

空肠弯曲菌多重聚合酶链反应基因鉴定及其毒力相关基因分析

张茂俊 顾一心 冉陆 张建中

【摘要】 目的 建立空肠弯曲菌、结肠弯曲菌多重聚合酶链反应(m-PCR)鉴定方法,并对菌株毒力相关基因 *cadF*、*virB11*、*flaA*、*cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 的分布进行初步分析。方法 利用m-PCR的方法对经过传统生物化学方法鉴定的 65 株弯曲菌进行鉴定,并通过空肠弯曲菌特异基因 *hipO*、结肠弯曲菌 *glyA* 基因特异片段的 PCR 扩增对鉴定的结果进一步验证;利用特异引物 PCR 方法初步分析其毒力、毒素相关基因 *cadF*、*virB11*、*flaA*、*cdtA*、*cdtB* 和 *cdtC* 的分布。结果 m-PCR 扩增结果发现 65 株不同来源的弯曲菌,42 株为空肠弯曲菌,23 株为结肠弯曲菌。*hipO*、*glyA* 基因 PCR 扩增结果与 m-PCR 扩增结果一致。16.9% 菌株 PCR 鉴定结果与传统的生物化学鉴定结果不一致。100% (65/65) 菌株 *cadF*、*flaA* 基因阳性,并且 PCR 扩增片段大小一致。*virB* 的阳性率为 10.8% (7/65),其中空肠弯曲菌阳性率 11.9% (5/42),结肠弯曲菌阳性率为 8.7% (2/23)。空肠弯曲菌、结肠弯曲菌 *cdtA* 的阳性率分别为 100% (42/42) 和 78% (18/23);空肠弯曲菌 *cdtB* 扩增的的阳性率为 97.6% (41/42),而 23 株结肠弯曲菌扩增结果均为阴性;空肠弯曲菌、结肠弯曲菌 *cdtC* 的阳性率皆为 100%,但 PCR 扩增产物大小不一致,空肠弯曲菌为 555 bp,结肠弯曲菌约为 465 bp。结论 m-PCR 的方法可以有效的对空肠弯曲菌和结肠弯曲菌进行属内分型。中国菌株细胞溶胀毒素基因簇 *cdt* 基因的特征与文献报道国外菌株存在差异。

【关键词】 空肠弯曲菌; 结肠弯曲菌; 多重聚合酶链反应; 毒力、毒素相关基因

Multi-PCR identification and virulence genes detection of *Campylobacter jejuni* isolated from China
ZHANG Mao-jun*, GU Yi-xin, RAN Lu, ZHANG Jian-zhong. *National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: ZHANG Jian-zhong, Email: Helico99@sina.com

【Abstract】 Objective This study was to simultaneously identify *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates in China by Multi-PCR assay and to study the prevalence of six virulence and toxin genes on them. Methods A multi-PCR method with three sets of primers specifically designed for application of a 16S rRNA as a universal control, *mapA*, *ceuE* based on the specific sequence of *C. jejuni* and *C. coli*, was applied to detect 65 *Campylobacter* isolates from China. Another two separately PCR Primers were directed towards the hippuricase gene (*hipO*) characteristic of *C. jejuni* and *glyA* gene characteristic of *C. coli* were performed for further confirmation. The presence of the *cadF*, *virB11*, *flaA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* genes among these 65 strains were investigated by PCR. Results From multi-PCR detection, 42 isolates belonged to *C. jejuni*, other 23 isolates belong to *C. coli*. Data showing the identification were 100% in concordance with the separated PCR for *hipO* and *glyA* amplification. The efficiency (100%) of identification by these three primers multi-PCR method was higher than the biochemical test (83.1%). The *cadF* and *flaA* genes were detected from 100% (65/65) of the isolates and the PCR product of each gene were identical with each isolate. Only 10.8% (7/65) of the isolates were positive for *virB11*. The *cdtA* gene was found in 92% (60/65) of the isolates. 97.6% (41/42) of *C. jejuni* had *cdtB* gene, whereas no PCR product with this primers for all the *C. coli* isolates. *cdtC* was presented in all the isolates but the lengths of PCR products were different. For *C. jejuni*, it was 555 bp, for *C. coli*, it was about 465 bp. Conclusion This three primers simultaneous multi-PCR method seemed to be useful for the identification of *C. jejuni* and *C. coli* isolates from China since *cadF* and *flaA* genes were widely spread in *Campylobacter* isolates in this country. The present report on *virB11* was similar to previous reports from other countries, but the distribution of *cdt* gene cluster in *Campylobacter* species isolated from China might be different.

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所诊断室(张茂俊、顾一心、张建中);中国疾病预防控制中心传染病应急办公室肠道传染病组(冉陆)

通讯作者:张建中,Email: Helico99@sina.com

【Key words】 *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter coli*; Multiplex polymerase chain reaction; Virulence and toxin genes

空肠弯曲菌感染是夏秋季腹泻和旅行者腹泻的主要病因之一,尤以学龄前儿童发病率较高,且空肠弯曲菌感染与格林-巴利综合征(GBS)密切相关^[1]。随着生活模式的改变,近年来由于空肠弯曲菌感染造成的食物中毒事件也迅速增加。空肠弯曲菌的感染不仅在发展中国家发病率高,也是发达国家食源性感染的主要病因。空肠弯曲菌的感染在欧美等发达国家已列居食源性感染的首位,同时也是欧美国家食源性感染性疾病的主要监测病原菌。目前,世界各国对于空肠弯曲菌感染的疾病控制工作均给予了高度重视,包括建立不同的菌株分子生物学分型与鉴定方法,用于传染源的分析 and 指导相关疾病控制。本研究利用多重聚合酶链反应(m-PCR)的方法^[2],对我国不同来源的弯曲菌进行鉴定并对菌株的毒力、毒素相关基因 *cadF*、*virB11*、*flaA*、*cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 的分布进行初步分析,以期对我国的弯曲菌的重要基因分布有初步了解。

材料与方 法

1. 材料:

(1)菌株及背景:实验所用菌株由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所诊断室保存并提供,共 65 株。其中分离于腹泻患者粪便标本弯曲菌 33 株,分离于 GBS 患者粪便标本弯曲菌 8 株,鸡粪便标本弯曲菌 8 株,食物标本弯曲菌 16 株。阳性对照为空肠弯曲菌测序菌株 NCTC11168,结肠弯曲菌 CJ76。阴性对照为大肠埃希菌 K12、大肠埃希菌 O157、志贺菌、单核细胞增生李斯特菌、幽门螺杆菌 26695。

(2)试剂: Taq DNA 聚合酶是天为时代科技有限公司产品(cat # ET101-01);DNA 提取试剂盒为 QIA gene 公司 DNeasy Tissue Kit(cat # 69506);实验所用抗生素均为 Amresco 公司产品,其他化学试剂均为分析纯试剂。

2. 方法:

(1)传统生化鉴定:包括氧化酶试验、过氧化氢酶试验、H₂S 产生试验和马尿酸盐水解试验。具体实验方法按文献[3]进行。

(2)模板制备:单菌落来源的菌株在含 100 g/L 绵羊血的选择性培养基(哥伦比亚琼脂含万古霉素

0.25 mg/ml,两性霉素 B 20 mg/ml,多粘菌素 B 20 mg/ml 和 TMP 30 mg/ml)上,微需氧环境(体积分数 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂), 37℃ 培养 24 h;收集细菌悬浮于 200 μl PBS 中, DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA。

(3)PCR 反应:实验所用引物及 PCR 反应体系和产物大小见表 1。m-PCR: 20 μl 反应体系中 MgCl₂ (1.5 mmol/L), dNTP (2.5 mmol/L), 16S rRNA 上下游引物的终浓度分别为 10 μmol/L, MapA 上下游引物的终浓度分别为 20 μmol/L, CeuE 上下游引物的终浓度分别为 20 μmol/L, 模板 DNA (1 μg), Taq DNA 聚合酶(1 U)。反应程序: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 1 min, 59℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。常见 PCR: 20 μl 反应体系, MgCl₂ (1.5 mmol/L), dNTP (2.5 mmol/L), 上下游引物的终浓度分别为 10 μmol/L, 模板 DNA (1 μg), Taq DNA 聚合酶(1 U)。其他引物反应程序见表 1。

(4)PCR 产物检测:扩增反应完毕后,取 5 μl 反应液与 1 μl 6× 载样缓冲液混合,在体积分数 1.5% 溴化乙锭预染的琼脂糖凝胶中加样 3 μl 电泳, Stratagene Eagle Eye II 读胶仪照相记录。

结 果

1. m-PCR 鉴定: 65 株弯曲菌,通过 m-PCR 方法鉴定, 42 株为空肠弯曲菌, 23 株为结肠弯曲菌。与传统的生物化学反应鉴定结果相比, 11 株鉴定结果有差异。对 11 株鉴定结果有差异的菌株应用结肠弯曲菌、空肠弯曲菌的特异引物 GlyA、HipO 分别进行 PCR 扩增,结果与 m-PCR 结果一致。大肠埃希菌 K12 株,幽门螺杆菌 26695 株的 PCR 扩增结果为阴性。部分 m-PCR 扩增鉴定结果见图 1。

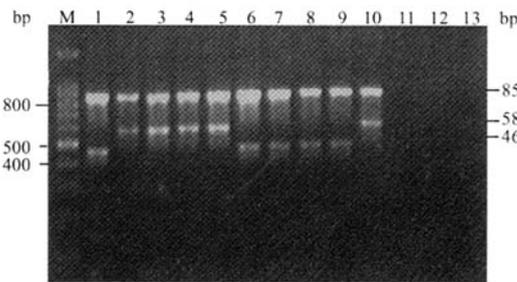
2. 不同分离来源空肠弯曲菌、结肠弯曲菌毒力相关基因、毒素基因的分布:应用 *cadF*、*virB11*、*flaA*、*cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 基因的特异引物进行 PCR 扩增,不同分离来源菌株的扩增结果见表 2。

讨 论

20 世纪 80 年代以来,随着弯曲菌分离技术的完善,空肠弯曲菌的感染以其所引起的夏秋季腹泻

表1 PCR 引物序列及扩增条件、产物的片段大小

基因名称	引物序列	PCR 产物 (bp)	PCR 反应程序
16S rRNA (<i>C. jejuni</i> & <i>C. coli</i>)	16F: 5'-ATCTAATGGCTTAACCATTAAC -3' 16R: 5'-GGACGGTAACTAGTTTAGTATT -3'	857	
<i>MapA</i> (<i>C. jejuni</i>)	mapA-F: 5'-CTATTTTATTTTTGAGTGTCTTGTG -3' mapA-R: 5'-GCTTTATTTGCCAATTTGTTTTAITA -3'	589	
<i>ceuE</i> (<i>C. coli</i>)	ceuE-F: 5'-ATTTGAAAATGCTCCAACATG -3' ceuE-R: 5'-TGATTTTATTAITTTGTAAGCAGCG -3'	462	
<i>hipO</i> (<i>C. jejuni</i>)	hip100F: 5'-ACTGCAAAAATTAGTGGCG -3' hip1128R: 5'-GAGCTTTAGCAAACCTTCC -3'	1028	95℃ 5 min, 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 5 min
<i>glyA</i> (<i>C. coli</i>)	glyA-F: 5'-GTAAAAACCAAGCTTATCGTG -3' glyA-R: 5'-TCCAGCAATGTGTGCAATG -3'	126	95℃ 5 min, 94℃ 1 min, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 5 min
<i>cadF</i>	cadF-F: 5'-TGGAGGGTAATTTAGATATG -3' cadF-R: 5'-CTAATACTAAAGTTGAAAC -3'	400	95℃ 5 min, 94℃ 1 min, 45℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 5 min
<i>virB11</i>	virB-F: 5'-GAACAGGAAGTGGAAAACTAGC -3' virB-R: 5'-TTCCGCATTTGGGCTATATG -3'	708	95℃ 5 min, 95℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 5 min
<i>flaA</i>	flaA-F: 5'-GGATTTGCTATTAACACAAAATGGTGC -3' cdtA-F: 5'-GGAAAATGGATTTGGGCGTAACT -3'	1728	94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 45℃ 1 min, 72℃ 3 min, 35 个循环, 72℃ 5 min
<i>cdtA</i>	cdtA-R: 5'-ATCACAAAGGATAATGGACAAT -3' cdtB-F: 5'-GTAAAAATCCCTTGTATCAACCA -3'	165	
<i>cdtB</i>	cdtB-R: 5'-GTTGCKACTTTGGAAITTCGAACCC -3' cdtC-F: 5'-TGGATGATAGCAGGGGATTTTAAC -3'	495	94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 42℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 5 min
<i>cdtC</i>	cdtC-R: 5'-TTGCACATAACCAAAGGAAG -3'	555	



注: M: 100 bp DNA Ladder Marker; 1, 6~9: 结肠弯曲菌扩增结果; 2~5, 10: 空肠弯曲菌扩增结果; 11~13: 阴性对照

图1 空肠弯曲菌、结肠弯曲菌 m-PCR 扩增结果

表2 不同分离来源空肠弯曲菌和结肠弯曲菌菌株毒力、毒素相关基因 PCR 扩增结果

弯曲菌	菌株来源				PCR 扩增阳性						
	腹泻患者	GBS 患者	鸡粪标本	食物	cadF	flaA	virB11	cdtA	cdtB	cdtC	
空肠	28	8	4	2	42	42	5	42	41	42	
结肠	5	0	4	14	23	23	2	18	0	23	
合计	33	8	8	16	65	65	7	60	41	65	

的高发病率越来越受到全球关注。WHO 将空肠弯曲菌感染确定为 27 种新发传染病之一。研究发现 90% 人类弯曲菌感染是空肠弯曲菌和结肠弯曲菌感染, 其中空肠弯曲菌感染占 90% 以上^[1,4]。基于选择性弯曲菌培养条件下不能很好的区分空肠弯曲菌和结肠弯曲菌。本研究采用 m-PCR 的方法, 通过 16S rRNA 确定为弯曲菌属, 同时通过对空肠弯曲菌和结肠弯曲菌特异基因片段的扩增, 确定为空肠弯曲菌或结肠弯曲菌。其 PCR 过程一步完成, 鉴定

的结果分别通过针对空肠弯曲菌、结肠弯曲菌其他特异基因的分别扩增和再次确定、核实。PCR 均获得正确扩增片段, 同时应用大肠埃希菌 K12、大肠埃希菌 O157、志贺菌、单核细胞增生李斯特菌、幽门螺杆菌作为阴性结果, 保证了检测的特异性。m-PCR 方法对于鉴定纯培养菌株的敏感度和特异度均超过传统的生化鉴定方法, 克服了传统生化鉴定方法步骤烦琐、结果不稳定的缺点, 做到快速、经济、准确。此方法对于这两种主要人类弯曲菌病原体的鉴定, 及其在流行病学的溯源、监测以及食物链中病原的有效识别都具有重要意义。该方法对于样品的直接检测应用有待于进一步证实。

目前对于空肠弯曲菌的致病机理不是十分明确, 但许多研究已经证实: 细菌的黏附、侵袭能力以及细菌鞭毛活动力等均与细菌的毒力及致病能力相关。菌株毒力特点的研究对于菌株毒力的变迁监测及致病机制的分析具有重要价值。

CadF (campylobacter adhesion to fibronectin) 编码相对分子质量 (M_r) 37×10^3 的外膜蛋白。空肠弯曲菌通过 CadF 蛋白与上皮细胞的纤维粘连蛋白 (FN) 特异结合, 是在空肠弯曲菌与宿主细胞的黏附与侵袭过程中起重要作用^[5,6]。目前研究发现 CadF 普遍存在于空肠弯曲菌和结肠弯曲菌中。由于 CadF 的保守性, cadF 基因通常被作为空肠弯曲菌和结肠弯曲菌感染的产物来检测被污染食物^[7]。本

研究发现,在包括空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的中国菌株中广泛存在 *cadF* 基因,其大小与已发表的序列大小一致。对于 *CadF* 在弯曲菌检测中的应用还有待于进一步研究。

鞭毛是细菌的运动器官,与细菌的黏附侵袭密切相关,属于细菌的毒力因子之一。空肠弯曲菌的鞭毛从结构上有 *flaA* 和 *flaB* 两个基因组成,分别编码 $M_r 59.5 \times 10^3$ 和 59.9×10^3 的蛋白,有研究发现只有 *flaA* 的突变显著减少了空肠弯曲菌的定植能力^[8,9]。本研究发现中国空肠弯曲菌和结肠弯曲菌普遍存在 *flaA* 基因。

virB11 是空肠弯曲菌 pVir 质粒上与幽门螺杆菌四型分泌系统组成成分 *virB* 同源性基因,*virB11* 在弯曲菌的染色体上没有同源序列。pVir 质粒上 *virB11* 的突变导致空肠弯曲菌的黏附和侵袭能力显著降低^[10]。pVir 质粒是弯曲菌上大小约 37.5 kb 的环行质粒,被认为是空肠弯曲菌的主要毒力因子之一。有研究证实 pVir 的存在与空肠弯曲菌引起的血便密切相关,是空肠弯曲菌侵袭性感染的标志。Bacon 等研究发现空肠弯曲菌 pVir 包含细菌四型分泌系统的组成成分,在对上皮细胞的黏附和侵袭的过程中起重要作用。pVir 在空肠弯曲菌的阳性率较低,大约为 1%~10%,也有研究发现 pVir 质粒与空肠弯曲菌四环素抗性基因携带质粒 pTET(O) 的存在相关,pTET(O) 阳性菌株 pVir 的阳性率明显高于 pTET(O) 阴性菌株^[11]。本研究发现中国菌株 *virB11* 的阳性率为 10.8% (7/65),与相关报道泰国 10% 菌株含 pVir 相似。对于中国菌株 pVir 质粒与临床分离个体的病理改变及四环素抗性基因携带质粒存在的关系有待进一步研究。

细胞溶胀毒素 CDT(cytolethal distending toxin) 是目前研究证明空肠弯曲菌分泌表达的唯一细胞毒素,通常由多个亚单位组成。在空肠弯曲菌中,*cdt* 基因簇由 *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* 串联组成^[12]。CDT 在空肠弯曲菌感染的时候表达并且具有中和抗体的作用。有研究表明 *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* 在不同菌株中的分布不一致,*cdtB* 广泛存在并与 CDT 毒素滴度相关,*cdtB* 突变引起空肠弯曲菌对上皮细胞的毒素作用降低,但也有研究表明 *cdtB* 突变没有引起 CDT 活性滴度的改变^[13]。本研究发现中国菌株空肠弯曲菌 *cdtC* 的阳性率为 100% (42/42),大小为 555 bp,结肠弯曲菌 *cdtC* 的 PCR 产物阳性率为 100% (20/20),但 PCR 产物大小与空肠弯曲菌不一

致,约为 465 bp。空肠弯曲菌 *cdtA* 的阳性率为 100% (42/42),结肠弯曲菌 *cdtA* 的阳性率为 78% (18/23)。利用文献报道引物 *cdtB* PCR 扩增结果发现中国菌株空肠弯曲菌 *cdtB* 的阳性率为 97.6% (41/42),而 20 株结肠弯曲菌扩增结果为阴性,表明中国结肠弯曲菌 *cdtB* 基因的分布或者引物区序列与国外报道菌株有差异,其差异特点有待于进一步测序结果的分析。中国菌株细胞毒素的毒素作用滴度与基因分布的关系需要进一步的细菌细胞相互作用的研究。

本研究探索了一套在我国弯曲菌菌株鉴定中应用的 m-PCR 方法,分析了菌株毒素、毒力相关基因的分布,初步获得了我国部分菌株的分子特征的基础资料,对我国弯曲菌感染的预防与控制工作有一定意义。

参 考 文 献

- [1] Moore JE, Corcoran D, Dooley JS, et al. *Campylobacter*. Vet Res, 2005, 36(3): 351-382.
- [2] Bang DD, Møller NE, Scheutz F, et al. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. J Appl Microbiol, 2003, 94: 1003-1014.
- [3] 中华人民共和国国家标准. GB/T 4789.9-2003. 食品卫生微生物学检验-空肠弯曲菌检验.
- [4] Hanninen ML, Perko-Makela P, Pitkala A, et al. A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area. J Clin Microbiol, 2000, 38(5): 1998-2000.
- [5] Konkel ME, Gray SA, Kim BJ, et al. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its products. J Clin Microbiol, 1999, 37: 510-517.
- [6] Ziprin RL, Young CR, Stanker LH, et al. The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. Avian Diseases, 1999, 43: 586-589.
- [7] Oliveira TC, Barbut S, Griffiths MW. Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. Int J Food Microbiol, 2005, 104(1): 105-111.
- [8] Nachamkin I, Bohachick K, Patton CM. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol, 1993a, 31: 1531-1536.
- [9] Nachamkin I, Yang XH, Stern NJ. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three days old chicks: analysis with flagella mutants. Appl Environ Microbiol, 1993b, 59: 1269-1273.
- [10] Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, et al. Involvement of a plasmid in the virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. Infect Immun, 2000, 68: 4384-4390.
- [11] Tracz DM, Keelan M, Ahmed-Bentley J, et al. pVir and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. Emerg Infect Dis, 2005, 11(6): 838-843.
- [12] Bang DD, Borck B, Nielsen EM, et al. Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Danish turkeys by PCR and cytolethal distending toxin production of the isolates. J Food Prot, 2004, 67(10): 2171-2177.
- [13] Purdy D, Buswell CM, Hodgson AE, et al. Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. J Med Microbiol, 2000, 49(5): 473-479.

(收稿日期: 2006-10-10)

(本文编辑: 张林东)