

# ERIC-PCR 在人工混合菌体系中的检出灵敏度\*

李艳琴 孙永艳 崔丽方 申 泉

(山西大学生物技术研究所化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

**摘要:** 提取大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和阴沟肠杆菌 (E-26R) 的基因组 DNA, 进行 ERIC-PCR, 可以分别得到稳定而独特的 DNA 指纹图谱; 模板量的变动范围从 10 ~ 100ng 都不会影响其图谱的稳定性; 在图谱中 DH5 $\alpha$  和 E-26R 各自均有一条含量最大的特征带, 其不易受实验环境和实验条件的干扰而发生变化。把 DH5 $\alpha$  和 E-26R 按比例混合, 提取混合菌基因组 DNA, 进行 ERIC-PCR, 结果表明: 混合菌的 DNA 指纹图谱为各纯菌图谱的叠加, 亦具有稳定性; 通过对凝胶电泳图谱中特征带的分析, 可以看出: 当 DH5 $\alpha$  的菌含量达到总菌量的 0.5% 时, 可被 ERIC-PCR 方法清楚地检测出来。为 ERIC-PCR 用于土壤微生物和环境微生物的研究, 特别是用于发酵工业中杂菌污染的检测与鉴定提供了一定的依据。

**关键词:** ERIC-PCR, 指纹图谱, 混合菌, 检出灵敏度

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0061-04

## The Sensitivity of ERIC-PCR in the Mixed Bacteria System

LI Yan-Qin SUN Yong-Yan CUI Li-Fang SHEN Quan

(Institute of Biotechnology, Chemical Biology and Molecular Engineering  
Laboratory of Education Ministry, Shanxi University, Taiyuan 030006)

**Abstract:** Genomic DNA of the two bacterial strains including *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and *Enterobacter cloacae* E-26R were amplified by PCR with specific primers of ERIC sequence. Each strain showed the stable and unique DNA fingerprint when PCR products were analyzed in agarose gel electrophoresis. The stability of the genomic DNA fingerprint wasn't influenced by the template from 10ng to 100ng. In the fingerprints there were characteristic bands. The unique band was influenced difficultly due to the change of the environment and condition of experiment. DH5 $\alpha$  and E-26R were mixed proportionately, and examined by ERIC-PCR. The result showed that the DNA fingerprints of the mixture were the superposition of each pure bacterium's. Analysis of the main bands showed that DH5 $\alpha$  can be examined by ERIC-PCR when its concentration gets to 0.5% of the total mixed bacteria. The study provides the reference for the research of soil microbe and environmental microbe, and especially can be used for quick identification and examination of the sundry bacterial contamination in the fermentation industry.

**Key words:** ERIC-PCR, Fingerprint, Mixed bacteria, Sensitivity

ERIC 序列 (Enterobacteria Repetitive Intergenic Consensus) 是一段在肠杆菌中发现的重复序列, 它在不同菌基因组中的定位和拷贝数不同<sup>[1]</sup>。ERIC-PCR 是 Versalovic 根据 ERIC 序列中部高度保守区设计的一对特异外向引物, 用于扩增两段 ERIC 序列间的 DNA 片段<sup>[2]</sup>。每一种菌都有其独特的稳定的 ERIC-PCR 指纹图谱, 因此该技术常被用于属、种、甚至菌株水平上的细菌分类与鉴定<sup>[3-5]</sup>。近年来有许多科学工作者把 ERIC-PCR 技术应用于混合微生物的研究中, 例如: 用于土壤微生物和活性污泥中微生物群

\* 山西省自然科学基金资助项目 (No. 20021080)

收稿日期: 2003-09-12, 修回日期: 2003-12-28

落结构的研究<sup>[6,7]</sup>，但用于发酵工业中杂菌污染的检测与鉴定尚未见报道。

本文试图把 ERIC-PCR 技术应用于发酵工业中杂菌污染的检测与鉴定。在正常情况下，发酵菌株 E-26R 的 ERIC-PCR 指纹图谱是固定不变的。如果有杂菌污染，其指纹图谱必定会发生变化。通过比较分析即可知道污染的是什么菌，还可通过污染菌特征带在凝胶图上的亮度，估计污染的程度。那么，污染到什么程度才能被该方法检测出来呢？即该方法在混合菌中的检测灵敏度是多少？这是本文所研究的对象。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) E-26R，本室保存，大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ ，本室保存。

1.2 基因组 DNA 的提取

参考 Versalovic 等所使用的总 DNA 提取方法<sup>[2]</sup>。

1.3 DNA 浓度测定

用 DyNA Quant TM 200 荧光仪 (Hoefer)。

1.4 ERIC-PCR 引物<sup>[2]</sup>

ERICR 5' -ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

ERIC2 5' -AAGTAAGTGAAGTGGGCTGAGCG-3'

1.5 ERIC-PCR 扩增条件及反应体系

按文献 [2]。

1.6 PCR 简易模板的制备

取 LB 液体培养菌液 4 $\mu$ L，与 100 $\mu$ L 高纯水混合于安道夫管中，沸水浴 2 min，取出立即放入冰中，离心，取 2 $\mu$ L 上清为模板。

1.7 DH5 $\alpha$  和 E-26R 混合菌体系

分别接种 DH5 $\alpha$  和 E-26R 于 5 mL LB 液体培养基，160 r/min，37 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养过夜，以 1% 接种量分别转接于 100 mL LB 液体培养基中，培养 8 h，梯度稀释，平板记数，然后把两种菌调整到相同的浓度 (约  $3 \times 10^7$  cfu/mL)，按表 1 混合。

表 1 DH5 $\alpha$  和 E-26R 混合菌体系

编 号	1	2	3	4	5	6	7
加样量 DH5 $\alpha$	0	1	5	10	100	500	1000
( $\mu$ L) E-26R	1000	999	995	990	900	500	0
占总菌比 DH5 $\alpha$	0	0.1	0.5	1	10	50	100
例 (%) E-26R	100	99.9	99.5	99	90	50	0

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 质量评价

通过对多次提取的基因组 DNA 用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测，结果表明其分子量均大于 23 kb (图 1)；经 DNA 浓度测定，均在 200 $\mu$ g/mL 以上；经 ERIC-PCR 扩增，均能得到清晰的 DNA 指纹图谱。

2.2 DH5 $\alpha$ 、E-26R 的 ERIC-PCR 图谱的特征及稳定性

图 2 结果表明 DH5 $\alpha$  和 E-26R 各有其独特的稳定的 ERIC-PCR 指纹图谱。DH5 $\alpha$  在 1.1 kb 处出现一条非常亮的带，E-26R 在 0.5 kb 处出现一条非常亮的带。每一次重复之间的实验条件的微小变化，会影响到图谱中微弱条带的变化，但不会影响到其特征带的变化。图 3 为不同模板量的 ERIC-PCR 指纹图谱，结果表明：模板量的变动范围从 10 ~ 100 ng 都不会影响 ERIC-PCR 指纹图谱的稳定性。

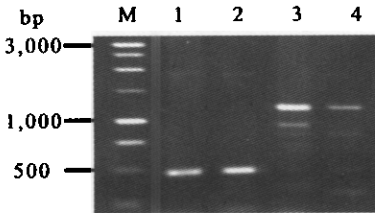


图 2 DH5 $\alpha$  和 E-26R 的 ERIC-PCR 电泳图谱  
M 1kb ladder, 1 E-26R (2003.5.15), 2 E-26R (2003.6.5), 3 DH5 $\alpha$  (2003.5.15), 4 DH5 $\alpha$  (2003.6.5)

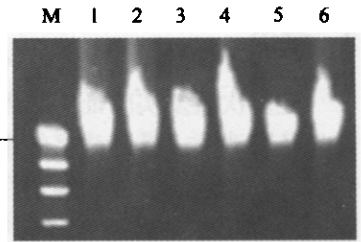


图 1 DH5 $\alpha$  和 E-26R 的基因组 DNA 电泳图谱  
M  $\lambda$ DNA/*Hind*III Marker, 1 DH5 $\alpha$  (2003.5.15), 2 DH5 $\alpha$  (2003.5.17), 3 DH5 $\alpha$  (2003.5.31), 4 E-26R (2003.5.15), 5 E-26R (2003.5.17), 6 E-26R (2003.5.31)

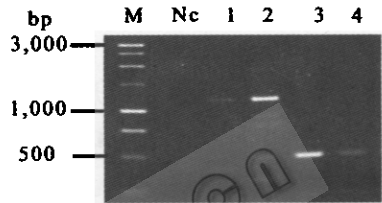
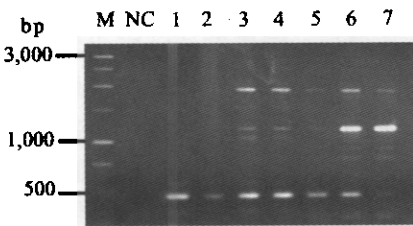


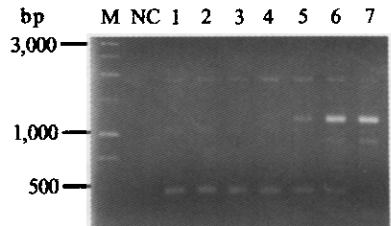
图 3 不同模板量的 ERIC-PCR 电泳图谱  
M DH5 $\alpha$  (10ng), 2 DH5 $\alpha$  (100ng), 3 E-26R (100ng), 4 E-26R (10ng)

2.3 混合菌体系 ERIC-PCR 指纹图谱的稳定性及检出灵敏度

混合菌体系的多次 ERIC-PCR 结果均得到相同的指纹图谱，其图谱是纯菌图谱的叠加。从图 4 (A) 可以看出：当 DH5 $\alpha$  菌量占到总菌量的 0.5% 时，在 1.1 kb 处即出现一条明显的带。随着 DH5 $\alpha$  菌量的增加，这条带的亮度也逐渐增强。由于这条带是 DH5 $\alpha$  特有的，因此，说明 DH5 $\alpha$  的菌量在 0.5% 时，即可被 ERIC-PCR 方法所检测。图 4 (B) 为简易模板的 ERIC-PCR 电泳图谱，结果与图 4 (A) 相同。



A



B

图 4 混合菌体系的 ERIC-PCR 电泳图谱

A 模板为提取的基因组 DNA, B 模板为煮沸裂解的简易模板

M 1kb ladder, Nc 阴性对照, 1 DH5 $\alpha$  0%, E-26R 100%, 2 DH5 $\alpha$  0.1%, E-26R 99.9%, 3 DH5 $\alpha$  0.5%, E-26R 99.5%, 4 DH5 $\alpha$  1%, E-26R 99%, 5 DH5 $\alpha$  10%, E-26R 90%, 6 DH5 $\alpha$  50%, E-26R 50%, 7 DH5 $\alpha$  100%, E-26R 0%

### 3 讨论

经多次重复实验证明,无论是单菌还是混合菌的 ERIC-PCR 均获得了具有较高稳定性且条带清晰、易于观察的指纹图谱;模板量从 10~100 ng 都不会影响 PCR 结果,说明这种方法的可靠性和实用性。

ERIC-PCR 在混合菌体系中的检出灵敏度为 0.5%,也就是说,发酵过程中有 0.5% 的杂菌污染,该方法即可检测出来,如果把特征条带纯化、标记、制成探针,通过 DNA 杂交的方法,可大大提高检测灵敏度。

该方法从收集菌体、提取基因组 DNA、PCR 到凝胶电泳结果,大约需要 8 h,用煮沸裂解的 DNA 做模板,时间可减少一半。大大解决了传统微生物检测结果滞后于工艺生产的尴尬状况。

当污染杂菌与发酵菌株形态特征相似或相同时,传统的微生物学方法就显得束手无策,而利用 ERIC-PCR 可以从基因水平上将二者区别并检测出来。

综上所述,ERIC-PCR 技术由于其稳定、灵敏、快速、方便、可靠,足以作为一种发酵工业中杂菌污染的检测和鉴定方法而得到广泛应用。

### 参考文献

- [1] Hulton C S J, Higgins C F, Sharp P M. *Molecular Microbiology*, 1991, **5** (4): 825~834.
- [2] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. *Nucleic Acids Research*, 1991, **19**: 6823~6831.
- [3] De Bruijn F J. *Appl Environ Microbiology*, 1992, **58** (2): 2180~2187.
- [4] Jersek B, Tcherneva E, Rijpens N, *et al.* *Letters in Applied Microbiology*, 1996, **23** (1): 55~60.
- [5] 李艳琴, 申 泉, 刘彬彬, 等. *微生物学通报*, 2003, **30** (5): 89~93.
- [6] Di Giovanni G D, Watrud L S, Seidler R J, *et al.* *Microbial Ecology*, 1999, **37**: 129~139.
- [7] 高平平, 赵 义, 赵立平. *环境科学学报*, 2003, **23** (6): 705~710.