

北京地区实验动物绿脓杆菌分离株 MLVA 分型

邢 进^{1,2}, 吴 军¹, 岳秉飞², 贺争鸣²

(1. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071; 2. 中国食品药品检定研究院 实验动物资源研究所, 北京 100050)

【摘要】 目的 通过多位点可变数目串联重复序列分析 (multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis, MLVA) 分型方法, 研究北京地区实验动物绿脓杆菌分离株基因型和分布情况。**方法** 选择 13 个可变数目重复序列 (variable-number tandem-repeat, VNTR) 位点, 对实验动物及设施中检测出的 141 株绿脓杆菌的基因组 DNA 进行重复序列扩增, 所得指纹图谱使用 BioNumerics 软件进行聚类分析, 绘制系统发育树和最小生成树 (minimum spanning tree, MST)。**结果** 所采用的 13 个 VNTR 位点能够对全部分离株进行有效分型。141 株绿脓杆菌主要被分为了 3 个基因群, 56 个基因型。各群所占比例分别为 A 群 82.3%, B 群占 12.8%, C 群占 5.0%, 辛普森多样性指数为 0.763。同一区域内相邻实验动物单位的绿脓杆菌分离株同源关系较远。**结论** MLVA 方法对绿脓杆菌具有很好的分型能力, 能够有效的追踪绿脓杆菌的来源。北京地区实验动物中绿脓杆菌分离株基因型多态性丰富, 但无地域性同源关系。

【关键词】 绿脓杆菌; 多位点可变数目串联重复序列; 基因分型; 实验动物

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)05-0044-07

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.05.010

Multiple-locus Variable-number Tandem-repeat Analysis for Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* in Beijing

XING Jin^{1,2}, WU Jun¹, YUE Bing-fei², HE Zheng-ming²

(1. Military academy of medical sciences, Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China;

2. National Institutes for Food and Drug Control, Institute of Laboratory Animal Resources, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To identify genotypes and potential routes of dissemination of *P. aeruginosa* isolates in Beijing using Multilocus-locus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA). **Methods** One hundred and forty one experimental animals and facilities isolates of *P. aeruginosa* were detected by selected 13 VNTRs loci. Then we draw the phylogenetic tree and minimum spanning tree (MST) using BioNumerics software according to fingerprint clustering analysis. **Results** All isolates of *P. aeruginosa* was divided into three major genetic Clusters, 56 genotypes. The proportion of A cluster is 82.3%, B cluster 12.8%, C cluster 5.0%. The Simpson's index of diversity is 0.763. The isolates have distant homology in the neighboring facilities. **Conclusions** MLVA displayed excellent discriminatory power for *P. aeruginosa*. MLVA can effectively track *P. aeruginosa* source. The *P. aeruginosa* isolates of experimental animals have rich polymorphism genotypes and no regional homology in Beijing.

【Key words】 *Pseudomonas aeruginosa*; MLVA; Genotyping; Experimental animal

[作者简介] 邢进 (1979-), 男, 助理研究员, 在职硕士生, 专业: 微生物学。E-mail: xjvet@nifdc.org.cn。

[通讯作者] 吴军, 男, 研究员, E-mail: junwu1969@163.com。岳秉飞, 男, 博士, 研究员, E-mail: y6784@126.com。

绿脓杆菌又称铜绿假单胞菌,革兰氏阴性杆菌,广泛存在于环境(如水、土壤)、植物和动物中^[1]。绿脓杆菌是医院最常见机会致病菌之一^[2],也是无特定病原体(SPF)动物必须排除的病原菌之一。在免疫功能正常的小鼠体内,绿脓杆菌不会致病,但是对免疫功能低下的动物,如注射免疫抑制剂、烧伤研究和全身辐照等,以及免疫缺陷动物模型,就很容易受到感染而出现败血症,导致死亡^[3,4],严重干扰动物实验的进行,影响实验数据和结果的可靠性和准确性。因此,了解和掌握绿脓杆菌在实验动物和实验动物设施中绿脓杆菌的分型情况,有助于控制该菌在实验动物中的传播和对动物实验的影响。本实验采用多位点可变数目串联重复序列分析(multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis, MLVA)方法对近几年在实验动物中分离到的 141 株绿脓杆菌分离株进行分型研究。

1 材料和方法

1.1 绿脓杆菌菌株

标准菌株 ATCC 27853 和 PAO1 株 ATCC 47085,购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。分离株共 141 株,编号为 Pa1 ~ Pa143 (Pa73 和 Pa129 为空号)分离自 17 个不同的实验动物生产和使用单位(分别编号为 L1 ~ L17)。其中 133 株分离自北京地区实验动物生产和使用单位中小鼠、大鼠、豚鼠和兔;2 株分离自河北省的小鼠;6 株分离自北京地区部分实验动物设施中的饮水样品。

1.2 主要试剂和仪器

MH 琼脂培养基购自 BD 公司;PCR 相关试剂购自 TAKARA 生物工程公司;根据参考文献^[5]合成引物 ms77, ms127, ms142, ms172, ms211, ms212, ms213, ms214, ms215, ms216, ms217, ms222, ms223,由上海生物工程公司合成。毛细管电泳仪(Qiagen QIAxcel),BioNumerics 软件 6.6 版本。

1.3 绿脓杆菌 DNA 的制备

将绿脓杆菌分离株接种于 MH 培养基 37 °C 培养 18 h,用灭菌棉签取适量菌落悬浮于无菌 PBS 中,采用加热法提取菌落 DNA, -20 °C 保存备用。

1.4 多位点串联重复序列(MLVA)分析

根据文献^[5,6]和 MLVA 数据库^[7],筛选 13 个串联重复基因位点,见表 1,对 141 株绿脓杆菌分离株和 2 株标准菌株的 13 个 VNTR 位点进行 MLVA

分析。

1.4.1 PCR 反应体系 20 μL 反应体系:上下游引物(10 μmol/L)各 0.6 μL, DNA 模版 0.5 μL, dNTP (各 2.5 mmol/L) 1.6 μL, Taq 酶(5 U/μL) 0.2 μL, 10 × Buffer(含 Mg²⁺ 15 mmol/L) 2 μL, 加灭菌水至 20 μL。

1.4.2 反应条件 96 °C 预变性 5 min, 95 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

1.4.3 毛细管电泳 使用高分辨力预制胶卡(QX DNA High Resolution Cartidge)电泳 12 min, Size Marker 使用 100 bp ~ 3 kb, Alinement Marker 使用 50 bp ~ 3 kb。

1.5 MLVA 结果分析

13 个位点可变数目重复序列(VNTR13)分析 PCR 产物经毛细管电泳,所得电泳图用 Biocalculator 软件进行图像处理,然后用 Bionumerics 6.6 软件进行分析,计算各 VNTR 数目,根据该特征数据,对各菌株间的相似度采用非加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析,绘制系统发育树(UPGMA dendrogram),并绘制最小生成树(minimum spanning tree, MST)。MLVA 的分辨力用辛普森多样性系数 D(Simpson's index of diversity)表示^[8],公式如下:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

注:N 表示全部受试菌株的总数, n_j 表示菌株的分型数目。

2 结果

2.1 绿脓杆菌分离株 MLVA 的稳定性和重复性

每次进行 PCR 均设标准菌株的对照,扩增片段大小或重复序列数与文献和数据库中的一致^[5,7]。从分离株中抽取不同来源的 20 株菌,间隔 1 个月重复扩增 3 次,每次的扩增片段或重复序列数完全相同。

2.2 绿脓杆菌 VNTR13 多态性

本次试验选取了 13 个 VNTR 位点对 141 株北京地区的实验动物绿脓杆菌分离株进行 MLVA 基因分型,如两个标准菌株的电泳结果所示,如图 1、图 2 所示。显示出绿脓杆菌 VNTR13 的 DNA 指纹图谱多态性。

2.3 聚类分析

2.3.1 VNTR13 扩增各菌株的片段经过毛细管电泳仪电泳,图像经 Bionumerics 6.6 数据化处理分析后计算出各菌株的每个位点的重复序列数目。根

表 1 绿脓杆菌 13 个 VNTR 位点引物序列及重复片段大小^[5]
Tab. 1 *P. Aeruginosa* 13 VNTRs loci primer sequences and repeat fragment size

位点名称 Locus name	在 PAO1 中的位置 (kb) Position (kb) in PAO1	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	重复片段大小 (bp) Repeat unit size (bp)
ms77	2263	ms77L	GCGTCATGGTCTGCATGTC	39
		ms77R	TATACCTCTTCGCCCAGTC	
ms127	3496	ms127L	CTCGGAGTCTCTGCCAACTC	15
		ms127R	GGCAGGACAGGATCTCGAC	
ms142	3876	ms142L	AGCAGTGCCAGTTGATGTTG	115
		ms142R	GTGGGGCGAAGGAGTGAG	
ms172	5084	ms172L	GGATTCTCTCGCACGAGGT	54
		ms172R	TACGTGACCTGACGTTGGTG	
ms211	264	ms211L	ACAAGCGCCAGCCGAACCTGT	101
		ms211R	CTTCGAACAGGTGCTGACCGC	
ms212	521	ms212L	TGCTGGTCGACTACTTCGGCAA	40
		ms212R	ACTACGAGAACGACCCGGTGTT	
ms213	2568	ms213L	CTGGGCAAGTGTGGTGATC	103
		ms213R	TGGCGTACTCCGAGCTGATG	
ms214	2705	ms214L	AAACGCTGTTCGCCAACCTCTA	115
		ms214R	CCATCATCCTCTACTGGGTT	
ms215	4376	ms215L	GACGAAACCCGTCGCGAACA	129
		ms215R	CTGTACAACGCCGAGCCGTA	
ms216	4528	ms216L	ACTACTACGTCGAACACGCCA	113
		ms216R	GATCGAAGACAAGAACCCTCG	
ms217	6187	ms217L	TTCTGGCTGTCGCGACTGAT	109
		ms217R	GAACAGCGTCTTTTCCTCGC	
ms222	5361	ms222L	AGAGGTGCTTAACGACGGAT	101
		ms222R	TGCAGTTCTGCGAGGAAGCGG	
ms223	5455	ms223L	TTGGCAATATGCCGGTTCGC	106
		ms223R	TGAGCTGATCGCCTACTCG	

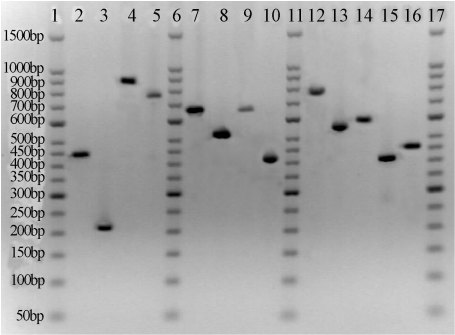


图 1 PAO1 株 VNTR13 的多态性

Fig. 1 Polymorphism of PAO1 strain VNTR13

Note: 1, 6, 11, 17. 50bp DNA ladder marker; 2 ~ 5. ms77, ms127, ms142, ms172; 7 ~ 10. ms211, ms212, ms213, ms214; 12 ~ 16. ms215, ms216, ms217, ms222, ms223.

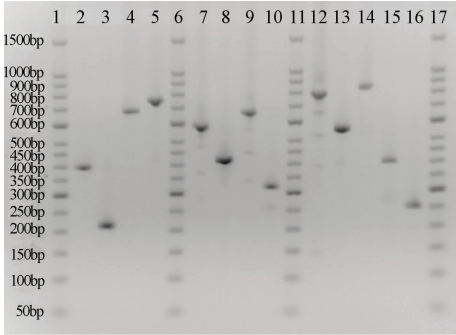


图 2 ATCC27853 VNTR13 的多态性

Fig. 2 Polymorphism of ATCC27853 strain VNTR13

Note: 1, 6, 11, 17. 50bp DNA ladder marker; 2 ~ 5. ms77, ms127, ms142, ms172; 7 ~ 10. ms211, ms212, ms213, ms214; 12 ~ 16. ms215, ms216, ms217, ms222, ms223.

据每株菌的 13 个重复序列数将 143 株 (含 ATCC27853 和 PAO1 株) 绿脓杆菌相同基因型合并, 绘制精简的系统发育树, 见图 3。来自 17 个单

位的 141 株绿脓杆菌分离株, 共被分为 A、B、C 3 个大群 56 个基因型, 基因型编号为 MP1 ~ 56, 见表 2。根据公式计算 VNTR13 的分辨力系数为 $D = 0.763$ 。

表 2 141 株绿脓杆菌分离株分型情况
Tab. 2 The number of 141 *P. aeruginosa* isolates typing

MLVA 分型编号 Genotype name of MLVA	分离株编号 Name of isolates	菌株数 Strains number	分离地点 Source
MP1	Pa001	1	L1
MP2	Pa002	1	L2
MP3	Pa003	1	L2
MP4	Pa004	1	L2
MP5	Pa005	1	L3
MP6	Pa006	1	L3
MP7	Pa007	1	L3
MP8	Pa008	1	L2
MP9	Pa009 ~ 014, 032, 045, 054 ~ 055, 103	11	L2
MP10	Pa015 ~ 021, 024 ~ 030, 033 ~ 043, 046 ~ 052, 056 ~ 057, 060 ~ 067, 080, 085, 088 ~ 089, 092 ~ 097, 108 ~ 120, 124 ~ 127	69	L2, L12, L13
MP11	Pa022	1	L2
MP12	Pa023, 099	2	L2, L14
MP13	Pa031, 044	2	L2
MP14	Pa053	1	L2
MP15	Pa058	1	L4
MP16	Pa059	1	L2
MP17	Pa068	1	L2
MP18	Pa069	1	L2
MP19	Pa070	1	L5
MP20	Pa071	1	L6
MP21	Pa072	1	L6
MP22	Pa074	1	L7
MP23	Pa075	1	L8
MP24	Pa076	1	L9
MP25	Pa077	1	L10
MP26	Pa078	1	L11
MP27	Pa079	1	L11
MP28	Pa081	1	L2
MP29	Pa082	1	L2
MP30	Pa083 ~ 084	2	L2
MP31	Pa086 ~ 087	2	L2
MP32	Pa090	1	L2
MP33	Pa091	1	L2
MP34	Pa098	1	L12
MP35	Pa100	1	L14
MP36	Pa101	1	L5
MP37	Pa102	1	L2
MP38	Pa104	1	L2
MP39	Pa105	1	L2
MP40	Pa106	1	L2
MP41	Pa107	1	L2
MP42	Pa121	1	L3
MP43	Pa122	1	L15
MP44	Pa123	1	L2
MP45	Pa128	1	L2
MP46	Pa130	1	L5
MP47	Pa131	1	L15
MP48	Pa132	1	L16
MP49	Pa133	1	L16
MP50	Pa134	1	L5
MP51	Pa142 ~ 143	2	L17
MP52	Pa135	1	L5
MP53	Pa136	1	L5
MP54	Pa137 ~ 138, 140	3	L5
MP55	Pa139	1	L5
MP56	Pa141	1	L3

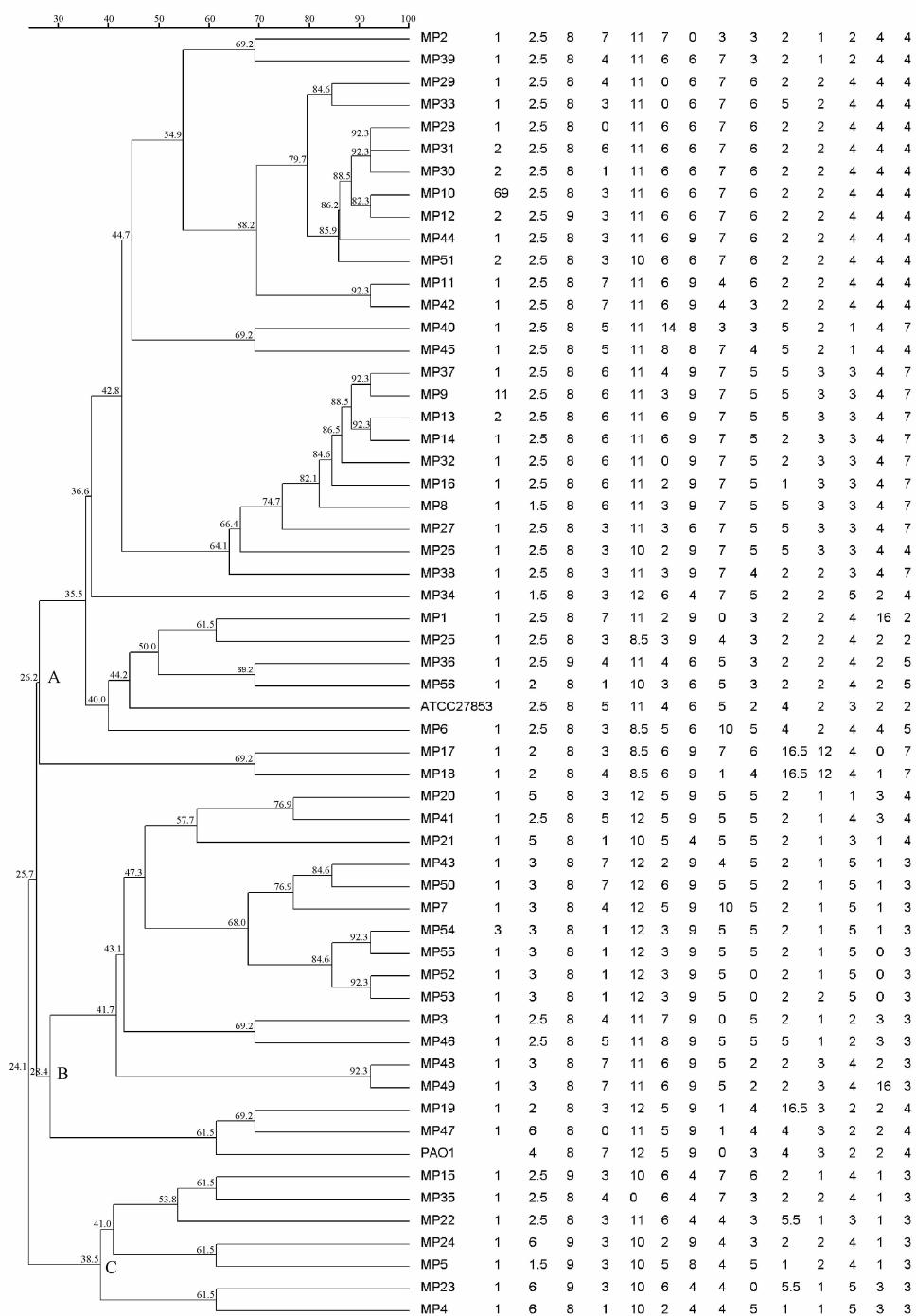


图3 北京地区绿脓杆菌 MLVA 分型结果聚类分析

Fig. 3 MLVA typing of *P. aeruginosa* in Beijing cluster analysis results

注: 143 株绿脓杆菌 (含 ATCC27853 和 PAO1 株) 共分为 A、B、C 三个大群, 56 个基因型。图片右侧的菌株信息从左至右依次为: MLVA 分型编号, 同型菌株数量, 随后 13 列分别为 VNTR 位点 ms77、ms127、ms142、ms172、ms211、ms212、ms213、ms214、ms215、ms216、ms217、ms222、ms223 的重复序列数目。ATCC 27853 和 PAO1 株作为分型对照

Note: 143 *P. aeruginosa* (including ATCC27853 and PAO1 strain) were divided into A, B, C three large group, 56 genotypes. Strains right of the picture information from left to right: MLVA type number, the number of the same type of strain, respectively, followed by 13 loci ms77, ms127, ms142, ms172, ms211, ms212, ms213, ms214, ms215, ms216, ms217, ms222, ms223 number of repeat sequences. ATCC 27853 and PAO1 strains as a sub-type controls

2.4.2 用最小生成树对所得菌株 VNTR13 特征数据进行聚类分析(彩插 7 见图 4)。从图中可以看到所有菌株被分为了 3 大部分。其中 A 群所占比例最大,为 116/141 (82.3%),B 群为 18/141 (12.8%),C 群为 7/141 (5.0%)。A 群主要由 L1~L3、L10~L15 共 9 个来源的分离菌组成。B 群主要由 L2、L3、L5、L6、L15 和 L16 共 6 个来源的分离菌组成。C 群主要由 L2~L4、L7~L9 和 L14 共 7 个来源的分离菌组成。标准菌株 PA01 归属于 C 群,ATCC27853 属于 A 群,但同源关系较远。A 群中以 MP9 和 MP10 分型为主。其他菌株均呈散在分布。

在 141 株分离株中,Pa71~Pa77(Pa73 为空号)是不同来源动物饮水样品,分型编号为 MP20~MP25,在 3 个群中均有分布,MP20、MP21 属于 B 群,MP23、MP24 属于 C 群,MP25 属于 A 群。

Pa142 和 Pa143(MLVA 分型编号 MP51)分离自 L17,为河北省石家庄市,其同源性与 Pa123(分型编号 MP44),同源性高达 85.9%。

Pa015~021、024~030、033~043、046~052、056~057、060~067、080、085、088~089、092~097、108~120、124~127,分别分离自 L2、L12 和 L13,分离株数最多,分型完全相同。Pa023 和 Pa099 分离自两个不同的单位,L2 和 L14,分型完全相同,分型编号为 MP12。其他分离地点的分离株分型相对独立,无区域性同源关系。

3 讨论

绿脓杆菌的基因分型方法主要有 MLVA 方法、脉冲场电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)方法^[9,10,11],以及多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)方法等^[12]。与后两者相比,MLVA 分型方法在分型能力、试验效率、自动化程度、重复性和成本等因素都是比较理想的分型方法^[12,13]。本研究中所得到的 56 种基因分型通过与数据库^[7]比对,其中 MP49(Pa133)和 MP55(Pa139)分别与利比亚的 1 株和西班牙的 1 株分离株仅有 2 个位点的不同,同源性最高;其次是 MP5(Pa005)、MP25(Pa077)、MP38(Pa104)和 MP41(Pa107)分别与分离自法国的 4 株菌株有 3 个位点的差异;MP54(Pa137~138、140)与分离自西班牙的 1 株分离株有 3 个位点的差异。其他分型与数据库中比对的结果,位点差异均在 3 个以上。本研究的 MLVA 结果已经上传至此数据库,名称为 *P. aeruginosa*2011_

Beijing。由此可以将所得的重复序列数目结果共享,与国内外的分离株进行比对,对于病原菌流行病学分析具有很好的应用价值。

目前国内还没有应用 MLVA 方法对实验动物中绿脓杆菌分型的报道,MLVA 基因分型方法日渐成熟,近两年已经有很多关于大肠杆菌^[14]、布鲁氏菌^[15]、鼠疫耶尔森氏菌^[16]、烟曲霉菌^[17]等病原菌的 MLVA 方法分型的报道。在绿脓杆菌的分型分析中,一般常用的有 15 个 VNTR 位点,本次实验所选择的 13 个位点的重复序列大小均在 15 bp 以上,不需要进行测序就能够测定其片段大小。

根据最小生成树(MST)的结果可以发现,北京地区的绿脓杆菌分离株主要分为 3 个大群,其中 A 群的比例最大,占到了 82.3%,B 群占 12.8%,C 群占 5.0%。A 群基因型中 MP9 有 11 株,MP10 有 69 株,这与不同来源动物的检测数量有一定关系。在菌株来源中,L2 中的分离菌株在 3 个群中均有分布,表明此单位的绿脓杆菌污染源来自于不同方面。总体分析,其他各来源分离株基本呈现散在分布,大多为一株一型,表明北京地区动物设施内的绿脓杆菌分离株多态性比较丰富。因此更需要我们引起对该菌的重视。

本次试验中水中分离株与动物分离株分型并不完全相同,只是具备较近的同源关系,能够证明饮水的污染是实验动物绿脓杆菌感染的重要原因之一。大部分分离株保持了比较独立的基因型,而 L3 的分离株呈明显散在分布,这可能与动物使用单位不繁殖动物,所用实验动物均从外部购买有关。实验动物设施是相对封闭的环境,同时都有着比较严格的净化措施,从结果看,同一区域的分离株并没有较近的同源性,反倒是不同区域的分离株存在一定的同源性。说明实验动物的引进和交流会引起绿脓杆菌对本实验室或实验动物设施的污染。由此可见,通过 MLVA 方法可以方便的对本实验室和动物设施的绿脓杆菌污染进行分子流行病学的临床监测,追溯污染源,便于实验室的评价。

参考文献:

- [1] Goldberg JB, Pseudomonas: global bacteria [J]. Trends Microbiol. 2000, 8(2): 55-57.
- [2] Campa M, Bendinelli M, Friedman H (eds.). Pseudomonas aeruginosa as an Opportunistic Infection [M]. New York: Plenum Press, 1993, 1-18.
- [3] Hammond CW, Tompkins M, Miller CP, et al. Studies on the

- susceptibility to infection following ionizing radiation. I. The time of onset and duration of the endogenous bacteremias in mice[J]. J. Exp. Med. 1954, 99(5):405-410.
- [4] Dietrich HM, Khaschabi D, Albini B. Isolation of Enterococcus durans and Pseudomonas aeruginosa in a scid mouse colony[J]. Lab Anim, 1996, 30(2):102-107.
- [5] Vu - Thien H, Corbineau G, Hormigos K. Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Longitudinal Survey of Sources of Pseudomonas aeruginosa Infection in Cystic Fibrosis Patients[J]. J Clin Microbiol. 2007, 45(10):3175-3183.
- [6] Onteniente L, Brisse S, Tassios PT, et al. Evaluation of the Polymorphisms Associated with Tandem Repeats for Pseudomonas aeruginosa Strain Typing[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(11):4991-4997.
- [7] MLVA bank. [http://minisatellites u-psud fr/MLVAnet/](http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/).
- [8] Hunter PR, Gaston MA. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems; an Application of Simpson's Index of Diversity[J]. J Clin Microbiol, 1988, Nov. 26(11):2465-2466.
- [9] Botes J, Williamson G, Sinickas V, et al. Genomic typing of Pseudomonas aeruginosa isolates by comparison of riboprinting and PFGE; correlation of experimental results with those predicted from the complete genome sequence of isolate PAO1[J]. J Microbiol Methods, 2003, 55(1):231-240.
- [10] Anthony M, Rose B, Pegler MB, et al. Genetic Analysis of Pseudomonas aeruginosa Isolates from the Sputa of Australian Adult Cystic Fibrosis Patients[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(8):2772-2778.
- [11] Grundmann H, Schneider C, Hartung D, et al. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for Pseudomonas aeruginosa[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(3):528-534.
- [12] van Mansfeld R, Jongerden I, Bootsma M, et al. The Population Genetics of Pseudomonas aeruginosa Isolates from Different Patient Populations Exhibits High-Level Host Specificity[J]. PLoS One, 2010, 5(10):e13482.
- [13] van Belkum A, Struelens M, De Visser A, et al. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology[J]. J Clin Microbiol, 2001, 14(3):547-560.
- [14] Murphy M, Minihan D, Buckley JF, et al. Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of Irish verocytotoxigenic Escherichia coli O157 from feedlot cattle; uncovering strain dissemination routes[J]. BMC Vet Res, 2008, 4:2.
- [15] Her M, Kang SI, Kim JW, et al. A Genetic Comparison of Brucella abortus Isolates from Animals and Humans by Using the MLVA Assay[J]. J. Microbiol. Biotechnol. 2010, 20(12):1750-1755.
- [16] Zhang XA, Hai R, Wei JC, et al. MLVA distribution characteristics of Yersinia pestis in China and the correlation analysis[J]. BMC Microbiol, 2009, 9:205.
- [17] Thierry S, Wang DY, Arne P, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing of Aspergillus fumigatus[J]. BMC Microbiol, 2010, 10:315.

[修回日期] 2012-02-14