 序列为引物进行 PCR 法扩增,对分离自不同食品样品的空肠和结肠弯曲菌的菌株进行 *flaA* 基因的检测,并同时对该检测方法的敏感性进行实验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 空肠弯曲菌标准株 (CCUG 11284) 和结肠弯曲菌标准株 (CCUG 11283) 均由 WHO 全球沙门菌监测网络 2003 年度室间质控系统 (EQAS) 提供,CCUG 为瑞典哥德堡大学菌种保存中心缩写。阴性对照株大肠杆菌 ATCC 25922 由中国 CDC 营养与食品安全所提供,4 株空肠和 4 株结肠弯曲菌分离株为本实验室在 2003 - 2005 年间采用 WHO 推荐的分离培养方法分离自不同种类的食品样品。

基金项目:福建省卫生厅青年科研基金项目(2003-1-8)

作者简介:杨毓环 女 副主任技师

1.1.2 培养基和试剂 哥伦比亚血琼脂培养基 (OXOID 公司);微需氧产气袋、标准麦氏比浊管 (法国生物梅里埃公司);PCR 反应混合液 PerfectShot EX Taq、DNA Marker DL 2000 (TaKaRa 宝生物(大连)有限公司)。

1.1.3 仪器设备 PCR 扩增仪为德国的 Biometra Tgradient;电泳基础电源为 PowerPac™ Basic、电泳槽为宽式小型 Ready Sub- Cell GT,均为美国 BIO-RAD 公司产品;台式高速离心机为 5415 D, Eppendorf 公司产品;Gel Doc EQ 凝胶成像系统为美国 BIO-RAD 公司产品。

1.1.4 引物合成 2 个特异性引物参照 Nachamkin 等文献^[2,3],根据空肠和结肠弯曲菌的共有特异的鞭毛蛋白基因 *flaA* 的保守区 DNA 序列设计引物,扩增该基因上一段约 1 700 bp 的片断。引物合成由华大基因—上海鼎安生物科技有限公司完成。

引物 A1:5'-GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT GGT GC-3'

引物 A2:5'-CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG-3'

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的制备 将菌株分别划线接种在哥伦比亚血琼脂平板上,42℃ 微需氧培养 48 h,挑取少量菌苔,将菌苔悬浮于装有 500 μl 灭菌蒸馏水的 Eppendorf 管中,盖紧盖子,将管子插在泡沫板上,煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 1 min,取上清液做为模板,用于 PCR 扩增。

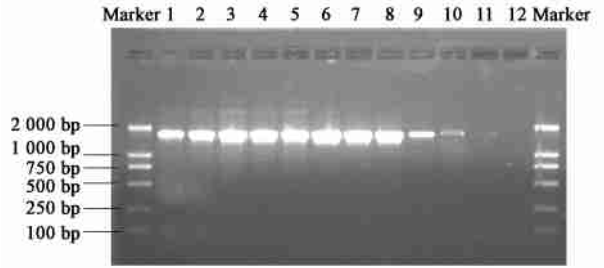
1.2.2 PCR 扩增反应 反应总体积 50 μl,即在 200 μl PCR 薄壁管中依次加入:PerfectShot EX Taq 混合液 25 μl、引物 A1 (20 μm) 1 μl、引物 A2 (20 μm) 1 μl、双蒸水 21 μl、模板 DNA 2 μl。以大肠杆菌 ATCC 25922 作阴性对照,双蒸水作试剂空白对照。PCR 扩增反应程序:94℃ 60 s 变性模板 DNA;然后 94℃ 15 s、45℃ 45 s、72℃ 105 s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 300 s。反应产物电泳前 4℃ 保存。

1.2.3 PCR 产物的电泳检测 各取 10 μl PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,DNA Marker 2000 作为标记参考。琼脂糖凝胶经溴化乙锭溶液染色后,用 Gel Doc EQ 凝胶成像系统获取图片。

1.2.4 PCR 反应的敏感性实验 将空肠弯曲菌标准株 (CCUG 11284) 的纯培养物用标准麦氏比浊管法制成 0.5 MCF (麦氏浊度) 的菌液,相当于 1.5×10^8 CFU/ml,并 10 倍递增稀释至 1.5×10^1 CFU/ml,将不同浓度的菌液提取 DNA,用该 PCR 方法检测 *flaA* 基因,以能见到目的扩增条带的最低稀释浓度为最低检出限,并推算最低检出菌量。

2 结果

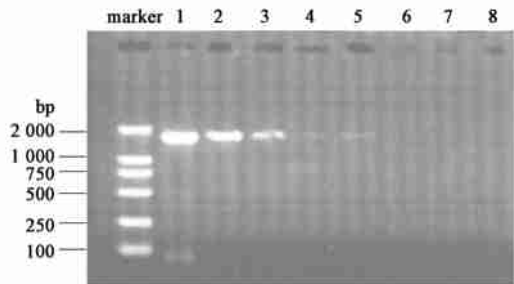
2.1 空肠和结肠弯曲菌食品分离株与标准株的 PCR 扩增结果,见图 1。



1~4:4 株分离自不同食品样品的空肠弯曲菌株;5~8:4 株分离自不同食品样品的结肠弯曲菌株;9:空肠弯曲菌标准株 (CCUG 11284);10:结肠弯曲菌标准株 (CCUG 11283);11:阴性对照株;大肠杆菌 ATCC 25922;12:试剂空白对照。

图 1 实验菌株 PCR 反应扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

2.2 PCR 反应的敏感性 敏感性试验结果见图 2。可以看出,菌液在 1.5×10^3 CFU/ml 稀释度时已不能扩增出特异性片段,能见到目的扩增条带的最低稀释浓度为 1.5×10^4 CFU/ml,所以该 PCR 方法的检测灵敏度为 1.5×10^4 CFU/ml,本实验 PCR 反应时模板的量取 2 μl,电泳时取总反应体积 1/5 的量,因此本实验 PCR 方法的最低检出菌量为 6 CFU。



1: 1.5×10^8 CFU/ml; 2: 1.5×10^7 CFU/ml; 3: 1.5×10^6 CFU/ml; 4: 1.5×10^5 CFU/ml; 5: 1.5×10^4 CFU/ml; 6: 1.5×10^3 CFU/ml; 7: 1.5×10^2 CFU/ml; 8: 1.5×10^1 CFU/ml。

图 2 PCR 反应敏感性实验的扩增结果图谱

3 讨论

3.1 弯曲菌的鞭毛是有粘附作用和侵袭性的,为重要的毒力因子。空肠和结肠弯曲菌鞭毛由 3 个亚单位的鞭毛蛋白组成,其鞭毛蛋白基因 *flaA* 和 *flaB* 均有高度的易变区域和高度保守区域^[4]。我们用该 PCR 方法对本实验室分离的另外 30 多株空肠和结肠弯曲菌食品分离株进行鞭毛蛋白基因 *flaA* 检测,也达到了很好的特异性 (100%)。该 PCR 方法操作简单且同时快速检测这两种重要致病性弯曲菌的存在,有利于流行病学的调查。

3.2 目前 PCR 检测弯曲菌常用的引物多是针对 *flaA* 基因的^[5],上游引物多与 *flaA* 的 5 端起点位置

互补,下游引物变化较大,扩增片段的长度多为 0.7~1.7 KB 之间。Comi 等^[6]利用巢式 PCR 进行扩增,但结果表明并不能增加其特异性与敏感性。也有视实际工作中检测的需要,针对空肠弯曲菌单独设计的特异性引物^[7]。而本次实验室采用的引物设计能最大限度地检测多态性,末端的 G 或 C 可以提高退火温度以增加特异性。

3.3 已有很多研究表明空肠和结肠弯曲菌的基因组结构有丰富的多样性,同一血清型的菌株其基因组结构的相似性程度不同,而不同血清型的菌株其基因组结构相似程度有时有可能很高^[8]。在食物中毒或其他突发病源性感染的公共卫生事件中,在流行病学调查上单纯的病原检测固然重要,但是病原的分型也是非常重要的。总的来说,基因分型的分辨率比血清分型要高,且操作简易,而血清分型的分型血清不易获得,甚至不全,给实际工作带来困难。因此在追溯污染源的调查中基因分型方法逐渐被利用且成为有力的证据。本实验的 PCR 方法,由于在引物设计上充分考虑了空肠和结肠弯曲菌基因组结构的多态性,不但能够检测空肠和结肠弯曲菌,更有利于进行进一步的基因分型实验。Nachamkin 等在此基础上还建立了空肠和结肠弯曲菌 *flaA* 基因的 PCR-RFLP 分型方法,并在欧洲监测网络实验室间推行标准化。由于 PCR-RFLP 方法分辨率高、可重复性好,不需要特殊设备,且操作简单、快速,特别适合

于通常实验室开展。因此,我们还将在今后的监测工作中,进一步展开空肠和结肠弯曲菌鞭毛蛋白基因 *flaA* 的 PCR-RFLP 基因分型。

参考文献

- [1] TAUXE R V. Incidence, trends and source of campylobacteriosis in developed countries [M]//WHO. The creasing incidence of human campylobacteriosis. Copenhagen, 2000, 42-43.
- [2] NACHAMKIN I, BOHACHICK K, PATTON C M. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis[J]. J Clin Microbiol, 1993, 31:1531-1536.
- [3] NACHAMKIN I, UNG H, PATTON C M. Analysis of HL and O serotypes of *Campylobacter* strains by the flagellin gene typing system [J]. *Campylobacter jejuni*, 1996, 34:277-281.
- [4] MEINERSMANN R J, HELSEL L O, FIELDS P I, et al. Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(11):2810-2814.
- [5] 周志平,王勇,虞爱华,等. 聚合酶链反应检测空肠和结肠弯曲菌的核酸[J]. 临床检验杂志, 1998, 16(2):79-81.
- [6] COMI G, FERRONI P, COCOLIN L, et al. Detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by two-step polymerase chain reaction[J]. Mol Biotechnol, 1995, 3(3):266-268.
- [7] 王文武,刘国,任保国. 多聚酶链反应扩增技术检测空肠弯曲菌[J]. 中国公共卫生, 1997, 13(7):431.
- [8] SLATER E, COLLES F M, WAREING D R, et al. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni* [J]. J Med Microbiol, 1998, 47(4):353-357.

[收稿日期:2006-10-20]

中图分类号:R15; Q939.121 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2007)04-0315-03

消息

我国成功举办第 39 届国际食品添加剂法典委员会会议

2007 年 4 月 24 至 28 日,卫生部代表中国政府在北京成功举办了第 39 届国际食品添加剂法典委员会会议。这是我国 2006 年担任国际食品添加剂法典委员会主持国后首次举办的国际食品法典委员会会议。参加会议的有 56 个成员国和 29 个国际组织的 232 名代表,中国疾病预防控制中心营养与食品安全所陈君石院士担任大会主席主持了会议,世界卫生组织驻华代表处 Henk Bekedam 先生、卫生部卫生监督局赵同刚局长出席开幕式并致辞。

会议的圆满成功得到与会各界的充分肯定和高度评价。作为主持国举办会议,不仅体现了中国政府和卫生部对食品卫生安全工作的重视,而且积极展示了中国在国际食品添加剂法典事务方面的能力,必将对我国参与制定国际食品卫生安全标准的未来产生极其深远的影响。