

分子分型技术在弧菌研究中的应用进展

江 晓^{1,2}, 任春华¹, 胡超群^{1*}

(1. 中国科学院南海海洋研究所应用海洋生物学重点实验室, 广东 广州 510301; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 弧菌(*Vibrio*) 是各种海洋环境的正常细菌区系的重要组成成分, 也是水生动物与人类的重要病原之一。近年来出现了各种灵敏、快速、自动化且易于操作的分子分型方法, 它们在弧菌分型中的应用, 对揭示弧菌菌株在分子水平上的变异和进化规律、寻找病原及调查传播途径、控制疾病暴发有至关重要的作用。应用于弧菌的各种分子分型方法可分为依赖于 PCR 分型技术和不依赖于 PCR 分型技术, 各种分型技术具有各自的优、缺点; 其中前者由于高度的特异性、敏感性、可操作性、准确性、快速和费用低廉而得到广泛的应用, 但重复性较差; 后者由于基于生物体全基因组的操作, 所以相对于依赖于 PCR 技术的分型方法结果更为可信, 缺点是操作繁琐, 对某些特殊细菌不适用。现今的国内外弧菌分型中公认的“金标准”的 PFGE 方法与近年来新发展起来的 IRS-PCR 分型方法结合, 同时利用现有的数据建立国际分型数据库, 实现信息和技术标准与共享, 是弧菌分型的较好方法。

关键词: 弧菌; 分子分型; 聚合酶链式反应技术(PCR)

中图分类号: R378.3

文献标识码: A

文章编号: 1671-6647(2010)04-0563-07

弧菌属(*Vibrio*) 隶属于弧菌科, 是一类在世界范围内广泛分布的革兰氏阴性菌。自然界中弧菌种类特别丰富, 现已报道的共有 200 多种。其中至少有 12 个种, 如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*) 和拟态弧菌(*V. mimicus*) 等对人体有很强的致病性, 可引起人体严重腹泻并脱水, 或者出现伤口感染、中耳炎及败血症等; 此外, 弧菌也是水产养殖中最为常见、流行性最广和危害严重的细菌性病原之一。因此, 找到一种灵敏度高、分型力和重复性俱佳的方法用于寻找病原、调查传播途径、控制疾病的暴发和流行, 是当务之急^[1,2]。

目前, 用于弧菌的分型技术主要应用于同种弧菌菌株间, 可分为表型技术和分子分型技术两大类。

表型分型技术包括生物分型、血清分型、药敏分型、噬菌体生物分型和多位点酶凝胶电泳技术(Multilocus Enzyme Electrophoresis, MLEE), 这些方法虽然比较有效, 但在判断那些具有相似表型但遗传学上没有关联的菌株时往往缺乏灵敏度, 且在分型与重复性上都受到一定限制, 如诊断血清与标准噬菌体的获得、病原本身生理因素对分型的影响等^[2]。目前应用于弧菌分型的表型分型技术有血清学分型和噬菌体生物分型两种。

分子分型技术主要包括依赖于聚合酶链式反应技术(Polymerase Chain Reaction, PCR)的分型技术和不依赖于 PCR 的分型技术, 其中前者由于高度的特异性、敏感性、可操作性、准确性、快速和费用低而得到广泛应用; 后者基于生物体全基因组的操作, 所以相对于依赖 PCR 技术的分型方法结果更为可信。

1 依赖于 PCR 的分子分型方法

PCR 反应可以在较短的时间内将特定的脱氧核糖核酸(DNA)序列进行大量扩增, 从而达到可以用琼

* 收稿日期: 2009-08-12

资助项目: 国家重点基础研究发展计划项目——海水鱼类病原弧菌致病基因与疾病发生(2006CB1018030); 中国水产科学研究院水产种质资源与养殖技术重点开放实验室开放基金课题——不同养殖水域溶藻弧菌基因型的比较研究

作者简介: 江 晓(1983-), 女, 湖北黄冈人, 硕士, 主要从事海洋水产病害控制及生物技术方面研究。E-mail: jiangxiao4367@126.com

* 通讯作者, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事海洋水产增养殖、病害控制及生物技术方面研究。E-mail: cqhu@scsio.ac.cn

(高 峻 编辑)

脂糖或者聚丙烯酰胺凝胶电泳检测的目的。由于 PCR 技术耗时短、结果准确、方法简单、费用低廉,人们提出了很多改进的 PCR 方法用于细菌分型。目前常用于弧菌分型的 PCR 方法包括随机扩增多态性(Random Amplified Polymorphism DNA, RAPD)、用 PCR 检测重复序列间 DNA 差别的分型系统、扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)、限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, RFLP)、低频限制性位点 PCR (Infrequent-Restriction-Site PCR, IRS-PCR) 和多基因位点分型技术(Multilocus Sequence Typing, MLST) 等。

1.1 随机扩增多态性 DNA 分型技术(RAPD)

RAPD,是用一系列任意的核苷酸序列(10个碱基)作为引物,通过引物与模板 DNA 序列随机配对进行 PCR 扩增。扩增时只有距离最近、方向相反的 2 个引物间的模板 DNA 区段才能被扩增。因此,如果基因组在这些区段发生了 DNA 片段缺失、插入或碱基突变,就可能引起这些特定结合位点的分布发生相应变化。通过电泳对扩增产物 DNA 片段的多态性进行检测、分析,就可以反映出不同菌株基因组的 DNA 特点,从而对它们进行分型。RAPD 技术的使用范围非常广,优点是简便、快捷、费用低、再现性和灵敏性高,一套引物可用于多个物种的分析,不需预知被检对象的核酸序列并可以显示差异表达基因;缺点是无法鉴定杂合子,分辨力低,且结果的稳定性不高^[3]。Goarant 等^[4]利用 RAPD 对虾类的弧菌病原进行了分子分型,结果表明,在虾类弧菌病流行病学研究中,RAPD 是一种快速、有效的分型方法;李孝权等^[5]用单一引物扩增来自广州地区的 46 株副溶血弧菌,RAPD 图谱呈现出不同程度的多态性、为副溶血弧菌所致食源性疾病的流行病学调查和溯源提供了有力的实验证据;Sudheesh 等^[6]用 RAPD 方法对 24 株副溶血弧菌和溶藻弧菌进行基因分型,聚类分析后将 15 株副溶血弧菌和 9 株溶藻弧菌分为 2 个类型,其中溶藻弧菌又被分为 2 个亚组,研究表明,该结果表明溶藻弧菌和副溶血弧菌有高度的遗传多样性。

1.2 用 PCR 检测重复序列间 DNA 差别的分型系统

该方法是根据细菌基因组中的重复片段来设计引物,这种重复片段属于细菌染色体上的一种分散的重复序列,这种结构遍布于许多微生物的染色体上,以不同的间隔存在,因此可以设计外向型引物与这些重复序列结合进行 PCR,扩增其间隔片段。不同菌株可以形成大小不等的扩增片段从而可以揭示菌株间基因型的变异。常用的重复序列包括基因外重复序列(REP)和肠道菌重复性基因内一致性序列(ERIC)。

1.2.1 基因外重复序列-PCR(rep-PCR)

基因外重复序列技术(Repetitive Extragenic Palindrome PCR, rep-PCR)是扩增细菌基因组中广泛分布的短重复序列间的片段,通过电泳条带比较分析,揭示基因组间的差异。此方法的优点是对于大量或少量菌株分型均适用,简单易行、灵敏度高、结果特异性好、分辨力高、再现性好、不需要特殊电泳设备,并可建立分型标准数据库^[7];缺点是对模板 DNA 的纯度要求较高,不如 RAPD 技术简单快速。刘佳妍等^[8]用 REP-PCR 技术将 40 株副溶血性弧菌分为 21 个型,优势菌型为 G1 型,占菌株总数的 15%,结果还表明,REP-PCR 分辨力指数可达到 0.953。

1.2.2 肠道菌重复性基因内一致性序列(ERIC-PCR)

肠道菌重复性基因内一致性序列(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR, ERIC-PCR)是一种特殊的 RAPD 技术,它是利用与插入序列保守区互补的 18~20 bp 的引物对基因组做扫描式的扩增,由于插入序列中间片段大小不一,从而产生了基因组多态性的指纹图谱。此方法优点是简单、快速、敏感和分辨率高;缺点是忽视了同一分子量大小条带异源性的事实,导致判定的结果与实际结果相佐的现象。Kahla 等^[9]应用 ERIC-PCR 将 34 株表型相同的溶藻弧菌分成 19 个基因型,且基因多态性较高,说明 ERIC-PCR 是一种有效的分子分型方法;Bhowmick 等^[10]将分离自印度水产品中的 71 株副溶血弧菌用 ERIC-PCR 分型,其中 37 株副溶血弧菌包含 6~8 个大小在 500~3 500 bp 的片段,而分子大小为 1 500 bp 的片段存在于所有菌中,另外 38 株菌仅扩增出 5 条带,最终分为 13 个型,鉴别指数为 0.94;Wong 等^[11]的研究则表明

ERIC-PCR 的鉴别指数为 0.98,并认为该方法分型能力强于 PFGE 和核糖分型。

1.3 扩增片段长度多态性分析技术(AFLP)

AFLP 将限制性内切酶酶切片段长度多态性技术(RFLP) 的可靠性和 PCR 技术的高效性结合起来,可应用于任何物种 DNA 的相关研究。基因组 DNA 先用限制性内切酶双酶切,再在两端连上特定的接头,根据接头和酶切位点的序列设计引物。不同样品由于 DNA 序列不同,扩增出的片段数及长度各不相同,经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳就能区分出样品之间的差异。AFLP 分型的优点是重复性好,分辨力高,可用于细菌的长期进化过程研究,且便于实验室间的资料交流和计算机资料分析;缺点是对 DNA 要求较高,操作复杂耗时,分辨力的大小在很大程度上取决于限制性内切酶的组合和引物的选择,且揭示的基因多态性不够丰富^[12]。Naris^[13]的研究工作显示,AFLP 技术也具有很好的分型能力,适用于流行病学调查研究;Lan 等^[14]利用 AFLP 技术对 45 株霍乱弧菌进行了分析,表明引起 1991 年非洲霍乱流行的菌株带型与 1989 年的带型一致,说明发生大流行前较长一段时间就已存在此类菌株;Thompson 等^[12]应用 AFLP 技术对 1991—2001 年从巴西分离到的 106 株 O1、非 O1 和非 O139 霍乱弧菌进行了聚类分析,结果将 106 株霍乱弧菌分为 7 大类,有些带型长期在不同的地点存在,表明了霍乱弧菌对环境变化的适应能力极强。

1.4 限制性片段长度多态性分析(RFLP)

RFLP 是利用 PCR 扩增目的基因,然后用限制性内切酶酶切样品 DNA,产生大量的限制性酶切片段。由于目标 DNA 之间存在有同源性和变异型,当用同一种限制性内切酶酶切不同品种或同一品种不同样品时,不同酶切产物中就会含有相同或不同的长度片段,从而解读出目标样品之间在 DNA 分子水平的差异。此方法的优点是简单快速,缺点是分辨率低。Suthienkul 等^[15]用 RFLP 分析了 137 株副溶血弧菌的耐热直接溶血素基因和耐热相关溶血素基因,结果显示,用 *Hind* III 酶切后,耐热直接溶血素基因能分为 5 型,而耐热相关溶血素基因分为 4 型;Parvathi 等^[16]用 RFLP 将 2002—2004 年印度分离的 27 株副溶血弧菌的耐热相关溶血素基因分为 5 型,并发现一些菌株使用 *Hae* III 和 *Hinc* II 酶切后获得的 RFLP 型完全不同,而使用 *Taq* I 酶切似乎更合适;Hidetoshi 等^[17]应用 RFLP 成功地将 49 株分属于 35 个种的弧菌分成 27 个基因型,其中 19 个种有特定的 16S rRNA 基因型,说明 RFLP 是一种有效的分型方法。

1.5 低频限制性位点 PCR (IRS-PCR)

IRS-PCR 技术是最新建立并迅速发展的一种新型基因分型技术,原理是用 2 种不同的限制性内切酶消化基因组 DNA,其中一种酶的酶切位点较多,另外一种较少,在消化片段粘性末端加上双链接头,以连接好的产物为模板进行 PCR 扩增,扩增后产物的两侧为稀有限制性位点的 DNA 序列,不同样品由于扩增特异片段的不同而在聚丙烯酰胺凝胶电泳中显示不同的电泳条带。此方法的关键特征是利用了基因组中限制性酶切位点的多少,选择性地扩增 DNA 片段。优点是重复性好、分辨率高、操作简单、快速、灵敏和省时;缺点是对一些较为特殊的菌株分辨率不高。Ren 等^[1]利用 IRS-PCR 方法将 45 株溶藻弧菌分成 24 个片段大小在 50~600 bp 的 IRS-PCR 型,并证明此方法与 PFGE 有相同的再现率,但 IRS-PCR 方法分型率($D=0.953$) 较 PFGE 高。

1.6 多基因位点分型技术(MLST)

MLST 技术源于 MLEE,MLST 不分析基因的表达产物,而是利用多对 20mer 左右的特异性引物对来扩增待测菌株的看家基因,以此来分析基因的核苷酸序列的不同^[18],这正好解决了 MLEE 不能直接通过分析特殊位点的表达产物而推断其碱基序列这一问题。其优点为分辨力高、结果清晰、省时省力、可直接进行网络实验室间比较,适合全球流行病学研究^[19];缺点是费用昂贵,仪器设备要求较高。Chowdhury 等^[20]同时测定 *gyrB*、*recA*、*dnaE* 和 *gnd* 的基因序列,根据各基因序列的多态性将 81 株属于 16 个血清型的副溶血

弧菌成功分型,克服了血清学分型方法对毒力株分型的不足;Farfan 等^[21]对 29 株霍乱 O139 群菌株的 6 个基因位点进行了测序分析,MLST 结果表明,O139 群菌株至少存在 3 个不同的克隆,而且这些菌株之间不存在基因内重组;Byun 等^[22]应用 4 个管家基因对第 6 次大流行菌株、第 7 次大流行菌株和美国海湾株进行了分析,结果表明这 3 个致病性克隆群高度相关。

2 不依赖于 PCR 技术的分子分型方法

不依赖于 PCR 技术的分子分型方法包括核糖体分型技术(Ribotyping, RT)、脉冲场凝胶电泳技术(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)、质粒图谱分析(Plasmids Genotype)、DNA 测序分型及染色体 DNA 限制性内切酶分析技术(Restriction Enzyme Analysis, REA)等,其中目前应用于弧菌的分型方法有 RT 和 PFGE 两种。

2.1 核糖体分型技术(RT)

核糖体分型是第 1 个用于细菌分型的分子指纹技术,是在 DNA 印迹和 RFLP 基础上发展起来的一种分型方法,它将提取的细菌染色体 DNA 用限制性内切酶消化,经电泳分离和 Southern 转印后,与经标记的 rRNA 基因探针杂交,根据带型的不同对细菌进行分型。该方法的优点是一种通用的探针可用于几种不同的生物体^[23]以及分型图谱稳定性高、条带多^[24];缺点是操作方法繁琐。此方法在霍乱弧菌的分型研究中使用较为广泛。段广才等^[25]应用核糖体分型对国内外 O139 群霍乱菌株进行分型分析发现,当时国内流行的菌株与印度和孟加拉国流行的优势菌株不属于同一基因型;Marshall 等^[26]利用核糖体分型技术将 60 株副溶血弧菌分成 15 个核糖体型;朱海明等^[27]对 2003—2004 年广东省食品及食物中毒病人中分离得到的 64 株副溶血弧菌进行了核糖体分型,52 株食品分离株分为 41 个核糖体型,12 株病人分离株分为 10 个核糖体型;Zorrilla 等^[28]用核糖体分型技术将 34 株溶藻弧菌分成 23 个核糖体型,并且所有分型菌株均显示 13~19 条稳定的、再现性好的条带。结果表明,对于溶藻弧菌来说,核糖分型是一种敏感的分型方法。

2.2 脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)

PFGE 的原理:细菌包埋于琼脂块中,用合适的内切酶对整个细菌染色体进行酶切,酶切片段在特定的电泳系统中借助电场方向不断交替变换及合适的脉冲时间等条件得到良好的分离,从而在凝胶上按染色体片段长度的不同而呈现出不同的电泳带型^[29]。该方法的优点是分辨力强、图谱清晰、重复性好、易于观察和解释,且能满足不同实验室间的分型结果比较,被认为是目前所有分型方法中的金标准;缺点主要表现在:不能分辨大于 750 kb 的线状 DNA 分子,电泳耗时长,凝胶孔径大小对 DNA 分子在凝胶中的移动影响较大,且很多环境分离弧菌株在进行 PFGE 分型时易发生核酸降解^[30]。Ren 等^[1]成功地利用 PFGE 方法将 45 株溶藻弧菌分成 24 个基因型,分型率为 95.3%;Wong 等^[31]将分离自亚洲、欧洲和美国等 15 个国家和地区的 535 株副溶血弧菌用 *Sfi* I 酶切后进行 PFGE 分型,发现相对于使用 *Apa* I,利用 *Sfi* I 消化会获得更清晰的分型条带;金春光等^[32]用 PFGE 方法对 O139 群霍乱弧菌进行了分型,结果显示 14 株 O139 群霍乱弧菌经 *Sfi* I 酶切后电泳分离可得到一个 PFGE 型,用 *Not* I 酶切后电泳分离可分为 2 个 PFGE 型。目前针对部分菌株在 PFGE 分型时易发生核酸降解的原理还不是很清楚,Koort 等^[33]提出利用降低 PFGE 反应温度、延长酶切时间可以优化 PFGE 分型,降低核酸降解率;Wong 等^[31]提出使用羟乙基哌嗪乙磺酸作为电泳缓冲液也可有效减少 DNA 降解。

3 结 语

不同的分型方法各有优势,表型技术由于表型变化总是落后于基因型的变化,从而逐渐被分子分型技术

所取代。具体到弧菌来说,目前以 PFGE 为代表的分子分型技术已成为世界上各实验室的主要分型方法。我国学者在对弧菌进行分型时多采用传统的表型分型如噬菌体分型和血清分型。但由于其可靠性和重复性不佳,分型率及分辨率不高,操作费时,技术复杂,并非弧菌分型的最佳选择。随着分子生物学的发展,近年发展的基因分型相比传统的表型分型结果更为准确,敏感性、特异性、分型率和分辨率也较好,故在现代的弧菌分型中具有不可替代的作用。近年来,我国学者也开始采用 PFGE 分型、RAPD 分型、ERIC-PCR 等分子分型方法对弧菌进行分型^[1,5,8,32],各种方法因其各自的优缺点而有不同的适用范围,且都能达到分型目的,但是作为分型金标准的 PFGE 方法还是被大多数学者所采用。

现有的研究资料表明,用不同的分型方法对同一组细菌进行分型,其结果不完全一致^[34]。一般说来分子分型的分辨率比传统分型要高,但如果将分子分型和传统分型两种方法联用,例如噬菌体分型或血清分型加上某种基因分型^[35-37],分辨率会更高,结果分析也会更加直观准确。王晓萍等^[35]和陈杰等^[36]采用血清学分型、噬菌体分型及 PFGE 分型三种分型方法分别对不同来源的霍乱弧菌进行了分型分析,结果显示相同的血清型、噬菌体型可以有不同的 PFGE 带型;李柏生等^[37]应用血清学分型、噬菌体分型和 PFGE 三种分型方法对 170 株霍乱弧菌进行分型的结果显示,这 3 种分型结果间有联系也有区别,但分子分型方法的分型率较血清学和噬菌体分型高。

但是,现在还没有哪种分子分型方法能将重复性、可比性、分辨力、操作简单及费用低廉等几个优点同时综合起来。尽管某种分型方法可以将分型力、操作简单和重复性结合起来,但是结果解释的困难性也较大。同时,由于弧菌传播速度快,波及范围广,如何提高各种分型方法的分型率和分辨力,建立和统一各种方法的标准操作规程和国际分型数据库,并实现信息的共享,是促进弧菌分型的必要之道。

现今的国内外弧菌分型中公认的“金标准”的 PFGE 方法结合近年来新发展起来的 IRS-PCR 分型方法,同时利用现有的数据建立国际分型数据库,实现信息和技术标准与共享,是弧菌分型的较好方法。

参考文献 (References):

- [1] REN C H, HU C Q, LUO P, et al. Genotyping of *Vibrio alginolyticus* isolates from Daya Bay by infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2008,22(4):267-271.
- [2] ALONSO R, ACUCKEN H M, PEREZ D J C, et al. Comparison of serotyping, biotype and bacteriocin type with rDNA RFLP patterns for the type identification of *Serratia marcescens*[J]. *Epidemiology Infection*,1993,111:99-107.
- [3] BALDY C K. Rep-PCR-a variant to RAPD or an independent technique of bacteria genotyping? A comparison of the typing properties of rep-PCR with other recognised methods of genotyping of microorganisms[J]. *Acta Microbiologica Polonica*,2001,50(3-4):189-204.
- [4] GOARANT C, MERIEN F, BERTHE F, et al. Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio spp.* Pathogenic for shrimp[J]. *Applied and Environmental Microbiology*,1999,65(3):1145-1151.
- [5] LI X Q, LIU H C, CHAI Q X, et al. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from food-borne disease by random amplified polymorphic DNA and analysis (RAPD)[J]. *Modern Preventive Medicine*,2005,32(7):726-28. 李孝权,刘衡川,柴巧学,等. 副溶血性弧菌食源性疾病分离株的 RAPD 分子分型研究[J]. *现代预防医学*,2005,32(7):726-728.
- [6] SUDHEESH P S, JIE K, XU H S. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* isolated from cultured shrimps[J]. *Aquaculture*,2002,207(30):11-17.
- [7] MALUPING R P, RAVELO C, LAVILLA P C R, et al. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from the Philippines by PCR-based methods[J]. *Journal of Applied Microbiology*,2005,99:383-391.
- [8] LIU J Y, JIN L L, WANG Q Y. Repetitive-element PCR of bacteria and its application[J]. *Journal of Microbiology*,2006,26(3):90-93. 刘佳妍,金莉莉,王秋雨. 细菌基因组重复序列 PCR 技术及其应用[J]. *微生物学杂志*,2006,26(3):90-93.
- [9] KAHLA N A B, CHAIEB K, BESBES A, et al. Virulence and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Tunisian cultured gilthead seabream and sea bass outbreaks[J]. *Veterinary Microbiology*, 2006,117:321-327.
- [10] BHOWMICK P P, KHUSHIRAMANI R, RAGHUNATH P, et al. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the southwest coast of India[J]. *Letters in Applied Microbiology*,2008,46(2):198-204.
- [11] WONG H C, LIN C H. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers[J]. *Journal of*

- Clinical Microbiology, 2001, 39(12):4233-4240.
- [12] THOMPSON F L, THOMPSON C C, VICENTE A C, et al. Genomic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 2001 as revealed by fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(5):1946-1950.
- [13] NAIR S, SCHREIBER E, THONG K L, et al. Genotyping by amplified fragment length polymorphism fingerprinting provides increased discrimination as compared to pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 41:35-43.
- [14] LAN R, REEVES P R. Pandemic spread of *cholera*: genetic diversity and relationships within the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(1):172-181.
- [15] SUTHIENKUL O, IIDA T, PARK K S, et al. Restriction fragment length polymorphism of the *tdh* and *trh* genes in clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34(5):1293-1295.
- [16] PARVATHI A, KUMAR H S, BHANUMATHI A, et al. Molecular characterization of thermostable direct haemolysin related haemolysin (TRH)-positive *Vibrio parahaemolyticus* from oysters in Mangalore, India[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(6):997-1004.
- [17] HIDETOSHI U, KUMIKO K T, KOUICHI O. 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family *Vibrionaceae*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 152(1):125-132.
- [18] SALCEDO C, ARREAZA L, ALCALA B, et al. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(2):757-762.
- [19] MAIDEN M C, BVGRAVES J A, FEIL E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1998, 95(6):3140-3145.
- [20] CHOWDHURY N R, STINE O C, MORRIS J G, et al. Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(3):1280-1282.
- [21] FARFAN M, MIANA G D, FUSTE M C, et al. Allelic diversity and population structure in *Vibrio cholerae* O139 Bengal based on nucleotide sequence analysis[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(5):1304-1313.
- [22] BYUN R, ELBOURNE L D H, LAN R, et al. Evolutionary Relationships of Pathogenic Clones of *Vibrio cholerae* by sequence analysis of four housekeeping genes[J]. Infection and Immunity, 1999, 67(3):1116-1124.
- [23] GRIMONT F, GRIMONT P A D. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools[J]. Research in Microbiology, 1986, 137(22):165-175.
- [24] SCHUCHAT A, SWAMINATHAN B, BROOME C V. Epidemiology of human *Listeriosis*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1991, 4(2):169-183.
- [25] DUAN G C, GAO S Y, QI G M, et al. Comparisons on the molecular characteristics of *Vibrio cholerae* O139 isolated from China, India and Bangladesh[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 1994, 14(6):373-375. 段广才, 高守一, 祁国明, 等. 霍乱弧菌 O139 国内外菌株分子生物学特征比较[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1994, 14(6):373-375.
- [26] MARSHALL S, CLARK C G, WANG G, et al. Comparison of molecular methods for typing *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37:2473-2478.
- [27] ZHU H M, DENG F, YAN J W, et al. Analysis of rDNA fingerprinting patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from food and diarrhea patients[J]. South China Journal of Preventive Medicine, 2006, 32(6):1-5. 朱海明, 邓峰, 严纪文, 等. 广东省副溶血性弧菌 rDNA 指纹图谱特征分析[J]. 华南预防医学, 2006, 32(6):1-5.
- [28] ZORRILLA I, MORINIGO M A, CASTRO D, et al. Intraspecific characterisation of *Vibrio alginolyticus* isolates recovered from cultured fish in Spain[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95:1106-1116.
- [29] HUBNER R J, COLE E M, BRUCE J L, et al. Types of *Listeria monocytogenes* predicted by the positions of EcoRI cleavage sites relative to ribosomal RNA sequences[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1995, 92(11):5234-5238.
- [30] LU P L, CHANG S C, PAN H J, et al. Application of pulsed field gel electrophoresis to the investigation of a nosocomial outbreak of *vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2000, 33(1):29-33.
- [31] WONG H C, LIU S H, CHIOU C S, et al. A pulsed field gel electrophoresis typing scheme for *Vibrio parahaemolyticus* isolates from fifteen countries[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 114(3):280-287.
- [32] JIN C G, SHI Y Z, XU J Y, et al. Typing of *Vibrio cholerae* O139 by pulsed-field gel electrophoresis[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2007, 17(4):622-623. 金春光, 石优章, 徐景野, 等. 用脉冲场凝胶电泳方法对 O139 霍乱弧菌分型的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(4):622-623.
- [33] KOORT J M, LUKINMAA S, RANTALA M, et al. Technical improvement to prevent DNA degradation of enteric pathogens in pulsed-field gel electrophoresis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(9):3497-3498.

- [34] RIPABELLI G, SAMMARCO M L, MCLAUCHLIN J, et al. Molecular characterization and antimicrobial resistance of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio alginolyticus* isolated from mussels (*Mytilus galloprovincialis*) [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2003, 26: 119-126.
- [35] WANG X P, GUO W Z, ZHAN L F, et al. Characteristics of epidemic *Vibrio cholerae* strains from Fujian Province in 2005 [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2007, 17(11): 1965-1967. 王晓萍, 郭维植, 詹峦峰, 等. 2005 年福建省霍乱弧菌流行菌型特征分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(11): 1965-1967.
- [36] CHEN J, LAI Y X, LIU L, et al. Pathogenic characteristics of sporadic cholera cases in Dandong City of Liaoning Province and the relationship with *Vibrio cholerae* polluted water and seafood [J]. Disease Surveillance, 2007, 22(7): 444-446. 陈杰, 赖怡湘, 刘丽, 等. 丹东市散发霍乱病例病原学特征及与水体和海(水)产品霍乱弧菌污染间的关系 [J]. 疾病监测, 2007, 22(7): 444-446.
- [37] LI B S, TAN H L, WANG D C, et al. Study of drug resistance and molecular typing of *Vibrio cholerae* from cholera cases and outer environment in Guangdong Province [J]. Disease Surveillance, 2009, 24(5): 319-324. 李柏生, 谭海玲, 王多春, 等. 广东省霍乱病例与环境来源霍乱弧菌的耐药性和分子分型研究 [J]. 疾病监测, 2009, 24(5): 319-324.

Progress in Application of Molecular Typing Technology for *Vibrio* Studies

JIANG Xiao^{1,2}, REN Chun-hua¹, HU Chao-qun¹

(1. The Key Laboratory of Applied Marine Biology of Guangdong Province and Chinese Academy of Sciences, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Vibrios* are important members of normal microflora living in various of marine environments. And they belong to pathogens for serious diseases of aquatic animals and human beings. In recent years, molecular typing methods have been developed, in order to achieve their better sensitivity, rapidity, automaticity, and easy operation. The applications of these methods to *Vibrio* molecular typing have important effects on finding regularity for mutation and development of *Vibrio* strains on the molecular level, looking for the pathogeny, investigating the disease infection ways, or controlling the disease outbreak. In the paper, the molecular typing methods applicable to *Vibrio* studies are classified into two kinds. One is dependent upon PCR, and the another is independent upon PCR. The two kinds of the methods have their respective advantages, and disadvantages. The former is widely applied because of its unique features, sensitivity, operative applicability, accuracy, rapidity, and inexpensive cost, but it is noticed that its repetitiveness is less favourable. The latter is more reliable because the entirety of genom which are contained in *Vibrio* is involved in the operating process of the latter, but its disadvantages are the overelaborate details in its related operation and the inapplicability to some special *Vibrio* species. Among *Vibrio* typing technology in the domestic and international studies at present, a better method is that the combination of the recognized "golden standard" i. e. the PFGE method with the IRS-PCR method developed recently, using at the same time the present available data to set up and to realize the commonly sharing of the information and technological standards.

Key words: *Vibrio*; molecular typing; Polymerase Chain Reaction (PCR)

Received: August 12, 2009