

## 细菌分子分型意义

随着全球贸易往来的日益频繁,人口的流动、卫生条件的改变等因素使食源性疾病成为当前最严重的公共卫生问题。食源性感染是由细菌、病毒、真菌和寄生虫等通过食物传播引起的感染性疾病。细菌食源性感染呈现逐年上升的趋势,已引起世界各国的重视。

而医院感染的日益增多,也已成为一个重要的公共卫生问题。上世纪90年代初,美国CDC在医院感染计划中进行了46次医院感染流行病学调查,其中31次由细菌引起。鉴于细菌感染是医院感染暴发中最重要致病因素,因此许多国家将控制细菌感染作为预防院内感染控制工作的一个主要内容。

对于食源性感染和医院感染的病原进行鉴定和分型,是分辨各感染病例是否为同一菌株所致、追溯感染源、证实暴发流行的可靠方法,以便从根源上控制食源性感染或院内感染。

## 细菌分子分型的方法

### 脉冲场电泳技术 (PFGE)

PFGE技术以其重复性好、分辨力强而被誉为细菌分子分型的“金标准”

它可分离大片段DNA,其分辨范围可达到10 Mb,而普通琼脂糖凝胶电泳仅能分离小于500 Kb的DNA。PFGE的基本原理是通过电场的不断改变,使包埋在凝胶中的DNA分子的泳动方向周期性地发生改变,小分子DNA比大分子DNA泳动得快,从而在凝胶上按DNA分子大小呈现出特异的电泳图谱。

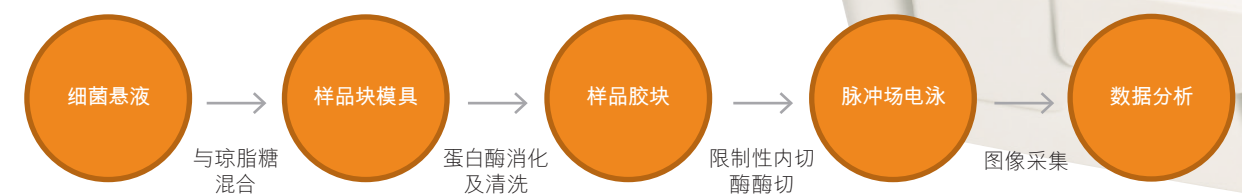
具体而言,PFGE分型技术是使用限制性核酸内切酶消化细菌基因组DNA,产生十几或二十几条大的DNA片段(10~800kb),这些大片段在电场方向周期改变(脉冲)的凝胶电泳条件下,根据其大小得到有效分离,且其图谱具有特异性。当采用一种限制性核酸内切酶的分辨力不强时,可以采用两种限制性核酸内切酶加以提高。理论上,所有的细菌都能使用PFGE进行分型分类,结果具有极高的再现性和分辨率,而且结果稳定、易于标准化,常作为分子生物学分型方法的“金标准”使用。

### 常用方法

传统的病原微生物分型方法主要依据其培养特性和生化特征,如血清型、噬菌体型和抗菌药物耐受谱型等。这些分型方法应用广泛,具有十分重要的作用,但分辨力较弱、重复性较差、标准化较难。随着分子生物学技术的迅速发展,分子分型技术应用于病原微生物分子分型成为临床诊断、流行病研究中的热点。

目前进行细菌分子分型的方法主要有:质粒图谱法、RAPD法、RFLP法、AFLP法、Ribotyping法、焦磷酸测序法、MLST法、MLVA法以及PFGE等。

### PFGE的工作流程图



伯乐生命医学产品(上海)有限公司 地址: 上海市浦东东方路18号 保利广场E栋3楼 电话: 021-6169 8500 传真: 021-6169 8599 邮编: 200120	北京办事处: 地址: 北京朝阳区曙光西里5号 A栋凤凰置地广场22楼 电话: 010-5939 0088 传真: 010-5939 0160 邮编: 100028	广州办事处: 地址: 广州市环市东路403号 广州国际电子大厦1302-03室 电话: 020-8732 2339 传真: 020-8732 2332 邮编: 510095	武汉办事处: 地址: 湖北省武汉市汉口区解放大道634号 新世界中心B座1202室 电话: 027-8380 6255 传真: 027-8380 6265 邮编: 100028
---	--	---	---

伯乐公司中国呼叫中心: 800-820-5567, 021-61698504 欢迎访问: www.bio-rad.com

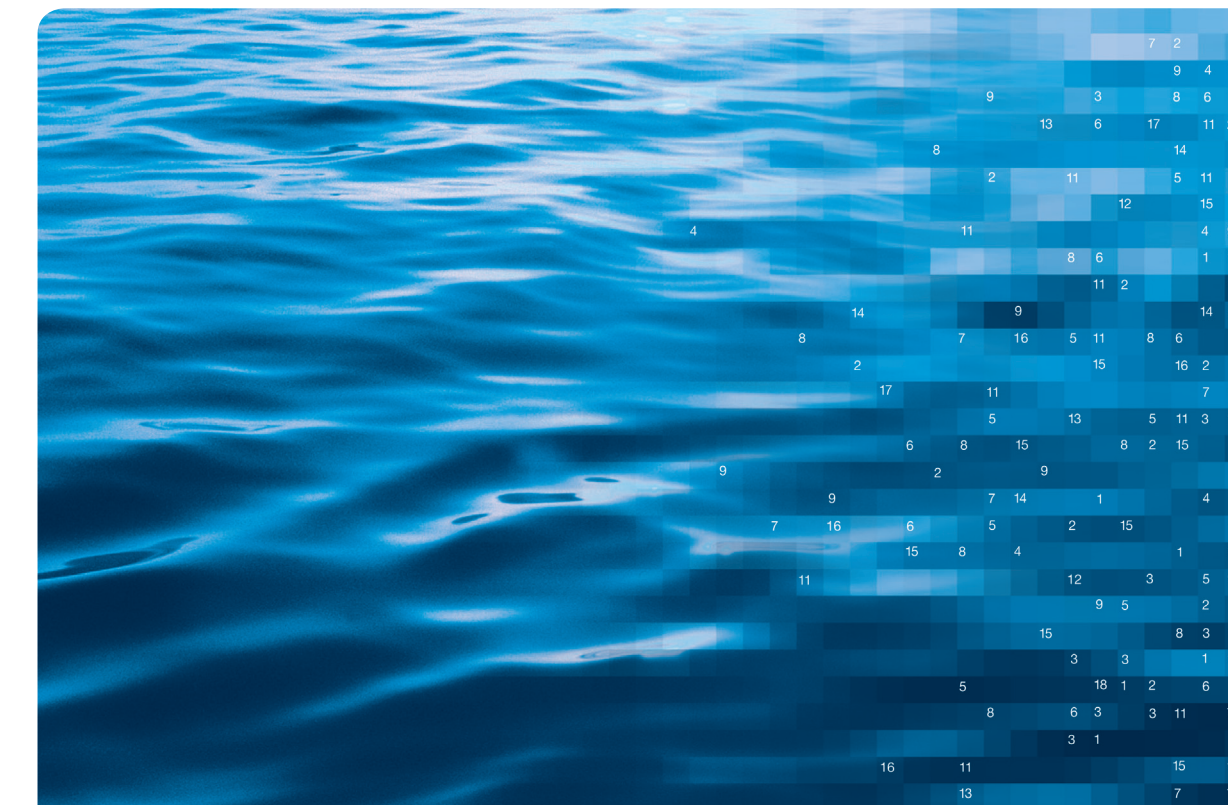


Life Science Group

Web site www.bio-rad.com USA 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 01 877 89 01 Belgium 09 385 55 11 Brazil 55 31 3689 6600 Canada 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 420 241 430 532 Denmark 44 52 10 00 Finland 09 804 22 00 France 01 47 95 69 65 Germany 089 31 884 0 Greece 30 210 777 4396 Hong Kong 852 2789 3300 Hungary 36 1 459 6100 India 91 124 4029300 Israel 03 963 6050 Italy 39 02 216091 Japan 03 6361 7000 Korea 82 2 3473 4460 Malaysia 60 3 2117 5260 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 0318 540666 New Zealand 64 9 415 2280 Norway 23 38 41 30 Poland 48 22 331 99 99 Portugal 351 21 472 7700 Russia 7 495 721 14 04 Singapore 65 6415 3170 South Africa 27 861 246 723 Spain 34 91 590 5200 Sweden 08 555 12700 Switzerland 061 717 95 55 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 6518311 United Kingdom 020 8328 2000 Vietnam 84 8 38131140

Printed in China

11-094 1011



## 细菌分子分型监测系统





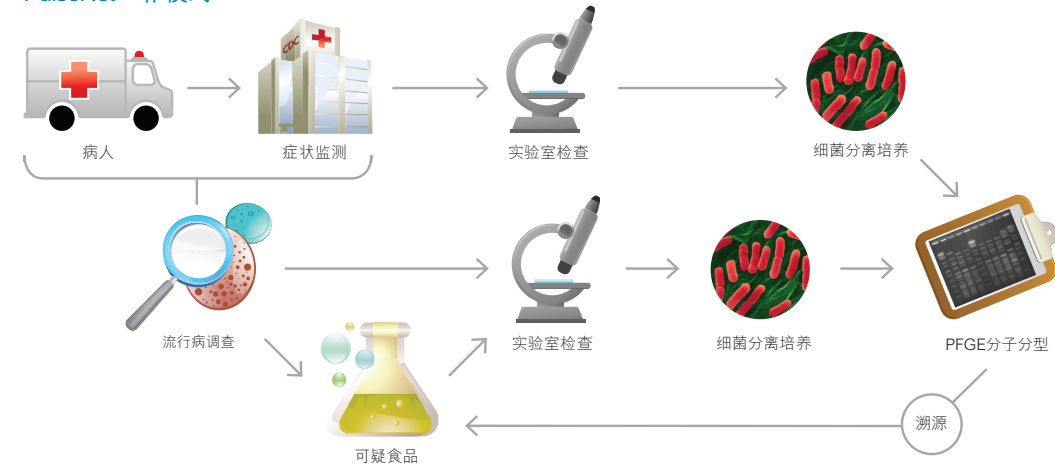
## PulseNet 网络

PulseNet是美国CDC于1998年5月由副总统在白宫宣布成立的。这个网络是利用标准化的细菌实验室分子分型技术、标准的设备平台,通过分布各地的网络实验室的实际检测和监测,建立网络平台及时交流和比对数据,从而识别食源性传染病发生的关联、调查暴发流行、快速鉴定暴发的来源。在暴发流行的识别、分析、预警和改善控制措施中发挥了重要作用,并受到美国政府的表彰。PulseNet使食源性疾病病原菌检测基本满足了准确和快速的要求,使引发食物中毒暴发的病原菌分离的时间由几天缩短为几小时。2006年大肠杆菌O157的大规模爆发,就是PulseNet通过PFGE平台快速检测和溯源的。

我国CDC的科学家充分认识到PulseNet在疾病爆发的监控和调查中的巨大作用,开始根据传染病监测的全球化发展的要求,结合国际化监测网络标准,探索建立适合中国模式的PulseNet。PulseNet China在2004年9月成立,已经在我国2003年C群流脑暴发处置、2005年猪链球菌感染暴发处置、多起霍乱弧菌暴发与应急处置和我国小肠结肠炎耶尔森菌流行特征分析等工作得到了很成功的应用。

“标准化”是PulseNet的核心。PulseNet的成员全部采用标准的设备、标准的程序和标准的样品制备方法,构建出从病人或食物中分离的病原菌的PFGE“指纹图谱”。

### PulseNet 工作模式



### PulseNet 使用的标准设备平台



## 标配仪器特点



### CHEF Mapper® XA System

CHEF Mapper XA 系统是市面上最先进的脉冲场凝胶电泳系统,可以在所有PFGE相关应用领域中。它将CHEF、PACE、DR、FIGE和AFGE多种技术结合在一起,还能够提供“多矢量”功能和“二次脉冲”程序,使所有片段大小范围的DNA分子都能得到最佳分离。

主要特点:

- 360° 全方位脉冲,分离范围宽,使100bp-10Mb范围的DNA片段获得最佳的分辨率
- 功能强大,可选多种分离条件,保证针对各种复杂样品都有最佳分离效果
- 内置脉冲专家系统,方便实验条件优化
- 断电记忆功能,恢复供电后,继续运行断电前的程序



### CHEF DR® III 可变角系统

系统整合了CHEF和PACE技术,适合5Kb-6Mb范围的DNA进行快速、高分辨率的分离。

主要特点:

- 应用灵活: 90° -120° 的脉冲角度范围,可以编程和连续运行3个子程序
- 自动化,能记忆机器最后运行的程序,并把它作为下次开机默认的实验程序
- 断电记忆功能,恢复供电后,继续运行断电前的程序

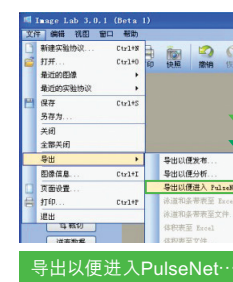


### Gel Doc XR+ / ChemiDoc 成像系统

Gel Doc XR+或ChemiDoc成像系统是脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 的最佳拍档,是PulseNet的指定成像系统,可以实现最完整的标准化操作流程。Quantity One/Image Lab软件具有唯一的PulseNet输出格式,并直接进入BioNumerics软件进行分析,是PulseNet实验室的专业选择。

主要特点:

- 操作友好: 全中文软件,成像操作极为简便
- 记忆功能: 可存储方法,只需反复调用程序即可,有利于方法的标准化
- 量身设计: 有专门的PulseNet导出菜单,利于结果的后续分析



### 仪器配置

PulsNet 配置推荐		
货号	产品名称	数量
170-3672	CHEF Mapper XA Chiller System	1
170-8195	Gel Doc XR+	1
170-7950	White Light Transilluminar	1
170-4324	COMB, SUBCELL, 15 W X 1.5 MM	1
170-3622	SAMPLE MOLD	5
170-3713	CHEF PLUG MOLDS	5
170-3704	WIDE/LONG	1
170-3699	COMBINATION COMB HOLDER	1
170-3711	CHEF SCREENED CAP, 5 PCS	10
170-3627	15 WELL COMB, 8.25 W x 1.5 MM	1

选配 FPQuest数据库软件 (功能同BioNumeric软件)		
货号	产品名称	数量
170-9310	InforQuestFP basic fingerprint software	1
170-9311	InforQuestFP character types module	1
170-9312	InforQuestFP sequence type module	1
170-9313	InforQuestFP matrix type module	1
170-9314	InforQuestFP cluster analysis module	1
170-9315	InforQuestFP identification and library manager module	1
170-9316	InforQuestFP dimensioning techniques module	1
170-9317	InforQuestFP database sharing module	1

## 仪器参数:

### (一) 脉冲场电泳仪 CHEF- Mapper XA

(1) 主控单元:

- 分离范围 100 bp to 10 Mb DNA 片段
- 脉冲角度范围 0 — 360°, 每步0.5°调节
- 电源输出 最大350 V, 增量连续可调, 最大电流0.5 A
- 脉冲控制 基于CHEF技术 (钳位匀场强)
- 转换时间范围 50 msec to 18 hr
- 转换时间梯度 有线性、凸型和凹型三种
- 电极调节能力 可实时监测和调节电极的电势 ±0.5%
- 程序模块设置 最多8个, 可以自动连续执行
- 电场矢量 同一程序中允许最多15个电场矢量, 以增强分辨率
- 有二次脉冲功能, 进一步加快大分子DNA的泳动速度
- 有内置专家系统, 可自动提供优化的电泳条件
- 可存储至少20个复杂程序, 99个一般程序
- 有自动记忆功能, 断电后3小时内来电, 自动启动

(2) 电泳槽 Electrophoretic Cell:

- 体积 510 mm (depth) x 450 mm (width) x 130 mm (height)
- 材料: 聚碳酸酯, 电泳槽盖上配有安全锁, 防止触电
- 24根铂金电极, 0.5 mm 直径, 呈六边形排列, 每根电极可单独更换
- 可运行多种规格的凝胶 (宽 x 长): 14 cm x 13 cm, 21 cm x 14 cm, 14 cm x 21 cm
- 有内置温度探头监测缓冲液温度变化

(3) 冷却装置:

- 输入功率 75 watts (14°C时)
- 温度范围 5°C — 25°C

(4) 循环泵:

- 泵速可调, 典型流速 1 liter/min

### (二) 脉冲场电泳仪 CHEF-DRIII

1. 主控单元

- 分离范围 5 KB-6 MB DNA 分子提供快速高分辨率的分离
- 脉冲角度范围 90 — 120°, 1°增量
- 电源输出 最大电压降9V/cm, 最大电流0.5 A
- 脉冲控制 基于CHEF技术 (钳位匀场强)
- 转换时间范围 0.1 to 65K 秒
- 转换时间梯度 可提供线性的时间梯度
- 电极调节能力 可实时监测和调节电极的电势 ±0.5%
- 程序模块设置 最多3个, 可以自动连续执行
- 最高电泳时间 999 小时/ 每个模块
- 有自动记忆功能, 断电后, 重新来电自动启动电泳

(注: 电泳槽、冷却系统、循环泵技术指标同CHEF—Mapper XA)

### (三) 凝胶成像系统 Gel Doc XR+

(1) 仪器性能:

- CCD分辨率: 1360 × 1024, 马达自动控制
- 动力学范围 > 3个数量级, 12 bit灰度级 (非插值)
- 滤光片: 标配2个, 3个可选
- 镜头缩放: 8.5 — 51 mm 镜头
- 暗箱: 密封暗箱可用于化学发光检测
- 样品大小: 28 x 36 cm, 成像大小: 25 x 26 cm
- 备有校正镜头曲面度的专用滤光片
- 平场校正板, 美国专利号5,951,838 (可选)
- 曝光时间: 最短0.001 s, 每0.001 s步进
- 灵敏度: 0.1 ng EB染色的DNA
- 信噪比: > = 56 dB
- 光源: 透射白光, 反射白光, 透射紫外, 透射蓝光 (可选)
- 紫外光源: 302 nm, 可选254nm/365 nm, 紫外自动光闸保护

(2) 软件功能:

- 全自动Image Lab专业成像及分析软件
- 专门为PulseNet设计出菜单
- 软件可编程, 所编程序可重复调用或再编辑
- 软件可自由安装于多台电脑, 同时分析
- 显示过饱和和像素保证精确度量
- 自动条带检测, 自动分子量测算, 自动条带浓度测算
- 可进报告输出: 包括图像仪名称、仪器序列号、使用者姓名、成像时间、光源名称、滤光片名称、泳道图示、条带标注等行RFLP和DNA指纹分析
- 图像输出格式: .tif, .bmp, .png, .jpg

