

林邦和等^[4]曾用动物实验的方式对红花煎剂的毒性进行研究,用含生药 0.24、0.48 和 0.96 g/kg 的红花煎剂给妊娠大鼠灌胃,观察其对大鼠妊娠和胚胎发育的影响,结果表明红花煎剂对母体及其胚胎均有明显的毒性,可导致母体流产、体重降低、肾体指数升高,胚胎死亡率和宫内生长迟缓(IUGR)发生率上升,认为红花有终止早期妊娠和对胚胎有致死、致 IUGR 等毒性,并与剂量密切相关。曹毅君等^[5]曾报道了一例红花注射液引起急性肾衰综合征的病例,认为是药物过敏所致。红花作为一种长期大量服用的保健食品的原料使用应采取谨慎态度。本研究建立的简便、快速的肝肾毒性筛选实验方法可以在保健食品原料安全性筛选中应用。

参考文献

[1] SEGLE P O. Preparation of isolated rat liver cells[J]. Meth Cell Biol, 1976 (13): 29-83.
 [2] 卢永科,李秋娟,宫德正. 利用原代培养细胞进行药物短期毒性筛选方法的建立[J]. 卫生毒理学杂志, 2003, 17(2): 112-114.
 [3] PONSODA X, JOVER R, NuÑEZ C, et al. Evaluation of the cytotoxicity of 10 chemicals in human and rat hepatocytes and in cell lines: correlation between *in vitro* data and human lethal concentration[J]. Toxic *in Vitro*, 1995, 9(6): 959-966.
 [4] 林邦和,严冬,周立人. 红花对大鼠妊娠和胚胎发育的毒性和影响[J]. 安徽中医学院学报, 1998, 17(4): 50-52.
 [5] 曹毅君,刘桂枝,钟美声. 一例红花注射液致急性肾衰综合征的治疗及护理[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2002, 23(10): 1189.

实验技术与方法

椰毒假单胞菌酵米面亚种脉冲场凝胶电泳分型的研究

郭云昌 王 岗 杜春明 付 萍 裴晓燕

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:目的 建立椰毒假单胞菌酵米面亚种的脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)分型方法,并对 29 株分离株进行 PFGE 分型研究。方法 分别选择 5 种限制性内切酶(*Xba* I、*Spe* I、*Not* I、*Sma* I、*Asc* I)酶切椰毒假单胞菌酵米面亚种染色体 DNA 以进行 PFGE 分析,并利用 BioNumerics 软件对分离株的指纹图谱进行聚类分析。结果 *Not* I、*Sma* I 和 *Asc* I 的酶切片段过小,而 *Xba* I 酶切片段的大小适中但数量过多,不能获得清晰可辨的图谱,均不适于椰毒假单胞菌酵米面亚种的 PFGE 分型。*Spe* I 酶切的 PFGE 条带数量和大小适中、指纹图谱清晰可辨,对椰毒假单胞菌酵米面亚种具有足够的分辨率。结论 本研究建立的 PFGE 分型方法可应用于椰毒假单胞菌酵米面亚种的分子分型和溯源。

关键词:椰毒假单胞菌酵米面亚种;脉冲场凝胶电泳;分子分型

中图分类号:R155.5 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)03-0236-04

Molecular Typing of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* with Pulsed-Field Gel Electrophoresis

GUO Yun-chang, WANG Gang, DU Chun-ming, FU Ping, PEI Xiao-yan

(National Institute of Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To establish a method for molecular typing *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and to analyze the type of 29 isolates with PFGE method. **Method** The isolates were digested with 5 kinds of restriction endonucleases *Xba* I, *Spe* I, *Not* I, *Sma* I and *Asc* I, and the PFGE

收稿日期:2010-03-08

基金项目:国家自然科学基金青年基金(30901200)

作者简介:郭云昌 男 副研究员 研究方向为食品卫生 E-mail:yunchangguo2006@yahoo.com.cn

通信作者:裴晓燕 女 助理研究员

patterns were analyzed by BioNumerics software. **Results** The bands on PFGE for the fragments digested by restriction endonucleases *Not I*, *Sma I* or *Asc I* were too small, and that digested by *Xba I* were too many to identify clearly. The restriction endonucleases *Not I*, *Sma I*, *Asc I* and *Xba I* were not suitable for typing the pathogen on PFGE. The number of bands on PFGE for the fragments digested by *Spe I* was moderate and the pattern of molecular weight was clear and well discriminated. **Conclusion** This method can be used for molecular typing and tracing *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*.

Key words: *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*; Pulsed-Field Gel Electrophoresis; Molecular Typing

椰毒假单胞菌酵米面亚种 (*Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*) 是中国学者于 1977 年发现的一种新的细菌性食源性致病菌^[1]。流行病学分析发现,该菌所致食物中毒与居民的特殊饮食习惯密切相关,由该菌引起的食物中毒在发达国家未见报道,在印尼中毒食品主要为发酵椰子食物,而在我国主要是谷类发酵食品,如发酵玉米面、糯玉米汤圆粉、玉米淀粉、发酵糯米粉等,其次为变质银耳及薯类淀粉制品等。在我国该菌引起的食物中毒平均死亡率达 41.80%,个别中毒事件中死亡率高达 100%^[2]。虽然脉冲场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 分型方法已经广泛应用于常见食源性致病菌感染的散发、暴发调查和溯源研究,但到目前为止,还未见该技术在椰毒假单胞菌酵米面亚种的分析中应用。本研究在其他常见食源性致病菌 PFGE 分型研究的基础上,分别采用 5 种限制性内切酶 (*Xba I*、*Spe I*、*Not I*、*Sma I*、*Asc I*) 进行酶切消化,对我国椰毒假单胞菌酵米面亚种分离株进行分型研究。

1 材料和方法

1.1 菌株

本实验室保存的 29 株食品或食物中毒分离株,主要分离自银耳、蘑菇、酵米面、中毒患者等。PFGE 相对分子量标准沙门菌 Braenderup 血清型菌株 H9812。

1.2 仪器

bioMérieux Vitek 浊度计 (bioMérieux, 法国); 恒温振荡器 (金坛市杰瑞尔电器有限公司); 高速冷冻离心机 (Hitachi, 日本); GEL DOC XR 凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国); 纯水仪 (MILLIPORE, 美国); CHEF-mapper 型脉冲场凝胶电泳仪 (Bio-Rad, 美国)。

1.3 试剂和耗材

脑心浸液琼脂 (brain heart infusion agar, BHA) 和脑心浸液肉汤 (brain heart infusion broth, BHI), 均购自英国 Oxoid 公司; 血琼脂平板 (北京陆桥技术有限公司); Tris base (Promega, 美国); 限制性内切酶 *Xba I*、*Spe I* (New England Biolabs, 美国); 蛋白酶

K (Merck, 德国); Tris-HCl (Promega, 美国); 比浊管 (bioMérieux, 法国); 50ml 的 screw-cap 试管 (Corning, 美国); SeaKem Gold 琼脂糖 (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., 美国); C₁₅H₂₈NNaO₃ (Sodium lauroyl Sarcosine, SLS)、SDS、Na₂EDTA · 2H₂O 均购自美国 Sigma 公司。

1.4 方法

1.4.1 胶块的制备 从 BHA 平板上挑取纯菌落接种于 BHI 中, 37 °C 振荡培养约 18 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 取 3ml 细胞悬浮缓冲液 (cell suspension buffer, CSB; 100 mmol/L Tris-HCl; 100 mmol/L EDTA, pH 8.0) 悬浮菌团, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 取适量 CSB 悬浮菌团, 制备菌悬液 (透光度 14%)。也可直接从划线接种的血平板上挑取菌落制备菌悬液。

取 200 μl 菌悬液, 加入 10 μl 的蛋白酶 K 和 200 μl 溶化的 56 °C 的 1% SeaKem Gold 琼脂糖 (或 1% Seakem Gold:1% SDS), 制备 plug。然后使用蛋白酶 K/细胞裂解液 (50 mmol/L Tris; 50 mmol/L EDTA, pH 8.0 + 1% SLS + 0.1 mg/ml 蛋白酶 K) 裂解 plug 中包被的细菌, 分别使用超纯水洗涤 2 次、TE 缓冲液洗涤 4 次。

1.4.2 酶切 切取 2 mm 宽洗涤后的胶块, 分别使用限制性内切酶 *Xba I*、*Spe I*、*Not I*、*Sma I*、*Asc I* (*Xba I* 为 40U, 其他 4 种酶均为 30U) 酶切 4h 左右。将酶切后的胶片加在梳子齿上, 倒入溶化的 1% SeaKem Gold 琼脂糖, 制胶。

1.4.3 电泳 使用 CHEF-mapper XA 型脉冲场凝胶电泳仪和 0.5 × TBE 进行电泳。设置初始电泳参数均为: low MW-30 kb, high MW-700 kb, 电泳时间 20 h。调整后, *Xba I* 酶切的电泳参数为: low MW-20 kb, high MW-300 kb, 电泳时间 20 h。

1.4.4 成像 待电泳结束, 取出胶, 使用 1 μg/ml 的 EB 溶液染色 30 min, 然后用超纯水脱色 25 min。用 GEL DOC XR 凝胶成像系统拍摄图像。

1.4.5 结果分析 获得的脉冲场凝胶电泳图谱用 BioNumerics 数据库软件 (Applied Maths BVBA, Belgium) 进行处理, 识别图形条带。

2 结果

从 *Not* I、*Sma* I 和 *Asc* I 的酶切后的指纹图谱可见,主要酶切条带集中在50 kb以下。*Xba* I 主要酶切条带集中在 20 ~ 300 kb,但酶切条带数多于 25 条,条带过于密集。所有菌株的基因组 DNA 被限制性内切酶 *Spe* I 消化后均显示出良好的分型能力,条带数主要集中在 20 条左右。酶切条带分子量范

围为 10 ~ 1 200 kb,其中主要酶切条带集中在 30 ~ 700 kb。29 株椰毒假单胞菌酵米面亚种的 PFGE 条带模式如图 1 所示,共有 27 种 PFGE 带型,分离株 90-2 和 90-3、23 和 30 的酶切图谱完全一致。其他各株分离株的酶切图谱各不相同。以 BioNumerics 分析 Dice 相关系数及树状图见图 1。

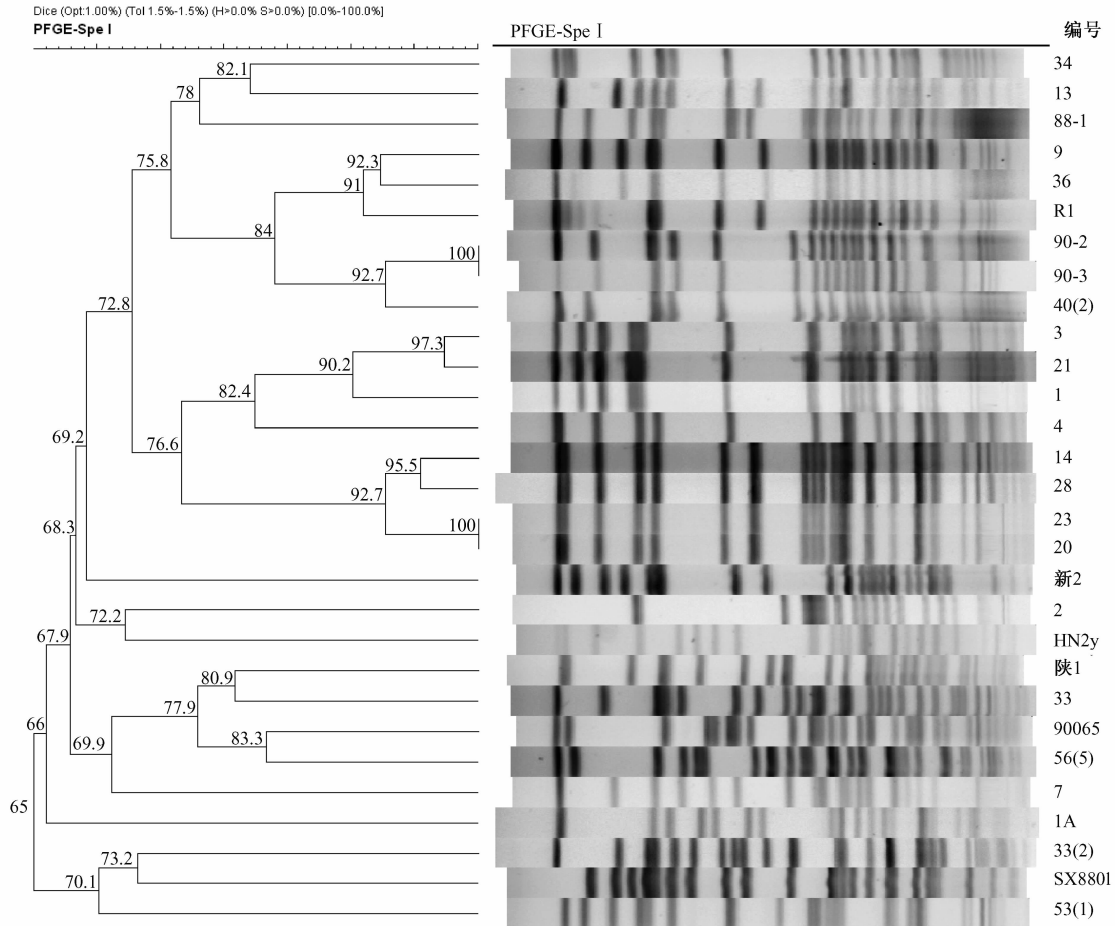


图 1 29 株椰毒假单胞菌酵米面亚种 PFGE 分型树状图(*Spe* I 酶切)

3 讨论

3.1 胶块的制备

与沙门菌、副溶血性弧菌等常见食源性致病菌相比,椰毒假单胞菌酵米面亚种的生长较慢,同时采用 BHI 振荡培养和划线接种血平板两种方法,获得新鲜培养的纯菌,用于制备菌悬液。取 200 μl 菌悬液加入 10 μl 的蛋白酶 K 后,再加入 200 μl 的 1% SeaKem Gold 琼脂糖或 1% Seakem Gold:1% SDS 制备胶块。使用上述不同方法制备的胶块进行酶切电泳,从获得的酶切图谱可见,各种胶块制备方法对结果没有显著差异。

3.2 限制性内切酶的选择

PFGE 中选择的限制性内切酶与细菌基因组 G + C 的含量有关。焦振泉等^[3]测定了从不同食物中分离到的 5 株血清型不同的椰毒假单胞菌酵米面亚

种,其 G + C 含量范围为 65% ~ 70%。同时,根据与该菌亲缘关系较近的伯克霍尔德菌属^[4-7]的 PFGE 研究结果,及常见食源性致病菌的 PFGE 限制性内切酶的选择,本研究选择 *Xba* I、*Spe* I、*Not* I、*Sma* I 和 *Asc* I 等 5 种限制性内切酶用于椰毒假单胞菌酵米面亚种的 PFGE 分型。

从椰毒假单胞菌酵米面亚种的 PFGE 酶切图谱可见,*Not* I、*Sma* I 和 *Asc* I 的酶切片段过小,不适用于 PFGE 分型,这应该与椰毒假单胞菌酵米面亚种染色体中上述限制性内切酶的酶切位点过多有关。*Xba* I 酶切条带大小适中,但酶切片段过多,通过调整脉冲场凝胶电泳的电泳参数,仍然不能获得清晰可辨的指纹图谱,因此 *Xba* I 酶切也不适于该菌的 PFGE 分型。

Spe I 酶切的 PFGE 条带数量和大小适中、指纹

图谱清晰可辨。除 90-2 和 90-3、23 和 30 外,其他 26 株分离株的酶切图谱各不相同。可见, *Spe I* 酶切对椰毒假单胞菌酵米面亚种具有足够的分辨率,可以用于该菌的 PFGE 分型。

3.3 中国椰毒假单胞菌酵米面亚种分离株的分子分型

本研究中,采用 BioNumerics 数据库软件,结合分离株的来源信息,对 29 株椰毒假单胞菌酵米面亚种分离株的带型进行分析。指纹图谱完全一致的分离株 90-2 和 90-3,均来自同一食物中毒事件的中毒食品。来自黑龙江省的分离株中,14、28、23 和 30 指纹图谱相似度较高,其中 23 和 30 的酶切图谱完全一致。另外,指纹图谱相似度较高的 3 和 21 均来自黑龙江省(具体来源不详)。但是,同时从辽宁建平县分离到的 2 株椰毒假单胞菌酵米面亚种(分离株 1 和 2)PFGE 指纹图谱的相似度只有 68.75%。

PFGE 用稀有位点的限制性内切酶进行酶切,可以获得菌种某亚种特有的电泳图谱。从整个基因组的角度考虑菌株间的关系,在暴发调查以及疾病控制方面能够发挥较大的作用,已经成为分子流行病学调查研究中最有效的手段之一。本实验室建立的椰毒假单胞菌酵米面亚种 PFGE 分型方法及对国内分离株的分型研究为食品和环境中的该菌污染的分

子溯源提供了技术储备。

参考文献

- [1] 孟昭赫. 食品卫生检验方法注解(微生物学部分)[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:222-223.
- [2] 陈炳卿. 营养与食品卫生学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:320-323.
- [3] 焦振泉,刘秀梅,杨瑞馥,等. 椰毒假单胞菌酵米面亚种鸟嘌呤和胞嘧啶含量的测定及 2 种测定方法的比较[J]. 卫生研究,2000,29(4):243-245.
- [4] JIAO Z, KAWAMURA Y, MISHIMA N, et al. Need to differentiate lethal toxin-producing strains of *Burkholderia gladioli*, which cause severe food poisoning: description of *B. gladioli pathovar cocovenans* and an emended description of *B. gladioli* [J]. *Microbiol Immunol*, 2003, 47(12): 915-925.
- [5] DREVINEK P, VOSAHLIKOVA S, CINEK O, et al. Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic[J]. *Med Microbiol*, 2005, 54(Pt 7): 655-659.
- [6] CHANTRATITA N, VESARATCHAVEST M, WUTHIEKANUN V, et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a discriminatory typing technique for the bioterror agent *Burkholderia mallei* [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2006, 74(3): 345-347.
- [7] SEGONDS C, CLAVEL-BATUT P, THOUVEREZ M, et al. Microbiological and epidemiological features of clinical respiratory isolates of *Burkholderia gladioli* [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(5): 1510-1516.

实验技术与方法

中国部分水产品副溶血性弧菌毒力基因的分布特征

李薇薇 王晓英 郭云昌

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:目的 了解中国部分水产品中副溶血性弧菌毒力基因的分布情况。方法 通过聚合酶链反应测定从中国部分水产品中分离的 192 株副溶血性弧菌是否携带毒力基因 *tdh*、*trh*,及种特异性基因 *tlh*、*toxR*。结果 192 株实验菌株 *tdh* 全阴性,4 株 *trh* 阳性,毒力基因携带率 2.08%;而 *tlh*、*toxR* 的携带率均为 100%。结论 中国副溶血性弧菌水产品分离株毒力基因携带率非常低。

关键词:副溶血性弧菌;基因;聚合酶链反应;溶血素类

中图分类号:R155.5⁺5 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)03-0239-05

收稿日期:2010-03-01

作者简介:李薇薇 女 硕士研究生 研究方向食品卫生学 E-mail: liww_1984@hotmail.com

通信作者:郭云昌 男 副研究员 E-mail: yunchangguo2006@yahoo.com.cn