

单核细胞增生性李斯特菌毒力基因检测及 DNA 随机扩增多态性分型

王连秀 赵维勇

(昌平区疾病预防控制中心,北京 昌平 102200)

摘要:为了解在昌平地区分离的单核细胞增生性李斯特菌(*Lm*)携带毒力基因的状况和 DNA 随机扩增多态性(RAPD)分型情况,采用聚合酶链反应(PCR)对 28 株 *Lm* 进行了溶血素基因(*hly*)、与侵袭性有关的 *iap* 和 *prfA* 基因的测定及 RAPD 分型。结果 3 个毒力基因 PCR 全部呈阳性反应,两株无害 *Lm* 为阴性反应。用 RAPD 分型,28 株 *Lm* 分为 12 型,A、B 两型共 9 株菌全部来自某肉联厂;C、D 两型共 10 株来自某肉鸡公司;另外 9 株 *Lm* 有 8 个 RAPD 型,分别来自熟肉制品及零售市场。此次实验发现昌平地区在不同时间、不同地点分离的 *Lm* 其 RAPD 型别变化较大,有多种型别的细菌存在。根据 RAPD 分型看出肉联厂与肉鸡公司可能存在着内部污染问题。
关键词: 李斯特氏菌,单核细胞增生;聚合酶链反应;随机扩增多态 DNA 技术;毒力

Toxin Gene Detection and Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Typing Analysis of *Listeria Monocytogenes* (*Lm*)

WANG Lian-xiu, ZHAO Wei-yong

(Changping District Center for Disease Prevention and Control, Beijing Changping 102200, China)

Abstract: To understand the virulence gene distribution and RAPD typing of *Lm* isolated from meat products in Changping District, Beijing, the virulence gene distribution of 28 strains of *Lm* was detected with PCR with primers MH1、MH2, *iap*1、*iap*2, and *prfA*1、*prfA*2 and RAPD typing analysis was performed. All of the 28 *Listeria monocytogenes* strains tested were positive for all the 3 pairs of primers, and 2 strains of *Listeria innocua* were all negative for all primers tested. The 28 *Listeria monocytogenes* strains consisted of 12 RAPD types (A-M). Nine strains with type A and B were found in isolates from pork, 10 strains with type C and D were found in isolates from chicken, the other 9 strains with 8 RAPD types were found in isolates from meat products of retail market. The result of this study showed that multiple RAPD types of *Listeria monocytogenes* exist in Changping district. And it also can be concluded that inner contamination should be controlled in meat and chicken plants.
Key word: *Listeria monocytogenes*; Polymerase Chain Reaction; Random Amplified Polymorphic DNA Technique; Virulence

单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, *Lm*)毒力相关基因比较多,目前认为由 *hlyA* 基因编码的溶血素是基本的致病因子,*iap* 基因编码的 P60 蛋白是与侵袭性有关的蛋白质,所以此基因也是侵入细胞过程中的致病因子。*prfA* 编码的蛋白是 *Lm* 调控转录激活因子,可调控和转录多种 *Lm* 的毒力基因^[1],该基因具有调节细菌致病性的生物学机能。本实验应用 PCR 方法对 *Lm* 的 3 个毒力基因进行检测,了解 *Lm* 的毒力基因存在状况。又应用 RAPD 技术对分离株进行分型,从而确定本研究 *Lm* 分离株基因组 DNA 是否具有多态性,观察 RAPD 型别与样品、菌株之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

作者简介:王连秀 女 副主任检验师

菌株 *Lm* 来源于昌平区肉联厂、肉鸡公司、熟肉制品和零售市场的肉类食品。菌株分离按照国家食品卫生检验标准 GB/T 4789.30—2003 进行。将分离的菌株接种在 API LISTERIA 生化试条上,培养后读取结果输入计算机用 API 细菌鉴定系统进行分析。*Lm* 标准菌株(标号 54004)由北京市疾病预防控制中心提供。

试剂 Taq DNA Polymerase 购自华美公司。

仪器 DYY-2C 电泳仪和 DYYIII 33B 电泳槽北京六一仪器厂生产。

1.2 方法

PCR 引物的设计合成 *Lm* 特异性引物参照文献^[2,3]合成了检测溶血素基因 *hlyA* 基因的引物对 MH1、MH2,检测 *iap* 基因的引物对 *iap*1、*iap*2 以及检测 *prfA* 基因的引物对 *prfA*1、*prfA*2。随机引物 R1、R2 参照文献^[4]合成,见表 1。特异性引物扩增产物片断长度为 *iap* 400 bp; *hlyA* 234 bp; *prfA* 467 bp。

毒力基因的检测 DNA 提取参照文献^[5]提取染色体 DNA 部分进行。PCR 系统组成如下:无 Mg²⁺ 的缓冲液 2 μl ,MgCl₂ 1.2 μl (2.5 mmol/L) ,dNTP (每种 2.5 mmol/L) 1.6 μl ,引物 1 10 μmol/L ,引物 2 10 μmol/L ,模板 0.5 μl ,Taq 酶 2 U ,加去离子水补充到 20 μl 。循环:94 °C 预变性 10 min 后,94 °C 变性 15 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,30 个循环。72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 1.2 %的琼脂糖进行电泳分离,染色,记录结果。

随机引物 PCR 采用前述提取染色体的 DNA。试验 50 μl PCR 反应体系中包含 25 ng *Lm* 基因组 DNA ,200 ng 引物 ,200 μmol/L 的 dNTP ,2.5 mmol/L 的 MgCl₂ 以及 2.5 U 的 Taq 聚合酶。扩增参数为:94 °C 5 min ,40 °C 5 min ,72 °C 5 min ,然后 40 个下列步骤的循环,94 °C 30 s ,40 °C 2 min ,72 °C 2 min ;最后加终末延伸 72 °C 10 min。设立阴性对照(扩增体系同前,不同的是不添加 DNA)。PCR 结束后,取 20 μl 产物电泳,使用 1.2 %的琼脂糖进行电泳分离,最后用溴化乙锭染色拍照记录实验结果。随机引物 PCR

扩增所产生的模式图谱以扩增产物电泳得到的条带为基础进行分析。若所有的片段都相同则认为相同。

表 1 <i>Lm</i> 的特异性引物及随机引物		
基因	引物	
<i>iap</i>	<i>iap</i> 15 5'-CAAACTGCTAACAGCTACT-3'	<i>iap</i> 2 5'-GCACCTGAATTGCTGTTATTG-3'
<i>hlyA</i>	MH1 5'-CGGAGGTTCCGCAAAAGATG-3'	MH2 5'-CCTCCAGAGTGATCGATGTT-3'
<i>prfA</i>	<i>prfA</i> 1 5'-ACCAATGGATCCACAAGA-3'	<i>prfA</i> 2 5'-CAGCTGAGCTATGTGCGAT-3'
寡聚核苷酸	R1 5'-GCTTATCTCTGACATCCA-3'	R2 5'-TGTTCTGTGCTGTTCTG-3'

2 结果

2.1 28 株菌株分离后,用 API LISTERIA 细菌鉴定为 *Lm*,溶血试验为阳性。毒力基因检测结果为溶血素 *hly* 基因、与侵袭性有关 *iap* 基因以及 *prfA* 基因全部为阳性(100 %),2 株无害李斯特菌(46、124 号)为阴性,详见表 2。

用合成的 3 对引物进行 PCR 扩增,扩增产物用

表 2 28 株 <i>Lm</i> 和 2 株无害李斯特菌毒力基因检测结果									
样品名称	菌号	<i>hly</i> 基因	<i>iap</i> 基因	<i>prfA</i> 基因	样品名称	菌号	<i>hly</i> 基因	<i>iap</i> 基因	<i>prfA</i> 基因
生猪肉	97	+	+	+	生鸡翅(一线)	135	+	+	+
生猪肉	112	+	+	+	生鸡腿(二线)	149	+	+	+
生猪肉	114	+	+	+	生鸡腿(一线)	150	+	+	+
生猪肉	115	+	+	+	生鸡腿(一线)	151	+	+	+
生猪肉	116	+	+	+	生鸡腿(一线)	152	+	+	+
生猪肉	118	+	+	+	生鸡腿(一线)	153	+	+	+
生猪肉	119	+	+	+	生鸡腿(二线)	154	+	+	+
生猪肉	121	+	+	+	生鸡腿(二线)	155	+	+	+
生猪肉	122	+	+	+	生鸡翅(一线)	156	+	+	+
猪头肉	22	+	+	+	生鸡翅(二线)	159	+	+	+
酱口条	42	+	+	+	生鸡胸	105	+	+	+
猪大肚	70	+	+	+	生鸡小胸	106	+	+	+
猪头肉	83	+	+	+	生猪肉	160	+	+	+
熟牛肉	125	+	+	+	生牛肉	188	+	+	+
牛蹄筋	46	-	-	-	生猪肉	124	-	-	-

注:1. 表中一线和二线表示屠宰加工过程的先后顺序,一线表示拔毛后;二线表示进一步细加工。2. + 代表阳性;- 代表阴性。

1.2 %的琼脂糖凝胶电泳分析,*iap* 基因在 400 bp 处有一特异扩增条带;*hly* 基因在 234 bp 处有一特异扩增条带;*prfA* 基因在 467 bp 处有一特异扩增条带,见图 1。

2.2 *Lm* RAPD 分型,在 RAPD 分型中使用随机寡聚核苷酸 R1、R2、引物序列,PCR 扩增所产生的模式图谱以扩增产物电泳得到的条带为基础进行分析,28 株 *Lm* 得到 12 种带型,见图 2。

28 株 *Lm* 样品全部分离于肉类,在 12 型中 A、B 两型共 9 株菌来自某肉联厂;C、D 两型共 10 株来自某肉鸡公司;另外 9 株 *Lm* 有 8 个 RAPD 型,分别来

自熟肉制品及零售市场,见表 3。

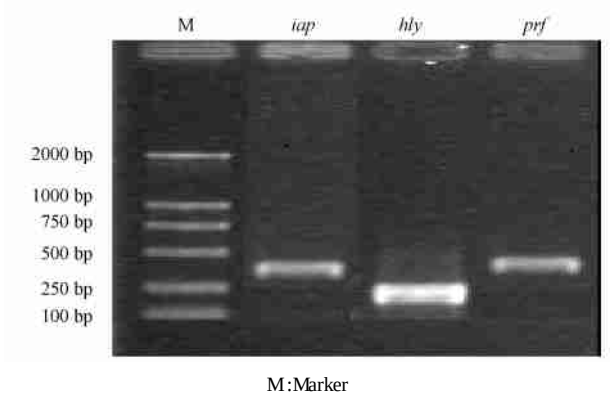
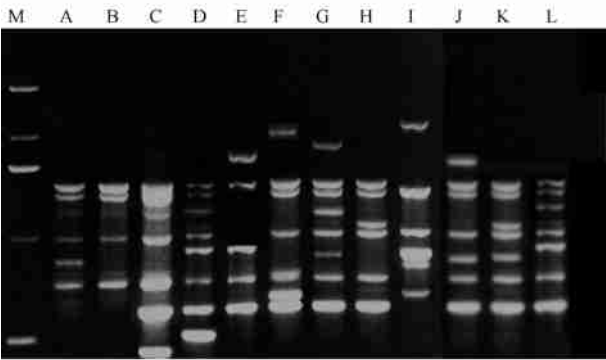


图 1 *iap*、*hly*、*prfA* 基因扩增图



M:Maker

图2 RAPD分型扩增图

表3 28株Lm RAPD分型

产品来源	样品名称	Lm (株数)	RAPD分型(株数)											
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
某肉联厂	生猪肉	9	6	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
某肉鸡公司	生鸡肉	10	-	-	6	4	-	-	-	-	-	-	-	-
肉食加工厂	熟肉制品	5	-	-	-	-	2	1	1	1	-	-	-	-
零售市场	生牛肉	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
零售市场	生鸡肉	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-
零售市场	生猪肉	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
合计	/	28	6	3	6	4	2	1	1	1	1	1	1	1

注：“-”代表阴性

28株Lm表现了12个RAPD型别。其中,A、B两型共9株来源于某肉联厂,C、D两型共10株来源于某肉鸡公司,其它9株Lm有8个RAPD型别,分别来自熟肉制品及零售市场。从分型结果可以看出来自同一企业的菌株其分型结果较集中,可能存在内部之间的互相污染。而来自其它分散企业的菌株其RAPD型别也比较分散,相互之间界线清楚,说明昌平区在不同时间、不同地点分离的单核细胞增生性李斯特菌其RAPD型别变化较大,有多种型别的细菌存在,但不同来源的菌株RAPD型别未表现出存在DNA同源性。

本次实验没有对食品的相关处理环节的环境进行菌株分离,也没有病人分离株,所以不能进行较深入的流行病学研究。以后将在食品流通的多个相关环节进行监测,并加大对腹泻病人的单核细胞增生性李斯特菌的检测。进一步探讨毒力因子在感染过程中的作用以及RAPD技术在Lm流行过程中的应用。

参考文献

[1] 姜永强.产单核细胞李斯特菌毒力因子的分子遗传学研究进展[J]. 国外医学(微生物学分册),1996,19(3):

3 讨论

使用API鉴定的Lm菌,PCR检测致病因子,是比较简单快捷的方法,但在选择检测毒力基因时除了溶血素(hlyA)、与侵袭性有关iap基因阳性的菌株对小鼠有致病力外^[6,7],prfA基因也可调控和转录多种Lm的毒力基因,所以此次试验将prfA作为Lm毒力基因进行了检测,检测结果看出prfA与hlyA、iap基因全部呈阳性反应,说明prfA基因与两个有致病力的基因反应一致,提示如果用prfA基因来代替API鉴定Lm,是一个节省费用、节省时间的好方法。

23-25.

[2] Andreas Bubert, Joachim Riebe, Norbert Schnitzler, et al. Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR[J]. J Clin Microbio,1997, 35(1): 179-183.

[3] Niederhauser C, Candrian U, Hofelein C, et al. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58:1564-1568.

[4] louie M, jayaratne, luchsinger, et al. Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes* [J]. J Clin Micro, 1996, Jan. 15-19.

[5] 杨晋川,景怀琦,李洪卫,等. 肠出血性大肠埃希菌(O157:H7)的基因同源性的分析[J]. 中华传染病杂志, 2003,21(6):410-412.

[6] 陈伟伟,付萍,杨毓环,等. 用PCR检测六类食品中单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000,16(3):68-69.

[7] 王连秀,赵维勇,牛桓彩,等. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌调查及毒力研究[J]. 中国食品卫生杂志,2001, 13(2):16-18.

[收稿日期:2006-01-30]