

· 实验研究 ·

# 多位点序列分型和脉冲场凝胶电泳 在肠炎沙门菌分子分型的比较

计融 李燕俊 王玉平 崔生辉 江涛

**【摘要】 目的** 比较多位点序列分型技术和脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术在肠炎沙门菌菌株间分型的分辨率。**方法** 分别建立肠炎沙门菌的 6 个管家基因 *thrA*、*purE*、*sucA*、*aroC*、*hemD*、*dnaN* 和一个特异性的 DNA 标记 *Sdf I* 的多位点序列分型技术,及以寡切点的 *Xba I*、*Spe I* 作为限制性内切酶的 PFGE 方法,并应用上述方法对食品中的分离株进行分型,比较两种方法的分辨率。结果 PFGE 可以将 50 株肠炎沙门菌分为 11 个型,并且通过双酶系统的多重 PFGE 分型,还可以将 PFGE 型别再精细划分为亚型;MLST 则揭示了在同一血清型内部,各菌株之间的管家基因碱基序列高度保守,而在沙门菌不同血清型的核苷酸序列之间,则分别存在不同数量的碱基差异。即 MLST 方法只能用于血清型之间,不能在血清型内部进行分型研究。**结论** 与 MLST 比较,PFGE 方法在肠炎沙门菌的分型方面显示了比较高的分辨率。

**【关键词】** 肠炎沙门菌;多位点序列分型;脉冲场凝胶电泳;分辨率

**Comparison of multilocus sequence typing system and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Salmonella enteritidis*** Ji Rong, LI Yan-jun, WANG Yu-ping, CUI Sheng-hui, JIANG Tao. National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China

Corresponding author: Ji Rong, Email: jirong36@126.com

**【Abstract】 Objective** To compare the discriminatory ability between multilocus sequence typing system (MLST) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Methods** *Salmonella enteritidis* strains, isolated from food in China were identified by MLST, under PCR products of *thrA*, *purE*, *sucA*, *aroC*, *hemD*, *dnaN* and *Sdf I*. The same set of strains was typed by PFGE using *Xba I*, *Spe I* as the restriction enzyme in order to compare the discriminatory power of the methods. **Results** Data from MLST revealed the lack of diversity among the strains of the same serotype and the number of variable nucleotide sites per locus ranged from 1 to 23 between *Salmonella typhi* LT2 and other serotypes of *Salmonella*. However, 50 *Salmonella enteritidis* strains were identified as 11 patterns and more sub-patterns by PFGE. **Conclusion** In strain typing, PFGE was the highly discriminatory method comparing to the MLST system.

**【Key words】** *Salmonella enteritidis*; Multilocus sequence typing; Pulsed-field gel electrophoresis; Discriminatory ability

随着食源性疾病发生逐渐由暴发转为多点散发,以及食品贸易国际化带来的食品分发途径的改变,血清型的分型鉴定水平已不能满足在复杂的食源性疾病诊断中对病原体进行溯源的需求。随着分子生物学手段的不断发展,从 DNA 水平对致病菌进行分型及鉴定已成为可能。目前已建立了多种沙

门菌的分子分型技术,如扩增片段长度多态性分析(AFLP)、PCR、随机扩增多态性 DNA 分析(RAPD)、核糖体分型(Ribotyping)、脉冲场凝胶电泳(PFGE)、多位点基因序列分析(multilocus sequence typing, MLST)等方法。其中 PFGE 方法因其高分辨率已被国际上广泛采用,如美国 CDC 通过建立致病菌的标准化 PFGE 技术,并在此基础上建立了 PulseNet, 48 h 之内就可完成食源性疾病原因食品的确证<sup>[1]</sup>。MLST 方法则是近几年发展的新方法,因其可以通过序列的变化反应菌株之间的进化关系,已经证实了在某些菌株方面具有良好的分

基金项目:国家“十五”重大科技专项食品安全关键技术课题研究资助(2001BA804A3205)

作者单位:100021 北京,中国疾病预防控制中心营养与食品安全所

通讯作者:计融, Email: jirong36@126.com

辨能力,目前已广泛应用于霍乱弧菌、空肠弯曲菌、葡萄球菌、单增李斯特菌等细菌的分型研究<sup>[2-4]</sup>。我国目前尚未引入 MLST 的技术,在肠炎沙门菌 PFGE 方面的研究也刚刚起步,为早日和国际先进技术接轨,并对比这两种方法在分型方面的鉴定能力,我们进行了肠炎沙门菌 MLST 方法和 PFGE 方法的研究。

### 材料与方 法

1. 实验用菌株:以 WHO 考核肠炎沙门菌 S8 株和 50041 株(中国医学科学院药品生物制品检定所)为肠炎沙门菌的标准菌株。以我国 11 个省市食品中分离的 51 株肠炎沙门菌为实验用菌株,其地区来源及食品来源见表 1。

表 1 肠炎沙门菌株的来源

地区	数量	菌株编号及来源
WHO 考核菌株	1	S8
标准菌株 50041	1	S3
吉林	3	S1(牛肉)、S5(鸡肉)、S65(猪肉)
河南	20	24、26、S14、S15、S162~S163(均为鸡肉)、S148(猪肉)、S154~S156(均为羊肉)、S157~S161(均为牛肉)、S168、S170~S172(均为熟肉)、S182(蔬菜)
浙江	4	29(鸡肉)、30(鸡肉)、S39(鸭肉)、S95(其他)
黑龙江	2	S44(鸡肉)、S45(牛肉)
湖北	1	S75(羊肉)
重庆	2	S127(鸡肉)、S134(鸡肉)
广西	1	S135(其他)
福建	1	S218(鸡肉)
内蒙古	3	1(鸡肉)、2(鸡肉)、4(鸡肉)
江苏	2	15(鸡肉)、18(鸡肉)
北京	12	33、34、35、37、38、39、44~49(均为鸡肉)

2. 试剂和主要实验仪器:DNA 提取试剂盒(北京天为时代科技有限公司)、pfu DNA Polymerase (Fermentas 公司)、dNTP(Promega 公司)、电泳级琼脂糖(Promega 公司)、溶菌酶(Sigma 公司)、蛋白酶 K(Merck 公司)、PMSF(Sigma 公司)、限制性内切酶 *Xba* I (Promega 公司)、限制性内切酶 *Spe* I (BioLabs 公司)。PTC-200 PCR 仪(MJ 公司);CHEF-mapper 型脉冲场凝胶电泳仪及配套设备(Bio-Rad 公司);图像处理:凝胶成像系统(法国 VL 公司)。

### 3. 方法:

(1) MLST 方法:选用肠炎沙门菌标准菌株 50041、我国食品中 18 株肠炎沙门菌分离株及 GenBank 中鼠伤寒沙门菌 LT2、甲型副伤寒沙门菌

ATCC9150、伤寒沙门菌 CT18、伤寒沙门菌 Ty2 和猪霍乱沙门菌 SC-B67 进行该项研究。选择沙门菌的 6 个管家基因 *thrA*、*purE*、*sucA*、*aroC*、*hemD*、*dnaN* 以及肠炎沙门菌的 1 个特异性 DNA 标记 *Sdf* I (AF370707)作为本研究中的目标基因。采用下列引物 *thrA*: F 5'-ATC CCG GCC GAT CAC ATG AT-3', R 5'-CTC CAG CAG CCC CTC TTT CAG-3'; *purE*: F 5'-ATG TCT TCC CGC AAT AAT CC-3', R 5'-TCA TAG CGT CCC CCG CGG ATC-3'; *sucA*: F 5'-AGC ACC GAA GAG AAA CGC TG-3', R 5'-GGT TGT TGA TAA CGA TAC GTA C-3'; *aroC*: F 5'-CCT GGC ACC TCG CGC TAT AC-3', R 5'-CCA CAC ACG GAT CGT GGC G-3'; *hemD*: F 5'-GAA GCG TTA GTG AGC CGT CTG CG-3', R 5'-ATC AGC GAC CTT AAT ATC TTG CCA-3'; *dnaN*: F 5'-ATG AAA TTT ACC GTT GAA CGT GA-3', R 5'-AAT TTC TCA TTC GAG AGG ATT GC-3'; *Sdf* I: F 5'-TGT GTT TTA TCT GAT GCA AGA GG-3', R 5'-CGT TCT TCT GGT ACT TAC GAT GAC-3'。基因进行扩增条件:预变性 94℃ 5 min;变性 94℃ 1 min;退火 55℃ 30 s;延伸 72℃ 2 min;30 个循环;再延伸 72℃ 7 min,其中 *thrA* 和 *dnaN* 的退火温度采用 58℃。PCR 产物序列测定在上海生工生物工程技术服务有限公司完成,用 Sequencer 2.0 软件对测序结果进行分析,用 GenBank 中鼠伤寒沙门菌 LT2 的 *thrA*、*purE*、*sucA*、*aroC*、*hemD*、*dnaN* 基因的序列与肠炎沙门菌标准菌株及食品中分离出的各个肠炎沙门菌菌株相应的序列进行对比,纠正其中可能出现的插入及缺失错误;然后再将各菌株相互对比,找出其中的核苷酸差异。

(2) PFGE 方法:选用 WHO 考核肠炎沙门菌 S8 株、肠炎沙门菌标准菌株 50041 株和我国食品中 51 株肠炎沙门菌分离株进行该项研究。用营养肉汤增菌后,菌液经离心后包埋于等量的琼脂糖中,并加入模具制成胶块,再用溶菌酶、蛋白酶 K 处理胶块后,选取寡切点的 *Xba* I、*Spe* I 作为本研究中的限制性内切酶,在短时间内酶切基因组 DNA,以产生少量的大限制性片段,并对其进行脉冲场凝胶电泳。为了达到良好的分辨效果,在实验中设置了多种电泳参数,并对其进行优化。最终选定了 *Xba* I 酶切后的 PFGE 电泳参数为 1% 琼脂糖、0.5×TBE 缓冲液、14℃,6 V/cm,120°脉冲夹角 4 h(25-65 s),14 h

(5-24 s); *Spe* I 酶切后的 PFGE 电泳参数为:1% 琼脂糖、0.5×TBE 缓冲液、14℃, 6 V/cm, 120°脉冲夹角 4 h(25-65 s), 16 h(2-24 s)。

## 结 果

1. MLST 分子分型:对肠炎沙门菌 *thrA*、*purE*、*sucA*、*aroC*、*hemD*、*dnaN* 6 个管家基因的 PCR 产物核苷酸序列进行比较研究,结果显示,在肠炎沙门菌标准菌株和我国食品中分离 18 株菌之间,在上述碱基范围内的核苷酸序列完全相同。对肠炎沙门菌特异性基因标记序列 *Sdf* I 的核苷酸序列进行比较研究,结果显示,在肠炎沙门菌的标准菌株 50041 株、食品中分离的 18 个菌株 *Sdf* I 的核苷酸序列与 GenBank 中该序列的碱基对比,发生了 C182T 的点突变。

### 2. PFGE 分子分型:

(1) *Xba* I 酶切结果:经 *Xba* I 酶切后进行 PFGE 分型,49 株菌株共分为 11 个不同的带型,其中 XF、XK 型为 2 个主要的型别,分别占 38.8%、30.6%,其余各型有 1~3 株不等。

(2) *Spe* I 酶切结果:经 *Spe* I 酶切后进行 PFGE 分型,电泳后,48 株菌株共分为 11 个不同的带型,其中 SA、SE 型为 2 个主要的型别,分别占 25.0%、47.9%,其余各型有 1~2 株不等。

3. 综合分型:两种内切酶的 PFGE 分型结果不相同,但其中有部分交叉。两种内切酶的 PFGE 分型都有 2 个主要的带型,包含了其中半数以上的菌株,因而在该型别内部,分辨率差,不利于对菌株进行区分乃至溯源。但是通过两种内切酶 PFGE 型别的综合,可以将 PFGE 型别再精细划分为 25 个亚型,提高了方法的分辨率(表 2)。同时,也可以进一步地看出,我国肠炎沙门菌分离株两种酶切后的 PFGE 的主要型别 XF 与 SA、XK 与 SE 有很好的相容性,即 XF 型中 31.6% 为 SA 型株,57.9% 为 SE 型株;XK 型中 26.7% 为 SA 型株,46.7% 为 SE 型株。

## 讨 论

本研究中在建立肠炎沙门菌的 PFGE 方法中,选取了限制性内切酶 *Xba* I (识别位点为 5'-T↓CTAGA-3')和 *Spe* I (识别位点为 5'-A↓CTAGT-3'),不仅可以 50 株菌分为 11 个大型,并且通过双酶系统的双重 PFGE 分型,还可以将 PFGE 型别

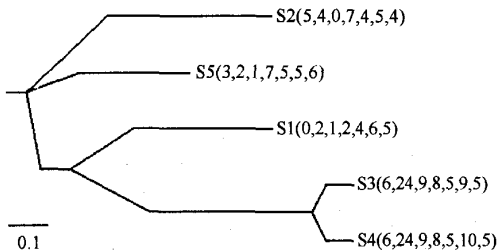
再精细划分为亚型,在肠炎沙门菌的分型方面显示了比较高的分辨率。

表 2 肠炎沙门菌 PFGE 分型结果

型别	条带数	亚型	包含菌株	数量(%)
XA	10	XA/SE	S45、S65	2(4.0)
		XA/SH	44	1(2.0)
XB	13	XB/SC	S95	1(2.0)
		XB/SH	S134	1(2.0)
XC	11	XC/SA	S5	1(2.0)
		XC/SE	S148	1(2.0)
XD	8	-	S1	1(2.0)
XE	15	XE/SA	49	1(2.0)
		XE/SD	S8	1(2.0)
XF	11	-	47(该菌株未得出 <i>Spe</i> I 酶切 PFGE 分型结果)	1(2.0)
		XF/SA	15、29、33、37、38、S182	6(12.0)
		XF/SE	24、46、48、S75、S135、S154、S155、S156、S161、S162、S168	11(22.0)
		XF/SF	S218	1(2.0)
XG	10	-	S3	1(2.0)
XH	12	XH/SE	S14	1(2.0)
		XH/SF	45	1(2.0)
XI	13	-	39	1(2.0)
XJ	11	-	34	1(2.0)
XK	11	XK/SA	4、S15、S170、S171	4(8.0)
		XK/SB	S44	1(2.0)
		XK/SG	S127	1(2.0)
		XK/SI	S157	1(2.0)
		XK/SE	1、S39、S158、S159、S160、S163、S172	7(14.0)
-	-	18(该菌株未得出 <i>Spe</i> I 酶切 PFGE 分型结果)	1(2.0)	
SK	16	-	35(该菌株未得出 <i>Xba</i> I 酶切 PFGE 分型结果)	1(2.0)

PFGE 等依赖图谱的分型方法最终多采用电泳带型来作为分型的依据,但图谱的比较存在着识别的困难以及各个不同的研究之间难以互相比较的局限性<sup>[5]</sup>。在 1998 年问世的一种新的实验方法——MLST 中,提出了选用多个管家基因进行序列分析的方法,该法可以通过序列的变化反应菌株之间的进化关系,具有较高的分辨水平<sup>[6,7]</sup>。但本研究中发现,在单一血清型肠炎沙门菌内,菌株 6 个管家基因的 PCR 产物序列均无差异,即未观察到位于血清型内部的基因序列碱基差异。但在不同的血清型之间,我们对比了鼠伤寒沙门菌 LT2 与肠炎沙门菌 54100、甲型副伤寒沙门菌 ATCC9150、伤寒沙门菌 CT18、伤寒沙门菌 Ty2、猪霍乱沙门菌 SC-B67 各基因产物的结果,并进行聚类分析,得到了亲缘关系图(图 1)。在相同血清型的伤寒沙门菌 CT18 和 Ty2 之间进行比较,也仅在 *hemD* 基因发生了 C270T 的

点突变。在 Noller 等对出血性大肠埃希菌 O157:H7 的研究中,也发现了在 7 个管家基因的 311 000 多个碱基中,没有一个变异存在<sup>[8]</sup>。考虑到管家基因的高度保守性,因此我们又选了一个肠炎沙门菌的特异性标记 *Sdf I*,对其基因的变异规律进行研究,预期在同一血清型的不同菌株中,该序列可以有稍微多一点的基因变异情况发生,结果仅发现了一个 C182T 的点突变,这就提示了在沙门菌及大肠埃希菌的同一血清型内部,各菌株之间的管家基因碱基序列高度保守,该结果与美国 FDA 在鼠伤寒沙门菌血清型内部进行的研究所得出的结论完全相同。



注:S1:肠炎沙门菌(标准菌株 1,分离菌株 18); S2:甲型副伤寒沙门菌(ATCC9150 NC\_006511); S3:伤寒沙门菌(NC\_003198); S4:伤寒沙门菌(NC\_004631); S5:猪霍乱沙门菌(NC\_006905);所有菌株均与鼠伤寒沙门菌(NC\_003197)相比较

图1 沙门菌不同血清型 MLST 方法聚类图

对研究结果及文献资料进行进一步分析,发现所有报道与 PFGE 等图谱分型方法比较,MLST 具有高分辨率的研究中,其研究对象均为目前没有良好的分型方法的菌株,如在弯曲菌中,一般的方法只能将其分为空肠弯曲菌和结肠弯曲菌。因缺乏有效的技术手段,而对空肠弯曲菌分型采用了 MLST 方法,并获得有效区分结果<sup>[9,10]</sup>。由于完善的血清分型方法,已经可以将沙门菌分为 2000 多个型别,因此,在血清型内部进行的进一步分型研究,就必须选择具有更高分辨率的方法。

采用核苷酸序列分析对细菌进行分型具有明显的优点,如减少了结果解释中的主观性;增加了数据的可传播性及实验室间的可比性;以及可以简便地采用计算机软件自动进行。但是在核苷酸的变异中,如果在管家基因中发生碱基的缺失或插入,则会

造成与生存密切相关的蛋白编译的改变,进而引起细菌死亡,因此 MLST 只能研究碱基的转换或颠换这类点突变,而不能反映严重的变异。而 PFGE 等图谱的方法由于可以反映碱基的点突变、插入及缺失等多种变异带来的酶切位点的变化,因此更适合用于沙门菌同一血清型内进一步的菌株分型及溯源。

参 考 文 献

- 1 <http://www.pulsenet.com>
- 2 Karaolis DK, Lan R, Reeves PR. The sixth and seventh cholera pandemics are due to independent clones separately derived from environmental, nontoxigenic, non-O1 *Vibrio cholerae*. J Bacteriol, 1995,177:3191-3198.
- 3 Duim B, Peggy CR, Godschalk, et al. Molecular evidence for dissemination of unique *Campylobacter jejuni* clones in Curacao, Netherlands Antilles. J Clin Microbiol,2003,41:5593-5597.
- 4 Diep BA, Perdreau-Remington F, Sensabaugh GF, et al. Clonal characterization of *Staphylococcus aureus* by multilocus restriction fragment typing, a rapid screening approach for molecular epidemiology. J Clin Microbiol,2003,41:4559-4564.
- 5 Lukinmaa S, Takkunen E, Siitonen A. Molecular epidemiology of *Clostridium perfringens* related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999. Appl Environ Microbiol,2002,68:3744-3749.
- 6 Kotetishvili M, Stine OC, Kreger A, et al. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. J Clin Microbiol,2002,40:1626-1635.
- 7 Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci, 1998,95:3140-3145.
- 8 Noller AC, Mcellistrem MC, Stine OC, et al. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol,2003,41:675-679.
- 9 Sails AD, Swaminathan B, Fields PI. Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by campylobacter jejuni. J Clin Microbiol, 2003,41:4733-4739.
- 10 Duim B, Peggy CR, Godschalk, et al. Molecular evidence for dissemination of unique *Campylobacter jejuni* clones in Curacao, Netherlands Antilles. J Clin Microbiol,2003,41:5593-5597.

(收稿日期:2006-05-23)

(本文编辑:王多春)