

论著

中国部分食品中肠炎沙门菌分离株的 PFGE 分子型别分析研究

李燕俊¹ 刘秀梅¹ 赵 熙¹ 吴 婷² 崔志刚³ 计 融¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021; 2. 四川大学,四川 成都 610041;
3. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,北京 102206)

摘 要:目的 研究中国食品中肠炎沙门菌分离株的分子谱别。方法 用脉冲场凝胶电泳分型技术对从中国 11 个省市食品中分离的 51 株肠炎沙门菌进行分子分型。结果 肠炎沙门菌经 2 种内切酶 Xba I、Spe I 处理后,均分为 11 个不同的带型。两种内切酶的分型结果不相同,但其中有部分交叉。2 种内切酶的 PFGE 分型都有 2 个主要的带型,分别涵盖了分离株的 70%,并在两型之间有部分兼容性。通过双酶系统的多重分型,还可以将其中的型别进一步区分为亚型。在各地之间菌株的型别分布无明显规律,在各种食品之间菌株的型别分布,Spe I 酶切后的结果更有规律。分离自羊肉中的 4 株菌经 Xba I、Spe I 酶切表现为同一 PFGE 型别,在 Xba I 分型结果中为 XF 型,在 Spe I 分型结果中为 SE 型,揭示了一定的亲缘关系。结论 脉冲场凝胶电泳分型技术是肠炎沙门菌分子分型的有效手段。

关键词:沙门菌;肠炎;食品;电泳;凝胶;脉冲场;细菌分型技术

Study on Molecular Type of *Salmonella enteritidis* Strains Isolated from Foods in China

LI Yan-jun, LIU Xiu-mei, ZHAO Xi, WU Ting, CUI Zhi-gang, JI Rong

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: **Objective** To research the molecular type of *Salmonella enteritidis* strains isolated from foods in China. **Method** 51 strains of *Salmonella enteritidis* which were isolated from foods in 11 provinces were identified by pulsed field gel electrophoresis. **Results** 11 distinct DNA fragment profiles, PFGE types A to K, were observed by 2 kinds of enzyme digestion (Xba I, Spe I), respectively. Between 2 kinds of enzyme system, the results were not the same, but there were some intercrossed. There were 2 dominant patterns in 2 kinds of restricted enzyme system occupying 70% of all isolates, respectively. The pattern type XF and XK of the Xba I profile could be further subtyped by Spe I profile. There was no correlation between the strain profiles and the isolated regions. However, 4 strains isolated from the mutton were the same molecular type in 2 kinds of restricted enzyme systems, showing certain epidemiological trend. **Conclusion** PFGE could be a effective method for determining the molecular epidemiological relationship among the different *Salmonella enteritidis* strains.

Key word: *Salmonella enteritidis*; Food; Electrophoresis, Gel; Pulse-Field; Bacterial Typing Techniques

随着经济建设的不断发展,我国食品分发运输途径发生了巨大的变化,控制食源性疾病的必要措施或技术手段不能再局限于某些事件发生的范围内,而要针对全国乃至全球食源性疾病流行的特点进行对比,通过同类病原菌的分子型别溯源,寻找可能的共同致病食品。过去,传染病的流行病学调查基本上是根据详细评价阳性案例和一批适当的对照,确定调查指示的可疑因素与特殊疾病的关联。实验室从可疑来源中分离和鉴定病原体为流行病学假设提供独立的证据。当一些实验室方法能够鉴定

细菌到种以下(血清型、生物型、噬菌体型)时,就可以在流行病学调查中把病例和可疑传染源进行匹配溯源。此外,在长期的致病菌分离、鉴定、监测工作中,如能对致病菌进行精确分型,就有可能找出其中的流行趋势,并最终达到疾病预警的目的,实现我国“预防为主”的公共卫生方针。目前国际上已有将脉冲场凝胶电泳(pulse-field gel electrophoresis, PFGE)分子分型方法用于沙门菌分子流行病学调查的多项应用实例^[1-3],本实验室也已在这方面进行了一些尝试^[4]。我们对方法进行了一些改进研究,并据此对我国食品中分离的肠炎沙门菌进行了分型。

基金项目:“十五”课题国家科技攻关重大项目《食品安全关键技术》

课题“食源性疾病的监控技术的研究”(2001BA804A03)

作者简介:李燕俊 女 副研究员

通讯作者:计 融 男 研究员

1 材料与方法

1.1 肠炎沙门菌分离株 以我国 11 个省市食品中分离的 51 株肠炎沙门菌为实验用菌株,其地区来源

及食品来源如表 1、2 所示。以 WHO 考核肠炎沙门菌 S8 株和 50041 株(中国医学科学院药品生物制品检定所)为肠炎沙门菌的标准菌株。

表 1 肠炎沙门菌株的来源

来源	数量	菌株编号
WHO 考核菌株	1	S8
标准菌株 50041	1	53
吉林	3	S1、S5、S65
河南	20	S14、S15、S148、S154 ~ S163、S168、S170、S171、S172、S182、24、26
浙江	4	S39、S95、29、30
黑龙江	2	S44、S45
湖北	1	S75
重庆	2	S127、S134
广西	1	S135
福建	1	S218
内蒙	3	1、2、4
江苏	2	15、18
北京	12	33、34、35、37、38、39、44~49

表 2 肠炎沙门菌分离株的食品来源

来源	数量	菌株编号
牛肉	7	S1、S45、S157~S161
鸭肉	1	S39
猪肉	2	S65、S148
羊肉	4	S75、S154、S155、S156
熟肉	4	S168、S170、S171、S172
蔬菜	1	S182
鸡肉	30	S5、S14、S15、S44、S127、S134、S162、S163、S218、1、2、4、15、18、24、26、29、30、33、34、35、37、38、39、44~49
其他	4	S8、S95、S135、53

1.2 试剂 营养琼脂(陆桥公司)、营养肉汤 LB(陆桥公司)、溶菌酶(美国 Sigma 公司)、蛋白酶 K(德国 Merck 公司)、PMSF(美国 Sigma 公司)、限制性内切酶 Xba I(美国 Promega 公司)、限制性内切酶 Spe I(美国 Promega 公司)、低熔点琼脂糖(美国 Bio-Rad 公司)、电泳级琼脂糖(美国 Promega 公司)、λ噬菌体分子量 marker(美国 Promega 公司)。

细胞悬浮液(1 mol/L Tris - 盐酸 (pH 7.2) 15 ml; 2.5 mol/L 氯化钠 2.4 ml; 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 30 ml; 纯水加至 300 ml)、溶菌酶缓冲液(1 mol/L Tris - 盐酸 (pH7.2) 2 ml; 2.5 mol/L 氯化钠 4 ml; 纯水加至 200 ml)、蛋白酶 K 缓冲液(0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 60 ml; 2.5 mol/L 氯化钠 6 ml; 纯水加至 300 ml)、TE 缓冲液(1 mol/L Tris - 盐酸 (pH 8.0) 10 ml; 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 50 ml; 纯水加至 500 ml)、0.5 ×TBE 电泳缓冲液(Tris 13.5 g; 硼酸 6.875 g; 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 5 ml; 纯水加至 2 500 ml)。

1.3 主要实验仪器 SW22 型水浴摇床(德国 Julabo 公司)、5415D 型台式高速离心机(德国 eppdorf 公司)、CHEF - mapper 型脉冲场凝胶电泳仪及配套设备(美国 Bio - Rad 公司)、凝胶成像系统(美国 Bio - Rad 公司)。

1.4 肠炎沙门菌的 PFGE 分子分型方法 挑取单个菌落,接种于 3 ml LB, 37 °C振荡培养 16 h。12 000 r/min 离心 1 min,弃上清,加细胞悬浮液,重复 2 次后,与等体积的 2 %的低熔点琼脂糖混匀,混合物加入模具孔中,待其凝固后加溶菌酶、蛋白酶 K 作用,待胶块透明后浸入 TE 缓冲液中,4 °C保存。切取胶块,选取寡切点的 Xba I、Spe I 作为本研究中的限制性内切酶,37 °C过夜酶切后,将胶块及 Marker (范围 50 kb ~ 1 000 kb,每条带的跨度为 50 kb)放入 1 %的琼脂糖凝胶孔中,电泳。Xba I 酶切后的 PFGE 电泳参数为:1 %琼脂糖、0.5 ×TBE 缓冲液、14 °C,6 v/cm,120 °,4 h (25 ~ 65 s),14 h (5 ~ 24 s);Spe I 酶切后的 PFGE 电泳参数为:1 %琼脂糖、0.5 ×TBE 缓冲液、14 °C,6 V/cm,120 °,4 h (25 ~ 65 s),16 h (2 ~ 24 s)。电泳结束后,凝胶用 EB 染色 20 ~ 30 min,脱色 15 min,紫外灯下观察结果,并通过凝胶成像照像。采用 Bionumerics 4.0 软件对酶切图谱进行分型,首先将带型相似的菌株分群,在同一个群中再根据条带的差异定为不同的带型。

2 结果

2.1 Xba I 酶切后的 PFGE 分型结果 经 Xba I 酶切后进行 PFGE 分型,49 株菌株共分为 11 个不同的带型,其中 XF、XK 型为 2 个主要的型别,分别占 38.8 %及 30.6 %,其余各型各有 1 ~ 3 株不等,结果如表 3 所示。

表 3 肠炎沙门菌 Xba I 酶切 PFGE 分型结果

型别	酶切后条带数	包含菌株	数量 (%)
XA	10	44、S45、S65	3(6.1)
XB	13	S134、S95	2(4.1)
XC	11	S148、S5	2(4.1)
XD	8	S1	1(2.0)
XE	15	S8、49	2(4.1)
XF	11	15、24、29、33、37、38、46、47、48、S135、S75、S154、S155、S156、S161、S162、S168、S182、S218	19(38.8)
XG	10	53	1(2.0)
XH	12	S14、45	2(4.1)
XI	13	39	1(2.0)
XJ	11	34	1(2.0)
XK	11	1、4、18、S15、S39、S44、S127、S157、S158、S159、S160、S163、S170、S171、S172	15(30.6)

注:数量指菌株数; %指占有所有菌株的比例。

2.2 Spe I酶切后的 PFGE 分型结果 经 Spe I酶切后进行 PFGE 分型,电泳后,48 株菌株共分为 11 个不同的带型,其中 SA、SE 型为 2 个主要的型别,分别占 25.0 %及 47.9 %,其余各型各有 1~2 株不等,结果如表 4 所示。

表 4 肠炎沙门菌 Spe I酶切 PFGE 分型结果			
型别	酶切后条带数	包含菌株	数量(%)
SA	20	4、15、29、33、37、38、49、S5、S15、S170、S171、S182	12(25.0)
SB	18	39、S44	2(4.2)
SC	21	S95	1(2.1)
SD	15	S8	1(2.1)
SE	20	1、24、46、48、53、S14、S39、S45、S65、S75、S135、S148、S154、S155、S156、S158、S159、S160、S161、S162、S163、S168、S172	23(47.9)
SF	21	45、S218	2(4.2)
SG	23	S127	1(2.1)
SH	14	44、S134	2(4.2)
SI	19	S1、S157	2(4.2)
SI	17	34	1(2.1)
SK	16	35	1(2.1)

注:数量指菌株数; %指占有所有菌株的比例。

2.3 双酶系统的双重分型结果 在用 Xba I、Spe I 作为核酸内切酶时均有一个优势型别,包括了多个菌株,但是用双酶系统互相对照进行双重分型后,可以分别将这两个优势型别再次精细划分为亚型,如表 5、表 6。

表 5 Xba I酶切结果中 XF 型菌株亚型分型结果		
亚型	包含菌株	数量(%)
XF/SA	15、29、33、37、38、S182	6(31.6)
XF/SE	24、46、48、S75、S135、S154、S155、S156、S161、S162、S168	11(57.9)
XF/SF	S218	1(5.3)
/	47(该菌株未得出 Spe I酶切 PFGE 分型结果)	1(5.3)

注:数量指菌株数; %指占有 XF 型菌株的比例

表 6 Xba I酶切结果中 XK 型菌株亚型分型结果		
亚型	包含菌株	数量(%)
XK/SA	4、S15、S170、S171	4(26.7)
XK/SB	S44	1(6.7)
XK/SE	1、S39、S158、S159、S160、S163、S172	7(46.7)
XK/SG	S127	1(6.7)
XK/SI	S157	1(6.7)
/	18(该菌株未得出 Spe I酶切 PFGE 分型结果)	1(6.7)

注:数量指菌株数; %指占有 XK 型菌株的比例

2.4 肠炎沙门菌 PFGE 分型结果地区分布规律 经 Xba I、Spe I酶切后进行 PFGE 分型,结果显示,

在各地区之间菌株的型别分布无明显规律,即使是一些菌株很少的地区,如吉林、黑龙江、重庆、内蒙等地,仅有的几株菌也大多分为不同的型别。

2.5 肠炎沙门菌 PFGE 分型结果食品分布规律 经 Xba I、Spe I酶切后进行 PFGE 分型,结果显示,在各种食品之间菌株的型别分布,Spe I酶切后的结果更有规律,如分离自猪肉中的 2 株肠炎沙门菌在 Spe I酶切后均表现为 SE 型,来自牛肉中的 4 株肠炎沙门菌在 Spe I酶切后则表现为 SE、SI 两型,而上述菌株的 Xba I酶切分型结果则没有规律。此外,分离自羊肉中的 4 株菌在 Xba I、Spe I酶切后的 PFGE 分型结果中均表现为同一型别,在 Xba I分型结果中为 XF 型,在 Spe I分型结果中为 SE 型。

3 讨论

本研究采用了 Xba I、Spe I作为核酸内切酶,对肠炎沙门菌的基因组 DNA 进行处理,再用 PFGE 方法对其进行分型。两种内切酶的 PFGE 分型结果不相同,但其中有部分交叉。两种内切酶的 PFGE 分型都有 2 个主要的带型,包含了其中半数以上的菌株,因而在该型别内部,分辨率差,不利于对菌株进行区分乃至溯源。双酶系统的双重分型与只用一种内切酶的分型方法比较,提高了方法的分辨率^[4]。我国肠炎沙门菌分离株 2 种酶切后的 PFGE 的主要型别 XF 与 SA、XK 与 SE 有很好的相容性,即 XF 型中 31.6 %为 SA 型株,57.9 %为 SE 型株;XK 型中 26.7 %为 SA 型株,46.7 %的 SE 型株。

在本研究中,从各地分离的肠炎沙门菌的分型没有明显的规律,各地几乎均有主要型别的菌株存在,个别型别的菌株的出现也没有特异性。但在菌株分离的食品来源中,在羊肉中分离的肠炎沙门菌,则无论在 Xba I酶切分型结果中,还是在 Spe I的酶切分型结果中,全部为同一个型别,显示了一定的亲缘关系。但是由于本次研究菌株数量有限,尚不能据此得出我国不同食品中肠炎沙门菌的分子型别特征,需要在今后分离更多的菌株,以便从地区分布、时间分布、食品种类分布等多个方面进行多项分子流行病学研究,建立大型的食源性菌株数据库,为我国的食源性疾病预防溯源工作服务。

参考文献

[1] RASSCHAERT G, HOUF K, GODARD C, et al. Contamination of carcasses with Salmonella during poultry slaughter[J]. J Food Prot. 2008, 71(1): 146-152.

[2] ZHENG J, KEYS C E, ZHAO S, et al. Enhanced subtyping scheme for Salmonella enteritidis[J]. Emerg Infect Dis. 2007, 13(12): 1932-1935.

论著

火麻仁油安全性评价及血清抗氧化功能初步研究

扈学俸 李永进 王军波 宋晓明 李 勇
(北京大学公共卫生学院,北京 100083)

摘 要:目的 研究火麻仁油的急性毒性、遗传毒性和亚慢性毒性,同时初步研究火麻仁油对大鼠血清抗氧化能力的调节作用。方法 采用急性毒性试验、小鼠骨髓细胞微核试验、Ames 试验、小鼠精子畸形试验和大鼠90 d喂养试验对火麻仁油的安全性进行评价,并对90 d喂养试验大鼠血清抗氧化指标进行测定。结果 火麻仁油对雌雄性大、小鼠经口LD₅₀均大于每公斤体重21.5 g,属无毒类。3项致突变实验均未显示出致突变性。大鼠90 d喂养实验各项结果均未见明显毒性,未观察到有害作用剂量水平为每公斤体重10.0 g。此外,经90 d喂养,每公斤体重10.0 g组雌、雄大鼠血清SOD、GSH-Px水平提高,MDA水平降低,与大豆油组和普通组相比均差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 在试验条件下火麻仁油为无毒物,未显示有遗传毒性作用及亚慢性毒性;血清抗氧化指标检测结果提示火麻仁油具有一定抗氧化功能,值得进一步探讨。

关键词:火麻仁;血清;抗氧化剂;急性毒性试验;毒性试验;慢性

Study on Safety Assessment and Antioxidant Function in Serum of Hemp Seed Oil
HU Xue-feng, LI Yong-jin, WANG Jun-bo, SONG Xiao-ming, LI Yong
(School of Public Health, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Objective** To research the acute, genotoxicity and subchronic oral toxicity of the hemp seed oil, and to study the antioxidant function in serum of hemp seed oil. **Method** Acute toxicity test, Ames test, micronucleus test of born marrow, sperm shape abnormality in mice and 90-day feeding test in rats were used to assess the safety of hemp seed oil, and antioxidant indexes in rat serum were also determined. **Results** The oral LD₅₀ of hemp seed oil in mice was more than 21.5 g/kg BW, so the hemp seed oil belonged to actual non-toxicity. The results of Ames test, micronucleus test of born marrow and sperm shape abnormality in mice were negative. No obvious adverse effects were observed at the dose level of 10.0 g/kg BW in the 90-day feeding test in rats. SOD and GSH-Px levels increased and MDA level decreased significantly in rat serum at the end of 90-day feeding with hemp seed oil, in comparison with control groups of soybean oil and the normal diet, and there were significant differences in hemp seed oil group ($P < 0.05$). **Conclusion** No adverse effects were observed in the series of toxicity tests and hemp seed oil could be safe to eat at the level of 10.0 g/kg BW. The change of antioxidant indexes in rat serum indicated that the antioxidant function of hemp seed oil should be further evaluated.

Key word: FRUCTUS CANNABIS;Serum;Antioxidants;Acute Toxicity Tests;Toxicity Tests,Chronic

[3] DAVIS M A, BESSER T E, ECKMANN K, et al. Multidrug-resistant salmonella typhimurium, Pacific northwest, United States[J]. Emerg Infect Dis. 2007, 13(10): 1583-1586.

[4] 李燕俊,赵熙,杨宝兰,等. 肠炎沙门菌脉冲场凝胶电泳分型研究[J]. 卫生研究, 2005, 34(3): 338-340.

[5] SCHWARTZ D C, CANTOR C R. Separation of yeast chromosome size DNA by pulsed field gradient gel electrophoresis[J]. Cell, 1984, 37: 67-67.

[6] 卢圣栋,主编. 现代分子生物学实验技术[M]. 1版. 北京:高等教育出版社,1993:84-86.

[7] LUKINMAA S, TAKKUNEN E, SIITONEN L A. Molecular epidemiology of Clostridium perfringens related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(8): 3744-3749.

[8] MARY E P, TERRY K, CINDY K, et al. Four strains of Eschewrichia coli O157:H7 isolated from patients during an outbreak of disease associated with ground beef: importance of evaluating multiple colonies from an outbreak-associated product[J]. J Clin Microbiol, 2002, 4: 1530-1533.

[收稿日期:2008-03-31]

中图分类号:R15; R378.22 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2008)05-0385-04

基金项目:国家十一五科技支撑计划(2006BAS27B08)
作者简介:扈学俸 男 硕士研究生
通讯作者:李 勇 男 教授