

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(3):298-303; 4 March 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

多位点序列分型分析空肠弯曲菌华东动物源分离株

薛峰^{1,2#}, 徐飞^{1,3#}, 栾军¹, 李震中⁴, 祝长青¹, 蒋原^{1*}, 陆承平²

(¹ 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 南京 210001)

(² 南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

(³ 东北农业大学成栋学院, 哈尔滨 150030)

(⁴ 河北医科大学第二医院神经内科, 石家庄 050000)

摘要:【目的】研究空肠弯曲菌菌株间的分子特征, 对不同宿主来源的空肠弯曲菌进行分子分型研究。【方法】选择空肠弯曲菌的 7 个看家基因 *gltA*、*aspA*、*glnA*、*glyA*、*pgm*、*tkt* 和 *uncA* 作为目的基因, 对 2006-2008 年间华东地区分离的 42 株空肠弯曲菌样本进行 PCR 扩增后测序。将测序结果软件分析并上传到数据库进行比对, 将结果制作多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST) 遗传进化树并进行分析。【结果】与数据库已有类型比对, 发现了 24 个新的 ST 型, 通过进化树得到其遗传关系。【结论】MLST 方法对于研究空肠弯曲菌的菌株群体基因差异与进化趋势具有重要意义。

关键词: 空肠弯曲菌; MLST; 分子分型

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0298-06

空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 是一种广泛分布于自然界的重要的食源性人兽共患病原菌^[1], 是多种动物如禽类、牛、羊及狗的正常寄居菌^[2]。Boes 等的研究表明^[3], 家禽是弯曲菌病最重要的传染源, 消费禽肉与弯曲菌的流行紧密相关^[4]。近年来, 随着空肠弯曲菌发病率的呈逐年增加其暴发流行已成为全球公共卫生关注的重点^[5-6], 因此对于动物来源空肠弯曲菌的分类和研究是必要和有现实意义的。

细菌进化的实质是其遗传物质发生变化的结果, 由此理论诞生的分子分型从基因差异上区分菌株从而判断其遗传规律。多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST) 是高通量测序技术与成熟的群体遗传学相结合的产物^[7]。2001 年 Dingle 等首先提出使用 MLST 方法研究空肠弯曲

菌的设想^[8]。经过大量的实验 MLST 被认为是对空肠弯曲菌流行病学调查和感染人群结构调查的非常有价值的工具^[9]。2008 年 Samue 等对空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的 MLST 的数据进行统计和研究, 从分子水平阐述了两种细菌的亲源和进化关系, 并且对人类活动对空肠弯曲菌的影响进行了评估^[10]。

本研究使用多位点序列分型的方法对 2006—2008 年间本实验室分离出的 42 株空肠弯曲菌进行研究, 为判断空肠弯曲菌发病趋势和进一步从分子水平研究 *C. jejuni* 致病性机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株: 2006—2008 年间华东地区分离的不同来源的 42 株空肠弯曲菌样本 (表 1)。

基金项目: 国家质检总局科研课题 (2009IK135, 2010 年立项项目)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-52345178; E-mail: jiangou@yeah.net

作者简介: # 对本文有同等贡献。薛峰 (1978-) 男, 江苏如皋人, 在站博士后, 主要从事食源性病原微生物检测与基因功能研究, E-mail: fengxue1219@yahoo.com.cn; 徐飞 (1987-) 男, 江苏南京人, 现从事微生物生理与基因功能研究, E-mail: feixu0905@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-09-25; **修回日期:** 2009-11-18

表 1 实验中使用的细菌

Table 1 The bacterial strains used in the study

Source	Number of isolates	Serial number	Isolate area
Chicken	27	A110601 - A110627	Nan Jing(南京) Yang Zhou(扬州)
Duck	5	D121102 - D121106	Nan Jing(南京)
Cow	3	C131001 - C131003	Nan Jing(南京)
Pig	6	Z130507 - Z130512	Nan Jing(南京)
Red-crowned Crane	1	D130606	Yan Cheng(盐城)

1.1.2 培养基: ① 增菌肉汤: *Campylobacter* Enrichment Broth (bolton formula, Oxoid), Hunt Enrichment Broth (HEB, Oxoid); ② 布氏肉汤(北京陆桥); ③ 分离平板: Modified Campy blood-free agar (Mccda, Oxoid), Skirrow (北京陆桥), 哥伦比亚 (Oxoid)。

1.2 提取细菌基因组 DNA

用增菌肉汤对冷冻保藏的菌株进行增菌 24 h,

然后接种到分离平板上 42℃ 微需氧环境 (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) 中进行分离培养, 24 h 后接种单菌落到哥伦比亚血平板纯化。将纯化过的细菌用肉汤洗出后使用试剂盒方法提取基因组 DNA。

1.3 MLST 基因的选择

选择空肠弯曲菌的 7 个看家基因 *gltA*、*aspA*、*glnA*、*glyA*、*pgm*、*tkl* 和 *uncA* 作为本研究的目的基因 (表 2)

表 2 目的基因的选择

Table 2 Selection of the housekeeping gene of *C. jejuni*

Gene	Size	MLST gene coordinates*	Internal fragments
<i>aspA</i>	477	96692 - 97168	aspatase
<i>glnA</i>	477	658085 - 657609	glutamine synthetase
<i>gltA</i>	402	1604930 - 1604529	citrate synthase
<i>glyA</i>	507	367573 - 368052	serine hydroxy methyl transferase
<i>pgm</i>	498	327773 - 328252	phospho glucomutase
<i>tkl</i>	459	1569415 - 1569873	transketolase
<i>uncA</i>	489	112163 - 112651	ATP synthase alpha subunit

* All coordinates are based on the *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11168 complete genome (GenBank no. AL111168.1)

1.4 PCR 引物的选择

引物来源参考 MLST 网站 (www.mlst.net) 针对 *C. jejuni* 提供的 7 对 PCR 引物序列和 7 对测序引物

序列 (表 3), 上述引物由南京金斯瑞科技有限公司合成。引物在使用前按照相应分子量进行稀释到 10 μmol/L。-20℃ 保存备用。

表 3 本研究所用 PCR 引物序列

Table 3 The ssequences of primer used in the study

Primer	Sequences (5'→3')	Primer	Sequences (5'→3')
Amplification primer		Sequencing primer	
<i>aspA</i> A9 (Forward)	AGTACTAATGATGCTTATCC	<i>aspA</i> S3 (Forward)	CCAAGTCAAGATGCTGTACC
<i>aspA</i> A10 (Reverse)	ATTTCATCAATTTGTTCTTTGC	<i>aspA</i> S6 (Reverse)	TTCATTTGCGGTAATACCATC
<i>glnA</i> A1 (Forward)	TAGGAACTTGGCATCATATTACC	<i>glnA</i> S3 (Forward)	CATGCAATCAATGAAGAAAC
<i>glnA</i> A2 (Reverse)	TTGGACGAGCTTCTACTGGC	<i>glnA</i> S6 (Reverse)	TTCCATAAGCTCATATGAAC
<i>gltA</i> A1 (Forward)	GGGCTTGACTTCTACAGCTACTTG	<i>gltA</i> S3 (Forward)	CTTATATFGATGGAGAAAATGG
<i>gltA</i> A2 (Reverse)	CCAAATAAAGTTGTCTTGGACGG	<i>gltA</i> S6 (Reverse)	CCAAAGCGCACCAATACCTG
<i>glyA</i> A1 (Forward)	GAGTTAGAGCGTCAATGTGAAGG	<i>glyA</i> S5 (Forward)	GCTAATCAAGTGTTTATAT
<i>glyA</i> A2 (Reverse)	AAACCTCTGGCAGTAAGGGC	<i>glyA</i> S4 (Reverse)	AGGTGATTATCCGTTCCATCGC
<i>tkl</i> A3 (Forward)	GCAAACCTCAGGACACCCAGG	<i>tkl</i> S5 (Forward)	GGTTTTAGATGTGGCTCATG
<i>tkl</i> A6 (Reverse)	AAAGCATGTTAATGGCTGC	<i>tkl</i> S2 (Reverse)	TCCAGAATAGCGAAATAAGG
<i>pgm</i> A7 (Forward)	TACTAATAATATCTTAGTAGG	<i>pgm</i> S5 (Forward)	GCTTAGCAGATATTTAACTG
<i>pgm</i> A8 (Reverse)	CACAACATTTTTCATTTCTTTTTTC	<i>pgm</i> S6 (Reverse)	AAGCCTGCTTGTCTTTGGC
<i>uncA</i> A7 (Forward)	ATGGACTTAAGAATATTATGGC	<i>uncA</i> S3 (Forward)	AAAGTACAGTGGCACAACTGG
<i>uncA</i> A8 (Reverse)	ATAAATTCATCTTCAAATTC	<i>uncA</i> S4 (Reverse)	TGCCTCATCTAAATCACTAGC

1.5 靶基因片段扩增

采用 50 μ L PCR 反应体系。① *gltA*、*aspA*、*pgm* 和 *uncA* 基因的反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。② *glnA* 和 *gly* 基因的反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。③ *tkl* 基因的反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 然后 EB 染色呈象观察。

1.6 DNA 序列测定

由金斯特科技(南京)有限公司对 PCR 产物的序列进行双向测定。

1.7 测序结果处理

使用测序引物对 PCR 结果进行测序, 对于所有基因序列对上下游进行 2 次序列测定。与 GenBank 中的已有的相关基因进行 BLAST, 然后使用 Lasergene 7.1 对序列进行 Clustal V 分析, 将上下游序列整合后得到完整序列。为减小误差首尾的几个碱基不计算入序列测定结果。最后将测序结果上传至 MLST 网站进行在线数据分析, 得到的结果与网站数据库进行比对。

1.8 方法重现性研究

对同一模板进行 3 次重复实验, 并对 PCR 产物测序, 比较结果的一致性。同时对同一菌株进行多次基因组 DNA 提取, 不同批次取得的 DNA 进行 PCR 并测序, 并对测序结果进行比较。

2 结果和分析

2.1 看家基因 PCR 结果

采用特异性 PCR 引物进行反应的果显示, *C. jejuni* 的 7 个基因均可以扩增出特异性产物用于测序(图 1)

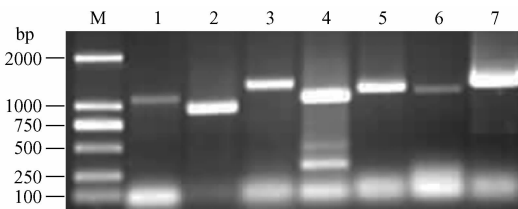


图 1 七个看家基因的 PCR 电泳结果

Fig.1 Result of PCR. M. DL2000; 1-7. *gltA*, *aspA*, *glnA*, *glyA*, *pgm*, *tkl* and *uncA*.

2.2 核苷酸序列比较结果

对不同来源的空肠弯曲菌的 7 个管家基因的序

列分别进行比较。得到 42 个不同样本的每个基因的碱基差异情况。

2.3 不同来源空肠弯曲菌 MLST 进化关系分析

对不同来源的 42 株空肠弯曲菌多位点序列分型结果聚类用非加权分组算术均方根法建立进化树(图 2)。样本中有记载的空肠弯曲菌 ST 型主要为 ST21 和 ST1811, 大部分新发现的 ST 型也与这两种型别相近, 均属于或接近于数据库划分的第 6 类型别。其余的型别与常见的 ST42 相近都属于数据库划分的第 4 类型别。结果显示, 华东地区分离株在亲源关系上与已有记载的菌株有一定区别, 但没有发现差异明显的样本。

2.4 MLST 数据库比对分析结果

将整理好的序列上传至 MLST 数据库网站(www.mlst.net)进行比对, 确定菌株的序列型(Sequence type, ST)。得到 ST-21 complex 12 株, ST-49 complex, ST-45 complex 和 ST-42 complex 各 1 株, 有 3 株无 ST 型记录, 其余 24 株为新发现的 ST 型(表 4)。

表 4 MLST 结果发现的新 ST 型
Table 4 New ST types of *C. jejuni* isolated

isolate	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkl	uncA	Sequence type
3	2	4	12	3	2	43	5	New
4	47	2	12	3	153	1	5	New
5	2	2	79	10	10	44	5	New
6	47	4	12	3	2	1	5	New
7	2	4	12	3	2	44	5	New
9	2	1	1	3	2	37	5	New
10	8	2	2	10	10	59	5	New
12	2	1	52	212	2	253	147	New
14	2	4	2	3	2	1	5	New
15	2	4	12	3	2	1	5	New
17	108	27	59	19	10	5	7	New
18	54	1	252	3	104	47	5	New
19	2	4	12	3	104	1	5	New
22	2	1	52	3	2	59	18	New
23	2	1	52	3	2	100	18	New
24	2	1	1	3	2	1	18	New
25	2	2	2	212	153	253	147	New
30	53	1	1	3	2	1	5	New
36	7	17	12	62	4	9	5	New
37	2	2	3	4	5	1	3	New
38	4	2	12	3	2	1	5	New
39	7	2	2	212	153	253	5	New
40	8	2	2	212	10	253	147	New
41	1	4	2	2	10	3	5	New

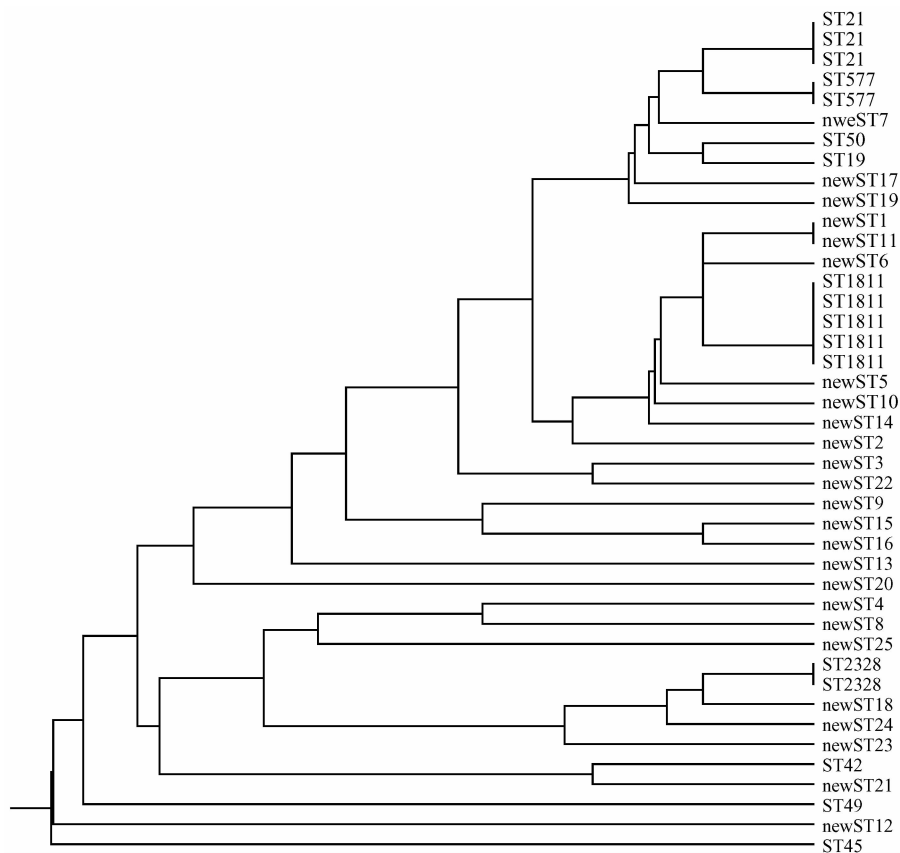


图2 多位点序列系统进化树

Fig. 2 MLST Phylogenetic tree. Online software Tree drawing was used to clustal W(www.mlst.net), choose UPGMA way to build the phylogenetic tree. It is show that most of new STs are closest match4 and match 6.

3 讨论

多位点序列分型作为一种准确的分子分型方法于1998年问世以来^[11],以其高分辨率^[12],可重复性好,可积累等^[13]优势而得到广泛关注。随着测序速度的提高和成本的大幅降低,数据库积累快速增长,其在病源微生物分类方面的优势突显。在本实验中用MLST方法对空肠弯曲菌分型显示出比传统分子分型方法如RAPD、PFGE等有更好的效果。MLST作为一种可积累的分型方法伴随着数据库的建立而使用,其结果可以在不同时间全球范围内进行数据共享。但是对于MLST的数据库中信息的准确建立在共享者正确使用的前提下,数据库要求实验者不仅将新的型别上传提供细菌进化相关信息,已有的型别的上传在分子流行病学统计上的意义同样重要。特别是对于空肠弯曲菌这样总样本量相对较小的菌种尤其重要。

在MLST方法建立中最重要的是选择目的基因,被选择的管家基因的变异情况决定了MLST的

分辨能力,选择的基因突变位点的数量如果过多会导致型别过多无法统计,而选择突变位点过少或者没有的基因将无法反应出菌株群体的基因变异的情况。例如受到选择压力大毒力相关基因或膜相关蛋白基因,序列的变化很小不适合用于MLST^[14]。为了验证本实验中选用的空肠弯曲菌7对管家基因的多样性情况,我们对7个基因的个别多样性分别进行计算,结果显示天冬氨酸酶基因*gltA* 0.6388、谷氨酰胺合成酶基因*aspA* 0.7236、柠檬酸合酶基因*glnA* 0.8.72、丝氨酸羟甲基转移酶基因*glyA* 0.5703、葡萄糖磷酸变位酶基因*pgm* 0.6260、转羟乙醛酶基因*tkt* 0.7561和ATP合成酶 α 亚基基因*uncA* 0.5122,整体遗传多样性较高0.6620 +/- 0.0398,能够切实的反映出空肠弯曲菌的进化特点。与Samuel等认为这7个基因的遗传稳定性良好的观点相符合^[10]。

MLST数据库已有的数据表明30.91%(1258/4070)的空肠弯曲菌样本未被分配clonal_complex型。本实验结果中出现的ST-21 complex, ST-49

complex, ST-45 complex 和 ST-42 complex 在数据库中所占的比例分别为 10% (407/4070), 0.71% (29/4070), 5.48% (223/4070), 1.74% (71/4070)。在实验中出现了 24 种之前未被发现的新的 ST 型。对实验得到的空肠弯曲菌 ST 型用 UPGMA 方法进行聚类分析。UPGMA 法要求所有的分类群现存, 所有谱系的变化速率相同, 这与本实验的样本情况相符。生成的进化树显示新的 ST 型基本上与 ST1811 和 ST21 在同一个分支, 只有鸡源的 newST12 较远。实验中出现多种新 ST 型的原因可能是由于空肠弯曲菌的 MLST 数据库建立较晚数据量小造成的。此前 MLST 数据库中的空肠弯曲菌样本来源主要是欧洲美国和大洋州国家, 亚洲国家的数据量相对较少。本实验室之前对于空肠弯曲菌的耐药和毒力相关基因的研究都表明华东地区的菌株与欧美菌株的基因分布都有一定的差异。本实验的结果是对 MLST 数据库的进一步完善, 为通过 MLST 方法研究不同区域不同来源的空肠弯曲菌的流行病学提供了依据。

致谢 本研究得到扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室刘秀梵院士、焦新安教授, 上海交通大学史贤明教授以及河北医科大学第二医院李春岩院士的指导和帮助, 在实验过程中来自南京农业大学的陈扬同学付出了辛勤的劳动, 在此一并表示感谢!

参考文献

- [1] Blaser MJ. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 176:103-105.
- [2] Senok A, Yousif A, Mazi W, et al. Pattern of antibiotic susceptibility in *Campylobacter jejuni* isolates of human and poultry origin. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2007, 60: 1-4.
- [3] Boes J, Nersting L, Nielsen EM, et al. Prevalence and diversity of *Campylobacter jejuni* in pig herds on farms with and without cattle or poultry. *Journal of Food Protection*, 2005, 68: 722-727.
- [4] Hood AM, Pearson AD, Shahamat M. The extent of surface contamination of retailed chickens with *Campylobacter jejuni* serogroups. *Epidemiol Infect*, 1988, 100: 17-25.
- [5] Skirrow MB, Blaser MJ. *Campylobacter*. *ASM Press*, 2000:69-88.
- [6] CDC. < <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/campylobacter-t.htm> >. Accessed.
- [7] Pradeep RM, Leigh KH, Kathryn H, et al. The effect of chromosome geometry on genetic diversity. *Genetics*, 2008, 179: 511-516.
- [8] Dingle KE, Colles FM, Wareing DR. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal clinical microbiology*, 2001, 39(1): 14-23.
- [9] Dingle KE, FM Colles, D Falush, et al. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Journal clinical microbiology*, 2005, 43:340-347.
- [10] Samuel KS, Noel DM, Daniel F, et al. Convergence of *Campylobacter* species: implications for bacterial evolution. *Science*, 2008, 320:237-239.
- [11] Maidenm CJ, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95: 3140-3145.
- [12] Brian G. Spratt, Martin C. J. Maiden. Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 1999, 354: 701-710.
- [13] J. Peter Gogarten, W. Ford Doolittle, Jeffrey G. Lawrence. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Molecular biology and evolution*, 2002, 19: 2226-2238.
- [14] 刘金华, 贺丹, 杨艳秋, 等. 多位点测序分型技术在病原微生物分型鉴定中的应用. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2007, 34(6):1188-1191.

Multilocus sequence typing of animal source *Campylobacter jejuni* in east China

Feng Xue^{1#}, Fei Xu^{1,3#}, Jun Luan¹, Zhenzhong Li⁴, Changqing Zhu¹, Yuan Jiang^{1*}, Chengping Lu²

(¹ Plant and Food Inspection Center, Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

(² College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(³ Chengdong College of Northeast Agricultural University, Haerbin, 150030)

(⁴ Department of Neurology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: [Objective] To characterize the genes of *Campylobacter jejuni* isolates and to genotype the strains from chicken, cow, duck, pig and red-crowned Crane during 2006 to 2008 by multilocus sequence typing (MLST). [Methods] To choose 7 pairs *Campylobacter jejuni* home-keeping gene, *gltA*, *aspA*, *glnA*, *glyA*, *pgm*, *tkt* and *uncA* as target gene, PCR was applied to detect 42 samples in East China between 2006-2008. Sequencing, analysis and comparison of the genes were done. [Result] Typing the 42 isolates by MLST and finding 24 new sequence typing types. [Conclusion] MLST is a useful method to evaluate *Campylobacter jejuni* genes and gene evolution.

Keywords: *Campylobacter jejuni*; Multilocus sequence typing (MLST); gene typing

(本文责编:王晋芳)

Supported by the AQSIQ Research Projects(2009IK135)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-52345178; E-mail: jiangy@yeah.net

#These authors contributed equally to this work.

Received: 25 September 2009/ Received: 18 November 2009

《微生物学报》2010年栏目调整

近年来,随着期刊建设的需要、以及期刊的编辑出版出现的问题,在2010年对《微生物学报》的栏目进行调整。

1. 设立一个新的栏目——“专论”

随着期刊建设的需要,为了丰富学报的内容,编辑部需要争取一些特约稿。这些稿件的内容会有别于本刊57年来贯有的模式,另立一个“专论”栏目,与“研究报告”和“研究简报”并列。将不定期试行,欢迎国内、外微生物研究领域的专家们为本刊撰文!这个栏目的稿件来源如下:

(1) 本刊新增的“专论”栏目,作者范围定位在:① 国内、外的知名专家;② 国家基金委等部门的管理者;③ 国家973、863等重大项目专家组的专家。邀请他们结合自己的研究领域、各自的工作为学报撰文。

(2) 考虑到“编委投稿综述”计划,也接受编委个人撰写的另外形式的文章,不必按照《微生物学报》综述要求的撰写。

2. 将每月一篇的“学科先贤”变更为每两个月刊出一篇

(1) 创建过程:为了让人们了解我国微生物领域的开拓者,从2005年4月开始《微生物学报》增加了一个新的栏目——“学科先贤”,每期刊出一篇人物传记。这个栏目出现后备受人们的关注。

(2) 变更原因:从2008年开始《微生物学报》改为月刊(每期144页),已运行两年。先贤的简介内容虽说只有短短4000多字,但是其内容涵盖了先贤们详尽的历史资料,特约撰稿人需要通过多方渠道搜集,每个月完成一篇实属不易。因此编辑部决定进行调整,由每月一篇变更为两个月一篇,在偶数期上刊出。