

# 青岛地区空肠弯曲菌的分离鉴定及 *Jej* 基因序列分析

张 维<sup>1,2</sup>, 盖文燕<sup>3</sup>, 王 娟<sup>3</sup>, 王君玮<sup>3\*</sup>, 范红结<sup>1</sup>, 曲志娜<sup>3</sup>, 黄秀梅<sup>3</sup>, 翟海华<sup>3</sup>

(1. 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 青岛易邦生物工程有限公司, 山东 青岛 266114;

3. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032)

**摘要:** 为调查青岛地区空肠弯曲菌(*C. jejuni*)的流行状况, 采集青岛地区不同分离地点的鸡盲肠棉拭子及内容物 98 份, 经分离鉴定得到 23 株 *C. jejuni*, 分离率达到 23.47%。应用 *C. jejuni* 的马尿酸酶(*Jej*)基因作为分子标记, 对分离到的 23 株 *C. jejuni* 分离株和 4 株 *C. jejuni* 上海分离株进行分析, 并与 8 株已知的 *C. jejuni* 序列进行相似性比较, 构建系统进化树, 对其系统进化关系进行分析。结果表明, 分离菌株及已知菌株均能扩增出 774 bp 的 *Jej* 基因片段, 得到 11 个不同的序列, 有 11 个核苷酸变异位点, 变异率为 0.13%~1.42%; 基于 *Jej* 基因构建的进化树表明, 分离株分为 2 个分支, 其中 4 株分离株与 C. J-NCTC11168 和 C. J-IA3902 亲缘关系近, 1 株与 C. J-RM1221、C. J-S3 亲缘关系近, 2 株与上海分离株亲缘关系比较近; 2 株与 C. J-81116、C. J-M1 组成另外一个分支。

**关键词:** 青岛; 空肠弯曲菌; 马尿酸酶基因; 序列分析; 系统进化; 溯源

**中图分类号:** S855.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)07-0138-07

## Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni* Isolates in Qingdao and Analysis of *Jej* Gene Sequences

ZHANG Wei<sup>1,2</sup>, GAI Wen-yan<sup>3</sup>, WANG Juan<sup>3</sup>, WANG Jun-wei<sup>3\*</sup>, FAN Hong-jie<sup>1</sup>,

QU Zhi-na<sup>3</sup>, HUANG Xiu-mei<sup>3</sup>, ZHAI Hai-hua<sup>3</sup>

(1. Department of Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China;

2. YEBIO Bioengineering Co., Ltd. of Qingdao, Qingdao 266114, China;

3. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China)

**Abstract:** To research the prevalence of *C. jejuni* in Qingdao for the different geographical distribution genetic variation study, 23 strains of *C. jejuni* were isolated from 98 chicken appendix cotton slips and contents, the isolation rate was 23.47%. The *C. jejuni* hippuricase(*Jej*) gene was used as a molecular marker to identify 23 isolates from Qingdao area and four Shanghai isolates. The *Jej* gene fragment was cloned and sequenced from *C. jejuni* samples. Sequence analysis, similarity comparison with the known eight *C. jejuni* and phylogenetic analysis were performed to study the source and phylogenetic relationship. Results showed that 774 bp of the *Jej* gene fragment were successfully amplified from all of the 27 isolates. Sequence analysis indicated that the sequences could be divided into eleven types with a total of eleven nucleotide variant sites (variant rate from 0.13% to 1.42%). The phylogenetic tree based on *Jej*

收稿日期: 2014-01-28

基金项目: 农业部“引进国际先进农业科学技术”重点项目—948 项目[2011-G14(2)]

作者简介: 张 维(1982-), 女, 宁夏银川人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物细菌病监测与防控技术研究。

E-mail: cszw0328@163.com

\* 通讯作者: 王君玮(1968-), 男, 山东临沂人, 研究员, 博士, 主要从事动物源性食品安全与疫病控制方面的研究。

E-mail: yffs2000@sina.com

sequence showed that all Qingdao isolates could be divided into two branches. One branch was that four Qingdao isolates showed the closest relationship with C. J-NCTC11168 and C. J-IA3902, C. J-RM1221, C. J-S3 and one Qingdao isolate showed the closest relationship, followed by two Qingdao isolates and Shanghai isolates as the closest relationship. Two Qingdao isolates, C. J-81116 and C. J-M1 constituted another branch.

**Key words:** Qingdao; *C. jejuni*; *Jej*; sequence analysis; phylogenetic analysis; traceability

空肠弯曲菌(*C. jejuni*)是一种重要的人兽共患病病原菌,是多种动物如禽类、羊、牛和狗的正常共生菌<sup>[1-3]</sup>。近年来,空肠弯曲菌感染率在世界各地普遍呈上升趋势,主要导致人和动物的细菌性胃肠炎和急性腹泻,并伴有反应性关节炎、格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome, GBS)等严重的并发症<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>表明,有近 40%的 GBS 患者都有空肠弯曲菌感染的病史。空肠弯曲菌为条件致病菌,研究其致病条件和菌株来源对从源头控制其致病十分重要。自 2000 年首次公布空肠弯曲菌 NCTC11168 株全基因组序列后<sup>[6]</sup>,人们又陆续获得 RM1221、81-176 和 81116 株的全基因组序列,这些分离株分别来源于鸡肉、腹泻儿童和腹泻病人,它们来源不同,但是均与腹泻有关。Cooper 等<sup>[7]</sup>从家禽中分离到空肠弯曲菌 S3 菌株,并获得其全基因组序列,且证实其与腹泻有关;Zhang 等<sup>[8]</sup>获得了中国济南 IC-DCCJ07001 分离株的全基因组序列,ICDCCJ07001 分离株与 GBS 有关;Luo 等<sup>[9]</sup>从流产的羊胎儿中分离到 C. J-IA3902 分离株,获得其全基因组序列。常规的流行病学方法一般不能准确地确定其传染源,随着基因测序技术的发展,DNA 测序研究成为追溯空肠弯曲菌传染源、调查其传播途径的主要手段。王君玮等<sup>[10]</sup>认为,加强空肠弯曲菌的分子追踪技术研究及溯源体系建立是防止空肠弯曲菌污染动物源食品的主要手段。因此,对于动物源空肠弯曲菌的溯源,调查其传播途径及系统进化分析是必要的,且具有现实意义。分子生物学的发展尤其是 DNA 测序技术的普及,为空肠弯曲菌的鉴定、分子分型及溯源提供了有力工具。DNA 测序技术用于分子分类及系统进化的研究已经被越来越多的学者所认可。马尿酸酶基因(*Jej*)为空肠弯曲菌(包括空肠亚种和德莱亚种)所特有<sup>[11]</sup>,基因序列相对保守,变异率低,其序列的变化可以反映生物种群内和种群间的遗传变异。本研究选择空肠弯曲菌 *Jej* 基因作为分子标记,对青岛地区分离鉴定的 23 个代表性空肠弯曲菌分离株进行测序分析,并且与 GenBank 中已知

的 8 株空肠弯曲菌序列和上海市 4 株空肠弯曲菌分离株进行序列比对及系统进化关系的分析,旨在为空肠弯曲菌的分子诊断、流行病学研究及溯源奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 从青岛地区不同的屠宰场、养殖场、动物门诊及农贸市场采集鸡盲肠棉拭子及盲肠(内容物样品),共 98 份样品,低温运送至实验室。

空肠弯曲菌(ATCC33560)购自中国兽医药品监察所。4 株空肠弯曲菌上海分离株及结肠弯曲菌(ATCC7709)由中国农业科学院上海兽医研究所马志永研究员惠赠。

1.1.2 主要试剂 pMD18-T 载体试剂盒、MiniBEST DNA 纯化试剂盒、DL2000 DNA Marker 购自大连宝生物有限公司,*E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞购自北京天根生物公司,弯曲菌选择性培养基购自 Sigma 公司,CCDA 琼脂、哥伦比亚血琼脂基础培养基购自英国 OXOID 公司,2 $\times$  Taq PCR Master Mix 购自生工生物(上海)股份有限公司,绵羊血购自青岛高科园海博生物科技有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 细菌的分离鉴定

1.2.1 细菌分离培养 用接菌环沾取少量盲肠内容物或者棉拭子划线接种到 CCDA 选择性培养基上,将接菌后的平板置于 MGC 厌氧罐中,根据厌氧罐容量每袋 2.5 L 的标准,放入微需氧产气袋,此时容器内约含 CO<sub>2</sub> 5%~10%<sup>[12]</sup>。随后连同容器一并置于 42 $^{\circ}$ C 微需氧环境培养 48 h。

1.2.2 分离纯化 将分离培养的疑似菌落转接于 TTC 琼脂平板、哥伦比亚血平板纯化培养,培养条件同 1.2.1。

1.2.3 多重 PCR 方法检测 将哥伦比亚平板纯化所得的细菌按照煮沸法提取 DNA,根据盖文燕等<sup>[13]</sup>以 16S rRNA、马尿酸酶和 16S-23S rRNA 基

因为靶序列建立的鉴定空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的多重 PCR 方法,对纯化到的细菌进行鉴定。

1.2.4 菌株的保存 将经多重 PCR 及测序鉴定为阳性空肠弯曲菌菌株置于含 7% DMSO 的 MH 肉汤中, -80 ℃ 保存备用。

### 1.3 Jej 基因的克隆及序列分析

1.3.1 DNA 提取 将分离鉴定的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, 在哥伦比亚血琼脂平板上挑取灰色或黄色湿润的、有金属光泽的弯曲菌典型菌落置于盛有 800 μL 超纯水的离心管中, 振荡混匀, 12 000 r/min 室温离心 10 min, 去上清。加入 200 μL 超纯水, 振荡混匀, 煮沸 10 min, 取出冰浴 10 min, 12 000 r/min 室温离心 10 min, 取上清液, 用紫外分光光度计测定 DNA 含量, -20 ℃ 保存备用。

1.3.2 引物设计 根据已报道的序列设计 PCR 引物(Jej-F: 5'-CATCTTCCCTAGTCAAGCCT-3'和 Jej-R: 5'-GCAAAGGCAAAGCATCCATA-3'), 特异性片段大小为 774 bp<sup>[14]</sup>, 引物由生工生物(上海)股份有限公司合成。

1.3.3 PCR 扩增 PCR 反应体系为 25 μL, 2 ×

Taq PCR Master Mix 12.5 μL, DNA 模板 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, 灭菌超纯水补足至 25 μL。

PCR 扩增条件为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后取 5 μL PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 溴化乙锭)进行电泳鉴定。

1.3.4 扩增片段的克隆及测序 用 MiniBEST DNA 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化, 连接到 pMD18-T 载体, 转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 挑取单个克隆菌落, 以通用引物进行 PCR 扩增, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。PCR 鉴定为阳性的重组菌培养后送生工生物(上海)股份有限公司测序。

1.3.5 序列分析 将测序结果在 NCBI/GenBank 数据库进行 BLAST 比较。下载已知的 8 株空肠弯曲菌相应的 Jej 代表序列(表 1), 利用 MEGA 5.2 使用最大简约法(Maximum Parsimony, MP)与邻位相连法(Neighbor-Joining, NJ)分别构建 50% 多数一致树<sup>[15]</sup>。

表 1 采用的空肠弯曲菌核酸序列 GenBank 序列号

分离株	序列号	分离地点	来源	作者(年份)
C. J-RM1221	CP000025	美国	鸡	Derrick E F, <i>et al</i> (2005) <sup>[16]</sup>
C. J-NCTC11168	AL111168	英国	腹泻患者	Gundogdu O, <i>et al</i> (2007) <sup>[17]</sup>
C. J-81-176	CP000538	美国	小孩	Korlath J A, <i>et al</i> (1985) <sup>[18]</sup>
C. J-81116	CP000814	—	成年人	Manning G, <i>et al</i> (2001) <sup>[19]</sup>
C. J-ICDCCJ07001	CP002029	中国济南	GBS 患者	Zhang M, <i>et al</i> (2010) <sup>[8]</sup>
C. J-S3	CP001960	美国	家禽	Cooper K K, <i>et al</i> (2011) <sup>[20]</sup>
C. J-IA3902	CP001876	美国	羊	Yan L, <i>et al</i> (2011) <sup>[21]</sup>
C. J-M1	CP001900	美国	家禽	Friis C (2010) <sup>[22]</sup>

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌的分离鉴定

2.1.1 细菌分离 空肠弯曲菌在 CCDA 选择培养基上生长出较小的圆形光滑、灰色闪金属光菌落, 有时沿接种线向外扩散或容易连成串珠状, 形状颇似逗点。共采集样品 98 份, 分离到空肠弯曲菌 23 株, 分离率达到 23.47% (表 2)。

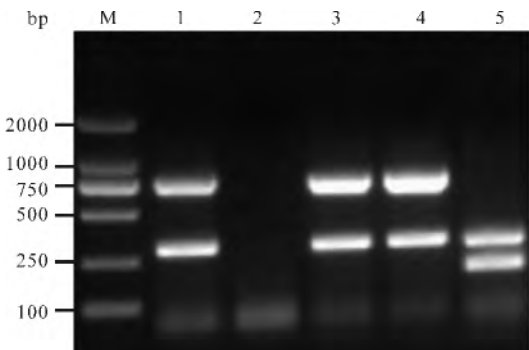
表 2 空肠弯曲菌分离株

分离株	样品代码	分离地点	来源
C. J-QDCw4	Jej-QDCw4	城阳河套	蛋鸡
C. J-QDCw7	Jej-QDCw7	城阳河套	蛋鸡
C. J-QDCc14	Jej-QDCc14	城阳屠宰点	肉鸡
C. J-QDCc5	Jej-QDCc5	城阳屠宰点	肉鸡
C. J-QDJk4	Jej-QDJk4	胶州王台	蛋鸡
C. J-QDJk6	Jej-QDJk6	胶州王台	蛋鸡

续表 2 空肠弯曲菌分离株

分离株	样品代码	分离地点	来源
C. J-QDJs18	Jej-QDJs18	胶州散养 A	蛋鸡
C. J-QDJs19	Jej-QDJs19	胶州散养 B	蛋鸡
C. J-QDJs29	Jej-QDJs29	胶州散养 C	蛋鸡
C. J-QDSd3	Jej-QDSd3	青岛市区动物门诊	肉鸡
C. J-QDSd5	Jej-QDSd5	青岛市区动物门诊	肉鸡
C. J-QDSa7	Jej-QDSa7	青岛市区屠宰点	肉鸡
C. J-QDSa2	Jej-QDSa2	青岛市区屠宰点	肉鸡
C. J-QDSm3	Jej-QDSm3	青岛市区市场 A	肉鸡
C. J-QDSm4	Jej-QDSm4	青岛市区市场 B	肉鸡
C. J-QDLm1	Jej-QDLm1	莱西市场 A	肉鸡
C. J-QDLm38	Jej-QDLm38	莱西市场 B	肉鸡
C. J-QDLf5	Jej-QDLf5	莱西某养殖场	蛋鸡
C. J-QDLf6	Jej-QDLf6	莱西某养殖场	蛋鸡
C. J-QDLa22	Jej-QDLa22	莱西屠宰厂 A	肉鸡
C. J-QDLa25	Jej-QDLa25	莱西屠宰厂 A	肉鸡
C. J-QDLb2	Jej-QDLb2	莱西屠宰厂 B	肉鸡
C. J-QDLb3	Jej-QDLb3	莱西屠宰厂 B	肉鸡
C. J-SH1	Jej-SH1	上海	—
C. J-SH6	Jej-SH6	上海	—
C. J-SH8	Jej-SH8	上海	—
C. J-SH10	Jej-SH10	上海	—

2.1.2 多重 PCR 试验结果 用多重 PCR 方法对分离到的 23 株空肠弯曲菌进行鉴定,电泳结果显示,空肠弯曲菌分离株分别在 314 bp 和 774 bp 处扩增出属特异性条带和种特异性条带,对照株结肠弯曲菌分别在 314 bp 和 194 bp 处扩增出属特异性条带和种特异性条带,而检测为阴性的菌株未出现特异性条带(图 1)。

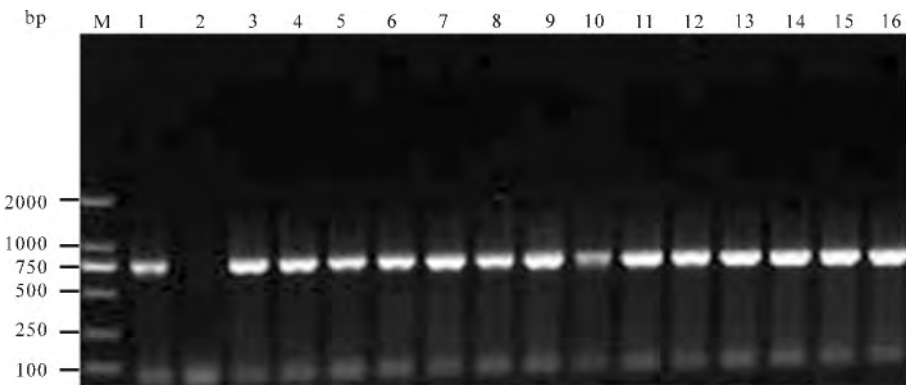


M. DNA 分子质量标准; 1. 空肠弯曲菌(ATCC33560); 2. 阴性对照; 3-4. 空肠弯曲菌检测样; 5. 结肠弯曲菌

图 1 *Jej* 基因多重 PCR 扩增结果

2.2 *Jej* 基因的克隆与序列分析

2.2.1 *Jej* 基因的 PCR 扩增结果 分别从 27 份空肠弯曲菌 DNA 样品中成功扩增出约 800 bp 的 *Jej* 基因片段,与预期目的片段长度相符,且无非特异性条带(图 2)。



M. DNA 分子质量标准; 1. 空肠弯曲菌(ATCC33560); 2. 阴性对照; 3-6. 上海分离株样品; 7-16. 空肠弯曲菌检测样

图 2 *Jej* 基因片段 PCR 扩增产物电泳结果

2.2.2 *Jej* 基因测序结果 将 27 份空肠弯曲菌的 DNA 样品的扩增产物克隆到 pMD18-T 载体后,每份样品选 3 个阳性克隆菌测序,确定其序列。结果显示,27 份样品的片段长度一致,均为 774 bp,应用 MultAlin(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)对 27 份样品的序列进行分析,共得到 11 个不同的序列,分别在 29、149、167、211、245、277、

284、311、355、383、644 位 11 个位点出现核苷酸变异,变异率为 0.13%~1.42%(图 3)。

2.2.3 *Jej* 基因序列相似性与系统进化分析 分别对 27 个空肠弯曲菌分离株的 *Jej* 基因序列应用 MultAlin 分析,结果显示,27 个分离株中 Jej-QD-Cw4 和 Jej-QDCw7 序列相同,Jej-QDLf6、Jej-QDCk4、Jej-QDSd3、Jej-QDSd5、Jej-QDSm3、

Jej-QDSm4、Jej-QDSa2、Jej-QDSa7、Jej-QDLa22 和 Jej-QDLa25 序列相同, Jej-QDJk6 和 Jej-QDJs29 序列相同, Jej-QDJs18 和 Jej-QDJs19 序列相同, Jej-QDCc14 和 Jej-QDCc5 序列相同, Jej-SH8、Jej-SH10、Jej-QDLf5、Jej-QDLb2、Jej-QDLb3 和 Jej-QDLm1 序列相同, Jej-SH6 和 Jej-

SH1 序列相同。每个分离地点选择序列不同的分离株, 城阳选 Jej-QDCw4 和 Jej-QDCc14, 胶州选 Jej-QDJk4、Jej-QDJk6 和 Jej-QDJs18, 青岛市区选 Jej-QDSd3, 莱西选 Jej-QDLf6、Jej-QDLm1 和 Jej-QDLm38, 上海选 Jej-SH6 和 Jej-SH8, 共计 11 个序列。

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Jej-QDSd3	CATCTTCCT	AGTCAAGCT	GTGCTTCAC	CTGTCTTGA	TTTTGTGAA	GTGTGTGTTA	TAACTTTAGC	ATTAAGACTT	AGGCTTAAAA	ATAAGCCTAA	AAAAAGAATT	TTAATTATT	TCATCTTTTA	
Jej-QDJk4														
Jej-QDLf6														
Jej-QDJk6														
Jej-QDLm1														
Jej-SH8														
Jej-QDCw4														
Jej-QDLm38														
Jej-SH6														
Jej-QDCc14														
Jej-QDJs18														
Consensus														
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Jej-QDSd3	CCTTTAAAA	TCATCCATGC	TATTTACAAC	ATTAGAAGCTT	CTTTGTATGC	TAGAAGATT	TTTACCTTCA	TTTTTGTTC	CATTGACTT	TCAATTAAA	GGCTCATTTG	TGTTAGCTAA	ATTTCATAA	
Jej-QDJk4														
Jej-QDLf6														
Jej-QDJk6														
Jej-QDLm1														
Jej-SH8														
Jej-QDCw4														
Jej-QDLm38														
Jej-SH6														
Jej-QDCc14														
Jej-QDJs18														
Consensus														
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Jej-QDSd3	GAATAAATC	TCACAGCTCC	TACATGTTCA	ATACCATTTT	CAGTTGTATA	GCTCCATTTT	TTAAGAGTAC	GAATACCACG	AATTTTACCG	CTTGCGCTTG	CTTTTATTTT	ACTATTACT	TTGTCAATAA	
Jej-QDJk4														
Jej-QDLf6														
Jej-QDJk6														
Jej-QDLm1														
Jej-SH8														
Jej-QDCw4														
Jej-QDLm38														
Jej-SH6														
Jej-QDCc14														
Jej-QDJs18														
Consensus														
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
Jej-QDSd3	TATTTGTTAT	GTTTTGAGTT	TGTTCTTGAG	TGGAAGTATC	ATTAACTTAA	ATACCTTTGT	TGATGATTTC	CTCGTAAAGT	TCACCACTTG	TTCTTTTCATC	TTTAAGACTT	AAATTGTAT	TAATAAAGTC	
Jej-QDJk4														
Jej-QDLf6														
Jej-QDJk6														
Jej-QDLm1														
Jej-SH8														
Jej-QDCw4														
Jej-QDLm38														
Jej-SH6														
Jej-QDCc14														
Jej-QDJs18														
Consensus														
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
Jej-QDSd3	TATAATAGCA	GCATCAGCCA	TAGTAAGTGC	TGTTTCTTTG	GCCTTAATCT	CTAAATATT	TGTTTTTTTA	GCATTGTCTAG	GATCTGCTAC	ATAACCCGAC	TTTCCATAAC	TTAAATAAT	AGGTGCACCA	
Jej-QDJk4														
Jej-QDLf6														
Jej-QDJk6														
Jej-QDLm1														
Jej-SH8														
Jej-QDCw4														
Jej-QDLm38														
Jej-SH6														
Jej-QDCc14														
Jej-QDJs18														
Consensus														
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	771
Jej-QDSd3	TTTTCATCAT	AAACTAAGCG	AATTCCATAT	TCATTTAAAA	AGCCTTTTGT	ATCTTTTGGC	AGATACTCAG	TTATTGCTTT	GCCTTTACCG	TTAATAGCAC	TCTGTCTTGC	TAGTGCCATA	TCIT	
Jej-QDJk4														
Jej-QDLf6														
Jej-QDJk6														
Jej-QDLm1														
Jej-SH8														
Jej-QDCw4														
Jej-QDLm38														
Jej-SH6														
Jej-QDCc14														
Jej-QDJs18														
Consensus														

图 3 空肠弯曲菌分离株 *Jej* 基因片段序列比对及核苷酸变异位点分析

将分析得到的 11 个 *Jej* 基因片段核苷酸序列经 BLAST 分析, 共发现 16 株空肠弯曲菌的 *Jej* 基因序列, 序列相似性在 96%~99%, 经分析后得到 8 株有代表性的核苷酸序列, 以空肠弯曲菌

(ATCC33560) 扩增的 *Jej* 基因作为参照, 应用 MEGA 5.2 的最大简约法绘制系统进化树(图 4)。从构建的进化树可以看出, 所有的青岛分离株可分为 2 个分支, 其中 Jej-QDJk4、Jej-QDJk6、Jej-QDLf6

和 *Jej*-QDCw4 组成一个分支,与 C. J-NCTC11168 和 C. J-IA3902 亲缘关系近;*Jej*-QDCw4 与 C. J-RM1221、C. J-S3 亲缘关系近;上海分离株与莱西市场分离株 *Jej*-QDLm1 和 *Jej*-QDLm38 亲缘关系比较近。*Jej*-QDJsl8、*Jej*-QDCc14 与 C. J-81116、C. J-M1 组成另外一个分支。利用邻位相连法构建的 50% 多数一致树与最大简约法建树的结果类似。

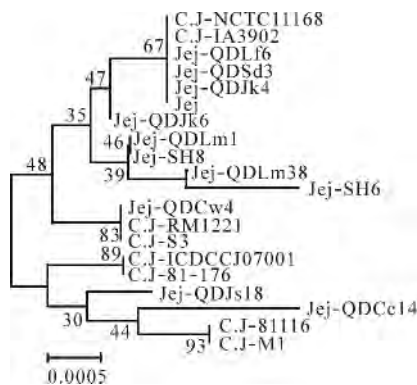


图 4 基于 *Jej* 基因序列的空肠弯曲菌分离株系统进化树

### 3 结论与讨论

*Jej* 基因为空肠弯曲菌(包括空肠亚种和德莱亚种)所特有<sup>[11]</sup>,其编码的 N-苯甲酰甘氨酸酶可以水解马尿酸盐,能有效区分空肠弯曲菌和结肠弯曲菌。目前,*Jej* 基因已经广泛应用于空肠弯曲菌的检测中,祝长青等<sup>[23]</sup>和吴高林等<sup>[24]</sup>以空肠弯曲菌特异的 *Jej* 基因为靶基因建立 PCR 方法,结果均显示其具有良好的特异性和准确性。*Jej* 基因序列相对保守,变异率低,其序列的变化可以反映生物种群内和种群间的遗传变异。本研究所采集的 98 份样品均来自于青岛地区不同地点,通过分离鉴定成功获得 23 株空肠弯曲菌,用笔者所在本实验室所建立的多重 PCR 鉴定空肠弯曲菌和结肠弯曲菌方法对分离到的 23 株空肠弯曲菌进行了进一步的鉴定,分离到的 23 株菌株均为空肠弯曲菌。序列分析结果表明,不同分离株的序列存在差异,碱基的变异率为 0.13%~1.42%。从构建的进化树可以看出,青岛市市区、莱西某养殖场、胶州王台等分离株与 NCTC11168 和 C. J-IA3902 菌株亲缘关系近,而 NCTC11168 和 C. J-IA3902 菌株分别来源于腹泻病人和羊的流产胎儿;城阳河套分离株与 C. J-RM1221 和 C. J-S3 菌株亲缘关系近,而 C. J-RM1221 菌株来自于鸡肉,C. J-S3 菌株来源于家

禽;胶州散养、城阳屠宰点分离株与来源于病人的 C. J-81116 菌株及来自人和禽的 C. J-M1 菌株亲缘关系较近,它们与中国济南 ICDCCJ07001 菌株等在进化树中单独组成一个分支,胶州散养 A 与散养 B 分离株与中国济南菌株亲缘关系近;上海分离株与莱西市场分离株亲缘关系比较近。分析发现,青岛市不同地方的分离株都有各自的特异性,初步推测其亲缘关系近的菌株可能来源于相同的传染源。同时基因片段序列相似性结果显示,青岛市市区、莱西市屠宰厂 A 和胶州王台养分离株序列相同,莱西市场和莱西屠宰场 B 分离株与上海分离株序列相似,初步推测,序列相同的活禽可能来源于同一个地方。

*Jej* 基因片段是空肠弯曲菌序列的保守区域部分,聚类分析发现该基因序列有一定的差异性,可作为不同地理分布分离株的分子遗传标记,区分不同地理来源的分离株。

通过对青岛地区空肠弯曲菌分离株序列的分析,了解不同分离株序列特点及地理分布,为判断空肠弯曲菌的发病趋势及进一步从分子水平上对空肠弯曲菌进行溯源奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Senok A, Yousif A, Mazi W, et al. Pattern of antibiotic susceptibility in *Campylobacter jejuni* isolates of human and poultry origin[J]. Jpn J Infect Dis, 2007, 60(1): 1-4.
- [2] 隆昌飞, 谭艾娟, 吕世明, 等. 猪、鸡空肠弯曲杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 天津农业科学, 2013, 19(3): 43-45.
- [3] 许紫建, 杨兵, 苏霞, 等. 空肠弯曲菌环介导等温扩增检测方法的建立和优化[J]. 华北农学报, 2013, 28(3): 222-226.
- [4] Ang C W, van Doorn P A, Endtz H P, et al. A case of Guillain-Barré syndrome following a family outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis[J]. J Neuroimmunol, 2000, 111(1/2): 229-233.
- [5] Dingle K E, Van Den Braak N, Colles F M, et al. Sequence typing confirms that *Campylobacter jejuni* strains associated with Guillain-Barré syndrome and Miller-Fisher syndromes are diverse genetic lineage, serotype, and flagellatype[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(9): 3346-3349.
- [6] Parkhill J, Wren B W, Mungall K, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences[J]. Nature, 2000, 403: 665-668.

(下转第 168 页)

## 参考文献:

- [1] Jing J, Parekh H S, Wei M. Advances in analytical technologies to evaluate the quality of traditional Chinese medicines [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 44: 39-45.
- [2] 田薇, 陈乃武, 李永民, 等. 紫外光谱组法鉴别云南白药及其伪品[J]. *中药材*, 2003, 26(6): 404-405.
- [3] 许卫锋, 张保国, 李勉, 等. 紫外光谱组法鉴别半夏与水半夏[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(5): 1191-1192.
- [4] 和智君, 张强, 蔡伟. 烟丝提取物紫外-可见光谱预测烟碱含量[J]. *中国烟草科学*, 2010, 13(4): 69-71.
- [5] 辛荣, 唐延林. 紫外光谱法预测烤烟烟叶中的全氮[J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29(5): 1367-1370.
- [6] 阮春生, 张强, 丁波洋, 等. 不同部位烟叶紫外可见光谱特征的研究[J]. *云南民族大学学报: 自然科学版*, 2009, 18(3): 237-241.
- [7] 李国栋, 胡建军, 周冀衡. 基于主成分和聚类分析的烤烟化学品质综合评价[J]. *烟草科技*, 2008(12): 5-9.
- [8] 陈景云, 胡建军. 烟叶化学成分-品质综合评价物元模型的建立与应用[J]. *烟草科技*, 2003(10): 31-34.
- [9] 吉松毅, 闫洪洋, 张志明, 等. 云南大理烤烟外观质量与感官质量的相关性研究[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(6): 3539-3543.
- [10] Victor A, Shashilov, Vitali Sikirzhyski, *et al.* Quantitative methods for structural characterization of proteins based on deep UV resonance Raman spectroscopy [J]. *Methods*, 2010, 52(1): 23-37.
- [11] Anna-Maija Saariaho, Dimitris S, Argyropoulos, *et al.* Development of the partial least squares models for the interpretation of the UV resonance Raman spectra of lignin model compounds[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2005, 37(1): 111-121.
- (上接第 143 页)
- [7] Cooper K K, Cooper M A, Zuccolo A, *et al.* Complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain S3 [J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(6): 1491-1492.
- [8] Zhang M, He L, Li Q, *et al.* Genomic characterization of the Guillain-Barre syndrome-associated *Campylobacter jejuni* ICDCCJ07001 isolate [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e15060.
- [9] Luo Y, Sahin O, Dai L, Sippy R, *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid, sensitive and specific detection of a *Campylobacter jejuni* clone [J]. *J Vet Med Sci*, 2012, 74(5): 591-596.
- [10] 王君玮, 王娟, 曲志娜, 等. 空肠弯曲菌对动物源性食品安全的影响及对策[J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29(11): 1119-1123.
- [11] Slater E R, Owen R J. Restriction fragmentation length polymorphism analysis shows that the hippuricase gene of *Campylobacter jejuni* is highly conserved [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1997, 25(4): 274-278.
- [12] 杨胜男, 王娟, 郑增忍, 等. 动物源空肠弯曲菌的分离及耐药性试验[J]. *中国动物医学进展*, 2013, 34(8): 116-119.
- [13] 盖文燕, 王君玮, 王娟, 等. 动物源空肠弯曲菌和结肠弯曲菌多重 PCR 鉴别方法的建立[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(2): 119-123.
- [14] van de Giessen A W, Tilburg J J, Ritmeester W S, *et al.* Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measures [J]. *Epidemiol Infect*, 1998, 121(1): 57-66.
- [15] 王小敏, 何孔旺, 周忠涛, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株的分离鉴定及遗传变异分析[J]. *华北农学*, 2014, 29(1): 232-238.
- [16] Fouts D E, Mongodin E F, Mandrell R E, *et al.* Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple campylobacter species [J]. *Mandrell PLoS Biol*, 2005, 3(1): e15.
- [17] Gundogdu O, Bentley S D, Holden M T, *et al.* Re-annotation and re-analysis of the *Campylobacter jejuni* NCTC11168 genome sequence [J]. *BMC Genomics*, 2007, 12(8): 162.
- [18] Korlath J A, Osterholm M T, Judy L A, *et al.* A point-source outbreak of campylobacteriosis associated with consumption of raw milk [J]. *J Infect Dis*, 1985, 152(3): 592-596.
- [19] Manning G, Duim B, Wassenaar T, *et al.* Evidence for a genetically stable strain of *Campylobacter jejuni* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(3): 1185-1189.
- [20] Cooper K K, Cooper M A, Zuccolo A, *et al.* Complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain S3 [J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(6): 1491-1492.
- [21] Luo Y, Sahin O, Dai L, *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid, sensitive and specific detection of a *Campylobacter jejuni* clone [J]. *J Vet Med Sci*, 2012, 74(5): 591-596.
- [22] Friis C, Wassenaar T M, Javed M A, *et al.* Genomic characterization of *Campylobacter jejuni* strain M1 [J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12253.
- [23] 祝长青, 蒋源, 刘秀梅, 等. 空肠弯曲菌 *hipO* 基因的 Real-time PCR 检测研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(8): 785-787.
- [24] 吴高林, 乔昕, 袁宝君. 空肠弯曲菌多重 PCR 快速检测方法建立的研究[J]. *现代预防医学*, 2007, 34(2): 207-209.