

空肠弯曲菌脉冲场凝胶电泳分子检测方法的建立及应用

黄金林¹, 许海燕^{1,2}, 姜丰¹, 尹衍新¹, 张弓¹, 潘志明¹, 刘秀梵¹, 焦新安^{1*}

(¹扬州大学生物科学与技术学院, 扬州 225009)

(²江苏省南通市疾病预防控制中心, 南通 226006)

摘要 【目的】建立空肠弯曲菌脉冲场电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)图谱分型方法。【方法】在PFGE基本程序基础上,通过调整菌液浓度、Seakem Gold琼脂糖凝胶浓度、蛋白酶K浓度、洗涤方式和限制性内切酶 *Sma* I 浓度,进行程序的比较与优化。应用PFGE技术对不同来源分离株进行分析。【结果】37株空肠弯曲菌脉冲场凝胶电泳图谱显示分离株均产生了6~24条电泳带,条带数量适中,清晰易读;系统进化树显示,可分为4个遗传谱系,分离株主要分布于PFGE遗传谱系IV,不同源分离株在各组群中呈交叉分布。【结论】PFGE对空肠弯曲菌具有很强的分型能力和良好的溯源性,初步数据显示鸡、牛等动物源空肠弯曲菌与腹泻病人空肠弯曲菌密切相关。

关键词: 空肠弯曲菌; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)04-0531-05

近年来,空肠弯曲菌感染率在世界各地普遍呈上升趋势,已成为全球范围内胃肠炎的主要病因,其病例数已超过沙门氏菌病、李斯特菌病和志贺氏菌病^[1];格林巴利综合征(Guillain-Barre syndrome, GBS)是特定血清型空肠弯曲菌感染后最严重的并发症,可以导致呼吸肌麻痹而死亡^[2]。对人致病的弯曲菌中95%的是空肠弯曲菌^[3]。弯曲菌作为食源性病原菌,主要是通过食用被污染的食物、水以及奶制品等而感染,因而建立一种快速、准确的分子亚分型方法对于追踪污染来源和监控弯曲菌病流行具有重要的意义。

血清学分型已被应用于弯曲菌病例的监测,但存在试剂不能保证供应、成本高、质量控制难、大量菌株不能被分型等缺点^[4],PFGE是20世纪80年代出现的分析大分子DNA片段的新技术,通过交变脉冲电场,交替改变电泳方向、时间与电流大小,DNA

片段按分子量大小得到分离,可分离50 kb~5000 kb的DNA片段^[5];PFGE检测的是整个细菌染色体上所有酶切位点的变化,从整体上反映不同菌株全部基因的相关性^[6]。本研究拟建立脉冲场凝胶电泳用于空肠弯曲菌的分子检测,并对人源、鸡源和牛源分离株进行同源性分析,为弯曲菌病溯源性研究和预防控制措施提供分子亚分型技术平台。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:空肠弯曲菌标准菌株(ATCC33560)由上海出入境检验检疫局惠赠,37株地方分离株由江苏省人兽共患病学重点实验室分离并保存,分别为:鸡源分离株(21株):ALM-43、ALM-67、ALM-78、AQM-25、AQM-48、ALM-21、ALM-52、AND-45、HQM-71、HLY-78、LSJ-1-9、LSJ-1-25、HQLM-22、HQLM-30、HQLM-15、

基金项目:国家“863计划”(2007AA02Z419);国家支撑计划(2006BAK02A28);江苏省社会发展支撑计划(BE2008655);江苏省农业科技自主创新基金项目[cs(08)103]

*通信作者。Tel: +86-514-87991803; Fax: +86-514-87991747; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

作者简介:黄金林(1969-)男,江苏姜堰人,博士,副教授,主要从事人兽共患病原微生物研究。E-mail: jinlin@yzu.edu.cn

收稿日期:2008-11-07;修回日期:2009-02-05

Z-1-4、Z-1-6、Z-1-9、Z-1-11、Z-1-18、Z-1-19,牛源分离株(10株):DN-4-6、QN-6-1、TR-6-4、TZDN-110、TZXN-13、TZXN-39、TZDN-66、XNSC-4-1、SQDN-14、ZWDN-19 腹泻病人分离株(6株):PO-6-9、PO-23-5、SO-1-2、SOC-13、SC-5-8、PI-42-6。

1.1.2 培养基及生长条件:所有菌株划线 CCDA 培养基^[7],置厌氧培养罐中,加入微需氧产气袋后,密封、纯培养 48h 经国标方法鉴定正确后^[8],备用。

1.1.3 主要试剂和仪器:脉冲场凝胶电泳仪(Bio-Rad 公司,美国),凝胶影像分析系统 GEL DOC2000 (Bio-Rad 公司,美国),*Sma* I 核酸内切酶(Roch 公司,德国),Seakem Gold® 琼脂糖凝胶(Bio-Rad 公司,美国),脉冲场凝胶电泳(PFGE)级琼脂糖(Bio-Rad 公司,美国)。

1.2 脉冲场凝胶电泳方法(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

PFGE 基本操作参照 Chang 的方法^[9]进行,并进行优化,主要操作如下:

收获新鲜培养物,悬浮于含 0.012 mol/L Tris-HCl, pH 7.6 的试管中,调整菌液浓度。取 400 μ L 菌液加入子形管中,加入等量的用 0.01 mol/L Tris, 0.01 mol/L EDTA, pH 7.6 溶解的 SKG 胶, 55~65 $^{\circ}$ C, 轻轻上下翻转 2~3 次,混合液立即加入模具中(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA),室温 10~15 min 或 4 $^{\circ}$ C 5 min 凝固。将包埋块放入含 2 mL ESP(0.05 mol/L Tris, 0.05 mol/L EDTA, pH 8.0, 1% 肌氨酸, 0.1 mg 蛋白酶 K/mL)的试管中, 50 $^{\circ}$ C 消化 1.5~2 h。

将包埋块切成 1 mm 厚度的薄片,转移至试管中,先加入 5 mL 50 $^{\circ}$ C 的双蒸水洗涤, 175~200 r/min, 15 min;再加入 5 mL TE buffer(10 mmol/L Tris, 10 mmol/L EDTA, pH 7.6)洗涤,重复 4 次,最后加入 *Sma* I buffer 100 μ L,室温孵育 15 min。去除 buffer,再加入 100 μ L *Sma* I buffer(内含 *Sma* I), 25 $^{\circ}$ C,过夜酶切。薄片用 1% 凝胶覆盖,置于 0.5 \times TBE (0.045 mol/L Tris-borate, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)中。电泳条件为缓冲液 0.5 \times TBE, 14 $^{\circ}$ C, 18 h, 脉冲时间 4 s~40 s, 电场夹角 120 $^{\circ}$, 电压 6 V/cm。电泳后,EB 染色(0.5 mg/mL), 30 min, 然后成像。

1.2.1 PFGE 程序优化:在空肠弯曲菌标准菌株(ATCC33560)PFGE 基础程序基础上,通过调整菌液、Seakem Gold® 琼脂糖凝胶、ESP 中蛋白酶 K 和限制性内切酶浓度,以及胶块洗涤方式等方面分别进行程序的比较与优化。菌液浓度 OD_{600} 分别为 2.0、1.5 和 1.0, Seakem Gold® 琼脂糖凝胶浓度为 0.8%、

1.0% 和 1.5%, 包埋块 ESP 中蛋白酶 K 浓度为 200 μ g、400 μ g 和 600 μ g, 限制性内切酶 *Sma* I 浓度为 20 U、40 U 和 60 U, 洗涤方式为摇振和静置。

1.2.2 不同源空肠弯曲菌的 PFGE 分析:应用优化的 PFGE 对分离自鸡、牛和人的 37 株空肠弯曲菌地方分离株进行分析。通过 PFGE 图谱中条带的存在与否来对其进行积分,有不同条带的菌株被分为不同的 PFGE 图形。菌株之间的差异度用 DICE 系数(F)来确定, $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, F 代表 x 和 y 分离株之间的相似系数, N_{xy} 代表 x 和 y 分离株之间共同拥有的条带数目, N_x 代表 x 分离株的总条带数目, N_y 代表 y 分离株的总条带数目。F 值为 1 时说明这两个菌株具有相同的 PFGE 图谱, F 值为 0 时说明两个菌株之间没有相似性。

基于 UPGMA 方法(un-weighted pair-group mean arithmetic, UPGMA)进行聚类分析,使用 Quantity One 软件(Quantitation Software, Bio-Rad),绘制分离株的系统进化树。

2 结果

2.1 空肠弯曲菌标准株 ATCC33560 PFGE 的建立

弯曲菌 PFGE 程序已有报道^[10,11],但不同实验室在包块准备、酶切消化和电泳等条件上采取不同的策略。本研究结果表明,菌液浓度和洗涤方式对 PFGE 条带有较大影响,摇振洗涤效果优于静置方式(图 1),而 Seakem Gold® 琼脂糖凝胶浓度、包埋块细胞溶解液中蛋白酶 K 浓度和限制性内切酶 *Sma* I

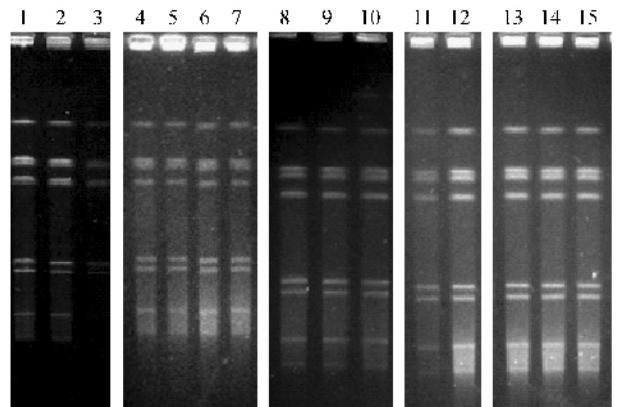


图 1 空肠弯曲菌标准株 ATCC33560 PFGE 程序的优化
Fig. 1 Optimization of PFGE procedure of ATCC33560. 1-3. The cell suspension concentration OD_{600} 2.0, 1.5 and 1.0; 4-7. Seakem Gold® agarose gel strength 0.7%, 1.0%, 1.2% and 1.5%; 8-10. Proteinase K quantity 200 μ g, 400 μ g and 600 μ g; 11-12. Washing method: shaking and standing; 13-15. *Sma* I restriction enzyme concentration 20 U, 40 U and 60 U.

浓度对 PFGE 的影响不显著。因此,优化的空肠弯曲菌 PFGE 程序为菌液浓度 OD_{600} 为 1.5, Seakem Gold® 琼脂糖凝胶浓度为 1.0%, 包埋块细胞溶解液中蛋白酶 K 浓度为 200 μg , 洗涤方式为摇振, 限制性内切酶 *Sma* I 浓度为 20 U。

2.2 不同源空肠弯曲菌 PFGE 分析

对分离自腹泻病人、鸡群、牛群的 37 株空肠弯

曲菌进行脉冲场凝胶电泳结果显示(图 2)每株分离株均产生了 6~24 条电泳带, 条带数量适中, 清晰易读, 不同分离株间电泳条带差异显著, 易于识别, 表明 PFGE 具有很强的分型能力。为进一步验证结果的可重复性, 对上述空肠弯曲菌分离株 3 个月后进行重复实验, 结果完全一致, 说明 PFGE 分型具有良好的可重复性。



图 2 空肠弯曲菌分离株的 PFGE

Fig.2 PFGE profiles of *C. jejuni* isolates. 1. ALM-43; 2. ALM-67; 3. ALM-78; 4. DN-4-6; 5. LSJ-1-9; 6. LSJ-1-25; 7. QN-6-1; 8. SC-5-8; 9. TR-6-4; 10. TZDN-110; 11. TZXN-13; 12. TZXN-39; 13. TZDN-66; 14. XNSC-4-1; 15. SQDN-14; 16. ZWDN-19; 17. Z-1-4; 18. Z-1-6; 19. Z-1-9; 20. Z-1-11; 21. Z-1-18; 22. Z-1-19; 23. PO-6-9; 24. PO-23-5; 25. SO-1-2; 26. SOC-13; 27. PI-42-6; 28. AQM-25; 29. AQM-48; 30. ALM-21; 31. ALM-52; 32. AND-45; 33. HQM-71; 34. HLY-78; 35. HQLM-22; 36. HQLM-30; 37. HQLM-15.

基于 UPGMA 聚类分析绘制的系统进化树进一步表明(图 3) 37 株分离株可分为 4 个遗传谱系, 分别称为遗传谱系 I (Lineage I)、遗传谱系 II (Lineage II)、遗传谱系 III (Lineage III) 和遗传谱系 IV (Lineage IV)。其中, 2 株分离株属于遗传谱系 I, 9 株分离株属于遗传谱系 II, 8 株分离株属于遗传谱系 III, 18 株分离株属于遗传谱系 IV; 分别占分离株总数的 5.41%、24.32%、21.62% 和 48.65%。表明我国空肠弯曲菌分离株主要属于 PFGE 遗传谱系 IV。根据菌株图谱相似性分析^[10-11] 4 个遗传谱系又可细分为 20 个组群 (group)。

腹泻病人分离株分析显示, 不同源分离株在各组群中呈交叉分布。6 株菌株分布于遗传谱系 II、III 和 IV 中, 且与鸡、牛分离株处于同一组群, 鸡、牛等动物源空肠弯曲菌与腹泻病人空肠弯曲菌有密切的相关性, 而且鸡是人类空肠弯曲菌感染的主要来源。

3 讨论

为了分析弯曲菌的流行病学特征, 尤其是对暴发流行的溯源性研究, 在过去的十几年, 多种亚分型方法应用于弯曲菌的追踪性研究^[11]。基于细菌染

色体 DNA 酶切的脉冲场凝胶电泳方法 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 能够对整个染色体进行分析, 稳定性好, 分辨率高, 被认为是从分子水平研究病原菌溯源性的金标准^[12], 已成为许多细菌分型、调查菌株间遗传关系的可靠方法^[13]。但 PFGE 操作过程复杂、影响因素多, 不同实验室、不同操作人员之间需要标准化^[11]。本研究通过对影响 PFGE 的主要条件进行分析, 得到了优化的空肠弯曲菌 PFGE 分子检测程序, 为进一步开展溯源性提供技术平台。

本研究对分离自腹泻病人、牛和鸡的 37 株空肠弯曲菌分子亚分型初步研究显示, 我国空肠弯曲菌分离株呈高度交叉分布, 人弯曲菌的感染与动物源弯曲菌感染密切相关, 可能存在着相同的传染源, 而且鸡是人类弯曲菌病的主要传染源。Zorman 等应用 PFGE 和 *fla*-RFLP 对禽及其制品和临床腹泻病人的弯曲菌分离株进行分析^[14], 分离株中存在优势 PFGE 和 *fla*-RFLP 型别, PFGE 对弯曲菌具有很好的区分和分型能力, 而且动物源和人源分离株在 PFGE 型别上具有相似性, 显示零售肉的交叉污染是人弯曲菌病的重要来源。同时, Uzunović-Kamberović 等应用 PFGE 对人源、零售肉和活鸡的 20 株结肠弯曲菌

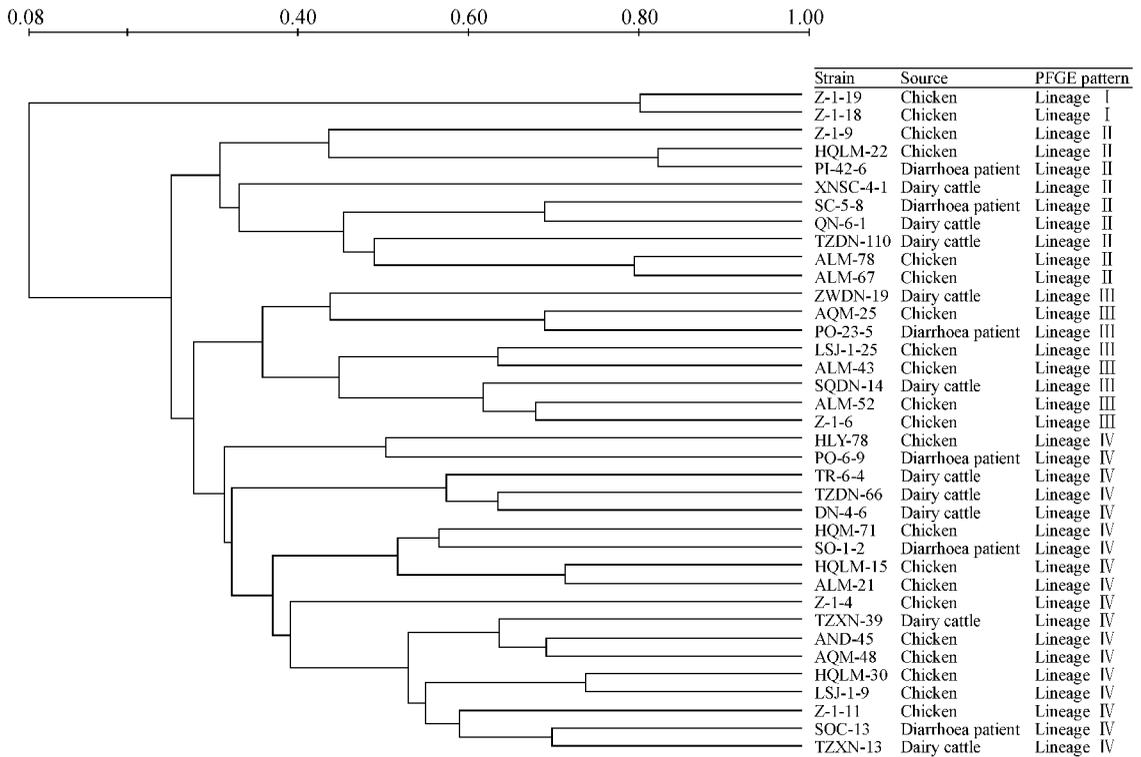


Fig.3 空肠弯曲菌分离株的遗传进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of *C. jejuni* isolates.

和 37 株空肠弯曲菌分离株进行分型研究^[15],发现只有少数(2 株)人分离株的 PFGE 型与肉、活鸡分离株同型,表明虽然鸡是弯曲菌感染的主要来源,但还存在其它途径,认为环境中的弯曲菌对人弯曲菌病有重要贡献。

综上所述,PFGE 是快速、辨别力强、重复性好的分子亚分型方法,该分型方法可作为研究空肠弯曲菌感染源和传播途径的有力工具^[12]。本研究对不同来源空肠弯曲菌 PFGE 图谱分析表明,鸡、牛等与人类感染空肠弯曲菌密切相关,加强动物源性空肠弯曲菌的预防与控制是根除人弯曲菌病的重要途径。

参考文献

- [1] Sonnevend A, Rotimi VO, Kolodziejek J, et al. High level of ciprofloxacin resistance and its molecular background among *Campylobacter jejuni* strains isolated in the United Arab Emirates. *Journal of Medical Microbiology*, 2006, 15 (11): 1533 - 1538.
- [2] Ang CW, Jacobs BC, Laman JD. The Guillain-Barré syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends in Immunology*, 2004, 25(2): 61 - 66.

- [3] Lastovica AJ, Skirrow MB. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Campylobacter*, 2000, 2nd eds. ASM Press, Washington, DC, pp. 139 - 153.
- [4] Frost JA, Oza AN, Thwaites RT, et al. Serotyping scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on direct agglutination of heat-stable antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36(2): 335 - 339.
- [5] 韩黎, 谭耕雯, 陈世平. PFGE 在真菌基因研究中的应用. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 1998, 38(2): 159 - 161.
- [6] Hernandez J, Fayos A, Ferrus MA, et al. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from human faeces, seawater and poultry products. *Research in Microbiology*, 1995, 146(8): 685 - 696.
- [7] Murinda SE, Nguyen LT, Oliver SP. Problems in isolation of *Campylobacter jejuni* from frozen-stored raw milk and bovine fecal samples: genetic confirmation using multiplex PCR. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2004, 1(3): 166 - 171.
- [8] 中华人民共和国国家标准[S]. 食品卫生微生物学检验—空肠弯曲菌检验. GB/T 4789.9-2003: 59 - 66.

- [9] Chang N , Chui L . A standardized protocol for the rapid the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* , 1998 , 31(1) : 275 - 279 .
- [10] Chang N , Taylor DE . Use of pulsed-field agarose gel electrophoresis to size genomes of *Campylobacter* species and to construct a *SalI* map of *Campylobacter jejuni* UA580. *Journal of Bacteriology* , 1990 , 172(9) : 5211 - 5217 .
- [11] Ribot EM , Fitzgerald C , Kubota K , et al . Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni* . *Journal of Clinical Microbiology* , 2001 , 39(5) : 1889 - 1894 .
- [12] Imai Y , Kikuchi M , Matsuda M . Macro-fingerprinting analysis at the chromosomal genomic DNA level of isolates of thermophilic *Campylobacter coli* and *C. jejuni* by pulsed field gel electrophoresis. *Cytobios* , 1994 , 78(313) : 115 - 122 .
- [13] Thong KL , Cheong YM , Puthuchery S , et al . Epidemiologic analysis of sporadic *Salmonella typhi* isolates and those from outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* , 1994 , 32(5) : 1135 - 1141 .
- [14] Zorman T , Heyndrickx M , Uzunović-Kamberović S , et al . Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with Campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. *International Journal of Food Microbiology* , 2006 , 110(1) : 24 - 33 .
- [15] Uzunović-Kamberović S , Zorman T , Heyndrickx M , et al . Role of poultry meat in sporadic *Campylobacter* infections in Bosnia and Herzegovina : laboratory-based study. *Croatian Medical Journal* , 2007 , 48(6) : 842 - 851 .

Pulsed field gel electrophoresis for determining the molecular homology of *Campylobacter jejuni* isolates

Jinlin Huang¹ , Haiyan Xu^{1,2} , Feng Jiang¹ , Yanxin Yi¹ , Gong Zhang¹ , Zhiming Pan¹ , Xiufan Liu¹ , Xin'an Jiao^{1*}

(¹College of Bioscience and Biotechnology , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China)

(²Nantong Municipal Centre for Disease Control and Prevention , Nantong 226006 , China)

Abstract : [**Objective**] To establish a genetic typing map for *Campylobacter jejuni* in China by using Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). [**Methods**] A PFGE protocol was developed for subtyping *C. jejuni* isolates from different sources . The effect of cell suspension concentration , Seakem Gold agarose gel strength , proteinase K density , washing style , and restriction enzyme concentration were also evaluated . [**Results**] DNA from 37 isolated strains of *C. jejuni* digested with restriction enzyme *Sma* I produced PFGE profiles that distinguished these strains to the level of species , and resulted in 6 to 24 bands of electrophoresis . A phyletic evolution tree showed that the isolates could be separated into four genetic lineages , and possessed dominance among lineage IV . The distribution of isolated strains from different sources overlapped each other in all groups . [**Conclusion**] PFGE can be used for the investigation of molecular epidemiological patterns of *C. jejuni* and for tracing the source of *C. jejuni* in clinical patients . Preliminary data showed that human Campylobacteriosis was related to *C. jejuni* of animal origin , particularly from the chicken .

Keywords : *Campylobacter jejuni* ; PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) ; molecular subtyping

(本文责编 : 王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA02Z419) , the National Key Technology RD Program (2006BAK02A28) , and the Grants from Jiangsu Provincial Government [BE2008655 , cx(08)-103]

* Corresponding author . Tel : + 86-514-87991803 ; Fax : + 86-514-87991747 ; E-mail : jiao@yzu.edu.cn

Received : 7 November 2008 / Revised : 5 February 2009