

综述

Sau-PCR 分子分型技术及应用

张淑红,吴清平,徐晓可,张菊梅,郭伟鹏

(广东省华南应用微生物重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地,广东省菌种保藏与应用重点实验室,广东省微生物应用新技术公共实验室,广东省微生物研究所,广东 广州 510070)

摘要: Sau-PCR 是 2005 年新发展的一种限制性内切酶(*Sau3AI*)酶切和 PCR 扩增相结合的分子分型技术,该技术是在扩增片段长度多态性(AFLP)和随机扩增多态性 DNA 片段(RAPD)方法的基础上建立起来的,具有重复性好、简单、快捷等优点,近年来被逐步应用于食品污染和院内感染的分子流行病学调查。本文对 Sau-PCR 的原理、技术特点及其应用情况等进行了介绍。

关键词: Sau-PCR; 分子分型; 食源性致病菌; 应用

中图分类号: R378 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2012)02-0180-05

Sau-PCR molecular typing technology and its application

Zhang Shuhong, Wu Qingping, Xu Xiaoke, Zhang Jumei, Guo Weipeng

(State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry—Guangdong Province Jointly Breeding Base), Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Provincial Public Laboratory for Applied and New Technology of Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Guangzhou 510070, China)

Abstract: Sau-PCR is a novel amplification technique for tracing the genetic fingerprint of microorganisms. Based on the digestion of genomic DNA with restriction endonuclease *Sau3AI* and subsequent amplification with primers whose core sequence is based on the *Sau3AI* recognition site, the reproducibility of the assay was as high as amplified fragment length polymorphism (AFLP) and is as quick and easy as random amplified polymorphic DNA (RAPD). Nowadays, Sau-PCR has been gradually used to determine the source of food pathogens and monitor the epidemiology of nosocomial infection. The principle, technical characteristics and the application of Sau-PCR were introduced in this paper.

Key words: Sau-PCR; molecular typing; foodborne pathogens; application

分子分型技术能够根据病原微生物的生化特征或基因组成分析不同来源菌株间的关系,从而对食源性疾病暴发追踪溯源,是食品污染和院内感染分子流行病学调查中必不可少的分析方法。传统的分型技术主要根据微生物的生理生化特征等表型来判断,尽管在实验室中广泛使用,但敏感性低,可重复性较差,分型结果存在一定误差。随着分子生物学的发展,分子分型技术逐步发展起来并越来越多地用于微生物分类鉴定和分子流行病学研究中,如脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel

electrophoresis, PFGE)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、随机扩增多态性 DNA 片段(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、基因间共有重复序列(enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR, ERIC-PCR)、基因外重复回文序列(repetitive extragenic palindromic elements PCR, Rep-PCR)等,这些分子分型技术具有分辨率高、快速简便等技术特点,为食源性疾病溯源、预防和控制提供了有力的工具^[1-5]。

2005 年 Corich 和 Mattiazzi^[6]报道了一种新的分子分型技术——Sau-PCR。该技术是在 AFLP 和 RAPD 方法的基础上发展起来的,保留了 AFLP 重复性好和 RAPD 简单快捷等优点,同时克服了这两种方法的缺点,如 RAPD 的不稳定性和 AFLP 操作繁琐等。本文就 Sau-PCR 原理、技术特点及其应用情况作一介绍。

收稿日期: 2011-08-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(U1031003); 广东省科技计划项目(2010B031000020、2009B030803010)

作者简介: 张淑红 女 助理研究员 研究方向为食品微生物安全快速检测技术 E-mail: zhangshh2001@163.com

通信作者: 吴清平 男 研究员 研究方向为食品微生物安全检测及控制技术 E-mail: wuqp203@yahoo.com.cn

1 Sau-PCR 技术的基本原理

Sau-PCR 是一种将限制性内切酶酶切和 PCR 扩增相结合的分型技术,所采用的限制性内切酶为 *Sau3AI*,该酶具有特殊的识别位点 GATC,G + C 含量为 50%,消化基因组可产生大量适度大小的核酸片段,且带有 GATC 黏性末端。以此黏性末端为中心设计引物,并在 5'端加上 CCGCCG -7 个寡核苷酸链,为 PCR 过程中的高严谨扩增提供较高的退火温度,降低非特异扩增;同时在 3'端加上某核苷酸(数量、种类可变)以增强引物的选择性,产生合适的电泳条带数。因此,Sau-PCR 是建立在 AFLP 技术对基因组 DNA 进行酶切消化和 RAPD 随机扩增的基础上的。一方面它借鉴 AFLP 技术基于限制性内切酶识别序列设计引物进行 PCR 扩增(引物无需添加头),另一方面与 RAPD 方法类似,其产物可直接通过琼脂糖凝胶电泳进行分析。

2 Sau-PCR 技术的操作过程及特点

Sau-PCR 技术的操作过程包括基因组 DNA 提取、限制性酶切、引物设计与筛选、PCR 扩增、凝胶电泳和聚类分析等过程。

2.1 基因组 DNA 提取和限制性酶切

Sau-PCR 技术可以应用于所有能提取基因组的有机体,对 DNA 提取质量要求相对较高,通常采用十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethylammonium bromide,CTAB)法或试剂盒法获得较高纯度的 DNA 模板,尽量减少杂质干扰。利用 *Sau3AI* 酶消化基因组,一般 200 ng DNA,加 1 μ l *Sau3AI*,配成 20 μ l 体系。

2.2 引物设计与筛选

引物设计首先以酶切位点 GATC 为核心,5'末端加 CCGCCG 7 个富含 GC 的寡核苷酸,3'末端加 1~3 个选择性碱基,然后分别用 3'端多出 1~3 个碱基的引物(SAUT,SAG,SGAG,SCA,STG 等)扩增酶切产物,分析选择合适的引物。引物筛选原则:扩增出的条带数目、大小都比较合适,带型清晰可辨。

2.3 PCR 扩增

Sau-PCR 扩增程序主要由 3 部分构成^[6],见图 1。

(1)填补酶切产物的黏性末端:开始 25 $^{\circ}$ C 退火 5 s,然后以 0.1 $^{\circ}$ C/s 的速度逐渐升温至 60 $^{\circ}$ C,60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s。低温起始反应是为了防止基因片段变性导致填补失败。

(2)低严谨性扩增:94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,50 $^{\circ}$ C 退火 15 s,后以 0.1 $^{\circ}$ C/s 的速度逐渐降温至 25 $^{\circ}$ C,再以

同样的速度回升至 50 $^{\circ}$ C,50 $^{\circ}$ C 扩增 30 s。

由于这一步退火的引物片段仅有核心序列和选择性核苷酸,5'端不参加反应,导致退火温度会较低,所以先采用递减温度循环以降低特异性扩增,然后采用递增温度扩增,防止引物脱落,使扩增成功。

(3)高严谨性扩增:94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,适宜温度(根据引物选择)退火 1 min,65 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,65 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。这一步骤中引物全长片段参加反应,能采用较高的温度退火,进行高严谨性扩增。

2.4 凝胶电泳和聚类分析

将扩增产物进行凝胶电泳,然后利用 Quantity One 相关软件对得到的 Sau-PCR 指纹图谱进行分析,采用非加权算术平均组对法(unweighted pair-group arithmetic method,UPGMA)做遗传分析的树状图,分析菌株间的亲缘关系。

3 Sau-PCR 技术的应用

Sau-PCR 作为一种新的分子分型技术,近年来已逐步用于食品污染源追踪和院内感染分析等方面,下面将 Sau-PCR 技术在几种常见病原微生物分型中的应用情况作一介绍。

3.1 沙门菌

沙门菌(*Salmonella*)是肠杆菌科的一个属,菌型繁多,已发现有 2000 种以上的血清型,极易污染食品、水及其他样品,可引起食物中毒^[7]。狄慧玲和石磊^[8]等利用 Sau-PCR 技术对 14 株不同食品来源的沙门菌分离株进行基因分型。结果发现,使用 STG 引物扩增可产生较多数量的条带,图谱清晰可辨,14 株分离株均可得到 6~11 条大小在 200~1500 bp 的片段,有利于分型,Sau-PCR 技术展现了良好的多态性。3 次抽提 DNA、酶切和扩增,其图谱基本一致,显示了良好的重现性和稳定性。此外,试验中还发现,即使是相同血清型的沙门菌菌株,也呈现了各自特异性的条带,表明在某些情况下,Sau-PCR 还可用于血清型相同但是基因型不同的细菌的区分。

3.2 志贺菌

志贺菌(*Shigella*)是一类重要的食源性致病菌,由志贺菌引起的细菌性痢疾(简称菌痢)是一种遍及世界的常见病、多发病^[9]。全球每年发病人次估计达 1.65 亿,约 110 万病例死亡,发病率和病死率居感染性腹泻之首^[10]。王秋艳^[11]对一起由福氏志贺菌引起的食物中毒事件中的 5 株分离株进行了溯源,其中 2 株来自残余食物,3 株来自患者肛拭子。分别采用 ERIC-PCR、Sau-PCR 和 PFGE3 种方法对

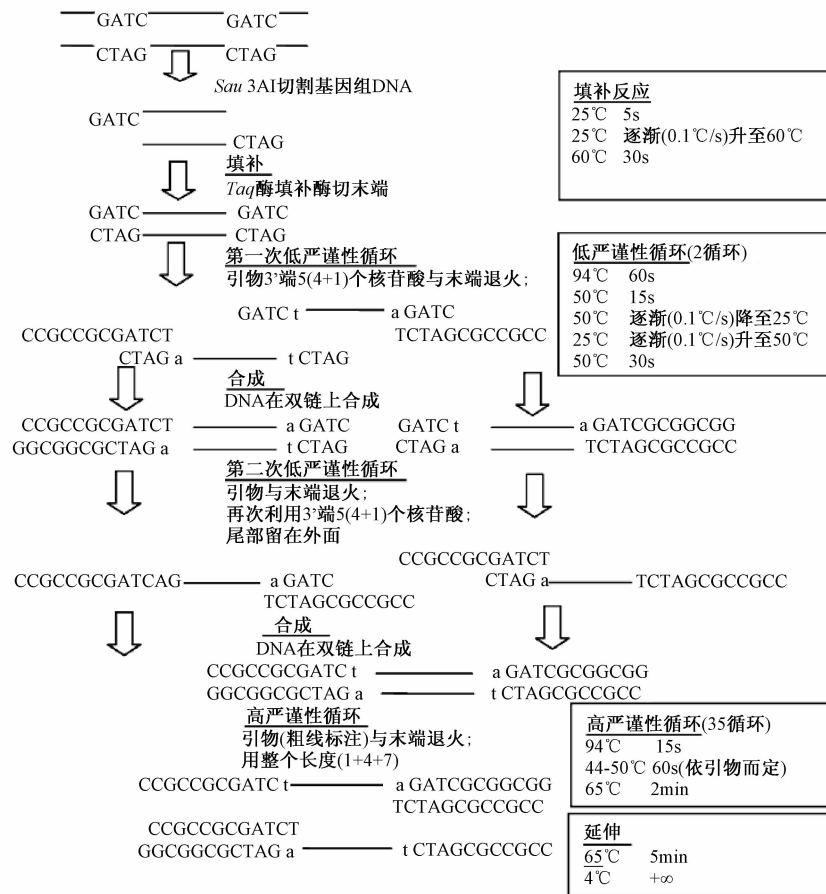


图1 Sau-PCR(SAUT 引物)扩增流程图

Figure 1 The flow chart of Sau-PCR (primer SAUT) amplification

这5株菌株进行基因分型,结果表明,3种分型方法对5株分离株的分型结果一致,菌株带型相似率都为100%。在Sau-PCR分型中,引物SAUT扩增约12条条带,大小为100~1500bp,条带数目、大小都比较合适,带型清晰可辨,而且5株菌株的带型基本一致,表明5株分离株在遗传学上具有高度同源性,由此推断此次食物中毒事件可能是由该餐馆的食物受污染所致。Sau-PCR方法为此次食物中毒追踪溯源提供了重要的分子流行病学依据。

3.3 单核细胞增生李斯特菌

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是国际上公认的四大食源性致病菌之一,广泛存在于肉制品和奶制品中,可引起新生儿脑膜炎和孕妇流产等疾病^[12-13]。Cocolin等^[14]采用RAPD和Sau-PCR方法对不同地区和样品来源(包括食品、工厂环境和动物)的单核细胞增生李斯特菌分离株进行基因分型,结果显示,在80%相似系数下,Sau-PCR方法(SAU引物)可以将分离株进行较好的区分,特别是对2003年两个时间段采集的工厂环境和动物分离株,Sau-PCR方法的图谱和聚类分析产生了清晰结果,将环境分离株和动物分离株分别划分为4个簇和3个簇,具有很好的分辨率。但是Sau-PCR

方法未能对食品样品的分离株进行有效区分。

3.4 副溶血性弧菌

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种嗜盐性革兰阴性致病菌,广泛存在于海水及海产品中,可引起人类急性胃肠炎^[15]。毕水莲等^[16]对广州一起由副溶血性弧菌引起的食物中毒进行常规鉴定后,应用Sau-PCR和AFLP分别对从食品和病人样品中分离的3株菌株进行分子分型,结果显示,1株患者分离菌与2株食品分离菌的Sau-PCR和AFLP型别均相同,3株菌株来源于同一克隆菌株。在Sau-PCR分型中,用引物SGAG扩增的条带最为清晰,3株菌株的扩增条带均为9条,条带大小在150~1500bp之间,且扩增图谱完全相同,可以认定食物中毒是由同一来源的副溶血性弧菌所引起。

3.5 格氏乳球菌

格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)是一种存在于鱼类和乳制品中的常见病原菌。Foschino等^[17]采用RAPD、AFLP和Sau-PCR方法对意大利北部乳制品和鱼肉中的格式乳球菌分离株进行基因分型,结果表明,3种方法对格式乳球菌都产生了很好的区分效果,相似度达到84.4%~97.5%。其中Sau-PCR方法的平均可重复率为87.5%,SAG引物扩增

产生了多条 200 ~ 2000 bp 大小的条带,可以有效区分所有的分离株。聚类分析表明,96% 的鱼肉分离株分成 8 个基因型,分别归于 5 个不同的簇(A、D、E、F 和 G),98% 的乳制品分离株聚类成 2 个簇(B 和 C),而来自山羊奶的分离株归为一个基因型独特的簇。此外,在分析格氏乳球菌在环境中的分布情况方面,Sau-PCR 方法也展现了良好的可靠性。

3.6 洋葱伯克霍尔德菌

洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)是临床上一种重要的病原微生物。Yan 等^[18]采用 Sau-PCR 方法分析了一起由洋葱伯克霍尔德菌引起的院内感染。调查中分离了 11 株菌株,其中 9 株来自肺部囊性纤维化患者的血液,1 株来自患者的痰,1 株来自院内反渗透水。Sau-PCR 分型结果显示,10 株来自患者的菌株中,除 1 株外,其余均表现出 100% 同源性。反渗透水分离株与血液分离株的图谱完全一致,提示此次院内感染的污染源可能来源于反渗透水。为进一步核实实验结果,Yan 等同时采用 PFGE 对菌株进行验证,其结果与 Sau-PCR 一致。Sau-PCR 技术在此次溯源中展示了良好的重复性和稳定性。

3.7 金黄色葡萄球菌

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是临床上常见的致病菌之一,菌株大多具有多重耐药性,可引起多种严重感染。李静^[19]利用 Sau-PCR 和 PFGE 方法对 5 株耐万古霉素突变株及其原始菌株进行分型,比较基因差异。结果发现,Sau-PCR 分型结果与 PFGE 方法吻合,3 株耐药突变株与原始菌株的基因型基本一致,而 2 株耐药突变株与其原始菌株基因型有一定差异。这些信息提示,经过万古霉素长期作用后,临床感染菌株的基因谱有可能会发生变化,为临床研究金黄色葡萄球菌的耐药机理提供了重要基础数据。王秋艳^[11]也曾利用 Sau-PCR 方法对 9 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)进行分型。结果显示,Sau-PCR 方法的分型结果与葡萄球菌染色体 *mec* 盒(SCC*mec*)基因分型结果高度一致,为研究 MRSA 临床菌株基因分型提供了有效的工具。

4 结语

随着分子生物学的发展,高分辨率、操作简单、快捷且易于推广的分型技术是未来病原菌基因分型技术的发展趋势。目前,病原菌的分子分型方法很多,但还没有一种能够集中重复性和稳定性好、分辨力高、操作简便、费用低廉等诸多优点于一体的方法。PFGE 分型技术是目前公认的用于分子分型和疾病溯源的“金标准”^[20-22]。PFGE 与其他方法

相比,具有重复性好、分辨率高、结果稳定、易于标准化的优点,现在已经广泛应用于对病原菌尤其是肠道细菌的基因组特征分析和分子流行病学研究。但是,PFGE 方法操作复杂,费用较高,电泳带型易受人为因素影响,需要专业操作技术和人员,在基层检测机构的推广受到限制。其他分子分型技术如 AFLP、RAPD、ERIC-PCR 等也都存在各自的优缺点。AFLP 技术具有条带丰富、用样量少、灵敏度高、准确性高、重复性好等优点,但是操作时间长,步骤繁琐,对实验技能及仪器设备要求相对较高;RAPD 技术不需要预先知道基因组 DNA 的序列,用一系列任意的核苷酶序列(10 个碱基)作为引物,通过引物与模板 DNA 序列随机配对进行 PCR 扩增,具有操作简便、快捷、成本低等优点,但是分型结果可重复性差,分辨力较低,而且对实验结果的解释具有很大的主观性;ERIC-PCR 的原理是利用根据 ERIC 核心序列设计的反向引物进行 PCR 扩增,根据所得数目不等、大小不同的电泳带型来达到菌株分型的目的,具有操作简便、灵敏度高、鉴别能力强、所需仪器设备简单等优点,但是样品的前处理和 DNA 提取过程都会影响 PCR 技术的重复性和准确性,图谱的稳定性需通过优化试验条件来提高。

Sau-PCR 作为一种新发展的分子分型技术,集中了 AFLP 技术的稳定性、多态性高和 RAPD 技术的简便、迅速等优点,在实际应用中显示了较好的分型效果,是适于推广的分子分型技术之一。此外,Sau-PCR 技术不需要特殊设备,无需了解待测基因组的碱基序列,具有敏感、检测成本低等优点,更适于在基层检测机构推广使用。在食品污染、食源性疾病暴发等突发事件中,可先采用 Sau-PCR 进行结果初筛,然后结合其他分型技术进一步验证结果。

尽管 Sau-PCR 技术在某些微生物分型中展示了良好的分辨率和重复性,但毕竟是一种新的基因分型技术,仍需要在实际应用中不断优化和完善。随着该技术的不断发展完善,其在病原微生物基因分型、分子流行病学调查和疾病溯源等方面的应用也会越来越广泛。

参考文献

- [1] 丁水军. 脉冲场凝胶电泳技术及其在病原菌分子分型中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(4):962-964.
- [2] 李雪,金莉莉,王秋雨. 病原微生物分子分型技术研究进展[J]. 中国公共卫生,2007,23(30):373-374.
- [3] 孙永艳,申泉,李艳琴. 肠杆菌基因间重复共有序列及 ERIC-PCR[J]. 生命的化学,2004,24(4):288-290.
- [4] 刘佳妍,金莉莉,王秋雨. 细菌基因组重复序列 PCR 技术及其应用[J]. 微生物学杂志,2006,26(3):90-93.
- [5] BALDY-CHUDZIK K. Rep-PCR-a variant to RAPD or an

independent technique of bacteria genotyping? A comparison of the typing properties of rep-PCR with other recognised methods of genotyping of microorganisms [J]. *Acta Microbiol Pol*, 2001, 50 (3-4): 189-204.

[6] CORICH V, MATTIAZZI A, SOLDATI E, et al. Sau-PCR, a novel ampli-fication technique for genetic fingerprinting of microorganisms [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71 (10): 6401-6406.

[7] 童哲,程苏云,梅玲玲. 浙江省 272 份食品沙门菌检测结果 [J]. *浙江预防医学*, 2003, 15 (4): 33-34.

[8] 狄慧玲,石磊. 食源性沙门菌 Sau-PCR 基因分型研究 [J]. *食品与机械*, 2008, 24 (3): 87-89.

[9] 茹维平,黄丽莉,赵嘉咏,等. 河南省 2005 ~ 2009 年细菌性痢疾流行概况及病原特性分析 [J]. *现代预防医学*, 2010, 37 (21): 4139-4141.

[10] 卫生部疾病预防控制局,中国疾病预防控制中心. 痢疾防治手册 [M]. 北京:人民卫生出版社,2006:11.

[11] 王秋艳. 三种基因分型技术在病原微生物溯源方面的应用 [D]. 广州:华南理工大学,2010.

[12] 周晓辉,焦新安. 产单核细胞李斯特菌的分子鉴定与分型研究 [J]. *中国人畜共患病杂志*, 2003, 19 (5): 444-471.

[13] BERESFORD M R, ANDREW P W, SHARMA G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments [J]. *J Appl Microbiol*, 2001, 90: 1000-1005.

[14] COCOLIN L, STELLA S, NAPPI R, et al. Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources [J]. *Int J Food Microbiol*, 2005, 103 (2): 167-178.

[15] 蒋立新,杨梅,邓凯杰,等. 深圳市水产品中副溶血性弧菌污染现状及耐药性分析 [J]. *职业与健康*, 2010, 26 (3): 287-288.

[16] 毕水莲,李琳,张学武,等. Sau-PCR 和 AILP 技术对一起副溶血弧菌引起食物中毒的分型研究 [J]. *食品工业科技*, 2009, 30 (8): 158-161.

[17] FOSCHINO R, NUCERA D, VOLPONI G, et al. Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing [J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 105 (3): 652-662.

[18] YAN H, SHI L, ALAM M J, et al. Usefulness of Sau-PCR for molecular epidemiology of nosocomial outbreaks due to *Burkholderia cepacia* which occurred in a local hospital in Guangzhou, China [J]. *Microbiol Immunol*, 2008, 52 (5): 283-286.

[19] 李静. 利奈唑胺和万古霉素对临床分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌防耐药变异浓度的研究 [D]. 石家庄:河北医科大学, 2009.

[20] PFALLER M A, WENDT C, HOLLIS R J, et al. Comparative evaluation of an automated ribotyping system versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with recurrent Gram-negative bacteria [J]. *J Diagn Microbiol Infect Dis*, 1996, 25 (1): 1-8.

[21] 马俊英,刘健华,陈杖榴,等. 细菌分型的分子生物学技术研究进展 [J]. *中国兽医科学*, 2007, 37 (10): 914-918.

[22] 王庆忠,娄峥,宣瑛. 病原菌分子分型方法研究进展 [J]. *检验医学*, 2009, 24 (5): 397-400.



卫生部关于养殖梅花鹿副产品作为普通食品有关问题的批复

卫监督函〔2012〕8号

吉林省卫生厅:

你厅《关于明确部分养殖梅花鹿副产品作为普通食品管理的请示》(吉卫文〔2011〕77号)收悉。经研究,现批复如下:

开发利用养殖梅花鹿副产品作为食品应当符合我国野生动植物保护相关法律法规。根据《食品安全法》及其实施条例,以及我部《关于普通食品中有关原料问题的批复》(卫监督函〔2009〕326号)和《关于进一步规范保健食品原料管理的通知》(卫法监发〔2002〕51号)有关规定,除鹿茸、鹿角、鹿胎、鹿骨外,养殖梅花鹿其他副产品可作为普通食品。

此复。

卫生部

二〇一二年一月十日