

文章编号:1000 - 0615(2005)03 - 0356 - 06

斜带石斑鱼 3 种致病性弧菌的分子生物学鉴定

李宁求^{1,2}, 白俊杰¹, 吴淑勤¹, 劳海华¹, 石存斌¹,
潘厚军¹, 叶 星¹, 简 清¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;
2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:从患病斜带石斑鱼分离到 3 株病原菌 EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801, 经常规生理生化鉴定均属于弧菌属的种类。为了进一步确定其分类地位, 测定了 3 株病原菌的 16S rRNA 和 HSP60 (heat shock protein, HSP60) 基因部分序列。16S rRNA 基因系统进化分析表明, 3 株病原菌与哈维氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌亲缘关系较近, 相互之间同源性均大于 98.6%, 差异不明显。HSP60 基因序列分析表明, 菌株 EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801 HSP60 基因序列分别与哈维氏弧菌 (AF230934)、溶藻弧菌 (AF230931)、副溶血弧菌 (AF230951) HSP60 基因的同源性最高, 依次为 95.7%、99.8% 和 99.8%, 而与其它弧菌 HSP60 基因的同源性均低于 90.6%, 3 株病原菌相互之间的同源性低于 91.0%。HSP60 基因构建的系统进化树表明, EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801 分别与 *Vibrio harveyi*、*Vibrio alginolyticus*、*Vibrio parahaemolyticus* 聚类。综合上述结果, 菌株 EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801 可分别鉴定为哈维氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌。结果表明, HSP60 基因比 16S rRNA 基因更适合用于海水鱼致病性弧菌种间的分类研究。

关键词: 哈维氏弧菌; 溶藻弧菌; 副溶血弧菌; 16S rRNA 基因; 热激蛋白 (HSP60); 系统进化

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Molecular classification of three kinds of pathogenic *Vibrios* in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*

LI Ning-qiu^{1,2}, BAI Jun-jie¹, WU Shu-qin¹, LAO Hai-hua¹, SHI Cun-bin¹,
PAN Hou-jun¹, YE Xing¹, JIAN Qing¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Three strains of pathogenic bacteria, namely EcGS020802, EcGS021001 and EcGS020801 were isolated from diseased orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*). By physiological and biochemical analyzing, they belonged to *Vibrio*. In order to further classify them, 16S rRNA and heat shock protein (HSP60) genes partial sequences were determined. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences indicated that three strains of pathogeny showed high levels of similarity to *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*. The identities among them, above 98.6%, were very high. Sequences analysis of HSP60 genes showed that they were very similar to *V. harveyi* (AF230934), *V. alginolyticus* (AF230931) and *V. parahaemolyticus* (AF230951), and their nucleotide identities were 95.7%, 99.8% and 99.8%, respectively. Moreover, the similarities with other *Vibrio* species were all less than 90.6%. The nucleotide similarities of HSP60 genes among three isolates were less than 91.0%. Phylogenetic tree of *Vibrio* based on HSP60 genes showed that strains EcGS020802, EcGS021001 and EcGS020801 clustered together with *V. harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*, respectively. Based on the results obtained, the strains EcGS020802, EcGS021001 and EcGS020801 were identified as *V. harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*, respectively. Results showed

收稿日期:2004-04-02

资助项目:国家 863 计划资助项目(2001AA622050)

作者简介:李宁求(1978 -),男,湖南长沙人,硕士,从事海洋生物技术研究。E-mail:liningq@tom.com

通讯作者:吴淑勤, E-mail:sqwxm@163.net

that HSP60 gene was fitter to classify marine *Vibrios* than 16S rRNA gene.

Key words: *V. harveyi*; *V. alginolyticus*; *V. parahaemolyticus*; 16S rRNA gene; heat shock protein (HSP60); phylogeny

弧菌是海洋环境中最常见的一类条件致病菌,随着养殖水域生态环境的恶化,已成为海水养殖动物的主要病原菌之一。已报道的海水养殖动物病原弧菌有 20 多种^[1],主要有哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、溶藻胶弧菌 (*V. alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、灿烂弧菌 (*V. splendidus*)、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)、最小弧菌 (*V. minius*)、鳗弧菌 (*V. anguillarum*) 和费氏弧菌 (*V. fischeri*) 等。对这些病原的鉴定,大部分是采用传统的生理生化方法,而对于弧菌属中的一些新种的某些表型特征在伯杰氏手册第九版尚无明确的标准,因此,有必要寻求新的方法对其进行分类鉴定。随着分子生物学的发展,现代细菌分类鉴定从传统的表型分类进入基因型分类水平。Woese^[2]通过对各类生物 rRNA 序列进行分析,认为 ssu rRNA (16S 或 18S rRNA) 序列是用于系统进化及分类研究最适宜的指标。目前,16S rRNA 分析已成为生命系统进化及分类研究最常用的工具。莫照兰等^[3-5]、叶军等^[6]应用 16S rRNA 序列分析方法对海水鱼的多种致病性弧菌进行了分类鉴定。热激蛋白 (heat shock protein) 是另一类常应用于生物进化及分类的大分子物质^[7,8],广泛存在于细菌及真核生物细胞中,主要功能是作为分子伴侣帮助蛋白质肽链折叠和组装成正确的构象,由于进化速度比 16S rRNA 快,HSP60 基因广泛应用于亲缘关系较近的细菌的分类鉴定^[9-11],Kwok 等^[12]研究表明 HSP60 基因适合用于研究海洋弧菌系统分类。本研究在常规生理生化鉴定的基础上,采用 16S rRNA 和 HSP60 基因序列分析的方法对斜带石斑鱼的 3 种致病性弧菌进行了分类鉴定,为海水鱼弧菌病的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801 分离自广东深圳大亚湾养殖场患病斜带石斑鱼。经回归感染及毒性试验表明均对斜带石斑鱼具有较强的致病性。

DNA 提取试剂盒 wizard genomic DNA purification kit 为 Promega 公司产品,PCR 产物纯

化试剂盒 high pure PCR product purification kit 为 Roche 公司产品,Taq 酶及有关试剂购自上海生物工程公司或华美生物工程公司。

1.2 方法

病原菌常规鉴定及 API 系统鉴定 细菌形态、生理生化特征试验参照《常见细菌系统鉴定手册》^[13] 方法进行。API (analytic products Inc) 系统鉴定按 ID 32E 试剂条说明书操作。

弧菌总 DNA 的提取 将菌株 EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801 分别在 2216E 液体培养基中培养过夜,离心收集菌体,按 wizard genomic DNA purification kit 说明书提取细菌总 DNA。

引物设计与 PCR 扩增 根据细菌 16S rRNA 基因保守序列设计一对引物 P1:5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'; P2:5' ATT CAC CGT GGC ATT CTG ATC C 3'。16S rRNA 基因 PCR 扩增条件为:94 预变性 2 min;接着 94 30 s,58 45 s,72 90 s,30 个循环;72 延伸 7 min。HSP60 基因 PCR 引物是根据哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血弧菌 HSP60 基因保守序列设计的,上下游引物分别为 P3:5' ACA ACA GCA ACG GTA CTA GC 3'; P4:5' CAA CTT TCA CGA TGC CAC 3'。HSP60 基因 PCR 扩增条件为:94 预变性 2 min;接着 94 30 s,50 45 s,72 60 s,30 个循环;72 延伸 7 min。

16S rRNA 和 HSP60 基因的序列分析 PCR 产物经纯化后,直接在 ABI PRISM TM 377 全自动 DNA 测序仪上进行序列分析,所测序列通过 Blast 与 GenBank 中序列进行序列比较,用 Vector NTI suite 6.0 软件进行序列同源性及系统进化树的构建。

2 结果

2.1 病原菌常规鉴定及 API 系统鉴定结果

菌株 EcGS020802 在 2216E 培养基恒温培养 24 h,形成的菌落呈圆形,中心略隆起,表面光滑,半透明,直径约 1.5 mm,TCBS 培养基的菌落呈黄色,直径约 2.2 mm,菌体革兰氏染色阴性,短杆状,可运动,氧化酶反应阳性,对弧菌抑制剂 O/

129 (150 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 敏感, 发酵葡萄糖, 不产气。菌株 EcGS021001 在 TCBS 培养基培养 24h 的菌落为黄色, 成弥漫状生长, 表面分泌出乳白色物质, 菌落直径约 3.5 mm, 菌体革兰氏染色阴性, 短杆状, 可运动, 氧化酶反应阳性, 对弧菌抑制剂 O/129 (150 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 敏感, 发酵葡萄糖产酸不产气。菌株 EcGS020801 在 TCBS 培养基培养 24 h 的菌落为绿色, 菌体革兰氏染色阴性, 杆状, 可运动, 氧化酶反应阳性, 对弧菌抑制剂 O/129 (150 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 敏感, 发酵葡萄糖产酸不产气。菌株 EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801 经 API 系统鉴定, 对于弧菌属均有极好的鉴定结果, 因此可将菌株 EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801 鉴定为弧菌科弧菌属的种类。

2.2 细菌总 DNA 的分离和 PCR 扩增 16S rRNA、HSP60 基因

分别从 3 株培养细菌中获得总 DNA, 以总 DNA 为模板, P1、P2 为引物, PCR 各扩增到约 1 370 bp 条带, 以总 DNA 为模板 P3、P4 为引物 PCR 分别扩增到 570 bp 的条带 (图 1)。

2.3 16S rRNA 基因序列分析

试验所测 3 个序列的多态性位点为 17 个, 多态率为 1.29%。Blast 分析表明菌株 EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801 16S rRNA 基因序列分别与 *V. harveyi* (AY046956)、*V. alginolyticus* (X74690)、*V. parahaemolyticus* (X74720) 的 16S rRNA 基因同源性最高, 分别为 99.8%、99.6%、

99.7%。所测 3 株弧菌 16S rRNA 基因之间的同源性大于 98.6%, 差异较小 (表 1)。所测序列与 GenBank 中其它弧菌的 16S rRNA 序列用 Vector NTI 6.0 构建的系统进化树显示 (图 2), 3 株弧菌与哈维氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌聚成一簇, 相互之间没有完全分开, 尚不能据此确定其种的分类地位。菌株 EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801 16S rRNA 基因序列已在 GenBank 中登录, 存取号分别为 AY332565、AY332566、AY456924。

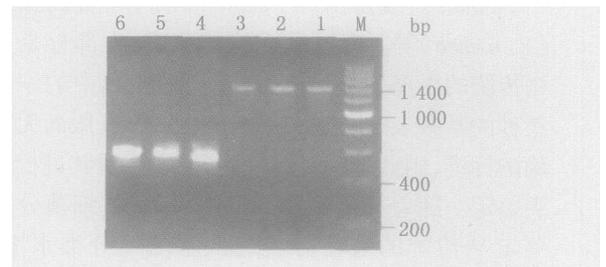


图 1 16S rRNA 和 HSP60 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplified products of 16S rRNA and HSP60 genes

M: 200bp 分子量标准; 1、2、3: 分别为菌株 EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物; 4、5、6: 分别为菌株 EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801 HSP60 基因 PCR 扩增产物

M: 200 bp marker; 1、2、3: 16S rRNA gene PCR products of strains EcGS020802, EcGS021001 and EcGS020801, respectively; 4、5、6: HSP60 gene PCR products of strains EcGS020802, EcGS021001 and EcGS020801, respectively

表 1 所测菌株 16S rRNA 和 HSP60 基因与 GenBank 中 3 种弧菌相应基因序列的同源性

Tab. 1 Similarities in 16S rRNA and Hsp60 genes between *Vibrio* isolates and

V. harveyi, *V. alginolyticus*, and *V. parahaemolyticus*

%

	EcGS020802	EcGS021001	EcGS020801	<i>V. harveyi</i>	<i>V. algi</i>	<i>V. para</i>
EcGS020802		88.0	91.0	95.6 *	87.7	88.6
EcGS021001	98.8		90.6	87.0	98.7 *	88.7
EcGS020801	98.8	98.8		90.4	90.6	95.3 *
<i>V. harveyi</i>	99.8	98.6	98.6		86.7	87.8
<i>V. algi</i>	98.7	99.6	99.6	98.8		87.9
<i>V. para</i>	98.6	99.5	99.7	98.6	99.8	

注: 对角线左下角为 16S rRNA 基因同源性, 对角线右上角是 HSP60 基因的同源性, * 代表差异显著 ($P < 0.05$), *V. algi* 代表 *V. alginolyticus*, *V. para* 代表 *V. parahaemolyticus*

Notes: lower left show similarities of 16S rRNA genes; upper right show similarities of Hsp60 genes; * represent significant difference ($P < 0.05$); *V. algi* represent *V. alginolyticus*; *V. para* represent *V. parahaemolyticus*

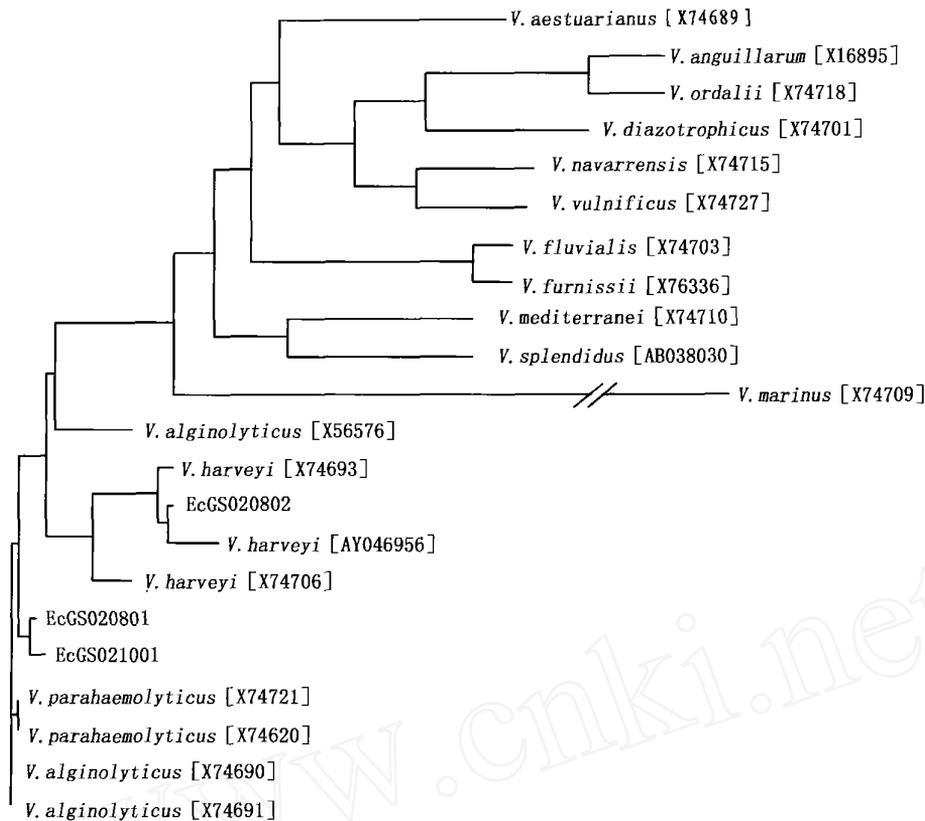


图 2 以 16S rRNA 基因构建的弧菌系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Vibrio* based on 16S rRNA genes

[]内代表在 GenBank 中序列存取号; [] represents accession number in GenBank

2.4 HSP60 基因序列分析

HSP60 基因序列分析表明,所测序列多态性位点为 72 个,多态率为 13.9%。所得序列 Blast 分析显示,菌株 EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801 HSP60 基因序列分别与 *V. harveyi* (AF230934)、*V. alginolyticus* (AF230931) *V. parahaemolyticus* (AF230951) HSP60 基因序列的同源性最高,分别为 95.7%、99.8%和 99.8%,所分离的 3 株弧菌 HSP60 基因序列同源性低于 91.0%,差异显著(表 1)。系统进化树显示,3 株弧菌分别与 *V. harveyi*、*V. alginolyticus* 和 *V. parahaemolyticus* 聚类(图 3),已经完全分开。综合以上结果,认为 EcGS020802 株为 *V. harveyi*, EcGS021001 株为 *V. alginolyticus*, EcGS020801 株为 *V. parahaemolyticus*。菌株 EcGS020802、EcGS021001、EcGS020801 HSP60 基因序列已在 GenBank 中的登录,存取号分别为 AY332568、AY332570 和 AY456925。

3 讨论

3 株病原菌经 API 系统鉴定,其生化谱与模式菌株均有一定的差异(表 2),不能有效的鉴定到种的水平。16S rRNA 基因序列分析表明,所测 3 株弧菌 16S rRNA 基因序列与 *V. harveyi*、*V. alginolyticus*、*V. parahaemolyticus* 16S rRNA 基因序列相互之间同源性均大于 98.6%(表 1),细菌分类学家普遍认为,16S rRNA 的同源性大于 97.5% 的细菌菌株可视为同种^[14]。而本研究所测的 3 株弧菌 16S rRNA 基因序列与 3 种弧菌的同源性均大于 97.5%,仍不能确定它们种的分类地位。因此,16S rRNA 不适宜用于亲缘关系较近的弧菌种之间的鉴别,这与 Stackebrandt 等^[15]认为 16S rRNA 序列同源性分析比较适合于属以上的分类阶元间亲缘关系的研究,而对于属以下的分类单位,其分辨率明显不足的观点一致。

3 种弧菌 HSP60 序列分析表明,不同弧菌种

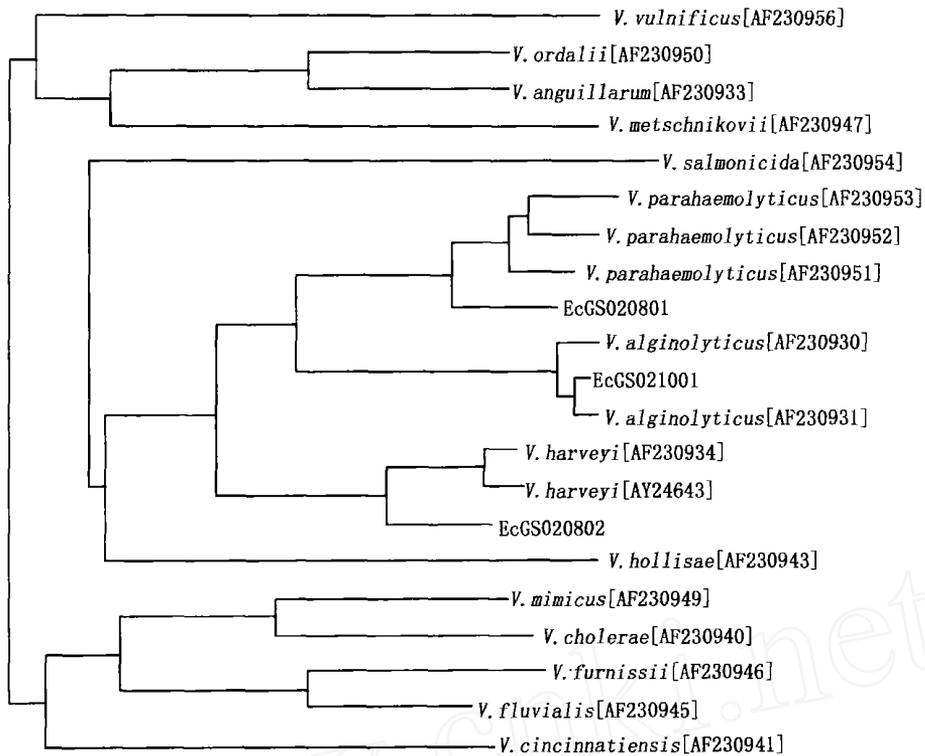


图 3 以 HSP60 基因构建的弧菌系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Vibrio* based on HSP60 genes

[]内代表在 GenBank 中序列存取号; []represents accession number in GenBank

表 2 API 系统鉴定结果与相应模式菌株结果的差异

Tab. 2 Differences of results between API system identification and corresponding model strains

待测菌株 exp. strains	鉴定项目 identical items	待测菌株 exp. strains	模式菌株 model strain
EcGS020802	- 半乳糖苷酶 - galactosidase	+	-
	纤维二糖 cellobiose	+	-
	- 半乳糖苷酶 - galactosidase	-	+
	- 葡萄糖 - Glucose	+	-
EcGS021001	纤维二糖 cellobiose	+	-
	甘露醇 mannitol	+	-
	- 半乳糖苷酶 - galactosidase	+	-
	L - 阿拉伯糖 L - arabinose	-	+
EcGS020801	- 麦芽糖苷酶 - maltase	-	+

类 HSP60 基因的同源性低于 91.0 % ,同种弧菌间 HSP60 基因的同源性大于 95.3 % (表 1) ,与 Kwok 等^[11]利用 HSP60 基因部分序列研究葡萄球菌属系统发育时,发现种内序列的相似性为 91 % ~ 98 % ,种间的序列相似性为 74 % ~ 93 % (平均为

82 %)的结果基本相符。16S rRNA 序列分析已经成为细菌分类的标准方法之一, HSP60 基因构建的弧菌系统进化树与 16S rRNA 基因构建的系统进化树形状基本相似,说明用 HSP60 基因作为分子标准对弧菌进行分类是可靠的。3 种弧菌 16S rRNA 的多态率仅为 1.29 % ,而 HSP60 基因的多态率为 13.9 % , HSP60 基因比 16S rRNA 携带更多的多态信息,因此, HSP60 基因比 16S rRNA 基因更适合于海水鱼致病性弧菌的分类研究。

参考文献:

- [1] 郑天伦,王国良,金 珊. 海水养殖动物弧菌病防治的研究进展[J]. 台湾海峡, 2002, 21(3): 372 - 378.
- [2] Woese C R. Bacterial evolution[J]. Microbiol Rev, 1987, 51(2): 221 - 271.
- [3] 莫照兰,茅云翔,陈师勇,等. 一株牙鲆出血症病原菌的分子生物学鉴定[J]. 高技术通讯, 2001, 12:12 - 17.
- [4] 莫照兰,茅云翔,陈师勇,等. 一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定[J]. 微生物学报, 2002, 42(3): 263 - 269.
- [5] 莫照兰,茅云翔,陈师勇,等. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(2): 131 - 141.
- [6] 叶 军,孔 杰,刘 萍,等. 对虾病原菌 2 - 5B 菌株 16SrRNA 基因片段的克隆和序列测定[J]. 海洋水产研究,

- 1997, 18(1):9 - 15.
- [7] Karlin S, Brocchieri L. Heat shock protein 60 sequence comparisons: duplications, lateral transfer, and mitochondrial evolution[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 2000, 97(21): 11348 - 11353.
- [8] Goh S H, Facklam R R, Chang M. Identification of *Enterococcus* species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(11): 3953 - 3959.
- [9] Kwok A Y, Chow A W. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Macrococcus* species based on partial Hsp60 gene sequences[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(1): 87 - 92.
- [10] Jian W, Zhu L, Dong X. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51(5): 1633 - 1638.
- [11] Kwok A Y, Su S C, Reynolds R P, et al. Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus* [J]. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49(3): 1181 - 1192.
- [12] Kwok A Y, Wilson J T, Coulthart M, et al. Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial Hsp60 gene sequences[J]. Can J Microbiol, 2002, 48(10): 903 - 910.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [14] 塞文婴, 东秀珠. 定向进化同源基因在细菌系统进化研究中的应用[J]. 微生物学通报, 2000, 27(5): 377 - 381.
- [15] Stackebrandt E, Liesack W, Goebel B M. Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis[J]. FASEB J, 1993, 7(1): 232 - 236.

【书评】

李泽瑶主编的《水产品安全质量控制与检验检疫手册》一书,已由企业管理出版社出版,它的出版有利于提高我国水产品的安全质量,保护消费者的合法权益,促进水产品进出口贸易的发展。

我国海岸线长,水产资源丰富,是世界主要渔业国之一。每年向世界五大洲的二十多个国家和地区出口的水产品,品质良好,受到国外的欢迎,为国家创造大量外汇,支援四化建设。同时,为了调节品种,根据需要,我国也进口一些水产品。因此强调水产品安全质量控制和检验检疫,对我国改革开放建设,人民生活水平的提高有着重要的意义。

为了提高人们的生活质量,科技人员对水产品安全控制做出了不懈努力,由一批长期从事水产品检验、监督管理的专家编写的《水产品安全质量控制与检验检疫手册》应运而生,为从事这方面的人员提供了强大的理论依据。

全书共分四个部分,约 760 千字,丰富的内容涵盖了水产品安全质量控制与检验检疫的主要理论和法规,及相关的法律法规。

第一篇 总论:对水产品作了精确的定义,详细介绍了水产品法律法规体系、标准,进出口水产品检验监督管理发展概况,以及进出口食品生产企业卫生注册登记管理体系。

第二篇 水产品安全卫生控制:分析了水产品的安全与危害,介绍了水产品安全卫生控制体系及其文件的编写方法,并以双壳贝类为例作了具体的卫生控制说明。

第三篇 水产品安全质量检验检疫:介绍了水产品生物危害、化学危害、物理危害的检验方法,概述了水产品的质量检验可通过品质感官检验、物理检验、包装检验、品质化学检验等方法,以及水产品检验的抽样方法和样品制备。

第四篇 附录:总结了与水产品相关的法律法规文件。

该书汇集了我国数十年来有关水产品安全的科研成果和技术精髓;大量吸纳了国际上的先进理论和技术基础;推出了构建未来水产品安全控制与检验检疫的全新理念。全书内容丰富、图文并茂、结构合理、层次清晰、数据精确翔实。它的出版,将为我国新世纪水产品质量的发展推波助澜,亦对科研和教学起到良好的促进作用。