

(5): 783-792.
 [10] RUEFF J, LAIRES A, BORBA H. Genetic toxicology of flavonoids: the role of metabolic conditions in the induction of reverse mutation SOS functions and sister-chromatid exchanges [J]. *Mutagenesis*, 1986, 1(3): 179-183.

[11] POPP R, SCHIMMER O. Induction of sister-chromatid exchanges (SCE), polyploidy and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures. A comparative study of 19 flavonoids [J]. *Mut Res*, 1991, 246(1): 205-213.

论著

广西香港海鸥菌分离菌株脉冲场凝胶电泳分子分型研究

孙贵娟, 黄彦, 唐振柱, 卢桂宁, 苏伟东, 甘永新
 (广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西 南宁 530028)

摘要:目的 探讨香港海鸥菌分子分型方法,了解广西水产品监测所分离的香港海鸥菌的相关性。方法 以 Not I 限制性内切酶对 2005 年分离的香港海鸥菌酶切后进行脉冲电泳,用 BioNumerics 5.1 聚类分析获得电泳图谱。结果 7 株香港海鸥菌分为 6 个分子型,其中从南宁分离的与从河池分离的 2 株香港海鸥菌高度同源,相似度达 100%。结论 PFGE 可应用于香港海鸥菌分子分型,有助于发现香港海鸥菌流行规律和传播途径,水鸟可能是香港海鸥菌传播环节的一种重要媒介。

关键词: 香港海鸥菌; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型; 食源性病原菌; 媒介

中图分类号: R446.5; R155.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)06-0494-03

Molecular typing of *Laribacter hongkongensis* isolated in Guangxi province by pulsed-field gel electrophoresis

Sun Guijuan, Huang Yan, Tang Zhenzhu, Lu Guining, Su weidong, Gan Yongxin
 (Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Prevention and Control, Guangxi Nanning 530028, China)

Abstract: Objective To study the molecular typing of *Laribacter hongkongensis* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and to find out the relationship of 7 strains of *L. hongkongensis* isolated from fishery products in Guangxi on 2005. **Methods** Total DNA of each isolate was digested with restriction enzyme Not I, and the DNA fingerprints were obtained by running PFGE. These fingerprints of different stains were compared and their relationship was investigated by BioNumerics 5.1 clustering. **Results** Seven strains of *L. hongkongensis* were attributed to six PFGE pattern combinations. One isolate from Nanning and another one from Hechi were homologous with 100% similarity. **Conclusion** PFGE is an effective way for molecular typing *L. hongkongensis* and is helpful in discovering the epidemiology and transmission of this bacteria. Waterfowl might be an important medium in the spreading of *L. hongkongensis*.

Key words: *Laribacter hongkongensis*; pulsed-field gel electrophoresis (PFGE); molecular typing; food-borne pathogenic; medium

香港海鸥菌 (*Laribacter hongkongensis*) 是一种新发现的食源性病原菌,属奈瑟氏科,为需氧及兼性厌氧菌, HKU1 株是它的模式株。香港海鸥菌最早的报道见于 2001 年,由香港大学从一名来自中国

大陆的患有肝硬化的病人血液和胸腔脓汁中分离出^[1]。香港海鸥菌可引起社区性胃肠炎 (community-acquired gastroenteritis) 和旅行者腹泻 (traveler's diarrhea)。目前该菌在中国香港、中国大陆、日本、瑞士、非洲及中美洲相继被发现。我国于 2005 年在河北、福建、浙江、广西、广东等 5 个沿海省份开展了水产品香港海鸥菌污染调查研究^[2-4]。为探讨分离自广西水产品的 7 株香港海鸥菌间的亲缘关系,应用脉冲场凝胶电泳 (pulsed-field

收稿日期: 2011-04-19
 作者简介: 孙贵娟 女 副主任技师 研究方向为微生物检测及分子生物学 E-mail: sungj0707@vip.sina.com
 通信作者: 黄彦 男 主管技师

gel electrophoresis ,PFGE) 对分离的菌株进行分型, 研究其流行分布规律, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

7 株香港海鸥菌分离于 2005 年广西水产品香港海鸥菌监测采样, 沙门菌标准株 H9812 为深圳市 CDC 馈赠。

1.2 试剂及耗材

API 20 NE 鉴定卡(生物梅里埃生产), 限制性内切酶 Not I (Takara 公司生产), SeaKem Gold (CAMBREX 公司生产), 蛋白酶 K (MERCK 公司生产), 细胞悬浮液(CSB)、细胞裂解液、酶切反应体系、10 × TBE 等试剂自配。酶切反应体系按每块胶 200 μl 准备, 每 200 μl 酶切反应体系含纯水 175 μl, Buffer H 20 μl, Not I 30U, 酶切缓冲液不含酶, 其余成分相同。

1.3 主要仪器

CHEF MAPPER I 脉冲场电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)、BVO-PRLNT 凝胶成像系统(Vilerber 公司)、BioMerieux Vitek colorimeter(生物梅里埃)。

1.4 方法

1.4.1 制胶

取 5 ~ 5.5 麦氏单位 CSB 菌悬液 400 μl 于 1.5 ml 离心管中, 置 37 °C 水浴 5 min, 加入蛋白酶 K 混匀。加入 400 μl 溶化的 1% Seakem Glod: 1% SDS, 混匀后加入模具, 放室温 10 ~ 15 min 凝固。

1.4.2 细胞裂解

将制好的胶块加入含 5 ml 蛋白酶 K/CLB 混合液(蛋白酶 K 终浓度为 0.1 mg/ml) 50 ml 的聚丙烯螺口盖管中, 54 °C 水浴摇床中孵育 3 h。用纯水洗涤 2 次, TE 重复洗 3 次, 加入 5 ~ 10 ml TE 放在 4 °C 保存备用。

1.4.3 酶切及电泳

切取 2.0 ~ 2.5 mm 宽的胶块, 加入 200 μl 含 Not I 的酶切反应体系, 孵育 2 h。将胶块放入 1% Seakem Gold 胶块孔中, 电泳。电泳液 2.2 L 0.5 × TBE, 电泳温度 14 °C, 电泳参数低分子量设为 30 kb, 高分子量设为 700 kb, 电泳时间 20 h, 脉冲时间 2.16 ~ 63.8 s, 电压 6 V, 转换角度 120 °C。

1.4.4 染胶和图像的获取

电泳结束后取出胶块, 放在 1 μg/ml EB 溶液托盘内, 染胶 30 min。用纯水脱色。用 BVO-PRLNT 凝胶成像系统拍摄图像。

1.4.5 分型方法

将香港海鸥菌脉冲场电泳图谱用 BioNumerics

5.1 软件导入, 根据条带的差异, 用 UPGMA 算法进行聚类分析。

2 结果

2.1 菌株鉴定结果

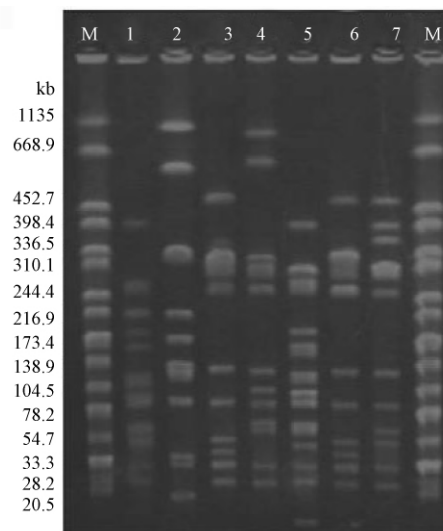
7 株菌株在头孢哌酮血平皿上为无色半透明灰白色菌落, 光滑、圆整、湿润, 大小约 1 ~ 2 mm, 不溶血, 涂片染色镜检为革兰氏阴性无芽胞杆菌, 形状呈海鸥状或 S 状。7 株分离株经 API 20 NE 生化鉴定结果均为香港海鸥菌, 其来源与分布见表 1。

表 1 7 株香港海鸥菌来源与分布
Table 1 Source and distribution of 7 kinds of *L. hongkongensis* strains

菌株编号	鱼类品种	分离地点
gx2005027	草鱼	南宁水街市场
gx2005081	草鱼	河池沿江市场
gx2005086	鲤鱼	河池沿江市场
gx2005094	草鱼	河池江滨市场
gx2005132	草鱼	桂林西门市场
gx2005212	鳊鱼	南宁淡村市场
gx2005214	草鱼	南宁淡村市场

2.2 7 株香港海鸥菌脉冲场电泳结果

7 株香港海鸥菌经 Not I 原位酶切, 经 20 h 电泳后, 在 20 ~ 1 100 kb 范围产生了 11 ~ 14 条带的图谱。各菌株间 DNA 图谱其条带位置和数量完全一致定为同一型别, 有 1 条及 1 条以上条带不一致, 即判为不同型别, 据此 7 株香港海鸥菌可分为 6 个分子型。结果见图 1。



M 为 H9812 标准株, 1 ~ 7 分别为 gx2005027、gx2005081、gx2005086、gx2005094、gx2005132、gx2005212、gx2005214

图 1 7 株香港海鸥菌 PFGE 电泳图谱
Figure 1 PFGE patterns of 7 kinds of *L. hongkongensis* strains

2.3 聚类分析结果

将 7 株香港海鸥菌脉冲场凝胶电泳图谱用

BioNumerics 5.1 软件导入,根据条带的差异,用UPGMA 算法进行聚类分析,得到同源图谱树状图,见图 2。gx2005086 与 gx2005212 菌株相似度高达 100%,其他菌株相似度均低于 70%,最低仅 30%,提示其余 5 株菌在 PFGE 分型存在较大的遗传差异。

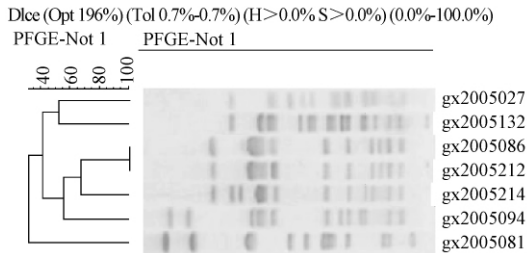


图 2 7 株香港海鸥菌聚类分析结果
Figure 2 The clustering analysis of 7 kinds of *L. hongkongensis* strains

3 讨论

同源生物体是同种的不同个体,具有相同的毒力因子、生化特征和基因特性。通常大暴发或大流行所分离到的病原体大都具有相同的遗传结构或相近基因构成。因此,在疾病监测与预警中,病原的分子分型对于食物中毒暴发、水污染暴发、医院内感染暴发等公共卫生事件传染源或污染源的识别与追踪,事件的预防与控制非常重要。PFGE 技术因其具有能够对整个染色体进行分析,稳定性和重复性好,区分能力强,易于标准化,可通过网络建立共享数据库便于实验室比较等优点,已成为细菌及真菌分子学研究的重要手段。本研究应用 PFGE 技术对新发现的食源性病原香港海鸥菌进行分子分型,可将 7 株香港海鸥菌分为 6 个 PFGE 型别。在 20~1100 kb 范围产生了 11~14 条带的图谱,各条带清晰可辨,表明 PFGE 应用于香港海鸥菌分子分型技术上可行,同时也表明,除了 2 株香港海鸥菌遗传相似度高度同源外,其余的菌株间遗传差异比较大。

本研究发现 2 株分离于相距数百公里不同地点的香港海鸥菌相似性达 100%,而从样品采集调查资料分析 2 份水产品样品从养殖、运输与出售过程均没有交集。有研究表明,水鸟极有可能是香港海鸥菌的重要传播媒介,丁华等^[5]从 50 份小白鹭粪样中检出香港海鸥菌 4 份,阳性率达 8.0%。小白鹭主要捕食小鱼、小虾以及蛙类等水生动物为生,广西的气候条件极适宜白鹭生活,在南宁近郊均有白鹭聚居地,因此,在不同地点分离的 2 株香港海鸥菌相似度高达 100%,遗传物质高度相似,证明 2 株菌亲缘关系极近,应考虑为水鸟迁徙过程粪便污染水体导致另一地点水生物的香港海鸥菌的感染。

香港海鸥菌作为一种新发现的食源性病原菌,其在淡水鱼中的污染及病人中的感染已得到证实,但是对其毒力基因、传播途径、传播媒介尚不清楚,因此应加大对其研究力度,建立起常态监测,及时发现污染动态及流行趋势,同时应加强对民众的健康教育,特别是加强对有吃淡水鱼生的地区的民众健康宣传,倡导健康生活方式,以减少由香港海鸥菌所致的食源性疾病的发生。

参考文献

[1] YUEN K Y, WOO P C, TENG J L, et al. *Laribacter hongkongensis* gen. nov., sp. nov., a novel gram-negative bacterium isolated from a cirrhotic patient with bacteremia and empyema [J]. *J Clin Microbiol* 2001, 39(12): 4227-4232.

[2] 徐进, 张静, 刘秀梅, 等. 2005 年中国 5 个沿海省份鱼类产品中香港海鸥菌的污染调查 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2006, 18(6): 517-520.

[3] 孙贵娟, 林红, 卢桂宁, 等. 广西首次自水产品中检出香港海鸥菌 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(1): 97.

[4] 梅玲珍, 高雯洁, 朱敏, 等. 浙江省 369 份淡水、海水鱼香港海鸥菌型菌污染状况研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2007, 19(4): 300-302.

[5] 丁华, 倪晓平, 孙建荣, 等. 香港海鸥形菌的外环境标本中的检出与分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(3): 697-698.