

两株对虾幼体弧菌病病原的分离和鉴定

温崇庆^{1,2} 薛明¹ 何红³ 周世宁^{2*}

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524088)

(2. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室 广州 510275)

(3. 广东海洋大学农学院 湛江 524088)

摘要: 从患弧菌病的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)幼体中分离到两株病原菌 zouA 和 zouB, 常规形态和生理生化试验表明均为弧菌属菌种, 弧菌编码鉴定系统分别鉴定为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)。副溶血弧菌 R72H 序列检测结果进一步证实菌株 zouB 为副溶血弧菌。对菌株 zouA 的 16S rRNA 基因序列分析表明该菌株与溶藻弧菌、副溶血弧菌等弧菌的相似性均高于 98%, 相互间不能区分; HSP60 基因序列分析表明该菌株与溶藻弧菌相似性达 98%以上, 而与所有其它弧菌的相似性不到 92%。结合表型和分子特征的鉴定结果, 菌株 zouA 和 zouB 分别被鉴定为溶藻弧菌和副溶血弧菌。

关键词: 副溶血弧菌, 溶藻弧菌, R72H 序列, 16S rRNA 基因, HSP60 基因, 鉴定

Isolation and Identification of Two Pathogenic Strains Associated with Vibriosis of Shrimp Larvae

WEN Chong-Qing^{1,2} XUE Ming¹ HE Hong³ ZHOU Shi-Ning^{2*}

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088)

(2. State Key Laboratory for Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275)

(3. Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088)

Abstract: Two pathogenic strains zouA and zouB were isolated from *Litopenaeus vannamei* larvae which suffered from vibriosis, and were identified as *Vibrio alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* by traditional bacterial identification method respectively. Strain zouB was confirmed further as *V. parahaemolyticus* by special R72H sequence test. 16S rRNA and heat shock protein (HSP60) genes partial sequences of strain zouA were determined. Phylogenetic tree of vibrios based on 16S rRNA gene sequences revealed that there was more than 98% sequence identity among zouA, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, et al., and could not be distinguished between each other. HSP60 gene sequences showed that strain zouA had sequence identity of more than 98% to *V. alginolyticus*, whereas had less than 92% to that of all the other vibrios. Combining phenotypic and molecular characters, zouA and zouB were identified as *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* respectively.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, R72H sequence, 16S rRNA gene, HSP60 gene, Identification.

弧菌是近海特别是海水养殖环境中最常见的优势细菌类群之一, 其中的一些种不仅是人类也是海水养殖动物最常见的病原菌^[1]。对于这些细菌的鉴定, 目前多采用以生理生化特征为主的表型鉴定方法, 但表型方法不仅相对耗时、其准确性也常受到质疑。随着分子生物学的发展, 现代细菌分类鉴定已从传统的表型方法进入基因型方法。目前, 16S rRNA 基因序列分析已成为细菌分类鉴定中最常用的分子方法, 但对一些亲缘关系紧密的细菌难以用此方法有效区分, 还需借助其它基因型方法。R72H 序列只在副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中存在, 可用于副溶血弧菌的特异性检测^[2, 3]。HSP60 基因是高度保守的管家蛋白—分子伴侣蛋白编码基因, 几乎在所有细菌基因组中均以单拷贝存在, 且其进化速度相对 16S rRNA 基因更快, 是一种适于近缘关系细菌间系统发育分析的分子标记, 目前已用于弧菌属(*Vibrio*)^[4]、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)^[5]、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)^[6]等的分类和鉴定。

弧菌病主要是由弧菌属细菌引起的一类细菌性疾病, 该病在全世界范围内广泛发生, 其发病率高、危害大, 是海水养殖动物病害研究的主要领域之一^[1]。对虾育苗期经常由于弧菌病导致幼体特别是蚤状期及其后期的幼体大量死亡^[7]。已报道的相关病原主要包括哈氏弧菌(*V. harveyi*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)和副溶血弧菌等^[7-9]。本研究主要结合表型和基因型方法对两株凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)幼体弧菌病原进行了鉴定, 以期对对虾育苗期弧菌病的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基和试剂盒

菌株 zouA、zouB 分别是广东省湛江市两个对虾育苗场大批濒死凡纳滨对虾蚤状Ⅱ期幼体中分离得到的代表株, 通过浸浴感染试验已证实两菌株对相应的幼体或仔虾均具有较强的致病性, 并表现典型的弧菌病症状。

2216E海水培养基: 蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, FePO₄ 0.01g, 固体加琼脂粉 15 g, 陈海水定容到 1000 mL, pH 7.6-7.8; TCBS琼脂培养基和生理生化微量鉴定管为北京陆桥公司产品。

细菌 DNA 提取试剂盒 EZNA Bacterial DNA Kit 和 PCR 产物纯化试剂盒 EZNA Cycle-Pure Kit 为

Omega 公司产品; Taq DNA 聚合酶和 pMD18-T Vector 为 TaKaRa 公司产品。

1.2 病原菌的分离

参考Vandenbergh等^[9]方法稍做改变, 即从不同虾苗池取症状典型的濒死蚤状Ⅱ期幼体 10~15 只, 无菌海水漂洗 3 次后, 转入含无菌海水的试管中, 旋涡混合器上剧烈混合后, 取梯度稀释液涂布 2216E海水平板, 30℃培养, 选择典型特征单菌落纯化后保存。

1.3 病原菌鉴定

1.3.1 常规鉴定: 根据主要形态和生理生化特征将两株代表菌鉴定到属^[8, 10], 并根据中科院微生物研究所弧菌编码鉴定数据库(<http://micronet.im.ac.cn/database/hujun/index.html>)方法进行编码鉴定。

1.3.2 R72H序列检测: 细菌基因组提取按EZNA Bacterial DNA Kit说明书进行。副溶血弧菌R72H序列特异性引物(VP33, 5'-TGCGAATTCGATAGG GTGTAAACC-3' 和 VP32 5'-CGAATCCTTGAAC ATACGCAGC-3') 和PCR扩增程序(94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min)参考Lee等人的方法^[2]进行。

1.3.3 菌株 zouA 的 16S rRNA 和 HSP60 基因序列分析: 细菌 16S rRNA 基因引物为 27F, 5'-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R, 5'-GGTTAC CTTGTTACGACTT-3'。PCR 扩增程序为 94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 54℃ 40 s, 72℃ 1 min30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。目的PCR产物用EZNA Cycle-Pure Kit纯化后交上海生工公司完成测序。

HSP60 基因简并引物(H60F: 5'-GGNGAYGG NACNACNACNGCNACNGT-3', H60R: 5'-TCNC CRAAN CCNGGNGCYTTNACN GC-3')及PCR扩增程序(94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。)按Jian等^[6]人的方法进行。目的PCR产物用EZNA Cycle-Pure Kit纯化后连接 pMD18-T Vector, CaCl₂法转化*Escherichia coli* DH5 感受态细胞, 选择阳性转化子, 交上海生工公司完成测序。

将测序得到的 16S rRNA基因序列和HSP60 基因序列分别与GenBank中核酸数据进行Blast分析, 选取已正式发表且同源性最高的比对序列, 并从GenBank中获取几种常见模式弧菌的 16S rRNA和 HSP60 基因序列, 采用MEGA3.1 软件进行序列比

对和聚类分析^[11], Neighbor joining法分别构建 16S rRNA和HSP60 基因系统发育树。

2 结果

2.1 病原菌的分离

最初自两个对虾育苗场分别分离到来自不同苗池的 3 株和 4 株纯培养物。同一育苗场分离的各菌株在 2216E 海水平板和 TCBS 平板上均表现一致的菌落特征,但不同育苗场分离物间的菌落特征有明显差异。因此选择来自不同育苗场编号分别为 zouA 和 zouB 的两个代表菌株作进一步研究。

2.2 病原菌的鉴定

2.2.1 病原菌的形态和生理生化特征: zouA 和 zouB 两菌株的个体形态特征相似:均为革兰氏染色阴性,短杆状,分散排列,可运动,大小 $0.5\ \mu\text{m}\sim 0.8\ \mu\text{m}\times 0.8\ \mu\text{m}\sim 2\ \mu\text{m}$ 。zouA 在 2216E 海水平板 30 培养 1d 的菌落呈蔓延型,大小不定,边缘不规则,光滑、湿润、不透明、浅黄色;zouB 菌落呈圆形,边缘圆整,

直径 1 mm~3 mm,光滑、湿润、不透明、浅黄色。TCBS 平板 30 培养 1 d 的 zouA 菌落呈圆形,直径 3 mm~5 mm,边缘较圆整,中间土黄色、光滑、湿润,周围淡灰黄色、细颗粒状;zouB 菌落呈圆形,直径 1.5 mm~2 mm,边缘圆整,表面较湿润、细颗粒状,草绿色。

根据 zouA 和 zouB 兼性厌氧、发酵葡萄糖产酸不产气、氧化酶和接触酶阳性、对弧菌抑制剂 O/129(2,4-二氨基-6,7-二异丙基喋啶磷酸盐, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)敏感等特征,两菌株均归为弧菌属菌种。两菌株所有测定的生理生化试验结果除鸟氨酸脱羧酶和蔗糖发酵外均一致,结果见表 1。

将上述相应测试结果输入弧菌编码鉴定数据库, zouA 鉴定结果为溶藻弧菌(相似性 99.9%)或副溶血弧菌(相似性 0.1%); zouB 鉴定结果为副溶血弧菌(相似性 65%)或溶藻弧菌(相似性 35%),根据相似性大小, zouA 和 zouB 分别初步被鉴定为溶藻弧菌和副溶血弧菌。

表 1 菌株 zouA 和 zouB 的生理生化特征
Table 1 The physiological and biochemical characteristics of strains zouA and zouB

试验项目(Test items)	zouA	zouB	试验项目(Test items)	zouA	zouB
氧化酶(Oxidase)	+	+	柠檬酸盐利用(Citrate utilization)	-	-
接触酶(Catalase)	+	+	丙二酸盐利用(Propionate utilization)	-	-
O/129 敏感性(O/129 sensitivity)	+	+	葡萄糖发酵 (Glucose fermentation)	+	+
葡萄糖产气(Gas from glucose)	-	-	甘露醇发酵(Mannitol fermentation)	+	+
鸟氨酸脱羧酶(Ornithine decarboxylase)	+	-	阿拉伯糖发酵(Arabinose fermentation)	-	-
赖氨酸脱羧酶(Lysine decarboxylase)	+	+	蔗糖发酵(Sucrose fermentation)	+	-
精氨酸双水解酶(Arginine dihydrolase)	-	-	绵子糖发酵(Raffinose fermentation)	-	-
硝酸盐还原(Nitrate reduction)	+	+	鼠李糖发酵(Rhamnose fermentation)	-	-
淀粉酶(Amylase)	+	+	肌醇发酵 (Inositol fermentation)	-	-
明胶酶(Gelatinase)	+	+	侧金盏花醇发酵(Adonitol fermentation)	-	-
几丁质酶(Chitinase)	+	+	水杨苷发酵(Salicin fermentation)	-	-
脲素酶(Urease)	-	-	山梨醇发酵(Sorbic alcohol fermentation)	-	-
苯丙氨酸脱氨酶(Phenylalanine deaminase)	+	+	0% NaCl 生长(Growth under 0% NaCl)	-	-
β -半乳糖苷酶(β -Galactosidase)	-	-	2%、5%、7% NaCl 生长(Growth under 2%, 5% and 7% NaCl)	+	+
硫化氢产生(H_2S production)	-	-	10% NaCl 生长(Growth under 10% NaCl)	-	-
吲哚产生(Indole production)	-	-	4℃ 生长(Growth at 4℃)	-	-
V.P.反应(V.P. reaction)	-	-	20℃、30℃、40℃ 生长(Growth at 20℃, 30℃ and 40℃)	+	+
吲哚丙酮酸(Indole pyruvic acid)	+	+	45℃ 生长(Growth at 45℃)	-	-

“+”: 阳性; “-”: 阴性 “+”: Positive; “-”: Negative

2.2.2 R72H 序列检测: R72H 序列对 *zouA*、*zouB* 基因组 PCR 扩增结果见图 1。*zouA* 和对照均无特异带出现, 而 *zouB* 在 400 bp 左右有一特异带, 并与副溶血弧菌特异的 R72H 序列大小相符合。据此可进一步确定 *zouB* 为副溶血弧菌, 同时排除了 *zouA* 是副溶血弧菌的可能性。

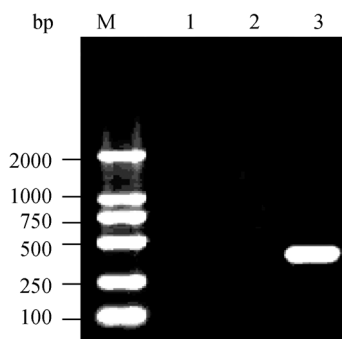


图 1 PCR 扩增 R72H 序列产物

Fig.1 PCR amplified products of R72H sequence

M: Marker; 1、2、3 :分别为对照、菌株 *zouA* 和 *zouB* 的 R72H 序列 PCR 扩增产物

M: Marker; 1、2、3 :PCR products of R72H sequence amplified in control, strains *zouA* and *zouB* respectively

2.2.3 菌株 *zouA* 的 16S rRNA 基因序列分析: *zouA* 的 16S rRNA 基因扩增产物电泳结果如图 2 右带, 测得序列长度为 1417 bp, GenBank 登录号为 DQ173157。NCBI Blast 分析表明 *zouA* 的 16S rRNA 基因序列与溶藻弧菌、副溶血弧菌、哈氏弧菌、坎氏弧菌(*V. campbellii*)、需钠弧菌(*V. natriegens*)和海弧菌(*V. pelagius*)等的同源性均在 98% 以上, 相互间难以区分。*zouA* 与 3 种模式弧菌—溶藻弧菌

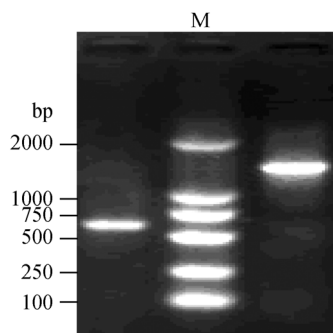


图 2 菌株 *zouA* 的 16S rRNA(右带)和 HSP60(左带)基因 PCR 扩增产物

Fig.2 PCR amplified products of 16S rRNA gene (right band) and HSP60 gene (left band) of strain *zouA*

M: marker

ATCC17749^T、副溶血弧菌 ATCC17802^T 和哈氏弧菌 ATCC35084^T 的 16S rRNA 基因序列比较如图 3。系统发育树 (图 4) 也表明 *zouA* 与上述弧菌聚为亲缘关系紧密的一大类群, 而与霍乱弧菌(*V. cholerae*)等的亲缘关系相对较远。

2.2.4 菌株 *zouA* 的 HSP60 基因序列分析: *zouA* 的 HSP60 基因扩增产物电泳结果如图 2 左带, 测得序列去除引物后长度为 541 bp, GenBank 登录号为 DQ991134。Blast 分析结果表明 *zouA* 的 HSP60 基因序列与包括模式菌株在内的几株溶藻弧菌最为接近, 相似性均为 98% 以上, 而与所有其它弧菌相似性均不到 92%。*zouA* 与溶藻弧菌、副溶血弧菌和哈氏弧菌模式菌株的 HSP60 基因序列比较如图 5。HSP60 基因系统发育树 (图 6) 上 *zouA* 也与溶藻弧菌紧密聚集为一个分支, 而与其它弧菌能明显区分。综合上述形态、生理生化特征、16S rRNA 和 HSP60 基因序列分析结果, 可将菌株 *zouA* 鉴定为溶藻弧菌。

3 讨论

李军等^[8]对中国对虾(*Penaeus chinensis*)幼体细菌性暴发病的研究表明引起溞状幼体大批死亡的病原为哈氏弧菌。本研究通过表型和分子特征对两个不同育苗场凡纳滨对虾溞状期幼体弧菌病原分别鉴定为溶藻弧菌和副溶血弧菌。这两种弧菌均是海水特别是近岸养殖海水中较常见的优势弧菌, 也是对虾育苗期较常见的病原弧菌^[7-9]。对虾育苗期弧菌病原的种类是由水体环境、弧菌致病力和对虾幼体发育期及其免疫力等相互作用决定的, 在特定的环境和时期具有相对稳定的病原种类。如 Vandenberghe 等^[9]对厄瓜多尔凡纳滨对虾育苗场的研究表明, 溶藻弧菌作为优势弧菌存在于凡纳滨对虾幼体各阶段, 特别存在于无节期和溞状期健康幼体上, 但在仔虾期更多见于患病个体上。

细菌鉴定中的生理生化测试结果与模式菌株常有一定差异, 对许多细菌难以准确鉴定, 如常用于弧菌鉴定的 API 系统区分副溶血弧菌和溶藻弧菌的唯一生化特征是蔗糖发酵反应, 但也有一些菌株特别是非临床来源的副溶血弧菌和溶藻弧菌的蔗糖发酵反应分别是阳性和阴性, 与模式菌株相反^[3]。16S rRNA 基因序列分析能有效区分细菌属及属以上的

Strain zouA AACGAGTTATCT	12
<i>V.alginolyticus</i>	ATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGACGGCTAACACATGCAAGTCGACCGGAAACGAGTTATCT	80
<i>V.parahaemolyticus</i>	ATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGACGGCTAACACATGCAAGTCGACCGGAAACGAGTTATCT	80
<i>V.harveyi</i> GAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGACGGCTAACACATGCAAGTCGACCGGAAACGAGTTATCT	74
Strain zouA	GAACCTTCGGGGACGATAACGGCGTCTACGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTCGCCGTGATGTGGGGGATAA	92
<i>V.alginolyticus</i>	GAACCTTCGGGGACGATAACGGCGTCTACGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTCGCCGTGATGTGGGGGATAA	160
<i>V.parahaemolyticus</i>	GAACCTTCGGGGACGATAACGGCGTCTACGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTCGCCGTGATGTGGGGGATAA	160
<i>V.harveyi</i>	GAACCTTCGGGGACGATAACGGCGTCTACGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTCGCCGTGATGTGGGGGATAA	154
Strain zouA	CCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCTACCGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATG	172
<i>V.alginolyticus</i>	CCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCTACCGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATG	240
<i>V.parahaemolyticus</i>	CCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCTACCGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATG	240
<i>V.harveyi</i>	CCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCTACCGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATG	234
Strain zouA	CCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC	252
<i>V.alginolyticus</i>	CCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC	320
<i>V.parahaemolyticus</i>	CCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC	320
<i>V.harveyi</i>	CCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC	314
Strain zouA	ACACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC	332
<i>V.alginolyticus</i>	ACACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC	400
<i>V.parahaemolyticus</i>	ACACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC	400
<i>V.harveyi</i>	ACACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC	394
Strain zouA	AGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTG	412
<i>V.alginolyticus</i>	AGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTG	480
<i>V.parahaemolyticus</i>	AGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTG	480
<i>V.harveyi</i>	AGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTG	474
Strain zouA	CATATTGACGTTAGCGACAGAGAAGACCGGCTAAGCTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGGAGGGTGGGAGCGTT	492
<i>V.alginolyticus</i>	CATATTGACGTTAGCGACAGAGAAGACCGGCTAAGCTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGGAGGGTGGGAGCGTT	560
<i>V.parahaemolyticus</i>	CATATTGACGTTAGCGACAGAGAAGACCGGCTAAGCTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGGAGGGTGGGAGCGTT	560
<i>V.harveyi</i>	CATATTGACGTTAGCGACAGAGAAGACCGGCTAAGCTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGGAGGGTGGGAGCGTT	554
Strain zouA	AATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATA	572
<i>V.alginolyticus</i>	AATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATA	640
<i>V.parahaemolyticus</i>	AATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATA	640
<i>V.harveyi</i>	AATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATA	634
Strain zouA	GCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGTGAATTTACAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAA	652
<i>V.alginolyticus</i>	GCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGTGAATTTACAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAA	720
<i>V.parahaemolyticus</i>	GCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGTGAATTTACAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAA	720
<i>V.harveyi</i>	GCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGTGAATTTACAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAA	714
Strain zouA	GGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTCGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGA	732
<i>V.alginolyticus</i>	GGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTCGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGA	800
<i>V.parahaemolyticus</i>	GGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTCGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGA	800
<i>V.harveyi</i>	GGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTCGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGA	794
Strain zouA	TACCTCGTGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTA	812
<i>V.alginolyticus</i>	TACCTCGTGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTA	880
<i>V.parahaemolyticus</i>	TACCTCGTGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTA	880
<i>V.harveyi</i>	TACCTCGTGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTA	874
Strain zouA	AGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGATTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGT	892
<i>V.alginolyticus</i>	AGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGATTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGT	960
<i>V.parahaemolyticus</i>	AGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGATTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGT	960
<i>V.harveyi</i>	AGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGATTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGT	954
Strain zouA	GGTTTAATTTCGATGCAACCGGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCG	972
<i>V.alginolyticus</i>	GGTTTAATTTCGATGCAACCGGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCG	1040
<i>V.parahaemolyticus</i>	GGTTTAATTTCGATGCAACCGGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCG	1040
<i>V.harveyi</i>	GGTTTAATTTCGATGCAACCGGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCG	1034
Strain zouA	GGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC	1052
<i>V.alginolyticus</i>	GGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC	1120
<i>V.parahaemolyticus</i>	GGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC	1120
<i>V.harveyi</i>	GGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC	1114
Strain zouA	CCTTATCCTTGTGTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCAGGAGACTGCCCGTGATAAACCCGAGGAAGGTGGGACGA	1132
<i>V.alginolyticus</i>	CCTTATCCTTGTGTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCAGGAGACTGCCCGTGATAAACCCGAGGAAGGTGGGACGA	1200
<i>V.parahaemolyticus</i>	CCTTATCCTTGTGTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCAGGAGACTGCCCGTGATAAACCCGAGGAAGGTGGGACGA	1200
<i>V.harveyi</i>	CCTTATCCTTGTGTGCCAGCGACTTCGGGTGGGAACCTCAGGAGACTGCCCGTGATAAACCCGAGGAAGGTGGGACGA	1193
Strain zouA	CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGCATACAGAGGGCGGCCAATTCGGAAA	1212
<i>V.alginolyticus</i>	CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGCATACAGAGGGCGGCCAATTCGGAAA	1280
<i>V.parahaemolyticus</i>	CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGCATACAGAGGGCGGCCAATTCGGAAA	1280
<i>V.harveyi</i>	CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGCATACAGAGGGCGGCCAATTCGGGAA	1173
Strain zouA	GTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA	1291
<i>V.alginolyticus</i>	GTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA	1360
<i>V.parahaemolyticus</i>	GTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA	1360
<i>V.harveyi</i>	GTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA	1353
Strain zouA	CGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTGTACACCCGCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAA	1369
<i>V.alginolyticus</i>	CGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTGTACACCCGCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAA	1440
<i>V.parahaemolyticus</i>	CGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTGTACACCCGCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAA	1440
<i>V.harveyi</i>	CGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTGTACACCCGCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAA	1433
Strain zouA	.. AGTAG TAGTTT .. ACCTTCGGGGACGCTACCACTTGTGGTCATGACTGG	1417
<i>V.alginolyticus</i>	GAAGTAGGTAGTTTCAACTACGGGAGGA ..	1468
<i>V.parahaemolyticus</i>	GAAGTAGGTAGTTTCAACTACGGGAGGAC ..	1471
<i>V.harveyi</i>	GAAGTAGGTAGTTTCAACTTCGGGGACGCTT ..	1465

图3 菌株 zouA 与 3 种模式弧菌的 16S rRNA 基因序列比较

Fig.3 The comparison of 16S rRNA gene sequences between strain zouA and three kinds of type vibrios

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

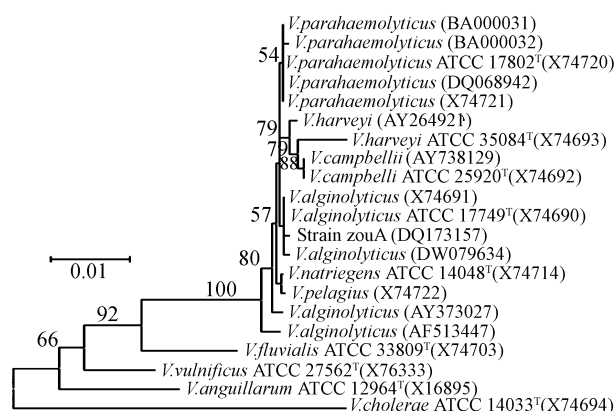


图4 菌株 *zouA* 的 16S rRNA 基因序列系统发育树(括号内为 GenBank 序列登录号)

Fig.4 Phylogenetic tree of strain *zouA* based on the 16S rRNA gene sequences (Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank)

分支旁的数字为 bootstrap 1000 次的置信度(%); 标尺表示 1%的核苷酸序列差异

Numbers near the branches are bootstrap probability values (%) with 1000 replicates; Scale bar corresponds to 1% difference in nucleotide sequence

分类单元, 然而许多亲缘较近的细菌种具有几乎相同的 16S rRNA 基因序列, 如溶藻弧菌、副溶血弧菌、哈氏弧菌等的 16S rRNA 基因序列间的同源性均在

98%以上^[4](图 3)。因此, 对这些细菌的准确鉴定还需引入其它分子特征。

Lee等^[2]最先报道R72H片段只特异存在于副溶血弧菌基因组中, 并将其用于副溶血弧菌的检测, 尽管对R72H片段的功能目前仍不清楚。Robert等^[3]进一步证实了R72H片段用于副溶血弧菌检测的特异性和准确性。因此可通过检测R72H片段对疑为副溶血弧菌的菌株进行快速、准确的甄别。

Goh等^[5]最先建议将HSP60基因序列作为微生物菌种鉴定的一种通用指标, 并将其用于葡萄球菌属的鉴定。Kwok等^[4]对15种共29株海洋弧菌部分HSP60基因序列分析表明, 弧菌种间HSP60基因序列相似性为71%~82%, 种内菌株间的相似性为96%~100%, 相对于16S rRNA基因序列和常规鉴定系统更适合于海洋弧菌的系统发育分析和鉴定。本研究对菌株*zouA*的鉴定结果也表明HSP60基因序列在海洋弧菌鉴定中的可靠性。当然也可根据目的和条件采用其它分子标记如16S-23S rDNA 间区序列^[12]、*gyrB*基因序列^[13]或综合多种分子标记的多位点序列分析(MLSA)^[14]等方法对弧菌等细菌进行分类和鉴定。

Strain <i>zouA</i> ACTAGCAATCTATCGTTAAGGAAGTCTAAAAGCAGTCGCGCGGGCATGAACCAATGGATCTTAAGC	71
<i>V. alginolyticus</i>	AGCAACGGTACTAGCAATCTATCGTTAAGGAAGTCTAAAAGCAGTCGCGCGGGCATGAACCAATGGATCTTAAGC	80
<i>V. parahaemolyticus</i>	AGCTACCGTACTAGGCAAGCAATCGTCAATGAAGTCTAAAAGCAGTTGCCGCGGGTATGAACCAATGGATCTTAAGC	80
<i>V. harveyi</i>	GGCAACTGTACTAGCGCAAGCAATCGTAAATGAAGTCTAAAAGCAGTTGCCGCGGGTATGAACCAATGGACCTTAAGC	80
Strain <i>zouA</i>	GTGGTTTCGACAAAGCTGTTGCCGCGGAGTTGAGCAACTAAAAGAGCTTTCTGTTGATGTAAACGACACAAAAGCGATC	151
<i>V. alginolyticus</i>	GTGGTTTCGACAAAGCTGTTGCCGCGGAGTTGAGCAACTAAAAGAGCTTTCTGTTGATGTAAACGACACAAAAGCGATC	160
<i>V. parahaemolyticus</i>	GCGGTATCGACAAAGCTGTTGCCGCGGAGTTGAGCAACTAAAAGAGCTGTTCTGTTGAGTGTAAACGACACAAAAGCAATC	160
<i>V. harveyi</i>	GCGGTATCGACAAAGCAAGTTATCGCAGCAGTTGAGCAACTAAAAGAGCTATCTGTTGAGTGTAAACGACACAAAAGCAATC	160
Strain <i>zouA</i>	GCGCAGGTTGGTACTATCTCTGCAAACTCAGACGCAAGCGTAGGTAATATCATTGCAGAAGCAATGGAGCGGTGGGGTCG	231
<i>V. alginolyticus</i>	GCGCAGGTTGGTACTATCTCTGCAAACTCAGACGCAAGCGTAGGTAATATCATTGCAGAAGCAATGGAGCGGTGGGGTCG	240
<i>V. parahaemolyticus</i>	GCTCAGGTGGTACTATCTCTGCAAACTCAGACGCAAGCGTAGGTAATATCATTGCAGCAATGGAGCGGTGGGGTCG	240
<i>V. harveyi</i>	GCACAGGTTGGTACTATCTCTGCAAACTCAGACGCAAGCGTAGGTAATATCATTGCAGCAATGGAGCAATGGAGCAATGGTTCG	240
Strain <i>zouA</i>	TGATGGCGTTATCACGGTTGAAGAAGGTCAGGCGCTACAAGACGAGTTAGACGTAGTGAAGGTATGCAGTTCGACCGCG	311
<i>V. alginolyticus</i>	TGATGGCGTTATCACGGTTGAAGAAGGTCAGGCGCTACAAGACGAGTTAGACGTAGTGAAGGTATGCAGTTCGACCGCG	320
<i>V. parahaemolyticus</i>	CGACGGTGTATCACTGTTGAAGAAGGTCAGGCTCTACAAACGAGCTGGACGTAGTGAAGGTATGCAGTTCGATCGCG	320
<i>V. harveyi</i>	CGACGGTGTATCACTGTTGAAGAAGGTCAGGCTCTACAAACGAGCTGAGCTAGATGTAGTGAAGGTATGCAGTTCGACCGCG	320
Strain <i>zouA</i>	GTTACCTGTCTCCTTACTTCATCAACAACCAAGAATCAGGCAAGTGTGATCTAGAAAACCCATTTCCTTCTAGTAGAC	391
<i>V. alginolyticus</i>	GTTACCTGTCTCCTTACTTCATCAACAACCAAGAATCAGGCAAGTGTGATCTAGAAAACCCATTTCCTTCTAGTAGAC	400
<i>V. parahaemolyticus</i>	GTTACCTATCTCCTTACTTCATCAACAACCAAGAAGCGGGCAGCGTTGAGCTAGAAAACCCATTTCCTTCTAGTAGAT	400
<i>V. harveyi</i>	GTTACCTATCTCCTTACTTCATCAACAACCAAGAAGCAGGTTCTGTTGATCTAGAAAACCCATTTCCTTCTAGTAGAT	400
Strain <i>zouA</i>	AAGAAGATCTCAACATTCGTGAGCTTCTTCCAACGCTAGAAGCTGTCGCGAAAGCATCTCGTCCACTGCTTATCATTCG	471
<i>V. alginolyticus</i>	AAGAAGATCTCAACATTCGTGAGCTTCTTCCAACGCTAGAAGCTGTCGCGAAAGCATCTCGTCCACTGCTTATCATTCG	480
<i>V. parahaemolyticus</i>	AAGAAGATCTCAACATTCGTGAGCTTCTTCCAACGCTAGAAGCAGTAGCAAAAGCTTCTCGTTCACTGCTGATCATTCG	480
<i>V. harveyi</i>	AAGAAAGTATCGAACATTCGTGAAGCTTCTTCCAGCACTAGAAGCAGTAGCAAAAGCATCTCGCCCACTACTTATCATTCG	480
Strain <i>zouA</i>	AGAAGATGTAGAAGGCGAAGCGCTAGCAACATTGGTTGTGAACAACATGCGTGGCATCGTAAAAGTTGCA.....	541
<i>V. alginolyticus</i>	AGAAGATGTAGAAGGCGAAGCGCTAGCAACATTGGTTGTGAACAACATGCGTGGCATCGTAAAAGTTGCGAGCTGTG	556
<i>V. parahaemolyticus</i>	AGAAGATGTAGAAGGCGAAGCTCTAGCAACATTGGTTGTGAACAACATGCGTGGCATCGTAAAAGTTGCTGCGGTT	556
<i>V. harveyi</i>	TGAAGACGTAGAAGGTGAAGCACTAGCAACATTGGTTGTGAACAACATGCGTGGCATCGTAAAAGTAGCAGCAGTG	556

图5 菌株 *zouA* 与 3 种模式弧菌的 HSP60 基因序列比较

Fig.5 The comparison of HSP60 gene sequences between strain *zouA* and three kinds of type vibrios

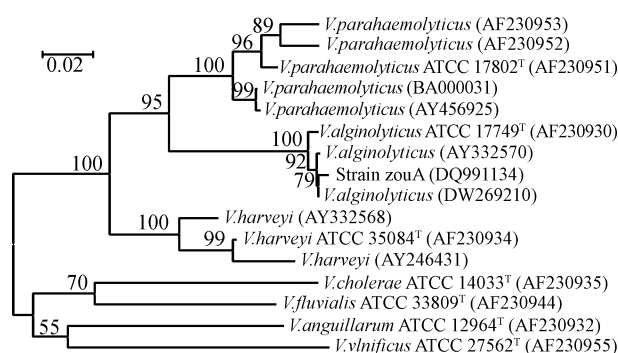


图 6 菌株 *zouA* 的 HSP60 基因系统发育树(括号内为 GenBank 序列登录号)

Fig.6 Phylogenetic tree of strain *zouA* based on the HSP60 gene sequences (Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank)

分支旁的数字为 bootstrap 1000 次的置信度(%); 标尺表示 2% 的核苷酸序列差异

Numbers near the branches are bootstrap probability values (%) with 1000 replicates; Scale bar corresponds to 2% difference in nucleotide sequence

参 考 文 献

- [1] Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, **68** (3): 403–431.
- [2] Lee CY, Pan SF, Chen CH. Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61** (4): 1311–1317.
- [3] Robert PA, Guenole A, Fournier JM. Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species validation by DNA–DNA hybridization. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **215** (1): 1–6.
- [4] Kwok AY, Wilson JT, Coulthart M, *et al.* Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial *hsp60* gene sequences. *Can J Microbiol*, 2002, **48** (10): 903–910.
- [5] Goh SH, Potter S, Wood J, *et al.* HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative *Staphylococci*. *J Clin Microbiol*, 1996, **34** (4): 818–823.
- [6] Jian WY, Zhu L, Dong XZ. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51** (5): 1633–1638.
- [7] 周 丽, 宫庆礼. 海水鱼虾蟹贝病害防治技术. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1998, pp.83–86.
- [8] 徐怀恕, 杨学宋, 李 筠, 等. 对虾育苗期细菌病害的诊断与控制. 北京: 海洋出版社, 1999, pp.1–217.
- [9] Vandenberghe J, Verdonck L, Robles AR, *et al.* *Vibrios* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (6): 2592–2597.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.106–120.
- [11] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, **5**(2): 150–163.
- [12] Lee SK, Wang HZ, Law SH, *et al.* Analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences. *Mar Pollut Bull*, 2002, **44** (5): 412–420.
- [13] Roux FL, Gay M, Lambert C, *et al.* Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Dis Aquat Organ*, 2004, **58**(2-3): 143–150.
- [14] Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, *et al.* Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(9): 5107–5115.