

# 金黄色葡萄球菌分子分型方法

刘保光<sup>1,2</sup> 王国强<sup>1</sup> 蔡田<sup>1</sup> 张程光<sup>1</sup> 宋博利<sup>2</sup>

1.河南农业大学牧医工程学院,郑州 450002;2.西藏职业技术学院动物科学技术学院,拉萨 850030

**摘要** 目前,分子分型方法已成为研究细菌耐药性发生及传播的重要手段,常用于金黄色葡萄球菌分子分型的方法有脉冲场凝胶电泳分型(PFGE)、表面蛋白 A 基因多态性分型(Spa)、随机扩增 DNA 多态性分型(RAPD)、多位点测序分型(MLST)等,本文总结了上述几种常用的金黄色葡萄球菌分子分型方法。

**关键词** 金黄色葡萄球菌;分型方法;基因

金黄色葡萄球菌是引起人和动物严重感染最常见的细菌之一。近年来,该病原菌引起的相关感染及食物中毒等问题日趋多见,已引起众多学者的关注。鉴于此,要建立前沿、宏观的数据库,有效、及时地实现疾病预防与控制,就要对金黄色葡萄球菌进行分子流行病学分析。

## 1 随机扩增 DNA 多态性分型(RAPD)

Williams 等在 1990 年在前人研究基础上,创立了随机扩增 DNA 多态性(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)分型方法,后来该方法被美国医院流行病学协会推荐为医院感染中常见病原菌的分型方法<sup>[1]</sup>。这种分型方法原理是,采用单一非特异性引物来识别细菌染色体上的相应位点,使用较低的退火温度,让其发生多位点结合。该分型通过 PCR 扩增、电泳检测并摄像,得到复杂基因组的指纹图谱,然后根据指纹图谱的差异达到分型的目的。这种分型方法的优点是安全、简便、快速、灵敏、经济,引物通用。缺点是操作技术有些复杂、分辨率低、易受多种因素的影响,重复性不太好等。

## 2 表面蛋白 A 基因多态性分型(Spa 分型)

1987 年已有研究报道,首次将金黄色葡萄球菌表面蛋白 A 基因(*Staphylococcus aureus* Protein A, *spa*)多态性分型的方法用于金黄色葡萄球菌,该方法是

基于 *spa* 基因重复序列的一种分型方法<sup>[2]</sup>。*spa* 包括以下几个部分:Fc 部分、X 区域和 Fc 末端区域。目前,已证实 X 区含有许多具有高度多态性的重复片段,大小为 24 bp,重复数量为 3~15 个,不同的菌株间重复的数目和序列不同。鉴于此,针对 NCBI 上的 *spa* 的基因序列来设计扩增引物,对 *spa* X 区域进行 PCR 扩增,根据产物具有一定多态性的特点,利用酶切后可以得到不同的电泳图谱,对其进行分子分型。该分型方法简便、快捷、易储存、易标准化。但是该法分辨率低,只能用于粗筛或初步筛选。

## 3 多位点测序分型(MLST 分型)

Maiden 等于 1998 年建立了一种新型的、分辨率高的分型方法,就是现在的 MLST<sup>[3]</sup>。该方法根据金黄色葡萄球菌内部的 7 个管家基因(*aroE*、*arcC*、*gmk*、*pta*、*glpF*、*tpi* 和 *yqiL*),根据不同菌株每一片段有不同的序列,进而对这 7 个管家基因进行扩增、测序,与标准克隆株序列比对,从而达到分型的目的。MLST 具有其网络数据库,库内包含有全球流行病学提交的相关资料,给长期进行流行病学相关试验研究提供了参考依据。但是该方法要求较严格,必须通过测序才能准确分型。

## 4 脉冲场凝胶电泳(PFGE 分型)

1984 年, Schwartz 和 Cantor 创建了用于全基因组 DNA 分型的染色体 DNA 脉冲场凝胶电泳

收稿日期:2016-07-15

基金项目:西藏自治区自然科学基金项目(2016ZR-15-62)

刘保光,男,1983 年生,在读博士生,讲师。

(pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 分型方法, 目前, 该方法被认定为金黄色葡萄球菌分型的金标准<sup>[4]</sup>。其 DNA 经限制性内切酶(*Sma* I、*Xba* I) 消化后, 通过特殊的电泳, 可获得 5~20 条不同大小的片段, 根据电泳条带的不同大小和多少对其进行分型。其分型规则如下: 同一型的菌株条带数目和大小一致, 用大写英文字母表示, 如 A 型; 同一型别的不同亚型条带形式相差 3 个条带以下, 表示方法为字母加数字, 例如 A1; 不同型别的条带形式相差 4 个条带以上, 用其他的字母表示, 如 B、C、D、E、F 型等。PFGE 这种分型方法, 具有型率高、分辨率高、重复性好等优点。然而, 也有一定的缺点, 繁琐耗时、试验费用高、对试验仪器要求高等, 在现实试验中, 有一定的局限性, 不便于普及。

### 5 *mecA* 基因高变区长度多态性

MRSA 菌株作为临床特殊菌株, 这种方法可以对其分型, 在金黄色葡萄球菌染色体上, *mecA* 和 *IS431* 之间存在着一段高变区, 不同的 MRSA 菌株, 呈现的碱基序列和数量不同, 根据这个重复单位序列扩增产物的不同来进行分型。因此, 可以用 PCR 扩增方法来区分不同的 MRSA 菌株, 区分其型别。这种方法的优点是简单、快捷, 且分辨率高, 但是至今没有统一分型标准<sup>[5]</sup>。

### 6 小结与展望

综上所述, 当选择采用哪种方法分型时, 必须

全面考虑技术、时间、费用、操作难易程度等因素。这些分型方法中, 脉冲场凝胶电泳仍然是暴发流行中 MRSA 分子分型的金标准, 而其他分型方法更适合用于检测菌株的变异和建立国际监测<sup>[6]</sup>。MLST 和 PFGE 分型的方法依旧是菌种长期进化研究的首选。Spa 分型适合初步筛选, 可以在一般常规监测中应用。迄今为止, 没有任何一种分型方法绝对好或绝对不好, 临床试验中必须根据自身试验的情况及试验要求, 结合相关的流行病学资料信息, 有针对性地选择分型方法。建议选择 2 种或 2 种以上的方法来对菌株分型, 可以通过比较提高其准确度, 有利于提高分辨率、分型率, 使试验结果更准确。或者先用分型率高的方法, 再用鉴定率高的方法进行分型。

### 参 考 文 献

[1] WILLIAMS J G, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.  
 [2] 孔秀凤, 祁伟. 金黄色葡萄球菌基因分型方法的研究进展[J]. *World Notes on Antibiotic*, 2008, 29(3): 104-108.  
 [3] 王冰, 缪小平. 金黄色葡萄球菌的分子分型技术研究进展[J]. *职业与健康*, 2015, 31(8): 1126-1131.  
 [4] 倪春霞, 蒲万霞, 胡永浩, 等. 金黄色葡萄球菌基因分型方法研究进展[J]. *中国动物检疫*, 2009, 26(10): 64-68.  
 [5] 戴媛媛, 马筱玲. 金黄色葡萄球菌的分子流行病学分型方法[J]. *临床输血与检验*, 2006, 8(1): 71-73.  
 [6] 何秋莹, 陈渡波, 曾华, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分子分型研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2014, 26(5): 614-620.

## 羔羊阉割技术操作方法

凡不做种用的公羔或公羊一律阉割作肥羊。阉割后羔羊性情温驯, 管理方便, 节省饲料, 肉无膻味, 且较细嫩。阉割多在春天或秋天进行, 天气炎热时不适于公羊去势。最常见的阉割法有 2 种。

1) 手术, 常 2 个人配合, 一人保定羊, 一人一手握住阴囊上方, 以防羔羊的睾丸缩回腹腔内。另一手用消毒的刀在阴囊侧面下方切开一小口, 约为阴囊长度的 1/3, 能挤出睾丸为宜。切开后把睾丸连同精索取出后, 消毒创口并撒上消炎粉。手术后不要让羊卧在潮湿肮脏的地方, 防止感染。

2) 用橡皮筋结扎法, 当公羊 1 周龄时, 将睾丸挤在阴囊里, 用橡皮筋紧紧地扎在阴囊的上部, 断绝睾丸部的血液流通, 约经半月左右自行脱落。

来源: 中国农业推广网