

食源性致病沙门氏菌血清型生物标志物的研究

董蓉^{1,2}, 吴清平¹, 张菊梅¹, 于泓鹏², 马连营¹, 郭伟鹏¹

(1. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 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, 广东广州 510070) (2. 广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510006)

摘要: 寻找食源性致病沙门氏菌 (*Salmonella*) 血清型生物标志物, 是研发食源性致病微生物鉴定及监控技术的基础。本文基于代谢组学技术提取 5 种沙门氏菌血清型 8 株标准菌株胞内代谢产物, 对各菌株进行胞内代谢轮廓分析, 并构建指纹图谱和 PCA 分析。研究发现, 各血清型之间的产物在种类和丰度上具有较大差异, 其中肠炎沙门氏菌血清型的特异性产物为巯基乙酸和 α -羟基-戊二酸, 伤寒沙门氏菌血清型特有产物为 N-乙酰基-天冬氨酸、2(1H)-嘧啶酮和 L-苏糖酸, 鼠伤寒沙门氏菌血清型特有产物为肉豆蔻酸甲酯和甘油醚葡萄糖苷, 猪霍乱沙门氏菌血清型特有产物 1,4-萘醌, 亚利桑那沙门氏菌血清型特有产物为 3-吡啶甲酸三甲酯; 通过聚类分析和 PCA 分析可以明显区分这 5 种沙门氏菌血清型。因此以上特异性产物有望作为各自血清型的潜在生物标志物。

关键词: 代谢组学; 沙门氏菌; 生物标志物; 指纹图谱

文章编号: 1673-9078(2017)5-288-292

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.046

Study on Biomarkers of Foodborne Pathogenic *Salmonella* Serotypes

DONG Rong^{1,2}, WU Qing-ping¹, ZHANG Ju-mei¹, YU Hong-peng², MA Lian-ying¹, GUO Wei-peng¹

(1. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China (The Ministry-Province Jointly Development), Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China) (2. School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Identifying the characteristic metabolites of foodborne pathogenic *Salmonella* serotypes is the basis for the research and development of an identification and monitoring technique for foodborne pathogenic microorganisms. In this study, intracellular metabolites were extracted from five different *Salmonella* serotypes comprising eight standard strains by using metabolomics technology, and intracellular metabolic profile analysis was conducted for each strain. Additionally, fingerprints were constructed and principal component analysis (PCA) was performed. It was found that the metabolites of each serotype had large differences in terms of type and abundance, and some potential characteristic metabolites were found. For example, mercaptoacetic acid and α -hydroxypentanedioic acid were biomarkers of the *S. enteritidis* serotype; N-acetyl aspartic acid, 2(1H)-pyrimidone, and L-threonic acid were only produced by the *S. typhi* serotype; tetradecanoic acid methyl ester and glyceryl ether-glucoside were released only by *S. typhimurium* serotype; 1,4-naphthoquinone was only produced by *S. choleraesuis* serotype, and 3-pyridinecarboxylic acid trimethylsilyl ester was unique to *S. arizonae* serotype. The five *Salmonella* serotypes could be clearly distinguished by cluster analysis and PCA. As a result, the above specific products could be used as potential biomarkers of *Salmonella* serotypes.

Key words: Metabolomics; *Salmonella*; Biomarkers; Fingerprint

近年来, 全球食品安全事故频发, 由食源性致病菌引发的食品中毒事件占主要位置。其中, 由沙门氏菌引发的感染事件位居前三, 在我国食源性致病微生物中毒事故中, 约 70%~80%源于沙门氏菌感染, 90%

收稿日期: 2016-05-24

项目基金: 广东省科技计划项目 (2014A040401055、2015B020230006)

作者简介: 董蓉 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食源性致病沙门氏菌代谢组学研究

通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 生物安全监测与控制

感染来源于禽畜类食品, 每年超过 200 万人感染此菌, 导致数百人因此死亡^[1]。沙门氏菌目前已发现 2500 多种血清型, 但是传统检测方法^[2]、免疫法^[3]、分子生物学方法^[4]以及基因分型方法^[3]由于各自的局限性难以快速高效的满足复杂多样的沙门氏菌血清型检测要求。因此, 建立快速、高效的沙门氏菌血清型相关快速检测方法显得尤为紧迫。近年来, 基于代谢组学技术构建代谢产物数据库和指纹图谱用于食源性致病菌快速、高灵敏检测和鉴定, 成为微生物新型检测手段的研究热点^[5]。Ubonart^[6]采用 SPME-GC-MS 技术, 对

大肠杆菌和沙门氏菌的挥发性代谢产物进行提取检测,成功区分这两种细菌。Elin^[7]基于代谢组学技术,很好地鉴别出引起伤寒的甲型副伤寒和伤寒沙门氏菌。但是,目前国内外对沙门氏菌代谢组学研究相对较少,一方面主要研究鼠伤寒沙门氏菌或者肠炎沙门氏菌与大肠杆菌或其他细菌特征性代谢产物,从而区别不同细菌;另一方面研究宿主感染沙门氏菌后所体现的代谢产物变化。目前,没有系统性的研究食源性致病沙门氏菌血清型的代谢组学,缺乏对应的代谢产物数据库以及生物标志物数据库的资源共享。

本文主要是对5种不同血清型的常见食源性致病沙门氏菌,共8株标准菌株(录属于伯杰细菌手册第九版沙门氏菌7个亚种中的二个亚种),基于代谢组学

技术进行胞内代谢轮廓分析,通过构建指纹图谱,寻找各种血清型的生物标志物,进一步通过聚类分析和PCA主成分对5种血清型进行区分,探讨生物标志物与沙门氏菌血清型的关联,建立基于代谢组学技术对沙门氏菌血清型快速鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株

8株标准菌株均由广东省食品微生物安全工程技术研究开发中心提供,每株菌株的具体信息如下表1所示。

表1 不同血清型标准菌株具体信息

Table 1 Specific information of different serotype standard strains

血清型	菌种名称	亚种类型
1,9,12:g,m:[1,7]	<i>S. enteritidis</i> CMCC50335/ATCC13076 肠炎沙门氏菌	亚种 I 肠炎沙门氏菌种
9,12,vi:d:_	<i>S. typhi</i> CMCC50071/ATCC50098 伤寒沙门氏菌	
1,4,[5],12:ii:1,2	<i>S. typhimurium</i> CMCC50115/ATCC14028 鼠伤寒沙门氏菌	
6,7:c:1,5	<i>S. choleraesuis</i> CMCC50018 猪霍乱沙门氏菌	亚种 III 亚利桑那沙门氏菌亚种
1,2:1,2,5	<i>S. arizona</i> CMCC47001 亚利桑那沙门氏菌	

1.1.2 主要试剂及培养基

胰蛋白胨大豆肉汤、胰蛋白胨大豆琼脂培养基:广东环凯微生物科技有限公司;甲醇(HPLC纯):阿拉丁公司;去离子水:实验室自制;二氯甲烷、吡啶(分析纯):广州化学试剂厂;甲氧胺盐酸盐、硬脂酸甲酯:阿拉丁;BSTFA+1% TMS: Regis Technologies, Inc.

1.1.3 主要实验仪器

全自动灭菌锅:日本 TOMY Digital Biology;微量可调移液枪:上海科华实验系统有限公司;电热恒温培养箱:上海一恒科技有限公司;超净工作台:中国苏净安泰公司;电子分析天平:美国 G&G 公司;气相色谱-质谱联用仪:美国 Agilent 科技有限公司;超声细胞破碎仪:美国 SONICS 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌体淬灭和提取

分别从-40℃保藏的8株沙门氏菌标准菌株甘油管中吸取100 μL菌液,加入到10 mL TSB 营养肉汤,在37℃培养箱培养12 h,取100 μL培养液涂布于TSA平板上,于37℃培养箱培养过夜,然后挑取两菌环上述菌体于10 mL带盖圆底离心管中,并加入2 mL的90%冷甲醇(-40℃),在-80℃冷冻保藏数小时进行淬灭,添加冷甲醇混合提取试剂CH₃OH/CH₂Cl₂/

H₂O (3:1:1)共5 mL,超声提取10 min,在-4℃条件下,8000 r/min离心10 min,迅速取出上清液3 mL至液闪瓶中,氮吹仪吹干,并于4℃低温下保藏备用。每株菌株取三个平行样品,相关实验都在冰上进行操作。

1.2.2 衍生化反应

在上述吹干样品中,加入400 μL含有2 mg/mL甲氧胺盐酸盐的吡啶混合溶液,并加入5 μg/mL的硬脂酸甲酯作为内标物,置于40℃反应80 min。然后加入200 μL的BSTFA置于40℃反应30 min,取样过滤至GC瓶,上GC-MS进样分析。

1.2.3 气相色谱条件

HP-5MS毛细管色谱柱(30 m×250 μm×0.25 μm);载气:高纯He;流速:1.0 mL/min;柱温升温程序:初始温度35℃,持续3 min,然后以10℃/min升温至45℃,再以6℃/min升温至140℃,最后以6℃/min升温至280℃,持续6 min。自动进样2 μL;分流比:10:1;进样口温度280℃。

1.2.4 质谱条件

离子源温230℃;接口温度280℃;全扫描模式,质量扫描范围30~1000 m/z。

1.3 数据处理

利用origin 8.0软件作图,使用HemI软件进行热

图分析,并用 Past 软件进行主成分分析

2 结果与讨论

2.1 标准菌株的胞内代谢轮廓分析

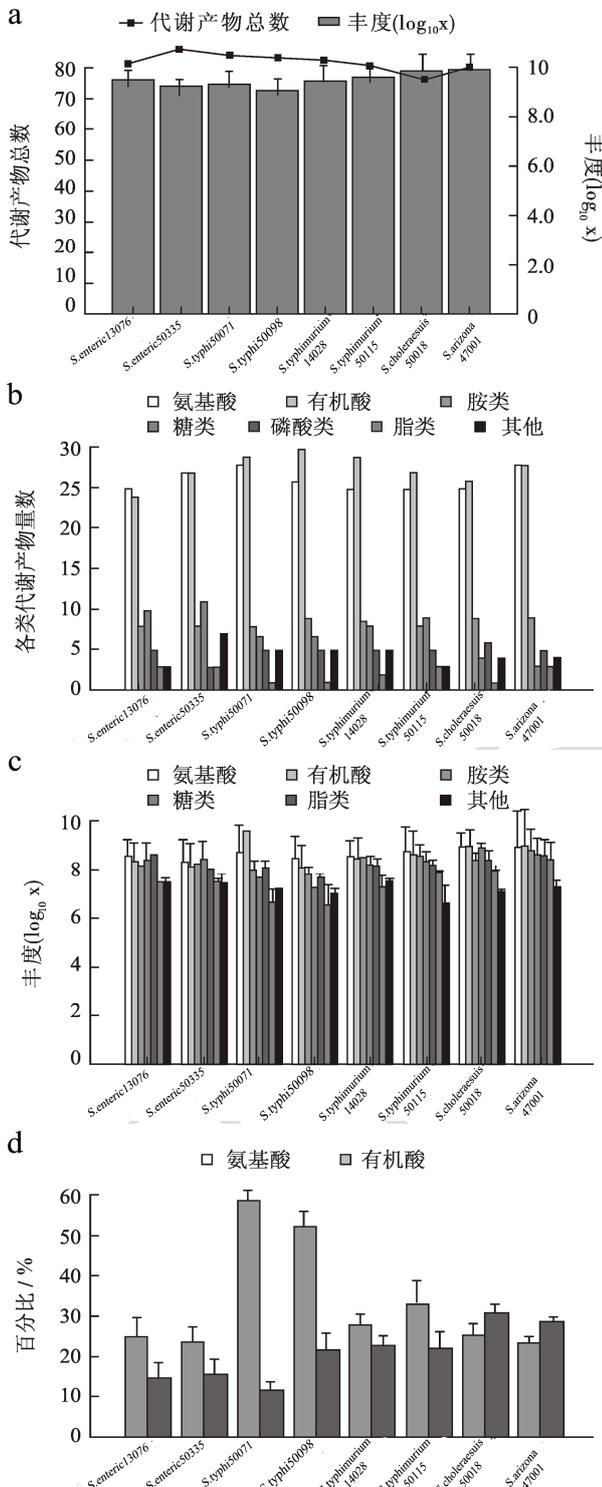


图1 各类胞内代谢产物总数和丰度以及各类成分百分比

Fig.1 Total number of intracellular metabolites, and abundance and percentage of all components

注: a 代谢产物总数和丰度 b 各类胞内代谢产物总数; c

各类代谢产物总丰度; d 氨基酸和有机酸所占总丰度百分比。

结合 GC-MS 质谱图对检索化合物进行积分和峰面积归一化后计算各化合物的相对含量,通过 NIST11 数据库进行匹配检索,并结合相关文献和本实验室常见食源性致病菌代谢产物信息,选取三个平行样品共有且相似度(SI)不小于 80%的组分,得到 8 株沙门氏菌标准菌株各类胞内代谢产物的总数和丰度代谢轮廓,如图 1 所示。

从图 1a 可知,上述 5 种沙门氏菌血清型 8 株标准菌株共检索出 127 种代谢产物,其中肠炎沙门氏菌血清型 *S. enteritidis* 50335 检索出的产物最多,达到 86 种;猪霍乱沙门氏菌 *S. choleraesuis* 50018 检索出的产物最低,共 76 种,其余各菌株产生的产物总数差异不大,约 80 种左右。除了伤寒沙门氏菌 *S. typhi* 50098 的产物总丰度相对偏低外,其余各菌株的产物总丰度差异不大。从图 1b 可知,各种血清型胞内产生的物质主要是氨基酸类(丙氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸、甘氨酸、L-苏氨酸、蛋氨酸、天冬氨酸、5-氧-L-脯氨酸、苯基丙氨酸和酪氨酸等)、有机酸类(a-丙酸、羟基乙酸、乙二酸、2-羟基-丙烯酸、棕榈酸、棕榈酸丙基酯和硬脂酸丙基酯等)、胺类(2-羟基乙胺、碳化二氧胺、腐胺和十八碳烯酰胺等)、糖类、磷酸类(蔗糖、 α -D-吡喃葡萄糖苷、 β -D-吡喃葡萄糖和 D-(+)-海藻糖等)、脂类以及三羧酸循环中间产物(柠檬酸、琥珀酸和延胡索酸)等其他代谢产物。其中氨基酸类和有机酸类物质总数相对较高,氨基酸类物质均达到 25 种左右,有机酸类物质达 30 种左右,具有较大差异性。伤寒血清型和猪霍乱血清型均只检测出一种脂类物质,相对其他三种血清型种类偏低。

从图 1c 可知,除了脂类物质总丰度相对较低外,其余各类代谢产物的总丰度相对较高,特别是氨基酸类和有机酸类物质总丰度相对偏高;对于伤寒沙门菌血清型 *S. typhi* 50071 和 50098,产生的氨基酸类总丰度比其余 6 类产物总丰度相对偏高,从图 1d 也可以看出这一点,这两株标准菌株产生的氨基酸类总丰度占总产物丰度的比例最高,分别达到 58.8%和 52.4%。

2.2 潜在生物标志物研究

沙门氏菌血清型之间的 DNA 同源性极高,因此胞内代谢产物相似度也较高,有学者研究发现鼠伤寒沙门氏菌、慕尼黑沙门氏菌和哈特福德沙门氏菌三个菌株的胞内代谢产物没有明显差别^[8]。但菌体在实际培养环境下容易受到环境刺激,而作为基因组和蛋白质组下游终产物的小分子胞内代谢产物,容易随着环境变化而发生应激变化。从上述各菌株胞内代谢轮

廓分析可知,各菌株胞内代谢产物存在较大差异,通过对上述5种不同血清型沙门氏菌标准菌株所有检

测到的代谢产物信息进行分析,寻找到各血清型潜在的生物标志物,列表2所示。

表2 不同沙门氏菌血清型的潜在生物标志物(丰度/10⁶±RSD)

Table 2 Characteristic metabolites of different *Salmonella* serotypes (abundance/10⁶±RSD)

血清型	生物标志物	T	<i>S. enteric</i> 13076	<i>S. enteric</i> 50335	<i>S. typhi</i> 50071	<i>S. typhi</i> 50098
1,9,12:g,m:[1,7]	硫基乙酸	16.92	23.15±6.91	27.81±9.37	ND	ND
	α -羟基-戊二酸	23.97	28.94±5.86	31.84±8.37	ND	ND
9,12,vi:d:_	N-乙酰基-天冬氨酸	27.48	ND	ND	7.40±5.18	10.1±2.70
	L-苏糖酸	24.12	ND	ND	6.97±3.93	7.89±2.75
1,4,[5],12:i:1,2	2(1H)-嘧啶酮	44.00	ND	ND	5.21±1.82	2.3±1.94
	肉豆蔻酸甲酯	36.63	ND	ND	ND	ND
6,7:c:1,5	甘油醚葡萄糖苷	23.97	ND	ND	ND	ND
	1,4-萘醌	24.41	ND	ND	ND	ND
1,2:1,2,5	3-吡啶甲酸三甲酯	17.97	ND	ND	ND	ND

血清型	生物标志物	<i>S. typhimurium</i> 50115	<i>S. typhimurium</i> 14028	<i>S. choleraesuis</i> 50018	<i>S. arizona</i> 47001
1,9,12:g,m:[1,7]	硫基乙酸	ND	ND	ND	ND
	α -羟基-戊二酸	ND	ND	ND	ND
9,12,vi:d:_	N-乙酰基-天冬氨酸	ND	ND	ND	ND
	L-苏糖酸	ND	ND	ND	ND
1,4,[5],12:i:1,2	2(1H)-嘧啶酮	ND	ND	ND	ND
	肉豆蔻酸甲酯	8.35±3.91	6.80±2.37	ND	ND
6,7:c:1,5	甘油醚葡萄糖苷	60.65±6.82	76.80±15.14	ND	ND
	1,4-萘醌	ND	ND	189.2±65.45	ND
1,2:1,2,5	3-吡啶甲酸三甲酯	ND	ND	ND	100.8±41.07

注: T表示保留时间(min); ND表示未检测出该代谢产物。

从表2可知,上述5种血清型沙门氏菌标准菌株的潜在生物标志物主要属于糖类、有机酸类等化合物。其中肠炎沙门氏菌血清型(1,9,12:g,m:[1,7])产生的特异性产物硫基乙酸在标准菌株*S. enteric*13076和50335丰度分别为23.15×10⁶和27.81×10⁶, α -羟基-戊二酸的丰度分别达到28.94×10⁶和31.84×10⁶,这两个化合物在微生物代谢组学相关的文献中未见报道,因此可以作为潜在的新生物标志物。伤寒沙门氏菌血清型(9,12,vi:d:_)的特异性产物N-乙酰基-天冬氨酸在*S. typhi*50071和50098标准菌株中丰度分别为7.4×10⁶和10.2×10⁶,L-苏糖酸丰度分别为6.97×10⁶和7.89×10⁶,而产物2(1H)-嘧啶酮的丰度也相对较高,另一方面这三种产物在微生物代谢组学中未见报道,因此可以作为伤寒沙门氏菌血清型潜在的新生物标志物。

鼠伤寒沙门氏菌血清型(1,4,[5],12:i:1,2)产生的特异性产物肉豆蔻酸甲酯在标准菌株*S. typhimurium*50115和14028中丰度达到8.35×10⁶和6.80×10⁶,而甘油醚葡萄糖苷丰度也较高,分别达到

60.65×10⁶和76.80×10⁶,并且在微生物代谢组学相关研究中未见报道,因此可以作为潜在的新生物标志物。猪霍乱沙门氏菌血清型(6,7:c:1,5)产生的特异性产物1,4-萘醌,在*S. choleraesuis*50018标准菌株中检测出的丰度达到189.2×10⁶,而3-吡啶甲酸三甲酯作为亚利桑那沙门氏菌血清型(1,2:1,2,5)的特异性产物,在*S. arizona*47001标准菌株中检测出的浓度相对较高,达到100.84×10⁶,迄今为止这两种化合物在其他微生物代谢组学相关研究中也未见报道,因此可以作为潜在的新生物标志物。

2.3 热图分析和PCA主成分分析

为了进一步探讨胞内代谢产物与血清型鉴别的关键,通过Heml软件将上述5种不同血清型沙门氏菌标准菌株检测出的所有胞内代谢产物进行热图聚类分析,如图2所示。

从图2可知,热图右边的颜色条带梯度一一对应着左边的代谢产物及其丰度,因此热图可以作为代谢产物指纹图谱。结合聚类分析,可以将这5种不同血

清型标准菌株分为两个类群：类群 I 为亚利桑那沙门氏菌血清型 *S.arizonae*；类群 II 为余下 4 种血清型，其中肠炎沙门氏菌血清型为一簇，鼠伤寒沙门氏菌血清型为一簇，伤寒沙门氏菌血清型与猪霍乱沙门氏菌血清型较类似分为一簇。聚类分析结果基本符合伯杰细菌手册第九版的分类^[9]。

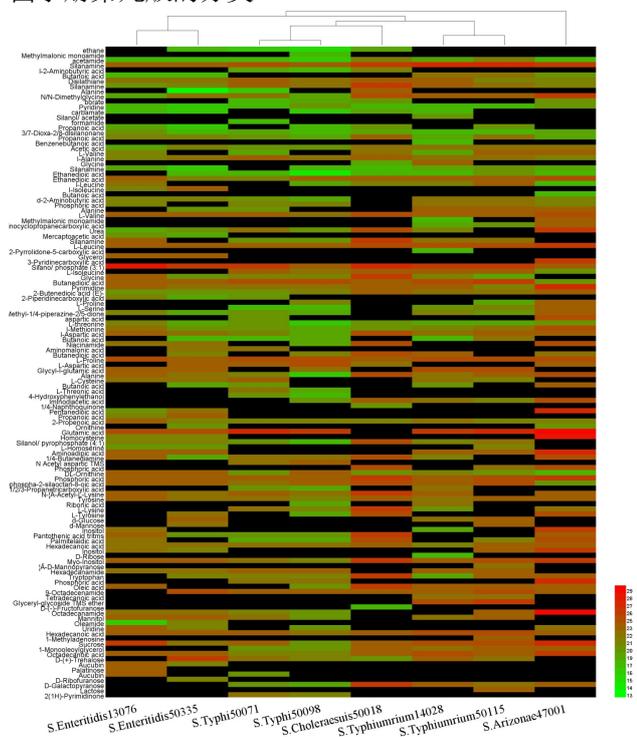


图 2 沙门氏菌标准菌株胞内代谢产物热图分析

Fig.2 Heatmap of intracellular metabolites from *Salmonella* standard strains

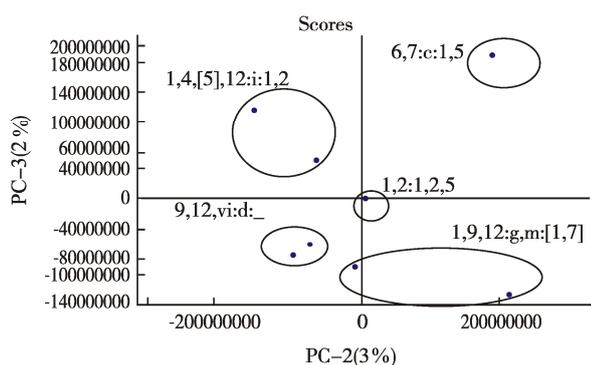


图 3 不同血清型胞内代谢产物的 PCA 主成分分析

Fig.3 PCA of the intracellular metabolites from different serotypes

进一步将上述 5 种血清型沙门氏菌标准菌株进行 PCA 主成分分析，从图 3 得分图可知，8 株样品的 PCA 主成分与聚类分析的结果相符，可以明显的区分亚利桑那沙门氏菌血清型（1,2:1,2,5）、鼠伤寒沙门氏菌血清型（1,4,[5],12:i:1,2）、肠炎沙门氏菌血清型（1,9,12:g,m:[1,7]）、猪霍乱沙门氏菌血清型（6,7:c:1,5）和伤寒沙门氏菌血清型

（9,12,vi:d;-）也可以明显区分开来。因此，对 5 种不同血清型沙门氏菌标准菌株的胞内代谢轮廓进行聚类和 PCA 分析，可以进行血清型鉴别。

3 总结

3.1 本文采用 GC-MS，基于代谢组学技术对不同血清型沙门氏菌标准菌株进行胞内代谢轮廓研究。共获得 127 种代谢产物，胞内代谢产物主要为氨基酸类、有机酸类、胺类、糖类、磷酸类和脂类等物质，而且不同血清型之间的胞内产物在种类和丰度上具有较大差异。

3.2 通过构建指纹图谱，寻找到各血清型的特异性代谢产物，可作为各血清型的潜在新生物标志物，为食源性致病沙门氏菌血清型快速鉴定区分提供新的检测靶标。

3.3 结合热图进行胞外代谢指纹图谱重建和聚类分析，可以将上述 5 种血清型分为两个类群，进一步进行 PCA 分析，可以明显区分这 5 种血清型。结果表明，基于代谢组学构建胞内代谢产物指纹图谱和生物标志物数据库用于沙门氏菌血清型的快速鉴定具有较好的实用价值和科学意义。

参考文献

- [1] 尹德凤,张莉,张大文,等.食品中沙门氏菌污染研究[J].江西农业学,2015,27(11):55-60
YIN De-feng, ZHANG Li, ZHANG Da-wen, et al. Research status of pollution of *Salmonella* in food [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2015, 27(11): 55-60
- [2] 蒋原.食源性病原微生物检测指南[M].北京:中国标准出版社,2010
JIANG Yuan. Detection guide of food-borne pathogenic microorganism [M]. Beijing: Standards Press of China, 2001
- [3] 刘雯静,邱少富,刘雪林,等.沙门氏菌的分子分型方法[J].现代生物医学进展,2010,10(20):3948-3950
LIU Wen-jing, QIU Shao-fu, LIU Xue-lin, et al. Molecular typing method for *Salmonella* [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(20): 3948-3950
- [4] Cheung P Y, Kam K M. *Salmonella* in food surveillance: PCR, immunoassays, and other rapid detection and quantification methods [J]. Food Research International, 2011, 45(2): 802-808
- [5] 李玉冬,吴清平,张菊梅,等.常见食源性致病菌胞外代谢轮廓分析[J].现代食品科技,2016,1:37-43
LI Yu-dong, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei, et al. Extracellular metabolic profiling of common food-borne

- pathogen [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 1: 37-43
- [6] Ubonrat S, Bruce R H. Solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry integrated with chemometrics for detection of *Salmonella typhimurium* contamination in a packaged fresh vegetable [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 581(1): 63-70
- [7] Elin Näsström, Nga Tran Vu Thieu, Dongol S. *Salmonella Typhi* and *Salmonella Paratyphi A* elaborate distinct systemic metabolite signatures during enteric fever [J]. *Epidemiology and Global Health*, 2014, 3(3): 1-19
- [8] Cevallos-Cevallos J M, Danyluk M D, De-Corcuera J R. GC-MS based metabolomics for rapid simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Muenchen*, and *Salmonella Hartford* in ground beef and chicken [J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(4): 238-246
- [9] George M G, Julia A B, Timothy G L. Taxonomic outline of the prokaryotes bergey's manual systematic bacteriology [M]. Springer, 2004