

# 沙门菌变性高效液相色谱法鉴定和分型研究

杨福江<sup>1</sup>, 王玉平<sup>1</sup>, 吴永宁<sup>2</sup>, 沈建忠<sup>3</sup>

**摘要:** [目的] 建立 PCR 与变性高效液相色谱 (DHPLC) 相结合的方法, 对沙门菌进行鉴定和分型。[方法] 针对 16S rRNA 基因或 16S-23S 之间序列保守区设计 3 对引物 S1、S2 和 S3, PCR 扩增产物或杂交产物用变性高效液相色谱仪鉴定。[结果] 柱温 50℃ 时, 引物 S1 产物在不同血清型沙门菌显示为特异 DHPLC 图谱; 柱温 61.4℃ 时, 引物 S2 杂交产物在不同血清型沙门菌显示为特异 DHPLC 图谱; 引物 S3 可用于沙门菌的特异鉴定, 但不能区分血清型; 同一血清型内各菌株基因高度保守。[结论] PCR-DHPLC 方法适用于不同血清型沙门菌的分型, 但不适于同一血清型内的菌株分型。

**关键词:** 变性高效液相色谱; 沙门菌; 鉴定; 分型; 16S rRNA 基因

## IDENTIFICATION AND TYPING OF SALMONELLA USING PCR-DHPLC METHOD YANG Fu-jiang, WANG Yu-ping, Wu Yong-ning, et al. (Xingtai Medical College, Xingtai 054000, China)

**Abstract:** [Objective] To establish a PCR-DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography) method for the identification and genotype of different Salmonella serovars. [Methods] Three primer sets (S1, S2 and S3) for the conserved region of 16S rRNA gene or 16S-23S ITS were designed and used for the PCR amplification. The PCR products or hybridization products were detected by DHPLC. [Results] The PCR products for primer S1 were shown as specific peak profiles in different Salmonella serovars at an oven temperature of 50°C. The hybridization products for primer S2 were shown as specific peak profiles in three Salmonella serovars at an oven temperature of 61.4°C. Primer S3 could be used for the identification of Salmonella spp. None of the three primer sets could be used for the molecular genotype of Salmonella strains. [Conclusion] The PCR-DHPLC method could be used for quickly identification of different Salmonella serovars, but not for genotype of Salmonella strains.

**Key words:** DHPLC; Salmonella spp.; Identification; Typing; 16S rRNA gene

沙门菌鉴定的方法包括传统的生化鉴定和血清型分型和以 PCR 为基础的分子鉴定和分型方法。传统方法已不能满足对食源性致病菌进行溯源的需求, 因此从 DNA 水平对致病菌进行分型及鉴定已成为发展趋势。变性高效液相色谱 (DHPLC) 是 20 世纪 90 年代发展的一种新的核酸片段分析技术, 不但可用于细菌鉴定, 也可用于微生物的分型研究<sup>[1,2]</sup>。本研究预采用 16S rRNA 基因与 DHPLC 相结合的方法鉴定不同血清型沙门菌 (本研究主要关注与食源性疾病相关的肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌和猪霍乱沙门菌), 并且对于能否用于沙门菌菌株分型, 做一次新的尝试。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 本研究使用菌株如下: 肠炎沙门标准菌株 CMCC50041、分离株 16 株, 鼠伤寒沙门标准菌株 CMCC50115、分离株 13 株, 猪霍乱沙门菌分离株 5 株; 鸡白痢、鸡伤寒、亚利桑那和山夫顿堡沙门菌分离株分别为 9、4、2 和 2 株; 共

计 53 株。作为对照使用的菌株: 大肠杆菌 O157:H7 CMCC882364, 单核细胞增生李斯特氏菌 CMCC54004, 福氏志贺氏菌 ATCC12022, 大肠杆菌 ATCC25922。

所有菌株均用显色培养基及鉴别培养基和 API<sup>®</sup> 细菌诊断金标准进行生化鉴定。鉴定过的菌株保存于 -80℃ 备用。沙门菌血清型采用沙门菌属诊断血清 (60 种) 进行鉴定。

### 1.1.2 试剂

1.1.2.1 细菌培养及诊断试剂 法国科玛嘉显色培养基 (郑州博赛生物技术研究)、法国梅里埃 API<sup>®</sup> 细菌诊断金标准 (北京威泰科生物技术有限公司)、沙门菌属诊断血清 (60 种) (宁波天润生物药业有限公司)。

1.1.2.2 DHPLC 试剂 三乙基胺乙酸盐 (Triethylammonium Acetate, TEAA)、乙腈、水, 均为色谱纯。

洗脱液 A: 0.1 mol/L TEAA, 0.025% (v/v) 乙腈

洗脱液 B: 0.1 mol/L TEAA, 25% (v/v) 乙腈

1.1.2.3 分子生物学试剂 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/μl)、dNTP (10 mM): 天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.1.3 主要仪器 WAVE 核苷酸片段分析系统、WAVEMAKER Software Version 4.1、DNASep 柱、紫外检测器: 美国 Transgenomic 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 引物设计 本方法分别针对 16S rDNA 或 16S-23S 之间

作者简介: 杨福江 (1968-), 男, 副教授, 研究方向: 预防医学教学和科研

作者单位: 1. 河北邢台医学高等专科学校, 邢台, 054000; 2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所; 3. 中国农业大学动物医学院

序列设计了 3 对引物。见表 1。

表 1 16SrRNA 基因引物序列

编号	基因	引物序列 (5' → 3')	产物大小 (bp)	引物性质
S1	16S-23S rDNA	F: TTGTACACACCGCCCGTCA R: TCTCGATGCCAAGGCATCCACC	—	通用引物
S2	16S rDNA	F: ATTAGATACCCTGGTAGTCACGC R: TTGCGGGACTTAACCCAAC	316	通用引物
S3	16S-23S rDNA	F: TATAGCCCCATCGTGTAGTCAGACC R: TGCGGCTGGATCACCTCTT	312	沙门菌特异引物

## 1.2.2 16S rRNA 基因 PCR 扩增及测序

1.2.2.1 DNA 模板制备 取纯培养的菌悬液 50 μl, 加入 3 ml LB 肉汤中, 37℃、150 rpm 振荡培养 8 h, 再按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明, 提取模板 DNA。

### 1.2.2.2 PCR 扩增

1.2.2.2.1 目的基因扩增 分别用 3 对引物扩增目的基因序列。PCR 反应体系均为 50 μl: DNA 模板 150 ng、上下游引物 (10 μmol) 各 1 μl、dNTP (10 mmol) 4.0 μl、10×PCR Buffer 5.0 μl、Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 加去离子水至 50 μl。

1.2.2.2.2 PCR 反应程序 引物 S1: 95℃ 预变性 10 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。引物 S2 和 S3: 95℃ 预变性 10 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.2.2.2.3 琼脂糖凝胶电泳 用 1% 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定 PCR 产物纯度及产物大小。

1.2.2.2.4 测序和序列比对 为了确定 16S rRNA 基因产物可变区序列, 对 3 个血清型沙门菌的 S2 的 PCR 产物, 进行测序 (E. coli ATCC 25922 作为对照也进行测序), 然后用 DNA-MAN5.2.2 软件进行序列比对。

1.2.3 S2 产物异源双链杂交 选择肠炎沙门菌标准菌株作为杂交双链源, 将杂交双链源的 16S rRNA 基因的 PCR 产物与其他实验菌株的 16S rRNA 基因的 PCR 产物等量混合 (各 10 μL), PCR 仪中形成杂交双链: 95℃ 预变性 5 min, 然后以每秒钟降低 0.02℃ 的速度, 在约 50 min 内缓慢降温到 35℃。杂交产物于 4℃ 保存备用。

1.2.4 PCR 产物 DHPLC 分析 将 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物 (S1 产物) 或杂交产物 (S2 产物) 用 DHPLC 检测, 上样量均为 5 μl, 建立 5 种致病菌的标准参照图谱。S1 产物采用柱温 50℃, 流速 0.9 ml/min, 检测范围 200~600 bp, 200 bp (3.6 min) 时 A 液 42%、B 液 58%, 600 bp (10.8 min) 时 A 液和 B 液分别为 34% 和 66%, 洗脱和平衡时 A 液和 B 液分别为 47% 和 53%, 从上样至平衡结束共用时 10.9 min。S2 产物采用柱温 61.4℃, 流速 0.9 ml/min, 起始梯度 (0.5 min) A 液 45%、B 液 55%, 终末梯度 (5.0 min) A 液 36%、B 液 64%, 洗脱和平衡时 A 液和 B 液均为 50%, 从上样至平衡结束共用时 5.4 min。

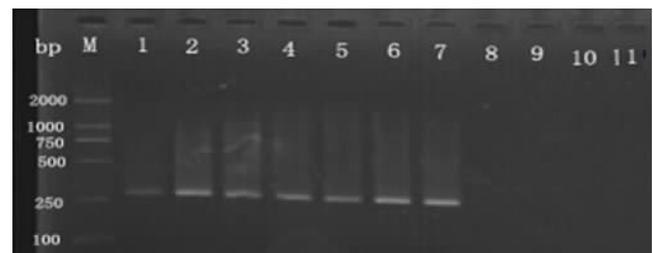
1.2.5 样品分析 对 10 株临床分离的 3 个血清型沙门菌 (经生化鉴定), 用部分变性 DHPLC 法进行鉴定, 根据峰型叠加结果鉴定血清型。

## 2 结果

### 2.1 沙门菌特异性引物 (S3) 的产物电泳鉴定

检测的 7 个血清型沙门菌, 均在 312 bp 处均出现电泳条带; 非沙门菌如大肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌和福氏志

贺氏菌则均为阴性。说明引物有较好的特异性, 可用于沙门菌的特异性鉴定, 但不能区分血清型。见图 1。

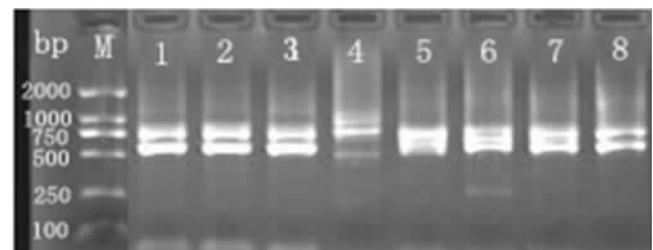


注: 1: 鼠伤寒沙门菌标准, 2: 鸡白痢沙门菌标准, 3: 山夫顿堡沙门菌, 4: 肠炎沙门菌, 5: 猪霍乱沙门菌, 6: 鸡伤寒沙门菌, 7: 亚利桑那沙门菌, 8: 大肠杆菌 O157:H7, 9: 单核细胞增生李斯特氏菌, 10: 福氏志贺氏菌, 11: 阴性对照

图 1 S3 产物电泳图谱

### 2.2 S1 产物鉴定

2.2.1 S1 产物电泳鉴定 不同菌属 PCR 产物大小及条带数量各不相同, 各血清型沙门菌电泳条带似乎无差别, 因此, 根据电泳条带无法对不同菌属和沙门菌血清型做出准确判断。见图 2。



注: 1: 鼠伤寒沙门菌标准, 2: 鸡白痢沙门菌标准, 3: 鸡伤寒沙门菌, 4: 单核细胞增生李斯特氏菌, 5: 福氏志贺氏菌, 6: E. coli O157:H7, 7: 肠炎沙门菌, 8: 猪霍乱沙门菌

图 2 S1 产物电泳图谱

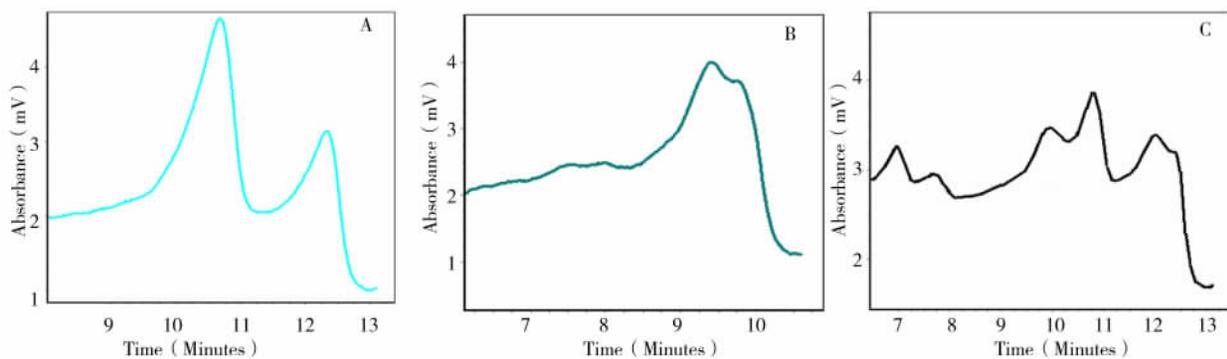
2.2.2 S1 产物 DHPLC 鉴定 S1 扩增产物用 DHPLC 在非变性条件下检测。见图 3。

在柱温 50℃ 时, S1 产物大小和数量各不相同, 因此 3 个血清型沙门菌的 DHPLC 色谱图的保留时间、峰形和峰的数目各不相同, 可以有效区分, 其他菌属更易区分。

### 2.3 S2 产物鉴定

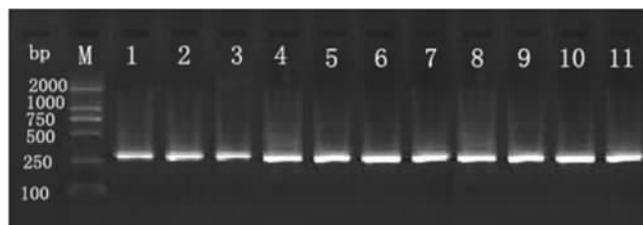
2.3.1 S2 产物电泳鉴定 检测的所有菌株, 均在 320 bp 左右处出现单一电泳条带, 因此, 对 S2 产物用电泳方法无法鉴别不同种属致病菌及沙门菌血清型。见图 4。

2.3.2 S2 产物 DHPLC 鉴定 S2 的 PCR 产物杂交双链用 DHPLC 在部分变性条件下检测, 见图 5。



注：A，猪霍乱沙门菌；B，鼠伤寒沙门菌；C，肠炎沙门菌

图 3 S1 产物 DHPLC 图谱



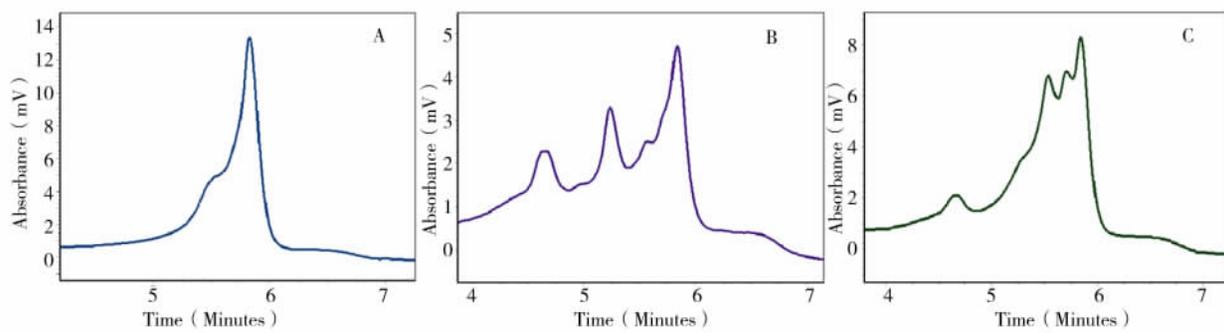
注：1：鼠伤寒沙门菌标准，2：鸡白痢沙门菌标准，3：山夫顿堡沙门菌，4：肠炎沙门菌，5：猪霍乱沙门菌，6：鸡伤寒沙门菌，7：亚利桑那沙门菌，8：大肠杆菌 O157：H7，9：单核细胞增生李斯特氏菌，10：大肠杆菌 ATCC 25922，11：福氏志贺氏菌

图 4 S2 产物电泳图谱

在部分变性条件下（柱温 61.4℃），3 个沙门菌血清型的扩增产物分别显示为保留时间和峰的数量各不相同的特异图谱。通过 DHPLC 的色谱图叠加功能，很容易区分和鉴定不同血清型。其他菌属亦可鉴别。

#### 2.4 16S rRNA 基因测序结果（部分序列）

鼠伤寒沙门菌与肠炎沙门菌和猪霍乱沙门菌相比，均有一个碱基的差别。经测序比对发现，同一血清型的不同地区和不同来源的分离株，其序列完全相同（测序结果未一一列出），因此 DHPLC 方法不能用于沙门菌菌株的进一步分型研究。见图 6。



A：肠炎沙门菌；B：猪霍乱沙门菌；C：鼠伤寒沙门菌

图 5 S2 产物 DHPLC 色谱图

鼠伤寒沙门菌 CMCC50115	GACATCCACAGAAGAATCCAGAGATGGATTGGTGCCTTC
肠炎沙门菌 CMCC50041	GACATCCACAGAAGAATCCAGAGATGGATTGGTGCCTTC
猪霍乱沙门菌分离株	GACATCCACGGAAGAATCCAGAGATGGATTGGTGCCTTC

图 6 不同血清型沙门菌 16S rRNA 基因序列比对结果（部分序列）

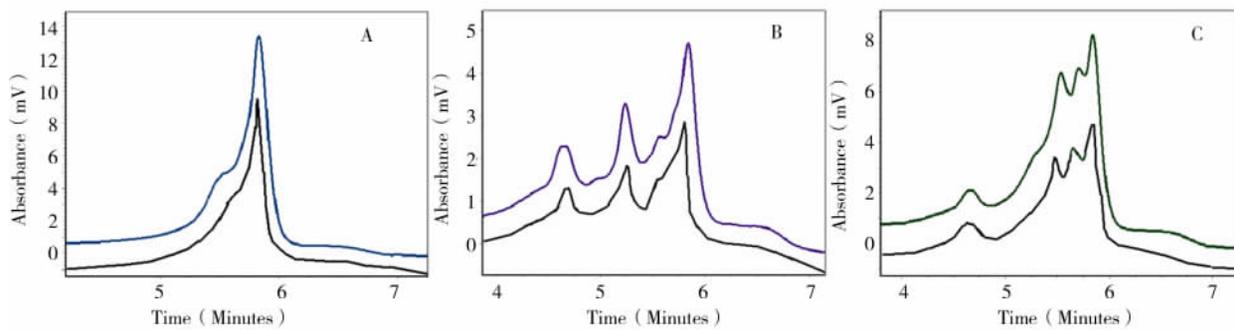
#### 2.5 样品鉴定结果

用部分变性方法对 10 株分离株进行了鉴定，结果有 3 株肠炎沙门菌、4 株鼠伤寒沙门菌，3 株猪霍乱沙门菌，与生化鉴定结果一致。见图 7。

### 3 讨论

此次研究，分别使用了针对 16S-23S ISR (Intergenic spacer region) 区或 16S rRNA 基因的 3 对引物。通过不同菌属相应基因的序列比对，选择基因保守区设计引物，扩增子中间跨越了高度可变区，因此不同种属致病菌乃至不同血清型沙门菌其中间序列各不同，因而可采用特定方法将其区分开来。S3

产物通过琼脂糖凝胶电泳，沙门菌均在相同位置出现条带，而非沙门菌则无条带出现，说明此对引物具有较好特异性，可用于沙门菌特异鉴定，但无法进行血清型鉴定。引物 S1 和 S2 理论上可用于不同种属的致病菌的鉴定，但是因普通凝胶电泳分辨率较低，无法区别相同位置的电泳条带。DHPLC 却具有很高的分辨率和灵敏度，在非变性条件下，因 PCR 产物双链长短不同和产物数量不等，而显示的保留时间和峰的数量不相同，因此可区分不同种属的致病菌，甚至在电泳图谱上显示无差别的不同沙门菌血清型亦可表现为不同的 DHPLC 色谱峰，因此 S1 可用于不同种属和不同血清型沙门菌的鉴定。不同种属致病菌和不同血清型的沙门菌，由于其 16S rRNA 基因（引



注：A：肠炎沙门菌；B：猪霍乱沙门菌；C：鼠伤寒沙门菌

图 7 10 株沙门菌分离株 DHPLC 鉴定图谱

物 S2 产物) 可变区序列的不同, 因此其杂交产物可在部分变性条件下, 因解链程度不同 (不互补的碱基首先解链), 导致峰形的差别, 而显示为特异的 DHPLC 色谱图, 可用于沙门菌血清型鉴定, 经实际样品的检测也证实了这一点。

由于进化压力较小, 16S rRNA-23S rRNA ITS (internal transcribed spacer) 区比 16S rRNA 或 23S rRNA 基因的遗传变异性更大<sup>[3]</sup>。因此理论上说, ITS 区可用于细菌的鉴定和甚至分型, 但是我们发现沙门菌的基因相当保守, 同一血清型的不同地区和年代菌株其序列并无差别, 因此 S1 和 S2 均不能对同一血清型沙门菌进行菌株分型。1998 年出现的多位点基因序列分析 (MLST), 同样由于沙门菌看家基因序列高度保守, 而不能将肠炎沙门菌分离株进一步分型<sup>[4]</sup>。或许是菌株来源差别不大, 本质上无区别, 或者是选择的基因变异不够大, 这种 DHPLC 方法不能用于沙门菌的分型。进一步扩大选择区域, 或寻找其他更易变异的基因, 如 *gyrB* 基因<sup>[5]</sup>, 也许可以达到此目的, 这将是我们今后的研究目标。

(致谢: 本研究受中国农业大学沈建忠教授承担的“十一五”国家科技支撑计划“食品安全关键技术”课题 (No. 2006BAK02A03) 资助, 在此表示衷心的感谢! 感谢国家计生

委研究所的张萌提供仪器操作和技术支持。)

参考文献:

- [ 1 ] Li JD, Gerhard DS, Zhang ZY, et al. Denaturing high-performance liquid chromatography for detecting and typing genital Human Papillomavirus[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 5563-5571.
- [ 2 ] Goldenberg O, Herrmann S, Adam T, et al. Use of denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven Candida species [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43: 5912-5915.
- [ 3 ] Hain T, Ward-Rainey N, Kroppenstedt RM, et al. Discrimination of Streptomyces albidoflavus strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers [J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47: 202-206.
- [ 4 ] 计融, 李燕俊, 王玉平, 等. 肠炎沙门菌多位点序列分型技术的研究 [J]. 卫生研究, 2008, 37 (1): 46-49.
- [ 5 ] 张嵘, 蔡加昌, 张书梅, 等. *gyrB* 基因和 16S rRNA 基因序列分析在沙门菌属细菌鉴别中的临床应用评价 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27 (4): 368-369.

(收稿日期: 2010-01-19)

## 中国科技核心期刊

# 《中华临床医师杂志(电子版)》

## 2011 年度征稿征订

《中华临床医师杂志 (电子版)》是中国科技核心期刊, 半月刊, 全年出刊 24 期, 定价 672 元, 国内刊号 CN 11-9147/R, 邮发代号 80-728, 被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。

2011 年度重点栏目征稿及 2011 年优惠征订详情请见中华临床医师杂志官方网站 [www.clinicmed.net](http://www.clinicmed.net) 的期刊动态。欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志! 欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文!

投稿信箱: 北京市 100035-50 信箱 编辑部 收 邮编 100035

投稿邮箱: [Lcdoctor@163.com](mailto:Lcdoctor@163.com)

电话: 010-62219211

传真: 010-62222508

网址: [www.clinicmed.net](http://www.clinicmed.net)