

DiversiLab 系统沙门氏菌分子分型评价

许龙岩, 袁慕云, 林文丽, 张 旺, 焦 红

(广东出入境检验检疫局技术中心食品实验室, 广东 广州 510623)

摘 要: 目的: 评价 DiversiLab(DVL)系统对沙门氏菌(SA)的分型能力。方法: 用 rep-PCR 技术为原理的 DVL 系统对进出口食品中分离的 44 株 SA 进行分子分型, 并与脉冲场凝胶电泳(PFGE)结果比较, 探讨 DVL 对 SA 的种群分类能力和分辨率。结果: 44 株 SA 经 rep-PCR 分型分成 22 个群, 分离自不同国家、不同食品中的相同血清型 SA 分布在同一个群, 而且菌株之间相似性非常高。在 rep-PCR 结果中分在同一个群中的 SA, 在 PFGE 结果中除 SA2 和 SA15 外, 其他菌株之间相关性较低。结论: DVL 在 SA 的种群的分类能力上优于 PFGE, 但分辨率低于 PFGE。
关键词: 沙门氏菌; DiversiLab 系统; rep-PCR; PFGE; 分子分型

Molecular Typing Evaluation of *Salmonella* in Diversilab System

XU Long-yan, YUAN Mu-yun, LIN Wen-li, ZHANG Wang, JIAO Hong

(Food Laboratory of Technology Center, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract: Objective: To evaluate the typing performance of DiversiLab system (DVL) for *Salmonella*. Method: A DVL system, which is based on rep-PCR, was used to type 44 *Salmonella* isolates from exported and imported foods and compared with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The *Salmonella* isolates were typed by rep-PCR into 22 groups. The same serotypes of *Salmonella* isolates from different countries and foods were distributed in the same group with a high similarity. The PFGE results obtained for *Salmonella* isolates assigned to the same group using rep-PCR indicated a low similarity among all other isolates except No. 2 and No. 15. Conclusion: DVL shows better typing ability but lower resolution for *Salmonella* than PFGE.

Key words: *Salmonella*; DiversiLab system; rep-PCR; PFGE; molecular typing

中图分类号: Q939

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)03-0203-04

基因外重复回文序列(repetitive extragenic palindromic, rep)在细菌基因组中存在着菌株、种、属水平上的分布和拷贝数量的差异, 而序列本身在进化过程中又具有较强的保守性, 非常适合作为 PCR 引物的扩增对象。在 rep 的中心有一段保守性很高的重复序列, 根据这段重复序列设计引物, 扩增两段 rep 之间的片段, 发展出了 rep-PCR 技术^[1]。DiversiLab(DVL)是以 rep-PCR 技术为原理的自动化的分子分型系统。本研究用 DVL 对食品中分离的沙门氏菌进行 rep-PCR 分型, 并与脉冲场凝胶电泳(PFGE)结果相比较, 探讨 DVL 对 SA 的分型能力, 为 DVL 应用于 SA 的溯源工作提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 菌株

进出口食品中分离的 SA 44 株, 菌株信息见表 1。

上述菌株为广东出入境检验检疫局技术中心食品实验室和中国检验检疫科学研究院食品安全研究所保存菌株, 所有菌株均经过 API 20E 生化鉴定确定为 SA。PFGE 相对质量标准用布伦登普(Braenderup)沙门氏菌 H9812, 由广东省疾病预防控制中心赠送。

1.2 试剂与仪器

API 20E、rep-PCR 试剂盒、微流体芯片 法国梅里埃公司; 限制性内切酶 *Xba* I 美国 Promega 公司; 蛋白酶 K 德国 Merck 公司; SeaKem Gold 琼脂糖、SLS(Sodium lauroyl Sarcosine)、SDS、EDTA 美国 Sigma 公司。

Agilent Bioanalyzer 2100型DVL分型系统 美国Agilent公司; PTC-200 型 PCR 仪、CHEF MAPPER 脉冲场电泳仪、Gel Doc XR 凝胶成像系统 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

收稿日期: 2011-03-27

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B0600013); 广东出入境检验检疫局科研项目(2009GDK35)

作者简介: 许龙岩(1970—), 男, 高级工程师, 硕士, 研究方向为食源性病原菌分子检测。E-mail: xlyooo@sohu.com

表 1 44 株沙门氏菌菌株信息

Table 1 Details of 44 *Salmonella* isolates investigated in this study

编号	样品名	血清型	样品来源	编号	样品名	血清型	样品来源
SA1	冻猪腰	阿贡纳	欧洲	SA23	冰鲜鸡	姆班达卡	广东
SA2	猪肚	德尔卑	欧洲	SA24	冻猪脚	渥兴顿	丹麦
SA3	猪肚	里森	欧洲	SA25	肉骨粉	明斯特	乌拉圭
SA4	冻猪肚	鼠伤寒	欧洲	SA26	冰鲜鸡	田纳西	惠州
SA5	冻猪肚	德尔卑	欧洲	SA27	猪舌	鼠伤寒	欧洲
SA6	冻鸡	鼠伤寒	广东	SA28	猪肚	基桑加尼	欧洲
SA7	冻鸡	肠炎	广东	SA29	猪肚	德尔卑	欧洲
SA8	饲料	鸭	广东	SA30	冰鲜鸭	鸭	惠州
SA9	鲨鱼骨	列克星敦	欧洲	SA31	冻猪脚	鼠伤寒	丹麦
SA10	冻鱿鱼	乌普萨拉	广东	SA32	蛤蚧	彻斯特	泰国
SA11	鱿鱼	乌普萨拉	广东	SA33	红鱼粉	奥胡斯	美国
SA12	肉骨粉	蒙得维的亚	澳大利亚	SA34	核酸酵母	利物浦	广东
SA13	冻鸡	乌普萨拉	广东	SA35	珠江水	阿贡纳	广东
SA14	蛤蚧	非丁伏斯	泰国	SA36	罗非鱼	鼠伤寒	茂名
SA15	冻鸡	德尔卑	广东	SA37	蛤蚧	列克星敦	泰国
SA16	肉骨粉	阿贡纳	乌拉圭	SA38	水饺	伊斯坦布尔	广东
SA17	冻鸡	布利丹	广东	SA39	蛤蚧	托尔诺	泰国
SA18	鸡翼	伊斯坦布尔	美国	SA40	蛤蚧	伊斯特本	泰国
SA19	肉骨粉	罗米他	乌拉圭	SA41	猪鼻	鲁齐齐	欧洲
SA20	肉骨粉	奥里翁	澳大利亚	SA42	珠江水	新加坡	广东
SA21	冻鱼	E群	广东	SA43	鸡翼	圣胡安	广东
SA22	饲料	姆班达卡	美国	SA44	珠江水	E群	广东

1.3.1 DNA 提取

刮取血琼脂平板上分离纯化的 SA 菌落，使用 DVL 配套核酸提取试剂盒，按照说明书推荐步骤提取

DNA，DNA 质量浓度控制在 25~50ng/μL。

1.3.2 rep-PCR 分型

以提取的 SA DNA 为模版，使用 DVL 配套的 rep-PCR 试剂盒，按照说明书进行 PCR 扩增，PCR 循环参数为：94℃、2min；94℃、30s，50℃、30s，70℃、90s，35 个循环；72℃、3min，反应体积为 25μL。

PCR 扩增产物注入微流体芯片放入 DVL 系统进行电泳，DVL 自动生成分析报告，包括聚类分析树状图、凝胶图像虚拟图、矩阵图、菌株之间相似度。DVL 根据 Pearson 相关系数确定菌株间的距离矩阵，用非加权配对算术平均法(Upgma 法)建立树状图。

1.3.3 rep-PCR 分型与 PFGE 分型比较

44 株 SA 中选 24 株进行 PFGE，PFGE 方法按文献[2]进行。限制性内切酶用 *Xba* I。产生的电泳图用 BioNumerics 软件构建聚类分析树状图。

2 结果与分析

2.1 44 株 SA rep-PCR 分型结果

44 株 SA 经 rep-PCR 分型分成 22 个群，由图 1 可见，分离自不同国家、不同食品中的相同血清型的 SA 分布在同一个群，而且菌株之间相似性非常高。鼠伤寒沙门氏菌 SA4、SA6、SA27、SA31、SA36 分别从欧洲冻猪肚、广东冻鸡、欧洲猪舌、丹麦冻猪后脚、广东罗非鱼中分离，5 株 SA 在聚类图上分布在第 4 群，而

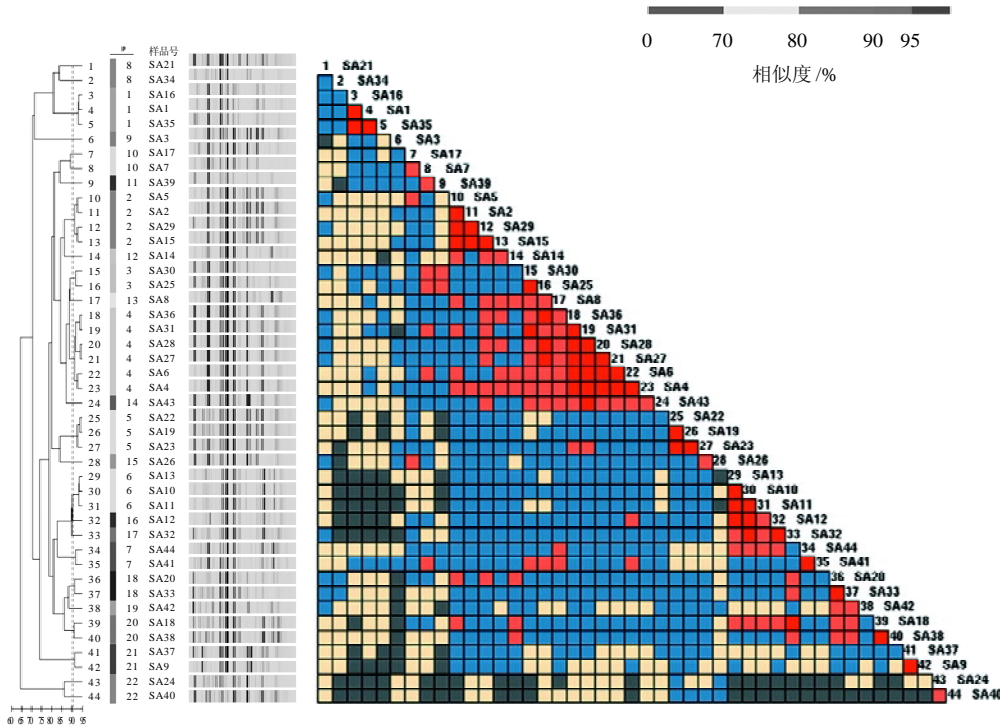
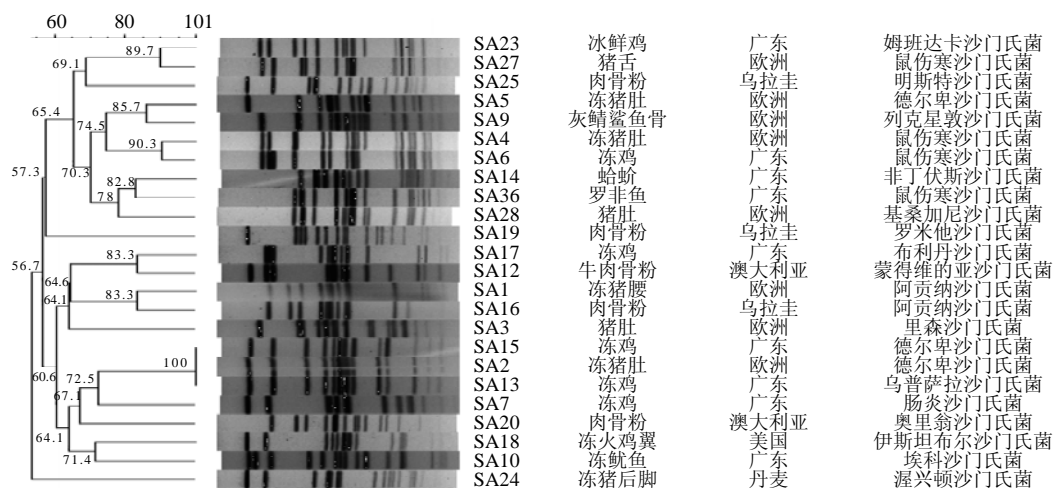


图 1 44 株沙门氏菌 rep-PCR 分子分型树状图和矩阵图

Fig.1 Dendrogram and matrix diagram constructed by rep-PCR molecular typing

图2 *Xba* I 酶切 24 株沙门氏菌 PFGE 聚类分析树状图Fig.2 Dendrogram constructed by PFGE cluster analysis based on *Xba* I digestion

且菌株之间的相似度在 97%~99%。不同时间从欧洲冻猪肚中分离的德尔卑沙门氏菌 SA2、SA5、SA29 和广东冻猪肚中分离的 SA15 分布在第 2 群, 菌株之间相似度在 95.1%~97.9%。相同的现象在其他血清型 SA 中也发现, 乌普萨拉沙门氏菌 SA10、SA11、SA13 分布在第 6 群; 阿贡纳沙门氏菌 SA1、SA16、SA35 分在第 1 群, 菌株之间相似度 97.8%~98.5%; 姆班达卡沙门氏菌 SA22 和 SA23 分布在第 5 群, 伊斯坦布尔沙门氏菌 SA18、SA38 分布在第 20 群。

2.2 SA rep-PCR 与 PFGE 分型结果比较

24 株 SA 经 PFGE, 根据电泳产生的条带位置和数量的不同, 共分为 22 个 PFGE 型, 带型较分散。由图 2 可见, 德尔卑沙门氏菌 SA15、SA2 和乌普萨拉沙门氏菌 SA13 之间的相似度达到 100%, 3 株 SA 有相同的 PFGE 型, 相似度达到 100%。分析 PFGE 型相同而且同源性 100% 的 SA13、SA2、SA15 菌株在 rep-PCR 图上的分布, 发现 3 株菌株在 rep-PCR 树状图上分布在不同的群中。德尔卑沙门氏菌 SA2、SA15 在第 2 群, 乌普萨拉沙门氏菌 SA13 在第 6 群, 而且在树状图的空间距离上与前两株菌相隔较远, 表现出不相关性。这可能是 SA13、SA15、SA2 对限制性内切酶 *Xba* I 有相同的酶切位点, 3 株 SA 有相同的 PFGE 型但有不同的 rep-PCR 型。分析鼠伤寒沙门氏菌在 PFGE 和 rep-PCR 中的分布, SA4、SA6、SA27、SA36 在 rep-PCR 图上均分布在第 4 群, SA4 和 SA6 菌株之间同源性为 97.8%, SA27 和 SA36 同源性达到 98.3%, 按 rep-PCR 判断标准 SA4 和 SA6、SA27 和 SA36 菌株间是不可分辨的关系, 但 PFGE 结果, SA4 和 SA6 之间是紧密相关菌株, SA27 和 SA36 之间是不相关菌株。相同的现象在阿贡纳沙门氏菌 SA16 和 SA1 之间也发现, 两株菌株在 rep-PCR 图上分

在第 1 群, 菌株之间相似度 98.5%, 是不可分辨的菌株, 但 PFGE 结果两株菌株的相似度 83.3%, 相关性较弱。

3 讨论

rep-PCR 已经被认为是一种细菌分型的有效方法, rep-PCR 已经被商业化成为一个自动化模式, 即 DiversiLab 系统^[3]。Healy 等^[3]在一次对爆发和非爆发相关的不同血清型脑膜炎奈瑟菌进行的分析中发现, DiversiLab 系统表现出了极其优秀的血清型和物种水平鉴别能力。Cangelosi 等^[4]用 DiversiLab 系统对结核分枝杆菌和鸟型分枝杆菌进行分型时, 产生其他方法不能分型的分枝杆菌的指纹, 本研究用 DVL 系统对不同来源的 SA 进行 rep-PCR 分型, 结果相同血清型的菌株分布在同一个群。5 株鼠伤寒沙门氏菌 SA4、SA6、SA27、SA31、SA36, 4 株德尔卑沙门氏菌 SA2、SA5、SA29、SA15, 乌普萨拉沙门氏菌 SA10、SA11、SA13, 阿贡纳沙门氏菌 SA1、SA16、SA35, 姆班达卡沙门氏菌 SA22、SA23, 均分别分布在同一个群中。值得一提的是, 与德尔卑沙门氏菌 SA2、SA15 PFGE 型别完全相同的乌普萨拉沙门氏菌 SA13, 在 rep-PCR 树状图上并非与上述两株菌株分在一个群, 而是与相同血清型的 SA10、SA11 分在同一个群。DVL 对 SA 种群分析时, 是基于分类群之间的亲缘关系进行分离, 在 SA 种群的分类方面表现出较强的能力。

rep-PCR 与 PFGE 分型结果比较发现, 在 rep-PCR 树状图中分在同一个群中的相同血清型 SA 在 PFGE 图谱上并非分在同一个群, 而且树状图中相隔较远、相似性较低。在 rep-PCR 图谱判断标准上, DVL 的厂家建议菌株之间相似性大于 97%、没有条带的差异, 判断为不可辨别的菌株; 相似性大于 95%、有 1~2 条不同的

条带,判断为相似菌株;相似性小于95%、有多条不同的条带,则判断为不同菌株(DVL的rep-PCR图谱不会给出100%的相似性)。曲燕燕等^[5]按上述判断标准用DVL对鲍曼不动杆菌进行分子分型,Healy等^[6]也用上述标准对阪崎肠杆菌进行分群。本研究rep-PCR图谱中分在同一群中的相同血清型SA之间相似性均在97%以上,按照DVL判断标准这些菌株之间是不可分辨的。但在PFGE结果中观察,只有德尔卑沙门氏菌SA2、SA15是完全相同的菌株外,阿贡纳沙门氏菌SA16和SA1、鼠伤寒沙门氏菌SA27和SA36、德尔卑沙门氏菌SA2和SA5,在树状图上相隔较远,彼此之间是不相关的菌株。这一观察结果表明,rep-PCR在进行SA种群分类时比PFGE更优胜,但对同种菌株的分型分辨率上PFGE更优于rep-PCR。在实验操作方面,DVL是自动化的rep-PCR分型系统,提供标准化的试剂和方法,对实验人员的操作技能要求没有PFGE高^[7-8]。在分型时间上DVL系统可以在4h内自动化分析13个样品,包括获得聚类分析树状图、凝胶图像虚拟图、矩阵图等报告,而PFGE需要3~5d时间^[9]。总之,在细菌的分型方法中,DVL系统是一种快速、简便的分型方法,对SA的种群分类能力和分辨率也比较高,作为SA快速分型和溯源工具具有潜在的实用性。

参考文献:

- [1] VERSALOVIC 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.
- [2] CDC. Standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigelloes sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)[EB/OL]. [2011-03-01]. <http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli-salmonella-shigella-protocols.pdf>.
- [3] HEALY M, HUONG J, BITTNER T, et al. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(1): 199-207.
- [4] CANGELOSI G A, FREEMAN R J, LEWIS K N, et al. Evaluation of a high-throughput repetitive-sequence-based PCR system for DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex strains[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 2685-2693.
- [5] 曲燕燕, 王文飞, 周华, 等. DiversiLab 系统鲍曼不动杆菌基因分型可行性研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2010, 33(5): 425-429.
- [6] HEALY B, MULLANE N, COLLIN V, et al. Evaluation of an automated repetitive sequence: based PCR system for subtyping *Enterobacter sakazakii*[J]. *Journal of Food Protection*, 2008, 71(7): 1372-1378.
- [7] 马俊英, 刘健华, 陈杖榴, 等. 细菌分型的分子生物学技术研究进展[J]. *中国兽医科学*, 2007, 37(10): 914-918.
- [8] 王丽丽, 徐建国. 脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)在分子分型中的应用现状[J]. *疾病监测*, 2006, 21(5): 276-279.
- [9] ROSS T L, MERZ W G, FARKOSH M. Comparison of an automated repetitive sequence: based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(11): 5642-5647.