

论著

红河州食源性蜡样芽胞杆菌毒力基因研究

倪刚,倪文玲,沈静华,何美红,吴春梅,李青,周涛

(红河州疾病预防控制中心,云南 蒙自 661199)

摘要:目的 了解红河州食源性蜡样芽胞杆菌毒力基因的携带情况,为食源性食物中毒的防治提供参考依据。方法 采用PCR方法对2011年1月至2014年9月红河州收集到的31株食源性蜡样芽胞杆菌10种毒力基因进行检测。结果 分离菌株普遍携带肠毒素毒力基因并且所有菌株均至少携带一种肠毒素基因,而呕吐型毒力基因只有一株菌携带。结论 红河州食源性蜡样芽胞杆菌基因携带以腹泻型为主,且携带率较高,对食品安全和公共健康存在潜在威胁。

关键词:蜡样芽胞杆菌;食源性致病菌;毒力基因;食品安全;红河州

中图分类号:R155.5;S852.61⁺6 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)05-0499-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.05.003

Analysis of foodborne *Bacillus cereus* virulence gene in Honghe prefecture

NI Gang, NI Wen-ling, SHEN Jing-hua, HE Mei-hong, WU Chun-mei, LI Qing, ZHOU Tao

(Honghe Prefecture Center for Diseases Control and Prevention, Yunnan Mengzi 661199, China)

Abstract: Objective To understand the status of foodborne *Bacillus cereus* virulence genes in Honghe prefecture.

Methods Ten virulence genes of *Bacillus cereus* which were collected from Jan 2011 to Sep 2014 in Honghe prefecture were detected by polymerase chain reaction. **Results** The strains of *Bacillus cereus* generally carried enterotoxin gene. All of the strains carried at least one enterotoxin gene. Only one strains carried emetic toxin gene. **Conclusion** Foodborne *Bacillus cereus* in Honghe prefecture might have strong pathogenicity, posing a potential food safety and public health threat.

Key words: *Bacillus cereus*; foodborne disease; virulence gene; food safety; Honghe prefecture

蜡样芽胞杆菌为革兰阳性产芽胞的大杆菌,是一种常见的食源性致病菌。世界卫生组织之前的一份报告显示^[1],蜡样芽胞杆菌是巴氏杀菌食品中最常见的食源性细菌。根据2008年我国突发公共卫生事件报告管理信息系统统计,我国细菌性食物中毒中由蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒在发生起数和发病人数方面均居前三位^[2]。蜡样芽胞杆菌是条件致病菌,偶尔能导致人的眼部感染,甚至心内膜炎、脑膜炎和菌血症等疾病,但常见的是导致两种不同类型的食物中毒:腹泻型和呕吐型^[3]。蜡样芽胞杆菌产生5种不同的肠毒素和一种呕吐毒素。5种肠毒素包括2个三元毒素:溶血素(hbl)和非溶血肠毒素(nhe);以及3个单一基因产物:细胞毒素K(cytK)、肠毒素FM(entFM)和肠毒素T(bceT)^[3-4];呕吐毒素cereulide是一种十二肽环状毒素对热和酸稳定,由非核糖

体多肽合成酶(NPRS)所合成^[5]。本试验采用PCR方法对2011年1月到2014年9月从红河州分离到的31株蜡样芽胞杆菌先进行种基因(*gyrB*)的复核再进行各项毒力基因检测。以便掌握红河州蜡样芽胞杆菌的分子流行病学特征,为其引起的食源性疾病的预防和治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

从155份米面制品和52份奶粉中分离到31株蜡样芽胞杆菌。蜡样芽胞杆菌(CCTCC 93038) [(ATCC 14579)类似株]、(FSCC 115001) [CMCC (B)63301类似株]作为基因扩增阳性对照菌株。(CCTCC 93038)购于中国典型培养物菌种保藏中心,(FSCC 115001)购于广东省食品微生物安全工程技术研究开发中心。

1.1.2 主要仪器与试剂

Del-Doc 凝胶成像系统、PCR 扩增仪 (MJ RESEARCH PTC-200, ABI 2720 Thermal cycler)、电

收稿日期:2015-05-13

作者简介:倪刚 男 主管技师 研究方向为微生物检测

E-mail:nigangng@163.com

泳仪均购自美国 Bio-Rad, 生物安全柜(美国 Thermo), 恒温培养箱, 高速离心机, 显微镜。

甘露醇多粘菌素培养基(MYP)等蜡样芽胞杆菌生化试剂(北京陆桥技术有限责任公司), PCR 反应体系和 DNA 分子量标准均购自宝生物工程(大连)有限公司, PCR 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 蜡样芽胞杆菌分离鉴定

分离及鉴定方法参照 GB/T 4789.14—2003 《食品卫生微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》^[6] 进行。

1.2.2 蜡样芽胞杆菌 DNA 提取

挑取 1~2 个菌落至装有 1 ml 0.85% 灭菌生理盐水的 Eppendorf 管内, 混匀。4~8 ℃, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液。沉淀加入 100 μl 灭菌去离子水, 混匀。100 ℃ 水浴加热 12 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液作为 PCR 扩增模板, -20 ℃ 冻存备用。

1.2.3 PCR 引物序列及产物片段大小

蜡样芽胞杆菌的种基因(DNA topoisomerase II 的 *gyrB*)引物是参照 GenBank 序号为 AB190226.1 序列, 利用 NCBI 在线软件 primer-blast 设计, 其他引物序列参照相关参考文献, 具体见表 1。

表 1 目标基因引物序列、浓度及产物片段大小

Table 1 Primer sequence for this study

目的基因	引物序列(5'-3')	产物片段大小/bp
<i>gyrB</i>	F:GCACGTGTAGCTGCGAAAAA	464
	R:TAAACAATGGCGGCTGTGC	
<i>hblA</i> ^[4]	F:GCAAAATCTATGAATGCCTA	884
	R:GCATCTGTTCTAATGTTTT	
<i>hblC</i> ^[4]	F:CCTATCAATACTCTCGCAA	695
	R:TTTCCTTTGTTATACGCTGC	
<i>hblD</i> ^[4]	F:GAAACAGGCTCATATTTT	1 018
	R:CTGCATCTTTATGAATATCA	
<i>nheA</i> ^[4]	F:TAAGGAGGGGCAAACAGAAG	759
	R:TGAATGCCAAGAGCTGCTTC	
<i>nheB</i> ^[4]	F:CAAGCTCCAGTTCATGCGG	935
	R:GATCCATTGTGTACCATTG	
<i>nheC</i> ^[4]	F:ACATACCTTTTGCAGCAGAAC	618
	R:CCACCAGCAATGACCATATC	
<i>cytK</i> ^[4]	F:CGACGTCACAAGTTGTAACA	565
	R:CGTGTGTAAATACCCAGTT	
<i>entFM</i> ^[4]	F:GTTTCGTTCAAGTGTGTTAC	486
	R:AGCTGGGCTGTACGTAATT	
<i>bceT</i> ^[7]	F:TTACATTACCAGGACGTGCTT	427
	R:TGTTTGTGATTGTAATTCAGG	
<i>NPRS</i> ^[5]	F:GACAAGAGAAATTTCTACGAGCAAAGTACAAT	635
	R:GCAGCCTTCCAATTACTCCTTCTGCCACAGT	

1.2.4 PCR 反应体系及反应温度(见表 2、3)

表 2 PCR 反应体系

Table 2 PCR reaction system

目的基因	PCR buffer	dNTPs / (μmol/L)	MgCl ₂ / (mmol/L)	Taq 酶 /U	引物浓度 / (μmol/L)	模板 /μl
<i>gyrB</i>	1 ×	200	1.5	1	0.5	2
<i>hblA</i>	1 ×	200	1.5	1	0.4	2
<i>hblC</i>	1 ×	200	1.5	1	0.4	2
<i>hblD</i>	1 ×	200	1.5	1	0.4	2
<i>nheA</i>	1 ×	200	1.5	1	0.2	2
<i>nheB</i>	1 ×	200	1.5	1	0.2	2
<i>nheC</i>	1 ×	200	1.5	1	0.2	2
<i>cytK</i>	1 ×	200	1.5	1	0.15	2
<i>entFM</i>	1 ×	200	1.5	1	0.04	2
<i>bceT</i>	1 ×	200	1.5	1	0.50	2
<i>NPRS</i>	1 ×	200	1.5	1	0.05	2

表 3 PCR 反应程序

Table 3 PCR reaction program

目的基因	步骤	温度/℃	时间/s	循环数
<i>gyrB</i>	1	95	300	1
	2	95	45	
	3	60	60	30
	4	72	60	
	5	72	300	1
<i>hblACD</i> <i>nheABC</i> <i>cytK</i>	1	95	300	1
	2	95	45	
	3	54	60	30
	4	72	120	
	5	72	300	1
<i>bceT</i>	1	94	180	1
	2	94	40	
	3	55	40	30
	4	72	60	
	5	72	300	1
<i>NPRS</i>	1	95	300	1
	2	95	30	
	3	60	30	30
	4	72	60	
	5	72	300	1

1.2.5 PCR 产物分析

取 5 μl PCR 反应产物上样至 1.5% 的琼脂糖凝胶于 70 V 电泳 2.5 h, Del-Doc 凝胶成像系统观察并拍照记录结果。对模糊条带结果进行重复检测以保证结果的可靠性。

2 结果

2.1 *gyrB* 基因检出情况

31 份样品中, 28 份检出 *gyrB* 阳性, 3 份阴性。其中 21 份来源于米面制品, 7 份来源于乳粉。

2.2 毒力基因检出情况

28 份 *gyrB* 阳性样品中 *nheC* 基因检出率最高为 100%, *NPRS* 基因检出率最低为 3.6%, 具体见表 4。根据每份样品的毒力基因携带情况可以将其分为 7 群, 具体见表 5。

表4 毒力基因检出情况(n=28)

Table 4 Detection of virulence genes

目标基因	检出数/份	检出率/%
<i>hblA</i>	14	50.0
<i>hblC</i>	14	50.0
<i>hblD</i>	14	50.0
<i>nheA</i>	26	92.9
<i>nheB</i>	27	96.4
<i>nheC</i>	28	100.0
<i>cytK</i>	19	67.9
<i>entFM</i>	27	96.4
<i>bceT</i>	18	64.3
<i>NPRS</i>	1	3.6

表5 毒力基因群分布

Table 5 Distribution of virulence genes

来源	阳性数	群1	群2	群3	群4	群5	群6	群7
米面制品类	21	8	1	2	8	1	0	1
乳粉类	7	5	0	0	1	0	1	0
合计	28	13	1	2	9	1	1	1
	(100%)	(46.4%)	(3.6%)	(7.1%)	(32.1%)	(3.6%)	(3.6%)	(3.6%)

注:群1:携带有 *hblACD*、*nheABC* 基因及 *cytK*、*bceT*、*entFM* 基因;群2:携带有 *hblACD*、*nheABC*、*entFM* 基因及 *cytK*、*bceT* 两者之一;群3:携带有 *nheABC* 基因及 *bceT*、*cytK*、*entFM* 基因;群4:携带有 *nheABC* 基因以及 *bceT*、*cytK*、*entFM* 基因中的一个或两个;群5:携带有 *NPRS* 以及 *nheABC*、*entFM* 基因;群6:携带有 *nheBC* 基因及 *entFM* 基因;群7:只携带有 *nheC* 基因;括号内百分数为各群所占总数的百分率

菌 DNA 的转录和复制很重要。因不显现频繁的基因横向转移并且基于该序列的分析与 DNA 杂交同源性分析有较好的一致性近年来常被选用于细菌系统发育分析及细菌鉴定^[8]。利用 PCR 的方法对 *gyrB* 基因进行扩增可以将形态与生化特性以及 16S rRNA 都极其相近的蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌快速地进行区分鉴定^[9]。这相对于传统鉴定方法缩短了检测时间并提高了检测效率。

仅从检出蜡样芽胞杆菌的样品检出情况来看,米面制品的检出率为 13.5% (21/155),乳粉类的检出率为 13.5% (7/52),两者的检出率基本相同。从毒力基因的检出来看,腹泻型毒素基因普遍存在于蜡样芽胞杆菌中,*nheABC* 基因以及 *entFM* 基因携带率均超过了 90%,并且其他肠毒素基因的携带率也均超过了 50%,而呕吐型毒素基因(*NPRS*)只有一株菌携带,占 3.6% (1/28),且同时携带有腹泻型毒素基因 *entFM* 和 *nheABC* 这与 Ehling-Schulz 等^[10]报道的呕吐型基因 *NPRS* 和肠毒素基因 *nhe*、*cytK* 能够同时携带结果相似。当前的试验结果表明在红河州食品监测中检出的蜡样芽胞杆菌主要为腹泻型。

由表 5 的结果可知,同时携带有完整的溶血性肠毒素(*hbl*)基因和非溶血性肠毒素(*nhe*)基因以及其他肠毒素基因的菌株有 14 株占 50.0% (14/28),只携带有完整的非溶血性肠毒素(*nhe*)基因和其他肠毒素基因的菌株有 12 株占 42.9% (12/28)。*hbl* 和 *nhe* 都是由有 3 个基因编码的蛋白复合体,只有在 3 种毒力组分同时存在才能表现出最大的毒性^[11-12]。提示红河州分离的这些蜡样芽胞杆菌毒

3 讨论

本次试验用 DNA topoisomerase II 的 *gyrB* 基因对用传统方法分离鉴定到的蜡样芽胞杆菌进行种的符合鉴定,在 31 份样品中只有 28 份呈阳性,蜡样芽胞杆菌符合率为 90.3% (28/31)。*gyrB* 基因属于信息通路中与 DNA 复制、限制、修饰和修复有关的蛋白编码基因,呈单拷贝,多数细菌都存在;一般位于 *rnpA-rmpH-dnaA-dnaN-recF-gyrB-rnpA* 基因簇中,编码的是唯一一种能诱导 DNA 负超螺旋的拓扑异构酶——DNA 促螺旋酶的 B 亚单位蛋白 *gyrB*,对细

性和潜在的威胁都比较大。

本次试验检出有 19 株菌携带有 *cytK* 基因,同时还携带有其他毒力基因,在这几种肠毒素基因中需要特别关注 *cytK* 基因,*cytK* 基因编码 34 kD 的细胞毒素 K 蛋白,对人肠上皮细胞有较高的毒性^[13],且单独携带 *cytK* 基因的菌株非常少见,其可能具有很高的毒力,Lund 等^[14]报道一起由只产生 *cytK* 毒素的蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒事件导致了 3 个人的死亡。

综上所述,了解食源性蜡样芽胞杆菌主要毒力基因型,有助于红河州地区有关部门掌握分离株的分子流行病学特征以及对强毒株的出现进行预警。

参考文献

- [1] Rahimi E, Abdos F, Momtaz H, et al. *Bacillus cereus* in infant foods: prevalence study and distribution of enterotoxigenic virulence factors in Isfahan Province, Iran [J]. The Scientific World Journal, 2013, Article ID292571; 1-5.
- [2] 庄子慧,何丽,郭云昌,等.我国食源性蜡样芽胞杆菌毒力基因和药物敏感性研究[J].中国食品卫生杂志,2013,25(3):198-201.
- [3] 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;304-314.
- [4] Rather M A, Aulakh R S, Gill J P S, et al. Direct detection of *Bacillus cereus* and its enterotoxigenic genes in meat and meat products by polymerase chain reaction[J]. Journal of Advanced Veterinary Research, 2011(1):99-104.
- [5] Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 232(2):189-195.

- [6] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.14—2003 食品卫生微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [7] 杨媛,陈庆森,吴海清. 原料乳中蜡样芽孢杆菌部分治病基因的鉴定及毒力评价[J]. 食品科学,2009,30(22):236-239.
- [8] 郝云捷,韩素贞. *gyrB* 基因在细菌系统发育分析中的应用[J]. 生物技术通报,2008(2):39-41.
- [9] Yamada S, Ohashi E, Agata N, et al. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice[J]. Applied Environmental Microbiology, 1999, 65(4):1483-1490.
- [10] Ehling-Schulz M, Guinebretiere M, Monthán A, et al. Toxin gene profiling of enterotoxigenic *Bacillus cereus* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 260(2):232-240.
- [11] Beecher D J, Schoeni J L, Wong A C. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus* [J]. Infect Immun, 1995, 63(11):4423-4428.
- [12] Lund T, Granum P E. Characterization of a non-hemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak [J]. FEMS Microbiology Letters, 1996, 141(2/3):151-156.
- [13] Fagerlund A, Ween O, Lund T, et al. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus* [J]. Microbiology, 2004, 150(8):2689-2697.
- [14] Lund T, De Buyser M L, Granum P E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis [J]. Molecular Microbiology, 2000, 38(2):254-261.

欢迎订阅 2016 年《农产品质量与安全》 中国科技核心期刊

主管 中华人民共和国农业部 主办 中国农业科学院
支持单位 农业部农产品质量安全监管局
协办单位 农业部农产品质量安全中心 中国绿色食品发展中心
承办单位 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

主要栏目:本刊特稿、本刊专稿、政策法规、质量安全监管、无公害农产品、绿色食品、有机农产品、农产品地理标志、农业标准化、检验检测、学科建设与发展、研究与探讨、安全生产技术、地方经验交流、海外博览、农业标准公告、信息与动态等。

读者对象:与农产品质量安全、农业质量标准和检验检测有关的各级行政管理、科研教学、检验监测、技术推广、生产企业等部门的相关人员。

本刊为双月刊,逢双月 10 日出版。大 16 开本,彩色四封,80 页。全国各地邮局(所)均可订阅,也可直接到本刊编辑部办理订阅手续。邮发代号:82-223。每册定价:10.00 元,全年共 60.00 元。

通讯地址:北京市中关村南大街 12 号中国农科院质标所《农产品质量与安全》编辑部,邮政编码:100081。

联系电话/传真:(010)82106521、82106522 E-mail:aqs@caas.cn

欢迎各界朋友订阅、赐稿和刊登广告