

# 进出口食品中金黄色葡萄球菌 *spa* 基因的分型

赵芳<sup>1</sup>, 洪小柳<sup>1</sup>, 万志刚<sup>1</sup>, 葛丽雅<sup>1</sup>, 黄李华<sup>1</sup>, 刘慧玲<sup>1</sup>, 薛峰<sup>2</sup>, 蒋原<sup>2</sup>,  
吕敬章<sup>1\*</sup>, 张玲<sup>3\*</sup>

- (1. 深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 深圳市食品安全检测技术研发重点实验室, 深圳 518045;
2. 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心, 南京 210001;
3. 南方医科大学生物技术学院输血医学系, 广州 510515)

**摘要:** **目的** 对我国进出口食品中分离得到的金黄色葡萄球菌进行 *spa* 基因分型。**方法** 对 36 株金黄色葡萄球菌的 *spa* 基因进行 PCR 扩增, 并对产物进行测序分析, 测序结果通过数据库进行 *spa* 基因分型。**结果** 共分出 16 个基因型, 分别为 *t189*、*t091*、*t164*、*t002*、*t899*、*t197*、*t1044*、*t034*、*t156*、*t7400*、*t2592*、*t4209*、*t127*、*t437* 和两株新发现的基因型。其中 *t189* 型共有 13 株, *t091* 型共 4 株, *t164* 和 *t002* 型分别为 3 株, 其余型分别为 1 株。**结论** 食品中分离出的 36 株金黄色葡萄球菌 *spa* 分型以 *t189* 居多, *t091* 型次之, 其他 14 型相对较少。**关键词:** 金黄色葡萄球菌; *spa* 基因; 多态性分析

## The *spa* genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from import and export food

ZHAO Fang<sup>1</sup>, HONG Xiao-Liu<sup>1</sup>, WAN Zhi-Gang<sup>1</sup>, GE Li-Ya<sup>1</sup>, HUANG Li-Hua<sup>1</sup>, LIU Hui-Ling<sup>1</sup>,  
XUE Feng<sup>2</sup>, JIANG Yuan<sup>2</sup>, LV Jing-Zhang<sup>1\*</sup>, ZHANG Ling<sup>3\*</sup>

(1. Shenzhen Key Laboratory of Detection Technology R & D on Food Safety, Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China; 2. Testing Center of Animals, Plants and Food, Jiangsu Entry and Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China; 3. Department of Transfusion Medicine, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**ABSTRACT: Objective** To understand of the *spa* genotyping of *Staphylococcus aureus* in import and export food. **Methods** The X region of the *spa* gene was amplified by PCR. DNA sequences were obtained with a sequencer and the *spa* types were determined with the database accessible via <http://www.ridom.de/spaserver/>. **Results** Thirty-six strains can be divided into 16 types, including *t189*, *t091*, *t164*, *t002*, *t899*, *t197*, *t1044*, *t034*, *t156*, *t7400*, *t2592*, *t4209*, *t127*, *t437* and 2 new types. There are 13 strains *t189* type, 4 strains *t091* type, 3 strains of *t164* type and 3 strains *t002* type, residual type 1 strains respectively. **Conclusion** The main *spa* typing of 36 strains of *Staphylococcus aureus* in import and export food is *t189* type, followed by *t091* type, and the other 14 types less.

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAK17B10)、高技术研究发展计划(863 计划)(2012AA101601)、质检公益项目(201510025, 201210127)

**Fund:** Supported by the National Science and Technology Project of China (2012BAK17B10), National High-tech R & D Program (863 Program) (2012AA101601) and the Commonweal Project of Inspection and Quarantine(201510025, 201210127)

\*通讯作者: 吕敬章, 硕士, 主任医师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: jz\_lu@yahoo.com.cn

张玲, 博士, 实验师, 主要从事分子病毒免疫学研究。E-mail: zhangling1982@163.com

\*Corresponding author: LV Jing-Zhang, Engineer, Food Inspection Center of CIQ-Shenzhen, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.1011, Fuqiang Road, Futian District, Shenzhen 518045, China. E-mail: jz\_lu@yahoo.com.cn

ZHANG Ling, Experimentalist, Department of Transfusion, School of Biotechnology, Southern Medical University, No.1838 Guangzhou avenue, Guangzhou 510515, China. E-mail: zhangling1982@163.com

**KEY WORDS:** *Staphylococcus aureus*; *spa* gene; SNP typing

## 1 引 言

金黄色葡萄球菌是造成人类食物中毒的常见致病菌之一, 建立准确、快速的分子分型方法对金黄色葡萄球菌的流行病学调查和快速溯源具有重要的意义。金黄色葡萄球菌蛋白 A (*Staphylococcus aureus* protein A, SPA) 是金黄色葡萄球菌细胞壁的一个组成部分, 几乎 90% 以上的金黄色葡萄球菌均含有这种成分。*spa* 基因的 X 区包含有 2~15 个长 21~27 bp 的重复序列, 该区由于重复序列数目、重复序列特征及重复序列的排列顺序不同而具有高度的多态性<sup>[1]</sup>。但目前, 国内对食品中的金黄色葡萄球菌的分子分型尤其是 *spa* 基因的分型研究较少。本研究对近年来我国进出口食品中分离出的金黄色葡萄球菌进行 *spa* 基因分型, 了解我国进出口食品金黄色葡萄球菌流行情况。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材 料

#### 2.1.1 菌 株

36 株金黄色葡萄球菌分离株为深圳出入境检验检疫局 2008~2014 年从进出口畜类、禽类及水产品等食品中分离所得(参照 GB 4789.10); 阳性对照为金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC33592)、阴性对照为表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, ATCC12228), 均购自美国菌种保藏中心。

#### 2.1.2 试 剂

DNA 提取试剂盒(QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit)购自德国 QIAGEN 公司; 100bp DNA Ladder Marker、琼脂糖凝胶、TAE 电泳缓冲液、6× loading buffer、dNTP、10×PCR buffer、Taq 酶购自大连宝生物有限公司; Gelred 核酸染料购自美国 Biotium 公司; 革兰氏阳性菌鉴定卡(VITEK)购自法国梅里埃公司; 其他培养基均购自北京陆桥技术有限公司。

#### 2.1.3 设 备

低温高速离心机(Universal 320R)购自德国 Hettich 公司; 电泳仪(DYY-10C 型)购自北京市六一仪器厂; 全自动凝胶成像系统(Gel Doc™ XR+)购自美国 Bio-Rad 公司; 超纯水系统(Elix10+milli-Q)购自密理博中国有限公司; PCR 仪(veriti 96)购自美国 Applied Biosystems 公司。

## 2.2 方 法

### 2.2.1 DNA 的提取

按照 DNA 提取试剂盒操作说明书进行。

### 2.2.2 PCR 扩增

#### 2.2.2.1 PCR 反应体系和反应条件

通过对引物、Mg<sup>2+</sup>、Taq 酶等各组分的用量以及退火温度的优化, 最终确定了最佳的 PCR 反应体系和扩增条件。反应体系: 10×PCR buffer 5 μL、25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 3 μL、2.5 mmol/L dNTP 4 μL、10 μmol/L 上游引物和下游引物 0.5 μL、5 U/μL Taq 酶 0.5 μL、DNA 模板 2 μL、用去离子水补足至 50 μL。扩增条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 1min, 72 °C 30 s; 72 °C 10 min。35 个循环。

#### 2.2.2.2 PCR 产物的测序与分型

将 PCR 产物交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。根据网站(<http://www.ridom.de/spaserver/>)已公布重复序列的排序方式确定 *spa* 基因型。

## 3 结 果

### 3.1 *spa* 基因扩增电泳结果

对 36 株金黄色葡萄球菌阳性菌株 PCR 扩增后, 电泳结果显示 36 株菌均扩增出目的条带, 其余菌株电泳结果呈多态性, 产物片段大小在 200 bp ~ 500 bp 之间(由于菌株电泳结果较多, 只列出部分电泳结果, 见图 1)。

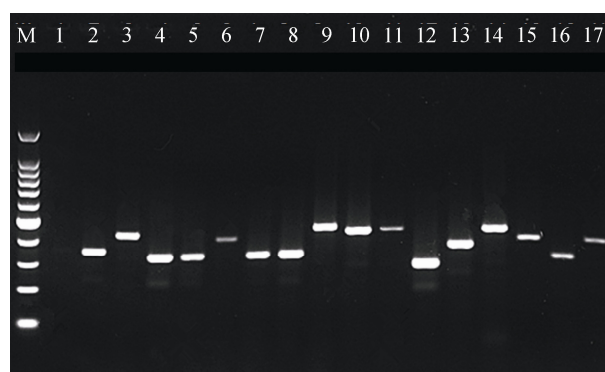


图 1 部分金黄色葡萄球菌 *spa* 基因 X 区域扩增

Fig. 1 Some amplification *Staphylococcus aureus* X district of *spa* gene

M: 100bp DNA ladder; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3: 26210; 4: 19912; 5: 13256; 6: 4339; 7: 19926; 8: 19924; 9: 24602; 10: 24705; 11: 23855; 12: 19807; 13: 23855; 14: 19807; 15: 20900; 16: 12362; 17: 21095.

### 3.2 spa 分型结果

对36株金黄色葡萄球菌的PCR扩增产物进行测序和 spa 分型, 共分出16个基因型, 分别为 *t189*、*t091*、*t164*、*t002*、*t899*、*t197*、*t1044*、*t034*、*t156*、*t7400*、*t2592*、*t4209*、*t127*、*t437* 和2株新发现的基

因型。其中 *t189* 型共有13株(36.1%), *t091* 型共4株(11.1%), *t164* 和 *t002* 型分别为3株(各占8.3%), 其余型别为1株(各占2.8%); 金黄色葡萄球菌标准菌株为 *t037* 型。结果见表1。

表1 36株金黄色葡萄球菌 spa 分型结果  
Table 1 The spa genotyping results of 36 strains of *Staphylococcus aureus*

序号	菌株编号	spa 重复编码特征	重复数	基因型
1	21095	07-06-17-21-34-34-22-34	8	t164
2	21494	07-23-12-21-17-34	6	t189
3	12362	07-16-23-02-34	5	t899
4	20900	07-06-17-21-34-34-22-34	8	t164
5	19807	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	10	t002
6	23855	11-10-34-24-34-22-25	7	t197
7	19807	07-33-22-17	4	t1044
8	23855	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	10	t002
9	23309	08-16-02-25-02-25-34-24-25	9	t034
10	24705	07-23-21-17-34-12-23-02-12-23	10	t091
11	24602	26-23-17-34-17-17-20-17-12-17-16	11	t2308
12	24191	07-23-12-21-33-24-33-22-17	9	unknown
13	21117	07-23-12-33-22-17	6	t156
14	19924	07-23-12-21-17-34	6	t189
15	19926	07-23-12-21-17-34	6	t189
16	4339	07-16-23-23-20-12-23-02-34	9	t7400
17	13256	07-23-12-21-17-34	6	t189
18	19912	07-23-12-21-17-34	6	t189
19	26210	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	9	t002
20	10114	07-23-12-21-17-34	6	t189
21	10115	07-23-12-21-17-34	6	t189
22	10113	07-12-21-17-13-13-34-34-34-33-13	9	t2592
23	6354	125-12-21-17-34	5	t4209
24	11667	07-23-21-16-34-33-13	7	t127
25	14236	04-20-17-20-17-25-34	7	t437
26	23620	07-23-12-21-17-34	6	t189
27	24109	07-23-12-21-17-34	6	t189
28	24540	07-23-12-21-17-34	6	t189
29	25279	07-23-12-21-17-34	6	t189
30	25283	07-23-21-17-34-12-23-02-12-23	9	t091
31	26333	07-23-21-17-34-12-23-02-12-23	9	t091
32	27304	07-23-21-17-34-12-23-02-12-23	9	t091
33	25824	07-23-12-21-17-34-34-34-24	8	unknown
34	27520	07-23-12-21-17-34	6	t189
35	25627	07-23-12-21-17-34	6	t189
36	21015	07-06-17-21-34-34-22-34	7	t164
阳性对照	ATCC33592	15-12-16-02-25-17-24	7	t037

## 4 讨 论

目前, 金黄色葡萄球菌基因分型方法主要有脉冲场凝胶电泳法(PFGE)<sup>[3-6]</sup>、扩增片断长度多态性法(AFLP)<sup>[5,7,8]</sup>、*spa* 法<sup>[2,9]</sup>、多位点序列分型法(MLST)<sup>[6,10]</sup>等。PFGE 由于重复性好、分型率高、分辨能力强而被认为是分型技术的“金标准”, 但该方法操作繁琐、需要特殊仪器, 且分型费时<sup>[11]</sup>。MLST 适用于金黄色葡萄球菌长期的进化研究<sup>[2]</sup>。*spa* 分型为 PCR 技术分型方法的一类, 针对 *spa* 基因 X 区设计扩增引物, 将测序结果与 *spa* 重复序列分型数据库中已有型别比较, 从而达到对金黄色葡萄球菌分型的目的<sup>[12]</sup>。文献报道 *spa* 分型分辨率与 PFGE 相近, 优于 MLST<sup>[13,14]</sup>。

本研究针对 36 株金黄色葡萄球菌进行 *spa* 分型, 共分出 16 个基因型, 分别为 *t189*、*t091*、*t164*、*t002*、*t899*、*t197*、*t1044*、*t034*、*t156*、*t7400*、*t2592*、*t4209*、*t127*、*t437* 和 2 株新发现的基因型。从分型结果来看, *t189* 型最多, 共有 13 株菌(占比 36.1%), 说明 *t189* 型是本研究选择的 36 株金黄色葡萄球菌的优势菌株, 这 13 株菌主要是从畜肉和禽产品中检出, 与文献报道<sup>[15]</sup>的从畜肉和水产品标本中分离到金黄色葡萄球菌主要以 *t189*(占比 20.4%)型居多相一致。分型结果排在第二位的是 *t091* 型, 共 4 株(占比 11.1%), 该型主要也是从畜肉和禽产品中检出, 可见 *t091* 型也是畜肉和禽产品中分布比较多的型别。*t164* 和 *t002* 型分别为 3 株(各占 8.3%), 主要分布在禽肉和水产品中, 未在畜产品出分离出这两个型别。其余型分别为 1 株(各占 2.8%), 分布在畜肉、禽产品和水产品等食品中, 可能与本研究选择的菌株较少有关, 也有可能与这些菌株自身的克隆株较少有关。

*spa* 分型起源于欧洲, 欧洲 29 个国家共 60 个实验室共同组织建立了 SeqNet.org 网站, 截止到目前, 该网站公布的重复序列有 658 个, *spa* 基因型为 14177 个, 可以很方便地进行序列对比和 *spa* 分型。虽然本研究选择的菌株较少, 但可以看出 *spa* 分型快速、准确、区分能力强, 而且结果容易解释, 易于不同实验室间的比较, 还可以通过数据库了解不同国家和地区的菌株流行情况。因此, *spa* 分型方法是一种较好的分型方法, 是金黄色葡萄球菌的分子流行病学调查和食品金黄色葡萄球菌分子溯源的一个极为便利的方法。

## 5 结 论

本文对进出口食品中分离得到的 36 株金黄色葡萄球菌 *spa* 进行分型, 发现以 *t189* 居多, *t091* 型次之, 其他型别相对较少。

### 参考文献

- [1] 崔俊昌, 刘又宁, 王睿. 金黄色葡萄球菌的蛋白 A 基因多态性分型[J]. 中国现代医学杂志, 2006; 14: 2129-31.
- [2] Cui JC, Liu YN, Wang R. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on basis of protein A gene polymorphism [J]. *Chin J Mod Med*, 2006, 14: 2129-2131.
- [3] Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(11): 3556-63.
- [4] Szalus-Jordanow O, Chrobak D, Pyrgiel M, et al. PFGE and AFLP genotyping of *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolated from goats with Morel's disease [J]. *Arch Microbiol*, 2013, 195(1): 37-41.
- [5] Ostojic M. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2008, 8(3): 259-65.
- [6] Melles DC, van Leeuwen WB, Snijders SV, et al. Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus* [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 69(2): 371-5.
- [7] Schouls LM, Spalburg EC, van Luit M, et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and *spa*-typing [J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5082.
- [8] Sloos JH, Janssen P, van Boven CP, et al. AFLP typing of *Staphylococcus epidermidis* in multiple sequential blood cultures [J]. *Res Microbiol*, 1998, 149(3): 221-8.
- [9] Cuteri V, Marenzoni ML, Mazzolla R, et al. *Staphylococcus aureus*: study of genomic similarity of strains isolated in veterinary pathology using amplified fragment length polymorphism (AFLP) [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2004, 27(4): 247-53.
- [10] Harmsen D, Claus H, Witte W, et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(12): 5442-8.

- [10] Saunders NA, Holmes A. Multilocus sequence typing (MLST) of *Staphylococcus aureus* [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 391: 71-85.
- [11] 李克诚, 李琼, 夏菲, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 spa 基因分型[J]. *疾病监测* 2012; 27(11): 877-9.  
Li KC, Li Q, Xia F, *et al.* Study on spa typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Dis Surveillance*, 2012, 27(11): 877-879.
- [12] Li V, Chui L, Louie L, *et al.* Cost-effectiveness and efficacy of spa, SCCmec, and PVL genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as compared to pulsed-field gel Electrophoresis [J]. *PLoS One*, 8(11): e79149.
- [13] Guizar-Mendoza JM, Amador-Licona N, Flores-Martinez SE, *et al.* Association analysis of the Gln223Arg polymorphism in the human leptin receptor gene, and traits related to obesity in Mexican adolescents [J]. *J Hum Hypertens*, 2005, 19(5): 341-6.
- [14] Du XF, Xiao M, Liang HY, *et al.* An improved MLVF method and its comparison with traditional MLVF, spa typing, MLST/SCCmec and PFGE for the typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Int J Mol Sci*, 15(1): 725-42.
- [15] 汪永禄, 王多春, 詹圣伟, 等. 马鞍山市金黄色葡萄球菌鉴定及 SPA 基因多态性分析[J]. *公共卫生与预防医学*, 2001; 22(4): 50-3.

Wang YL, Wang CD, Zhan SW, *et al.* Identification of *Staphylococcus aureus* and SpA polymorphisms in Maanshan City [J]. *J Pub Health and Prev Med*, 2001, 22(4): 50-53.

(责任编辑: 白洪健)

## 作者简介



赵芳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。  
E-mail: zf.ff@163.com



吕敬章, 硕士, 主任医师, 主要研究方向为食品安全检测。  
E-mail: jz\_lu@yahoo.com.cn



张玲, 博士, 实验师, 主要从事分子病毒免疫学研究。  
E-mail: zhangling1982@163.com