

副溶血性弧菌重复序列-PCR 分型研究

金莉莉¹ 董 雪² 王秋雨^{1*} 李 雪¹ 吴 琼¹ 李继耀²

(1. 辽宁大学生命科学学院 沈阳 110036)

(2. 沈阳市疾病预防控制中心 沈阳 110037)

摘 要: 利用基因外重复回文序列-PCR(REP-PCR)和肠细菌基因间共有重复序列-PCR(ERIC-PCR)技术,对副溶血性弧菌进行了分子分型研究和亲缘关系的探讨,并使用 Hunter 和 Gaston 方法计算分辨力指数。结果显示 40 株副溶血性弧菌分离株均可扩增产生可重复的 DNA 指纹图谱,并且不同菌株基因组 DNA 的扩增条带具有多态性。根据 SPSS10.0 软件得出的树状图结果, REP-PCR 可以把 40 株菌分为 21 个型,分辨力指数可达到 0.953,优势菌型为 G1 型;ERIC-PCR 可将 40 株菌分成 4 个型,分辨力指数为 0.5。研究显示重复序列-PCR 方法可以用于该菌分型分析,REP-PCR 具有较好的分型能力。在两种 PCR 的 DNA 指纹图谱中,血清型 O1 群与 O3 群主条带均非常相似,表明它们之间亲缘关系密切。

关键词: 副溶血性弧菌, 基因外重复回文序列-PCR, 肠细菌基因间共有重复序列-PCR, 分型, 亲缘关系

Typing of *Vibrio parahaemolyticus* by Repetitive Element Sequence-based PCR

JIN Li-Li¹ DONG Xue² WANG Qiu-Yu^{1*} LI Xue¹ WU Qiong¹ LI Ji-Yao²

(1. Life School of Liaoning University, Shenyang 110036)

(2. Shenyang Center for Disease Control and Prevention, Shenyang 110037)

Abstract: Two kinds of Rep-PCR, Repetitive extragenic palindromic elements-PCR(REP-PCR) and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences-PCR (ERIC-PCR), were used firstly in typing and genetic relationship research for *Vibrio parahaemolyticus* in China, and Hunter & Gaston's method was used to calculate discriminative index of REP-PCR and ERIC-PCR. Forty *Vibrio parahaemolyticus* strains, representing a wide range of REP and ERIC patterns, were grouped into 21 and 4 patterns with discriminative index of 0.953 and 0.5, by REP-PCR and ERIC-PCR respectively. G1 type was pre-dominant in 40 strains of *Vibrio parahaemolyticus* when typed by REP-PCR. The results show that Rep-PCR is feasible for typing *Vibrio parahaemolyticus* strains, and REP-PCR possesses better typing potential. Similar DNA fingerprints were gained from serotype O1 and O3 strains by two kinds of Rep-PCR. This result indicate that the genotype of serovar O3 and O1 are closely related.

Keywords: *Vibrio Parahaemolyticus*, Repetitive extragenic palindromic elements-PCR, Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences-PCR, Typing, Genetic relationship

副溶血性弧菌(*Vibrio Parahaemolyticus*)是一种嗜盐性革兰氏阴性细菌。该菌可引发食物中毒,导致严重的肠胃炎^[1]。近年来的报道显示,副溶血性弧菌引发食物中毒的规模及人群暴露规模呈明显上升趋势,已超过沙门氏菌食物中毒,成为一种严重的食源性病原菌^[2]。2005年沈阳疾病预防控制中心对沈阳地区夏季引起腹泻的病源菌进行检测,表明副溶血性弧菌占据细菌性腹泻的首位^[3],引起相关部门的重视。副溶血性弧菌细致的分子分型研究及菌株间亲缘关系的探讨可为该菌的预防、控制、流行病学调查、协助追踪感染源等工作提供重要理论依据。重复序列-PCR(rep-PCR)是以细菌DNA中串联重复序列为引物,对细菌基因组DNA进行扩增,得到指纹图谱并进行分析。该技术实用性强、费用低、可再现性好,已在多种病原菌的鉴定、分类、分型上得到广泛应用^[4]。WONG HC等研究评价了rep-PCR对副溶血性弧菌的分型方法,其分型能力与脉冲场凝胶电泳方法(PAGE)相当,优于核糖体方法,但其简捷性和实用性是PAGE方法所无可比拟的^[5]。近年来, Gomez-Gil B^[6]和Maluping R P^[7]使用rep-PCR方法对副溶血性弧菌的鉴定和分型进行了研究,均获得了良好的研究结果。

目前,国内对副溶血性弧菌分型研究的报道较少,常用方法是血清分型,但血清分型能力有限,只能对64%左右的副溶血性弧菌进行分型^[8]。国内尚未见应用rep-PCR技术对副溶血性弧菌进行分子分型研究的文献报道。本研究利用基因外重复回文序列-PCR(Repetitive Extragenic Palindromic-PCR, REP-PCR)和肠细菌基因间共有重复序列-PCR(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR, ERIC-PCR)两种rep-PCR技术,对2005年分离于沈阳地区腹泻患者的副溶血性弧菌分离株进行分子分型研究。研究结果可弥补血清分型率偏低的不足,为副溶血性弧菌流行病学研究、疾病预防和控制提供依据。

1 材料和方法

1.1 菌株

40株副溶血性弧菌分离株是2005年沈阳市疾

病控制中心从沈阳地区各大医院腹泻患者粪便中分离,经生化鉴定和血清分群,菌号1~10血清分群为O1群,菌号11~33血清分群为O3群,菌号34~39血清分群为O4群,菌号40血清分群为O5群。

1.2 副溶血弧菌 DNA 的提取

采用实验室常规的酚-氯仿法提取副溶血性弧菌基因组DNA^[9]。

1.3 PCR 引物及反应条件

REP-PCR和ERIC-PCR引物由TaKaRa生物工程有限公司合成,引物序列分别为:REP 1:5'-IIICGICGICATCIGGC-3', REP 2:5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3';ERIC-1:5'-ATGTAAGCTCCTGGG GATTAC-3', ERIC-2:5'-AAGTAAGTGACTGGG GTGA GCG-3'。PCR反应体系的组成和反应条件依据Versalovic等(1991)的方法进行^[10]。

1.4 PCR 反应产物分析

PCR扩增产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离、EB染色、3 V/cm条件下电泳3 h,电泳结果在全自动凝胶成像分析系统上照相。

1.5 图谱的相似度分析

通过Dolphin计算机软件计算出每条DNA扩增带的分子量,比较电泳中稳定出现的条带,再根据相似性计算公式 $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ (N_{xy} 为两个菌株之间共同拥有的DNA扩增带数量, N_x 和 N_y 是指每个菌株拥有DNA扩增带的数量)算出遗传距离列出矩阵图。再通过SPSS10.0软件分析电泳结果,用系统聚类分析法中的组内聚类法,菌株间的同类系相关性采用欧式距离的平方,依据不同的聚类标准(距离)对各菌株进行聚类,获得聚类树状图。根据欧式距离的平方(相异度)的大小,把不同的指纹图谱分成不同的型,最终使用Hunter和Gaston的方法计算出两种分型方法的区分能力^[11]。

2 结果

2.1 副溶血性弧菌分离株重复序列-PCR 扩增结果

在REP-PCR和ERIC-PCR扩增图谱中,40株副溶血性弧菌基因组DNA扩增条带呈现不同程度的多态性,相同血清群的菌株可扩增产生不同的指纹图谱(图1,2)。

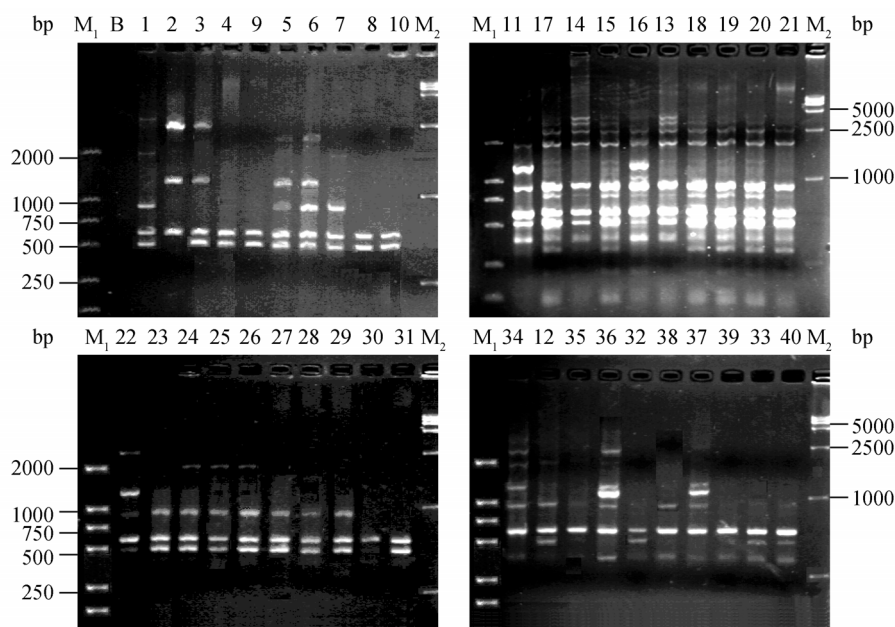


图 1 副溶血性弧菌的 REP-PCR 指纹图谱

Fig.1 REP-PCR fingerprint of *Vibrio Parahaemolyticus*
M1: DL-2000; M2: DL-15000; 1-40: *Vibrio Parahaemolyticus*; B: Blank

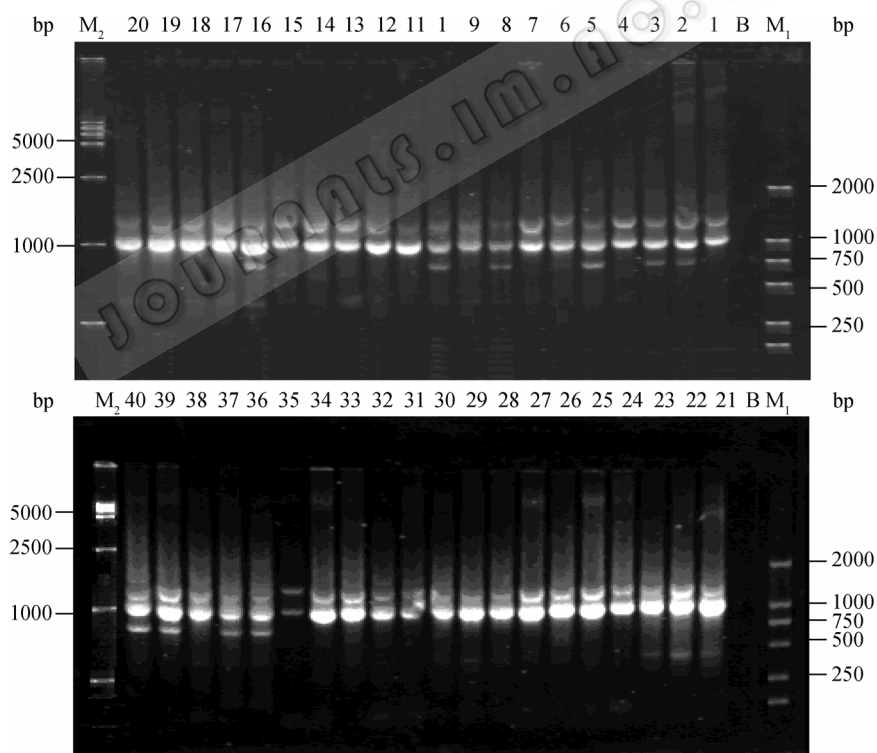


图 2 副溶血性弧菌的 ERIC-PCR 指纹图谱

Fig.2 ERIC-PCR fingerprint of *Vibrio Parahaemolyticus*
M1: DL-2000; M2: DL-15000; 1-40: *Vibrio Parahaemolyticus*; B: Blank

通过视觉比较(Vc), REP-PCR 指纹图谱可将 40 株副溶血性弧菌分为 A~P 16 个型(表 1)。在 REP-PCR 扩增后的 DNA 指纹图谱中, 血清型 O1 群

与血清型 O3 群的菌株主条带非常相似, 大部分菌株都有 500 bp、600 bp、900 bp 这 3 条带(图 1)。

ERIC-PCR 扩增产生的条带较 REP-PCR 产生的条带

较少, 视觉比较可将 40 株副溶血性弧菌分为 A、B、C、D 4 个型(表 1)。在 ERIC-PCR 扩增后的 DNA 指纹图谱中, 血清型 O1 群与血清型 O3 群的菌株图谱更为相似, 大部分菌株只有 1000 bp 和 1400 bp 2 条扩增带(图 2)。

使用 Hunter 和 Gaston 的方法计算两种分型方法

的区分能力, REP-PCR 分辨力指数为 0.953, ERIC-PCR 分辨力指数为 0.5。

2.2 副溶血性弧菌聚类分析结果

通过 SPSS10.0 软件分析电泳结果, 得到聚类树状图(图 3,4)。可以根据欧式距离的平方(相异度)的大小, 把不同的指纹图谱分成不同的型, 在

表 1 40 株副溶血性弧菌重复序列-PCR 指纹图谱分型结果									
Table 1 Typing of 40 <i>Vibrio Parahaemolyticus</i> by repetitive element sequence-based PCR									
菌株编号 No. of strains	REP-视觉比较 REP-V _c	REP-型 REP-type	ERIC-型 ERIC-type	血清型 Serotype	菌株编号 No. of strains	REP-视觉比较 REP-V _c	REP-型 REP-type ₁	ERIC-型 ERIC-type	血清型 Serotype
34	A	A1	D	O4	14	G	G2	D	O3
36	A	A1	A	O4	16	H	H	A	O3
37	A	A2	A	O4	7	I	I	D	O1
35	B	B	D	O4	28	I	I	D	O3
38	B	B	D	O4	29	I	I	D	O3
5	C	C1	A	O1	24	J	J1	D	O3
6	C	C1	D	O1	25	J	J1	D	O3
22	C	C1	C	O3	26	J	J1	D	O3
3	C	C2	A	O1	27	J	J1	D	O3
2	D	D	A	O1	1	J	J2	D	O1
11	E	E1	D	O3	4	K	K	D	O1
12	E	E2	D	O3	23	L	L	C	O3
40	F	F	B	O5	32	M	M	D	O3
15	G	G1	D	O3	33	M	M	D	O3
17	G	G1	D	O3	8	N	N	A	O1
18	G	G1	D	O3	9	N	N	D	O1
19	G	G1	D	O3	10	N	N	A	O1
20	G	G1	D	O3	31	N	N	D	O3
21	G	G1	C	O3	30	O	O	D	O3
13	G	G2	D	O3	39	P	P	A	O4

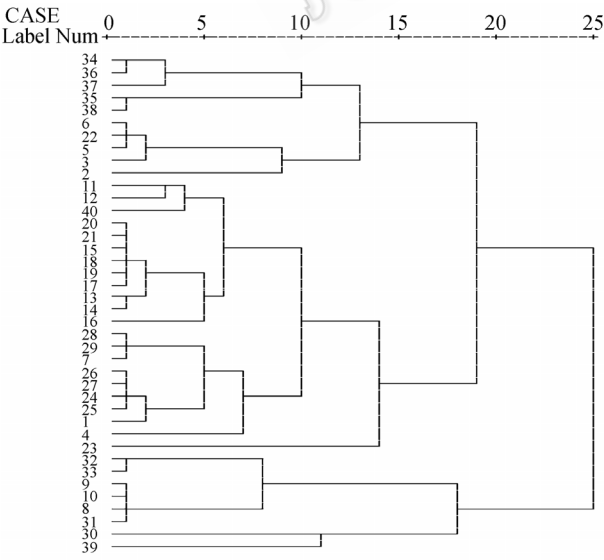


图3 40株副溶血性弧菌 REP-PCR 指纹图谱亲缘关系树状图

Fig.3 REP-PCR Dendrogram of 40 strains of *Vibrio Parahaemolyticus*

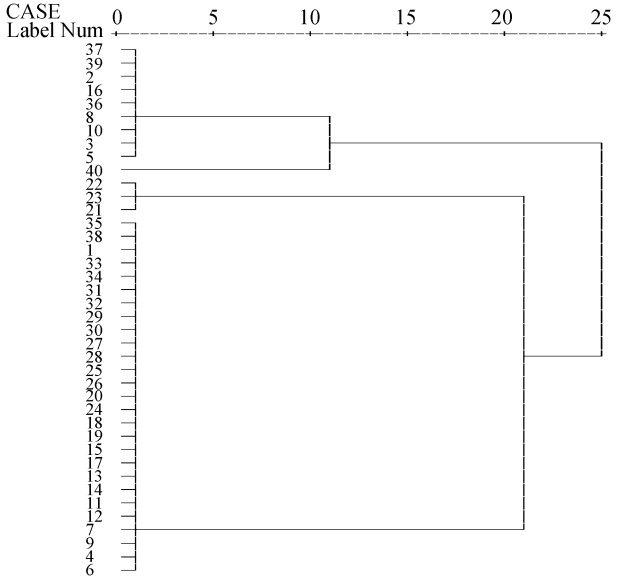


图4 40株副溶血性弧菌 ERIC-PCR 指纹图谱亲缘关系树状图

Fig.4 ERIC-PCR Dendrogram of 40 strains of *Vibrio Parahaemolyticus*

REP-PCR 树状图结果中, 40 株副溶血性弧菌分为 21 个型, 优势型为 G1 型, 占菌株数量的 15%(表 1)。在 ERIC-PCR 树状图结果中, 40 株副溶血性弧菌分型结果与视觉分型结果相同, 分为 A、B、C、D 4 个型, 其中 D 型占菌株总数的 67.5%, 是优势型(表 1)。

3 讨论

3.1 副溶血性弧菌 rep-PCR 分子分型研究的结果分析

本研究首次利用 REP-PCR 和 ERIC-PCR 方法对中国沈阳地区副溶血弧菌临床分离株进行分型研究。扩增结果显示, 这两种方法可以对副溶血性弧菌分离株基因组 DNA 进行扩增, 并可得到清晰、可重复的 DNA 电泳条带。在这两种分型方法中, 使用 REP-PCR 方法对 40 株副溶血性弧菌分离株的基因组 DNA 扩增出的条带明显多于 ERIC-PCR 方法扩增出的带, 通过使用 Hunter 和 Gaston 的方法可以计算出 REP-PCR 方法分辨力指数高于 ERIC-PCR 方法, 表明 REP-PCR 方法对副溶血性弧菌具有更好的分型能力。在 REP-PCR 树状图结果中, 40 株副溶血性弧菌被分为 21 个型, 其中, 优势菌型为 G1 型, 占菌株总数的 15%。上述研究结果与 Maluping RP 报道的对菲律宾副溶血弧菌分离株的分型结果相似^[7], 进一步表明 Rep-PCR 分型方法对该类菌株分型是可行的。

从 rep-PCR 分型的聚类图(图 3, 4)可看出, REP-PCR 的分型结果与血清分型结果并不完全吻合, 相同血清型菌株间的遗传距离和相异度变化幅度很大。另外, 个别不同血清型菌株有时会被分成相同的 REP 型或遗传距离很近(<5), 这可能是由于表面抗原位点在环境压力下易发生突变、缺失等原因造成。因此, 在血清型检测中就会把原本亲缘关系比较近的菌株分成不同的型, 给食源性疾病流行病学调查和溯源带来困难。本研究结果表明, REP-PCR 分型的分辨率比血清分型要高, 如果能将分子分型和血清分型两种方法联用, 分辨率会更高, 对菌株的鉴定(流行株与非流行株)也会更准确。

副溶血性弧菌的致病性源于溶血性毒素、尿素酶、黏附因子和侵袭力^[12]。耐热溶血素(TDH)和耐热相关溶血素(TRH)是主要致病因子。副溶血性弧菌在我萁氏培养基上的溶血现象被称为神奈川现象

(Kanagawa Phenomenon, KP)^[13]。本研究所用 40 株副溶血性弧菌分离株全部是致病菌, 通过沈阳市疾病预防控制中心鉴定它们都产生神奈川现象。40 株副溶血性弧菌的 REP-PCR 指纹图谱都含有 600bp 条带, ERIC-PCR 指纹图谱中都有 1000bp 条带, 这两条带所携带的遗传信息与副溶血性弧菌的致病相关性值得进一步探讨。

3.2 副溶血性弧菌血清型的推移变化和亲缘关系的初步探讨

80 年代对我国收集的副溶血性弧菌菌株所做的调查显示, 血清型主要以 O1 群和 O4 群为主^[14]。但近年来, 在引起我国食物中毒的副溶血弧菌菌株中, O3 群成为常见中毒株, 且无明显地域差异^[3]。2005 年 6~9 月沈阳市疾病预防控制中心对沈阳地区副溶血性弧菌分布进行调查的结果也显示, 引起食物中毒的主要是 O3 血清群, 占 60.47%(26/43), 是主要的致病血清群; 其次是 O1 群, 占 23.26%(10/43)^[3]。2000~2002 年杭州地区副溶血性弧菌的临床分离株也以 O3 型为主, 占 84.6%^[15]。这与日本、印度、韩国的血清分布情况相同, 均显示出分布最广最有优势的血清型由 O1 群和 O4 群转变为 O3 群^[16]。通过本研究获得的 REP-PCR 和 ERIC-PCR DNA 指纹图谱发现, 血清型 O1 群与血清型 O3 群的菌株主条带非常相似, 并且血清型 O1 群的菌株 7 与血清型 O3 群的菌株 28、29, 血清型 O1 群的菌株 9 与血清型 O3 群的菌株 31, 血清型 O1 群的菌株 1 与血清型 O3 群的菌株 24、25、26、27, 它们的 ERIC-PCR 扩增后的 DNA 指纹图谱中条带都是相同的。而在 REP-PCR 扩增后的 DNA 指纹图谱中, 血清型 O1 群的菌株 7 与血清型 O3 群的菌株 28、29, 血清型 O1 群的菌株 9 与血清型 O3 群的菌株 31 是相同的, 血清型 O1 群的菌株 1 与血清型 O3 群的菌株 24、25、26、27 条带也极为相似, 欧式距离的平方小于 5。上述结果表明当前流行的血清型 O3 群菌株与血清型 O1 群菌株亲缘关系密切。

参考文献

- [1] Cheryl LT, Jayna SP, Nancy DP, *et al.* Identification of *Vibrio* Isolates by a Multiplex PCR Assay and *rpoB* Sequence Determination. *J Clin Microbiol*, 2007, **45**(1): 134-140.
- [2] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究. 中国食品卫生杂

- 志, 2004, **16** (1): 3-9.
- [3] 董雪, 李继耀, 王冰, 等. 沈阳地区 2005 年腹泻患者副溶血弧菌分离株的血清分群. 中国卫生检验杂志, 2006, **16**(6): 707-708.
- [4] 傅小红, 徐景野, 金小霞, 等. 一起由副溶血性弧菌和嗜水气单胞菌混合感染引起的食物中毒. 中国卫生检验, 2001, **11**(3): 3821.
- [5] WONG HC, LIN CH. Evaluation of Typing of *Vibrio parahaemolyticus* by Three PCR Methods Using Specific Primers. *J Clin Microbiol*, 2001, **39**(12): 4233-4240.
- [6] Gomez-Gil B, Fajer-Avila E, García-Vargas F. Vibrios of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869 from northwestern Mexico. *J Appl Microbiol*, 2007, **102**(6): 1518-1526.
- [7] Maluping RP, Ravelo C, Lavilla-Pitogo CR, *et al*. Molecular typing of *vibrio parahaemolyticus* strains isolated from the Philippines by PCR-based methods. *J Applied Microbiol*, 2005, **39**(12): 383-391.
- [8] 李雪, 金莉莉, 王秋雨. 病原微生物分子分型技术研究进展. 中国公共卫生, 2007, **23**(3): 373-374.
- [9] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2003, pp.486-487.
- [10] Versalovic J, Koeuth T, Jupski JR. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 1991, **19**(24): 6823-6831.
- [11] 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**(11): 2465-2466.
- [12] Shiral H, Falkow S, Tompkins LS, *et al*. Sequence of a cloned PR72H fragment and its use for detection of *vibrio parahaemolyticus* with the PCR. *Infection and Immunity*, 1990, **58**(11): 3568.
- [13] Nishibuchi M, James BK. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infection and Immunity*, 1995, **63**(6): 2093-2099.
- [14] 潘幸福. 舟山群岛海产品和外环境副溶血性弧菌带菌调查及血清分型. 中华流行病学杂志, 1990, **11**(5): 299-311.
- [15] 张蔚, 潘劲草, 孟冬梅, 等. 杭州地区 2000-2002 年副溶血弧菌的分子分型研究. 中华流行病学杂志, 2006, **27**(4): 343-346.
- [16] Wong HC, Liu CC, Pan TM, *et al*. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates, obtained from patients involved in food poisoning outbreaks in Taiwan, by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**(6): 1809-1812.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学各分支学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 最好包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势。即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。