

论著

六种血清型沙门菌 PFGE 指纹图谱研究

王颖 顾其芳 刘诚 周培君 张美英
(上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

摘要:目的 用 PFGE 方法绘制不同血清型的沙门菌指纹图谱,并且进行同源性分析。方法 首先将从食品中检测出 6 中不同血清型的沙门菌菌株制成琼脂模块,再提取菌株的 DNA,用限制性内切酶 Xba I 对细菌 DNA 进行酶切,用 Bio-rad CHEP MAPPER 绘制出菌株的 PFGE 指纹图谱,最后用 Quantity One™ 图像分析软件进行同源性分析。结果 所有的菌株的同源性均用相似性系数(矩阵)和百分数表示。结论 用 PFGE 绘制菌株的指纹图再用 Quantity One™ 图像分析软件进行分析,是确定食源性致病菌沙门菌同源性的一种有效的方法。

关键词:沙门氏菌属;电泳,凝胶,脉冲场;基因,同源盒;细菌学技术

Study on fingerprint of Six strains of Salmonella Using PFGE

WANG Ying, GU Qi-fang, LIU Cheng, ZHOU Pei-jun, ZHANG Mei-ying

(Shanghai Municipal Center for Disease Prevention and Control, Shanghai 200336, china)

Abstract: Objective To draw the fingerprint of Salmonella of different serotypes by PFGE, for researching their source. **Method** Six different serotypes of Salmonella were made into plugs first. Then pure DNA was obtained with proteinase K and cut DNA using restriction enzyme Xba I. Fingerprint was produced using Chef Mapper (Bio-Rad). Finally, the source of these strains were analyzed using the software-Quantity One™. **Results** The source of all strains were expressed in similarity coefficient and percentage. **Conclusion** PFGE is a very useful method to analyze the source of bacteria causing foodborne diseases.

Key word: Salmonella; Electrophoresis, Gel, Pulsed-Field; Genes, Homeobox; Bacteriological Techniques

由沙门菌所致的食物中毒,在国内外都是严重的问题。引起食物中毒的沙门菌型很多,如鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌等^[1],我们实验室从食品中检测到多种血清型的沙门菌,现对其中 6 种进行 PFGE 指纹图谱的绘制和分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株的血清型 鼠伤寒沙门菌 O_{1,4,5}:H_{4,2} (A)、科特布斯沙门菌 O₈:H_{c,h,5} (B)、肠炎沙门菌

O_{1,9}:H_{g,m} (C)、汤卜逊沙门菌 O₇:H_{k,5} (E)、阿贡纳沙门菌 O_{1,4}:H_{f,g,5} (F)、伦敦沙门菌 O₁₀:H_{i,v,6} (H)。括号中为菌株代号。

菌株的分离来源与年代见表 1。

1.1.2 试剂 营养琼脂(上海市疾病预防控制中心培养基室),CSB (EDTA, Tris - HCL)、CLB (EDTA, Tris - HCL, 十二烷基肌氨酸钠) Sigma 公司, TE Buffer (10 ml 1 mol Tris - HCl pH 7.6, 2 ml 0.5 mol EDTA pH 7.6 加蒸馏水至 1 000 ml)、十二烷基肌氨酸钠 (Sigma 公司),蛋白酶 K(默克公司),限制性内切酶

[9] RUDNICKA W. The host response to *Listeria monocytogenes* mutants defensive in genes encoding phospholipases C (plcA, plcB) and actin assembly (act) [J]. *Microbiol, Immunol*, 1997; 41 (11): 847-853.

[10] ZENEWICZ L A, SKINNER J A, COLDFINE H, et al. *Listeria monocytogenes* virulence proteins induce surface expression of Fas ligand on T lymphocytes [J]. *Mol Microbiol*, 2004, 51 (5): 1483-1492.

[11] JAVIER A, CARRERO, BORIS C, et al. Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule [J]. *The Journal*

of immunology, 2004, 172: 4866-4874.

[12] SHAYNOOR D, PASCALE C. Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2002, 156 (6): 943-946.

[13] PULSENET USA CDC. Section 5. 3 Standardized protocol for molecular subtyping of *Listeria monocytogenes* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [Z]. 2004. 4.

[收稿日期:2006-10-20]

中图分类号:R15;Q939.122;R378.994 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2007)01-0021-05

作者简介:王颖 女 副主任技师

表1 菌株的来源与年代

菌株编号	样品来源	年代	菌株编号	样品来源	年代
A1	鸭肉	2003	E1	猪肉	2003
A2	乌骨鸡	2003	E2	猪肉	2003
A3	牛肉	2005	E3	小黄鱼	2003
B1	草鸭	2003	E4	黄鱼段	2003
B2	羊肉片	2003	E5	蔬菜	2005
B3	鸭肉	2005	F1	猪肾	2004
B4	牛肉	2005	F2	猪舌	2004
B5	蔬菜	2005	F3	猪肝	2004
C1	鸡翅	2003	F4	猪肉	2004
C2	鸡肉	2003	F5	猪肝	2005
C3	鸡翅	2003	H1	猪腰	2004
C4	鸡翅	2005	H2	牛肉馅	2003
C5	鸡腿	2005	H3	鸭肉	2005
C6	鸡翅	2005	H4	猪肝	2005

Xba^I :浓度为 80 U/模块 (Promega 公司), Agarose prep,浓度为 1.2 % (Pharmacia 公司), 跑胶用琼脂粉,浓度为 1.0 % (BIO - RAD 公司), 10 ×TBE(BIO - RAD 公司),蒸馏水,EB 染色。

1.1.3 仪器 水浴摇床及水浴箱 (37 ~ 54 ℃)、CHEP MAPPER 脉冲凝胶电泳仪、凝胶成像系统及 Quantity OneTM分析软件 (BIO - RAD 公司), VITEK 比浊仪 (法国生物梅里埃公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌株 DNA 的制备提纯和酶切 分别将各血清型的纯菌株于营养琼脂斜面培养,37 ℃ 18 ~ 24 h,悬浮于细胞悬浮液中,用 VITEK 比浊仪调节 A 值至 3.6 ~ 4.5。与等量的 Agarose prep 混合,制成含菌模块,用蛋白酶 K 提纯细菌的 DNA,54 ℃ 水浴摇床 1 ~ 2 h,再用蒸馏水和 TE Buffer 于 50 ℃ 反复洗涤模块,然后用限制性内切酶 Xba^I 将细菌 DNA 进行酶切,条件为 37 ℃ 3 ~ 5 h,酶切后模块保存在 0.5 × TBE 中。

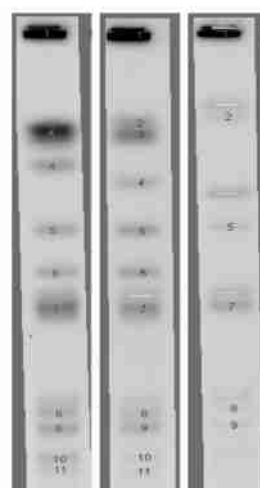
1.2.2 菌株 PFGE 指纹图谱的绘制 将酶切后的胶块 (2 mm 厚) 放置于 15 孔胶梳上,用 CHEP MAPPER 脉冲凝胶电泳仪电泳,条件设置为:3 ~ 60 s,19 h,温度为 12 ℃,电压为 6 V,线性程序,初始电流为 300 mA 以下。电泳结束后用 EB 染色 30 ~ 45 min,然后用蒸馏水脱色 1 h。

1.2.3 成像及图谱的分析 在 UV 条件下用凝胶成像系统拍摄染色后的 DNA 条带,得到 PFGE 指纹图谱。成像后,用 Quantity OneTM 软件分析得到的 PFGE 指纹图谱,首先选择需要比较的条带,调节对比度并反转图像,确定泳道。先进行自动对比,然后人工确认,最后在“report”菜单下进行条带的比较,以百分数和矩阵形式表示条带的相似度。

2 结果

图 1 ~ 图 6 是 6 中不同血清型的沙门菌的 PFGE

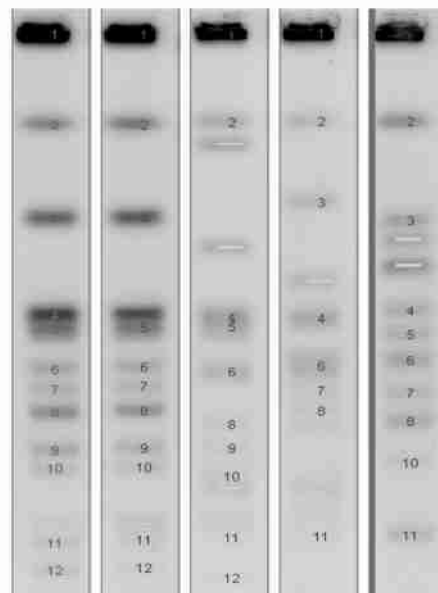
指纹图谱以及用 Quantity OneTM软件分析得到数据。



	1	3	2
	100.0%	85.4%	53.7%
Lane 1	100.0%	53.7%	85.4%
2	53.7%	100.0%	62.4%
3	85.4%	62.4%	100.0%

Lane 1: A1, Lane 2: A2, Lane 3: A3

图 1 3 株鼠伤寒沙门菌 PFGE 指纹图谱以及用 Quantity OneTM软件分析得到的数据



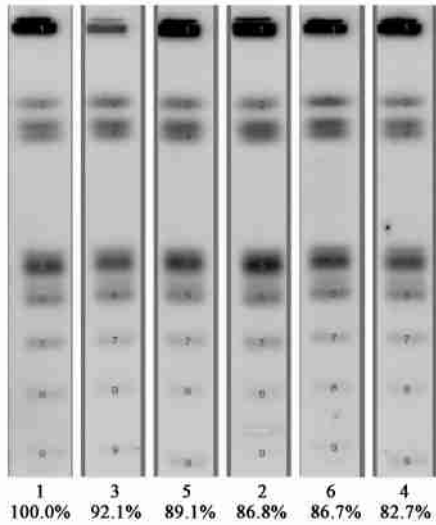
	1	3	6	5	2
	100.0%	93.3%	72.2%	66.9%	62.8%
Lane 1	100.0%	62.8%	93.3%	66.9%	72.2%
2	62.8%	100.0%	62.8%	49.6%	57.0%
3	93.3%	62.8%	100.0%	65.2%	70.7%
5	66.9%	49.6%	65.2%	100.0%	65.5%
6	72.2%	57.0%	70.7%	65.5%	100.0%

Lane1: B1, Lane2: B2, Lane3: B3, Lane5: B4, Lane6: B5

图 2 5 株科特布斯沙门菌 PFGE 指纹图谱以及用 Quantity OneTM软件分析得到的数据

3 讨论

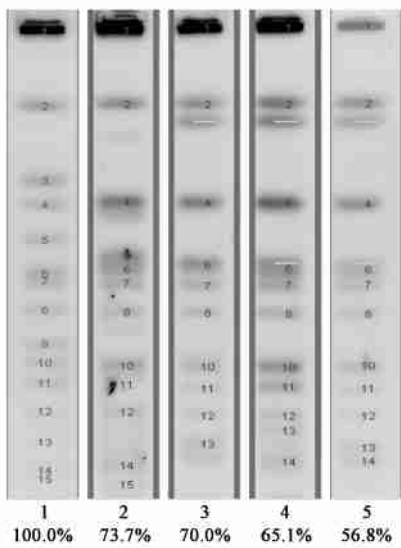
3.1 根据图 1 的分析结果—相似性系数 (矩阵) 和



Lane	1	2	3	4	5	6
1	100.0%	86.8%	92.1%	82.7%	89.1%	86.7%
2	86.8%	100.0%	85.8%	85.6%	90.6%	86.8%
3	92.1%	85.8%	100.0%	78.3%	87.8%	87.4%
4	82.7%	85.6%	78.3%	100.0%	87.3%	82.0%
5	89.1%	90.6%	87.8%	87.3%	100.0%	92.0%
6	86.7%	86.8%	87.4%	82.0%	92.0%	100.0%

Lane1 : C1 , Lane2 : C2 , Lane3 : C3 , Lane4 : C4 , Lane5 : C5 , Lane6 : C6

图 3 6 株肠炎沙门菌 PFGE 指纹图谱以及用 Quantity One™ 软件分析得到的数据

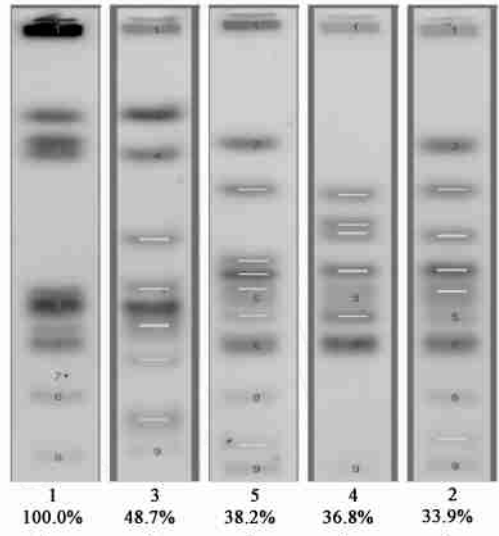


Lane	1	2	3	4	5
1	100.0%	73.7%	70.0%	65.1%	56.8%
2	73.7%	100.0%	71.8%	73.8%	69.6%
3	70.0%	71.8%	100.0%	73.5%	65.4%
4	65.1%	73.8%	73.5%	100.0%	84.0%
5	56.8%	69.6%	65.4%	84.0%	100.0%

Lane1 : E1 , Lane2 : E2 , Lane3 : E3 , Lane4 : E4 , Lane5 : E5

图 4 5 株汤卜逊沙门菌 PFGE 指纹图谱以及用 Quantity One™ 软件分析得到的数据

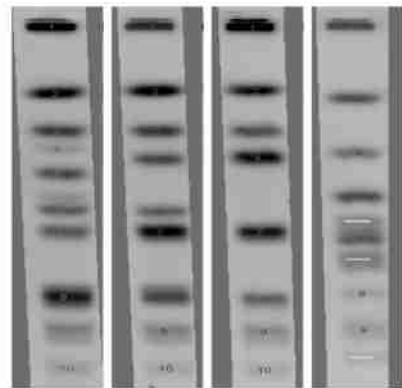
百分数可见 ,A1 和 A3 的相似度 80 % ,为 85.4 % ,故认为他们的遗传基因紧密相关 ,流行病学上可能



Lane	1	2	3	4	5
1	100.0%	33.9%	48.7%	36.8%	38.2%
2	33.9%	100.0%	36.5%	62.2%	80.0%
3	48.7%	36.5%	100.0%	43.9%	33.3%
4	36.8%	62.2%	43.9%	100.0%	58.7%
5	38.2%	80.0%	33.3%	58.7%	100.0%

Lane1 : F1 , Lane2 : F2 , Lane3 : F3 , Lane4 : F4 , Lane5 : F5

图 5 5 株阿贡纳沙门菌 PFGE 指纹图谱以及用 Quantity One™ 软件分析得到的数据



Lane	1	2	3	4
1	100.0%	81.6%	75.1%	53.3%
2	81.6%	100.0%	88.3%	68.6%
3	75.1%	88.3%	100.0%	65.5%
4	53.3%	68.6%	65.5%	100.0%

Lane1 : H1 , Lane2 : H2 , Lane3 : H3 , Lane4 : H4

图 6 4 株伦敦沙门菌 PFGE 指纹图谱以及用 Quantity One™ 软件分析得到的数据

密切相关。两者与 A2 的相似度分别 75 % ,故认为两者与 A2 之间遗传基因不紧密相关 ,流行病学上相关程度低或不相关^[2]。

根据图 2 的分析结果—相似性系数(矩阵)和百分数可见 ,B1 和 B3 的相似度 80 % ,为 93.3 % ,故认为他们的遗传基因紧密相关 ,流行病学上可能密切相关 ,其他菌株之间的相似度均 80 %。

论著

奶制品及反刍动物肉类食物中 n - 11 位反式脂肪酸含量研究

王春荣¹ 马雪征² 张 坚¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050; 2. 加拿大圣玛丽大学,加拿大)

摘要:目的 检测部分奶制品和牛、羊肉类食品中反式脂肪酸含量,为评估我国居民膳食中反式脂肪酸摄入量提供基础数据。方法 采集奶油、鲜奶、酸奶、奶粉及配方奶粉,不同部位牛、羊肉制品等食物样品 56 件。应用气相色谱结合银离子薄层层析方法测定样品中反式油酸含量。结果 以牛奶为原料加工生产的奶油样品含有 n - 11 反式油酸,以植物油为原料的奶油制品不含反式脂肪酸。酸奶中含 n - 11 反式油酸,奶饮料中脂肪含量很低,未检测出反式脂肪酸。两种奶酪、纯奶粉、多数配方奶粉及多数牛、羊肉类食物样品中含有 n - 11 反式油酸。所有样品均不含 n - 9 反式油酸。结论 鲜奶、纯奶粉、牛羊肉类食品及多数奶其制品中含 n - 11 反式油酸。不同部位的牛羊肉类食品,不同品牌的奶制品的 n - 11 反式油酸存在较大差异。

关键词:乳制品;反刍动物;肉制品;脂肪酸类,不饱和

根据图 3 的分析结果——相似性系数(矩阵)和百分数可见,6 个菌株之间的相似度均 80%,故认为他们的遗传基因紧密相关,流行病学上可能密切相关。

根据图 4 的分析结果——相似性系数(矩阵)和百分数可见,E4 和 E5 的相似度 80%,为 84.0%,故认为两者的遗传基因紧密相关,流行病学上可能密切相关,其他菌株之间的相似度均 80%。

根据图 5 的分析结果——相似性系数(矩阵)和百分数可见,F2 和 F5 的相似度 80%,为 80.8%,故认为两者的遗传基因紧密相关,流行病学上可能密切相关,其他菌株之间的相似度均 80%。

根据图 6 的分析结果——相似性系数(矩阵)和百分数可见,H₁ 和 H₂ 之间以及 H₂ 和 H₃ 之间的相似度 80%,故认为他们的遗传基因紧密相关,流行病学上可能密切相关。而 H₁ 和 H₃ 之间以及 H₁ 与 H₁、H₂、H₃ 之间的相似度均 80%。

图中这些遗传基因紧密相关的菌株之间的年代的相关性很差。这有可能与菌株的数量较少,代表性不够全面有关。

3.2 沙门菌是全球范围内普遍存在的、引起人类食源性疾病的病原菌,为适应全球沙门菌的监测与交流网络的需求,WHO、丹麦兽医实验室(DVL)、美国 CDC 于 2001 年共同组建了世界卫生组织全球沙门菌监测网(WHO GSS),以提高国家机构对食源性疾病和食源性致病菌的监测能力,有助于加强全球性的食源性疾病和食源性致病菌的监测与交流。近年来,各

中图分类号:R15;R117;R378.22 文献标识码:A

国政府及相关技术部门纷纷发展和运用高新技术,建立和完善各自的食源性致病菌及食源性疾病的检测系统和预警系统,主要有 Enter - Net、PulseNet、FoodNet、NARMS 和 PHILIS 等等,他们都是监测包括沙门菌在内的各种食源性致病菌的监测网络,中国已经加入了世界卫生组织全球沙门菌监测网^[3]。

3.3 我国已经建立全国性的食源性检测网,沙门菌是其中一个重要的监测项目,PFGE 分型技术和同源分析技术是其中一个非常关键的要素,他可以确定散发病例之间的病原关系,并可以即时确认和处理在大范围内、呈散发特征的爆发事件,在沙门菌等食源性致病菌的爆发事件中,在确定原因食品、追踪传播途径、确定流行范围等流行病学调查中发挥着关键作用^[4]。

随着我国食源性疾病监测网的不断完善和检测水平的提高,监测网中的数据会日益丰富和完整。这一网络对提高我国人民的生活质量和健康水平将会有越来越大的贡献。

参考文献

- [1] 孟昭赫. 食品卫生检验方法注解微生物学部分[M]. 北京:人民卫生出版社,1990.
- [2] 李燕俊,赵熙,杨宝兰. 肠炎沙门菌脉冲凝胶电泳分型研究[J]. 卫生研究,2005,4(3):338-340.
- [3] 冉陆. 世界卫生组织全球沙门菌监测网 2001 - 2005 年规划简介[J]. 中国食品卫生杂志,2001,13(5):44-46.
- [4] 冉陆. 食源性致病菌及食源性疾病的监测动态[J]. 中国食品卫生杂志,2001,13(4):42-44.

[收稿日期:2006 - 10 - 20]

文章编号:1004 - 8456(2007)01 - 0025 - 04

基金项目:达能营养与宣教基金(2003 - 12)

作者简介:王春荣 女 副主任技师

通讯作者:张坚 男 研究员

