

迟缓爱德华氏菌 *EcoR* I 核糖体自动化分型与聚类分析

黄新新^{1*} 何苗² 韩伟¹ 沈文淑¹ 顾鸣¹ 蔡强³

(1. 上海出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心 上海 200135)

(2. 清华大学环境学院 北京 100084)

(3. 浙江清华长三角研究院 浙江 嘉兴 314006)

摘要:【目的】对 26 株迟缓爱德华氏菌进行自动化核糖体分型, 并进行聚类分析。【方法】采用 RiboprinterTM 全自动微生物鉴定系统对分离自斑点叉尾鲷、日本鳗、多宝鱼、比目鱼、斑鲳等宿主体内的迟缓爱德华氏菌进行核糖体分型, 以限制性内切酶 *EcoR* I 处理、切割菌株 DNA; 运用 BioNumerics 软件分析图像数据。【结果】迟缓爱德华氏菌核糖体图谱与数据库中已有信息进行比对, ATCC15947 和 BYK00685 的比对相似值>0.85, 分别为 0.95 及 0.90。条形码经软件分析共产生 21 种核糖体条带, 聚类分析分为 3 个群。条带之间呈现明显的地域性差异和宿主差别。来自北方及南方的菌株除少数几株以外, 各自聚集为一个群; 所有人源株则分布在第三群。【结论】自动化核糖体分型可以方便快捷地用于不同物种的菌株分型与流行病学追踪溯源。

关键词: 迟缓爱德华氏菌, Riboprinter 分型, 聚类分析

Characterization of *Edwardsiella tarda* by automated *EcoR* I ribotyping and cluster analysis

HUANG Xin-Xin^{1*} HE Miao² HAN Wei¹ SHEN Wen-Shu¹ GU Ming¹ CAI Qiang³

(1. Technical Center for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

(2. School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(3. Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing, Zhejiang 314006, China)

Abstract: [Objective] A total of 26 *Edwardsiella tarda* isolates were characterized by automated ribotyping and cluster analysis. [Methods] Strains of *E. tarda* taken from Channel Catfish, Japanese eel, Turbot, flounder, sweet spot were analyzed by the DuPont RiboprinterTM Microbial

Foundation item: Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Technology Project (No. HK006-2015); Zhejiang Province Science and Technology Project (No. 2015C33009); National Important Project on Science Instrument (No. 2012YQ15008705)

*Corresponding author: Tel: 86-21-38620560; Fax: 86-21-38620561; E-mail: huangxinxin@shciq.gov.cn

Received: November 06, 2015; Accepted: March 08, 2016; Published online (www.cnki.net): March 09, 2016

基金项目: 上海出入境检验检疫局科技计划项目(No. HK006-2015); 浙江省科技计划项目(No. 2015C33009); 国家重大科学仪器设备开发专项(No. 2012YQ15008705)

*通讯作者: Tel: 86-21-38620560; Fax: 86-21-38620561; E-mail: huangxinxin@shciq.gov.cn

收稿日期: 2015-11-06; 接受日期: 2016-03-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-09

Characterization System and we adopted a protocol using *EcoR* I as restriction enzyme to differentiate and characterize the isolates discussed here. The Riboprinter patterns obtained for the 26 isolates were imported and analyzed with BioNumerics software. **[Results]** The ribotype profiles of the isolates were compared with the reference DuPont identification database. Only 2 isolates of ATCC15947 and BYK00685 matched the patterns of DuPont Identification Library with a similarity >0.85, reached 0.95 and 0.90. Altogether, 21 different ribotypes (RTs) were generated. There were geographical differences between the RTs, *E. tarda* isolates collected from host in Northern China were phylogenetically from isolates from Southern China were clustered into two distinct clades, all isolates collected from human and other fishes belonged to third clade. **[Conclusion]** The discrimination power of automated ribotyping can be used to characterize bacterial isolates of various species for epidemiological studies.

Keywords: *Edwardsiella tarda*, Ribotyping, Cluster analysis

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*, Et)对多种动物及人致病,尤其对特种水产品有重要致病性,超过20多种海水和淡水鱼类可感染,引起脓肿、全身败血症等致死性病变,对全球水产养殖造成了巨大的经济损失^[1]。此外,*E. tarda*也可引起人类感染,是一种重要的人畜共患病。*E. tarda*自1959年首次在日本由Sakazaki和Murata分离后,迅速在全世界各地蔓延开,包括亚洲、欧洲、非洲和美洲^[2-3]。我国动物疫病病种目录将*E. tarda*列为有害生物,是我国和其他国家在水产品进出口贸易中必须检疫的微生物。*E. tarda*分型研究对于探讨菌株遗传多样性及流行病学分析有着重要意义。杜邦公司Riboprinter™全自动微生物鉴定系统可实现全自动化核糖体分型,细菌裂解、DNA酶切、凝胶电泳和数据分析均做到了全部标准化。本实验采用1998年-2010年从不同区域及宿主来源分离的26株*E. tarda*,研究其核糖体分型特性并进行聚类分析。

1 材料与方法

1.1 菌株

*E. tarda*标准菌株ATCC15947、ATCC23692购自Oxoid公司,其余菌株分别从斑点叉尾鲷、日本鳗、多宝鱼、比目鱼、斑鲢等宿主体内分离(表1)。所有菌株均经过革兰氏染色、氧化酶试验、VITECK 32GN1⁺生化鉴定和16S rRNA基因序列同源性分析。置于-80℃甘油肉汤保存。

1.2 主要仪器及试剂

Riboprinter™全自动微生物鉴定系统、Riboprinter™系统*EcoR* I试剂盒,杜邦中国集团有限公司;BioNumerics数据库分析软件,比利时Applied Maths Inc;脑心浸液和胰蛋白胨大豆琼脂,北京陆桥技术股份有限公司。

1.3 Riboprinter 操作规程

1.3.1 样品准备:挑取平皿中培养24h的单个纯菌落,放入加有缓冲液(试剂盒提供)的离心管中,搅拌数秒,制备成混浊菌悬液。取30 μL菌悬液于微量反应板内(试剂盒配置),置于细菌热处理器,加热约25 min。将经热处理的样品内分别加入A、B裂解液5 μL备用。

1.3.2 上样:按照仪器显示加样及有关试剂标识进行加样和填充有关试剂,随后仪器自动运行。整体过程如下:

(1) 制备DNA:细菌破壁,去蛋白并用限制性内切酶*EcoR* I将DNA切成片段。

(2) 分离并转移DNA片段:依据DNA片段分子量大小进行电泳分离,并转移至硝酸纤维素膜上,与杜邦公司设计的探针杂交。

(3) 膜处理及检测:酶标抗体与探针特异性结合,探针包含编码高度保守的16S rRNA基因和23S rRNA基因的DNA片段及间隔序列。加入化学发光底物,底物与酶反应产生的光信号被CCD相机记录并储存为“条形码”图像数据。

表 1 实验所用菌株

Table 1 Reference strains used in this study

宿主 Host	菌株 Strains	来源 Source	鱼类致病性 Mortality
比目鱼 Flounder	BYK00679	安徽	Y
	TX1	山东	Y
多宝鱼 Turbot	EIB202	山东	Y
	TJ090818	天津	Y
	L-49231	辽宁	Y
	WY37	山东	Y
	ET-QD	山东	Y
斑点叉尾鮰 Channel catfish	GD091027	广东	Y
花鳗 Eel	manE29L	广东	Y
	ET080729	广东	Y
日本鳗 Japanese eel	080813-2	福建	Y
美国鳗 American eel	ET081126R	福建	Y
斑鳢 <i>Channa maculata</i>	ET-YZH	江苏	Y
红慈鲷 Red cichlids	ET-0711059	上海	Y
鲷 Porgy	ET-CD	上海	Y
未知 Unknown	BYK00685	江西	Y
马鲛脂鲤 <i>Serpae tetra</i>	PPD130/91	新加坡	Y
抹香鲸 Sperm whale	ETB	比利时	Y
奥斯卡鱼 Oscar fish	DT	广东	N
人 Human	ET-1	美国	N
	ET-11	美国	N
	ET-13	美国	N
	ET-0605	江苏	N
	ET-89602	江苏	N
	ATCC15947	美国	N
ATCC23692	美国	N	

(4) 数据处理: 系统依据每个样品的图像数据产生一个 Riboprinter 模式, 并与储存在系统中的其他 Riboprinter 模式进行比较来鉴定样品。

1.3.3 数据统计分析: 获得的图像数据使用 BioNumerics 数据库软件进行处理, 聚类图使用非加权配对算数平均法(UPGMA)构建, 条带位置优化度设为 0.5%。

1.3.4 核糖体指纹图谱数据库的建立: 在 BioNumerics 软件中依次建立数据库、安装 Riboprinter 输入程序、初始化数据库后导入 Riboprinter 指纹图谱文本文件。录入实验菌株的背

景信息, 建立 *E. tarda* 核糖体指纹图谱数据库。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

每个菌株产生的 Riboprinter 模式以 85% 相似度为界与数据库中的标准菌株进行比对鉴定, 只有 ATCC15947 及 BYK00685 超过 0.85, 分别为 0.95 和 0.90。其余菌株的比对结果分别为: ET-1: 0.74; ET-11: 0.72; ET-YZH: 0.73; ET-89602: 0.76; manE29L: 0.83; DT: 0.83; ETB: 0.65。剩余 17 株包括 ATCC23692 均未能在 Riboprinter 系统中显示鉴定的菌株为 *E. tarda*。

2.2 Riboprinter 分型及聚类分析

2 株 *E. tarda* 标准株和 24 株分离株的核糖体分型条带模式如图 1 所示, 共有 21 种核糖体带型。其中 18 种带型分别对应 1 株 Et, 为 PPD130/91、TX1、WY37、L-49231、TJ090818、080813-2、ET-CD、ET081126R、ET-YZH、ETB、ATCC15947、ET-0711059、ET-13、BYK00685、ET0605、DT、manE29L、ATCC23692; 2 种带型对应 3 株菌株, 即 BYK00679、EIB202、ET-QD 和 ET-1、ET-11、ET-89602; 1 种带型对应 2 株菌株: ET-080729、GD-091027。所有菌株的核糖体 DNA 被限制性内切酶 *EcoR* I 消化后条带数为 10–12 条左右, 酶切条带分子量范围位于 1–50 kb 之间。经相似度矩阵分析, 不同带型之间的最低相似度为 20.0% (ATCC23692 与 080813-2)。使用 BioNumerics 软件对结果进行分群和多维尺度分析, 可见 26 株 *E. tarda* 的核糖体分型主要分为 3 个群。对进化树上的菌株进一步分析发现, 来自相同地域或相同宿主的菌株同源性更近, 更趋于分布在同一或相近基因树上。例如: 来自山东、辽宁、天津等北方地区的菌株 EIB202、ET-QD、TX1、WY37、L-49231、TJ090818 聚集于第一群; 来自广东、福建、上海的 ET-080729、GD-091027、080813-2、ET081126R、ET-CD 聚集于第二群; 所有的人源株 ET-1、ET-11、ET-13、ET-0605、ET-89602 与其他的鱼源株则分布于第三群。

冲场凝胶电泳(Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)及多位点序列分型(Multi locus sequence typing, MLST)是目前国内外流行病学研究广泛接受的方法之一^[9]。与其他方法相比具有分辨率高、高灵敏性的优点,能在细菌基因组很庞大的情况下,尽可能反映较多的变异信息,被誉为细菌分子分型方法的金标准。然而这些方法存在的缺点是耗时费力,也缺乏标准化的操作手法。

Riboprinter™ 全自动微生物鉴定系统基于 Southern 杂交的自动化核糖体分型,其大容量专家数据库包含了 8 528 条标准菌株信息,含 1 740 多个种以及 290 多个属的微生物 DNA 信息,涵盖病原菌、环境菌、益生菌、致病菌、质控菌及其他多种微生物,全部经 ATCC, JCM 和 DSMZ 验证。已被广泛用于流行病学调研及食源性微生物溯源追踪。其分型结果基本与 PFGE 及 MLST 方法吻合,均显示菌株遗传多样性与宿主及地理来源有着密切的关联性^[9]。Yang 等^[10]将 33 株 *E. tarda* 用 PFGE 进行了分型,表明北方系与南方系分属两个群,人源株与 DT 株在另一个分支上。本次研究与 Yang 等^[10]所选用的 *E. tarda* 菌株有部分相同,结果有高度一致性:来自山东、辽宁、天津等北方的菌株汇成一群;广东、福建、上海等南方来源的菌株汇成第二个群;人源株及 DT 等其他鱼源菌株分布于第三个群。值得注意的是,来自安徽的 BYK00679 及来自新加坡的 PPD130/91 在两种研究方法中均归属于北方系,表明这两株菌株最初可能均由中国的北方地区传入。在本研究中,有较多的鱼源菌株与人源株归入一群;BYK00685 (江西株)未归于南方系,表明两种方法有少许的差异。但从本试验的结果看,如果以 85%相似度为界与数据库中的标准菌株进行比对鉴定,只有 ATCC15947 及 BYK00685 超过 0.85。因而在分型中 Ribotype 法将 BYK00685 归入人源株一群是更为合理科学的。

Riboprinter™ 全自动微生物鉴定系统在提供简便、标准化、客观及省力等多功能性能的同时,也存在一些相关问题。比如仪器购买价格昂贵,运行成本高。另外,由于有效使用该系统需要良好的识别数据库,因而对于一些菌株必需由用户构建自己的数据库以增加原先制造商所提供的库容量。对于此次研究来说,26 株 *E. tarda* 仅有 2 株与原数据库匹配相似度大于 0.85,其余 7 株菌虽能鉴别出是 *E. tarda*,但相似度很低,其余 17 株甚至 ATCC23692 都未能鉴别出。因而从整体来看,该系统在分子分型方便更有优势,而在鉴定菌株方面需结合其他方法。同时在分型聚类分析中,为进一步提高分辨率及可信度,同时使用 *Pvu* II 酶切可得到更好的验证效果。

参 考 文 献

- [1] Mohanty BR, Sahoo PK. Edwardsiellosis in fish: a brief review[J]. Journal of Biosciences, 2007, 32(S3): 1331-1344
- [2] White FH, Simpson CF, Williams LE Jr. Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida[J]. Journal of Wildlife Diseases, 1973, 9(3): 204-208
- [3] Wang YM, Wang QY, Xiao JF, et al. Genetic relationships of *Edwardsiella* strains isolated in China aquaculture revealed by rep-PCR genomic fingerprinting and investigation of *Edwardsiella* virulence genes[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 111(6): 1337-1348
- [4] Maiti NK, Mandal A, Mohanty S, et al. Phenotypic and genetic characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from pond sediments[J]. Comparative Immunology, Microbiology Infectious Diseases, 2009, 32(1): 1-8
- [5] Chen Y, Ross WH, Gray MJ, et al. Attributing risk to *Listeria monocytogenes* subgroups: dose response in relation to genetic lineages[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(2): 335-344
- [6] Corcoran D, Clancy D, Mahony MO, et al. Comparison of *Listeria monocytogenes* strain types in Irish smoked salmon and other foods[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2006, 209(6): 527-534
- [7] Tan YP, Lin Q, Wang XH, et al. Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of *Edwardsiella tarda*[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(11): 6475-6480
- [8] Liu XJ, Kang LQ, Liu YJ, et al. Characterization of the *Edwardsiella tarda* proteome in response to different environmental stresses[J]. Journal of Proteomics, 2013, 80: 320-333
- [9] Abayneh T, Colquhoun DJ, Sørum H. Multi-locus sequence analysis (MLSA) of *Edwardsiella tarda* isolates from fish[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 158(3/4): 367-375
- [10] Yang MJ, Shao S, Xiao JF, et al. Phylogenetic investigation of *Edwardsiella tarda* with multilocus sequence typing (MLST) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing methods[J]. Aquaculture, 2013, 410-411: 79-85