

随机扩增多态性 DNA 技术在沙门氏菌 同源性分析中的应用

郭爱玲, 谢 跻, 粟婉媛, 王洪江, 柳 婷, 汪 胜, 马美湖
(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 目的: 利用随机扩增多态性 DNA 技术(random amplified polymorphic DNA, RAPD)对从食品、蛋品样本或从业人员中收集到的 67 个地方菌株、4 个模式菌株, 涉及 29 种血清型的沙门氏菌进行同源性分析, 为沙门氏菌食源性疾病的流行病学溯源和疫情控制提供理论依据。方法: 选用筛选得到的 10 个碱基引物(CCGAAGCTGC)运用 RAPD 技术对不同来源的 71 株沙门氏菌进行随即引物扩增, 得到的 RAPD 图谱使用 NTSYS-pc2.10e 软件进行聚类分析。结果: 相似性系数在 0.70 时, 71 株沙门氏菌可以分为七大类群, 其中最多的一群内聚集的菌株达 54 株, 相似性系数在 0.90 时, 可以分为 26 个群, 最多的一群内聚集的菌株达 18 株, 相似性系数为 1.00 时, 有 9 个组群, 最多的一组群内聚集的菌株达 11。同源性结果和血清学鉴定的结果有 90% 的吻合率。结论: RAPD 检测技术可以用于沙门氏菌食源性疾病的流行病学调查和溯源。

关键词: 沙门氏菌; 地方菌株; RAPD; 聚类分析; 同源性

Application of RAPD in Homology Analysis of *Salmonella*

GUO Ai-ling, XIE Ji, SU Wan-ai, WANG Hong-jiang, LIU Ting, WANG Sheng, MA Mei-hu
(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective: 67 local strains isolated from food samples and egg samples and 4 type strains were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). It was not only related with the homology analysis of 29 Serotype of *Salmonella*, but also provided basis for the epidemiological traceability of food-borne disease and the controlling of the disease. Method: 10 bases primer were selected in the use of the RAPD analysis of 71 *Salmonella*. The fingerprinting of RAPD result was analyzed by NTSYS-pc2.10e. Result: When the rate of correlation is 0.7, 71 *Salmonella* can be divided into 7 groups. The group of most number has 54 strains. When the rate of correlation is 0.9, 71 *Salmonella* can be divided into 26 groups. The group of most number has 18 strains. When the rate of correlation is 1.0, 9 groups can reach the level. The group of most number has 11 strains. The result of RAPD analysis agrees with the analysis of serological test at the level of 90 percent. Conclusion: the technique of RAPD can be used to the epidemiological traceability of food-borne disease.

Key words: *Salmonella*; local strains; RAPD; clustering analysis; homology

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0355-03

近年来, 食品安全恶性事件不断发生, 食源性病原微生物是影响食品安全性的最主要生物因素。沙门氏菌属(*Salmonella*)是一大群寄生于人类和动物肠道内, 生化反应和抗原构造相似的革兰氏阴性杆菌。由沙门氏菌引起的食源性疾病在世界各地发生的食源性疾病中居首位或第二位^[1], 是引起食源性腹泻的主要原因。因此, 掌握食源性沙门氏菌病的流行病学资料, 对研究沙门氏菌的感染、传播机制及其预防具有重要的意义。

自1990年美国杜邦公司科学家 Williams等^[2]在PCR技术的基础上发展随机扩增多态性DNA技术(random amplified polymorphic DNA, RAPD)以来, 这项新技术特别是在研究亲缘关系^[3-4]、性状相关标志^[5]、基因定位^[6]等方面被广泛地应用。由于RAPD技术比其他的PCR技术需要的引物碱基序列少, 因此具有操作简便、经济、快速等优点。同时由于它无需预知被研究的生物基因组核苷酸顺序, 引物是随机合成或是任意选定的, 因此, 作

收稿日期: 2007-11-08

作者简介: 郭爱玲(1965-), 女, 副教授, 研究方向为食品安全及致病菌检测。E-mail: guoailing@mail.hzau.edu.cn

为高通量的分子研究工具 RAPD 技术来研究某一特定的生物种时, RAPD 图谱仍然处于缺乏状态^[7]。本研究利用 RAPD 技术对从食品、蛋品样本或从业人员中收集到的 67 个地方菌株, 涉及到 29 种血清型的沙门氏菌进行分子分型 分析其指纹图, 使用 NTSYS-pc2. 10e 软件进行聚类分析, 找出他们的同源性, 为沙门氏菌食源性疾病的流行病学溯源和疫情控制提供有力的理论学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

甲型副伤寒沙门氏菌 50001 (*Salmonella paratyphi*)、猪霍乱沙门氏菌 50019 (*S. choleraesuis*)、伤寒沙门菌 50071 (*S. typhi*)、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC13311 (*S. typhimurium*) 中国药品生物制品鉴定所; 其余 67 个地方菌株均为从食品、蛋品样品或从业人员中分离得到。研究菌株名称见表 1。

1.2 试剂

营养琼脂、营养肉汤 武汉市天益生化有限公司; Taq 酶 (5U/μl)、10 × PCR Buffer (Mg2+Plus)、10 × PCR Buffer (Mg2+free)、MgCl₂ (25.0mmol/L)、dNTP Mixture (各 25.0mmol/L)、DNA Marker DL2000、6 × loading Buffer TaKaRa 公司; M-8410 矿物油 Sigma 公司; 琼脂糖 BIOWEST 公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 模板制备

在无菌条件下将菌种接入营养肉汤中, 37℃ 恒温培养箱中培养 24h。取 1ml 含有菌种的营养肉汤, 放入 1.5ml EP 离心管中。10000r/min 离心 1min, 倾去上清液; 再取 1ml 含有菌种的营养肉汤加入, 10000r/min 离心 1min, 倾去上清液, 加入 100 μl 双蒸水, 沸水 10min。接着

12000 r/min 离心 10min, 收集菌体, -4℃ 保存。

1.3.2 RAPD 扩增反应

利用随即引物 5'-CCGCAGCCAA-3' 对所研究的 71 个沙门氏菌菌株进行随即扩增多态性分析。反应体系为 25 μl, 体系中含 Taq 酶 (5U/μl) 0.125 μl, 10 × PCR Buffer (Mg2+ Plus) 2.5 μl, dNTP Mixture (各 2.5mmol/L) 2 μl, DNA 上清液 1 μl, 引物 (10 μmol/L) 1 μl, 灭菌蒸馏水 18.375 μl。PCR 的循环参数为: 先 94℃ 预热 3min, 94℃ 1min、32~36℃ 1min、72℃ 2min 循环 35 次, 72℃ 接着延伸 10min。按照琼脂糖胶的浓度称去适量琼脂糖, 加入 0.5 × TBE 的缓冲液中, 先 60V 30mA 电泳 5min, 再 100V 30mA 电泳 60min。取出电泳完毕的琼脂糖胶放入 EB (200mg/L) 染液中避光染色 10min, 放入记录。

1.3.3 聚类分析

凝胶成像系统拍照得到 71 株沙门氏菌 RAPD 图象后, 根据 Marker 计算不同扩增片段分子量的大小, 使用 NTSYSpc-2. 10e 软件对来源不同的沙门氏菌菌株进行分析。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

利用随即引物 5'-CCGCAGCCAA-3' 对所研究的 71 个沙门氏菌菌株进行 RAPD 扩增, 电泳后, 条带数目在 2~9 条之间, 所获得片段分子量大小在 400~2100bp 之间, 结果见图 1。

2.2 聚类分析结果

使用 NTSYSpc-2. 10e 软件对图 1 的结果进行分析, 得到 71 株沙门氏菌亲源关系树状图谱, 见图 2。如图 2 所示, 相似性系数在 0.70 时, 71 株沙门氏菌可以分为

表 1 沙门氏菌菌株名称及株数
Table 1 Name and number of *Salmonella* strains

菌株名称	株数	菌号	菌株名称	株数	菌号
甲型副伤寒沙门氏菌	1	1	圣保罗沙门氏菌	3	27, 28, 53
伤寒沙门氏菌	9	2~6, 36~39	斯坦利沙门氏菌	1	29
鼠伤寒沙门氏菌	5	7~9, 51~52	肠炎沙门氏菌	5	30, 54~57
猪霍乱沙门氏菌	1	10	田纳希沙门氏菌	1	31
伊斯沙门氏菌	1	11	汤普逊沙门氏菌	3	32, 61, 62
鸭沙门氏菌	6	12~16, 71	纽布波兰田纳西沙门氏菌	2	34, 35
鸡雏沙门氏菌	1	17	明斯特沙门氏菌	3	40, 60, 64
茨昂威沙门氏菌	1	18	阿贡纳沙门氏菌	1	43
胥伐埃班沙门氏菌	2	19, 47	斯坦利沙门氏菌	2	44, 45
群里丁沙门氏菌	3	20, 69, 70	巴基斯坦沙门氏菌	1	46
科特布斯沙门氏菌	3	21, 22, 41	未知沙门氏菌	3	48~50
曼哈顿沙门氏菌	2	23, 65	布坦亡沙门氏菌	1	58
火鸡沙门氏菌	2	24, 33	伊桑吉沙门氏菌	1	59
德尔脾沙门氏菌	4	25, 26, 66, 67	圣地亚哥沙门氏菌	1	63
纽波特沙门氏菌	1	68			

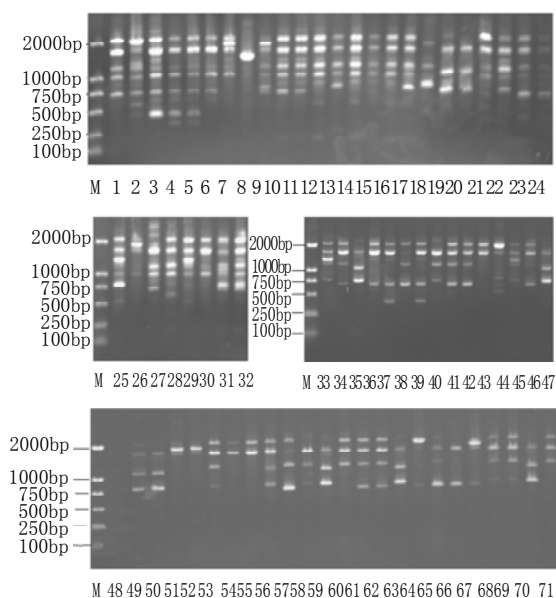


图1 71株沙门氏菌的RAPD图谱
Fig.1 RAPD map of 71 *Salmonella*

七大类群, 其中最多的一群内聚集的菌株达54株, 最少的一群只有1个株菌株; 相似性系数在0.90时, 可以分为26个群, 最多的一群内聚集的菌株达18株, 相似性系数在1.00时, 可以得到9个组群, 有31株菌分别分布在这9个组内, 每组内菌株之间的同源性最高, 如同在一组的菌株菌号为: 40、43和53; 51、52和54; 61和62; 12、14和15; 4和5号菌株等。

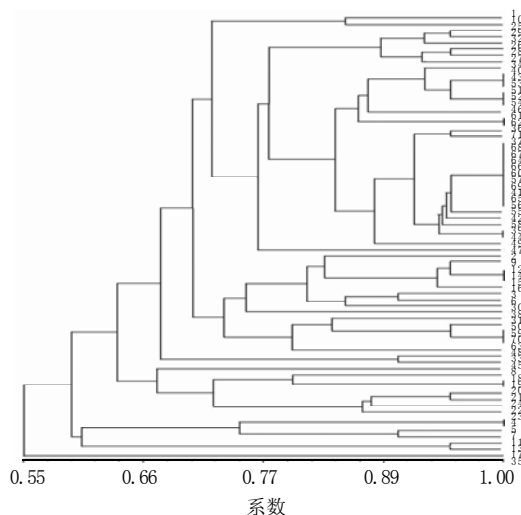


图2 71株沙门氏菌的聚类分析树状图
Fig.2 Clustering analysis of 71 *Salmonella*

3 讨论

许多学者对利用RAPD技术进行聚类分析的可靠性问题作了较为系统的研究, 其中Lanner等^[8]用某一RAPD扩增片段或克隆片段作探针, 进行Southern杂交来确定其同源率, 结果发现其同源性可达98.8%。崔百忠等^[9]

用RAPD技术对青海省和四川省分离的32株鼠疫菌株进行聚类分析, 明确了两地菌株间的亲缘关系。本研究对71株传统方法已经鉴定到血清型的沙门氏菌进行聚类分析, 从图2中可以看出相似性系数为1.00的组群有: 61和62号菌株同源性100%, 4号和5号菌株同源性100%, 12、14和15号菌株同源性100%, 51、52和54号菌株同源性100%; 从表1中得知: 61号62号菌株均为相同血清型而来源不同的汤普逊沙门氏菌地方菌株, 4号和5号菌株也为相同血清型而来源不同的伤寒沙门氏菌地方菌株, 12、14和15号菌株也为相同血清型而来源不同的鸭沙门氏菌地方菌株, 只有51、52和54号这一组相似系数是1.00的菌株血清型不同, 51、52号菌株的血清型是鼠伤寒沙门氏菌, 而54号是肠炎沙门氏菌。本实验利用RAPD技术对71株沙门氏菌进行聚类分析得到的同源性结果和血清学鉴定的结果有90%的吻合率, 树状图谱可以看出血清型相同而来源不同的地方菌株的亲缘关系。

目前, 食品中沙门菌的检测方法和我国沙门氏菌检验国标方法, 均是以1966年诞生的Kauffmann抗原表为基础, 依靠生化反应和血清学实验进行鉴定。整个实验需要5~6d, 检出限为 10^7 CFU/每毫升或每克。而食品、蛋品RAPD方法检测灵敏、特异、快速, 并且能够迅速判断出不同地方的沙门氏菌病是否是同一传染源引起, 具有一定的意义。

参考文献:

- [1] LEE W C, SAKAI T, LEE M J, et al. An epidemiological study of food poisoning in Korea and Japan[J]. Int J Food Microbiol, 1996, 29:105-113.
- [2] WILLIAMS J G, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acids Res, 1990, 18: 6531-6535.
- [3] CAO W G, SCOLES G, HUCL P, et al. Phylogenetic relationships of five morphological groups of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) based on RAPD analysis[J]. Genome, 2000, 43: 724-727.
- [4] SUDUPAK M A, AKKAYA M S, KENCE A. Analysis of genetic relationships among perennial and annual Cicer species growing in Turkey using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 2002, 105: 1220-1228.
- [5] SAAL, B, STRUSS D. RGA- and RAPD-derived SCAR markers for a Brassica B-genome introgression conferring resistance to blackleg in oilseed rape[J]. Theor Appl Genet, 2005, 111: 281-290.
- [6] GROOS C, GAY G, PERRETANT M R, et al. Study of the relationship between pre-harvest sprouting and grain color by quantitative trait loci analysis in a white×red grain bread-wheat cross[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 39-47.
- [7] LI J J, PEI G L, PANG H X, et al. A new method for RAPD primers selection based on primer bias in nucleotide sequence data[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 126: 415-423.
- [8] LANNER C, BRYNGDLSSON T, GUSTAFSSON M. Genetic validity of RAPD markers at intra and inter specific level in wild Brassica species with n=9[J]. J Theor Appl Genet, 1996, 98: 9-14.
- [9] 崔百忠, 金丽霞, 李敏, 等. 随机扩增多态性DNA (RAPD) 技术用于青海田鼠疫菌株亲缘性的研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19 (1): 58-59.