

# 扩增片段长度多态性分析用于霍乱弧菌分子分型的方法建立和应用评价

姜静 刁保卫 王洪霞 崔志刚 祁国明 阚斌

**【摘要】目的** 建立霍乱弧菌的基于红外荧光标记引物的扩增片段长度多态性(AFLP)分型方法,评价脉冲场凝胶电泳(PFGE)和 AFLP 对霍乱弧菌的分型能力。**方法** 选择 PFGE 带型均不相同的 47 株霍乱弧菌作为评价菌株,建立 AFLP 对于霍乱弧菌的分型方法;确定操作程序后选择 83 株分离自 1962-2005 年 11 个省的霍乱弧菌,进行 AFLP 和 PFGE 对于霍乱弧菌分型能力的比较。AFLP 分型方法采用了红外荧光标记 PCR 引物,利用 LI-COR4300 自动测序仪完成电泳、Saga<sup>MX</sup> 软件对电泳图谱进行编辑。PFGE 采用 PulseNet 提供的标准化程序。**结果** AFLP 用于霍乱弧菌分型时选择性引物携带碱基数为 1,最优引物组合为 *EcoR* I -G/*Mse* I -T, AFLP 分型实验的重复性达到 99.2%。AFLP 将 83 株霍乱弧菌分为 52 个型别, *D* 值为 0.9545; PFGE 将此 83 株菌分为 44 种带型, *D* 值为 0.9251。**结论** 优化固定了 AFLP 对于霍乱弧菌的分型程序,重复性好; AFLP 比 PFGE 具有更好的分型能力,能够用于分离菌株的分子分型。结合已成为实验室网络监测标准分析方法的 PFGE,可对分离株做更细致的分型比较。

**【关键词】** 霍乱弧菌; 扩增片段长度多态性; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型

**Establishment of fluorescent amplified fragment length polymorphism in *Vibrio cholerae* and evaluation in molecular typing** LOU Jing, DIAO Bao-wei, WANG Hong-xia, CUI Zhi-gang, QI Guo-ming, KAN Biao. State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: KAN Biao, Email: kanbiao@icdc.cn

**【Abstract】 Objective** To develop fluorescent amplified fragment length polymorphism (AFLP) method and to evaluate the its typing capability with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in molecular typing of *Vibrio cholerae*. **Methods** Forty-seven strains of *V. cholerae*, with different PFGE patterns, were selected as the reference group to optimize the selective primers of AFLP analysis. Eighty-three strains including 20 strains from one epidemic episode, isolated from different provinces during 1961 and 2005, were used to compare the typing abilities of AFLP and PFGE. LI-COR4300 DNA sequencing system was used for AFLP electrophoresis. The images were recorded by Saga<sup>MX</sup> software and transferred to BioNumerics for clustering analysis. A standard protocol for *V. cholerae* from PulseNet was used in PFGE. **Results** When comparison was made with different selective primers on AFLP based on the 47 strains, results showed that the optimized selective primer pair was *EcoR* I -G/*Mse* I -T, and the reproducibility of the tests was 99.2%. Eighty-three isolates showed 52 AFLP patterns and 44 PFGE patterns, with *D* values as 0.9545 (AFLP) and 0.9251 (PFGE) respectively. **Conclusion** The protocol of fluorescent AFLP on *V. cholerae* typing was established. AFLP was higher than PFGE in discrimination of *V. cholerae* which could be used for molecular typing. When combined with PFGE, AFLP became a more insightful tool to identify genome difference of different isolates.

**【Key words】** *Vibrio cholerae*; Amplified fragment length polymorphism; Pulsed-field gel electrophoresis; Molecular typing

近 10 年间 WHO 每年统计的霍乱全球报告病

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划课题资助项目 (2003BA712A05-04)

作者单位: 102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室

通讯作者: 阚斌, Email: kanbiao@icdc.cn

例数均在 10 万例以上, 而实际病例数要远高于这个数字<sup>[1]</sup>。一些发展中国家霍乱流行尤为严重。历史上共发生过 7 次霍乱大流行, 至今仍处在第七次大流行中。传染病迅速地跨地区传播, 已成为当前传染病预防控制面临的重要问题。一些远距离暴发流

行或造成的散发病例,有时通过疫情数字不能明确联系起来,流行病学调查必须辅助以病原体的实验室监测分析才能发现内在的联系。

基于核酸序列差异的分子分型能够从分子指纹特征方面描述病原菌的差异,在疾病暴发中,有助于追溯暴发来源、确定传播途径和流行范围。对于霍乱弧菌,已有核糖体分型(ribotyping)、脉冲场凝胶电泳(PFGE)及限制性片段长度多态性(RFLP)等多种分子分型方法<sup>[2]</sup>。PFGE 以其重复性好、区分力强等优势,目前已被公认为许多细菌分型的金标准<sup>[3-5]</sup>。扩增片段长度多态性(AFLP)分析是另一种全基因组指纹图谱技术<sup>[6]</sup>,广泛应用于植物及细菌的分子分型。目前还没有 AFLP 和 PFGE 对霍乱弧菌进行分型比较的报道。为评价 PFGE 和 AFLP 对霍乱弧菌的分型能力,在本研究中,我们建立了红外荧光标记引物的 AFLP 对霍乱弧菌的分型方法与 PFGE 的分型能力进行了比较。

### 材料与方法

1. 实验菌株:实验用霍乱弧菌在选择时考虑了尽可能来自不同的年份和更多的分离地点。这些菌株分离省份包括浙江、广东、福建、辽宁、江西、江苏、四川、安徽、山东、云南、新疆、河北、广西、湖南、北京、黑龙江的自 1962-2005 年分离的共计 163 株,其中有 47 株菌(来自 13 个省)经 PFGE 分析明确具有不同的 PFGE 带型,表示这些菌株存在染色体基因组的差异,用这些菌株进行霍乱弧菌 AFLP 选择性扩增引物的选择,即最佳分型引物序列的选择。将另外的 83 株[来自 11 个省(表 1),并包括福建省 2005 年一次 El Tor 霍乱流行中的 20 株分离株]进行了 PFGE 和 AFLP 分型,并进行比较。在 PFGE 中,*Salmonella braenderup* 血清型 H9812 为 PFGE 分子量标准菌株。

2. AFLP:挑取单菌落接种于 LB 中,37℃ 振荡培养过夜。用 MN 公司染色体提取试剂盒提取细菌染色体。将 100 ng 染色体采用 *EcoR* I 和 *Mse* I 双酶切,利用 T4 连接酶将 LI-COR 公司 AFLP 模板制备试剂盒中的 *EcoR* I 和 *Mse* I 的接头连接于酶切片段的两端,作为 DNA 扩增的模板。10 倍稀释连接产物按试剂盒说明书的条件在 MJ 公司 PTC-200PCR 仪上进行预扩增,*EcoR* I-0 引物序列 5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3',*Mse* I-0 引物序列为 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'。将预扩增产

物 40 倍稀释,采用 *EcoR* I-N 和 *Mse* I-N 进行选择扩增(其中 N 表示 4 种碱基中的任一种,由此 *EcoR* I-N 和 *Mse* I-N 引物对共有 16 种组合)。红外染料 IDReye 标记的扩增产物在 LI-COR4300 测序仪上进行电泳,实时的 AFLP 数据(TIF 图像)在电泳过程中被自动采集和存储。

3. PFGE:采用 PulseNet 提供的标化操作程序。以细胞悬浊液湿润无菌棉签,从培养皿中刮取适量细菌,均匀混入 2 ml CSB 中,调 A 值为 4.0~4.2。加入 400  $\mu$ l 细菌悬浊液,37℃ 水浴孵育 5 min,加入 20  $\mu$ l 蛋白酶 K(20 mg/ml),400  $\mu$ l 1% SeaKam Gold 1% SDS,混匀后加入模具,室温凝固 10-15 min,制成胶块;配制细胞裂解液(CLB)及蛋白酶 K 混合液(蛋白酶 K 终浓度为 0.1 mg/ml)。50 ml 的螺旋盖试管中,加入 5 ml CLB 及蛋白酶 K 混合液。将胶块放入螺旋盖试管中,54℃ 水浴摇床孵育 2 h,转速约 170 r/min,50℃ 水浴摇床将纯水和 TE 放入水浴摇床预热;预热的纯水洗 2 遍,间隔为 10-15 min。预热的 TE 洗 3 遍,间隔为 10-15 min。加入 10 ml TE,浸泡胶块,4℃ 保存备用。将胶块切下 2 mm 宽放入缓冲液 H 中,37℃ 水浴中孵育 10-15 min。在 200  $\mu$ l 酶切缓冲液中放入胶块,37℃ 水浴中孵育 3 h;确保电泳槽水平,加入 TBE 电泳。电泳完成的凝胶经 EB 染色,纯水脱色,用 Bio-Rad 公司凝胶成像仪 Gel Doc 2000 拍摄图像。

4. 统计学分析:AFLP 得到的数据导入 Saga<sup>MX</sup> 进一步分析,将数据转换为 TXT 文件,通过 BioNumerics(Version 4.0)数据库软件中 UPGMA 方法进行聚类分析;PFGE 的电泳图谱直接输入 BioNumerics(Version 4.0),进行聚类分析。Simpson 差异指数(D 值)作为评价分型能力的指标, $D = 1 - \frac{\sum [nj(nj - 1)]}{N(N - 1)}$ ,式中 N:实验菌株总数,nj:单个型别的菌株数<sup>[7,8]</sup>。

### 结 果

1. AFLP 选择性扩增引物的确定:在切割染色体 DNA 的内切酶确定的情况下(对细菌通常选用 *EcoR* I 和 *Mse* I),AFLP 分型的关键就是对于选择性扩增引物的选择。选择性引物 3' 端的选择性碱基数可以为 1~3 个。细菌基因组的大小适合添加一个选择性碱基的引物对。对霍乱弧菌的基因组 DNA 也尝试了分别加 1~3 个选择性碱基的引物对,携带一个选择性碱基的引物对在 50~700 bp,产

表1 83 株霍乱弧菌 PFGE 与 AFLP 分型对比

菌株号	菌株来源	分离年份	血清群、型	CT 基因	PFGE 型	AFLP 型	菌株号	菌株来源	分离年份	血清群、型	CT 基因	PFGE 型	AFLP 型
ZJ62-8	中国浙江	1962	O1,小川	+	P1	A1	FJ163	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29
ZJ64-21	中国浙江	1962	O1,小川	+	P2	A2	FJ164	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29
60-61	中国浙江	1977	O1,小川	-	P3	A3	FJ230	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29
JS32	中国江苏	1990	O1,稻叶	-	P4	A4	FJ231	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29
HLJ981	中国黑龙江	1998	O139	+	P5	A5	FJ232	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29
HLJ982	中国黑龙江	1998	O139	+	P5	A6	FJ233	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29
94-35	中国浙江	1994	O139	+	P6	A7	FJ246	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29
BJ94029	中国北京	1994	O139	+	P6	A8	FJ280	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29
GD98-155	中国广东	1998	O139	+	P6	A9	FJ281	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29
V98-508	中国安徽	1998	O139	+	P6	A10	FJ283	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29
V98-520	中国安徽	1998	O139	+	P6	A10	FJ234	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A30
XJ93329	中国新疆	1993	O139	+	P6	A10	FJ279	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A30
ZJ94004	中国浙江	1994	O139	+	P6	A11	FJ243	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A31
LN97	中国辽宁	1997	O139	+	P6	A11	FJ248	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A32
ZJ9694	中国浙江	1996	O139	+	P6	A12	FJ282	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A33
ZJ9695	中国浙江	1996	O139	+	P6	A12	BJ94005	中国北京	1994	O139	+	P20	A10
ZJ9696	中国浙江	1996	O139	+	P7	A11	HN98	中国湖南	1998	O1,稻叶	+	P21	A10
ZJ97-29	中国浙江	1997	O139	+	P7	A13	BJ94030	中国北京	1994	O139	+	P21	A10
BJ94034	中国北京	1994	O139	+	P8	A10	BJ94039	中国北京	1994	O139	+	P22	A11
ZJ98-3	中国浙江	1998	O139	+	P9	A10	FJ285	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P23	A29
ZJ98-4	中国浙江	1998	O139	+	P10	A10	ZJ9691	中国浙江	1996	O139	+	P24	A34
JXE94-489	中国江西	1994	O139	+	P10	A10	LN2001-9	中国辽宁	2001	O1,稻叶	+	P25	A35
ZJ96-86	中国浙江	1996	O139	+	P10	A15	GD95-12	中国广东	1995	O139	+	P26	A36
ZJ9690	中国浙江	1996	O139	+	P10	A16	ZJ79-25	中国浙江	1979	O1,稻叶	+	P27	A37
ZJ97-26	中国浙江	1997	O139	+	P10	A17	ZJ97-32	中国浙江	1997	O139	+	P28	A38
JX94-484	中国江西	1994	O139	+	P10	A18	LETVT1089	中国广东	1979	O1,稻叶	+	P29	A39
JX98330	中国江西	1998	O139	+	P11	A19	N16961	印度	1975	O1,稻叶	+	P30	A40
JS9901	中国江苏	1999	O139	+	P11	A20	GD97-3	中国广东	1997	O139	-	P31	A41
JX9866	中国江西	1998	O139	+	P12	A10	HLJ983	中国黑龙江	1998	O139	+	P32	A41
JS9805	中国江苏	1998	O139	+	P12	A21	GD96002	中国广东	1996	O139	+	P33	A42
ZJ96-89	中国浙江	1996	O139	+	P13	A22	N93134	中国新疆	1993	O139	+	P34	A43
ZJ96-98	中国浙江	1996	O139	+	P13	A23	ZJ63-16	中国浙江	1962	O1,小川	+	P35	A44
GD95-6	中国广东	1995	O139	+	P14	A24	ZJ96-72	中国浙江	1996	O1,小川	+	P36	A45
JS9707	中国江苏	1997	O139	+	P15	A25	GD98-152	中国广东	1998	O139	+	P37	A14
GD94-559	中国广东	1994	O139	+	P16	A26	ZJ97-15	中国浙江	1997	O139	+	P38	A46
ZJ9692	中国浙江	1996	O139	+	P17	A27	LN98-6	中国辽宁	1998	O1,小川	+	P39	A47
ZJ9693	中国浙江	1996	O139	+	P18	A28	ZJ95-63	中国浙江	1995	O1,小川	+	P40	A48
FJ147	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29	ZJ4-7	中国浙江	1977	O1,小川	-	P41	A49
FJ159	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29	ZJ98-4	中国浙江	1998	O139	+	P42	A50
FJ160	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29	JX98359	中国江西	1998	O139	+	P43	A51
FJ161	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29	GD97-25	中国广东	1997	O139	-	P44	A52
FJ162	中国福建	2005	O1,稻叶	+	P19	A29							

生的条带数大约为 30~80, 适合于霍乱弧菌的 AFLP 分型。引物对后面分别可添加 4 种碱基中的一种, 因此共有 16 种引物对的组合。所有 16 种 *EcoR* I-N/*Mse* I-N 引物组合中, 47 株菌的 PFGE 带型均不相同, 代表了具有明确的基因组差异的菌株。这些菌株被用来筛选用于霍乱弧菌 AFLP 的最佳的选择性引物对。

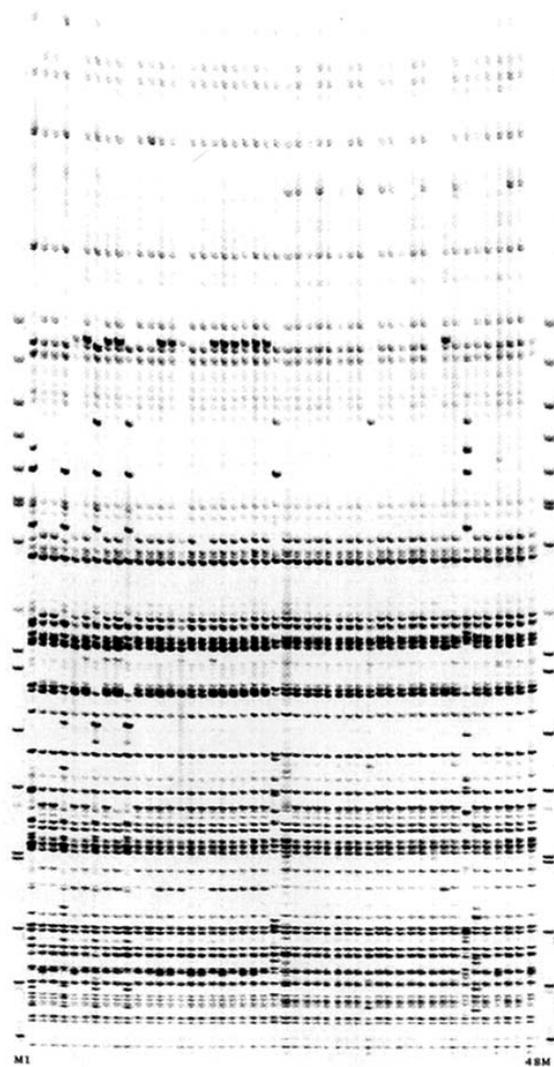
47 株霍乱弧菌 16 对引物的 AFLP 分型所得 D 值(表 2), 因此确定针对霍乱弧菌的最优引物组合为 *EcoR* I-G/*Mse* I-T(图 1)。这 47 株霍乱弧菌, 按照 *EcoR* I-G/*Mse* I-T 选择性引物组合, 又从其

染色体 DNA 的 *EcoR* I 和 *Mse* I 消化步骤开始重复 AFLP 分型步骤, 以判断实验的重复能力。两次获得的图谱通过 BioNumerics 软件进行聚类分析及一致性检验, 一致性系数为 99.2%, 证明了针对霍乱弧菌 AFLP 重复能力。

2. AFLP 与 PFGE 分型能力的比较: 在确定了用于霍乱弧菌的 AFLP 分析的引物对后, 选择 83 株分离自 1962-2005 年 11 个省的 O1 群和 O139 群霍乱弧菌, 包括 O139 群 48 株, O1 群 35 株(表 1), 进行 PFGE 和 AFLP 对这些菌株分型能力的比较。这些菌株中部分菌株的分离时间和地区尽可能地分

表2 选择扩增引物筛选结果比较

引物组合 EcoR I -N/Mse I -N	D 值	引物组合 EcoR I -N/Mse I -N	D 值
G/T	0.9814	T/T	0.8626
A/C	0.9273	T/A	0.8608
T/C	0.9140	G/C	0.8520
C/T	0.9096	C/C	0.8502
C/G	0.9096	G/G	0.8457
A/T	0.9030	C/A	0.8440
A/A	0.9007	G/A	0.8342
A/G	0.8945	T/G	0.7863



注:选择性 EcoR I 引物 3' 端所加选择性碱基为 G, Mse I 所加选择性碱基 T; 图下方标记泳道 1~48 为已知 PFGE 带型不同的 47 株霍乱弧菌以及基因组全测序株 N16961, M 为分子量标准

图1 47 株 PFGE 带型不同的霍乱弧菌 AFLP 电泳图谱散, 以尽可能避免这些菌株之间具有直接的传播关系, 另外有少部分菌株分离自 2005 年的霍乱流行中, 用以分析分型方法对关联菌株的判断。AFLP

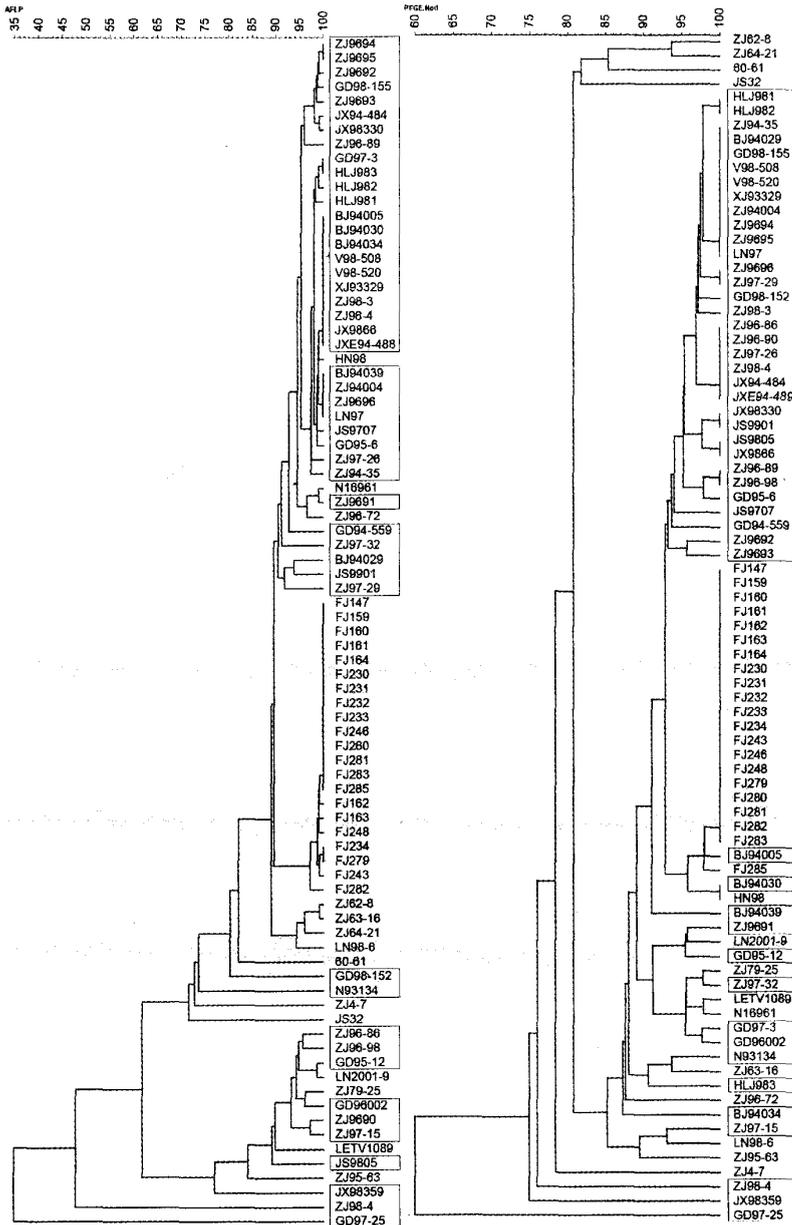
将 83 株菌分为 52 种带型,  $D$  值为 0.9545, 菌株间带型相似性聚类见图 2(左); PFGE 将这些菌株分为 44 种带型,  $D$  值为 0.9251, 菌株间带型相似性聚类见图 2(右), 对这些菌株的分析, AFLP 表现了更高的区分能力。83 株霍乱弧菌中 23 株(25%) PFGE 没有区分开, 表现为相同的带型, 而 AFLP 将其分为不同型别; 12 株(14%) AFLP 未能区分, 而 PFGE 将其分为不同型别。

## 讨 论

细菌分子分型能够用于描述病原菌所致暴发或流行的病原特征及追溯传染源等, 要求方法具备稳定性好、分辨力强且快速和高通量等特点。由于 AFLP 能够在短时间内分析大量的菌株, 因此在本研究中我们建立了霍乱弧菌荧光标记 AFLP 的分析方法, 并与常规使用的 PFGE 菌株分型能力进行了比较。

不同物种基因组大小及序列差别显著, AFLP 技术应用于不同物种的分析时, 选择性扩增引物 3' 端所携带选择性碱基数应有所不同。理论上, 对于一个核苷酸排列随机的基因组, 当选择性引物 3' 端各携带 1 个选择性碱基, 扩增出的条带是原酶切后第一轮处于扩增能力范围内的条带总数的  $1/4 \times 1/4$ ; 当各携带 2 个选择性碱基, 扩增出的条带是原条带总数的  $1/16 \times 1/16$ ; 各携带 3 个选择性碱基, 扩增出的条带是原条带总数的  $1/64 \times 1/64$ 。经实验筛选, 对于霍乱弧菌, 选择性扩增引物后面加 3 个及 2 个选择性碱基扩增条带数目过少, 不能满足分析所需。而选择性引物携带一个选择性碱基时, 获得的条带数量适中, 条带清晰, 故针对霍乱弧菌选择性引物附加的碱基数目确定为 1。

实验中对两条选择性引物各附加的碱基种类也进行了比较。筛选最佳引物组合的原则是能将序列不同的菌株最大程度地区分开。为此我们选择了 PFGE 分型结果已明确差异较大的 47 株霍乱弧菌, 这些菌株基因组序列能够明确是不同的。由此确定 EcoR I -G/Mse I -T 组合的分辨力最佳, 这个结果也与之之前实验报道的结论相同<sup>[9]</sup>。不同的引物组合分辨力差异明显, 也说明选择性引物的确定在 AFLP 分型中是关键步骤。分子分型方法的评价指标, 既包括它的分辨力, 还要求具备很好的重复性, 这样才能保证实验结果的稳定性和可信度<sup>[10]</sup>。在一个实验室中的 AFLP 操作是有良好重复性的<sup>[6,10,11]</sup>, 本研究显示在霍乱弧菌分型中也是相同的结果。



注:标方框为 O139 群菌株

图2 AFLP(左)和 PFGE(右)对 83 株不同来源 O1 群和 O139 群霍乱弧菌的分型聚类相似性分析

在进行两种分型方法的比较时,我们选择了分离年份和地点尽可能分开的菌株,这些菌株不具备直接的传播联系,另外也选择了福建省一次流行中的多个分离株,以分析对这些菌株的相似性检测。对于无流行病学联系的菌株,AFLP 比 PFGE 区分出更多的带型,对于此次流行的菌株,AFLP 也显示了高度的相似性,但也反映了一些菌株在流行期间发生的轻微变化。因为 AFLP 扩增出的片段带型

多,与 PFGE 相比能检测更多染色体位点上的突变,因此显示了少量条带的变化。两种方法的分辨力均大于 0.9,说明分辨力均较强<sup>[12,13]</sup>,AFLP 的 D 值略高于 PFGE,应是由于 PFGE 应用稀有切点限制性内切酶进行酶切,产生少量的 DNA 大片段,每株菌条带数为 18~25,大小为 20.5~300 kb,只能够反映酶切位点处的变异,以及大片段 DNA 的插入、缺失或染色体重排,而小片段的插入、缺失以及更多位点上的碱基改变则难以发现。而 AFLP 采用一中等切割频率和一高切割频率的双酶切,能够产生较大数量小于 700 bp 的 DNA 小片段,经 AFLP 选择性扩增,每株菌条带数可显示出 30~80,区分条带精确度可以达到 1 bp。更多酶切位点的突变以及 DNA 片段的插入、缺失,能够引起 AFLP 的电泳条带及聚类结果的变化。因此,AFLP 敏感性更高,能更好的反映基因组的多态性<sup>[14,15]</sup>。从这 83 株菌的聚类结果还显示,绝大多数 O1 群与 O139 群菌株能够分开,但小部分 O1 群与 O139 群菌株出现混杂聚类现象,但这并不代表 O1 群与 O139 群是一类菌株,反而也提示了 O139 群与 O1 群产毒株基因组还是高度相似的<sup>[16]</sup>。而在以后的实际应用中,将首先明确菌株的血清群,然后在各自血清群内进行比较。

AFLP 与 PFGE 是目前细菌分子分型常用的两种方法。PFGE 分辨率高、重复性好,已被公认为许多细菌基因分型的金标准,尤其是基于细菌 PFGE 分析的分型监测网络 PulseNet 是利用标准化的细

菌实验室分子分型技术,使 PFGE 操作方案实现标准化,通过网络实验室实施监测,建立数据交流的网络平台。但 PFGE 分析存在的问题是较费时,通量较低。一套仪器完成 11 个样品的分析时间为 48 h<sup>[12]</sup>。而 AFLP 具有相对更好的区分能力,其高通量也是 PFGE 无法比拟的。以 LI-COR4300 自动化 DNA 测序仪为例,一板胶最多可上样 96 个,电泳时间为 4 h。如果采用不同荧光标记的 PCR 产物,30 min 可重复上样,两张电泳图谱互不干扰。另外首次电泳结束后,胶板可以重复上样一次,一块胶板总的上样量为 384(96×2×2),整套方案的完成约需要 20 h<sup>[12]</sup>,一次可以完成 384 个样品,能够实现高通量<sup>[17]</sup>,利用毛细管自动电泳技术的测序仪进行 AFLP,也能获得更高的自动化和高通量分析。而 PFGE 已制定标准化方案,实现了实验室之间的数据交流,这也是 AFLP 未来的目标,尤其是 AFLP 在确定标准化实验方案后,虽然在一个实验室相隔较近的时期内操作具有满意的重复性,但在不同的实验室能否得到良好的重复性,还需要进一步检验。在实践中,分型方法的选择取决于研究目的、技术要求以及实验室资源,应充分发挥不同分型方法各自的优势,综合分析,才能够更加清晰地判断菌株之间的关系。

#### 参 考 文 献

- [1] WHO. Cholera 2005. Weekly Epidemiological Record. 2006, 81: 297-308.
- [2] Gurtler V, Mayall BC. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. Int J Syst Evol Microbiol. 2001, 51:3-16.
- [3] Struelens MJ. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1998, 93:581-586.
- [4] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol, 1995, 33:2233-2239.
- [5] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Infect Control Hosp Epidemiol, 1997, 18: 426-439.
- [6] Pieter V, Rene H, Marjo B, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Res, 1995, 23:4407-4414.
- [7] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol, 1988, 26:2465-2466.
- [8] Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing method. J Clin Microbiol, 1990, 28: 1903-1905.
- [9] Lan R, Reeves PR. Pandemic spread of cholera: genetic diversity and relationships within the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism. J Clin Microbiol, 2002, 40:172-181.
- [10] Savelkoul PH, Aarts HJ, de Haas J, et al. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. J Clin Microbiol, 1999, 37:3083-3091.
- [11] Janssen P, Coopman R, Huy G, et al. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology, 1996, 142:1881-1893.
- [12] Klaassen CH, van Haren HA, Horrevorts AM. Molecular fingerprinting of clostridium difficile isolates: pulsed-field gel electrophoresis versus amplified fragment length polymorphism. J Clin Microbiol, 2002, 40:101-104.
- [13] Garcia Del Blanco N, Dobson ME, Vela AI, et al. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol, 2002, 40:2964-2972.
- [14] Hu H, Lan R, Reeves PR. Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium reveals phage-type-specific markers and potential for microarray typing. J Clin Microbiol, 2002, 40:3406-3415.
- [15] Vaneechoutte M. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. Mol Biotechnol, 1996, 6:115-142.
- [16] Jiang SC, Matte M, Matte G, et al. Genetic diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting. Appl Environ Microbiol, 2000, 66:148-153.
- [17] Patricia EK, Robert RK, Samuel WC, et al. A high-throughput AFLP-based method for constructing integrated genetic and physical maps: progress toward a sorghum genome map. Genome Res, 2000, 10:789-807.

(收稿日期:2007-02-12)

(本文编辑:张林东)