

- phys 2009 486(2):95-102.
- (4) 郑丽维, 郑国华, 葛莉. 白藜芦醇对胃癌 MGC-803 细胞增殖抑制作用[J]. 中国公共卫生 2009 25(12):1466-1468.
- (5) 郑国华, 李颢, 李会庆. 大蒜油和白藜芦醇联合应用诱导胃癌细胞凋亡[J]. 中国公共卫生 2005 21(10):1205-1207.
- (6) Zhou HB, Yan Y, Sun YN, et al. Resveratrol induces apoptosis in human esophageal carcinoma cells [J]. World J Gastroenterol, 2003 9(3):408-411.
- (7) 周海波, 蔡建庭, 李茂岚, 等. 白藜芦醇诱导人胃癌原代细胞裸鼠移植瘤凋亡的研究[J]. 中国病理生理杂志 2005 21(3):25-28.
- (8) 刘红山, 潘承恩, 齐咏, 等. 白藜芦醇合用 5-FU 对小鼠移植肝癌 H22 生长的影响[J]. 世界华人消化杂志 2002, 10(1):32-35.
- (9) Schindler CK, Shinoda S, Simon RP, et al. Subcellular distribution of Bcl-2 family protein and 14-3-3 within the hippocampus during seizure-induced neuronal death in the rat [J]. Neurosci Lett, 2004, 356(3):163-166.
- (10) Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities [J]. Cell Death and Differ 2006 13:1378-1386.
- (11) Chen JH, Cao JL, Chu YL, et al. T-2 toxin-induced apoptosis involving Fas, p53, Bcl-2, Bax and caspase-3 signaling pathways in human chondrocytes [J]. Zhejiang Univ Sci B 2008 9:455-463.
- 收稿日期: 2010-06-23 (解学魁编辑 宋东校对)

【实验研究】

蜡样芽胞杆菌食物中毒分离株分子分型分析*

林一曼, 石晓路, 邱亚群, 李迎慧, 扈庆华, 杨杰

摘要:目的 建立蜡样芽胞杆菌的分子分型方法, 应用于蜡样芽胞杆菌食物中毒的溯源研究。方法 从 2000-2009 年广东省深圳市食物中毒暴发和散发病例的临床分离株中挑选 47 株蜡样芽胞杆菌进行鉴定及生化分型, 同时进行 *vrrA* 基因 PCR 扩增并对产物进行测序, 用 Bio-edit 和 MEGA 软件对 DNA 序列进行同源性比较。结果 传统生化分型: 47 株蜡样芽胞杆菌中有 5 株菌不能分型, 其余 42 株菌可分为 2 型、10 型和 4 型, 其中 2 型 16 株, 占 34.04%, 10 型 16 株, 占 34.04%, 4 型 10 株, 占 21.28%; 分子分型: 47 株菌可分为 13 个基因型 MT1-MT13, 其中 MT13 型 19 株, 占 40.43%, MT1 型 8 株, 占 17.02%, MT10 型 4 株, 占 8.51%。结论 *vrrA* 基因作为蜡样芽胞杆菌分子分型的一个多态性遗传标记, 可用于蜡样芽胞杆菌 DNA 分子分型研究, 对食物中毒溯源有重要意义。

关键词: 蜡样芽胞杆菌; *vrrA* 基因; 分子分型; 聚合酶链反应; DNA 序列

中图分类号: R 155.3⁺¹

文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2011)08-0998-02

Molecular typing of *Bacillus cereus* strains isolated from food LIN Yi-man, SHI Xiao-lu, QIU Ya-qun, et al. Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Province (Shenzhen 518055, China)

Abstract: Objective To develop a molecular typing method of *Bacillus cereus* strain for tracing *Bacillus cereus*-induced food poisoning. **Methods** Totally 48 *Bacillus cereus* strains were isolated from outbreak or sporadic cases of food poisoning from 2000 through 2009 for the biological identification and biochemical typing. *vrrA* gene was amplified by PCR and sequenced. The results were analyzed with Bio-edit and MEGA analysis software. **Results** Forty-two strains were typed into 3 types known as type 2 (34.04%), type 10 (34.04%) and type 4 (21.28%), while other 5 strains could not be typed by biochemical typing. Forty-seven strains were typed into 13 genotypes by molecular typing. Among the strains typed, MT13 is the main type (19 strains, 40.43%); 8 (17.02%) strains are MT1 and 4 (8.51%) strains are MT10. **Conclusion** *vrrA* gene could be used in the investigation of *Bacillus cereus* DNA molecular typing and could be considered as a polymorphism genetic marker of *Bacillus cereus*.

Key words: *Bacillus cereus*; *vrrA* gene; molecular typing; PCR; DNA sequencing

蜡样芽胞杆菌是引起细菌性食物中毒最常见的一种条件致病菌。中国检验标准目前仍以细菌计数 $\geq 10^5$ 个/mL 才能定其为致病菌⁽¹⁾。每次食物中毒的病因不同, 很难对所有样品均进行计数。因此, 对蜡样芽胞杆菌进行快速鉴定和分型十分重要。如果从各类标本中分离的菌株为同一型, 就可确定为致病菌, 反之则可排除。目前, 蜡样芽胞杆菌分型仍以传统生化分型为主, 但所需时间长, 结果不稳定, 重现性差, 而且有些菌株不能分型⁽²⁾。有文献报道, *vrrA* 基因是炭疽芽胞杆

菌的一个多态性位点⁽³⁻⁴⁾。本研究采用 *vrrA* 基因 PCR 扩增技术研究蜡样芽胞杆菌的 DNA 多态性, 拟建立一种快速分子分型方法, 用于食物中毒的快速溯源。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 营养肉汤培养基、甘露醇卵黄多粘菌素培养基(北京陆桥公司); 血琼脂平板(广州迪景生物工程有限公司); 蜡样芽胞杆菌生化鉴定盒、葡萄糖磷酸盐胨水、LUGOL 碘液(广东环凯微生物科技有限公司); PCR 缓冲液、加样缓冲液、MgCl₂、dNTP、rTaq 酶、胶块染色剂、100 bp DNA 分子量标准等(大连宝生物工程有限公司)。9700 PCR 仪(美国 PE 公司); 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 PCR 引物 根据 GenBank 上的蜡样芽胞杆菌 *vrrA* 基因序列, 自行设计一段引物, 序列为上游 5'-CACAAAC TACC ACC AATGGCACA-3'; 下游 5'-GCGCGTTTCATTTGATTCA-

* 基金项目: 深圳市科技计划项目(200902085)

作者单位: 深圳市疾病预防控制中心, 广东 518055

作者简介: 林一曼(1960-), 女, 广东潮州人, 副主任技师, 中专, 主要从事微生物检验工作。

通讯作者: 扈庆华, E-mail: huqinghua03@163.com; 石晓路, E-mail: shixiaolu831@163.com

TAC-3'。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 蜡样芽孢杆菌菌株的挑选 从 2000-2009 年各食物中毒暴发和散发病例的临床分离株中挑选有代表性的蜡样芽孢杆菌菌株 47 株,其中 9 株为散发病例分离株,38 株为 6 起食物中毒暴发中分离的菌株;以检定所购买的标准菌株 NCTC75097 为阳性对照株。

1.4 蜡样芽孢杆菌菌株的复苏、分离和培养 菌株从 -20 °C 菌种保存冰箱里取出,接种至血平板和甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基,置于 37 °C 电热恒温培养箱 24 h(过夜)培养,观察平板上菌落生长状况,挑选菌落作革兰染色镜检并同时接种营养肉汤中,置 37 °C 恒温摇床内培养 24 h(过夜)备用。

1.5 蜡样芽孢杆菌菌株的传统生化分型方法鉴定 参照中华人民共和国标准 GB/T4789.14-2003^[5]进行。

1.6 蜡样芽孢杆菌 DNA 提取、PCR 扩增及电泳检测 参见文献[4]。

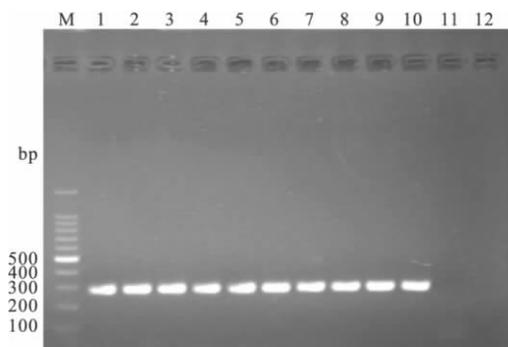
1.7 PCR 扩增产物测序、同源性分析及分子分型 测序工作由上海生工生物工程技术服务有限公司进行。从 GenBank 下载编号为 E33L、ATCC 14579 和 ATCC 10987 的 *vrrA* 基因序列进行辅助比对,测序结果用 BioEdit 和 MEGA 分析软件进行同源性分析比较,得到分子进化树,并根据进化树对 47 株蜡样芽孢杆菌进行分子分型。

2 结果

2.1 菌株复苏、分离培养结果 菌株在血平板和甘露醇卵黄多粘菌素琼脂平板(MYP)上均生长良好。菌落特征明显:表面粗糙蜡样,不透明,似毛玻璃状,菌落较大,血平板上呈 β 溶血。菌株在肉汤里呈混浊生长,为革兰阳性芽孢杆菌。

2.2 菌株生化分型 47 株蜡样芽孢杆菌中有 5 株菌不能分型,其余 42 株菌可分为 2 型、10 型和 4 型。其中 2 型 16 株,占 34.04%;10 型 16 株,占 34.04%;4 型 10 株,占 21.28%;未鉴定出型别的为 5 株,占 10.64%。

2.3 蜡样芽孢杆菌 *vrrA* 基因 PCR 扩增 47 株蜡样芽孢杆菌经 *vrrA* 基因 PCR 扩增,均扩增出 300 bp 左右的 DNA 扩增产物,经测序结果证实为 280~290 bp。其部分扩增电泳图片见图 1。



注: M: 100 bp marker; 1~9: 蜡样芽孢杆菌分离株; 10: 阳性对照(NCTC75097); 11: 阴性对照(大肠杆菌); 12 号为空白对照(无菌水)。

图 1 部分蜡样芽孢杆菌 PCR 扩增产物凝胶电泳图

2.4 蜡样芽孢杆菌 DNA 测序及同源性分析 可分为 13 个型,分别编码为 MT1-MT13。其中 MT13 型 19 株,占 40.43%; MT1 型 8 株,占 17.02%; MT10 型 4 株,占 8.51%; MT2、MT4、MT5、MT6、MT7、MT8 型均为 2 株,分别占 4.26%;

MT3、MT9、MT11、MT12 型均为 1 株,分别占 2.13%。其中 2009 年的 1 起食物中毒暴发中分离的 8 株蜡样芽孢杆菌菌株分子分型均为 MT13 型。

2.5 蜡样芽孢杆菌分子分型和传统生化分型结果比较 采用传统生化分型方法 47 株蜡样芽孢杆菌中 42 株可分为 2 型、4 型、10 型 5 株不能分型;采用分子分型方法 47 株菌株可分为 13 个型,其中生化分型 2 型的菌株应用分子分型可分成 MT1、MT2、MT3、MT4、MT6、MT7、MT8、MT13,生化分型 10 型的菌株用分子分型可分为 MT5、MT9、MT13,生化分型 4 型菌株用分子分型可分为 MT1、MT11、MT12,生化分型没有鉴定出型别的 5 株菌用分子分型可分为 MT5、MT10、MT12。MT13 型的 19 株菌中出现了生化 4 型、2 型和 10 型,主要以生化 10 型居多,占 84.21%。结果表明,2 种分型方法分型基本一致,生化型不同的,分子分型大多也不同;而生化分型相同的,分子分型能分得更加精细和准确。

3 讨论

目前,蜡样芽孢杆菌食物中毒溯源仍以传统生化分型为主。根据硝酸盐还原、明胶液化、柠檬酸盐利用、伏-普二氏(Voges-Proskauer, V-P)试验和淀粉水解试验把蜡样芽孢杆菌分为 15 个生化型^[6-8]。本研究通过平行对照实验发现,生化分型的结果重现率只有 80%~90%。另外,生化反应所需试剂繁多,操作费时费力,标准较难控制,实验过程中因环境或人为因素出现误差的机会较大。本研究在国外研究炭疽芽孢杆菌多态性和 DNA 指纹图谱的基础上,根据蜡样芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌属于芽孢杆菌属的特点,应用 *vrrA* 基因为分子遗传标记,研究蜡样芽孢杆菌的多态性,建立一种分子分型方法,替代传统生化分型。生化分型与分子分型比较结果表明,分子分型比较精细。如本研究所选的 16 株菌生化分型同为 2 型,分子分型却可分为 8 个不同型,证明分子分型可更准确地对菌株进行分型。本研究发现,2009 年的 1 起食物中毒暴发中分离的 8 株蜡样芽孢杆菌菌株分子分型均一致,证明该起食物中毒暴发是由蜡样芽孢杆菌引起。因此,分子分型结果可为食物中毒病原学的确诊提供更准确的依据,但其方法有待进一步完善。

参考文献

- 中华人民共和国卫生部. WS/T82-1996 蜡样芽孢杆菌食物中毒诊断标准及处理原则[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 1-11.
- 韦俊超, 王雅琴. 一起蜡样芽孢杆菌 2 型引起食物中毒的病原学检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(6): 1408-1409.
- Keim P, Prile LB, Klevytska AM. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationship within *Bacillus anthracis*[J]. J Bacteriology, 2000, 182(10): 2928-2936.
- 扈庆华, 石晓路, 庾蕾, 等. 蜡样芽孢杆菌 DNA 分子分型研究[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2003, 23(11): 840-843.
- 中华人民共和国卫生部. GB/T4789.14-2003 食品卫生微生物学检验/蜡样芽孢杆菌检验国家标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004: 95-100.
- 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(3): 373-374.
- 吴雅儿. 蜡样芽孢杆菌所致食物中毒病原学诊断的实验研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(3): 472-473.
- 冯增强. 一起蜡样芽孢杆菌污染引起食物中毒调查[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(9): 1115.

收稿日期: 2011-02-14

(王奕编辑 宋东校对)