

## 论著

## 利用全基因组序列优化气单胞菌脉冲场凝胶电泳分型方法

陈洪友,陈敏,屠丽红,陈涌,张曦  
(上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

**摘要:**目的 对气单胞菌脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型方法从限制性内切酶的选择和电泳条件设置上进行优化,减少片段共迁移,使片段在电泳中分布均匀且利于分析。方法 利用6个种的气单胞菌的全基因组数据,通过BioEdit软件对基因组序列进行677种酶的限制性片段分析,选择产生片段数量适宜的、有效片段比例高的酶作为备选酶。对片段长度取以10为底的对数作为自变量,以片段在泳道中的相对迁移距离作为应变量,计算片段长度-相对位置拟合公式,并模拟备选酶的电泳效果图。利用气单胞菌分离株对备选酶进行试验验证,确定PFGE分型方法,并用其对腹泻分离株进行分型应用。结果 经BioEdit分析,根据片段数量及有效片段比例,*Pme* I、*Pac* I、*Swa* I比*Xba* I更适合于气单胞菌的分型。从PFGE模拟效果及分离株试验验证看,*Pac* I、*Pme* I的限制性片段的分布比*Xba* I和*Swa* I更均匀,片段重叠更少。最终确定*Pme* I、*Pac* I分别为气单胞菌PFGE分型的首选酶和次选酶,脉冲场电流转换时间为2.16~63.8 s。16株腹泻分离株PFGE分型辛普森多样性指数为99.17%。结论 优化的PFGE方法使用*Pme* I、*Pac* I作为气单胞菌PFGE分型的限制性内切酶,该方法产生的片段数量与分布都优于*Xba* I,在腹泻分离株的分型中能获得良好的分辨率。此研究提供的优化程序可用于其他细菌PFGE方法的建立或优化。

**关键词:**气单胞菌;脉冲场凝胶电泳;限制性内切酶;全基因组序列;食源性致病菌;分型

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)06-0641-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.06.002

### Using whole genome sequences to optimize pulsed field gel electrophoresis typing method for *Aeromonas*

CHEN Hong-you, CHEN Min, TU Li-hong, CHEN Yong, ZHANG Xi

(Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

**Abstract: Objective** The pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing method of *Aeromonas* was optimized from aspects of restriction enzymes and electrophoresis parameters, which reduced fragments co-migration and made them well-distributed for easily analyzing. **Methods** Using whole genome sequences of 6 *Aeromonas*, restriction fragments produced by 677 enzymes were analyzed in BioEdit software. Enzymes producing more effective fragments in appropriate number were selected, and the fitting curve and regression equation were derived from the length of restriction fragments represented as denary logarithm and the relative position of fragments in gel represented as fragments migration distance percentage of the valid length of the reference system. Digital simulation of pulsed field gel electrophoresis map was shown when length of fragments from different *Aeromonas* substituted into the equation. Results of digital simulation were also verified by PFGE typing assay with selected enzymes for *Aeromonas* typing. Isolates from diarrhea patients were subtyped by the optimized new method. **Results** BioEdit analysis result showed *Pme* I, *Pac* I and *Swa* I were better than *Xba* I as enzymes for PFGE from the aspects of total and effective number of restriction fragments. According to the result of PFGE simulation and the verification test of isolates, the distribution of fragments of *Pac* I and *Pme* I was better distributed and less overlapped than those of *Xba* I and *Swa* I. Finally, *Pme* I and *Pac* I were selected as the first and second choice of enzymes for PFGE typing, and the pulsed field conversion time was set as 2.16-63.8 s. Sixteen isolates from diarrhea patients were subtyped by new method, and the Simpson diversity index was 99.17% according to the typing result. **Conclusion** As enzymes used in PFGE typing, *Pme* I and *Pac* I were better choices than *Xba* I, and good resolution was obtained from subtyping of isolates from diarrhea. The procedure for optimizing PFGE typing method provided in this study

收稿日期:2017-08-15

基金项目:上海市第四轮公共卫生三年行动计划高端海外研修团队培养计划(GWTD2015S01);“十三五”国家传染病防治科技重大专项(2017ZX10103009-003)

作者简介:陈洪友 男 副主任医师 研究方向为致病性弧菌检测 E-mail:chenhongyou@sdc.cdc.sh.cn

通信作者:张曦 女 主任医师 研究方向为病原微生物的实验室检测 E-mail:zhangxi@sdc.cdc.sh.cn

is applicable to the establishment or optimization of other bacteria's PFGE typing method.

**Key words:** *Aeromonas*; pulsed field gel electrophoresis; restriction enzyme; whole genome sequence; food contaminant; typing

气单胞菌广泛存在于环境与食品中,已知有 11 个种可通过污染的水或食品引起人类疾病,有时还可引起食物中毒<sup>[1-2]</sup>。在对气单胞菌引起的疾病进行暴发监测或在暴发中进行溯源时,因其来源多样,需采用分辨率高的分型技术。脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)作为一种分辨率高、结果再现性好的分型方法,被广泛应用于细菌性疾病暴发的监测<sup>[3]</sup>。BORCHARDT 等<sup>[4]</sup>首次在一起气单胞菌引起的腹泻暴发中以 *Xba* I 作为限制性内切酶对气单胞菌进行 PFGE 分型,并获得良好的分辨率,此后众多研究也多采用 *Xba* I 做为气单胞菌 PFGE 分型的内切酶。

根据 PFGE 图谱的解读原则,PFGE 是通过限制性酶切片段(条带)的变化来反映菌株之间的遗传事件<sup>[5]</sup>。PFGE 分型常以沙门菌 H9812 (*Salmonella* ser. *branderup*) 的 *Xba* I 酶切片段作为 DNA 片段长度参照,长度处于该参照体系范围内的标本片段被认为是有效片段,理想的 PFGE 图谱其全部的酶切片段应均为有效片段,并且不同片段间在长度上应保持必要的差异,以保证电泳时条带之间不发生重叠且易于区分,进而能通过条带的变化对菌株的变异进行解释。以 *Xba* I 作为气单胞菌 PFGE 分型酶,产生的片段有相当数量为无效片段,且有效条带主要集中于 20 ~ 400 kb 范围内,易造成片段重叠,故较难有效反映菌株之间的遗传关系。

此次研究利用已公布的气单胞菌的全基因组序列,以酶切片段数量、有效片段比例和电泳中片段的分布作为筛选限制性内切酶和改进电泳条件的主要因素,从方法设计上尽可能保证图谱能反映菌株之间的遗传关系,并使分型图谱更易于观察、比对。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 参考序列与验证菌株来源

6 个种的气单胞菌全基因组序列从 GenBank 下载,种名、菌株号与序列登录号如下:亲水气单胞菌 (*A. hydrophila*, ATCC 7966, NC\_008570)、豚鼠气单胞菌 (*A. caviae*, FDAARGOS\_72, GCA\_000783775)、维隆气单胞菌 (*A. veronii*, B565, NC\_015424)、中间气单胞菌 (*A. media*, WS, NZ\_CP007567)、杀鲑气单胞菌 (*A. salmonicida*, A449, NC\_009348)、舒伯特气单胞菌 (*A. schubertii*, WLI483, NZ\_CP013067)。

用于 PFGE 验证的气单胞菌菌株分离自医院肠

道门诊腹泻患者粪便,标本采集于 2015 年 1 ~ 6 月。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

脉冲场凝胶电泳仪(美国 Bio-Rad),限制性内切酶 *Xba* I、*Pme* I、*Pac* I 均购自美国 NEB,蛋白酶 K[宝生物工程(大连)有限公司],CHROMagar™ 弧菌显色琼脂(法国科玛嘉)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因组酶切位点分析与限制性内切酶的选择

利用 BioEdit 软件(V7.0.9.0)对气单胞菌基因组序列进行 677 种酶的酶切位点查找,排序各酶的酶切频率。选择酶切片段数量适中,且有效片段比例高的酶作为 PFGE 分型试验的备选酶,并与 *Xba* I 进行比较。

#### 1.2.2 限制性片段电泳分离效果的模拟

以沙门菌 H9812 的 *Xba* I 酶切片段作为 DNA 片段迁移距离参照,设最大片段(1 135 kb)在泳道上的位置为 0%,设最小片段(20.5 kb)在泳道上的位置为 100%,其他片段以其在泳道中的迁移距离百分比作为片段的相对位置。在脉冲时间为 2.16 ~ 63.8 s 且电泳时间为 18.5 h 的电泳条件下,对 H9812 的各片段长度取以 10 为底的对数作为自变量( $X$ ),以片段的相对位置作为应变量( $Y$ )进行二项式拟合,获得回归方程。将各备选酶酶切 6 种气单胞菌产生的片段长度取对数代入回归方程,计算片段的相对位置,据此绘制模拟电泳图,以观察气单胞菌酶切片段在电泳中的分布。选择片段分布均匀、重叠少的酶用于气单胞菌的 PFGE 分型试验。

#### 1.2.3 PFGE 分型

菌株接种 5% 绵羊血平板 35 °C 培养 24 h,直接取培养物配制成约 4 个麦氏浊度单位的菌悬液用于凝胶包埋和细胞消化。酶切后电泳的脉冲时间为 2.16 ~ 63.8 s,电泳时间为 18.5 h。PFGE 分型其他操作参照 BORCHARDT 等<sup>[4]</sup>的报道。以辛普森多样性指数(Simpson's diversity index, DI)描述气单胞菌腹泻分离株 PFGE 型的多样性,计算公式如下:

$$DI = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

其中, $N$  代表测试个体的总数, $n$  代表各型中个体数量, $i$  代表不同的型。

#### 1.2.4 验证菌株的分离与鉴定

粪便标本直接接种 CHROMagar™ 弧菌显色琼

脂平板进行分离培养。每个平板挑选 5 个可疑菌落,参考既往报道使用属特异性 16S rRNA 基因引物进行聚合酶链式反应 (PCR) 鉴定<sup>[6]</sup>,目标片段长度为 461 bp。

## 2 结果

### 2.1 基因组限制性片段分析

6 种气单胞菌基因组的酶切频次显示,频次最少的 10 种酶中,用于对照的 *Xba* I 多位于第 5 位,

表 1 各气单胞菌基因组酶切频次最少的 10 种限制性内切酶及其酶切频次

Table 1 First 10 enzymes of least frequency for each *Aeromonas* genome and their genome cutting frequency

亲水气单胞菌		豚鼠气单胞菌		维隆气单胞菌		中间气单胞菌		杀鲑气单胞菌		舒伯特气单胞菌	
酶	频次										
<i>Pme</i> I	14	<i>Pme</i> I	9	<i>Pme</i> I	17	<i>Pac</i> I	11	<i>Pme</i> I	11	<i>Pme</i> I	12
<i>Pac</i> I	25	<i>Pac</i> I	12	<i>Pac</i> I	24	<i>Pme</i> I	13	<i>Pac</i> I	24	<i>Pac</i> I	14
<i>Swa</i> I	36	<i>Swa</i> I	26	<i>Swa</i> I	34	<i>Swa</i> I	27	<i>Swa</i> I	33	<i>Swa</i> I	20
<i>Spe</i> I	52	<i>Spe</i> I	39	<i>Fse</i> I	53	<i>Spe</i> I	48	<i>Spe</i> I	58	<i>SnaB</i> I	75
<i>Xba</i> I	91	<i>Xba</i> I	72	<i>Spe</i> I	68	<i>Xba</i> I	104	<i>Xba</i> I	96	<i>Xba</i> I	76
<i>Avr</i> II	109	<i>BsiW</i> I	78	<i>Avr</i> II	94	<i>SnaB</i> I	115	<i>Avr</i> II	111	<i>Spe</i> I	76
<i>BstZ17</i> I	118	<i>SnaB</i> I	87	<i>Xba</i> I	107	<i>BstZ17</i> I	132	<i>SnaB</i> I	127	<i>Avr</i> II	77
<i>SnaB</i> I	121	<i>Avr</i> II	92	<i>SanD</i> I	108	<i>BsiW</i> I	140	<i>BstZ17</i> I	135	<i>BstZ17</i> I	88
<i>Mlu</i> I	149	<i>BstZ17</i> I	106	<i>BstZ17</i> I	124	<i>Avr</i> II	148	<i>AsiS</i> I	157	<i>Nhe</i> I	141
<i>SanD</i> I	153	<i>Afl</i> II	110	<i>SnaB</i> I	128	<i>Mlu</i> I	157	<i>Fse</i> I	171	<i>Bmt</i> I	141

从各酶酶切 6 种气单胞菌产生的总有效片段占总酶切片段数的比例看, *Pme* I (86.8%, 66/76) > *Pac* I (81.8%, 90/110) > *Swa* I (80.1%, 141/176) > *Spe* I (68.0%, 232/341) > *Xba* I (62.6%, 342/546), 见表 2。除豚鼠气单胞菌外, *Spe* I 和 *Xba* I 酶切其余 5 种气单胞菌产生的无效小片段 (<20.5 kb) 在各基因组中占 25.0% ~ 45.8%, 即有约 1/4 到 1/2 的片段不能用于反映菌株间的遗传关系, 故不考虑 *Spe* I 作为 PFGE 分型酶, 因此 *Pme* I、*Pac* I、*Swa* I 相对更适合于气单胞菌的分型。

### 2.2 限制性片段电泳分离效果的模拟

据 H9812 的酶切片段长度对数与相对位置, 得回归方程  $Y = -22.19X^2 + 37.64X + 89.07$ ,  $R^2 = 0.997$ 。将酶切片段长度对数代入回归方程得条带的相对迁移距离推测值 ( $Y_1$ ), 推测值与实测值 ( $Y_0$ ) 大致相当, 该回归方程可用于推测气单胞菌各酶切片段在同样电泳条件下的迁移位置, 见表 3。

将 *Xba* I、*Pac* I、*Pme* I、*Swa* I 酶切 6 种气单胞菌产生的片段的长度取对数分别代入回归方程, 根据其相对位置绘制 PFGE 模拟图。模拟图显示 (图 1), 在条带分布上 *Xba* I 的片段集中于凝胶的下部, *Pac* I、*Pme* I 的限制性片段均匀分布于整个泳道。从片段的重叠情况看,  $Pme$  I <  $Pac$  I <  $Swa$  I <  $Xba$  I, *Swa* I 的片段在部分位置发生重叠。根据模拟效果, *Pac* I 和 *Pme* I 更适合于气单胞菌的 PFGE

其在各基因组中的酶切频次从 72 至 107 不等。从频次上看 *Pac* I、*Pme* I、*Swa* I 均低于 *Xba* I, 产生的片段数量为 9 ~ 36 条, *Spe* I 则  $\leq Xba$  I, 此 4 种酶可作为气单胞菌 PFGE 分型的备选酶, 见表 1。其他酶对至少一种气单胞菌的酶切频次要高于 *Xba* I, 如 *Fse* I、*SnaB* I, 或者对至少一种气单胞菌酶切频次超过 100 次, 如 *Mlu* I、*SanD* I 等, 考虑到 PFGE 凝胶的有限的分离距离仅约 10 cm, 故不采用其为 PFGE 分型的备选酶。

分型, 且 *Pme* I 要优于 *Pac* I, 两者可分别作为气单胞菌 PFGE 分型的首选酶和次选酶。

### 2.3 分离株的 PFGE 验证与应用

2015 年从 8 份粪便标本中检出 16 株气单胞菌, 取其中 3 株作为 PFGE 方法的验证菌株。 *Xba* I 酶切后, 3 株菌的大部分条带均位于凝胶中部以下, 有效片段长度范围约为 20 ~ 250 kb, 且在 33.3 ~ 104.5 kb 之间有大量片段因共迁移发生重叠, 难以分辨条带确切位置, 见图 2-A。针对重叠位置的条带, 调整电泳条件, 设置脉冲转换时间为 0.5 ~ 20 s, 以减少大片段泳动距离, 增加小片段的分离效果后, 片段基本能充满凝胶大部分, 小片段分离效果有所改善, 但在 33.3 ~ 104.5 kb 之间仍有大量条带集聚, 片段共迁移现象并未明显改善, 见图 2-B。分离株的电泳验证提示, *Xba* I 并不适合作为气单胞菌 PFGE 分型的限制性内切酶, 其产生的片段长度范围比较狭窄, 经调整脉冲场电泳参数, 能使该狭窄范围内的片段最大限度的分布到整个凝胶上, 但因其数量过多, 不可避免的大量条带发生重叠。

验证菌株以 *Pac* I 和 *Pme* I 酶切后电泳结果显示, 在电泳脉冲转换时间为 2.16 ~ 63.8 s、电泳时间为 18.5 h 的条件下, 3 株气单胞菌酶切后片段长度范围约在 20 ~ 1 135 kb, 条带数量适中, 平均约为 11 ~ 13 条, 且在凝胶中分布均匀, 条带位置明确, 部分菌株有片段共迁移现象, 但并不普遍, 见图 3。

表2 5种限制性内切酶酶切6种气单胞菌基因组的限制性片段分布

Table 2 Distribution of restriction fragments from 6 *Aeromonas* species digested by 5 enzymes

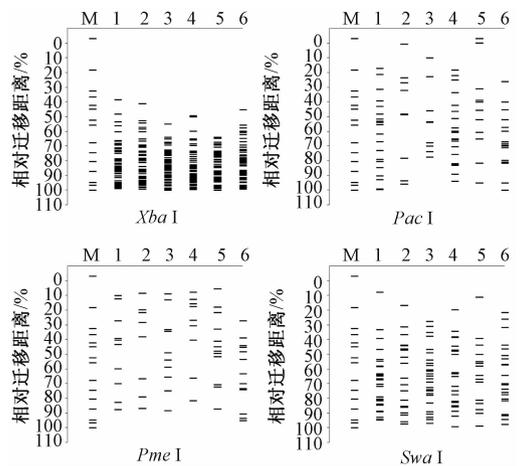
限制性内切酶	气单胞菌	>1 135 kb		<20.5 kb		有效片段数	
		片段数	占比/%	片段数	占比/%	片段数	占比/%
Pac I	亲水气单胞菌	0	0.0(0/25)	4	16.0(4/25)	21	84.0(21/25)
	豚鼠气单胞菌	1	8.3(1/12)	2	16.7(2/12)	9	75.0(9/12)
	中间气单胞菌	1	9.1(1/11)	0	0.0(0/11)	10	90.9(10/11)
	杀鲑气单胞菌	0	0.0(0/24)	4	16.7(4/24)	20	83.3(20/24)
	舒伯特气单胞菌	0	0.0(0/14)	3	21.4(3/14)	11	78.6(11/14)
	维隆气单胞菌	1	4.2(1/24)	4	16.7(4/24)	19	79.2(19/24)
Pme I	亲水气单胞菌	0	0.0(0/14)	2	14.3(2/14)	12	85.7(12/14)
	豚鼠气单胞菌	1	11.1(1/9)	0	0.0(0/9)	8	88.9(8/9)
	中间气单胞菌	1	7.7(1/13)	2	15.4(2/13)	10	76.9(10/13)
	杀鲑气单胞菌	0	0.0(0/11)	1	9.1(1/11)	10	90.9(10/11)
	舒伯特气单胞菌	0	0.0(0/12)	0	0.0(0/12)	12	100.0(12/12)
	维隆气单胞菌	1	5.9(1/17)	2	11.8(2/17)	14	82.4(14/17)
Spe I	亲水气单胞菌	0	0.0(0/52)	18	34.6(18/52)	34	65.4(34/52)
	豚鼠气单胞菌	0	0.0(0/39)	7	17.9(7/39)	32	82.1(32/39)
	中间气单胞菌	0	0.0(0/48)	12	25.0(12/48)	36	75.0(36/48)
	杀鲑气单胞菌	0	0.0(0/58)	18	31.0(18/58)	40	69.0(40/58)
	舒伯特气单胞菌	0	0.0(0/76)	29	38.2(29/76)	47	61.8(47/76)
	维隆气单胞菌	0	0.0(0/68)	25	36.8(25/68)	43	63.2(43/68)
Swa I	亲水气单胞菌	0	0.0(0/36)	8	22.2(8/36)	28	77.8(28/36)
	豚鼠气单胞菌	0	0.0(0/26)	4	15.4(4/26)	22	84.6(22/26)
	中间气单胞菌	0	0.0(0/27)	0	0.0(0/27)	27	100.0(27/27)
	杀鲑气单胞菌	0	0.0(0/33)	9	27.3(9/33)	24	72.7(24/33)
	舒伯特气单胞菌	1	5.0(1/20)	4	20.0(4/20)	15	75.0(15/20)
	维隆气单胞菌	0	0.0(0/34)	9	26.5(9/34)	25	73.5(25/34)
Xba I	亲水气单胞菌	0	0.0(0/91)	39	42.9(39/91)	52	57.1(52/91)
	豚鼠气单胞菌	0	0.0(0/72)	21	29.2(21/72)	51	70.8(51/72)
	中间气单胞菌	0	0.0(0/104)	39	37.5(39/104)	65	62.5(65/104)
	杀鲑气单胞菌	0	0.0(0/96)	30	31.3(30/96)	66	68.8(66/96)
	舒伯特气单胞菌	0	0.0(0/76)	26	34.2(26/76)	50	65.8(50/76)
	维隆气单胞菌	0	0.0(0/107)	49	45.8(49/107)	58	54.2(58/107)

表3 内参照沙门菌 H9812 的 Xba I 限制性片段长度及其相对迁移距离实测值与推测值

Table 3 Restriction fragments length of H9812 digested by Xba I and their measured and predicted relative migration distance

片段长度/kb	X	Y <sub>0</sub> /%	Y <sub>1</sub> /%
1 135.0	3.1	0.0	-3.0
668.9	2.8	15.5	18.3
452.7	2.7	30.7	32.5
398.4	2.6	35.1	36.9
336.5	2.5	42.1	42.5
310.1	2.5	45.3	45.1
244.4	2.4	53.5	52.4
216.9	2.3	57.3	55.9
138.9	2.1	69.3	67.8
104.5	2.0	75.4	74.6
78.2	1.9	80.9	80.8
54.7	1.7	87.4	87.5
33.3	1.5	92.9	94.9
28.8	1.5	97.9	96.7
20.5	1.3	100.0	100.3

注: X 为片段长度以 10 为底的对数值; Y<sub>0</sub> 为片段的相对位置实测值; Y<sub>1</sub> 为根据回归方程推算的片段相对位置推测值

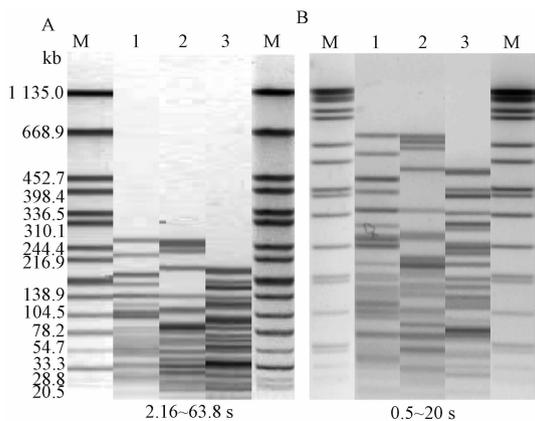


注: M: 沙门菌 H9812 基因组的 Xba I 限制性片段, 作为条带迁移距离参照; 1~6: 气单胞菌基因组酶切片段, 依次为亲水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、中间气单胞菌、杀鲑气单胞菌、舒伯特气单胞菌、维隆气单胞菌

图1 6种气单胞菌以4种酶酶切的PFGE模拟

Figure 1 PFGE simulation of 6 *Aeromonas* species digested by 4 enzymes

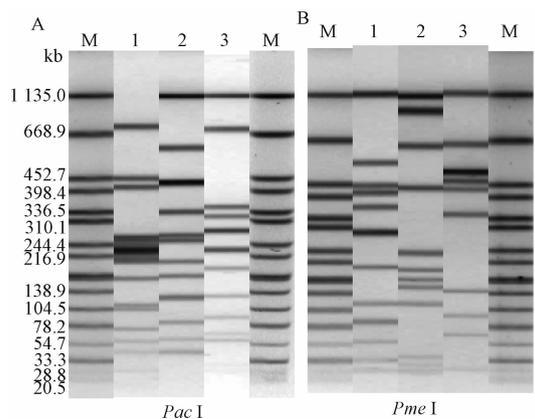
从验证试验结果看, Pac I 和 Pme I 均可用于气单胞菌的 PFGE 分型。



注:M:沙门菌 H9812 基因组的 *Xba* I 酶切片段;  
1~3:气单胞菌分离株,依次为 PX15037-1、PX15094、PX15206

图2 3株气单胞菌分离株经 *Xba* I 酶切后的片段在不同电泳条件下的分离效果

Figure 2 PFGE results of 3 *Aeromonas* isolates digested by *Xba* I with different electrophoretic parameters



注:M:沙门菌 H9812 基因组的 *Xba* I 酶切片段;1~3:气单胞菌分离株,依次为 PX15037-1、PX15094、PX15206

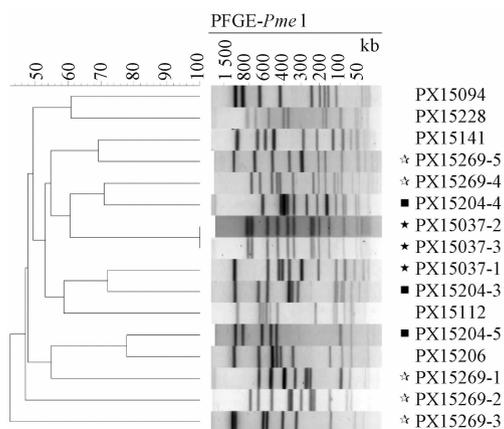
图3 3株气单胞菌分离株经 *Pac* I 与 *Pme* I 酶切后产生的片段的电泳分离结果

Figure 3 PFGE results of 3 *Aeromonas* isolates digested by *Pac* I and *Pme* I

*Pme* I 对分离株进行 PFGE 分型的结果显示,16 株气单胞菌共分为 15 个 PFGE 型,来自不同标本的分离株其 PFGE 型别不同。除 1 份标本(PX15037)中有 2 株分离株 PFGE 型别不可区分外,其他来自相同标本的菌株 PFGE 型别均不相同,见图 4。以 PFGE 分型结果计算辛普森多样性指数为 99.17%,气单胞菌以 *Pme* I 进行 PFGE 分型可获得良好的分辨率。

### 3 讨论

通过对不同种的气单胞菌的全基因组序列进行各种酶的酶切频次分析,确定备选酶,然后通过片段长度-电泳迁移距离的数学拟合,模拟备选酶的电泳效果以观察酶切片段分布,并通过菌株验证最终确定



注:相同的符号表示菌株来自相同的标本

图4 *Pme* I 酶切气单胞菌腹泻分离株的 PFGE 聚类分析

Figure 4 Dendrogram of PFGE results of *Aeromonas* isolates from diarrhea patients digested by *Pme* I

PFGE 分型的内切酶。PFGE 模拟效果与分离株验证结果显示,在脉冲转换时间为 2.16~63.8 s、电泳时间为 18.5 h 时,*Pac* I 和 *Pme* I 酶切气单胞菌基因组产生的片段数量适中,在凝胶中分布均匀,且少有重叠,因此以 *Pac* I 和 *Pme* I 代替 *Xba* I 可优化气单胞菌 PFGE 分型方法。

有研究<sup>[7-8]</sup>在 *Xba* I 酶切的基础上对气单胞菌 PFGE 的电泳条件进行调整,图谱在单张或少量图谱间尚可比对,但不利于大规模暴发或长期监测获得的大量图谱的比对分析。此次研究的验证结果也显示,*Xba* I 产生的片段在凝胶中的分布并不能通过调整电泳条件得以有效改善,故对于气单胞菌的 PFGE 分型,*Xba* I 并非最佳选择。

对于不同的细菌,PFGE 分型方法的区别主要在于限制性内切酶的选择和电泳条件的设定。此次研究提供的优化方法避免了在内切酶选择及电泳参数确定时的大量尝试性试验操作,减少了时间及试剂的消耗。该方法可以同样用于其他细菌 PFGE 方法的建立或优化。

除了分辨率高、结果再现性好外,PFGE 作为一种成功应用于多种细菌性疾病监测的分子分型技术,还具有实验室网络成熟的优点,目前仍被广泛使用<sup>[9]</sup>。优化后的方法对 16 株分离株的分型结果显示出良好的分辨率,但任何细菌的 PFGE 分型方法的确立都不应仅仅局限于实验室,而应与流行病学调查相结合。此研究中分离株的分型结果显示出发酵病例标本中气单胞菌构成的复杂性,提示在怀疑暴发由气单胞菌引起时,应挑选多个可疑菌落对其分型,以确定何种型别引起暴发,而不能简单的以单个菌落的分型结果来下结论。

## 参考文献

- [1] 李振涛, 郑浩. 一起嗜水气单胞菌食物中毒的流行病学调查[J]. 江苏预防医学, 2015, 26(6): 90-91.
- [2] KHAJANCHI B K, FADL A A, BORCHARDT M A, et al. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(7): 2313-2325.
- [3] BESSER J. Pulsed-field gel electrophoresis for disease monitoring and control [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1301: 3-7.
- [4] BORCHARDT M A, TEMPER M E, STANDRIDGE J H. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis [J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(2): 224-228.
- [5] TENOVER F C, ARBEIT R D, GOERING R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [6] PERSSON S, AL-SHUWELI S, YAPICI S, et al. Identification of clinical *Aeromonas* species by *rpoB* and *gyrB* sequencing and development of a multiplex PCR method for detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media* [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(2): 653-656.
- [7] VILLARI P, CRISPINO M, MONTUORI P, et al. Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1): 697-701.
- [8] EROVA T E, SHA J, HORNEMAN A J, et al. Identification of a new hemolysin from diarrheal isolate SSU of *Aeromonas hydrophila* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 275(2): 301-311.
- [9] PARIZAD E G, PARIZAD E G, VALIZADEH A. The application of pulsed field gel electrophoresis in clinical studies [J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(1): DE01-DE04.

## · 资讯 ·

## 解读《关于富马酸化的2,6-二甲基苯酚均聚物等12种食品相关产品新品种的公告(2017年第9号)》

## 一、富马酸化的2,6-二甲基苯酚均聚物

(一)背景资料。富马酸化的2,6-二甲基苯酚均聚物在室温下为深褐色固体,不溶于水,在预期使用条件下性质稳定。欧盟委员会批准其所有单体用于塑料类食品接触材料及制品。日本卫生烯烃与苯乙烯塑料协会确认其可用作聚苯乙烯(PS)树脂的添加剂。

(二)工艺必要性。该物质作为PS树脂添加剂,可改进树脂的抗冲击强度等力学性能。

二、过硫酸铵引发的2-甲基-2-丙烯酸与2-丙烯酸丁酯、1,1'-(1,1-二甲基-3-亚甲基-1,3-亚丙基)二苯、苯乙烯、 $\alpha$ -甲基苯乙烯、2-甲基-2-丙烯酸甲酯和2-丙烯酸钠的聚合物。

(一)背景资料。该物质为不溶于水的白色乳液,可在水中分散,在预期使用条件下性质稳定。美国食品药品监督管理局和加拿大卫生部批准该物质用于食品接触用纸和纸板材料及制品。

(二)工艺必要性。申报物质作为食品接触用纸和纸板的松香施胶剂的分散剂,可使松香施胶剂形成稳定的分散液,有利于施胶剂留驻在纸和纸板中。

三、3,3'-{(2-氯-1,4-亚苯基)二[亚氨基(1-乙酰基-2-氧-2,1-乙烷二基)偶氮基]}二[4-甲基]苯甲酰胺

(一)背景资料。该物质是一种重氮苯并咪唑类颜料,为黄色固体粉末。美国食品药品监督管理局和欧洲理事会允许该物质用作食品接触用塑料材料及制品用着色剂,日本卫生烯烃与苯乙烯塑料协会确认其可用作食品器具、包装容器用添加剂。

(二)工艺必要性。此颜料着色力强,与其他黄色颜料相比,具有更好的色调、饱和度和热稳定性。

四、9-十八烯酸(9Z)-1,1'-[2,2-双(十八烷基氧甲基)]1,3-丙二醇酯

(一)背景资料。该物质常温下为液态,沸点110℃,不溶于水。美国食品药品监督管理局和欧盟委员会允许该物质用于食品接触材料及制品。

(二)工艺必要性。该物质用于涂料起润滑剂的作用,可提高涂层板之间的润滑性和耐擦伤性,从而提高罐头等材料生产的速度。

五、乙烯基三甲氧基硅烷