

钩端螺旋体脉冲场凝胶电泳标准化技术的建立及谱型特征初步分析

张艳 郭宗琪 李秀文 崔志刚 聂一新 蒋秀高

【摘要】 目的 建立中国钩端螺旋体(钩体)脉冲场凝胶电泳(PFGE)的标准化操作程序及中国 15 群 15 型代表菌株的图谱数据库。方法 参照目前美国疾病控制中心及亚太地区 PulseNet 提供的其他病原体 PFGE 标准化操作程序,结合钩体菌株的特性,对菌体基因组染色体 DNA 纯化技术、限制性内切酶消解方案及脉冲场电泳参数进行优化。结果 利用标准化 PFGE 操作程序,建立了中国 15 群 15 型钩体代表菌株基因组 DNA 的 Not I 酶切图谱,并对历年从四川、安徽省钩体病监测工作现场分离的部分黄疸出血群菌株进行 PFGE 分析,结果发现中国 15 群 15 型钩体代表菌株各自具有独特的谱型特征,24 株黄疸出血群分离株存在 3 种谱型特征,91.67% (22/24) 的分离株与黄疸出血群赖型(56601)的谱型匹配。结论 建立的 PFGE 标准化操作程序制作钩体菌株的酶切图谱,具有图像清晰、分辨率高、各种大小的片段分布均匀等特点,能较好地反映出中国钩体菌株的分子遗传学特征,与传统的血清学分类存在较好的相关性。

【关键词】 钩端螺旋体; 脉冲场凝胶电泳; 分子遗传学分型

Establishment of standardized method for Pulsed-field gel electrophoresis on *Leptospira interrogans* and analysis on their patterns ZHANG Yan*, GUO Zong-qi, LI Xiu-wen, CUI Zhi-gang, NIE Yi-xin, JIANG Xiu-gao. *National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: JIANG Xiu-gao, Email: jiangxiugao@icdc.cn

【Abstract】 **Objective** To establish a standardized operation procedure for pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) on *Leptospira interrogans* as well as a figure digital database to develop the Chinese representative reference strains. **Methods** Under the characteristics of strains and referring to the other SOPs of PFGE on pathogens provided by CDC and PulseNet Asia Pacific, genomic chromosome DNA purification, restriction endonuclease digestion and the parameters for running PFGE were optimized. **Results** Not I digestion patterns of leptospiral genome for the Chinese representative strains were established and partial isolates of serogroup icterohaemorrhagiae from the leptospirosis surveillance in Sichuan and Anhui provinces were analyzed by PFGE. Results showed that each of all the 15 Chinese representative strains had a unique pattern. 91.67% (22/24) of the 24 isolates identified as serogroup icterohaemorrhagiae matched to the map of the reference strain 56601 (serogroup icterohaemorrhagiae serovar lai). **Conclusion** The PFGE figures were clear with high resolution and the fragments were equally distributed by this standardized operating procedure so as to reveal the molecular-genetic characteristics of *Leptospira interrogans*. The patterns had high relativity with the serological identification and seemed to be very important for genetic analysis of strains in studying the outbreak of leptospirosis.

【Key words】 *Leptospira interrogans*; Pulsed-field gel electrophoresis; Molecular-genetics typing

脉冲场凝胶电泳(PFGE)是近年来得到广泛应用的一种分子遗传学分型技术,被公认为是用于细菌分型以及追踪传染源最有效的方法之一,它能够揭示完整的基因组染色体 DNA 遗传特性。我们利用 PFGE 技术,结合钩体菌株的特性,建立我国钩体

PFGE 分析的标准化操作程序。在此基础上,运用目前国际上 PulseNet 通用的 PFGE 图像处理、分析软件 BioNumerics,建立了我国 15 群 15 型钩体代表株的 PFGE 酶切图谱的数字化数据库,并对历年从四川、安徽省钩体病监测中获得的部分黄疸出血群菌株进行比对分析。

材料与amp;方法

1. 菌株来源:我国 15 群 15 型问号钩体代表株

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所人兽共患病室(张艳、李秀文、崔志刚、聂一新、蒋秀高);四川省疾病预防控制中心(郭宗琪)

通讯作者:蒋秀高, Email: jiangxiugao@icdc.cn

由本实验室保存, 24 株黄疸出血群钩体分离株来自四川省和安徽省疾病预防控制中心; PFGE 标准分子量采用亚太地区 PulseNet 提供的沙门菌工程菌 H9812 经标准化方法提取和酶切后获得。

2. 主要试剂与仪器: 钩体 EMJH 培养基为 BD 公司产品; 限制性内切酶 Not I、Xba I 购自 TaKaRa 公司; SeaKem Gold 琼脂糖购自 Cambrex Bio Science Rockland 公司; 蛋白酶 K 购自 Merck 公司。PFGE 系统采用亚太区 PulseNet 推荐的 Bio-Rad 公司成套设备。

3. 钩体 PFGE 标准化操作程序: ①细菌培养: 将钩体接种于 EMJH 液体培养基中, 28℃ 恒温培养约 5 d, 经活菌计数菌体浓度达到 2×10^8 /ml 以上。②琼脂糖包埋法纯化钩体全基因组 DNA: 以 12 000 r/min 离心 20 min 收集菌体沉淀, 用细胞悬浮液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 值 7.2: 50 mmol/L EDTA pH 值 8.0: 20 mmol/L NaCl) 重新溶解菌体, 再以 6000 r/min 离心 5 min, 重复洗菌 1 次, 调节细菌浊度到 4.0 Mc Farland, 取 400 μ l 菌液在 50℃ 条件下与等量 1% SeaKem Gold 琼脂糖混匀, 加入专用模具制作 DNA 凝胶块。将胶块转入终浓度为 0.3 mg/ml 的蛋白酶 K 溶液中, 50℃ 水浴以 100 r/min 轻摇作用 2 h。以预热的纯水 50℃ 洗涤胶块 2 次, 每次 10 min; 预热的 TE 50℃ 洗涤胶块 4 次, 每次 15 min。③染色体 DNA 酶切: 使用试剂盒提供的缓冲液, 按操作说明进行, 酶的用量为 10 U/胶块。④电泳: 1% SeaKem Gold 琼脂糖, 电压 6 V/cm, 电场夹角 120°, 温度 14℃, 脉冲时间 5-65 s, 运行 20 h。⑤凝胶成像: 电泳结束后, 将胶块放入 0.1 μ g/ml EB 溶液染色 20 min, 然后在纯水中脱色 1 h。所有标准图像均按照 640 \times 480 像素拍摄。⑥图像处理和识别: 采用 BioNumerics 4.0 软件对 PFGE 图像进行识别, 通过 Excel 表格导入菌株背景资料, 建立图像数字化数据库。⑦聚类分析: 聚类图类型选择非加权配对算术平均法 (UPGMA) 构建, 条带位置差异容许度选择 1.0%, 优化值 0.5%。

结 果

1. 钩体黄疸出血群赖型赖株计算机模拟酶切片段分析: 根据我国已发表的黄疸出血群赖型赖株全基因组序列, 采用 DNASTar 软件对文献中常选用的稀位点酶进行计算机模拟酶切片段分析, 其中 Not I、Sbf I、SgrA I 模拟酶切可获得 10~30 个片

段, 符合 PFGE 分析对片段数量的要求。其中 Not I 消解钩体大、小染色体 DNA 分别产生 12 和 1 个片段, 其片段数量和大小分布适中, 仅产生 1 个小片段, 最适合用于 PFGE 分析。而 Sbf I 和 SgrA I 在钩体大、小染色体 DNA 上的切点分别是 26、1 和 30、4, 由于产生许多小片段, 可能在电泳中容易丢失而影响实验结果 (图 1、2)。

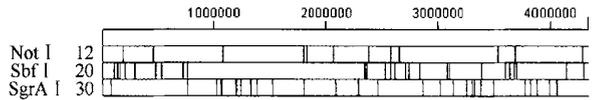


图1 Not I、Sbf I、SgrA I 在钩体大染色体 (4 332 241 bp) 上的酶切位点分析

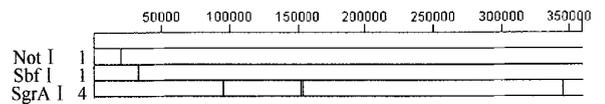
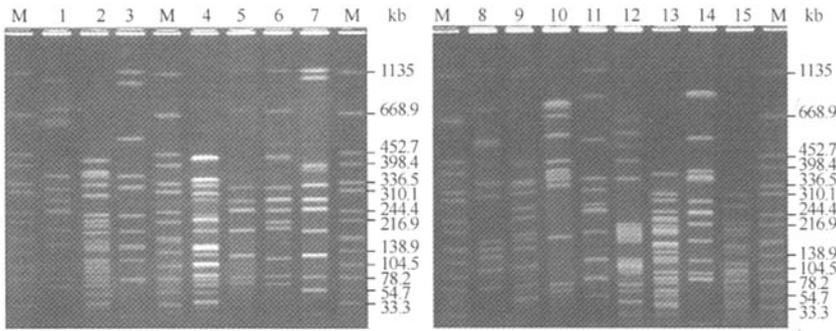


图2 Not I、Sbf I、SgrA I 在钩体小染色体 (358 943 bp) 上的酶切位点分析

2. 我国 15 群 15 型钩体代表株 PFGE 图谱: 我国 15 群 15 型钩体代表株染色体 DNA 用 Not I 酶切后, 采用 PFGE 技术进行片段分离, 结果获得了高清晰度酶切图谱, 其酶切片段的数目和大小适中, 分离效果良好。经多次重复实验证明, 在严格控制实验条件下, 各菌株的条带数量和分布特征稳定。位于第 1 泳道的 56601 为黄疸出血群赖型赖株, 有 12 个片段在图谱中清晰可辨, 说明有 1 个小分子片段在电泳中丢失, 与计算机模拟酶切预计的结果一致。15 个代表株可分辨的片段数量大约在 10~20 条之间, 各具不同的谱型特征。大部分代表株含有 500 kb 以上不同数量和分布特征的大片段 (56601、56603、56605、56606、56607、56608、56609、56610、56612、56613、56635), 有 4 个代表株 (56602、56604、56615、56655) 的最大片段小于 500 kb, 条带主要分布在 30~450 kb 之间 (图 3)。聚类分析结果表明, 56605 和 56606 两个代表株谱型相似性较高达到 95%, 但仍可根据条带的细微分布特征加以区分, 其余 13 个代表株的相似度不高, 可以非常方便地从谱型特征上区分不同的钩体代表株 (图 4)。

3. 部分黄疸出血群钩体分离株的 PFGE 初步分型分析: 利用钩体 PFGE 标准化操作程序, 对历年从四川、安徽省钩体病现场监测中获得的 24 株鉴定为黄疸出血群钩体的分离株, 进行 PFGE 分析, 并与黄疸出血群代表株 56601 进行聚类比对分析。结果发



注:M:Marker; 1:56601; 2:56602; 3:56603; 4:56604; 5:56605; 6:56606; 7:56607;
8:56608; 9:56609; 10:56610; 11:56612; 12:56613; 13:56615; 14:56635; 15:56655

图3 我国 15 群 15 型钩体代表株 PFGE 图谱

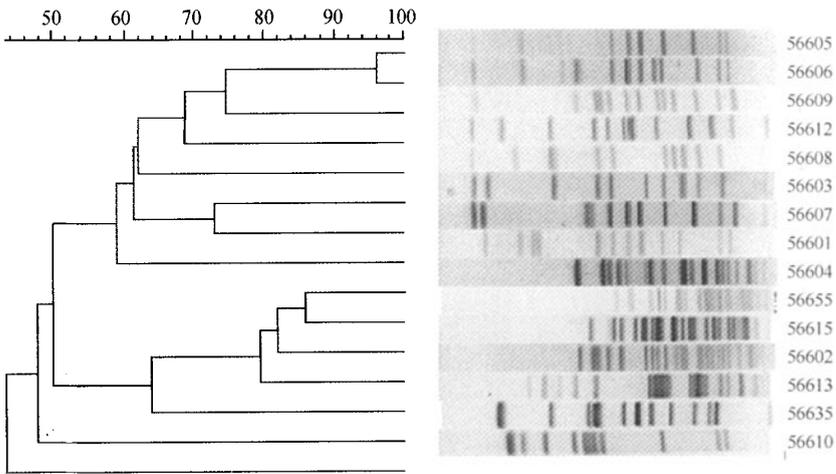


图4 我国 15 群 15 型钩体代表株 PFGE 谱型聚类分析图

现,24 株鉴定为黄疸出血群的分离株明显存在 3 种谱型特征,位于图 5 上部的 8 株菌(200302、200501、9091、9096、9137、81522、78001、78618)属第 1 类谱型,这些菌株与代表株 56601 比较,同样存在 3 条大片段(图 5 左侧),但大片段分布特征不同,其余片段的数量与分布位置均与代表株相似;位于图 5 中间的 14 株菌(81366、82224、200062、200063、77114、79353、9195、B125、E26、200057、7726、9813、200043、B167)属于第 2 类谱型,这些菌株与代表株 56601 比较,条带的数量和分布位置均十分相似,大部分菌株谱型相似性达到 100%;位于图 5 下部的 2 株菌(200060、9165)属于第 3 类谱型,2 株菌谱型完全一样,但与代表株 56601 比较,片段的数量和分布均明显不同,其原因尚待进一步分析。

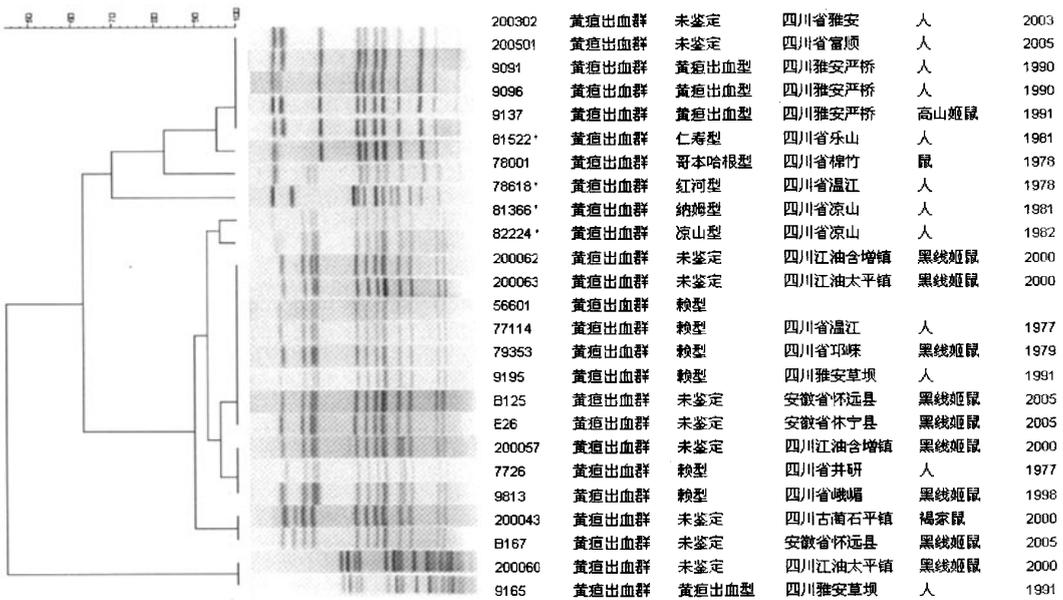
讨 论

PFGE 是目前国内外流行病学家广泛推崇的方

法之一,用来研究细菌的分子流行病学特点,可以从整个基因组的角度分析菌株之间的遗传关系^[1]。与其他方法相比,该方法具有重复性好、分辨率高、结果稳定、易于标准化的优点,能在细菌基因组庞大的情况下,尽可能反映更多的变异信息^[2-4]。Hiraku 等^[5]认为 PFGE 得出的基因多样性比其他基因分型及表型特征更加复杂。Herrmann 等^[6]在 1992 年将 PFGE 用于钩体分型,结果显示 89% (64/72)分离株血清学分类结果与 PFGE 图谱结果一致,说明 PFGE 是一个强大的菌株分型鉴定工具。2005 年四川省霍乱疫情暴发调查中,PFGE 结果显示甲鱼中分离的 O139 霍乱弧菌与疫情分离株间高度同源,确认被污染的甲鱼是食源性霍乱

暴发的主要传染源之一,从而确立了霍乱防控的重点^[7]。Shao 等^[8]在安徽省 2003-2005 年流行性脑脊髓膜炎(流脑)暴发疫情调查中应用 PFGE 对 106 株 C 群脑膜炎奈瑟菌分析,发现其中 89 株菌有相同的 PFGE 带型(AH1),与流行病学资料相结合,确立 C 群中的 AH1 型是导致安徽省流脑暴发的主要原因。

由于受到设备条件和技术方法的限制,国内外学者先前开展的大量钩体 PFGE 研究工作,存在图谱质量不高,操作方法不统一,各实验室之间数据不能共享等问题。美国疾病控制中心是世界上成立 PulseNet 最早的国家,实现了各实验室 PFGE 数据的网络化和资源共享,为病原菌实现快速分子遗传学分型鉴定提供了强大支持。目前国际上还没有正式发布钩体 PFGE 标准化操作程序,我国是钩体血清群(型)最多的国家,为了首先实现中国 PulseNet 中钩体 PFGE 操作程序的标准化和各省市 PFGE 数



注：* 经国际钩体病分类委员会鉴定属我国分离的新血清型钩体

图5 我国黄疸出血群钩体分离株聚类分析图

据资源的共享,我们参考其他病原体 PFGE 标准化操作程序,结合我国钩体菌株的生长特性、基因组特征和菌体细胞膜结构与染色体 DNA 提取方面的特点,通过长期、反复实验研究,建立了钩体 PFGE 标准化操作程序。本文建立的钩体 PFGE 标准化操作程序具有方法简便、快速,图谱质量高,实验结果稳定等特点。

本文中制作的我国 15 群 15 型钩体代表株 PFGE 图谱,通过 BioNumerics 软件建立了图谱资料的数字化数据库。由于对实验条件进行了优化,图谱质量达到了 PulseNet 资源共享的要求。本文中选用的稀位点限制性内切酶 NotI,消解我国 15 群 15 型代表株基因组染色体 DNA,所获得的片段数量和分子量大小适中,获得了非常满意的片段分离效果,各代表株具有独特的谱型特征,为今后我国钩体病监测和疫情调查中病原体分子遗传学分型奠定了基础。通过对从四川省和安徽省钩体病现场监测中分离的黄疸出血群部分菌株进行 PFGE 分析,发现大部分分离株的谱型与代表株谱型匹配,但部分菌株的条带数量和分布位置与代表株还存在着一定的差异,说明钩体 PFGE 谱型特征与钩体血清学分群结果具有很好的相关性,同一血清群钩体 PFGE 谱型的多态性特征,是进一步研究 PFGE 谱型与钩体血清型相关性的分子基础。钩体的血清群、型十分复杂,不同群型钩体具有不同的宿主来源,所引发的钩体病具有不同的流行病学特征,各群型钩体间抗

原性不同,缺乏交叉免疫保护。因而,流行菌株的鉴定对于指导钩体病防治工作具有重要意义。由于受菌株资源的限制,本文尚不能完全反映各种不同群、型钩体 PFGE 的特征。需要在今后工作中与各省市钩体病实验室、国家钩体菌保藏鉴定中心和国际钩体病组织加强协作,不断补充和完善钩体 PFGE 数据库,更好实现钩体菌株分子遗传学资源共享。

参 考 文 献

- [1] Safa A, Bhuiyan NA, Alam M, et al. Genomic relatedness of the new matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 to the classical and El Tor biotypes as determined by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 2005, 43:1401-1441.
- [2] Hopkins KL, Hilton AC. Methods available for the sub-typing of *Escherichia coli* O157. World J Microbiol Biotechnol, 2000, 16: 741-748.
- [3] Harsono KD, Kaspar CW, Luchansky JB, et al. Comparison and genomic sizing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. J Appl Environ Microbiol, 1993, 59:3141-3144.
- [4] Farber JM. An introduction to the hows and whys of molecular typing. J Food Prot, 1996, 59:1091-1101.
- [5] Hiraku Sasaki, Eiichi Kawamoto, Emi Okiyama, et al. Molecular typing of *Pasteurella pneumotropica* isolated from rodents by amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis and pulsed-field gel electrophoresis. J Microbiol Immunol, 2006, 50(4):265-272.
- [6] Herrmann JL, Belenger E, Perolat P, et al. Pulsed-field gel electrophoresis of Not I digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. J Clin Microbiol, 1992, 30:1696-1702.
- [7] 刘红露, 张京云, 冯泽惠, 等. 脉冲场凝胶电泳分型技术在追溯 O139 霍乱传染来源中的应用. 中华流行病学杂志, 2006, 27(2): 102-106.
- [8] Shao ZJ, Li W, Ren J, et al. Identification of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C clone from Anhui province, China. Lancet, 2006, 367:419-423.

(收稿日期:2007-04-30)

(本文编辑:张林东)