

论著

创伤弧菌 16S-23S rDNA 间区变形梯度凝胶电泳多态性分析

张晶,周勇,陶霞,吴新伟

(广州市疾病预防控制中心微生物检验科,广东 广州 510440)

摘要:目的 建立创伤弧菌基因分型的新方法,了解创伤弧菌的分子特征。方法 应用 PCR-变形梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术对创伤弧菌的 16S-23S rDNA 间区(16S-23S rDNA intergenic spacer regions,ISR)多态性进行分析比较,结合药敏试验,以进一步验证分离菌株之间的亲缘关系。结果 ISR-PCR 将创伤弧菌菌株扩增出 4 条约 900、750、650、550 bp 大小不同的条带;同时,创伤弧菌的 ISR-DGGE 序列表现出明显的株间差异,18 株共产生了 16 种不同的指纹图谱;聚类分析将所有的细菌分为两大类,相似性分别为 0.65 和 0.71;亲缘关系较近的菌株具有不同于关系较远的菌株的耐药谱,与 ISR-DGGE 指纹图谱分析相一致。结论 这种分子操作技术完全能够用于创伤弧菌株型的调查与鉴定,为创伤弧菌的基因分型提供了一种新的方法。

关键词: 创伤弧菌; 16S-23S rDNA 间区; PCR-变形梯度凝胶电泳; 基因分型; 致病菌; 食品安全

中图分类号:R155;Q754 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)03-0206-05

Analysis of the polymorphism of 16S-23S rDNA intergenic spacer regions from *Vibrio vulnificus* strains by denaturing gradient gel electrophoresis

Zhang Jing, Zhou Yong, Tao Xia, Wu Xinwei

(Guangzhou Center for Diseases Control and Prevention, Guangdong Guangzhou 510440, China)

Abstract: Objective To establish a new method for genotyping of *Vibrio vulnificus*. **Methods** PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) was used to elucidate the molecular characteristics of the polymorphism of 16S-23S rDNA intergenic spacer regions (ISR) from 18 *Vibrio vulnificus* strains. Meanwhile, detection of virulence factors and antimicrobial susceptibility test of isolates were conducted to verify the relationship of the strains. **Results** The *Vibrio vulnificus* strains could be amplified into 4 different bands by ISR-PCR, including 900, 750, 650 and 550 bp. At the same time, *Vibrio vulnificus* ISR-DGGE sequences showed significant differences between the strains, and all 18 strains were typed into 16 types by DGGE. Clustering analysis divided them into two categories with similarity of 0.65 and 0.71. The results of antimicrobial susceptibility test implied that drug resistant types of sj6, sj11 and sj12 were different from the other 15 strains, which was consistent to the ISR-DGGE. **Conclusion** This molecular technique could be applied to investigation and identification of *Vibrio vulnificus*, and provide a new method for genotyping.

Key words: *Vibrio vulnificus*; 16S-23S rDNA intergenic spacer regions; PCR-DGGE; genotyping; pathogens; food safety

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)是一种嗜温、嗜盐、嗜碱型革兰氏阴性海洋致病菌,能引起人类急性胃肠炎、坏疽性伤口感染及败血症,感染病例起病急、进展快、致残率和致死率高,是一种临床少见而又极具致命性的致病菌,在食品公共卫生上具有重要防范意义^[1-2],因此在暴发调查中需要利用实验室分型技术揭示创伤弧菌的流行病学规律,预防和控制其引发的疾病,研究创伤弧菌的种内多样性并对种内进行分型,确定传染源和传播途径。PCR-变形梯度凝胶电泳(PCR-DGGE),能将分子量相同而单一碱基序列有

差异的 DNA 片段很好的区分出来,显示出 PCR 扩增 DNA 的多态性,为分子遗传分析提供快速、直观、相对简单且结果稳定的强有力工具。本研究应用 PCR-DGGE 技术对创伤弧菌的 16S-23S rDNA 间区(16S-23S rDNA intergenic spacer regions,ISR)多态性进行分析比较,结合药敏试验,进一步验证分离菌株之间的亲缘关系。此种分子操作技术能够用于创伤弧菌株型的调查与鉴定,本研究结果亦可为创伤弧菌的基因分型新技术的应用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

创伤弧菌由本实验室自海产品中分离保存,采用

收稿日期:2013-03-12

基金项目:广州市医药卫生科技项目(201102A213240)

作者简介:张晶 女 技师 研究方向为病原微生物学

E-mail:zhangjing9468@yahoo.com.cn

脑心浸液培养基于恒温培养摇床中 37 ℃,150 r/min 培养 24 h。

表 1 菌株来源

Table 1 Source of 18 *Vibrio vulnificus* strains

编号	样品	采集地
sj1	三文鱼刺身	从化水产市场
sj2	海胆刺身	从化水产市场
sj3	麻虾刺身	从化水产市场
sj4	北极贝刺身	从化水产市场
sj5	海鲫鱼	南沙水产市场
sj6	牡蛎	黄沙水产市场
sj7	海虾	黄沙水产市场
sj8	甜虾	黄沙水产市场
sj9	象拔蚌	黄沙水产市场
sj10	蝴蝶贝	黄沙水产市场
sj11	牡蛎	黄沙水产市场
sj12	牡蛎	黄沙水产市场
sj13	章鱼	黄沙水产市场
sj14	鱿鱼	黄沙水产市场
sj15	北极贝刺身	黄沙水产市场
sj16	标准菌株(ATCC 27562)	北京世纪奥科生物技术有限公司
sj17	海胆刺身	南沙水产市场
sj18	牡蛎	南沙水产市场

1.1.2 主要仪器与试剂

M-H 平板、OXOID 药敏纸片(均购自广州千江生物科技有限公司),PCR TaqMix(100 bp Maker,上海英韦创津生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的制备

取 1.5 ml 菌液,4 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 50 μl 无菌水重悬,100 ℃ 水浴裂解 10 min,冰上保存 10 min,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。

1.2.2 ISR 引物设计及 PCR 扩增

根据苏婷等^[3]的报道,使用带一段 GC 夹(划线部分)的 VINT 基因引物^[4]: gc-VINTF: 5'-CCCG CCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGCCACGGGGTG GGGTGAAGTCTGAACAAGG-3'; VINTR: 5'-TCCT TCATCGCCTCTGACTG-3' 作为创伤弧菌的 ISR 特异性检测引物,由上海英韦创津生物公司合成。PCR 反应体系:PCR TaqMix 25 μl,引物各 1 μl(终浓度 1 μmol/L),DNA 模板 2 μl,最后加无菌去离子水补足至 50 μl。PCR 反应条件:94 ℃ 4 min;94 ℃ 50 s,55 ℃ 1 min,72 ℃ 90 s,34 个循环;72 ℃ 8 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖电泳检测,凝胶成像系统成像并拍照。

1.2.3 PCR 产物的 DGGE

采用 Bio-Rad 公司的通用突变检测系统对 PCR 产物进行分析。扩增产物所用的变性梯度凝胶电泳(DGGE)条件:PCR 产物上样量 15 μl,聚丙烯酰胺浓度为 8%,变性梯度 40%~50%(100% 的变性剂浓度为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺),150 V,60 ℃,6 h,电泳缓冲液 1 × TAE,电泳结束后用 0.5 μg/ml 溴化乙锭染色 20 min,Bio-Rad 公司凝胶成像系统(Gel Doc2000TM)拍照。

胺浓度为 8%,变性梯度 40%~50%(100% 的变性剂浓度为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺),150 V,60 ℃,6 h,电泳缓冲液 1 × TAE,电泳结束后用 0.5 μg/ml 溴化乙锭染色 20 min,Bio-Rad 公司凝胶成像系统(Gel Doc2000TM)拍照。

1.2.4 聚类分析图

对 PCR 产物的 DGGE 指纹图谱进行统计,有条带计为“1”,无条带计为“0”,用 MEGA 2.1 软件中的 UPGMA 程序进行聚类分析,作出聚类分析树状图。

1.2.5 药敏试验

取新鲜培养的创伤弧菌菌液各 100 μl 涂布 M-H 平板,用 OXOID 药敏纸片分配器取 12 种药敏纸片贴于琼脂表面,包括氨苄西林 10 μg、头孢曲松 30 μg、环丙沙星 5 μg、氯霉素 30 μg、阿米卡星 30 μg、复方新诺明 25 μg、庆大霉素 10 μg、萘啶酸 30 μg、磺胺复合物 300 μg、链霉素 10 μg、四环素 30 μg、甲氧苄氨嘧啶 5 μg,37 ℃ 培养 20 h,测量抑菌圈的大小,覆盖敏感、中敏、耐药判读标准。

2 结果

2.1 ISR PCR 电泳图谱分析

由 ISR PCR 电泳图谱(见图 1)可知:18 株细菌均能扩增出至少 4 条约 900、750、650、550 bp 大小不同的条带,sj12、sj13、sj14、sj15、sj16 还能扩增出第 5 条条带,大约 1 400 bp 左右,表明创伤弧菌菌株间 ISR 带谱具有差异性;并且同一菌株间不同条带的亮度不同,说明各区间在菌株内部的拷贝数可能不同^[5]。

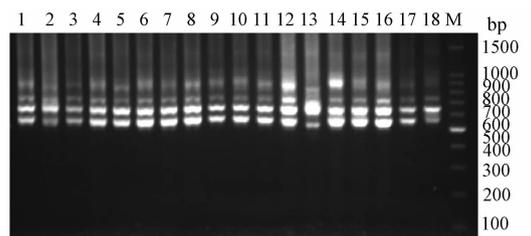


图 1 ISR PCR 电泳图谱

Figure 1 ISR PCR fingerprints of 10 *Vibrio vulnificus* strains

2.2 PCR 产物的 DGGE 图谱

经 DGGE 电泳后的 DNA 带型发生了变化(见图 2),可见 18 株细菌具有不同的 DGGE 图谱特征,归纳 18 株细菌的 DGGE 条带,共产生 18 个多态性位点,相对应为 1~18 号条带,其中 1 号条带距离点样孔最近,结果表明 18 个样品分别分离出 6~11 条条带,其中 18 号条带为 sj7 特有,1 号条带最为常见,18 株细菌中的每一株均包含此条带。琼脂糖电泳分离出的分子量相同的条带,在 DGGE 电泳图中

进一步分离出更丰富的指纹图谱,并且不同的菌株条带的数量及相对位置亦不尽相同,可能是由于个

别碱基替代或缺失所致。18株共产生了13种不同的指纹图谱。

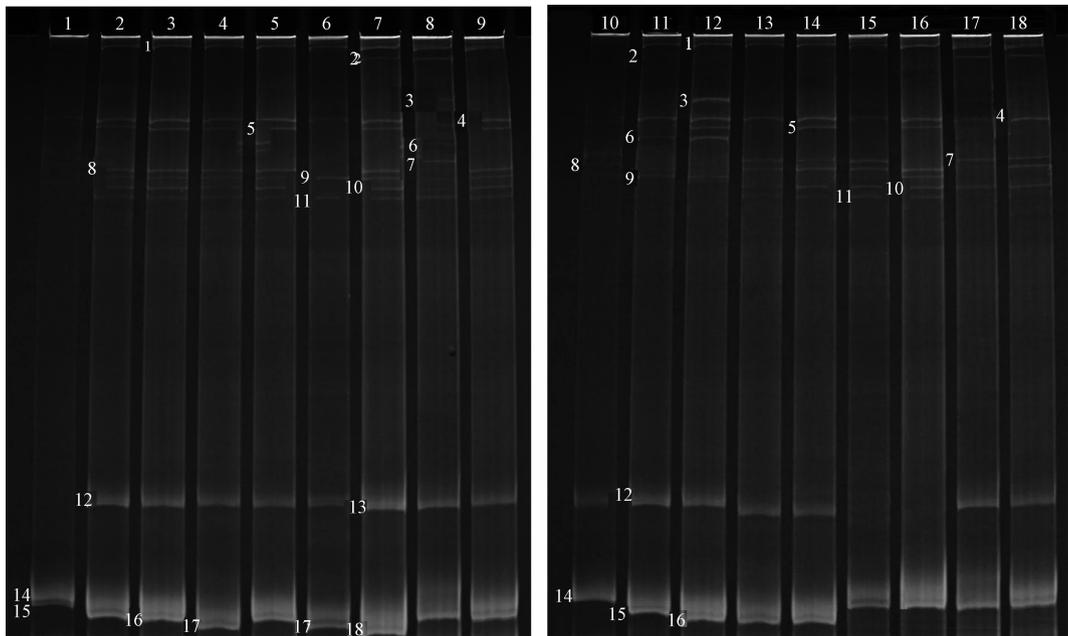


图2 ISR PCR产物DGGE电泳图谱

Figure 2 DGGE fingerprints of ISR PCR products

2.3 聚类树状图谱分析

对18株创伤弧菌的ISR PCR产物DGGE图谱进行统计,根据MEGA 2.1软件中的UPGMA程序聚类分析,得到具有多级分支的复杂遗传关系图(见图3),提示菌株间具有不同的亲缘关系。18株创伤弧菌可分为2个大的分支,其中sj6、sj11、sj12聚为一类,相似性为0.71;其余菌株聚为一类,相似性为0.65;在0.72处再次分支,sj1、sj10、sj15、sj16、sj17、sj18聚为一类,sj2、sj3、sj4、sj5、sj7、sj9聚为一类,sj8、sj13、sj14聚为另一类相同的菌株。

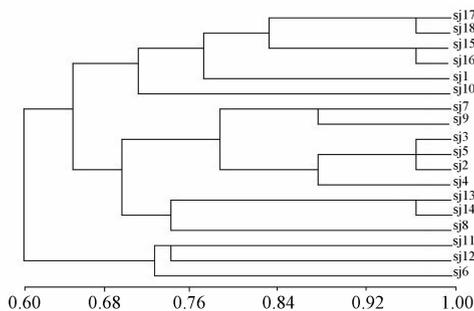


图3 创伤弧菌的UPGMA聚类分析结果

Figure 3 UPGMA clustering analysis of *Vibrio vulnificus*

用SPSS 16.0软件计算各菌株间的遗传距离,遗传距离最大达到11.0,最小为0,与遗传树状图结果相符(见表2)。

2.4 药敏试验结果

受检的18株创伤弧菌具有不同程度的耐药性,

在检测的12种药物中,头孢曲松、环丙沙星、氯霉素、复方新诺明、磺胺复合物5种药的敏感率为100%,氨苄西林的耐药率最高,超过80%,仅菌株sj6、sj11、sj12呈中度敏感,并且甲氧苄氨嘧啶只有sj6、sj11、sj12为耐药菌株。

3 讨论

近几年发展起来的16S-23S rDNA间区PCR-DGGE技术是基于ISR高可变性的DNA指纹技术。DGGE技术最早是由Fisher和Lerman创立的,利用DNA分子双螺旋局部变性时电泳迁移率下降,将分子量相同而碱基序列不同的双链DNA片段区分开。当双链DNA某一区域首先解链,与其只有一个碱基之差的另一条链就有不同的解链变性剂浓度,用不同浓度的变性剂就可将此双链DNA区分,同时产生的两条单链由于GC夹结构而不能完全分离,而由引物与模板形成的GC夹可以增加模板与引物的结合率导致扩增效率的增加^[6-7]。该技术与PCR技术结合后具有较强的分析鉴定能力,可检测单一碱基的变化和DNA的多态性,被广泛用于基因突变的检测和物种的鉴定。例如转基因小麦田土壤细菌^[8]、副溶血弧菌^[3]、溶藻弧菌^[9]、河流弧菌^[10]等。2001年Buchan等^[11]首次用ISR PCR-DGGE对大肠杆菌ISR多态性进行分析,2008年谢珍玉等^[12]应用PCR-DGGE技术对溶藻弧菌的16S rDNA与23S rDNA的ISR多态性进行了分析,相同的菌株只能产

表 2 18 株创伤弧菌遗传距离比较

Table 2 Comparison of genetic distance among 18 *Vibrio vulnificus* strains

编号	sj1	sj2	sj3	sj4	sj5	sj6	sj7	sj8	sj9	sj10	sj11	sj12	sj13	sj14	sj15	sj16	sj17	sj18
sj1	0.000																	
sj2	9.000	0.000																
sj3	9.000	0.000	0.000															
sj4	9.000	2.000	2.000	0.000														
sj5	9.000	0.000	0.000	2.000	0.000													
sj6	10.000	5.000	5.000	3.000	5.000	0.000												
sj7	8.000	5.000	5.000	5.000	5.000	8.000	0.000											
sj8	11.000	8.000	8.000	10.000	8.000	11.000	7.000	0.000										
sj9	8.000	3.000	3.000	5.000	3.000	8.000	2.000	5.000	0.000									
sj10	6.000	7.000	7.000	7.000	7.000	8.000	8.000	9.000	8.000	0.000								
sj11	7.000	8.000	8.000	8.000	8.000	5.000	9.000	10.000	9.000	7.000	0.000							
sj12	10.000	5.000	5.000	7.000	5.000	6.000	10.000	9.000	8.000	8.000	5.000	0.000						
sj13	8.000	5.000	5.000	7.000	5.000	8.000	6.000	5.000	4.000	10.000	11.000	10.000	0.000					
sj14	8.000	5.000	5.000	7.000	5.000	8.000	6.000	5.000	4.000	10.000	11.000	10.000	0.000	0.000				
sj15	5.000	6.000	6.000	6.000	6.000	7.000	7.000	8.000	7.000	7.000	10.000	11.000	3.000	3.000	0.000			
sj16	5.000	6.000	6.000	6.000	6.000	7.000	7.000	8.000	7.000	7.000	10.000	11.000	3.000	3.000	0.000	0.000		
sj17	4.000	7.000	7.000	7.000	7.000	8.000	8.000	9.000	8.000	4.000	7.000	10.000	6.000	6.000	3.000	3.000	0.000	
sj18	4.000	7.000	7.000	7.000	7.000	8.000	8.000	9.000	8.000	4.000	7.000	10.000	6.000	6.000	3.000	3.000	0.000	0.000

生唯一的 ISR-DGGE 指纹图谱,表明这种分子操作技术完全能够用于菌株的调查与鉴定,展示了新技术的优越性。本研究正是利用 ISR 的高可变性研究创伤弧菌的种内基因分型。

目前用于细菌多态性分析的分子生物学方法很多,如脉冲场凝胶电泳(PFGE)、随机扩增片段长度多态性分析(RAPD)、多位点序列分析(MLST)等。这几种方法均有很强的可比性和高度分型能力,对于细菌的同源性分析有指导意义,然而这些技术也存在着成本昂贵、技术要求高、耗时长、很难在基层开展和实行。

基于创伤弧菌 16S rDNA 与 23S rDNA 的 ISR 多态性进行分析的 PCR-DGGE 技术简单直观地展现了创伤弧菌 ISR 间区数量和序列的丰富多样性,具有很高的分辨率,结果收集和分析不受主观影响,重复性好,操作简单,输出结果量化,成本低,对于短期内爆发流行病大量标本的处理具有更大优势,完全可以成为分型鉴定的一线工具。

由 ISR PCR 电泳图谱可知,创伤弧菌的 ISR 共扩增出 5 种大小不同的条带,分子量在 550 ~ 1 400 bp 之间,并且同一菌株间不同条带的亮度不同,说明各区间在菌株内部的拷贝数可能不同,550 和 650 bp 的条带占优势。而琼脂糖电泳分离出的分子量相同的条带,在 DGGE 电泳图中进一步分离出更丰富的指纹图谱,18 株细菌产生 18 个多态性位点、13 种不同的指纹图谱,并且不同的菌株条带的数量及相对位置亦不尽相同,可能是由于个别碱基替代或缺失所致。聚类分析表明 18 株细菌形成具有多级分支的复杂树状图,将所有的细菌分为两

大类,相似性为 0.65、0.71,其中 sj6、sj11、sj12 聚为一类,其余归为另一类谱型相近的菌株。药敏结果表明 sj6、sj11、sj12 与其他株细菌的耐药谱有所不同,提示 ISR-DGGE 指纹图谱分析与药敏试验有很好的相关性,推测这三株细菌可能具有相同的来源,溯源后,发现这三株细菌均来自 2011 年自黄沙水产市场采购的牡蛎,这对于研究创伤弧菌的种内多样性并对种内进行分型,确定传染源和传播途径尤为重要。

参考文献

- [1] Bisharatn N, Cohen D I, Harding R M, et al. Hybrid *Vibrio vulnificus*[J]. *Emerg Infect Dis*,2005,11(1):30-35.
- [2] Gulig P A, Bourdage K L, Starks A M. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*[J]. *J Microbiol*,2005,43:118-131.
- [3] 苏婷,罗鹏,胡超群,等. 34 株副溶血弧菌 16S-23S rDNA 间区多态性 DGGE 分析[J]. *热带海洋学报*,2010,29(3):55-60.
- [4] Maeda T, Takada N, Furushita M, et al. Structural variation in the 16S-23S rDNA intergenic spacers of *Vibro parahaemolyticus*[J]. *FEMS Microbiol Lett*,2000,192:73-77.
- [5] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) in microbial ecology [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*,1998,73:127-141.
- [6] Myers R M, Fischer S G, Lerman L S, et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Nucleic Acids Res*,1985,13:3131-3145.
- [7] Myers R M, Fischer S G, Maniatis T, et al. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Nucleic Acids Res*,1985,13:3111-3129.