

ERIC-PCR 技术特点及其应用

李犹平, 倪学勤* (四川农业大学动物科技学院, 四川雅安 625014)

摘要 ERIC 序列是近年来发现的存在于原核生物基因组中一类短的重复序列。该序列在染色体上的分布和拷贝数具有种间的特异性, 根据序列中心高度保守的 44 bp 的 ERIC 核心序列设计反向引物, 可扩增出反映细菌基因组结构特征的谱带。由于 ERIC PCR 快速简便, 图谱重复性好, 能用于细菌分类鉴定、环境监测、污染治理以及人和动物肠道菌群结构研究等方面。

关键词 ERIC; IRU; ERIC PCR; 特点; 应用

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)18-05358-03

Characteristic and Application of the Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR

LI You-ping et al (College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014)

Abstract Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus(ERIC), a kind of short duplication sequences is found to exist in the genome of prokaryotic organism. Distribution and copy of the sequence in chromosome is interspecific specificity. According to the highly conservative core sequence, 44bp, reverse primer is designed. ERIC PCR can generate unique fingerprints to reflect the structural feature of bacterial strains, and can identify species. ERIC PCR technique can be used in the identification of bacterium, environmental monitoring, investigation of intestinal flora of human beings and animals, which is rapid, simple and repetitive.

Key words ERIC; IRU; ERIC PCR; Characteristic; Application

传统的微生物分类鉴定方法是基于微生物的表型特征, 如生长、营养、生理生化等, 只能检测可培养的细菌, 且费时、费力, 易受操作方法影响。近年来随着分子生物学技术的发展, 如 PFGE、RFLP、ARDRA、RAPD PCR、DGGE PCR、ERIC PCR 等越来越多地应用于微生物种群结构特征, 系统多样性和动力学变化等方面的研究。这些技术克服了传统方法的局限性, 在微生物的分类鉴定中发挥越来越大的作用。ERIC PCR 技术是利用 ERIC 序列中的高度保守区来设计的一对反向引物进行 PCR 扩增, 因此通过该技术扩增基因组 DNA, 构建 DNA 指纹图谱, 建立快速检测的分子分型平台, 能广泛应用于微生物分类鉴定、环境微生物动态分析等方面的研究。

1 肠杆菌基因间重复共有序列(ERIC)的发现与分布

1990 年, Sharples 等^[1]在对 Escherichia coli 的基因组中 ds 的 3' 末端区进行分析时首次发现了 ERIC 片段, 命名为“基因间重复单位”[IRU (Intergenic Repetitive Unit)] 序列。随后, Hilton 等^[2]也鉴定出了相同的重复序列, 并命名为 ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), 即肠杆菌基因间保守重复序列。并且在其他的肠道细菌基因组中也发现了相似的序列。

曹又方等^[3]对 46 个已测序的菌株进行全基因组序列搜索, 结果表明 ERIC 仅主要存在于肠道细菌基因组间, 并且含有该序列的细菌基因组中, 序列的重复频率差异也很大。目前尚未在细菌噬菌体和质粒上发现有 ERIC 序列的存在^[4]。

2 ERIC 结构特征及功能

ERIC 序列长约 126 bp, 定位于基因组中可转录的非编码区域与转录有关的区域内, 但与编码序列没有特定的关系, 其中包含几个反向重复序列。在基因组中 ERIC 可以完整或部分缺失的状态存在, 位于多顺反子操纵子基因间区域, 或位于阅读框内上、下游不翻译区域, 唯一已知例外是 Vibrio cholerae 基因组中, 有一个 ERIC 序列包含在 sul 基因 5' 末端^[2]。

ERIC 的功能目前还不太清楚, 只是根据它的结构作了一些猜测。认为位于基因 3' 末端的 ERIC 可能由于形成二级结构后, 其茎环结构防止外切核酸酶对基因 3' 末端的降解, 促进上游基因的表达; ERIC 在基因组间的位置和拷贝数具有种属特异性, 可能该序列本身就为 DNA 提供某些结构或功能相关的信息, 这些信息被核酸代谢相关的特定蛋白识别, 从而影响核酸的代谢, 或者提供位点用于在类核中组织染色体; 大多数 ERIC 是可以转录的, 在 mRNA 中的茎环结构可能干扰核糖体与之结合进而影响翻译的进行; ERIC 可能通过促进基因的重新排列或者为基因重组提供不稳定位点来影响整个基因组的稳定性^[5-7]。

3 ERIC-PCR 的原理及特点

在 1999 年, Franklin 等^[8]和 Wikstrom 等^[9]分别报道了将短引物的 RAPD 技术应用到研究复杂的自然界微生物群落结构的动态检测上。但此技术存在很多问题, 如引物太短, 退火温度过低, 不易获得稳定的图谱, 重复性不理想, 缺乏标准化^[10]。ERIC PCR 是在随机引物 PCR (RAPD) 的基础上发展起来的对细菌 DNA 进行指纹图谱分析的一种方法。

ERIC 的中心有一段保守性很高的反向重复序列, 该序列长约 44 bp。Versalovic 等^[11]以 ERIC 的核心序列设计了一对反向引物 (ERIC1 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3', ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), 认为 ERIC PCR 扩增的是两个相邻的 ERIC 保守序列之间的区域, 由于不同的细菌基因组上的 ERIC 重复序列的数目和分布不同, 从而得到由一系列大小不同片段组成的 DNA 指纹图谱, 并将该技术申报专利。此后, ERIC-PCR 技术就被广泛用于细菌分类和菌种鉴别上。

Gillings 等^[12]研究指出, ERIC-PCR 与 RAPD PCR 相比, 更稳定, 重复性更好, 具备 RAPD PCR 不要求模板序列已知而直接进行扩增的优点, 又由于其引物序列较长 (一对 22 个碱基的引物), PCR 反应退火温度较高 (RAPD PCR 一般为 40 左右, 而 ERIC-PCR 为 52 左右), 所以能得到图谱稳定、重复性高, 并能产生多种独特的扩增产物 (50 ~ 3 000 bp), 可根据扩增产物的电泳条带来区分细菌的株型。

基金项目 四川农业大学青年基金。

作者简介 李犹平 (1977-), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向: 动物微生物生态。* 通讯作者, 博士, 副教授。

收稿日期 2007-03-23

不同地域和不同年代的同一株菌其指纹图谱一样^[13]；不同的方法提取基因组DNA，图谱具有良好的可重复性^[14]。

4 ERIC-PCR 产物形成规律

早期普遍认为，能扩增出ERIC PCR 产物的基因组则意味着它含有ERIC 序列。然而1997年Gillings等^[12]用该技术可从植物、脊椎动物、无脊椎动物、真菌等物种的基因组DNA中扩增出稳定的、多态性丰富的图谱，而这些生物的基因组中没有典型的ERIC 重复序列。因此，并不需要有ERIC 序列就可以获得多态性丰富的、可以反映底物序列差异的图谱。因此Gillings认为ERIC PCR 实质是一种随机扩增PCR (RAPD PCR)。

陈迎春等^[15]对大肠杆菌MG1655菌株进行ERIC PCR 图谱分析，发现ERIC PCR 所扩增的片段大多是基因组中ERIC 序列附近的DNA片段。他们对已经完成全基因组测序的近40个基因组的分析也表明，ERIC 序列之间的距离都远远大于ERIC PCR 图谱中最大的约3 kb 片段的距离，因此，其扩增的显然不是两个相邻的ERIC 序列之间的片段。分析E. coli K12 MG1655 菌株中1.1 kb 条带发现，它由丰度不等的多个片段组成，其中大部分的扩增片段是从基因组中ERIC 序列附近得到的，这些扩增片段的一端含有ERIC 序列，而另一端没有ERIC 序列。在所有的扩增片段中，仅有一小部分序列两端都不含有ERIC 序列。是由于基因组区域两端与ERIC 引物的相似性较高，以致被引物识别，从而在PCR 反应中被扩增出来，这是随机扩增的结果，但所占比例很小。

可以推断，如细菌基因组中含有ERIC 序列，那么ERIC PCR 的扩增产物通常一端含有ERIC 序列，而另一端则是随机匹配；如细菌基因组中不存在ERIC 序列，ERIC PCR 就成为一种较特殊的随机扩增，由于其引物较长(22个寡聚核苷酸)，因此可产生具有较高可重复性和一定特异性的指纹图谱。因此ERIC PCR 是一种半随机性质的PCR。

5 ERIC-PCR 技术的应用

ERIC PCR 用于分子微生物生态学研究，不仅免除了纯培养的局限，而且分析速度快、提供的信息量大。因而特别适合于对复杂微生物生态系统的区系结构进行连续动态分析，在环境监测、污染治理以及人和动物肠道菌群生态结构研究等方面具有广泛的应用前景^[16]。

5.1 在菌株分类和鉴定中的应用 张美玲等^[17]对从粪便样品中分离到的大肠杆菌，用ERIC PCR 分析则可以揭示个体水平上的多样性。金莉莉等^[18-19]对从62份样品中分离的单核细胞增生性李斯特氏菌运用ERIC PCR 技术进行鉴定，结果表明与国标生化方法检测结果完全一致，该技术可用于李斯特氏菌种、菌株的鉴定以及进一步分型研究。李海鹏等^[20]用ERIC PCR 技术对5株芽孢杆菌进行了分析，结果表明枯草芽孢杆菌TY7210菌株与其他芽孢杆菌菌株具有不同的指纹图谱，尤其不同于枯草芽孢杆菌(ATCC1.1849)，这为芽孢杆菌的快速鉴别奠定了基础。

最近几年国外对ERIC PCR 的研究也较多，用ERIC PCR 能鉴别从胃肠炎患者和环境中的气单胞菌属，而REP-PCR 则不能^[21]；从不同乳制品和环境样品中分离89株双歧杆菌，ERIC PCR 技术能对其进行分类鉴定^[22]；Rasschaert

等^[23]运用5种重复序列(ERIC1R-ERIC2R、REP1R-REP2I、ERIC2R、BOXAIR、(GG)5)对肠道沙门氏菌PCR 指纹图谱进行比较研究，结果表明用ERIC1R-ERIC2R 引物和(GG)5 引物，扩增条带多于其他3种，能达到13~22个条带；在分辨能力和指纹图谱遗传多样性方面两者具有相同的效果，比其他3种都好，并且都能用于区分沙门氏菌血清型。

5.2 在混合菌样品中的应用 在1999年Di Giovanni等^[24]首次报道了将ERIC PCR 应用到混合菌群群落结构的分析研究上，得到能反映菌群组成差异的重复性好且稳定的指纹图谱。并在研究混合菌体系时，发现相对于RAPD PCR、ARDRA 方法，ERIC PCR 的指纹图谱可较全面地反映混合体系中微生物的多样性，可在种及菌株水平上分辨不同微生物^[25]。Gonzalez等^[26]采用ERIC PCR 技术对酿酒过程中醋酸菌种群的变化进行了研究，发现随着发酵菌数量的增加，醋酸菌也迅速增殖；而改变一些酒精发酵的条件，醋酸菌的多样性也大大减少。跟踪并快速检测出醋酸菌的菌种水平，为控制好酒的质量提供了保障。

李艳琴等^[27]把大肠杆菌DH5 和阴沟肠杆菌E26R 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；李亮等^[28]以焦化工业废水中的悬浮污泥和生物膜的微生物群落为研究对象，用ERIC PCR 方法进行分析，结果显示悬浮污泥和生物膜的微生物群落组成存在较大的差异。

5.3 ERIC-PCR 在流行病调查中的应用 Khan等^[29]用ERIC PCR 技术对导致美国暴发胃肠炎的副溶血性弧菌进行研究分析，发现纽约和得克萨斯分离的菌株不同于太平洋西北地区分离的菌株。晏群等^[30]对30株临床分离的绿脓杆菌的DNA 进行ERIC PCR 扩增，结果显示30株绿脓杆菌中不同患者分离的27株指纹图谱表现出多态性，不同患者呈现不同谱型，即没有同源性，说明未发生绿脓杆菌的暴发流行。

鲁海峰等^[31]用ERIC PCR 和Southern 杂交方法分析大熊猫肠道菌群结构，发现大熊猫不同个体之间肠道微生物群落结构相似，而且同一个体在不同时期表现出较高的稳定性，但当个体的健康出现问题时肠道优势菌菌群结构有一定波动，这为监测大熊猫肠道微生物区系结构变化提供了可行性。因此，ERIC PCR 可应用于临床菌株的分类及流行病学调查，对探究疾病的感染源和传播途径等流行病学问题具有良好的应用前景。

6 存在的问题和展望

近期美国能源部发起了针对微生物的Genomes to Life 计划，测出一大批典型的细菌基因组的全序列。随着序列数据与其功能研究的不断积累以及生物信息学计算技术的发展，将有可能通过大规模的基因组分析比较来帮助理解重复DNA 序列在细菌细胞中所起的作用。

ERIC PCR 方法的有效性、简易性、快速性、灵敏性和可重复性使得它在细菌分类、分子微生物生态学研究有着广阔的应用前景，对发现新的菌株及对已知菌株作进一步的分析有很重要的现实意义，能成为细菌鉴别和细菌分类的分子遗传分析的有力工具。可以试图采用建立ERIC PCR 技术对肠道致病菌基因组DNA 进行扩增，根据各种不同的特异性

谱带, 构建肠道致病菌的指纹图谱, 建立快速肠道致病菌分子检测平台, 达到同时对多种肠道致病菌进行快速检测目的, 这在流行性肠道疾病的调查和快速诊断方面将会有很大的用途。

但作为一种方法, 也存在一些局限性, 如基于 PCR 反应本身所存在的扩增错误和偏差等, 样品的局限性, 以及在省去 DNA 提取而直接以细菌细胞为模板的 PCR 反应中, 其扩增效率受到细胞生理状况的影响等问题还有待解决。

参考文献

- [1] SHARPLES G J, LLOYD R G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 6503-6508.
- [2] HULTON C S J, HIGGINS C F, SHARP P M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria [J]. *Molecular Microbiology*, 1991, 5(4): 825-834.
- [3] 曹又方, 赵立平. ERIC 序列在不同细菌基因组中分布的分析 [J]. *山西大学学报*, 2002, 25(4): 354-357.
- [4] BACHELIER S, CLEMENT J M, HOFNUNG M. Short palindromic repetitive DNA elements in enterobacteria: a survey [J]. *Research in Microbiology*, 1999, 150: 627-639.
- [5] MERION E, BECERRIL B, VALLE F, et al. Deletion of a repetitive extragenic palindromic (REP) sequence downstream from the structural gene of *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase affects the stability of its mRNA [J]. *Gene*, 1986, 50(2/3): 305-309.
- [6] GILSONE, CLEMENT J M, PERRIND, et al. Palindromic units: a case of highly repetitive DNA sequence in bacteria [J]. *Trends in Genetics*, 1987(3): 226-230.
- [7] GILSON E, PERRIND, HOFNUNG M. DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to *E. coli* palindromic unit highly repetitive DNA implications for bacterial chromosome organization [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(13): 3941-3952.
- [8] FRANKLIN R B, TAYLOR D R. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 35(3): 225-235.
- [9] WIKSTROM P, ANDERSSON A C, FORSMAN M. Monitoring complex microbial communities using random amplified polymorphic DNA and principal component analysis [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 28(2): 131-139.
- [10] 杨朝国, 安乙敏. 病原微生物分子生物学分型方法的选择 [J]. *国外医学: 病毒学分册*, 2000, 7(2): 48-51.
- [11] VERSALOMI J, KOEUTH T, LUPSKI J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(24): 6823-6831.
- [12] GILLINGS M, HOLLEY M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1997, 25(1): 17-21.
- [13] DALLA COSTA L, MURINO K, RODRIGUES J, et al. Characterization of diarrhoeagenic *Escherichia coli* clones by ribotyping and ERIC PCR [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 1998, 47(3): 227-234.
- [14] HOUF K, ZUTTER L D, HOUF J V, et al. Assessment of the genetic diversity among acrobacters isolated from poultry products by using two PCR based typing methods [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(5): 2172-2178.
- [15] 陈迎春, 曹又方, 赵立平. 大肠杆菌 MGI655 菌株 ERIC PCR 图谱主带序列组成分析 [J]. *微生物学通报*, 2002, 29(6): 28-33.
- [16] 高平平, 赵立平. 微生物群落结构探针杂交评价不同培养基从活性污泥分离优势菌群的能力 [J]. *微生物学报*, 2003, 43(2): 264-270.
- [17] 张美玲, 周志华, 赵立平. 粪便样品中大肠杆菌多态性分子研究 [J]. *微生物学通报*, 2005, 32(2): 5-9.
- [18] 金莉莉, 王芳, 王秋雨. ERIC PCR 鉴定单核细胞增生利斯特氏菌 [J]. *中国公共卫生*, 2003, 19(7): 879.
- [19] 金莉莉, 王秋雨, 侯潇. ERIC PCR 技术在李斯特氏菌种、菌株鉴定中的应用 [J]. *遗传*, 2003, 25(2): 195-197.
- [20] 李海鹏, 赵春贵, 陈涛. 枯草芽孢杆菌 TY7210 菌株的 ERIC PCR 快速鉴别 [J]. *山西大学学报*, 2006, 29(1): 89-92.
- [21] SZCZUKA E, KAZNOWSKI A. Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. strains by randomly amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(1): 220-228.
- [22] VENTURA M, MEYLAN V, ZINK R. Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by use of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(7): 4296-4301.
- [23] RASSCHAERT G, HOUF K, IMBERECHIS H, et al. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(8): 3615-3623.
- [24] DI GIOVANNI G D, WAIRUD L S, SEIDLER R J, et al. Comparison of parental and transgenic alfalfa rhizosphere bacterial communities using Biolog GN metabolic fingerprinting and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence PCR (ERIC PCR) [J]. *Microbial Ecology*, 1999, 37(2): 129-139.
- [25] DI GIOVANNI G D, WAIRUD L S, SEIDLER R J, et al. Fingerprinting of mixed bacterial strains and Biolog gram-negative (GN) substrate communities by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence-PCR (ERIC PCR) [J]. *Current Microbiology*, 1999, 38(4): 217-223.
- [26] GONZALEZ A, HERRON N, POBLET M, et al. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 102: 295-304.
- [27] 李艳琴, 孙永艳, 崔丽方, 等. ERIC PCR 在人工混合菌体系中的检出灵敏度 [J]. *微生物学通报*, 2004, 31(4): 61-64.
- [28] 李亮, 魏桂芳, 童耕雷, 等. 用 PCR 指纹图技术分析焦化废水接触氧化池中悬浮污泥和生物膜的微生物种群组成 [J]. *中国微生物生态学杂志*, 2004, 16(1): 8-12.
- [29] KHAN A A, MCCARTHY S, WANG R F, et al. Characterization of United States outbreak isolates of *Vibrio parahaemolyticus* using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR and development of a rapid PCR method for detection of O8:K6 isolates [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 206: 209-214.
- [30] 晏群, 陈丽华, 刘文恩, 等. 分子生物学分型技术 ERIC PCR 的建立 [J]. *实用医学杂志*, 2003, 19(6): 688-699.
- [31] 鲁海峰, 魏桂芳, 李仲达, 等. ERIC PCR 分子杂交技术分析大熊猫肠道菌群结构 [J]. *中国微生物生态学杂志*, 2005, 17(2): 81-84.