

论著

椰毒假单胞菌酵米面亚种荧光标记扩增片段长度多态性分型方法的建立

王岗¹,郭云昌¹,杜春明¹,付萍¹,李薇薇¹,赵悦²,刘秀梅¹,杨大进¹,裴晓燕¹

(1. 国家食品安全风险评估中心,北京 100021; 2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:目的 建立椰毒假单胞菌酵米面亚种荧光标记扩增片段长度多态性(FAFLP)分型方法,并对4株模式菌株和19株分离菌株进行分型。方法 选用4种低频限制性内切酶(*Apa* I、*Eco* R I、*Hind* III和*Pst* I)和2种高频限制性内切酶(*Mse* I和*Taq* I)进行组合,对FAFLP预扩增和选择性扩增体系进行优化,用BioNumerics软件对分离株的指纹图谱进行聚类分析,并与VITEK 2 GN生化结果和16S rDNA序列分析进行比较。结果 *Apa* I -G/*Taq* I -G组合将19株椰毒假单胞菌酵米面亚种分为7个群,菌株间最低相似度为80.85%,最高相似度为98.77%。*Pst* I -T/*Taq* I -G组合将19株椰毒假单胞菌酵米面亚种分为10个群,菌株间最低相似度为48.68%,最高相似度为99.67%。两种FAFLP组合均能将菌株进行完全区分,而VITEK 2 GN和16S rDNA序列分析无法将菌株进行完全区分。结论 *Apa* I -G/*Taq* I -G组合与*Pst* I -T/*Taq* I -G组合FAFLP对椰毒假单胞菌酵米面亚种具有足够的分辨率,本研究建立的FAFLP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; 荧光标记扩增片段长度多态性(FAFLP); 分子分型; 食源性致病菌; 食品安全
中图分类号:R155; TS207.4; Q503 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)02-0125-07

Establishment of the typing method by fluorescent amplification fragment length polymorphism for *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*

Wang Gang, Guo Yunchang, Du Chunming, Fu Ping, Li Weiwei, Zhao Yue,
Liu Xiumei, Yang Dajin, Pei Xiaoyan

(China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To establish a genotyping method for *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* with fluorescent amplification fragment length polymorphism (FAFLP). **Methods** Four low-frequency-cleavage restriction endonucleases (*Apa* I, *Eco* R I, *Hind* III, *Pst* I) and two high-frequency-cleavage restriction endonucleases (*Mse* I, *Taq* I) were tested to optimize the combination for FAFLP. Pre-selective and selective PCR reactions were then optimized. The selective PCR products was separated on LI-COR 4300 DNA Analyzer and digital images were analyzed by BioNumerics software. In addition, the FAFLP method was compared with other two typing methods (VITEK 2 and 16s rDNA). **Results** 19 isolates were clustered into 7 groups with 80.85% as the minimum similarity and 98.77% the maximum among groups using the combination of *Apa* I -G/*Taq* I -G. The isolates were clustered into 10 groups with 48.68% as the minimum similarity and 99.67% the maximum among groups using the combination of *Pst* I -T/*Taq* I -G. The two combinations of FAFLP could discriminate all the strains in the study, but not the other two methods (VITEK 2 and 16s rDNA). **Conclusion** The two combinations of FAFLP both had a good discrimination and could be applied for tracing *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* in the investigation of foodborne diseases.

Key words: *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*; fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP); molecular typing; foodborne pathogens; food safety

椰毒假单胞菌酵米面亚种 (*Pseudomonas*

cocovenenans subsp. *farinofermentans*)是我国学者于1977年发现并命名的一种食源性致病菌,并在2003年被划为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia gladioli*)的一个病原型^[1]。由该菌引起的食物中毒与居民的特殊饮食习惯有关,在我国引起食物中毒的食品主要为发酵玉米面、变质银耳、发酵糯玉米汤圆、醋凉粉等,食物中毒平均死亡率达39.9%,个别中毒事件中死亡率高达100%^[2],是高发区域一

收稿日期:2013-01-17

基金项目:国家自然科学基金青年基金(30901200)

作者简介:王岗 男 硕士 研究方向为食品微生物

E-mail:gavinwang24@qq.com

通信作者:裴晓燕 女 博士 研究方向为食品微生物

E-mail:pxydc@sohu.com

直重点关注的食物中毒致病菌。

荧光标记扩增片段长度多态性 (fluorescent amplified fragment length polymorphism, FAFLP) 分析是一种用荧光素标记引物扩增已知酶切位点和接头 DNA 片段的指纹图谱技术, 具有快速、简便、价廉、分辨率高、重复性好和污染少的特点。该方法已被成功地应用于植物学、动物学、法医学、微生物学等领域, 是目前微生物流行病学调查、鉴定、分型和遗传分析中较为理想的分子生物学方法。本研究在其他微生物扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 分析基础上, 对椰毒假单胞菌酵米面亚种分离株的反应体系进行优化, 建立该菌的 FAFLP 分型方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

Burkholderia gladioli 的三种病原型: *Burkholderia gladioli* pv *gladioli* ATCC 10248、*Burkholderia gladioli* pv *agaricola* NCPPB 3580、*Burkholderia gladioli* pv *alliicola* NCPPB 947 以及 *Burkholderia cepacia* ATCC 25416。

由本实验室保存的 19 株椰毒假单胞菌酵米面

亚种, 主要分离自酵米面、银耳、醋凉粉、蘑菇等。经 VITEK 2 GN 鉴定, 结果均为 *Burkholderia gladioli*, 除 BG 01 和 BG 27 鉴定结果可能性低于 91% 外 (分别为 91% 和 89%), 其他均高于 94%; 经 API 20NE 鉴定, 结果均为“洋葱伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia cepacia* (可能为 *Burkholderia gladioli*)”, 除 BG 34、BG 51 鉴定结果可能性低于 85% 外 (分别为 58.5% 和 83.5%), 其他均高于 99.5%。

1.1.2 主要仪器与试剂

Nanodrop ND1000 超微量核酸蛋白测定仪 (美国 Thermo Fisher); LI-COR 4300 DNA 分析仪 (美国 LI-COR 公司); PCR 仪、凝胶成像系统和电泳仪 (均为美国 BIO-RAD 公司)。

Taq 聚合酶、dNTPs、T4 DNA 连接酶以及限制性内切酶 *Apa* I、*Eco*R I、*Hind* III、*Pst* I、*Mse* I、*Taq* I (均为美国 NEB 公司); 细菌基因组提取试剂盒 (天根, 中国); KB Plus 6.5% Combo Pack、IRD_{ye}-700、Stop Solution (均为美国 LI-COR 公司)。

连接接头及普通引物由上海生工生物技术有限公司合成, IRDye-700 标记的荧光引物由柏业贸易 (上海) 有限公司合成, 接头和引物序列见表 1^[3-4]。

表 1 接头及引物

Table 1 Adapters and primers sequence

	引物序列	接头序列
<i>Apa</i> I -0	5' -GACTGCGTACAGGCC-3'	5' -TCGTAGACTGCGTACAGGCC-3'
<i>Apa</i> I -A/C/G/T	5' -GACTGCGTACAGGCCA/C/G/T-3'	5' -TGACGCAGTCTAC-3'
<i>Taq</i> I -0	5' -GATGAGTCTGACCGA-3'	5' -GACGATGAGTCTGAC-3'
<i>Taq</i> I -A/C/G/T	5' -GATGAGTCTGACCGAA/C/G/T-3'	5' -CGGTCAGGACTCAT-3'
<i>Pst</i> I -0	5' -GACGGCCGTCATGCAG-3'	5' -GACGTGACGGCCGTCATGCA-3'
<i>Pst</i> I -A/C/G/T	5' -GACGGCCGTCATGCAGA/C/G/T-3'	5' -TGACGGCCGTCACG-3'

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

使用试剂盒提取菌株基因组 DNA (具体操作见使用说明书), 并调浓度至 50 ng/μl 作为酶切模板。

1.2.2 基因组 DNA 酶切与连接

使用 4 种低频限制性内切酶 (*Apa* I、*Eco*R I、*Hind* III 和 *Pst* I) 与 2 种高频限制性内切酶 (*Mse* I 和 *Taq* I) 进行组合, 根据酶切结果选择合适组合。

根据所选择的酶切组合配制相应接头反应液, 进行连接反应, 20 μl 反应体系组成: 酶切产物 15 μl, 低频酶接头 (4 mmol/L) 1 μl, 高频酶接头 (40 mmol/L) 1 μl, 10 × 反应缓冲液 2 μl, T4 DNA 连接酶试验, 4 种用量分别为 0.1、0.2、0.3、0.5 μl, 超纯水。此连接产物作为预扩增反应的模板。

1.2.3 连接产物的预扩增

预扩增反应条件均为: 94 °C 2 min, 1 个循环;

94 °C 30 s, 56 °C 60 s, 72 °C 1 min, 20 个循环; 72 °C 5 min, 结束。

起始 20 μl 预扩增反应体系中低频引物浓度 0.2 mmol/L, 高频引物 1.0 mmol/L, Mg²⁺ 2.0 mmol/L, dNTPs 0.5 mmol/L, *Taq* 聚合酶 0.062 5 U/μl, 在此基础上依次对体系中引物、Mg²⁺、dNTPs、*Taq* 聚合酶浓度进行优化, 根据琼脂糖电泳结果优化预扩增反应体系。

1.2.4 选择性扩增

扩增反应条件为: 72 °C 2 min; 94 °C 2 min, 65 °C 30 s, 72 °C 2 min, 1 个循环; 94 °C 60 s, 65 °C 30 s, 72 °C 2 min, 13 个循环, 退火温度每个循环下降 0.7 °C; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 2 min, 23 个循环; 72 °C 5 min, 结束。

起始 20 μl 选择性扩增反应体系中低频引物浓度 0.2 mmol/L, 高频引物 1.0 mmol/L, Mg²⁺ 2.0

mmol/L, dNTPs 0.5 mmol/L, *Taq* 聚合酶 0.062 5 U/ μ l, 用不同选择性碱基进行扩增选择最优组合, 再依次对预扩增产物、引物、 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* 聚合酶浓度进行优化。优化后的组合使用 IRDye 700 标记的荧光引物进行选择性的扩增。

1.2.5 电泳及图像分析

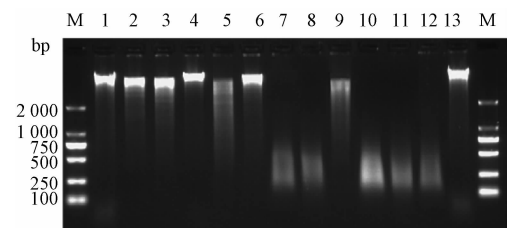
选择性扩增产物经 DNA 分析仪 1 500 V 预电泳 20 min 后, 点样电泳 3 h。电泳图谱用 Saga 软件自动收集与校正。

对获得的 FAFLP 图谱用 BioNumerics 数据库软件进行处理, 识别条带, 并进行人工校正。聚类分析用非加权配对算数平均数法 (unweighted pair group method with arithmetic means), 并与 VITEK 2 GN 生化特征及 16S rDNA 序列的分型结果进行比较。

2 结果

2.1 限制性内切酶酶切及连接结果

Hind III 和 *Mse* I 几乎没消化基因组, 酶切组合中除 *Eco* R I / *Mse* I 外其他三种酶切组合酶切 DNA 片段大小适中, 但 *Eco* R I / *Taq* I 酶切片段相对集中, 结合单酶切结果, 最终选择 *Apa* I / *Taq* I 与 *Pst* I / *Taq* I 两种组合 (见图 1)。4 种浓度 T4 DNA 连接酶过夜连接均具有较好连接效果, 为保证连接充分选择 0.2 μ l, 约 1.2 U。



M: 分子量标准; 1: 未酶切; 2: *Apa* I; 3: *Eco* R I; 4: *Hind* III; 5: *Pst* I; 6: *Mse* I; 7: *Taq* I; 8: *Apa* I / *Taq* I; 9: *Eco* R I / *Mse* I; 10: *Eco* R I / *Taq* I; 11: *Hind* III / *Taq* I; 12: *Pst* I / *Taq* I; 13: 未酶切

图 1 不同限制性内切酶及其组合酶切结果

Figure 1 Digestion of different restriction endonucleases and combinations

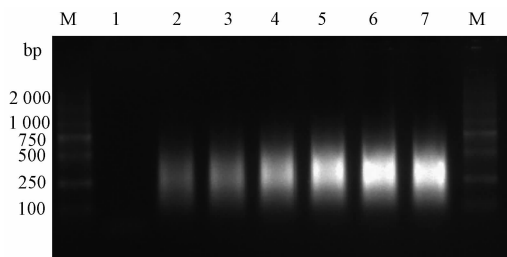
2.2 预扩增结果

本研究先对 *Apa* I / *Taq* I 酶切组合的预扩增和选择性扩增进行优化, 在此基础上进一步改进 *Pst* I / *Taq* I 组合的反应体系。

2.2.1 引物浓度对预扩增的影响

引物浓度过低, 产物合成量少; 引物浓度过高会增加引物错配机率, 使非特异性产物和引物二聚体增多。电泳结果见图 2, 随着引物量的增加产物量增加, 当 *Apa* I-0 与 *Taq* I-0 引物超过 0.2 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时产物非特异性合成增加, 低于

0.2 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时产物合成量不足, 引物用量选择 0.2 mmol/L 和 1.0 mmol/L。



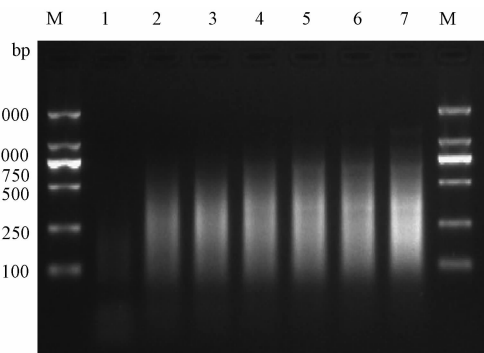
M: 分子量标准; 1: 未加引物; 2: 0.05 mmol/L 和 0.25 mmol/L (分别为 *Apa* I-0 与 *Taq* I-0 的浓度, 以下相同); 3: 0.1 mmol/L 和 0.5 mmol/L; 4: 0.15 mmol/L 和 0.75 mmol/L; 5: 0.2 mmol/L 和 1.0 mmol/L; 6: 0.25 mmol/L 和 1.25 mmol/L; 7: 0.3 mmol/L 和 1.5 mmol/L

图 2 引物浓度对预扩增的影响

Figure 2 The effect on the pre-selective PCR with different concentration of primers

2.2.2 Mg^{2+} 浓度对预扩增的影响

Mg^{2+} 浓度对扩增影响最大, 浓度低扩增片段少, 浓度过高出现非特异性扩增机率增大。电泳结果见图 3, 随着 Mg^{2+} 用量增加, 产物量也增加, 在 2.5 mmol/L 时扩增产物量高, 片段均匀处于 50~750 bp 之间; 当达到 2.5 mmol/L 时, 大量产物集中于 200~400 bp。因此, Mg^{2+} 选用 2.5 mmol/L。



M: 分子量标准; 1: 未加 Mg^{2+} ; 2: 0.5 mmol/L; 3: 1.0 mmol/L; 4: 1.5 mmol/L; 5: 2 mmol/L; 6: 2.5 mmol/L; 7: 3.0 mmol/L

图 3 不同浓度 Mg^{2+} 对预扩增的影响

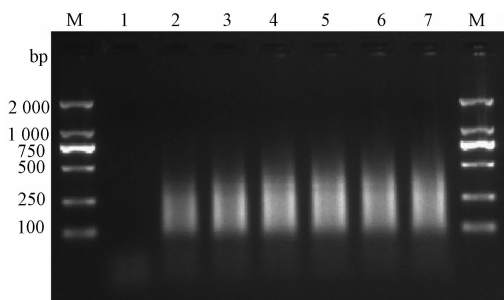
Figure 3 The effect on the pre-selective PCR with different concentrations of Mg^{2+}

2.2.3 dNTPs 浓度对预扩增的影响

dNTPs 浓度过低, 会使 PCR 扩增原料不足而使产物量减少, dNTPs 浓度过高会使结合的 Mg^{2+} 增加, 使得 Mg^{2+} 催化作用减弱, 影响反应效率。当 Mg^{2+} 用量固定为 2.5 mmol/L 时, dNTPs 为 0.35 mmol/L 时产物产量最高 (见图 4), 选用 0.35 mmol/L 进行 PCR。

2.2.4 *Taq* 聚合酶对预扩增的影响

Taq 聚合酶过少反应不充分, 过多则造成浪费,

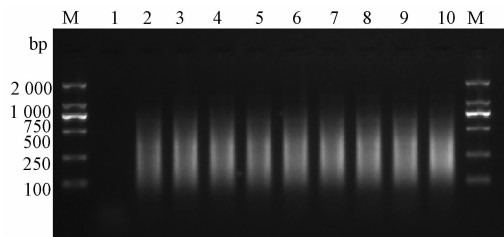


M: 分子量标准; 1: 未加 dNTPs; 2: 0.05 mmol/L; 3: 0.15 mmol/L; 4: 0.25 mmol/L; 5: 0.35 mmol/L; 6: 0.45 mmol/L; 7: 0.5 mmol/L

图4 不同浓度 dNTPs 对预扩增的影响

Figure 4 The effect on the pre-selective PCR with different concentrations of dNTPs

结果显示 31.25 U/ml 的 *Taq* 聚合酶就能使反应充分(见图5)。



M: 分子量标准; 1: 未加 *Taq* 聚合酶; 2: 6.25 U/ml; 3: 12.5 U/ml; 4: 18.75 U/ml; 5: 25 U/ml; 6: 31.25 U/ml; 7: 37.5 U/ml; 8: 43.75 U/ml; 9: 50 U/ml; 10: 62.5 U/ml

图5 *Taq* 聚合酶浓度对预扩增的影响

Figure 5 The effect on the pre-selective PCR with different concentrations of *Taq* polymerase

2.2.5 预扩增体系的优化

根据以上梯度反应结果优化预扩增反应体系为: *Apa* I -0 0.2 mmol/L 与 *Taq* I -0 1 mmol/L, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, dNTP 0.35 mmol/L, *Taq* 聚合酶 0.031 25 mmol/L, 20 μ l 反应体系中加入 10 \times PCR buffer 2.0 μ l, 连接产物 2.0 μ l, 补去离子水至 20 μ l。将此反应产物作为选择性扩增的模板储存液。

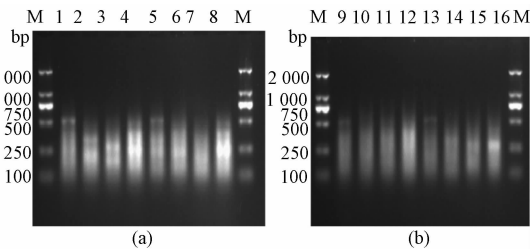
2.3 选择性扩增结果

2.3.1 引物选择性碱基的影响

Apa I /*Taq* I 酶切四种碱基不同组合选择性扩增结果中(见图6), *Apa* I -G/*Taq* I -C 和 *Apa* I -G/*Taq* I -G 电泳结果分布均匀, 范围在 50 ~ 750 bp 之间, 本研究选择 *Apa* I -G/*Taq* I -G 组合(简称 AT 组合)进行。同理, *Pst* I /*Taq* I 酶切组合选用 *Pst* I -T/*Taq* I -G 组合(简称 PT 组合)。

2.3.2 模板稀释倍数对选择性扩增的影响

FAFLP 对模板的用量要求不高, *Apa* I /*Taq* I 预扩增产物从 5 倍稀释到 100 倍选择性扩增结果变化不大。本研究选择 30 倍稀释产物作为选择性扩增的模板。



(a) M: 分子量标准; 1: *Apa* I -A/*Taq* I -A; 2: *Apa* I -A/*Taq* I -C; 3: *Apa* I -A/*Taq* I -G; 4: *Apa* I -A/*Taq* I -T; 5: *Apa* I -C/*Taq* I -A; 6: *Apa* I -C/*Taq* I -C; 7: *Apa* I -C/*Taq* I -G; 8: *Apa* I -C/*Taq* I -T; (b) M: 分子量标准; 9: *Apa* I -G/*Taq* I -A; 10: *Apa* I -G/*Taq* I -C; 11: *Apa* I -G/*Taq* I -G; 12: *Apa* I -G/*Taq* I -T; 13: *Apa* I -T/*Taq* I -A; 14: *Apa* I -T/*Taq* I -C; 15: *Apa* I -T/*Taq* I -G; 16: *Apa* I -T/*Taq* I -T

图6 不同选择性碱基对选择性扩增的影响

Figure 6 The effect on the selective PCR with different selective bases

2.3.3 选择性扩增体系各成分优化结果

根据梯度反应结果优化 AT 组合 20 μ l 选择性扩增反应体系组成为: 选择性引物用 *Apa* I-G 荧光引物 0.1 mmol/L, *Taq* I-G 引物 0.2 mmol/L, Mg^{2+} 2.25 mmol/L, dNTPs 0.25 mmol/L, *Taq* 聚合酶 0.031 25 mmol/L, 10 \times PCR buffer 2.0 μ l, 模板 2.0 μ l, 补去离子水至 20 μ l。PT 组合使用相同的反应体系。

2.4 FAFLP 电泳结果及聚类结果

AT 组合、PT 组合(见图7)的 FAFLP 指纹图谱条带集中于 50 ~ 500 bp, 具有丰富多态性, 50 ~ 200 bp 条带较密集。两种酶切组合均有较好分型能力。AT 组合按照 92% 的相似度分群标准将 19 株椰毒假单胞菌酵米面亚种分为 7 个群, 菌株间最低相似度为 80.85%, 最高相似度为 98.77%。与 *Burkholderia gladioli* 3 个病原型的模式菌株 ATCC 10248、NCPPB 3580、NCPPB 947 最高相似度分别为 87.62%、86.11% 和 94.63%, 与 ATCC 25416 最高相似度为 86.28%。PT 组合按照 92% 的相似度分群标准将 19 株椰毒假单胞菌酵米面亚种分为 10 个群, 菌株间最低相似度为 48.68%, 最高相似度为 99.67%。与 ATCC 10248、NCPPB 3580、NCPPB 947 最高相似度分别为 66.09%、68.78% 和 91.31%, 与 ATCC 25416 最高相似度为 57.37%。FAFLP 聚类分析 Dice 相关系数及树状图见图 8。

2.5 VITEK 2 GN 和 16S rDNA 序列分型

VITEK 2 GN 生化反应按照 92% 的相似度分群标准将 19 株椰毒假单胞菌酵米面亚种分为 6 个群, 但有 9 株菌无法进行完全区分, 且 BG 29、BG 53 无法与 *B. gladioli* 模式株 ATCC 10248 进行区分, BG 24 无法与模式菌株 NCPPB 3580 进行区分。椰毒假单胞菌酵米面亚种生化反应特征难以达到 FAFLP 分型的分辨水平。16S rDNA 序列按照 99.6% 的相

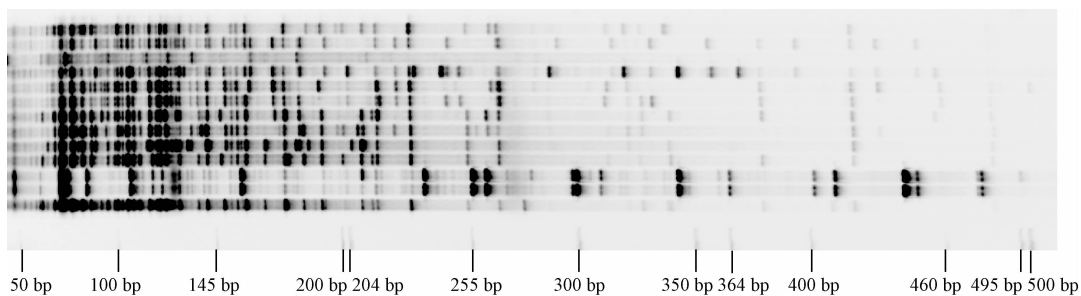
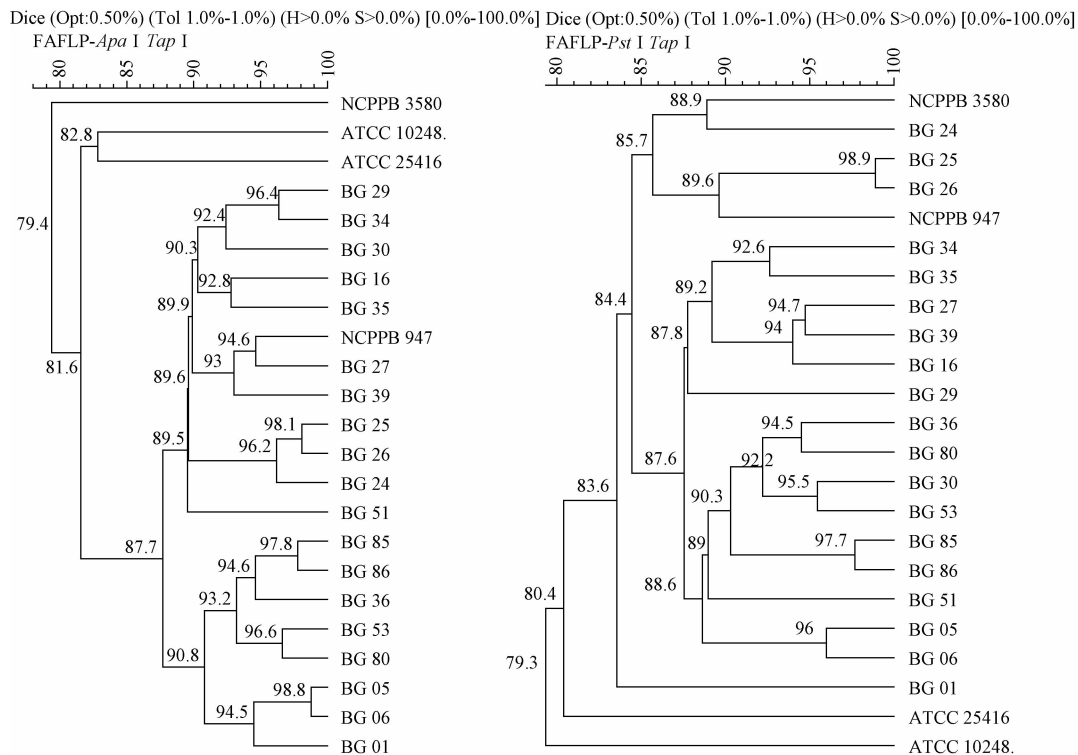
图7 FAFLP 指纹图谱 (*Pst* I -T/*Taq* I -G)Figure 7 FAFLP Fingerprint (*Pst* I -T/*Taq* I -G)

图8 4株模式菌株和19株椰毒假单胞菌酵米面亚种FAFLP聚类图(*Apa* I -G/*Taq* I -G和*Pst* I -T/*Taq* I -G)
 Figure 8 Clustering of 19 *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* isolates and 4 type strains by FAFLP
 (*Apa* I -G/*Taq* I -G and *Pst* I -T/*Taq* I -G)

似度分群标准将19株分离株分为7个群,其中BG 06与BG 53、BG 25与BG 35无法进行区分,且有7株菌的相似度超过99.9%,具有极高相似度,不适合对椰毒假单胞菌酵米面亚种进行分型和溯源。VITEK 2 GN生化反应及16S rDNA序列聚类分析Dice相关系数及树状图见图9。

3 讨论

3.1 限制性内切酶的选择

限制性内切酶的选择对FAFLP分析的准确性起关键作用,其选择主要依据分析对象的类别和所要达到的分辨率。一般选择使用双酶切(高频内切酶和低频内切酶),并根据细菌G+C含量选择合适的限制性内切酶组合:一般G+C含量较高的基因组,选择识别位点富含G+C的限制性内切酶组合,

反之选择富含A+T的酶组合。根据与椰毒假单胞菌酵米面亚种亲缘关系较近的伯克霍尔德菌属的AFLP研究结果^[5],及其G+C含量(65%~70%),本研究选用4种常用低频内切酶(*Apa* I、*Eco*R I、*Hind* III和*Pst* I)和2种高频内切酶(*Mse* I和*Taq* I)。其中,高频内切酶中,富含G+C酶切位点的*Taq* I可将基因组切成200~750 bp的小片段,富含A+T酶切位点的*Mse* I则将基因组切成较大片段。低频酶中富含G+C酶切位点的*Apa* I、*Pst* I均将基因组切成较大片段,富含A+T酶切位点的*Hind* III则几乎未将基因组切开,但富含A+T酶切位点的*Eco*R I亦能将基因组切成较大片段,这可能与基因组中含有一定数量的AATT和TTAA序列有关,这种特定序列常被用作控制基因表达以及DNA治疗的靶位点^[6]。因此,也可考虑使用相对便宜的

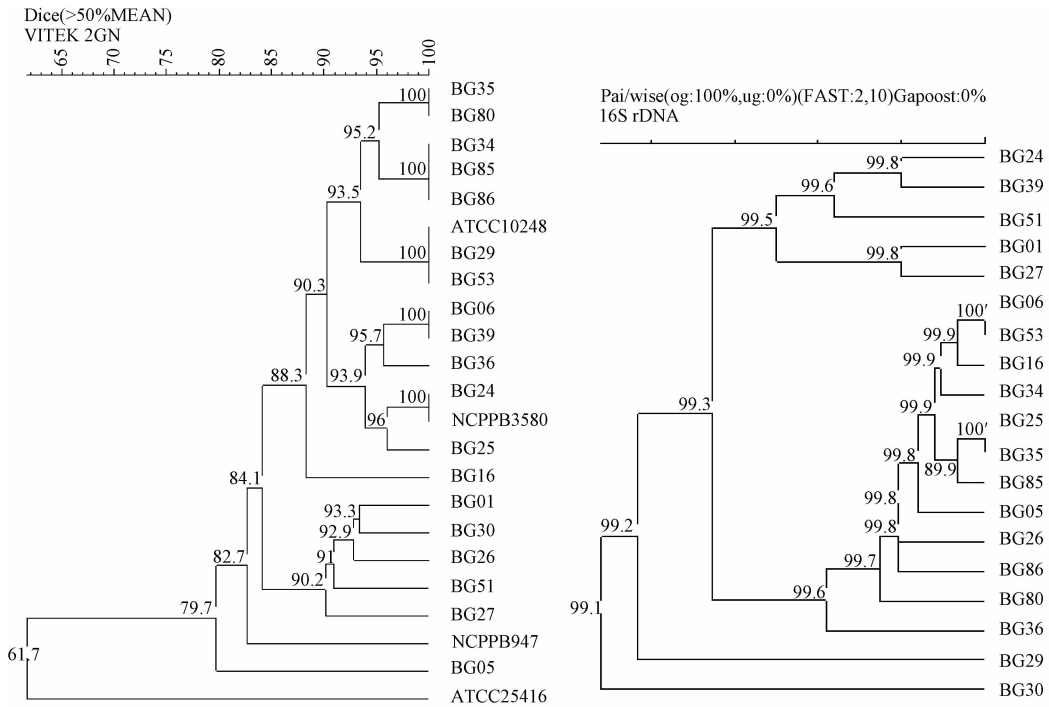


图9 实验菌株的 VITEK 2 GN 生化反应和 16S rDNA 序列聚类图

Figure 9 Clustering of strains in this study by API VITEK 2 GN and 16 rDNA sequence

EcoR I 与 *Taq I* 组合进行试验。

3.2 选择性碱基的选择

选择性碱基通过延长引物序列,可有效减少扩增产物,有利于图谱分析。理论上选择性碱基可以选择不同数量和组合产生无数种多态性。在应用中病毒一般不用选择性碱基,细菌用 2 个,真菌用 3~4 个,动植物可用 5~6 个。选择性碱基的不同组合可通过试验加以确认,本研究中所用 AT 组合与 COENYE 等人的研究相一致^[5]。高 G+C 含量的基因组用识别位点富含 G+C 的限制性内切酶组合产生丰富片段的同时,选用 G 或 C 作为选择性碱基有时不足以有效减少选择性扩增片段数,可考虑选用 A 或 T 作为选择性碱基或增加选择性碱基的数量进行进一步优化。

3.3 两种酶切组合 FAFLP 结果的比较

两种酶切组合 FAFLP 对椰毒假单胞菌酵米面亚种分型结果均具有较高分辨率,可用于椰毒假单胞菌酵米面亚种的分型和分类。两种 FAFLP 组合结果具有一致性的同时,也存在差别。两种酶切组合中, BG 25 与 BG 26、BG 85 与 BG 86、BG 05 与 BG 06 指纹图谱均具有较高一致性; AT 组合中, BG 29 与 BG 34、BG 24 与 BG 25 及 BG 26、BG 53 与 BG 80 具有较高一致性(Dice 相关系数均高于 96.2%),而在 PT 组合中最高相似度仅为 92.2%; PT 组合中, BG 27 与 BG 39、BG 36 与 BG 80、BG 30 与 BG 53 具有较高一致性(Dice 相关系数均高于 94.5%),而在 PT 组合中最高相似度为 93.2%。两种组合的

FAFLP 分型结果并不完全一致,个别菌株 Dice 相关系数差别较大。因此,单纯依赖一种方案对结果进行推论时应谨慎,可结合两种或多种方案对菌株的相似性和同源性进行推论以提高准确性,并紧密结合菌株流行病学资料得出溯源分析的结论。

两种 FAFLP 结果表明椰毒假单胞菌酵米面亚种与 *Burkholderia cepacia* 相似程度较低,而与 *Burkholderia gladioli* pv *alliicolaug* 病原型具有很高相似度,但与 *Burkholderia gladioli* 其他两种病原型相似度较低。同时, VITEK 2 将该菌鉴定为 *Burkholderia gladioli*。因此,本研究也支持将椰毒假单胞菌酵米面亚种归为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的一个病原型。

3.4 FAFLP 与 VITEK 2 GN 及 16S rDNA 序列分析的比较

在椰毒假单胞菌酵米面亚种分型方面, FAFLP 比 VITEK 2 GN 生化反应及 16S rDNA 序列分析具有更高的分辨水平。但必须对菌株进行明确鉴定的前提下,才能发挥 FAFLP 高分辨率的优势。VITEK 2 等商品化生化鉴定系统为细菌鉴定带来了极大便利,并具有标准的操作程序和统一的鉴定数据库,便于不同实验室间的比较。16S rDNA 序列分析则常用于细菌的鉴定和细菌分类学^[7],是研究细菌系统发育学关系的重要方法。FAFLP 分型方法应与其他鉴定和分型方法相结合,对菌株做出更加全面客观的判断。

FAFLP 具有 AFLP 技术的优点,且省去聚丙烯