

恒定电泳 1~2 小时,然后置紫外分析仪上观察或照像。

质粒分子量测定参照文献[3]的方法,在 λ DNA 和本实验中提取的质粒 DNA 的样品中分别加入限制性内切酶 *hind* III,作用后进行电泳。用 DNA 酶切片段划一条校正曲线,在校正曲线下求出所检测质粒 DNA 的分子量。

动物实验 将分离的细菌接种于肉浸液肉汤中,37℃培养 24 小时,该菌液的含量为 10^9 /mL,取 0.3mL 菌液注射小白鼠腹腔,每株菌接种 3~5 只小白鼠,观察小白鼠的死亡及病理变化情况。

2 结果

2.1 质粒指纹图谱分析 6 株大肠杆菌质粒指纹图谱分析的结果表明,所有这些大肠杆菌具有相同的质粒图谱,即含有分子量约为 6.4×10^6 dal. 的质粒。

2.2 系统生化反应 见表 1。6 株不同来源的大肠杆菌生化反应出现了大致相同的结果。

2.3 食物中毒的临床检查 病人出现高热,39℃左右,颜面潮红,有上呼吸道感染症状。早期无腹泻、呕吐。发病一周左右病人出现心电图改变。

2.4 动物实验 小鼠腹腔注射后 2 小时,出现烦躁不安,1~2 天死亡,解剖发现小鼠心脏内有大量血液沉积,说明小鼠生前心脏严重充血。

3 讨论

此次食源性疾患发生在 1993 年 4 月某托幼机构,当时陆陆续续有 70 多名儿童因病住在市儿童医院等医疗单位,所有这些病例均发生在该托幼机构的中班和小班。患儿的主要症状是高热、腹痛、腹胀,腹泻不明显;大部分患儿心电图有改变,而且在住院后 3~4 天后出现腹泻。因发病初期腹泻不明显,便标本是通过肛门拭子采集的。不同医院的同类患儿早期便培养可以分离到乳糖阴性的大肠杆菌,排除了其它肠道菌存在的可能性。虽然本次调查没有采集到合适的剩余食物标本以及从中分离到相同的细菌,但是,鉴于此次食源性疾患的病原菌用以往的常规生化鉴定方法不能确定以及考虑到菌株的来源,病人的临

床和流行病学特点以及菌株的动物实验结果,使用质粒指纹图谱分析方法对病原菌进行分子流行病学分析,初步可以在病原学上确定造成这次食源性疾患的原因。

质粒指纹图谱分析原理是根据大多数分布广泛的细菌往往含有数量和大小不等的质粒,在一定的时间和空间内某种质粒特征保持相对稳定,而且质粒 DNA 在琼脂糖凝胶电泳时,其相对迁移率与分子量对数呈负相关。一种细菌含有几种质粒,电泳后会出现对应的几条质粒 DNA 条带,即 PP 图谱。由于不同细菌具有不同的质粒特征,因此,可以根据不同的 PP 图谱对不同种细菌和不同菌株进行鉴定。也可以使用 PP 图谱对引起暴发流行的某一菌株与其非流行株进行区别。[4~6]

应用 PP 图谱确定是病原菌株具有很好的特异性。考虑到从 6 个病人的粪便标本中以及工作人员的工作环境中分离到同一种,含有分子量为 6.4×10^6 dal. 质粒 DNA 的大肠杆菌;加之病人的临床表现与动物实验吻合,因此,可以认为此次食源性疾患与该株大肠杆菌有关。本研究结果表明,在没有其它方法能确定病原菌时,采用质粒指纹图谱分析方法具有现实意义,而且该方法简便、快速,易于在基层防疫站和医院推广。

4 参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部. 食品卫生微生物学检验 病原性大肠艾希氏菌检验 GB 4789.6—84. 1984—12—25
- 2 金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1992: 19
- 3 蔡良婉主编. 核酸研究技术(上册). 北京:科学出版社, 1987: 122
- 4 刘秉阳主编. 医学细菌学(上册). 过去 现在 未来. 北京:中国科学技术出版社, 1989: 143
- 5 徐伟,等. 质粒指纹图谱分析在呼吸道绿脓杆菌感染中的应用. 中华医学检验杂志, 1991, 14(2): 105
- 6 李少娟,等. 用 DNA 限制性内切酶图谱和 PCR/RFLP 鉴定斑点热群立克次氏体中国分离株. 中华微生物学和免疫学杂志, 1993, 13(4): 255

一起食源性疾患中大肠杆菌质粒指纹图谱分析的应用

杜 蕾 石建成 尹 明 北京市卫生防疫站 (100013)

近几年,无论是在国内还是在海外,由致病性大肠杆菌引起的食物中毒屡屡发生。尤其是 1994 年美国某家餐馆由于食用了污染 O₁₅₇:H₇ 大肠杆菌的快餐食品死亡两人,更是引起世人的关注。致病性大肠杆菌已由原来的 3 个型发展成目前的 5 个型。新的致病性大肠杆菌还不断被发现。由于国内现有致病性大肠杆菌、侵袭性大肠杆菌定型血清不能确切进行菌型鉴定,产毒性大肠杆菌 ELISA 试剂盒也不能进行定型。我们对在一起食源性疾患中发现的 6 株菌,用 PCR 方法分析,确定是侵袭性的、乳糖发酵阴性的大肠杆菌,采用了质粒指纹图谱(PP 图谱)分析方法,分析不同来源的大肠杆菌分子水平的同源性,确定了该大肠杆菌与这次食源性疾患的病因学关系。

1 材料与方 法

菌株 6 株经生化反应鉴定的大肠杆菌,5 株来自病人的肛拭子的粪便标本,1 株采自炊事员办公桌涂抹标本。

主要试剂 SDS,EDTA,琼脂糖均由华美公司提

供。

主要仪器

微量低温高速离心机 法国产 MR1812 型;

电泳仪 国产 DYY-Ⅲ 系列水平电泳仪。

生化反应 待测株的系统生化反应方法见[1]。

质粒提取过程 参考[2]的改良方法。细菌接种于加相应抗生素的 LB 肉汤中,37℃ 震荡培养过夜,离心弃上清,加缓冲液(40mmol/L Tris. AC-2mmol/L EDTANa₂ pH8.0)0.2mL 悬浮细菌,加裂解液(4% SDS 100mmol/L Tris,使用前与 0.3mol/L NaOH(新配制)等体积混合)0.40mL,混合均匀,放置室温 5 分钟,加 0.3mL 冷溶液(3mol NaAc pH5.5)轻轻翻转混匀,冰浴 5 分钟,1000 r/min 离心 5 分钟,再冰浴 15 分钟,1000 r/min 离心 5 分钟,取上清液(换一套小管)加入等体积的异丙醇,4℃ 放置 15 分钟,1000 r/min 离心 5 分钟。弃上清液后加入含 20μg/mL RNA 酶的 TE 40μL 作用 20 分钟后,电泳,制作 PP 图谱。上述溶解质粒 DNA 的 TE 溶液也可以用于酶切分析。

表 1 大肠杆菌生化鉴定结果

菌株	G 染色	氧化酶	靛基质	V-P	赖氨酸	尿素	枸橼酸盐	阿拉伯糖	硫化氢	葡萄糖	乳糖	甘露醇	山梨醇	纤维二糖
1	-	-	+	-	+	-	-	+	-	(+) ⁽¹⁾	-	+	+	-
2	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
3	-	-	+	-	+	-	-	+	-	(+)	-	+	+	-
4	-	-	+	-	+	-	-	+	-	(+)	-	+	+	-
5	-	-	+	-	+	-	-	+	-	(+)	-	+	+	-
6	-	-	+	-	+	-	-	+	-	(+)	-	+	+	-

菌株 1~5 采自病人的肛拭子标本;6 为炊事员办公桌的涂抹标本。

(1)+ 为产酸;()为产气。

琼脂糖凝胶电泳及质粒分子量的计算 电泳液为 TBE(Tris 54g; 硼酸 27.5g; EDTA 4.5g 溶于

1000mL 水中,使用前稀释 5 倍),使用水平电泳槽,用含有 0.5mg/mL EB 的 1.0% 琼脂糖凝胶,电压 70V