

随机扩增多态性 DNA 分子标记技术 在肠球菌分型中的应用

付竹贤^{1,2}, 关仁梅², 王淑敏², 陈偲^{1,2}, 罗璠^{1,2*}

(1. 西南民族大学青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部四川省重点实验室, 四川成都 610041)

(2. 西南民族大学畜牧兽医学院, 四川成都 610041)

摘要: 该研究旨在探索随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 分子标记技术在肠球菌种间快速分型的效果。试验通过筛选模板、单引物、双引物及 RAPD 反应体系, 构建肠球菌种间分型体系, 对 32 株已知肠球菌分型确定分型相似度标准, 并通过对 46 株未知肠球菌进行种间分型以及管家基因 *rpoA* 测定验证分型效果。结果显示微波法提取基因组 DNA 满足实验需要, 筛选出 7 条单引物用于双引物配对组合, 最适的双引物反应体系为: 2×PCR Taq Mix 12.5 μL, 模板 DNA 1 μL, 引物各 1 μL, ddH₂O 9.5 μL; 分型效果最好的双引物组合为 Primer1+Primer5, 该引物组合可以在 80% 的相似度下区分肠球菌种间差异, Primer1+Primer3 组合在 500 bp 位置扩增出海氏肠球菌的特征条带, 可以作为海氏肠球菌的鉴定指标, 用以快速鉴定海氏肠球菌。

关键词: 肠球菌; 随机扩增多态性 DNA; 双引物; 体系优化

文章编号: 1673-9078(2023)11-86-93

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.11.1513

Application of Random Amplified Polymorphic DNA Molecular Marker Technique in Typing of *Enterococcus*

FU Zhuxian^{1,2}, GUAN Renmei², WANG Shumin², CHEN Cai^{1,2}, LUO Fan^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Utilization, Ministry of Education, Sichuan Province, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

(2. College of Animal and Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: The effect of random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular marker technique on rapid typing of *Enterococcus* species was investigated. An interspecific typing system of *Enterococcus* was constructed through screening the template, single primer, double primer and RAPD reaction system. The standard of strain similarity typing was established by typing 32 known strains of *Enterococcus*. Interspecific typing of 46 unknown strains of *Enterococcus* and testing of the house-keeping gene *rpoA* were performed to verify the effect of typing. The results showed that microwave-assisted extraction of the genomic DNA satisfied the experimental requirements, and seven single primers were selected for the paired combination of two primers. The optimal two-primer reaction system was: 2× PCR Taq Mix 12.5 μL; Template DNA and primer 1 μL; ddH₂O 9.5 μL. The optimal two-primer pair was Primer 1 and Primer 5, which allowed the distinguishment of *Enterococcus* species with 80% similarity. The primer pair of Primer1 and Primer3 can amplify the characteristic DNA segment of *Enterococcus hirae* at 500 bp, which can be used as the identification index for the rapid identification of *Enterococcus hirae*.

Key words: *Enterococcus*; random amplified polymorphic DNA; pairs of primer; system optimization

引文格式:

付竹贤, 关仁梅, 王淑敏, 等. 随机扩增多态性 DNA 分子标记技术在肠球菌分型中的应用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(11): 86-93

FU Zhuxian, GUAN Renmei, WANG Shumin, et al. Application of random amplified polymorphic DNA molecular marker technique in typing of *Enterococcus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(11): 86-93

收稿日期: 2022-11-28

基金项目: 四川省自然科学基金面上项目 (2022NSFC0114); 西南民族大学研究生创新型科研项目 (CX2021SZ14)

作者简介: 付竹贤 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: f2835757820@163.com

通讯作者: 罗璠 (1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物菌群互做演变及益生微生物资源开发利用, E-mail: luofany77@sina.com

肠球菌是传统发酵食品中常见的菌株^[1],因其具有明显益生作用,目前广泛应用于奶酪、泡菜、香肠等发酵食品以及动物饲料生产中^[2]。肠球菌是一类来源广泛、功能多样而且又具有致病性的微生物种类,由于其抗逆性强的特点,近年来常被作为益生菌用于饲料工业中,同种类和来源的肠球菌其功能、致病性和抗生素抗性就可能存在较大差异,因此肠球菌种的准确鉴定就显得尤为必要^[3]。肠球菌种类丰富,不同种的肠球菌益生性及安全性也有明显差异,近年来肠球菌异位感染现象增多,肠球菌使用的安全性受到质疑,因此快速准确区分种间肠球菌差异对于其合理使用及临床治疗都有重要意义^[4]。

随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 是一种快速的基因分析鉴定法,自 20 世纪 90 年代问世以来,因其操作简便快速、条带丰富、容易分型等特点,广泛应用于物种遗传亲缘关系分析、物种鉴定^[5-8]等方面。该技术利用随机引物对样品进行扩增,事先不需要知道被测样品的基因序列,扩增的多态性条带可用于样品间亲缘关系的分析^[9-12],且简单灵敏、经济便捷,鉴于 RAPD 的明显优势,目前在多种生物分型鉴定中广泛被采用^[13-19]。RAPD 技术在细菌的基因分型研究中有深入地研究和应用,如 Eduardo 等^[20]利用 RAPD-PCR 分型技术对 *Malassezia* spp. 进行分析,可以得出不同来源的菌株彼此间的亲缘关系,且发现特异性的扩增带能够区分各菌株。Marisa 等^[21]利用 RAPD 技术对芽胞杆菌进行分型鉴定,结果表明芽胞杆菌在属内存在很高的多态性。Christian 等^[22]比较了 16S rDNA 和 RAPD-PCR 技术检测对 171 株乳酸菌分离株的鉴定结果,结果均为弯曲乳杆菌、桑弗朗西斯乳杆菌和肠球菌,两者的鉴定结果相同。

在细菌分类学中可以使用几种管家基因在种属水平上进行鉴定分析,因为它整合了细菌染色体周围不同分子钟的信息,除 16S rDNA 基因,管家基因 *rpoA* (编码 RNA 聚合酶 α 链) 测序对肠球菌属的物种鉴定具有较高的鉴别力,也被用于肠球菌种水平鉴定^[23]。肠球菌种间差异度小,常用的 16S rDNA 分析不能准确区分种间肠球菌差异,目前常用于细菌基因分型的分子生物学方法,如随机扩增多态性 DNA 技术 (RAPD)、脉冲场凝胶电泳 (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) 和扩增片段长度多态性分析 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) 等^[24],在肠球菌种间大规模快速鉴定中的应用还未见系统深入研究和相似度的分型标准。

因此,本研究通过构建 RAPD 筛选体系和分型标

准,为肠球菌菌群规模化快速鉴定提供可行的方法。

1 材料与方法

1.1 菌株

已知菌株:屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) B13、1003、999、1056、888、7'、106、166、1020、1018、1062、1208、1232、141、451、1074、1096;

耐久肠球菌 (*Enterococcus durans*) 15、130、426、22-2、1029、127、10'、178、1451;

海氏肠球菌 (*Enterococcus hirae*) 39、1019、1021、1041、1061、1065;

以上 32 株肠球菌使用 16S rDNA 结合 *rpoA* 管家基因鉴定。

未知肠球菌: 1042、401、461、472、1231、1246、115、147、1004、1005、1009、1010、1011、1014、1016、1017、1024、1026、1027、1030、1031、1032、1033、1034、1035、1037、1038、1044、1045、1049、1050、1051、1054、1055、1057、1059、1060、1064、1066、1069、1073、1082、1087、1099、1101、1008。

以上 46 株菌株均分离纯化于农家传统泡菜,使用 16S rDNA 鉴定到属水平。

1.2 主要仪器设备

立式自动压力蒸汽灭菌器,厦门致微仪器有限公司;精密电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;微波炉,广东美的厨房电器制造有限公司;高速冷冻离心机,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;超净工作台,中国青岛海尔有限公司;电热恒温培养箱,天津泰斯特设备有限公司;超微量核酸蛋白测定仪,上海学静生物科技有限公司;智能凝胶化学发光成像系统,中国天能公司;PCR 仪,北京东胜创新生物科技有限公司;水平电泳仪,南京庚辰科学仪器有限公司。

1.3 主要试剂

2×Taq PCR Master Mix 预混酶、Marker DL5000、Marker DL2000 均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;Agarose 琼脂糖、50×TAE 电泳缓冲液和 Gel RED 核酸染料购于北京擎科生物科技有限公司;TE 缓冲液 (pH 值 8.0)、PBS 缓冲液 (pH 值 7.4)、MRS 液体培养基均购于成都欣亿维有限公司;DP302 型细菌基因组 DNA 提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 模板筛选

1.4.1.1 模板提取方法比对

从-20℃冰箱中取出保藏菌株,以1%的接种量接种于1 mL的MRS液体培养基,放入37℃恒温培养箱静置培养16 h。选用试剂盒法和微波提取法两种方法提取基因组DNA,试剂盒提取方法按说明书操作步骤进行,微波法提取DNA具体操作为:取细菌培养液1 mL,10 000 r/min离心2 min,弃去上清液,用1 mL PBS溶液洗涤两次、1 mL 1xTE溶液洗涤一次,用200 μL 1xTE溶液重悬,功率700 W的微波炉预热1 min后,加热2 min,13 000 r/min离心5 min,收集上清液即为DNA。用微量核酸蛋白测定仪测定2种提取方法获得的基因组DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀值和DNA的浓度,并电泳检测基因组DNA条带及RAPD条带比较。

1.4.1.2 储存时间对模板的影响

提取模板于-20℃分别存放0、30、50、60、70、80、90 d,电泳检测基因组DNA的条带及RAPD分型条带,选取条带清晰且重复性好的时间,作为模板保存时间。

1.4.2 单引物筛选

以基因组DNA为模板,选择8条随机引物,对模板DNA进行单引物扩增,选取条带清晰且条带较多的引物,用于后续试验。引物序列信息如表1所示。

表1 RAPD分型随机引物序列信息

Table 1 Oligonucleotide primers used to perform PCR

reactions			
基因	引物序列 (5'-3')	Tm/℃	文献
Primer1	GGTGACGCAG (10 bp)	36	[25]
Primer2	CTGCTGGGAC (10 bp)	36	[25]
Primer3	CCTTGACGCA (10 bp)	36	[25]
Primer4	GGGATGGAAC (10 bp)	36	[25]
Primer5	CACCGATCCA (10 bp)	37	[6]
Primer6	GAGGGTGGCGGTTCT (15 bp)	48	[7]
Primer7	CCGCAGCCAAT (11 bp)	36	[8]
Primer8	GAGGGTGGCGGTTCT (15 bp)	45	[8]

1.4.3 RAPD双引物反应体系的优化

参考刘刚^[26]的多条引物扩增条件以及扩增体系略加修改,以屎肠球菌999为模板,随机选用Primer1+Primer5引物分别对引物添加量、模板添加量进行优化。

1.4.3.1 引物添加量筛选

引物添加量梯度设置为:0.1、0.25、0.5、1、1.5、2、2.5 μL。

1.4.3.2 模板添加量筛选

模板添加量梯度设置:0.5、1、1.5、2、2.5、3、4 μL。

1.4.4 双引物筛选

1.4.4.1 初筛

将筛选到的多态性良好的单一随机引物,进行两两组合。在筛选得到的RAPD反应条件下,选择B13、1003、999、1056、15、130、178、39、1019、1021作为模板DNA,进行RAPD-PCR扩增,筛选出特异性、稳定性高的双引物组合。PCR扩增产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,120 V,30 min,凝胶成像系统观察后拍照留存。每个实验重复3次。

1.4.4.2 复筛

在筛选得到的RAPD反应条件下,用初筛得到的6对双引物对32个肠球菌菌株DNA模板进行种间RAPD分型研究。

1.4.5 重复性实验

1.4.5.1 扩增批次内重复性实验

每个样品在同个PCR仪上进行3个RAPD-PCR平行实验,通过比较电泳图谱判定RAPD-PCR的重复性。

1.4.5.2 扩增批次间重复性实验

每个样品,在同个PCR仪上分批扩增3次,比较电泳图谱判定扩增批次间实验的重复性。

1.4.6 RAPD在肠球菌分型中的应用和验证

1.4.6.1 RAPD分型

在筛选的RAPD反应条件下,用1.4.4筛选出的最适RAPD双引物对24株已知肠球菌和46株未知肠球菌进行RAPD分型鉴定。

1.4.6.2 管家基因验证

使用*rpoA*基因序列分析RAPD分型中各个类别的代表菌株。

PCR反应体系:基因组DNA 1 μL,2×Taq Master Mix 预混酶 12.5 μL,正反引物各1 μL,无菌双蒸水 9.5 μL。PCR扩增程序:95℃预变性5 min,(95℃变性1 min,48℃退火1 min 15 s,72℃延伸1 min 15 s)3次循环,(95℃变性35 s,46℃退火1 min 15 s,72℃延伸1 min 15 s)30次循环,72℃延伸7 min,4℃保存备用。取5 μL扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳检测扩增产物大小。对合格产物进行序列测定。使用NCBI网站BLAST进行在线比对,比对结果>97%鉴定为同一菌种^[27]。

1.4.7 数据统计分析

使用Gel RED核酸染料胶染法制胶,在1.5%琼脂糖凝胶上电泳分离扩增产物。取5 μL扩增产物点于凝胶孔,电泳缓冲液为1×TAE,120 V恒压电泳

30 min 后通过凝胶成像系统拍照。对 RAPD 标记进行处理,并按显性标记计数,将电泳图上清晰的条带标记为“1”,而在同一位置没有或不易区分的条带标记为“0”,并构建原始数据矩阵,用 NTsys 进行聚类分析,构建各菌株的遗传距离聚类图。

2 结果与讨论

2.1 模板筛选

2.1.1 模板提取方法的筛选

经微量核酸检测仪检测,试剂盒法提取的 DNA 的 $OD_{260/280}$ 为 1.8~2.0, DNA 质量浓度为 123~353 $\mu\text{g/mL}$ 微波法所得到的 DNA 的 $OD_{260/280}$ 为 1.9~2.1, DNA 质量浓度为 106~308 $\mu\text{g/mL}$ 。从数据上,虽然试剂盒提取法较微波提取法好,但是微波提取法较为方便快捷,适合大规模提取,且 RAPD 分型效果与试剂盒结果无明显差异,因此选择使用微波法用于模板提取。

2.1.2 DNA 模板稳定性

模板稳定性影响 RAPD 分型结果,研究结果显示微波法提取的 DNA 模板在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 90 d 保存期间内扩增出的 RAPD 图谱无明显变化,说明经由微波法提取的 DNA 模板在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下在 90 d 内均可用于 RAPD-PCR 分型研究。

2.2 单引物筛选结果

如图 1 所示,屎肠球菌 999 的在 8 条随机引物扩增下 Primer 1~7 均可获得多态性条带(泳道 1~7),而 Primer 8 没有扩增出条带。因此选用 Primer 1~7 作为后续双引物筛选试验的引物。

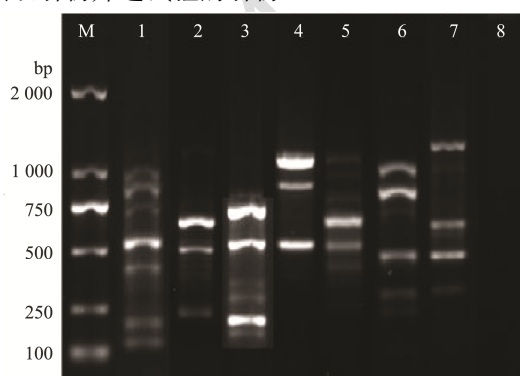


图 1 不同单引物的 RAPD-PCR 扩增电泳图

Fig.1 RAPD-PCR amplification by different single primer

注: M 为 DL2000, 1~8 泳道分别是 Primer 1、Primer 2、Primer 3、Primer 4、Primer 5、Primer 6、Primer 7、Primer 8 的扩增电泳图。

2.3 RAPD 双引物反应体系的优化

2.3.1 最适引物添加量

如图 2 所示,引物添加量在 0.1~1 μL 范围内,随着引物添加量的增加,扩增结果条带的数量和亮度均有增加,即引物添加量影响扩增带型的多态性,当引物添加量大于 1 μL 时,无特异性条带增加,故确定最适的引物添加量是 1 μL 。

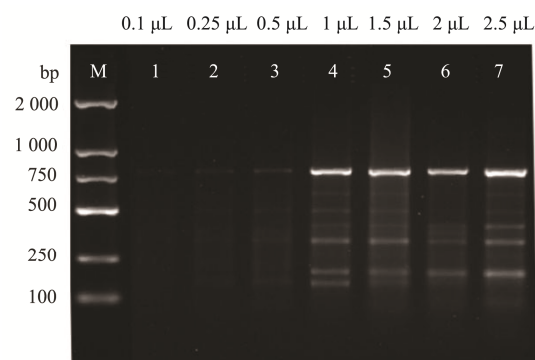


图 2 不同引物添加量对菌株 999 的 RAPD 扩增图谱

Fig.2 Influence of primer additive volume on RAPD profiles of strains 999

2.3.2 最适模板 DNA 添加量

由图 3 所示,不同模板 DNA 添加量对反应影响显著,在 0.5~1 μL 范围内,随着添加量的增加,带型丰度增加,模板 DNA 在添加量为 1 μL 时扩增的谱带最为清晰,多态性较好;当引物添加量高于 1 μL 时,扩增的出的 500 bp 以下的 3 条带亮度减弱,并出现背景弥散。这是因为本试验提取的 DNA 没有经过纯化,添加量过多时会抑制 RAPD-PCR 的进行,故确定最适的模板 DNA 添加量是 1 μL 。

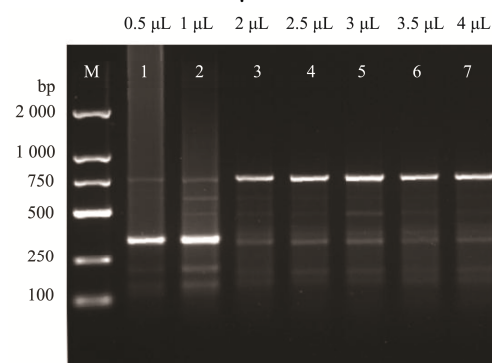


图 3 不同 DNA 添加量对菌株 999 的 RAPD 扩增图谱

Fig.3 Influence of DNA additive volume on RAPD profiles of strains 999

综上所述,经过单因素试验确定最适反应体系为: 2×PCR Taq Mix 12.5 μL , 模板 DNA 1 μL , 引物各 1 μL , ddH₂O 9.5 μL 。

2.4 双引物筛选结果

将 7 个单引物随机两两组合获得 21 种组合方式, 在 RAPD 反应条件下分别使用 21 对双引物对 10 株肠球菌 DNA 模板进行 RAPD 扩增, 如图 4 所示, 筛选得到了 6 对多态性好、稳定性高的双引物组合, 即 Primer 1+Primer 2、Primer 1+Primer 3、Primer 1+Primer 5、Primer 2+Primer 4、Primer 3+Primer 4、Primer 3+Primer 5。

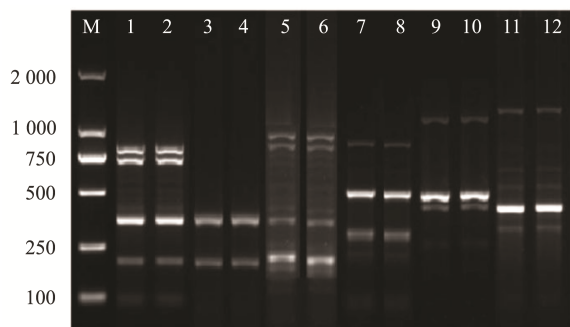


图 4 不同双引物对菌株 999 的 RAPD-PCR 扩增电泳图

Fig.4 RAPD-PCR amplification of strain 999 by different double primers

注: M 为 DL2000, 1~2 泳道是 Primer 1+Primer 3、3~4 泳道是 Primer 1+Primer 2、5~6 泳道是 Primer 1+Primer 5、7~8 泳道是 Primer 3+Primer 4、9~10 泳道是 Primer 3+Primer 5、11~12 泳道是 Primer 2+Primer 4 的扩增电泳图。

在相同条件下, 分别使用 6 对双引物对已知 32 株肠球菌进行 RAPD-PCR 扩增, 结果显示使用 Primer 1+Primer 3、Primer 1+Primer 5 和 Primer 2+Primer 4 组合均可获得丰富的多态性带型, 可扩增出 2~5 个条带; 而 Primer 1+Primer 2、Primer 3+Primer 5 进行 RAPD-PCR 时均有部分样品没有扩增出条带, Primer 3+Primer 4 进行 RAPD-PCR 时屎肠球菌 (1096) 与耐久肠球菌 (130、15、426、1029、127、178、1451) 无法分开, 相似度 100%。

目前应用 RAPD 技术对乳酸菌属间分型研究中, 是在 75%~88% 的相似度下做到属间分型^[7,22], 目前未见 RAPD 技术对肠球菌种间的相似度分型标准, 三种

组合均能明显找出各种间的差异, 分别在 86%、80%、86% 的相似度下将肠球菌在种间区分。其中, 从区分度来看, Primer 1+Primer 5 组合分辨率最高, 可作为肠球菌种间分型的最佳双引物对。

Primer 1+Primer 3 组合 RAPD-PCR 扩增时发现在 500 bp 位置出现海氏肠球菌的特征条带, 可以作为海氏肠球菌的鉴定指标, 由图 5 所示。研究发现, 海氏肠球菌是一种低感染性的肠球菌^[28], 已被国家微生物资源平台收录并定义为一种潜在的益生菌。有研究者从山羊奶中分离出一株具有抑菌性、耐高温、耐酸碱, 对常见抗生素敏感, 无毒力基因的海氏肠球菌, 经选择培养基初筛后, 进行细菌的分离纯化, 并采用形态学、生化试验及 16S rDNA 基因扩增测序对分离菌株进行鉴定, 最后鉴定结果为海氏肠球菌^[29], 鉴定方法较为繁琐, 本试验发现在 Primer 1+Primer 3 组合进行 RAPD-PCR 扩增时发现 500 bp 位置的条带是海氏肠球菌的特征条带, 可以作为海氏肠球菌的鉴定指标。

2.5 重复性实验

使用 Primer 1+Primer 5 对 10 个基因组 DNA 进行扩增, 结果如图 6、7, 显示在批次内及批次间, 获得的样品多态性图谱结果一致, 说明在优化后的体系条件下, 具有较高的重复性及稳定性。

2.6 RAPD 在肠球菌分型中的应用和验证

用 Primer 1+Primer 5 组合对 24 株已知肠球菌和 46 株未知分离株基因组 DNA 进行 RAPD 扩增。由图 8 可知, 46 株未知肠球菌和 24 株已知肠球菌在 80% 的相似度下, 可以分为 13 个亚型。除 401、461、472 单独聚在亚型 11, 其他 43 株未知菌株均与已知菌株聚类, 分别是 33 株屎肠球菌、8 株耐久肠球菌、2 株海氏肠球菌; 将所有菌株进行管家基因 *rpoA* 基因序列分析, 43 株未知菌株的 *rpoA* 结果和 RAPD 结果一致, 401、461、472 均为耐久肠球菌, 说明 RAPD 应用于肠球菌鉴定结果具有可靠性。



图 5 Primer 1+Primer 3 引物扩增 32 株肠球菌指纹图谱

Fig.5 Finger print of 32 Enterococcus was amplified with Primer 1+Primer 3

注: M 为 DL2000, 1~32 泳道分别是 1056、39、178、1019、130、1003、1021、166、1018、1451、106、B13、7'、1020、15、1062、1041、1208、426、1232、999、22-2、141、1029、451、1061、888、1074、127、1096、1065、10'。

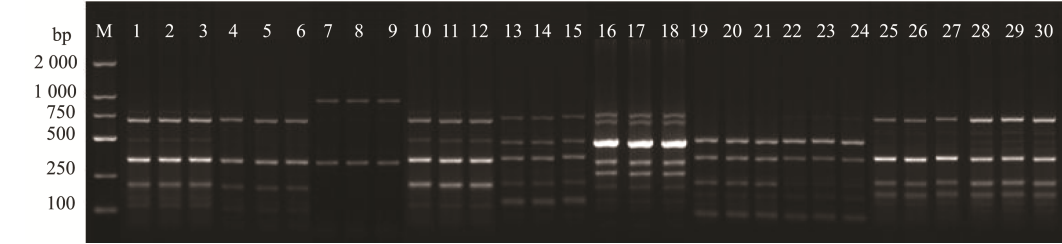


图 6 RAPD 扩增批次内重复性试验

Fig.6 RAPD patterns of repeat test in a batch

注：M 为 DL2000，1~3、4~6、7~9、10~12、13~15、16~18、19~21、22~24、25~27、28~30 泳道分别是 B13、1003、15、999、39、1056、178、1019、130、1021 的电泳图。

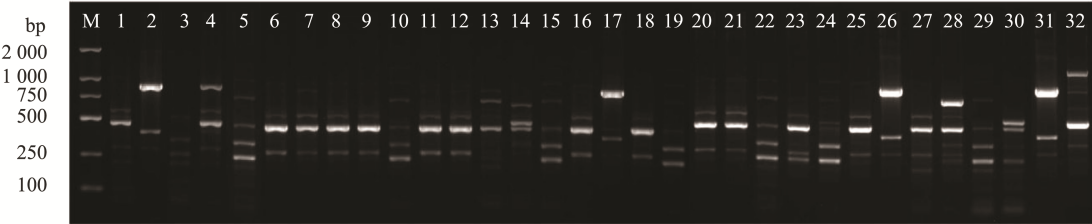


图 7 RAPD 扩增批次间重复性试验

Fig.7 RAPD patterns of repeat test among a batch

注：M 为 DL2000，1~10、11~20、21~30 泳道分别是乳酸菌 B13、1003、15、999、39、1415、1224、1414、1458、1461 的 3 批平行。

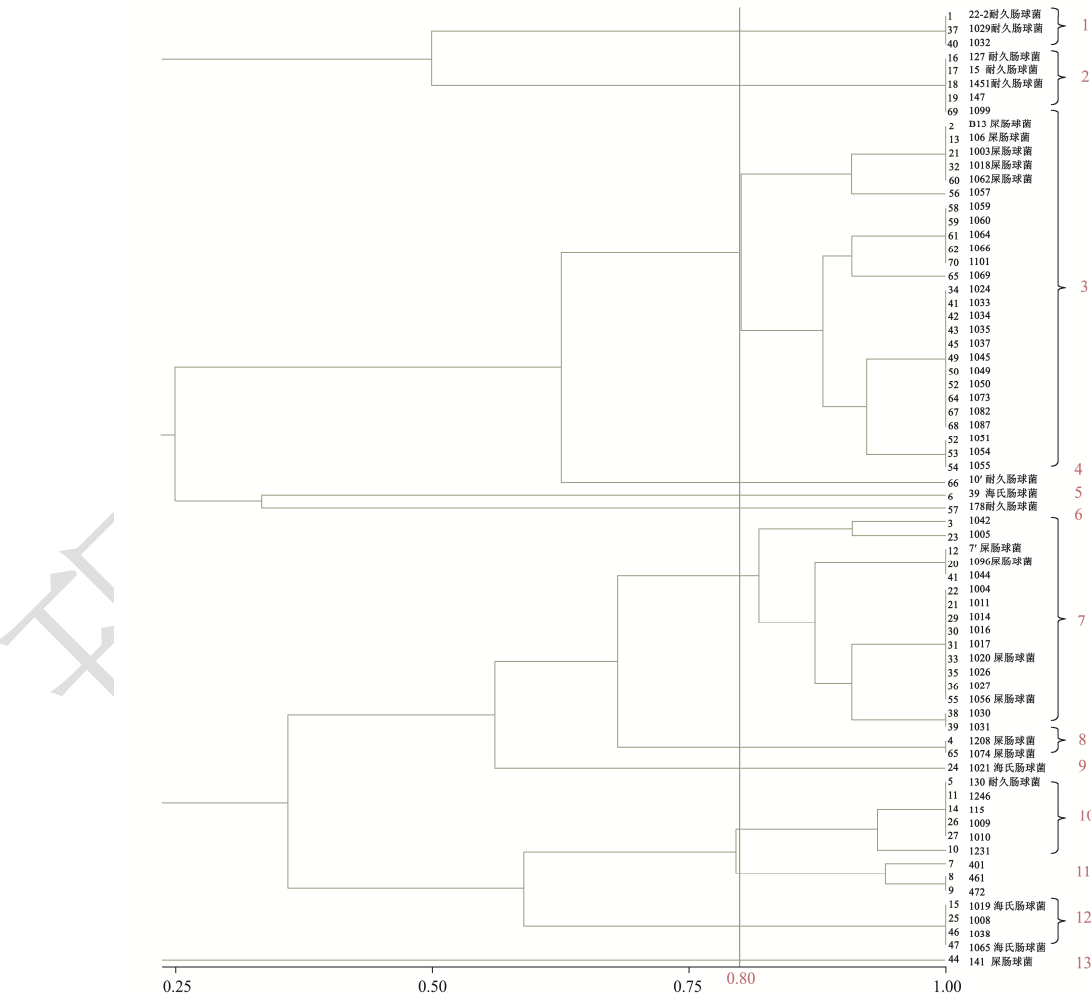


图 8 Primer1+Primer5 引物扩增 70 株肠球菌的聚类树状图

Fig.8 Clustering tree of 70 *Enterococcus* was amplified with Primer1+Primer5

3 结论

本研究以分离自传统自然发酵食品中的肠球菌为研究对象,从优化 RAPD 体系入手,并应用 RAPD 技术来对肠球菌分型。首先,高质量的 DNA 是进行 PCR、基因克隆、测序和指纹图谱等分子生物学方法的基础,采用试剂盒法和微波法提取肠球菌 DNA,筛选出微波法为后续实验的提取方法;其次,研究表明,退火温度、PCR Taq Mix 酶的添加量、引物添加量、模板添加量均会影响扩增效果。本试验通过对 RAPD 反应条件中引物添加量、DNA 模板添加量的优化,确定 RAPD 最适反应体系为: 2×PCR Taq Mix 12.5 μL, 模板 DNA 1 μL, 引物各 1 μL, ddH₂O 9.5 μL; 最后, RAPD-PCR 存在的主要问题是很难在实验室内和实验室之间得到重复性试验结果。本试验结果表明,在保证模板样品、在同一台 PCR 仪的前提下,无论是批次内验证实验还是批次间验证实验,获得的样品多态性图谱结果一致,故说明在最适的反应体系条件下,实验具有很高的重复性及稳定性。

本试验通过引物的预筛选,得到 3 对多态性好、稳定性高的引物组合,即 Primer 1+Primer 3、Primer 1+Primer 5 和 Primer 2+Primer 4 组合。三种组合都可获得稳定性高的多态性带型,分别在 86%、80%、86% 的相似度下将肠球菌在种水平上分型。Primer 1+Primer 5 组合的分辨率最高,因此推荐应用在肠球菌种间的分型中。此外,在 Primer 1+Primer 3 组合进行 RAPD-PCR 扩增时发现 500 bp 位置的条带是海氏肠球菌的特征条带,可以作为海氏肠球菌的鉴定指标。

通过 RAPD 和 *rpoA* 基因序列分析对肠球菌分离株进行鉴定,发现 RAPD 结果和 *rpoA* 鉴定结果一致,说明肠球菌 RAPD 分型结果具有可靠性。综合比较结果考虑, RAPD 技术在肠球菌分类鉴定中有一定的应用价值,同时它有操作简单快速、属间和种间区分效率高、费用低的优势,与其他表型和基因型方法相结合,可提高菌种鉴定效率和准确性。

参考文献

- [1] 区锡敏,王阿利,孙张乐,等.酱醪源肠球菌的特性研究与安全性评价[J].食品与发酵工业,2020,46(9):83-88.
- [2] 鄂晓迪,肖蕴祺,李梦梅,等.屎肠球菌在家禽生产中的应用及安全性研究进展[J].中国家禽,2022,44(5):95-103.
- [3] Carvalho M G S, Steigerwalt A G, Morey R E, et al. Characterization of three new enterococcal species, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E1, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E2, and *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E3, isolated from human clinical specimens [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(3): 1192-1198.
- [4] 翟梦凯.一株屎肠球菌的益生特性及安全性研究[D].泰安:山东农业大学,2017.
- [5] Mahboobeh Ahangaran, Mahmood Gharaviri, Majid Masoumian. A study on the genetic variation in licorice (*Glycyrrhiza glabra*) Iran by molecular DNA MARKers (RAPD) [J]. Health, Food & Biotechnology, 2020, 2(4): 89-97.
- [6] To Ka Ning, Powell Oliver, Jamroz Dorota, et al. RAPD PCR detects co-colonisation of multiple group B Streptococcus genotypes: A practical molecular technique for screening multiple colonies [J]. Journal of Microbiological Methods, 2021, 190(1): 106322.
- [7] 蒋厚阳,赵国华,杨吉霞.随机扩增多态性法分析西藏牦牛奶酪中乳酸菌的遗传多样性[J].食品科学,2014,35(23):215-220.
- [8] 卢佳音.发酵蔬菜中菌的分离鉴定及其益生性研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2018.
- [9] Elkady Fathy M, Al Askar Abdulaziz A, Tawab Ahmed Abdel, et al. Comparative genotypic analysis of RAPD and RFLP markers for molecular variation detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates [J]. Medicina, 2022, 58(9): 1245.
- [10] 李玉洁,赵成日.中国古老月季 RAPD 反应体系的优化[J].分子植物育种,2018,16(24):8073-8079.
- [11] Kalaiyarasi G, Padmavathi S, Abdul G, et al. Molecular analysis through RAPD markers in greengram genotypes [J]. Electronic Journal of Plant Breeding, 2022, 13(3): 1051-1056.
- [12] 唐莹莹,杨祥燕,蔡元保,等.澳洲坚果 RAPD 标记反应体系的建立及应用[J].中国南方果树,2018,47(3):46-49.
- [13] Fadel Aqeel A, Abdulhamed Zeyad A, Yousif Shatha A. RAPD technique to determine the genetic divergence of barley genotypes [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2022, 1060(1): 012123.
- [14] 陈秋夏,郑小玲,王正加.浙江省主栽脐橙的品质和 RAPD 分析[J].中国南方果树,2020,5:41-44.
- [15] Hematzadeh Aida, Haghkhah Masoud. Biotyping of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human infections by RAPD and ERIC-PCR [J]. Heliyon, 2021, 7(9): e07967.
- [16] LI Jun, GAO Guangchun, LI Bin, et al. Genetic analysis of *Prunus salicina* L. by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) [J]. Genetics Research, 2022, 1: 2409324.
- [17] Sri Hartati. Genetic variability analysis of *Phaius* spp Orchid

- based on RAPD markers [J]. International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology, 2022, 12(4): 1558-1564.
- [18] 刘丹梅,李文利,王丹丹,等.基于 RAPD 标记对 71 个柞蚕品种的聚类分析[J].江苏农业科学,2019,11:61-66.
- [19] Seong, EunSoo, Jeon, et al. Analysis of genetic diversity in the bioenergy crop *Miscanthus* via ISSR and RAPD markers [J]. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2022, (prepublish): 1-7.
- [20] Eduardo R Duarte, Júnia S Hamdan. RAPD differentiation of *Malassezia* spp. from cattle, dogs and humans [J]. Mycoses, 2010, 53(1): 48-56.
- [21] Manzano Marisa, Giusto Cristina, Iacumin Lucilla, et al. Molecular methods to evaluate biodiversity in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains from different origins [J]. Food Microbiology, 2009, 26(3): 295-264.
- [22] Christian Andrighetto, Angioletta Lombardi, Massimiliano Ferrati, et al. Lactic acid bacteria biodiversity in Italian marinated seafood salad and their interactions on the growth of *Listeria monocytogenes* [J]. Food Control, 2008, 20(5): 462-468.
- [23] 李玉琴.7 个乳酸菌新种的多相鉴定和新疆肠球菌 (*Enterococcus xinjiangensis*)的重新分类[D].哈尔滨:东北农业大学,2021.
- [24] 王亚宾.猪肠球菌病原体分离鉴定及其分子致病机制研究[D].郑州:河南农业大学,2009.
- [25] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes [J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(24): 6823-6828.
- [26] 刘刚.利用 M-RAPD 技术绘制不同病原微生物基因指纹图[D].成都:四川大学,2004.
- [27] Peter Schumann, Peter Kampf, Hans-Jurgen Busse, et al. Proposed minimal standards for describing new genera and species of the suborder Micrococccineae [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(7): 1823-1849.
- [28] 张芬.婴儿源肠球菌的安全性评价及其体内外降胆固醇的益生功能和机制探究[D].南昌:南昌大学,2017.
- [29] 贺曦,徐淑琴,马祥兆,等.藏羊源肠道海氏肠球菌的分离鉴定及益生特性研究[J].黑龙江畜牧兽医,2021,22:63-68.