

沙门菌 PCR-dHPLC 基因分型方法建立*

张东方^{1,2}, 袁飞¹, 王娉¹, 杨海荣¹, 胡玥¹, 赵勇胜¹, 陈颖¹, 葛毅强^{2,3}

摘要:目的 建立沙门菌聚合酶链反应-变性高效液相色谱(PCR-dHPLC)基因分型方法。方法 采用 16S~23S rRNA 内转录间隔(ITS)作为沙门菌分型目的基因,确定特异性扩增引物,进行 PCR 扩增,扩增产物经 dHPLC 分离,根据 dHPLC 图谱峰型差异进行分型,并与血清学和生化分型结果比较。结果 89 株沙门菌共分为 12 个 dHPLC 型(D 型);所有沙门菌均有 1 个相同色谱峰,克隆测序结果表明,其片段大小为 600 bp,其他 8 种食源性致病菌对照株无此色谱峰,应为沙门菌 16S~23S rRNA 基因序列的特征性条带,分型结果与血清学差异较大,与生化分型结果有一定一致性。结论 所建立的沙门菌 PCR-dHPLC 基因分型方法具快速、操作方便、重复性好、成本低廉、高通量和自动化的特点。

关键词: 聚合酶链反应-变性高效液相色谱(PCR-dHPLC);沙门菌;16S~23S rRNA 基因区间;分子分型

中图分类号: R 446.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)11-1515-04

Genotyping of *Salmonella* spp. by 16S-23S rRNA assay

ZHANG Dong-fang^{*}, YUAN Fei, WANG Ping et al^{*} Chinese Academy of Inspection and Quarantine Beijing 100123, China)

Abstract: Objective To develop a polymerase chain reaction-denaturing high performance liquid chromatography (PCR-dHPLC) genotyping method for genotyping of *Salmonella* spp. **Methods** Specific primers of 16S-23S rRNA intergenic spacer sequence(ITS) region were used to subtype *Salmonella* spp. The PCR amplification products of experimental strains were separated by dHPLC. The results of genotyping achieved through the differences between dHPLC peaks and were compared to the results obtained by serological typing and biochemical typing. **Results** Totally 89 *Salmonella* spp. strains were successfully genotyped into 12 dHPLC types(D type). All the *Salmonella* spp. strains had one same chromatographic peak, while other food-borne pathogens showed no similar peak. DNA sequence analysis showed that the sequence was 600bp. The results indicate that the chromatographic peak is specific to *Salmonella* spp. Comparing the dHPLC genotyping results with those of serological typing and biochemical typing, we found dHPLC genotyping results were significantly differ from the serological typing results, while were consistent with that of the biochemical typing. **Conclusion** DHPLC is a novel rapid highly accurate and cost-effective genotyping method for genotyping of *Salmonella* spp.

Key words: PCR-dHPLC; *Salmonella* spp.; 16S-23S rRNA ITS; molecular genotyping

沙门菌(*Salmonella* spp.)属内分型复杂,不同类型沙门菌致病性不同。因此进行沙门菌分型鉴定研究具有重要意义^[1]。传统的沙门菌分型方法包括血清学鉴定和生化分型,主要通过表型进行鉴定,存在分型率低、重复性差、操作繁琐等缺点。近年来,分子分型方法逐渐得到应用,各种技术各有优缺点,但无金标方法^[2]。变性高效液相色谱(denaturing high-performance liquid chromatography, dHPLC)是 20 世纪 90 年代发展起来的一种新的核酸片段分析技术,具有快速、高通量、自动化、高灵敏度等特点^[3-4]。近年来,该技术也用于鉴定和分子分型^[5]。细菌核糖体 16S~23S 内转录间隔序列(internal transcribed spacer, ITS)即 16S~23S rRNA 基因区

间,两端为高度保守序列,中间为高度变异序列,含有足够的种内多态性及种间保守性的遗传信息,非常适合于种内分型研究^[6]。本研究采用 dHPLC 技术和沙门菌属 16s~23s 基因区间序列,对 89 株沙门菌进行分型,旨在建立一种沙门菌基因分型鉴定的新方法。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)菌株:沙门菌菌株 89 株,依次编号为 1~89 号;大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、奇异变形杆菌、福氏志贺菌、蜡样芽胞杆菌、阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌等食源性致病菌对照菌株 8 株。所有菌株均来源于中国检验检疫科学研究院食品安全微生物菌种保藏管理中心(IQCC)。(2)主要仪器与试剂:WAVE 核苷酸片段分析系统,包括 WAVEMAKER Software Version 4.1, DNASep 柱,紫外检测器(美国 Transgenomic 公司);10、100、200、1 000 μ L 微量移液器(德国 Eppendorf 公司);聚合酶链反应扩增仪(德国 Eppendorf 公司),DYY-6C 电泳仪(北京六一仪器厂),凝胶成像仪(Gene

* 基金项目:国家科技支撑计划项目(2009BAD91306);国家质检总局科研计划项目(2009IK312、2010IK178)

作者单位:1. 中国检验检疫科学研究院,北京 100123; 2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院; 3. 中国农村技术开发中心

作者简介:张东方(1987-),女,河北人,硕士在读,主要从事食品微生物及分子生物学研究。

通讯作者:陈颖, E-mail: yqychen@yahoo.com.cn; 葛毅强, E-mail: 68511009@163.com

Genius, 美国 SYNGENE 公司)。脑心浸液肉汤 (BHI) (美国 Difco 公司); 营养琼脂 (北京陆桥公司); API20E 生化鉴定试剂盒 (法国生物梅里埃公司)。三乙基胺醋酸盐 (triethylammonium acetate, TEAA)、乙腈 (acetonitrile)、水, 均为色谱纯 (美国 Transgenomic 公司)。缓冲溶液 A: 0.1 mol/L TEAA 0.025% (v/v) 乙腈; 缓冲溶液 B: 0.1 mol/L TEAA 25% (v/v) 乙腈; 缓冲溶液 D: 75% 乙腈。

1.2 方法

1.2.1 基因片段扩增 (1) 引物与模板: 根据文献 [7] 确定用于 16S ~ 23S rRNA 基因间区扩增的引物 G1 和 L1, 由 Invitrogen 公司合成。G1: GAAGTCG-TAACAAGG; L1: CAAGGCATCCACCCGT。G1 片段位于区间界限上游 30 ~ 40 bp, L1 片段位于区间界限下游 20 bp 附近。采用水煮提取法 [8] 提取菌株基因组 DNA 模板。(2) 反应体系及扩增程序: 反应体系总体积 50 μL, 其中包括 10 × PCR buffer 5 μL, dNTP Mixture 4 μL, 上游引物 (10 μmol/L) 1 μL, 下游引物 (10 μmol/L) 1 μL, Hotstart Taq 聚合酶 (5 U/μL) 0.4 μL, DNA 模板 1 μL, 去离子水 37.6 μL。扩增程序为 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 7 min。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 观察目的基因扩增结果, 扩增出目的基因的 PCR 产物用于 dHPLC 检测。

1.2.2 dHPLC 分析 采用 WAVE 核苷酸片段分

析系统对 PCR 产物进行分型鉴定。色谱柱: PS-DVB & C18 DNASep 色谱柱 (4.6 mm × 5 mm, 粒度 3 μm); 柱温: 50 °C; 流动相: 缓冲溶液 A 浓度为 50.2%, 缓冲溶液 B 浓度为 49.8%; 流速: 0.9 mL/min; 检测器: 荧光检测器; PCR 产物放入进样室, 自动进样, 上样量 5 μL; 采用双链 DNA 多片段 (double-stranded multiple fragments) 分析模式, 根据 dHPLC 图谱不同峰型特征, 进行不同属种菌株的鉴定分型, 沙门菌属内具有相同峰型特征的菌株, 判定为同一 dHPLC 型 (简称 D 型)。

1.2.3 扩增产物克隆测序 在上述沙门菌分型得出的型别中, 每个 D 型选择 2 ~ 3 个电泳条带清晰的菌株, 将其 PCR 扩增产物送上海英骏生物技术有限公司纯化和测序, 测序引物与 PCR 扩增引物相同。

1.2.4 血清学与生化学鉴定 按照 GB/T 4789.4 - 2008 中沙门菌血清学分型鉴定方法 [9], 对 89 株菌株进行血清学型别鉴定, 与 dHPLC 分型结果进行对照。按照 GB/T 4789.4 - 2008 中沙门菌属生化群鉴别方法 [9], 对 89 株菌株进行生化学型别鉴定, 与 dHPLC 分型结果进行对照。

2 结果

2.1 扩增产物 (图 1) 所有实验菌株均扩增出多条条带, 不同菌属 PCR 产物大小及条带数量各不相同, 沙门菌均在 400 ~ 700 bp 有电泳条带。



注: M: DNA Marker; 1 ~ 20: 沙门菌 1 ~ 20 号; 21: 铜绿假单胞菌; 22: 阴沟肠杆菌; 23: 大肠埃希菌; 24: 奇异变形杆菌; 25: 蜡样芽胞杆菌; 26: 福氏志贺菌; 27: 金黄色葡萄球菌; 28: 单增李斯特菌; B: 空白对照 (ddH₂O)。

图 1 实验菌株 16S ~ 23S rRNA 基因区间扩增结果

2.2 dHPLC 分型鉴定及测序比较 (图 2、3) 所有沙门菌均有出峰时间为 11.6 min 的信号峰, 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、奇异变形杆菌、福氏志贺菌、蜡样芽胞杆菌、阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌等 8 种非沙门菌均无此信号峰, 克隆测序结果显示, 对应这个出峰时间的基因片段长度为 600 bp。表明 11.6 min 信号峰是沙门菌属的特征峰, 可以将沙门氏菌与其他菌属有效区分, 具有良好特异性。

根据 dHPLC 出峰数量、出峰时间、峰面积, 可将 89 株沙门菌分为 12 个 dHPLC 型 (D 型)。其中具有 D1 特征峰菌株 30 株, D2 特征峰菌株 24 株, D3 特征峰菌株 5 株, D4 特征峰菌株 6 株, D5 特征峰菌株 2 株, D6、D7、D8 特征峰菌株各 3 株, D9 特征峰菌株 1 株, D10 特征峰菌株 5 株, D11 特征峰菌株 6 株, D12 特征峰菌株 1 株。具有 D1 和 D2 特征峰的菌株共 54 株, 占 67.67%, 表明沙门菌属中, 这 2 个 D 型占多数。

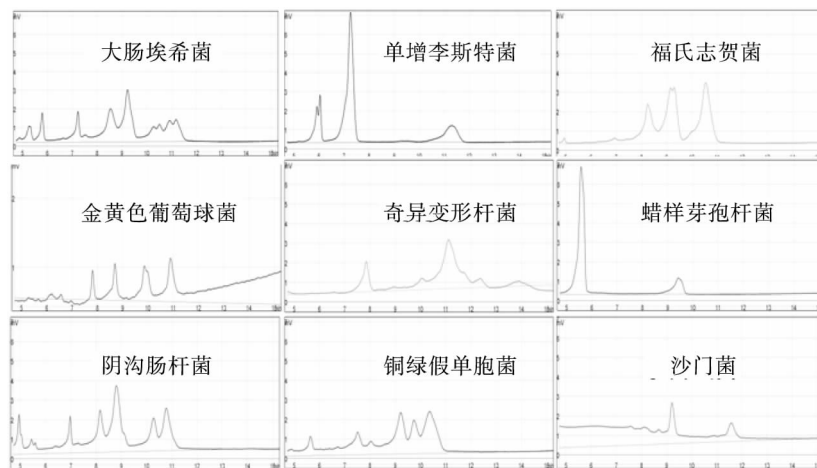


图2 沙门菌及对照菌株 dHPLC 色谱图

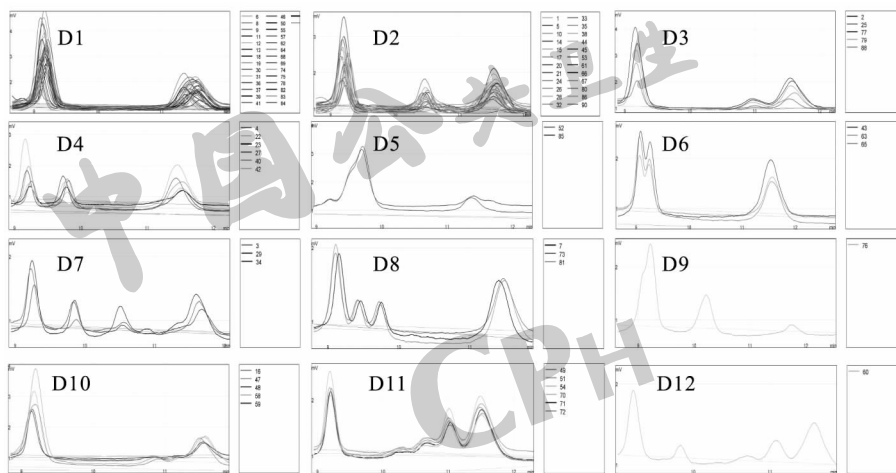


图3 89 株沙门菌 dHPLC 分型色谱图

2.3 与血清学和生化学分型比较 (1) 89 株沙门菌分为 47 个血清型(有 5 株菌株血清学实验结果未得出明确结果, 归为 1 个型, 即其他型)。其中鼠伤寒沙门菌 9 株, 猪霍乱沙门菌 9 株, 豪顿沙门菌 5 株, 亚利桑那沙门菌 4 株, 汤卜逊沙门菌 3 株, 其余菌株分散于 42 个血清型中。可分为 7 个群, 其中 A 群 3 株, B 群 15 株, C 群 40 株, D 群 12 株, E 群 7 株, F 群 1 株, 其他群 11 株。与 dHPLC 基因分型结果比较, 7 个群分别分布在: A 群 - D1、D3 型; B 群 - D1、D2、D4、D7、D10 型; C 群 - 除 D4、D6、D9 外的 9 个 D 型; D 群 - D1、D2、D3、D4、D9、D11 型; E 群 - D1、D2、D6 型; F 群 - D1 型; 其他群 - D2、D4、D6 3 个 D 型。表明 2 种分型结果差异很大, 菌株分布没有对应关系。(2) 89 株沙门菌中, 生化学鉴定分为 6 个群, 生化群 I 76 株; 生化群 VI 2 株; 疑似生化群 I 氰化钾阳性 6 株; 疑似生化群 I 卫矛醇阴性 4 株; 1 株沙门菌(76 号) 生化结果为“卫矛醇阳性, 山梨醇阴性, 水杨苷阳性, ONPG 阳性, 丙二酸盐阳性, 氰化钾阳性”, 标准中无对应生化群, 列为其他。与 dHPLC 分型结果比较, 2 种分型结果有一定差异, 生化群 VI

的 2 株菌分属于 D1、D5 型; 也有一定一致性, 76 号菌株单独为 D9 型, 疑似生化群 I 卫矛醇阴性的 4 株均为 D1 型。

3 讨论

本研究结果显示, dHPLC 图谱分析 ITS 序列比电泳图谱更为灵敏、清晰、稳定。如 2 号、4 号菌株的电泳图谱均可见到清晰的 2 个条带及模糊的 1 个条带, dHPLC 图谱清晰显示 2 株菌均有 3 个信号峰出现, 但有 1 个信号峰的保留时间不同, 据此分为不同的 D 型, 表明 dHPLC 适合用于沙门菌属内分型分析。

本研究中, DNA 模板提取耗时约 20 min, 片段扩增耗时不足 1 h, 样品的 dHPLC 分析过程约 15 min, 因此, 本方法从提取 DNA 模板到 dHPLC 分析出峰时间约需 2 h, 具有快速的特点。其中 DNA 模板制备、片段扩增过程均可一次完成 96 个样品, dHPLC 分析也可连续进行上百个样品分析。因此, 本方法具有高通量的特点。采用水煮法提取 DNA 模板, 操作非常简便, 无需特殊仪器设备, 片段扩增和 dHPLC 分析均由全自动分析仪器完成, 可见本方

法具有操作简便和自动化特点。DNA 模板提取、片断扩增所用分子生物学试剂, dHPLC 分析所需流动相均为普通试剂, 价格低廉。其中 PCR 和 dHPLC 分析结果稳定, 重复性好。表明本研究建立的沙门菌 PCR-dHPLC 精细基因分型方法具备快速、操作方便、重复性好、成本低廉、高通量和自动化的特点^[10-11]。与传统的血清学及生化学表型分型方法比较存在差异, 但也有一定的一致性, 可作为原有分型方法的补充。对于 PCR-dHPLC 分型结果的流行病学意义有待进一步研究。

参考文献

[1] 蒋原. 食源性病原微生物检测指南[M]. 北京: 中国标准出版社 2010: 50-57.
 [2] 张代涛, 阚飙. 沙门菌属分子分型技术研究进展[J]. 中国人兽共患病学报 2009 25(5): 465-468.
 [3] Xiao WJ, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review[J]. Hum Mutat 2001, 17(6): 439-474.
 [4] 李莉, 王翀, 陈瑶生. DHPLC 系统工作原理及其应用[J]. 生物

技术通报 2006(增刊): 120-124.
 [5] Li X, Evans J, Ling T, et al. Rapid genotyping of CTX-M extended-spectrum β -lactamases by denaturing high performance liquid chromatography [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007 51(4): 1446-1454.
 [6] 傅君芬, 卢美萍, 尚世强, 等. 16S-23S rRNA 基因区细菌鉴定实验研究[J]. 浙江大学学报: 医学版 2002 31(6): 448-452.
 [7] Raheb J, Khoshroo H, Azimi A, et al. Isolation and characterization of a new acidothiothiobacillus ferrooxidans from the Aliabad Copper Mine in Yazd using 16s-23s spacer gene nucleotide sequencing method[J]. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran, 2007, 18(3): 209-213.
 [8] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Res, 1980 8(19): 4321-4325.
 [9] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.4-2008 食品卫生微生物学检验沙门氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社 2008.
 [10] 黄晓蓉, 邵碧英, 王传得, 等. 霍乱弧菌多重 PCR-DHPLC 分型方法建立[J]. 中国公共卫生 2009 25(6): 721-722.
 [11] 王耀, 曹际娟, 王顺芝, 等. 食品绵羊李斯特菌 PCR-DHPLC 快速检测[J]. 中国公共卫生 2009 25(7): 816-817.

收稿日期: 2011-02-14

(孔繁学编辑 郑新校对)

• 检验技术 •

中药材中 5 种重金属含量 ICP-MS 法测定*

陆秋艳¹, 余艳明², 傅武胜¹

关键词: 微波消解; 碰撞反应池电感耦合等离子体质谱法; 重金属; 中药材

中图分类号: R 115

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)11-1518-02

中药材中重金属含量超标已成为影响传统中药走向世界的重要问题。近年来, 电感耦合等离子体质谱法(inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS) 越来越受到重视, 该方法在中药微量元素分析中已被广泛应用^[1-3]。采用四极杆型电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS) 配合八极杆碰撞/反应池(collision/reaction cell octopole reaction system, ORS) 消干扰技术则可以很好地消除复杂的中药基体干扰^[4], 准确地测定中药材中多种重金属元素含量。本实验采用微波消解, ORS/ICP-MS 法对福建产泽泻、薏苡、乌梅、绞股蓝 4 种中药材中铅、镉、砷、铜、镍 5 种重金属元素含量进行测定, 建立中药材中 5 种重金属元素的检测方法, 为福建中药材的检测和安全性评价提供一个可靠的技术手段。

1 材料与方法

1.1 仪器 Agilent 7500cx ICP-MS(美国 Agilent 公司); 微波消解系统(上海新拓公司); Direct-Q 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司); BSA 224S 电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试剂 含 10 $\mu\text{g/mL}$ 的镍、铜、砷、镉、铅的多元素混合物标准溶液, 含 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 Li、Mg、Y、Ce、Tl、Co 的质谱调谐液, 含 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 Sc、Ge、Rh、Bi 的内标溶液(美国 Agilent 公司); HNO_3 (优级纯, 德国 Merck 公司)、 H_2O_2 (优级纯, 上海国药); 超纯水(电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega$); 国家标准参考物茶叶(GBW10016 GSB-7, 国家地矿部物化探研究所)^[5]。

1.3 样品来源 所用的药材均购于本地药店, 药材经福建中医药大学药学院吴锦忠教授鉴定, 包括泽泻 [*Alisma orientalis*(Sam.) Juzep.], 绞股蓝 [*Gynostemma pentaphyllum*(Thunb.) Mak.], 薏苡 [*Coix lacrymosa-jobi* L. var. *ma-yuen*(Roman.) Stapf.], 乌梅 [*Prunus mume*(Sieb.) Sieb. et Zucc.]。

1.4 ICP-MS 测定工作条件 射频功率 1 500 W,

* 基金项目: 福建省科技计划重点项目(2008Y0029)

作者单位: 1. 福建省疾病预防控制中心理化科, 福州 350001; 2. 泉州医学高等专科学校

作者简介: 陆秋艳(1981-), 女, 江苏靖江人, 技师, 硕士, 主要从事卫生检验工作。

通讯作者: 傅武胜, E-mail: fwsfqm@126.com