

基于高通量测序技术的实验动物沙门氏菌 检测方法的建立与评价

胡毅翔, 张欢欢, 余陈欢, 金晓音, 应华忠

(浙江省医学科学院 浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 杭州 310013)

【摘要】 目的 建立基于高通量测序技术的实验动物沙门氏菌检测方法,应用于实验动物沙门氏菌的检测。**方法** 提取小鼠粪便 DNA 样本,分别针对 16S rDNA 区域、23S rDNA 区域、16S~23S rDNA IS、23S~5S rDNA IS、*gyrB* 优选区域设计通用引物,对各个引物进行测试分析,优化扩增条件并建库,利用 Illumina 高通量测序技术检测区分 42 个样本中的沙门氏菌,评价该方法的特异性和稳定性。**结果** 筛选发现沙门氏菌的菌种分类优选区域为 *gyrB* 基因,*gyrB* 基因引物序列为 FP5'-AACCACCGCAATCAGACCTT3',FP5'-AGCCACGAAACCTTCACYA-3'。对引物进行优化,确定最佳扩增条件及样品上样量并正式建库,通过高通量测序和序列分析能检测出 42 个样品中极微量的沙门氏菌,检测方法稳定,灵敏度高,检测限可达 $0 \sim 10^2$ 的 cfu。**结论** 本实验利用高通量测序技术,建立了一套完整检测实验动物沙门氏菌的生物体系,能检测出实验动物体内极微量的沙门氏菌,检测方法稳定性好,灵敏度高,可沿用至其他种类病原微生物的检测。

【关键词】 沙门氏菌;实验动物;高通量测序

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0072-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.014

Establishment and evaluation of a high throughput sequencing technology for detection of *Salmonella* in laboratory animals

HU Yi-xiang, ZHANG Huan-huan, YU Chen-huan, JIN Xiao-yin, YING Hua-zhong
(Zhejiang Key Laboratory of Experimental Animal and Safety Evaluation,
Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

【Abstract】 Objective To establish a detection method of *Salmonella* in laboratory animals based on a high-throughput sequencing technology, and to apply it in detection of *Salmonella* in laboratory animals. **Methods** DNA samples were extracted from mouse feces. Universal primers for 16S rDNA, 23S rDNA, 16S-23S rDNA, 23S-5S rDNA region, *gyrB* preferred area were designed, respectively. Each primer was tested and analyzed to determine the best amplification conditions and build a database. Forty-two samples of *Salmonella* were assayed by Illumina high-throughput sequencing technology and evaluated the specificity and stability of this method. **Results** The species preferred region of *Salmonella* was *gyrB* gene region. The primers for *gyrB* gene were FP5'-AACCACCGCAATCAGACCTT3' and FP5'-AGCCACGAAACCTTCACYA-3'. The primers were optimized and determined, through a high-throughput sequencing, and the sequence analysis detected very small amount of *Salmonella* in the 42 samples, indicating that this detection method is stable, highly sensitive, and the limit of detection reached to $0 \sim 10^2$ CFU. **Conclusions** We have established a complete

[基金项目] 浙江省卫生高层次人才(2012F30026),浙江省科技厅院所专项(2016F30001)。

[作者简介] 胡毅翔(1989-),男,硕士研究生,研究方向为中药药理学。Email: aahyxaa@163.com。

[通讯作者] 应华忠(1968-),男,研究员,从事动物模型与比较医学研究。Email: YHZ0101@126.com。

detection system for detection of *Salmonella* in laboratory animals based on a high-throughput sequencing technology, This system can detect trace amounts of *Salmonella* in laboratory animals, and this detection method is stable and highly sensitive, which can be also used in detection of other kinds of pathogenic microorganism in laboratory animals.

【Key words】 *Salmonella*; Laboratory animal; High-throughput sequencing

沙门氏菌(*Salmonellae*)是一类可以引起沙门氏菌病的典型人畜共患病原菌,属肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*),兼性厌氧型革兰氏阴性菌^[1,2]。自 1885 年 Salmon 等分离得到猪霍乱沙门氏菌以来,目前已检出沙门氏菌血清型约 2 500 余种,其中我国发现的 100 多种^[3]。沙门氏菌在分类学上被分为两个种,分别为 *Salmonella enterica* 和 *Salmonella bongori*,可由多种途径向人类进行传播,进入人体后在肠道内寄生并繁殖,所产生的沙门氏菌内毒素能进入血液循环,引发肠道黏膜肿胀、脱落、甚至溃疡、坏死^[4]。在实验室研究方面,携带或者潜在携带沙门氏菌的实验动物不仅对实验人员造成潜在的传染隐患,也会对后续科学实验产生较大的影响,因此对于实验动物的沙门氏菌的检测尤为重要^[5]。

生化方法和免疫学方法是目前检测沙门氏菌的主要方法,但这类方法检验程序复杂繁琐,耗时长,部分检验过程及结果判定存在实验人员的主观判断,因此新的检测方法的引入势在必行^[6]。分子生物学方法具有快速、准确的优势,现已开始被大量的应用于检测病原微生物,主要涉及到的分子生物学技术主要包括 PCR 技术、基因芯片和环介导等温扩增技术(LAMP)等^[7,8]。近年来,高通量测序技术开始引入病原微生物检测领域,实现了更为高效的检测手段。本次研究主要采用的是 Illumina 的 Miseq 高通量测序平台,对于病原微生物检测该平台具有周期短、通量高、成本低、准确率高等优点^[9,10]。本实验以分子生物学技术方法为基础,采用 Miseq 高通量测序技术检测实验室用小鼠所携带的沙门氏菌,通过本次研究,建立了一套完整检测实验动物沙门氏菌的技术体系。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级 ICR 小鼠 42 只,体重 18~20 g,由浙江省医学科学院实验动物中心提供(实验动物生产许可证号为 SCXK(浙)2008-0034,使用许可证号为 SYXK(浙)2008-0114)。

1.2 菌株

鼠伤寒沙门氏菌冻干株(编号:TA98),甲型副

伤寒沙门氏菌冻干株(编号:CMCC(B)50093),肠炎沙门氏菌冻干株(编号:TDF918),志贺菌冻干株(编号:TG212)为本实验室冷冻保存。

1.3 药品和试剂

Premix Ex Taq™ Hot Start Version(日本 Takara 公司,批号 RR030A),DL2000 DNA Marker(日本 Takara 公司,批号 3427),Axygen PCR Clean Up Kit(美国 Axgen 公司,批号 AP-PCR-500),QubitdsDNA HS Assay Kit(美国 Invitrogen 公司,批号 Q32851),PrimeScript® RT reagent Kit(日本 Takara 公司,批号 DRR037A)。高通量测序试剂盒(Illumina,美国),Trizol reagent(Invitrogen,美国,批号 Q35438)。

1.4 主要仪器

Bioanalyzer 2100 生物分析仪(Agilent,美国);Hiseq 2500 高通量测序仪(Illumina,美国);荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国);Qubit 2.0 核酸定量仪(Life Technologies,美国);组织研磨仪(TissueLyser, Qiagen,德国)。

1.5 实验方法

1.5.1 小鼠沙门氏菌模型的建立及样品收集:小鼠适应性饲养 3 d 后,随机分为 6 组:鼠伤寒沙门氏菌组(5 只)、甲型副伤寒沙门氏菌组(5 只)、志贺杆菌组(5 只)、肠炎沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌(5 只)、肠炎沙门氏菌组(18 只)、阴性对照组(4 只)。鼠伤寒沙门氏菌组每只小鼠灌服鼠伤寒沙门氏菌,甲型副伤寒沙门氏菌组每只小鼠灌服鼠伤寒沙门氏菌 0.2 mL (5×10^3 cfu/mL),志贺杆菌组每只小鼠灌服鼠伤寒沙门氏菌 0.2 mL (5×10^3 cfu/mL),肠炎沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌每只小鼠灌服肠炎沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌 0.2 mL (5×10^3 cfu/mL),肠炎沙门氏菌组每只小鼠灌服鼠伤寒沙门氏菌 0.2 mL (0 cfu/mL, 5×10^1 cfu/mL, 5×10^2 cfu/mL, 5×10^3 cfu/mL, 5×10^4 cfu/mL, 5×10^5 cfu/mL),每个浓度各 3 只,各组小鼠每隔 2 周灌胃 1 次,连续 3 次。取 60 mg 小鼠粪样置于 2 mL 离心管中,采用 PowerFecal DNA Isolation Kit 试剂盒(MoBio,美国)抽提 100 mg 小鼠粪便样本中微生物的总 DNA,操作步骤按照说明书进行,完成基因组 DNA 抽提后,放 -20℃ 保存备用,样品信息见表 1。

表 1 样品信息
Tab.1 Sample Information

样品名称	样品数(个)
菌量 10^3 cfu 鼠伤寒沙门氏菌冻干株	5
菌量 10^3 cfu 甲型副伤寒沙门氏菌冻干株	5
菌量 10^3 cfu 志贺杆菌	5
菌量各 10^3 cfu 肠炎沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌	5
阴性对照样品	4
菌量 0 cfu 肠炎沙门氏菌	3
菌量 10^1 cfu 肠炎沙门氏菌	3
菌量 10^2 cfu 肠炎沙门氏菌	3
菌量 10^3 cfu 肠炎沙门氏菌	3
菌量 10^4 cfu 肠炎沙门氏菌	3
菌量 10^5 cfu 肠炎沙门氏菌	3

1.5.2 菌种分类优选区域选择:通过文献查找,针对沙门氏菌,寻找在研究范围内的几个菌种相互之间差异变化大的区域。NCBI 数据库中查找沙门氏菌典型菌株,以鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)典型菌株 LT2、ST4/74 等作为研究对象。通过序列比对,去除经比对菌种间同源关系极高的区域,最终筛选得到 5 大类区域:①16S rDNA 区域,②23S rDNA 区域,③16S ~ 23S rDNA ISR,④23S ~ 5S rDNA ISR,⑤gyrB 优选区域。

1.5.3 通用引物设计及优化:针对①16S rDNA 区域,②23S rDNA 区域③16S ~ 23S rDNA ISR,④23S ~ 5S rDNA ISR,⑤gyrB 优选区域设计通用引物,通用引物在多个菌种中都能 PCR 扩增得到产物。对设计的引物进行引物测试,淘汰不能扩增的引物。在原有的通用引物基础上加上建库和测序需用到的接头序列(Linker),区分样本使用的正反向 Barcode 序列(Index),增加文库均一性和丰富度的连接碱基(heterogeneity spacer),如此设计的引物长度在 90 bp ~ 97 bp 之间,该优化引物可直接用于建库,实际的建库工作需要一步 PCR 反应完成。优化引物设计图如图 1 所示:

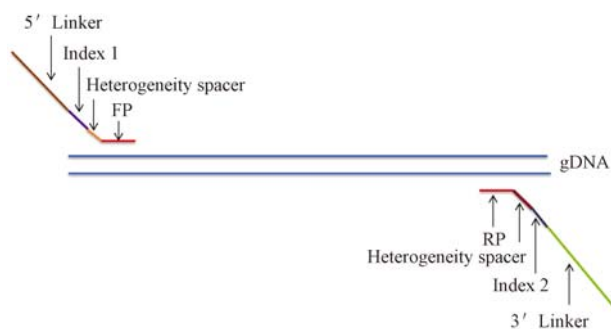


图 1 优化引物结构组成图

Fig.1 Diagram of optimization of the primer structure

1.5.4 沙门氏菌建库 PCR 条件摸索:建库 PCR 采

用的是 90 ~ 97 bp 长度的长链引物,这与普通 16 ~ 25 bp 的引物 PCR 扩增条件会有很多不同,长链引物扩增条件比普通引物扩增的条件要苛刻。建库 PCR 条件摸索:模板上样量、退火温度、循环、延伸时间,其中主要考查上样量和退火温度。(1)退火温度:考察的退火温度为 56℃、54℃、52℃。2)模板上样量:针对模板上样量设计 11 个模板浓度梯度实验,模板信息如表 1 所示。上样量共分为 12 个梯度,依次为 500、200、100、50、25、10、1 ng、100、10、1、100、10 fg。

1.5.5 高通量测序体系的特异性和敏感性检测:42 个检测样本的建库后采用 Illumina Miseq 高通量测序平台进行高通量测序。随后对高质量序列进行提取,提取方法:Miseq 测序得到的 PE reads 首先根据 overlap 关系进行拼接,将成对的 reads 拼接成一条序列,同时对 reads 质量和 merge 的效果进行质量质控和过滤,去除序列末端的后引物和接头序列、多碱基 N、polyA/T 尾巴及低质量碱基;去除所得序列的 barcode 标签序列、前引物序列;丢弃长度短于 200 bp、模糊碱基数 > 0、序列平均质量低于 20 的序列。高通量测序结果与样本信息进行对比,评价高通量测序体系检测沙门氏菌的特异性和敏感性。

2 结果

2.1 通用引物设计及引物测试

针对①16S rDNA 区域,②23S rDNA 区域,③16S ~ 23S rDNA ISR,④23S ~ 5S rDNA ISR,⑤gyrB 优选区域各设计 3 对通用引物。经过测试,16S rDNA、23S rDNA、gyrB 各有一对引物通过测试。但分析后发现 16S rDNA、23S rDNA 的引物实际建库测序的结果与设计时的有偏差,它无法区分样品中的肠炎沙门氏菌。最后确定沙门氏菌的菌种分类优选区域为 gyrB 基因引物(表 2)。gyrB 基因通用引物引物测试电泳结果如图 2 所示,由于 gyrB 基因不仅存在于沙门氏菌中,在志贺杆菌、大肠杆菌等肠科杆菌中都存在该基因,因此样品中只要有以上任一菌种,都能扩增出目的条带。引物主要是优势扩增沙门氏菌,但是该引物对于其他沙门氏菌和肠科杆菌的模板 DNA 还是有微弱的结合能力,因此即使是沙门氏菌阴性样品,也能够扩增得到目的条带。针对 gyrB 基因设计的 1 对引物(测试了鼠伤寒沙门氏菌和志贺杆菌其中的两个样本),条带单一,

表 2 *gyrB* 基因通用引物基本信息
Tab. 2 Basic information of the universal primer for *gyrB* gene

<i>gyrB</i> 引物	通用引物序列 (5' - 3')	片段长度 (bp)
FP	AACCACCGCAATCAGACCTT	456
RP	AGCCACGAAACCTTCACYA	

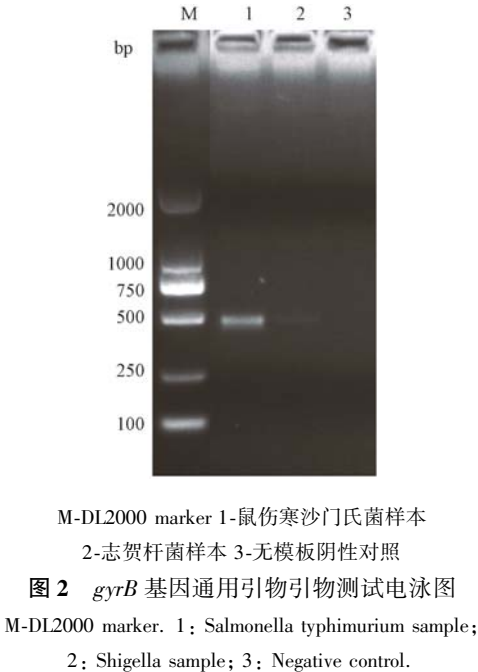


图 2 *gyrB* 基因通用引物引物测试电泳图
Fig. 2 Electrophoregram of the universal primers for *GyrB* gene

条带大小约为 456 bp,通过电泳图可以看到此对引物对沙门菌的 *gyrB* 基因优势扩增,条带较亮,对属于肠杆菌属的志贺杆菌的 *gyrB* 基因扩增能力有很大程度降低,条带较淡。

2.2 沙门氏菌建库 PCR 条件优化

2.2.1 退火温度:第 1 轮 PCR,退火温度 56℃,无扩增条带,未成功;第 2 轮 PCR,退火温度 54℃,无扩增条带,未成功;第 3 轮 PCR,退火温度 52℃,有扩增条带,成功。

2.2.2 模板上样量:针对模板上样量设计一个模板浓度梯度实验,共分为 12 个梯度,依次为 500、200、100、50、25、10、1 ng、100、10、1、100、10 fg,实验结果如下电泳图 3。通过以上模板浓度梯度实验,可以发现模板在 10 ng ~ 200 ng 范围内,都能扩增得到目的片段。为了保证最后的产物有足够的量,也就是要保证目的条带足够亮,选择较为合适的模板浓度 150 ng 作为体系最终的模板浓度。总结沙门氏菌 *gyrB* 基因建库 PCR 体系为 DNA 150 ng、*Premix Ex Taq* 12.5 μL,上下游优化引物 (10 pmol /μL) 各 2.5 μL,补充 ddH₂O 至 20 μL;PCR 最佳反应条件为:98℃ 预变性 30 s;98℃ 变性 10 s,52℃ 退火 30s,72℃ 延伸 10

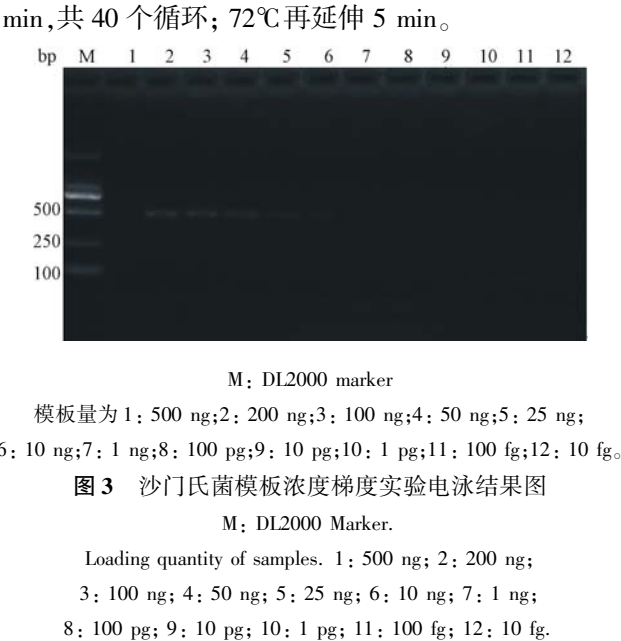


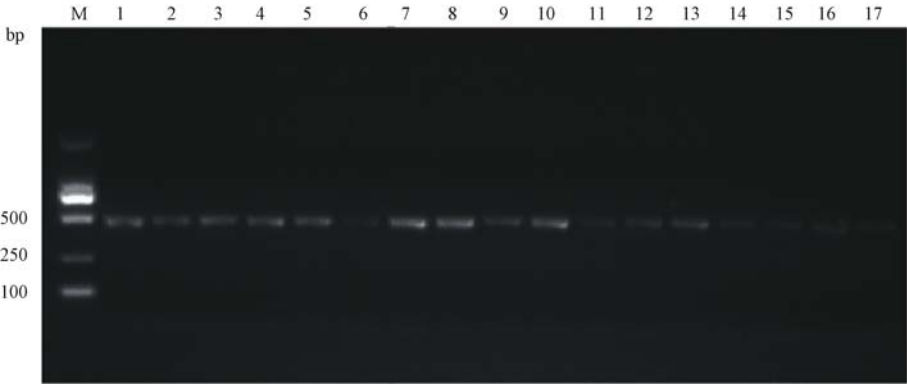
图 3 沙门氏菌模板浓度梯度实验电泳结果图
Fig. 3 Results of concentration gradient experiment of the *Salmonella* templates

2.3 样本正式建库

采用以上摸索得到的建库 PCR 条件将所有样品进行建库,建库 PCR 结果如图 4 ~ 6 所示。结果显示,42 个样本建库成功,均可得到 456 bp 大小的目的条带。

2.4 检测结果的准确性、特异性及重复性分析

42 个样本的高通量测序检测结果如表 3 所示,各样本检测到的主体菌种与目的菌种基本上一致的。通过测序的方法在样品中存在的极微量的菌种也被检测到,因此在一些样品中除了要检测的主体菌种外,还存在极微量拷贝数的其他沙门氏菌菌种。在志贺杆菌中,特别设置了一个志贺杆菌的数据库用于 19 ~ 23 号样品的比对,发现无法检测到该菌种,说明设计的引物可以特异扩增沙门氏菌。在混合菌种中,该引物能将两种不同的菌种进行区分。针对肠炎沙门氏菌设置的 cfu 梯度,从检测的结果可以看出,在 0 ~ 10² 的 cfu 范围内,也能检出,在其他 cfu 梯度样品中都能稳定检出,准确性及灵敏度高,各平行样本之间的检测结果一致,说明该方法具有较高重复性。通过高通量测序技术能够将检测出极微量的沙门氏菌,并能沙门氏菌很好的区分出来。

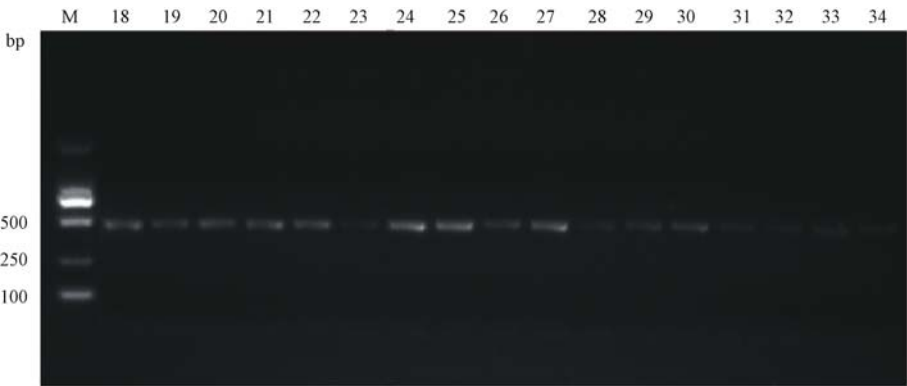


M: DL2000 marker 1-17 ;1-17 号样本

图 4 1-17 号样本建库 PCR 电泳图

M: DL2000 marker 1-17 ; Sample 1-17

Fig. 4 PCR electrophoregram of the sequencing library of samples 1-17



M: DL2000 marker. 18-34;18-34 号样本

图 5 18-34 号样本建库 PCR 电泳图

M: DL2000 marker. 18-34; Samples 18-34

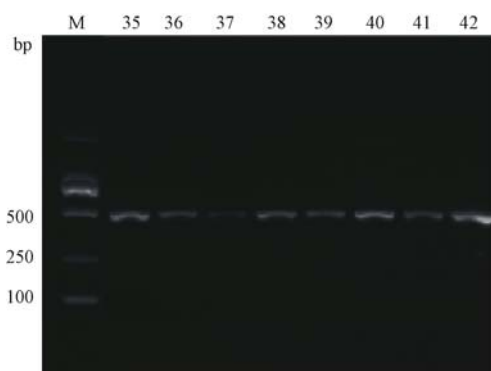
Fig. 5 PCR electrophoregram of the sequencing library of samples 18-34

表 3 沙门氏菌样本的数据分析结果

Tab.3 Analysis results of the Salmonella samples

样品 编号	目的菌种	检测到的 主体菌种	检测到的 其他菌种	样品编号	目的菌种	检测到的 主体菌种	检测到的 其他菌种
1	ST	ST		22	SA & SE	SA & SE	
2	ST	ST	SA(极微量)	23	SA & SE	SA & SE	
3	ST	ST		24	Control	No hits found	
4	ST	ST		25	0 cfu SE	No hits found	
5	ST	ST		26	0 cfu SE	No hits found	SE(极微量)
6	Control	No hits found		27	0 cfu SE	No hits found	SE(极微量)
7	SA	SA		28	10 ¹ cfu SE	SE(极微量)	
8	SA	SA		29	10 ¹ cfu SE	No hits found	
9	SA	SA	ST(极微量)	30	10 ¹ cfu SE	No hits found	
10	SA	SA	ST(极微量)	31	10 ² cfu SE	SE(极微量)	
11	SA	SA		32	10 ² cfu SE	SE	
12							
1111	Control	No hits found	SA & ST(极微量)	33	10 ² cfu SE	No hits found	
13	SH	SH		34	10 ³ cfu SE	SE	SA & SE(极微量)
14	SH	SH	SA(极微量)	35	10 ³ cfu SE	SE	
15	SH	SH		36	10 ³ cfu SE	SE	
16	SH	SH		37	10 ⁴ cfu SE	SE	SA(极微量)
17	SH	SH		38	10 ⁴ cfu SE	SE	
18	Control	No hits found	SA & SE(极微量)	39	10 ⁴ cfu SE	SE	
19	SA & SE	SA & SE		40	10 ⁵ cfu SE	SE	
20	SA & SE	SA & SE		41	10 ⁵ cfu SE	SE	
21	SA & SE	SA & SE		42	10 ⁵ cfu SE	SE	

注: ST: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; 鼠伤寒沙门氏菌; SA: *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A; 甲型副伤寒沙门氏菌; SE: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis; 肠炎沙门氏菌; SH: *Shigella*; 志贺菌



M: DL2000 marker. 35-42: 35-42 号样本

图 6 35-42 号样本建库 PCR 电泳图

M: DL2000 marker. 35-42: Sample 35-42

Fig. 6 PCR electrophoregram of the sequencing library of samples 35-42

3 讨论

人畜共患病是指由同一种病原体引起,流行病学上相互关联,在人类和动物之间自然传播的疫病。其病原包括病毒、细菌、支原体、螺旋体、立克次氏体、衣原体、真菌、寄生虫等。这类疾病的特性在于很不容易消灭。因此这些病原微生物的存在会对人类健康、畜牧业安全生产、畜产品安全和公共卫生造成重大危害^[11]。沙门氏菌是一类可以引起沙门氏菌病的典型人畜共患病原菌,并且在实验动物中十分常见,可感染实验人员并对实验结果造成不可预估的影响,因此对于沙门氏菌的检测就变得尤为重要。

如今,分子生物学技术已越来越多的被应用于菌种鉴定,比如现在较为成熟的 16S rDNA 细菌菌种鉴定技术,ITS 区真菌菌种鉴定技术等等,都体现出了简便、快速、高效的特点。菌种鉴定到属的级别还是相对较容易的,现在也有很多技术可以达成,但是想要鉴定到种、亚种甚至是菌株的水平,鉴定的困难程度就要提高很多。16S rDNA 能很好的将菌种鉴定到属的层面,但是由于 16S rDNA 的进化速度非常慢,即太保守,虽对种系有一定的区分能力,但是难以区分某些种系非常接近的菌种及同一菌种的不同菌株。23S rDNA 也可用于菌种鉴定,有些学者认为其系统进化分析能力甚至比 16S rDNA 更强,但是由于 23S rDNA 的分子大小较大,因此它的使用也受到了限制^[12,13]。核糖体基因间隔区(intergenic spacer region, ISR)为 rDNA 区域之间高度可变的区域,它的进化速度远远的高于 rDNA 区域,可以用于菌种间的鉴别。ISR 区域主要有 16S

~23S rDNA ISR 区域和 23S ~5S rDNA ISR 区域。ISR 区域碱基变化程度与 rDNA 区域的程度相差不多,它优于 rDNA 区域的原因主要是该区域存在片段插入或缺失,导致片段大小的变化从而产生了种间和种内差异^[14]。Morales 等还发现 23S ~5S rDNA ISR 区域比 16S ~23S rDNA ISR 区域具有更好的菌种区分能力^[15]。然而,在某种程度上,ISR 区域的种系鉴别能力也因其高度变异性和高度进化率而受到限制。

细菌中的一些基因也可以作为系统发育标记基因,比如 *gyrB* 基因,该基因编码 DNA 解旋酶(*gyrase*)的 B 亚单位,具有 DNA 依赖的 ATP 酶活性,催化 ATP 的水解。Fukushima 应用 *gyrB* 基因对大肠埃希菌、沙门氏菌和志贺杆菌进行系统发育分析,证实了 *gyrB* 基因优于 16S rDNA 基因^[14]。由于 *gyrB* 基因的进化速度比 16S rDNA 等其他基因快,因此更适用于亲缘关系较近的种内及种间的鉴定和分类。

在本研究中,针对 16S rDNA、3S rDNA、16S ~23S rDNA IS、23S ~5S rDNA IS、*gyrB* 优选区域设计通用引物,对各个引物进行测试分析,最终筛选发现沙门氏菌的菌种分类优选区域为 *gyrB* 基因,*gyrB* 基因引物序列 FP 5'-AACCACCGCAATCAGACCTT-3', RP 5'-AGCCACGAAACCTTCACYA-3'。优化扩增条件并建库,利用 Illumina 高通量测序技术检测区分 42 个样本进行通过高通量测序和序列分析,能够检测出样本中极微量的沙门氏菌,检测方法稳定,检测限可达 0 ~ 10² 的 cfu,检测方法稳定性好,灵敏度高,可沿用至其他科学研究用的动物(如大鼠、豚鼠、家兔等)病原微生物的检测,同时还可将该实验体系应用于其他种类病原微生物的检测。

参考文献:

- [1] 王军,郑增忍,王晶钰. 动物源性食品中沙门氏菌的风险评估[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(4): 23-25.
- [2] 张嘉宁,藏富妍,顾为望. 应用 PCR 法检测小鼠沙门氏菌[J]. 中国比较医学杂志, 1999, 9(1): 45-47.
- [3] McGuinness S, McCabe E, O'Regan E, et al. Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of Salmonella on fresh meat [J]. Meat Sci, 2009, 83(3): 555-562.
- [4] Liu FP, Tong HM. *GyrA* and *ParC* gene mutation of clinically isolated fluoroquinolone-resistant strain of salmonella [J]. J Northeast Agr Univ, 2006, 13(1): 47-50.
- [5] Yan SS, Pendrak ML, Abela-Ridder B, et al. An overview of Salmonella typing — public health perspectives [J]. Clin Appl Immunol Rev, 2003, 4(3): 189-204.

- [6] 范媛媛, 郑冰, 王树祥, 等. 一种新型培养基在沙门氏菌检测中的效果评价 [J]. 食品工业科技, 2008, 8: 415-417.
- [7] 杨保伟, 盛敏, 席美丽, 等. 食源性沙门氏菌耐药性检测及相关质粒 [J]. 微生物学报, 2008, 48(8): 1006-1012.
- [8] He LL, Sok D, Azadnia P, et al. Toward a more accurate view of human B-cell repertoire by next-generation sequencing, unbiased repertoire capture and single-molecule barcoding [J]. Sci Rep, 2014, 4: 67-78.
- [9] Weinstein JA, Jiang N, White III RA, et al. High-throughput sequencing of the Zebrafish antibody repertoire [J]. Science, 2009, 324(5928): 807-810.
- [10] DeKosky BJ, Ippolito GC, Deschner RP, et al. High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire [J]. Nat Biotech, 2013, 31(2): 166-169.
- [11] 王章云, 滕焕昭, 李柏桂, 等. 肠炎沙门氏菌引起的食物中毒细菌学调查 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(3): 115.
- [12] Henrik C, Steen N, John EO. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequences [J]. Int J Systematic Bacteriol, 1998, 48: 605-610.
- [13] Sara PL, Francisco R, Ruiting L. Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies [J]. J Bacteriol, 1998, 180(8): 2144-2151.
- [14] Cesar AM, Richard G, Jean G. Linkage of avian and reproductive tract tropism with sequence divergence adjacent to the 5S ribosomal subunit *rrfH* of *Salmonella enterica* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 264: 48-58.
- [15] Fukushima M, Kakinuma R. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(8): 2779-2785.

[修回日期]2016-03-08

(上接第 71 页)

3 分析与讨论

野百合碱可引起大鼠肺血管内皮损伤、血管重构,进而导致肺血管阻力增加,肺动脉高压形成,这与人肺动脉高压发病的病理生理机制类似^[2]。异丙肾上腺素为受体激动剂,对心肌的正性变力和变时作用可使心肌收缩力增强,心率加快,致使心肌细胞肥大,胶原纤维增生,产生心肌肥厚^[3]。但是,采用野百合碱联合异丙肾上腺素共同作用于大鼠的报道罕见,本研究发现:药物使用剂量越大,对大鼠心、肺组织破坏就越严重,大鼠的死亡率也随之上升;但如果注射药物剂量低,作用效果不明显。采用一次性注射野百合碱 55 mg/kg 联合 8 mg/kg 异丙肾上腺素连续注射 1 周,既保证了大鼠的存活率,又保证了肺动脉高压的成功形成。

本实验中,野百合碱联合异丙肾上腺素共同作用注射 6 周后,与空白对照组相比,中剂量组大鼠平均肺动脉压、右心室内压均明显升高($P < 0.05$),平均肺动脉压大大超过 25 mmHg,达到了重度以上肺动脉高压的标准,这其中也可能与生物信号采集仪的设定标准有一定的关系,也与信号采集连接导管有关系。

肺动脉高压早期,右心室尚能代偿,舒张末期压仍正常,但随着病情的进展,特别是急性加重期,肺动脉压持续升高且严重,超过右心室的负荷,右心失代偿,右心排血量下降,右室收缩末期残留血量增加,舒张末压增高,促使右心室肥厚,严重时甚至出现右心室功能衰竭。野百合碱进入大鼠体内后,在肝脏多功能氧化酶系作用下,转化为野百合吡咯而后损伤

肺血管内皮细胞,引起肺动脉平滑肌细胞增殖,最终导致肺动脉高压,继发右心室肥厚,是常用的右室肥厚病理模型^[4,5]。本研究通过注射野百合碱联合异丙肾上腺素的作用,使心肌肥厚的作用十分明显,与空白对照组比较,中剂量组心系数增加($P < 0.01$)。中剂量组大鼠右心室肥厚指数比空白对照组增加($P < 0.05$),说明野百合碱和异丙肾上腺素能对大鼠产生肺动脉高压,导致心气虚弱。

致谢: 贵州医科大学机能实验室提供了 BL-420 生物信号采集仪,张金娟老师对本 PE-10 管的自备和大鼠静脉插管的悉心指导,在此一并致以衷心的感谢。

参考文献:

- [1] 袁平, 吴文汇, 刘崇, 等. 改良心导管测定大鼠肺血管阻力的方法 [J]. 中华心血管病杂志, 2011, 39(10): 901-904.
- [2] Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, et al. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats [J]. Circ Res, 2004, 94(3): 385-393.
- [3] Bos R, Mougnot N, Findji L, et al. Inhibition of catecholamine-induced cardiac fibrosis by an aldosterone antagonist [J]. Cardiovasc Pharmacol, 2005, 45(1): 8-13.
- [4] Boor PJ, Gotlieb AI, Joseph EC, et al. Chemical-induced vasculature injury [J]. Toxicol Applied Pharmacol, 1995, 132(2): 177-195.
- [5] Naito Y, Hosokawa M, Hao H, et al. Impact of dietary iron restriction on the development of monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling and right ventricular failure in rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 436(2): 145-151.

[修回日期]2016-05-09