参考文献

[1] 李永鑫,李艺敏. 护士倦怠与自尊、健康和离职意向的相关性研究[J]. 中华护理杂志,2007,42(5):392.

[2] Fahrenkopf AM, Sectish TC, Barger LK, et al. Rates of medication errors among depressed and burnt out residents: prospective cohort study[J]. British Medical Journal, 2008, 336: 488 – 491.

[3] Ge CX, Fu JL, Chang Y, et al. Factors associated with job satisfaction among Chinese community health workers: a cross-sectional study[J]. BMC Public Health, 2011, 11: 884.

[4] Rohland BM, Kruse GR, Rohrer JE. Validation of a single-item measure of burnout against the Maslach Burnout Inventory among physicians[J]. Stress and Health, 2004, 20: 75 – 79.

[5] Bayram N, Gursakal S, Bilgel N. Burnout, vigor and job satisfaction among academic staff[J]. European Journal of Social Sciences, 2010, 17(1): 41 – 53.

[6] 潘菲,孙宏玉,官锐园,等. 急诊护士遭受工作场所暴力后对工作倦怠的影响[J]. 中华护理教育,2010,7(1):24 – 27.

[7] 施跃健,王玲凤. 医生职业压力与心理状况关系[J]. 中国公共卫生,2007,23(5):529 – 531.

[8] 谭一笑,叶明,蔡开贤. 医生主管幸福感现状调查[J]. 中国公共卫生,2010,26(5):515 – 516.

[9] 李永鑫. 工作倦怠的心理学研究[M]. 北京:中国社会科学出版社,2008:77 – 92.

[10] 周荣慧,呼滨,丁炎明,等. 北京城区综合性医院护士职业倦怠影响因素的追踪研究[J]. 中国护理管理,2010,10(9): 27 – 30.

[11] 李超平,时勘,罗正学,等. 医护人员工作家庭冲突与工作倦怠的关系[J]. 中国心理卫生杂志,2003,17(12): 807 – 809.

[12] 李超平,时勘,罗正学,等. 医护人员工作倦怠的调查[J]. 中国临床心理学杂志,2003,11(3):170 – 172.

[13] 李永鑫,李艺敏. 工作倦怠诊断标准的初步探讨[J]. 心理科学,2006(1):148 – 153.

[14] Ozyurt A, Hayran O, Sur H. Predictors of burnout and job satisfaction among Turkish physicians[J]. QJM, 2006, 99: 161 – 169.

收稿日期:2013 – 05 – 08　　(郭薇编辑　郑新校对)

中国公共卫生 CPH

· 检验技术 ·

克罗诺杆菌种间鉴定 *recN* 基因方法建立*

田雪[1,2],王娉[1],赵勇胜[1],胡玥[1],丛苑[1],陈颖[1],葛毅强[2,3]

摘　要:目的　建立一种基于重组和修复蛋白基因(*recN*)的克罗诺杆菌种间鉴定方法,将不同来源的克罗诺杆菌分离株鉴定到种。**方法**　扩增 *recN* 基因全长序列,选取不同长度的 *recN* 基因片段,用 MEGA 4.0 软件对克罗诺杆菌 8 个参考菌株进行聚类分析,确定克罗诺杆菌种间鉴定可信度高、序列较短的片段;设计并合成该片段的引物,以 8 株参考菌株作为参照,构建 44 株克罗诺杆菌实验菌株的聚类分析图,并用生化反应鉴定对聚类结果进行佐证。**结果**　基于 *recN* 基因上一段 640 bp 的片段可对克罗诺杆菌不同种的菌株进行区分;以 8 株参考菌株在聚类图上的位置作为参考,根据遗传距离的远近,44 株分离菌中有 37 株阪崎克罗诺杆菌,3 株丙二酸盐阳性克罗诺杆菌,3 株苏黎世克罗诺杆菌,1 株尤尼沃斯克罗诺杆菌,与生化反应鉴定结果一致。**结论**　该方法与生化鉴定和基于 *recN* 全基因方法相比简便快速,PCR 扩增后,一次测序反应就可以将克罗诺杆菌鉴定到种。

关键词:克罗诺杆菌;重组和修复蛋白基因(*recN*);种间鉴定

中图分类号:TS 207.4;R 155.5　**文献标志码**:A　**文章编号**:1001-0580(2015)01-0063-04　DOI:10.11847/zgggws2015-31-01-19

Species identification of *Cronobacter spp*. based on *recN* gene

TIAN Xue*, WANG Ping, ZHAO Yong-sheng, et al(*Agro-Products Safety Research Center, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing* 100123, China)

Abstract: Objective　To establish a method for species identification of *Cronobacter spp*. based on recombination and repair protein gene(*recN*), and to identify *Cronobacter* strains isolated from different sources at species level by the method established. **Methods**　The whole *recN* genes of 8 *Cronobacter* reference strains were amplified and sequenced. Different fragments of *recN* gene were selected according to their length and location. After comparison and analysis of the phylogenetic tree with MEGA 4.0, a credible and shorter *renN* gene sequence was chosen for species identification, and then 44 *Cronobacter* isolates and 8 reference strains were identified at species level and the results were proved by bioochemical reactions. **Results**　*Cronobacter* strains can be identified at species level based on 640 bp gene sequence of *recN*. The location of 8 reference strains in the dendrogram was used as a reference according to the genetic distance. All the 44 *Cronobacter* isolates were identified at species level, including 37 strains of *Cronobacter* sakazakii, 3 strains of

* **基金项目**:国家高技术研究发展计划(2012AA101605);农业公益项目(201003008 – 08);质检公益项目(201210043)

作者单位:1. 中国检验检疫科学研究院农产品安全研究中心,北京 100123;2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院;3. 中国农村技术开发中心

作者简介:田雪(1989 –),女,黑龙江哈尔滨人,硕士在读,研究方向:食品微生物及分子生物学。

通讯作者:陈颖,E-mail:chenyingcaiq@163.com;葛毅强,E-mail:68511009@163.com

数字出版日期:2014 – 4 – 8 14:10

数字出版网址:http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140408.1410.040.html

Cronobacter malonaticus, 3 strains of *Cronobacter* turicensis, and 1 strain of *Cronobacter* universalis. The results were coincident with biochemical reaction results. **Conclusion** The established method could be adopted to identify *Cronobacter spp.* species by one sequencing after PCR amplification, and it is simple and rapid compared with biochemical identification and the method based on the whole *recN* gene.

Key words: *Cronobacter spp.*; *recN* gene; species identification

克罗诺杆菌(*Cronobacter spp.*)可寄生在人体和动物肠道内,感染婴幼儿等免疫力低下人群,引起脑膜炎、菌血症和坏死性小肠结肠炎等病症[1]。自2008 年起,克罗诺杆菌(原阪崎肠杆菌)被划分为一个新属,包括 7 个种和 3 个亚种[2-3]。目前国内对克罗诺杆菌的鉴定方法仅针对该属中的某个或某些种[3-5],国外已有学者利用重组和修复蛋白(recombination and repair protein gene, *recN*)全基因将克罗诺杆菌鉴定到不同种的研究[6]。本研究在此基础上筛选出 *recN* 基因上一段较短且可信度较高的序列,设计并合成相应的扩增引物,基于该段基因序列,PCR 扩增后一个测序反应即可将克罗诺杆菌鉴定到种和亚种,结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　菌株　实验用菌株为 8 株国际通用的克罗诺杆菌参考菌株:阪崎克罗诺杆菌(ATCC29544)、丙二酸盐阳性克罗诺杆菌(DSM18702)、尤尼沃斯克罗诺杆菌(NCTC9529)、苏黎世克罗诺杆菌(DSM18703)、穆汀斯克罗诺杆菌(ATCC51329)以及都柏林克罗诺杆菌 3 个亚种都柏林亚种(DSM18705)、洛桑亚种(DSM18706)、乳粉亚种(DSM18707)和 44 株中国检验检疫科学研究院微生物菌种保藏管理中心(IQCC)保存的不同来源的克罗诺杆菌分离菌株,编号分别为 30421、30422、30424 ~ 30427、30429 ~ 30432、30434 ~ 30436、10416、10419、10424、10434、10440、10443、10444、30469、30470、30472 ~ 30474、10405 ~ 10407、10409、10410、10455 ~ 10459、10403.23 ~ 10403.26、10486 ~ 10488、10446、10439。

1.2　主要试剂与仪器　dNTPs(2.5 mmol/L)、Ex Taq(5 U/μL)、10 × Buffer(上海宝生物工程有限公司),DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司),脑心浸液肉汤(brain heart infusion broth, BHI)培养基、胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptose Soya Agar, TSA)培养基(北京陆桥技术股份有限公司),溴化乙锭,细菌微量生化鉴定管(北京奥博星生物技术有限责任公司)。DU640 核酸蛋白分析仪(德国 Beckman 公司),Veriti 96 Well Thermal Cycler PCR 扩增仪(美国 AB 公司),MODEL 200/2.0 POWER SUPPLY 电泳仪(美国 BIO-RAD 公司),VersaDoc 分子凝胶成像仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.3　方法

1.3.1　菌株培养　克罗诺杆菌实验菌株接种在 BHI 液体培养基中,36 ℃培养过夜,培养后的菌液在 TSA 平板上划线分离,36 ℃培养 24 h。

1.3.2　菌株生化反应种间鉴定[7]　从实验菌株 TSA 平板上分别挑取单菌落至 5 mL 生理盐水中,制成 0.5 麦氏浊度的菌悬液,按照细菌微量生化鉴定管中使用说明,将菌悬液逐一滴加于甲基-α-葡萄糖苷、丙二酸盐、卫矛醇、吲哚的生化管中,每管接种 3 滴,将接种好的丙二酸盐、卫矛醇、吲哚的生化管于 36 ℃,甲基-α-葡萄糖苷于 30 ℃分别孵育 24 h。每株菌进行 2 次平行的 4 项生化反应,孵育后进行结果判定。

1.3.3　基因组 DNA 提取　取适量的克罗诺杆菌培养物用试剂盒提取基因组 DNA,并用核酸蛋白分析仪测定 DNA 的浓度,A_{260nm}/A_{280nm} 值在1.8 ~ 2.0 之间的菌株基因组 DNA,稀释至 20 μg/mL 备用。

1.3.4　参考菌株 *recN* 基因全长扩增　PCR 扩增引物序列[8]由上海生工生物工程公司合成。配制 50 μL 反应体系,其中 10 × buffer 5 μL, dNTP (2.5 mmol/L)2.5 μL, Ex Taq(5 U/μL)5 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,灭菌水补齐至 50 μL。扩增条件:95 ℃预变性 10 min,95 ℃变性 30 s,59 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 2 min,35 个循环,72 ℃充分延伸 10 min,4 ℃保存。

1.3.5　参考菌株 PCR 扩增产物检测及序列测定　利用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行鉴定,配制 2 % 琼脂糖凝胶,取 5 μL PCR 产物加溴酚蓝混匀,以 DL 2000 DNA ladder marker 作为参照,120 V 恒压电泳 30 min。凝胶经溴化乙锭染色后,用凝胶成像系统成像。每个参考菌株选择 2 个平行扩增阳性样品送上海生工生物工程公司进行正反双向测序。

1.3.6　克罗诺杆菌种间鉴定的 *recN* 基因片段筛选　用 Lasergene 软件将 8 个参考菌株测序序列分别与 *recN* 基因上的 1 300 bp 片段、934 bp 片段(GenBank 检索号 FJ624474.1)、805 bp 片段(GenBank 检索号 FJ624473.1)和 640 bp 片段进行比对并截取相应片段。用 CLUSTALX1 软件分别对参考菌株已截取好的 4 个不同 *recN* 基因片段进行全局比对,用 MEGA 4.0 软件按照 N-J(neighbour-joining)法,基

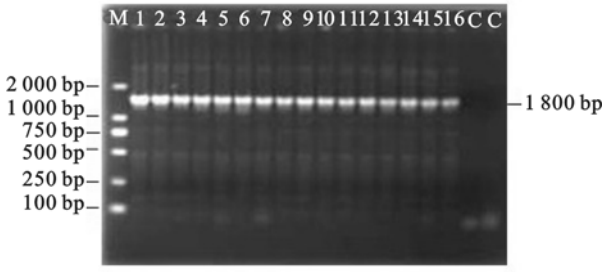
于 MCL(maximum composite likeliood)模型,分别对 4 个 *recN* 基因不同片段的参考菌株进行聚类,经 bootstrap(1 000 次运算)检测聚类结果可信性。依据聚类结果,确定一段可将克罗诺杆菌鉴定到种且可信度最高、片段较短的 *recN* 基因片段,设计并合成该片段的扩增引物,用该引物对 8 个参考菌株进行扩增,并用琼脂糖凝胶电泳验证引物的有效性。

1.3.7　克罗诺杆菌分离株的种间鉴定　用设计合成的 *recN* 目的片段的引物,对 44 株克罗诺杆菌分离株进行扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳验证后,选择 2 个阳性平行样品进行测序。截取测序序列 *recN* 基因上的目的片段,以 8 个参考菌株作为参照,用 MEGA 4.0 软件对 44 株克罗诺杆菌分离菌株目的片段进行聚类分析,生成聚类图,根据聚类关系将 44 株克罗诺杆菌分离菌株鉴定到种。

2　结　果

2.1　实验菌株生化反应鉴定结果　经鉴定,8 株克罗诺杆菌参考菌株的 4 项生化反应结果与参考文献[8]一致,44 株克罗诺杆菌分离菌株中有 3 株丙二酸盐阳性克罗诺杆菌,3 株苏黎世克罗诺杆菌,37 株阪崎克罗诺杆菌,编号 10403.23 的菌株经 2 次平行实验,丙二酸盐生化反应结果一次呈阳性,一次呈阴性,无法准确判定。为进一步确认该菌株的种,进行补充生化实验,最终判定其为尤尼沃斯克罗诺杆菌。

2.2　参考菌株 *recN* 全长基因扩增及测序(图 1)　8 株参考菌株在 1 800 bp 处显示出清晰明亮的特异性目的条带,表明实验菌株的目的基因片段扩增成功;每株菌选择 2 个阳性平行样品用于测序,8 株克罗诺杆菌参考菌株得到的测序片段长度均在 1 400 bp左右,测序信号好,无双峰现象,2 个平行样品测序结果一致,可用于克罗诺杆菌的聚类分析。

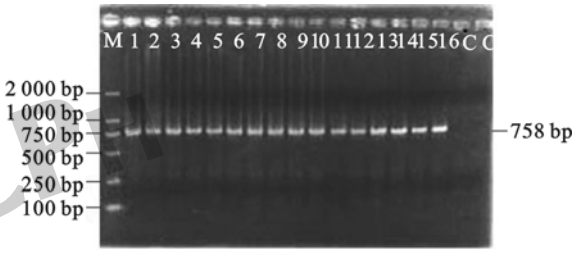


注:M:DL2000 DNA ladder marker;1 ~ 2:丙二酸盐阳性克罗诺杆菌;3 ~ 4:苏黎世克罗诺杆菌;5 ~ 6:都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种;7 ~ 8:都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种;9 ~ 10:都柏林克罗诺杆菌乳粉亚种;11 ~ 12:尤尼沃斯克罗诺杆菌;13 ~ 14:阪崎克罗诺杆菌;15 ~ 16:穆汀斯克罗诺杆菌;C 空白对照(ddH_2O)。

图 1　8 株克罗诺杆菌参考菌株 *recN* 全基因扩增结果

2.3　克罗诺杆菌种间鉴定的 *recN* 基因片段筛选　基于 *recN* 基因上 1300、934、805 和 640 bp 片段对 8 个参考菌株进行聚类,4 个不同片段的聚类得到的 8 个标准菌株在不同进化支上均可被区分开,聚类结果基本一致,但 640 bp 片段聚类结果的各分支可信度均较高,故本研究最终选择 640 bp 片段(GenBank 检索号 EU569492.1 基因上 117 ~ 756 bp)对克罗诺杆菌进行种间鉴定。

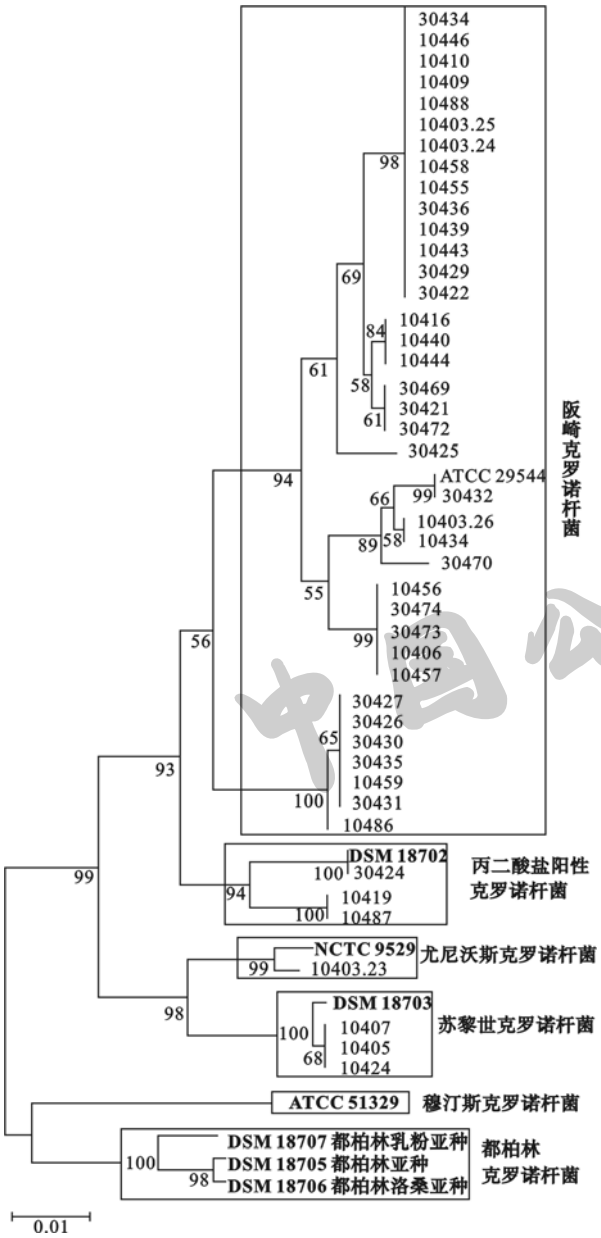
2.4　640 bp *recN* 基因片段的引物有效性验证(图 2)　根据 640 bp 片段在 *recN* 基因上的位置和序列,设计并合成扩增该片段的引物(上游引物 *recN*640F:5′-GACTTTAACGCCGGGATGAC-3′,下游引物 *recN*640R:5′-TCAAGCATATTCAGCACGCC-3′),扩增片段长 758 bp,包含 *recN* 基因上 640 bp 分析片段。用该引物对 8 个参考菌株扩增,结果显示,8 个克罗诺杆菌参考菌株均在 750 bp 左右显示出清晰明亮的特异性目的条带,表明已成功对标准菌株的目的基因片段进行扩增,所设计的引物有效且特异性较好。



注:M:DL2000 DNA ladder marker;1 ~ 2:丙二酸盐阳性克罗诺杆菌;3 ~ 4:苏黎世克罗诺杆菌;5 ~ 6:都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种;7 ~ 8:都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种;9 ~ 10:都柏林克罗诺杆菌乳粉亚种;11 ~ 12:尤尼沃斯克罗诺杆菌;13 ~ 14:阪崎克罗诺杆菌;15 ~ 16:穆汀斯克罗诺杆菌;C:空白对照(ddH_2O)。

图 2　8 株克罗诺杆菌参考菌株 *recN* 基因 640 bp 片段扩增结果

2.5　44 株克罗诺杆菌分离株种间鉴定结果(图 3)　根据参考菌株在聚类图中的位置和遗传距离的远近,44 株克罗诺杆菌分离菌株中 37 株是阪崎克罗诺杆菌,3 株丙二酸盐阳性克罗诺杆菌,3 株苏黎世克罗诺杆菌,1 株尤尼沃斯克罗诺杆菌。其中,阪崎克罗诺杆菌是优势种,这与目前国际上对克罗诺杆菌的鉴定和分型结果一致[9-11]。同一种内的菌株在不同进化分支上,遗传距离不同,提示克罗诺杆菌存在种内遗传多样性。基于 *recN* 基因 640 bp 片段的 44 株克罗诺杆菌聚类结果与 4 项生化反应鉴定结果一致,编号 10403.23 的菌株,仅利用 4 项生化反应无法准确判定其所属的种,在进行补充生化反应后鉴定为尤尼沃斯克罗诺杆菌,基于 *recN* 基因 640 bp 片段对分离菌株进行聚类即可以直接将其鉴定到尤尼沃斯克罗诺杆菌,聚类结果与生化鉴定结果吻合。



注：加粗的为 8 个参考菌株。

图 3　基于 *recN* 640 bp 基因片段的 44 株分离菌株聚类图

3　讨　论

recN 基因是克罗诺杆菌重组和修复蛋白基因，片段长 1 665 bp，在克罗诺杆菌不同种之间存在差异。国外已有学者基于 *recN* 全基因序列对克罗诺杆菌进行聚类分析，将阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐阳性克罗诺杆菌、尤尼沃斯克罗诺杆菌、苏黎世克罗诺杆菌、穆汀斯克罗诺杆菌以及都柏林克罗诺杆菌区分开，同时与肠杆菌科其他属进行了区分，但并未鉴定到都柏林克罗诺杆菌的亚种[7]。1 665 bp 片段较长，测序成本相对较高，本研究在此基础上建立的基于 *recN* 基因上的 640 bp 片段对克罗诺杆菌进行种间鉴定的方法，可信度较高，且成本较低。本研究所用的 44 株克罗诺杆菌分离菌株中阪崎克罗诺杆菌最多，可能与阪崎克罗诺杆菌在环境中分布较广，容易成为食品的污染源，而其余种是近几年刚被发现数量较少的新种有关，此外，对克罗诺杆菌检测和分析所用样品范围较窄，还不能包括克罗诺杆菌所有可能的污染源。因此，要进一步调查克罗诺杆菌不同种的分布情况，需扩大鉴定样品的种类和范围。聚类分析图显示，阪崎克罗诺杆菌被分在不同大分支上，该结果一定程度上反映了阪崎克罗诺杆菌是一个新的组合，且该种内遗传多样性很强，克罗诺杆菌属可能在以后被分离出更多的种，划分的更加详细。

参考文献

[1] 李锦程，王玉坤，曹远银. 阪崎肠杆菌检测技术研究进展[J]. 中国公共卫生，2008，24(3)：371－373.

[2] Iversen C, Mullane N, Mccardell B, et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov. comb. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis* sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *C. dublinensis* sp. nov. subsp. dublinensis subsp. nov., *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lausannensis* subsp. nov., and *C. lactaridi* subsp. nov[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58：1442－1447.

[3] 董晓辉，李程思，吴清平，等. 食品污染克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌)的分离及鉴定[J]. 微生物学报，2013，53(5)：429－436.

[4] 陈万义，艾连中，任婧，等. 婴儿配方粉中阪崎克罗诺杆菌 gyrB 基因的多态性分析[J]. 食品科技，2013，38(6)：40－44.

[5] 徐晓可. 基于 rpoB 基因部分序列对克罗诺菌属(原阪崎肠杆菌)分离株的分析[C]. 2010 第二届中国食品安全高峰论坛论文集. 广东：广东省科学技术协会科技交流部，2010.

[6] Kuhnert P, Korczak BM, Stephan R, et al. Phylogeny and prediction of genetic similarity of *Cronobacter* and related taxa by multilocus sequence analysis (MLSA) [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 136(2)：152－158.

[7] 杨海荣，赵贵明，赵勇胜，等. 食品中克罗诺杆菌属的表型特征研究[J]. 检验检疫学刊，2012，22(增刊)：127－132.

[8] El-Sharoud WM, O'Brien S, Negredo C, et al. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products[J]. BMC Microbiology, 2009, 9：24.

[9] Miled-Bennour R, Ells TC, Pagotto FJ, et al. Genotypic and phenotypic characterization of a collection of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) isolates[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 139(12)：116－125.

[10] Jaradat ZW, Ababneh QO, Saadoun IM, et al. Isolation of *Cronobacter spp.* (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing[J]. BMC Microbiology, 2009, 9：225－235.

[11] Iversen C, Lehner A, Mullane N, et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*：proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. sakazakii, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. malonaticus subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. Nov., *Cronobacter dublinensis* sp. Nov. and *Cronobacter* genomospecies 1[J]. BMC Evolutionary Biology, 2007, 7：64－74.

收稿日期： 2013－12－17　　（解学魁编辑　郑新校对）

中国公共卫生 CPH