

霍乱弧菌和副溶血弧菌分离株的 *gyrB* 基因系统发育分析

侯晓丽¹, 曹清毅¹, 潘劲草², 陈 智^{1*}

(¹ 浙江大学附属第一医院传染病研究所 杭州 310003)

(² 浙江省杭州市疾病预防控制中心 杭州 310006)

摘 要: 依据 *gyrB* 基因部分编码序列构建系统发育树以分类和鉴别霍乱弧菌和副溶血弧菌, 并探讨其种系发生关系。扩增并测序 13 株霍乱弧菌、8 株副溶血弧菌、2 株嗜水气单胞菌及 1 株类志贺邻单胞菌的 *gyrB* 基因(编码 DNA 促旋酶 B 亚单位)序列, 并采用距离法与最大似然法构建系统发育树。两种方法所构建的树结构完全一致, 霍乱弧菌、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌及类志贺邻单胞菌各自形成一个独立的簇。其中, 霍乱肠毒素基因(*ctxA*)阳性的霍乱弧菌(8 株 O139 群与 2 株 O1 群 El Tor 型)聚类成一分枝, 3 株副溶血弧菌临床株(1 株 2002 年流行株, 2 株 2004 年分离株)与 1 日本菌株及 2001 年 1 株自环境分离的毒力株聚类。系统发育分析靶分子 *gyrB* 基因可以良好区分上述 4 种常见病原菌。产毒 O139 群霍乱弧菌与产毒 O1 群 El Tor 型霍乱弧菌关系密切。副溶血弧菌环境毒力株与本地区临床主要流行株在系统发育关系上较为接近, 可能是潜在的致病菌。

关键词: *gyrB* 基因; 系统发育分析; 霍乱弧菌; 副溶血弧菌; 嗜水气单胞菌; 类志贺邻单胞菌

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)06-0884-06

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)作为弧菌科内两种主要致病菌, 可分别引起霍乱及食物中毒。自 1820 年以来每次埃尔托霍乱世界大流行均波及我国, 并于 1993 年首次在新疆发生了 O139 霍乱局部爆发流行, 且持续流行至今^[1]。近年来, 特别是 2005 年第三季度霍乱病例数增多, 全国累计报告 638 例, 死亡 2 人, 比去年同期上升了一倍多, 病例主要集中在福建、浙江地区。副溶血弧菌是我国沿海地区夏、秋季食物中毒和急性胃肠炎的主要病原菌^[2], 主要是由于摄食污染的海产品而引起的。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)是弧菌科另两种较多见的致病菌, 一般认为是条件致病菌, 主要引起腹泻, 近年有报道指出嗜水气单胞菌可合并霍乱弧菌感染^[3,4]。对于彼此间关系密切的弧菌科细菌而言, 传统的基于生化反应特征的表型鉴定方法相对比较费时, 且其正确性有时也受到置疑, 如在临床微生物实验室易将嗜水气单胞菌及类志贺邻单胞菌误鉴定为弧菌属细菌^[5]。

随着分子生物学技术的发展, 基于基因型鉴定菌株的方法已被广泛采用。16S rRNA 基因是最常用的分子靶标, 但由于该基因高度保守, 对于种间水平的鉴定往往分辨率不足, 如, 副溶血弧菌的 16S rRNA 基因序列与溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)高度相似(~98%), 因而不易区分^[6]。*GyrB* 基因是单拷贝基因, 普遍存在于各种细菌中, 编码 DNA 促旋酶(DNA gyrase)的 B 亚单位。DNA 促旋酶为一种细菌中的 II 型拓扑异构酶, 在 DNA 复制及 DNA 超螺旋结构的维持过程中起着重要作用。*GyrB* 基因相对于 16S rRNA 基因具有较高的替换率, 主要是由于其作为蛋白编码基因, 所固有的遗传密码子兼并性使得 DNA 序列可以发生较多替换而不改变氨基酸序列, 尤其对于密码子第三位核苷酸^[7], 因此特别适用于菌种间的区别和鉴定。本文以四种常见弧菌科病原菌: 霍乱弧菌、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌及类志贺邻单胞菌的 *gyrB* 基因部分序列为基础, 构建系统发育树, 探讨了霍乱弧菌、副溶血弧菌常见血清型及产毒、无毒株间的系统发育关系, 评价 *gyrB* 基因作为通用分子靶标分类鉴别这些细菌的有效性。

基金项目: 浙江省科学技术厅重点项目“重要传染病诊断和治疗新技术的研究”(2003C13015, 021103128)

* 通讯作者。Tel: 86-571-87217007; Fax: 86-571-87217044; E-mail: chenchi@zju.edu.cn

作者简介: 侯晓丽(1976-), 女, 山西人, 博士研究生, 主要从事临床微生物分子诊断研究。E-mail: ch3h966@sohu.com

收稿日期: 2005-12-14; 接受日期: 2006-02-14; 修回日期: 2006-05-03

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验用菌株及其基因组 DNA: 13 株霍乱弧菌与 6 株副溶血弧菌基因组 DNA 由浙江省杭州市疾病预防控制中心提供。以上 13 株霍乱弧菌中除 2 株 *ctxA* 阴性 O1 群外, 其余 11 株 (9 株 O139 群与 2

株 O1 群) 来自于潘劲草^[8]等 16S rRNA 核糖体基因分型的 110 株 O139 群与 20 株 O1 群霍乱弧菌, 6 株副溶血弧菌中有 4 株来源于张蔚等研究的 174 株临床与环境副溶血弧菌分离株^[2]。另有 2 株副溶血弧菌、2 株嗜水气单胞菌及 1 株类志贺邻单胞菌由浙江大学附属第二医院提供。实验所用菌株以及具体背景资料见表 1。

表 1 实验所用菌株

Table 1 All isolations used in this study

Strain No.	Species	Source of isolates/district	Time	Serotype	Virulence	Ribotyping ^a
513	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical / Shangchen	1997	O139	<i>ctxA</i> +	II
322	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical / Hangzhou	1997	O139	<i>ctxA</i> +	IV
514	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical / Xiaoshan	1998	O139	<i>ctxA</i> +	VI
515	<i>Vibrio cholerae</i>	Carrier / Jianggan	2000	O139	<i>ctxA</i> +	VII
321	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical / Bingjiang	2000	O1, ogawa, El Tor	<i>ctxA</i> +	A
323	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical / Xianshan	2000	O1, ogawa, El Tor	<i>ctxA</i> -	/
519	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical / Shangchen	2001	O1, ogawa, El Tor	<i>ctxA</i> -	/
512	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical / Jianggan	2001	O139	<i>ctxA</i> +	II
518	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical / Shangchen	2001	O1, inaba, El Tor	<i>ctxA</i> +	B
516	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical / Shangchen	2001	O139	<i>ctxA</i> -	α
047	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical / Hangzhou	2004	O139	<i>ctxA</i> +	II
511	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical / Gongshu	2004	O139	<i>ctxA</i> +	II
510	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical / Jianggan	2004	O139	<i>ctxA</i> +	II
524	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Environment/ Hangzhou	2001	O1 :K?	<i>tdh</i> -, <i>trh</i> +	/
520	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	outbreak clinical / Hangzhou	2002	O3 :K6	<i>tdh</i> +, <i>trh</i> -	/
522	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	outbreak clinical / Hangzhou	2002	O4 :K8	<i>tdh</i> +, <i>trh</i> -	/
523	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Clinical / Xiaoshan	2004	O1 :K1	<i>tdh</i> -, <i>trh</i> +	/
460	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Clinical / Hangzhou	2004	/	/	/
461	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Clinical / Hangzhou	2004	/	/	/
WP1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Kyoto University	/	/	<i>tdh</i> +, <i>trh</i> 1 -, <i>trh</i> 2 -	/
AQ4037	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Kyoto University	/	/	<i>tdh</i> -, <i>trh</i> 1 +, <i>trh</i> 2 -	/
287	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Clinical / Hangzhou	2004	/	/	/
295	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Clinical / Hangzhou	2004	/	/	/
413	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Clinical / Hangzhou	2004	/	/	/

^aResults derived from Pan Jin-cao *et al.* ^[8]

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR 扩增反应试剂购自 TaKaRa 公司。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。扩增引物: UP-1, 5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3'; UP-2r, 5'-AGCAGGGTACGGATGTGCCAGCCRTCNCACRTCCNGTCAT-3' (Y 代表 C 或者 T, R 代表 A 或者 G, N 表示任一碱基)^[9]。测序引物为 UP1S 与 UP2rS^[9]。UP-1S, 5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA-3'; UP2rS, 5'-AGCAGGGTACGGATGTGCCAGCC-3'。热循环仪: PTC-200 Peltier (MJ Research)。PCR 产物少量割胶纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。系统发育分析使用的软件: Lasergene 软件包 6.1 版; PHYLIP 软件 3.65 版^[10]; PAML 软件包 3.14 版^[11]。

1.2 PCR 扩增与测序

扩增条件: 35 个循环 (96°C 变性 1min, 62°C 退火 1min, 72°C 延伸 2min), 然后 72°C 终末延伸 7min。PCR 产物约 1.2kb, 经割胶纯化后, 由上海英骏生物技术有限公司测序。对含有特异性突变位点的菌株二次测序以资确定。

1.3 *gyrB* 基因系统发育分析

构建系统发育树的 *gyrB* 核苷酸序列包括以上 24 株分离株序列与 3 条来自 GenBank 的相关序列 (O1 群 El Tor 霍乱弧菌 N16961, GenBank 序列号 AE004093; 副溶血弧菌 ATCC17802, GenBank 序列号 AY527390; 嗜水气单胞菌 ATCC7966T, GenBank 序列号 AJ868394)。

使用 Clustal^[12] 算法对序列进行多序列联配分

析。根据联配结果将其裁减对齐,并对准该基因读码框。处理后的联配结果全长为 1119 个联配位点 (position),起始于霍乱弧菌 *gyrB* 基因编码区的第 346 位核苷酸 (通过与 O1 群霍乱弧菌 N16961 *gyrB* 基因全长序列比较后确定)。由于该段序列是连续编码序列,最后还需要进一步校正联配结果,使得联配产生的所有空位 (gap) 都以三联体形式存在于密码子之间而非插入密码子内,具有较好的生物学意义。

使用 PHYLIP 软件 3.65 版,以距离法 (JC69 模型构建距离矩阵^[13], neighbor-joining 法聚类), 最大似然法 (maximum-likelihood) 构建系统发育树,并以类志贺邻单胞菌和嗜水气单胞菌为外类群将树有根化 (rooted)。两种方法中所需设置的具体参数 (如 gamma 分布的 alpha 系数等) 通过 PAML 软件包 3.14 版获得。对 2 种方法均进行 2000 次自举 (bootstrap) 检验。

构树过程中,均先用原始数据集构建得到基准树,再将相应的 2000 次自举树中各分支点的自举支持率填入基准树中,对于低于 50% 的自举值和只存

在于自举树中而在基准树中不存在的分支点均不填。

1.4 核苷酸序列查询号

将测序得到的序列提交 GenBank 数据库,数据库查询号为 DQ316971 ~ 316983 及 DQ519366。

2 结果

2.1 序列联配分析

在 10 株 *ctxA* 阳性霍乱弧菌分离株中,7 株 O139 群 (菌株编号 047、510、511、512、513、514 和 515) 和 2 株 O1 群 El Tor 型 (菌株编号 321、518),与 N16961 (GenBank AE004093, O1 群 El Tor 型) *gyrB* 基因相应的区域序列相同;4 株副溶血弧菌 (菌株编号 AQ4037、A60、A61、520) 序列相同。表 2 显示了各菌株序列间相似与差异率。嗜水气单胞菌与类志贺邻单胞菌分别与两种致病弧菌序列差异率为 30.1% ~ 37.7%,高于霍乱弧菌种内 (0.2% ~ 5.4%) 与副溶血弧菌种内 (0.4% ~ 1.8%) 及两种弧菌间 (21.7% ~ 23.3%) 的差异率,符合做外类群的条件 (表 2)。

表 2 经 Lasergene 软件两两比较分析 (霍乱弧菌 Vc, 副溶血弧菌 Vp, 嗜水气单胞菌 Ah, 类志贺邻单胞菌 Ps) *gyrB* 基因部分序列所得相似率及差异率 (%)

Table 2 *gyrB* gene sequence similarity and divergence^b of each pair for *Vibrio cholerae* (Vc), *Vibrio parahaemolyticus* (Vc),

Aeromonas hydrophila (Ah), *Plesiomonas shigelloides* (Ps) by Lasergene

Sequence No.	Strain name and No.	Similarity with strain No. / %														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	Vc322		94.8	96.3	94.9	99.7	80.6	80.4	80.4	80.5	80.6	80.3	71.1	70.6	71.4	74.4
2	Vc323	5.4		96.5	99.8	95.1	81.3	81.0	81.3	81.1	81.0	80.6	71.3	71.0	71.1	74.2
3	Vc516	3.8	3.6		96.7	96.6	81.1	80.9	80.9	81.1	80.9	80.5	71.8	71.6	71.8	75.1
4	Vc519	5.3	0.2	3.4		95.2	81.4	81.1	81.4	81.2	81.1	80.7	71.4	71.0	71.2	74.4
5	Vc (N16961, 047, 321, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 518)	0.3	5.1	3.5	5.0		80.9	80.7	80.7	80.8	80.7	80.3	71.8	71.2	71.9	74.9
6	Vp524	22.8	21.8	22.2	21.7	22.4		98.5	99.5	98.5	98.7	98.2	72.0	71.7	71.5	74.3
7	Vp (WP1)	23.1	22.3	22.4	22.2	22.7	1.5		98.5	98.6	98.7	98.3	72.1	71.6	71.4	74.0
8	Vp (AQ4037, A60, A61, 520)	23.1	21.8	22.4	21.7	22.7	0.5	1.5		98.5	99.0	98.6	72.0	71.6	71.4	74.2
9	Vp522	22.9	22.1	22.2	21.9	22.5	1.5	1.4	1.5		98.7	98.3	72.0	71.7	71.5	73.9
10	Vp523	22.8	22.3	22.4	22.2	22.7	1.4	1.3	1.0	1.3		99.6	72.0	71.6	71.4	74.0
11	Vp (ATCC17802)	23.3	22.8	22.9	22.7	23.2	1.8	1.7	1.4	1.7	0.4		72.1	71.7	71.3	74.1
12	Ah295	36.6	36.4	35.5	36.2	36.1	34.8	34.7	34.8	34.8	34.8	35.2		97.5	95.8	75.0
13	Ah287	37.7	37.1	36.0	36.9	37.2	35.5	35.6	35.6	35.5	35.6	36.1	2.6		95.3	75.8
14	Ah (ATCC7966T)	36.1	36.7	35.4	36.5	36.0	35.7	35.9	35.9	35.8	35.9	36.7	4.4	4.9		75.7
15	Ps413	31.2	31.5	30.1	31.2	31.0	31.2	31.7	31.4	31.8	31.7	32.1	30.5	29.3	29.5	

^b Divergence percentage is calculated by comparing sequences pairs in relation to the phylogeny reconstructed by MegAlign (Lasergene). Similarity percentage compares sequences directly without accounting for phylogenetic relationships.

2.2 聚类分析

选择嗜水气单胞菌与类志贺邻单胞菌共同做为外类群将系统发育树有根化。距离法与最大似然法两种方法所得树的拓扑结构,在种属水平完全一致,

图 1 仅显示距离法构建的系统发育树。同一菌种的不同株各自聚类形成单系类群 (monophyletic group), 并且每群都有较高的自举支持率。

霍乱弧菌和副溶血弧菌各自形成一个独立的簇

(cluster)。在霍乱弧菌簇内的每个分枝自举支持率均大于 50% : *ctxA* 阳性的霍乱弧菌(8 株 O139 群与 2 株 O1 群 El Tor 型)加上 N16961 先聚集成一分枝,再与 1 株 *ctxA* 阴性 O139 群(516)聚类;另一分枝是由两株 *ctxA* 阴性的 O1 群 El Tor 型聚集形成的。

副溶血弧菌簇的内部也形成了支持率为 100% 的两个分枝: 4 株序列一致的副溶血弧菌(520(2002 年局部爆发流行株, *tdh* 阳性, O3 :K6 型), 460, 461 (均为 2004 年临床分离株)及一日本株 AQ4037 与 2001 年自环境分离的 1 株 *trh* 阳性的 O1 :K? 型菌株(524)聚类;另一分枝由 2 株临床分离株: 522 (2002 年另一局部爆发流行株, *tdh* 阳性, O4 :K8 型), 523 (*trh* 阳性, O1 :K1 型)和一日本株(WP1)及 ATCC17802 GenBank 号 AY527390 聚类而成。

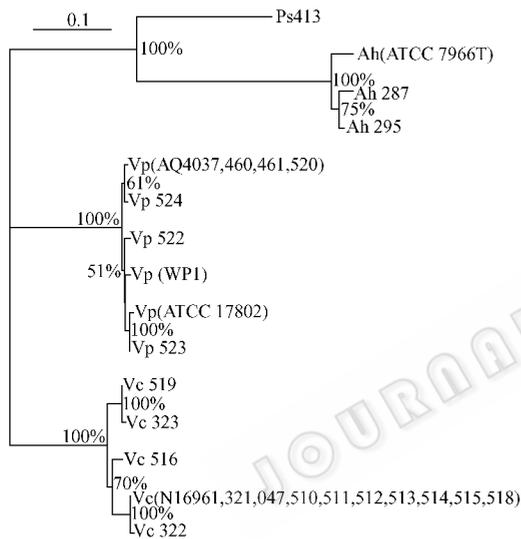


图 1 基于 *gyrB* 基因采用距离法(neighbor-joining 聚类)构建的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree derived from *gyrB* sequence comparisons with neighbor-joining method implemented in the PHYLIP version 3.65 software package. Ah : *A. hydrophila* ; Ps : *P. shigelloides* ; Vc : *V. cholerae* ; Vp : *V. parahaemolyticus*. Numbers in brackets are the name of bacterial strains that share the same sequence. Numbers shown next to each node indicate bootstrap values higher than 50%. The scale bar represents the number of substitutions per nucleotide position.

2.3 霍乱弧菌 16S rRNA 核糖体分型

除 2 株 *ctxA* 阴性 O1 群外,其余 11 株(9 株 O139 群与 2 株 O1 群)有潘劲草^[16]等提供的 16S rRNA 核糖体基因分型结果,见表 1。

3 讨论

研究中所涉及的霍乱弧菌、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌分离株在种水平与各自相应的标准株聚类成一簇,且不同方法所得到的结果一致,说明了 *gyrB*

基因序列分辨率较高,能够在种水平可靠地区分鉴别这些常见病原菌。

在霍乱弧菌簇中,无毒的 O1 群(323, 519)和无毒的 O139 群(516)较早分化出来,而 10 株 *ctxA* 阳性的霍乱弧菌(8 株 O139 群, 2 株 O1 群)所居位置距根最远,说明产毒株(*ctxA* 阳性)可能是从无毒株衍化而来。在 *ctxA* 阳性株中只存在两种不同的序列: N16961(047, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 321, 518)与 322, 此两者间序列差异为 0.3%,说明本地区霍乱弧菌产毒株可能产生了一定的同质化,具有了居主导地位基因型,而其中 8 株 O139 群相应的 16S rRNA 核糖体基因分型有 4 型(II, IV, VI 和 VII), 2 株 O1 群霍乱弧菌核糖体分型为 A 和 B, 分别对应于 O139 群的 VI 与 VII 带谱。这些结果表明产毒的 O139 群和 O1 群 El Tor 霍乱弧菌在进化上密切相关,也曾有研究显示: O139 群可能是由 O1 群 El Tor 霍乱弧菌通过基因水平转移作用获得新的基因合成表面多聚糖而形成的^[14, 15]。*ctxA* 阴性 O139 群菌株(516)是自散发腹泻患者分离获得,其核糖体分型为 α 型,不同于产毒 O139 群的模式。在系统发育树中,其与 *ctxA* 阳性霍乱弧菌(O139 群和 O1 群)聚类,但位于不同的分枝。此结果类似于基于 *recA* 基因的相关分析^[16]。如前所述,产毒的 O139 与 O1 群霍乱弧菌关系密切是被广为接受的观点,而无毒的 O139 群与它们关系如何,尚未见较明确的说法。从本文结果看无毒 O139 群同无毒 O1 群关系较远,而同产毒 O1/O139 群关系相对紧密,可能由共同祖先在转化重组过程中产生。同时相对于产毒 O139 群,其与产毒 O1 群的关系更远。但是,本研究中仅包含 1 株 *ctxA* 阴性 O139 群菌株,且在进化树中与产毒 O1/O139 群分歧点的支持率也不是很高。因此,还需要扩大样本量来明确 *ctxA* 阴性与 *ctxA* 阳性 O139 群之间的关系。

耐热直接溶血素基因(thermostable direct hemolysin *tdh* gene)和耐热直接溶血素相关溶血素基因(thermostable direct hemolysin-related hemolysin *trh* gene)是副溶血弧菌的主要毒力因子,与致病能力密切相关。两者任一表现阳性的菌株就被认为是毒力株。杭州地区临床来源的副溶血弧菌以 *tdh* 阳性的 O3 :K6 型菌株为最多,其次为 *tdh* 阳性 O4 :K8 型菌株。*gyrB* 系统发育分析表明,本地区这二种主要血清型的临床分离株在种系关系上有一定的距离,分列于树中不同的分枝。2001 年从小水产品中分离获得的 524 号菌株为张蔚分析的 46 株环境分离株中唯一的毒力株(*tdh*-, *trh*+), 在我们构建的

进化树中,此菌株与局部爆发流行株 520(*tdh* 阳性, O3 :K6 型),2004 年临床分离株 460、461,及一日本菌株 AQ4037 聚类构成一分枝,且有较高自举支持率,表明环境中此类菌株与本地区临床来源的主要流行株(*tdh* 阳性, O3 :K6 型)在系统发育关系上较接近,可能是潜在的致病菌,尽管其携带的毒力基因特征不同于常见临床分离株。

综上所述,基于 *gyrB* 基因的系统发育分析,可以显著地将霍乱弧菌、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌、类志贺邻单胞菌的分离株区别开来。*ctxA* 阳性 O139 群与 *ctxA* 阳性 O1 群 El Tor 型霍乱弧菌种系发生关系较密切,而 O139 群本身的 *ctxA* 阴性与阳性群之间却存在一定距离。本地区副溶血弧菌两种主要流行血清型(O3 :K6, O4 :K8)菌株相应的 *gyrB* 基因序列有一定差别。*trh* 阳性副溶血弧菌环境分离株与本地区临床分离的主要流行株(*tdh* 阳性, O3 :K6 型)关系紧密,可能是潜在的致病菌。

值得一提的是,本文所述的核糖体基因分型结果是用 *Bgl* I 酶切分析获得的。Lan 等以 *Bgl* I 酶对霍乱弧菌第 7 次世界大流行的克隆株做核糖体基因分型研究,发现所呈现的多个核糖体分型结果是由于 *rrn* 操纵子高频重组引起的,因而核糖体分型相似并不能说明种系关系一定相似,由此以核糖体基因分型做为种系发生研究和追踪传染源的依据就不是很适合^[17]。而 *gyrB* 基因以其较高的“分辨率”比较适用于属内或属间种系发生关系的比较,特别是其单拷贝的特征避免了上述核糖体分型方法的缺陷^[9,18,19]。从本文初步结果来看,*gyrB* 基因对于推断两种主要致病弧菌种内诸型别的相互关系具有一定价值,可同其他高频重组基因结合应用于弧菌的流行病学调查。其能较稳定准确地地区分弧菌科主要病原菌,具有作为快速诊断芯片系统靶分子的潜力。

参 考 文 献

- [1] Qu M, Xu J, Ding Y, *et al.* Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O139 in China: polymorphism of ribotypes and CTX elements. *J Clin Microbiol*, 2003, **41**(6): 2306 – 2310.
- [2] 张蔚,孟冬梅,潘劲草,等. 杭州地区临床和环境分离副溶血弧菌菌株携带毒力基因的特征. *中华预防医学杂志*, 2004, **38**(3): 200 – 203.
- [3] 崔恩博,曲芬,鲍春梅,等. 霍乱弧菌与嗜水气单胞菌合并感染一例. *中华内科杂志*, 2005, **44**(5): 397.
- [4] 杨建新,杨尚茹,郝素梅. 夏秋季腹泻便中弧菌属与气单胞菌属的分离与鉴定报告. *中国卫生检验杂志*, 2005, **15**(1): 105 – 106.
- [5] Abbott SL, Seli LS, Catino M, *et al.* Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**(4): 1103 – 1104.
- [6] 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.
- [7] Kasai H, Watanabe K, Gasteiger E, *et al.* Construction of the *gyrB* database for the identification and classification of bacteria. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform*, 1998, **9**: 13 – 21.
- [8] 潘劲草,叶榕,王满琴,等. O139 群霍乱弧菌的核糖体基因分型及其与药物抗性相关性研究. *国外医学流行病学传染病学分册*, 2005, **32**(4): 196 – 225.
- [9] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(3): 1104 – 1109.
- [10] Felsenstein J. PHYLIP. Phylogeny Inference Package version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. 2004.
- [11] Yang Z. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Computer Applications in BioSciences*, 1997, **13**: 555 – 556.
- [12] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**(22): 4673 – 4680.
- [13] Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules, in Munro H N. ed. *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press, 1969, 21 – 123.
- [14] Bik EM, Bunschoten AE, Gouw RD, *et al.* Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *Embo J*, 1995, **14**(2): 209 – 216.
- [15] Comstock LE, Johnson JA, Michalski JM, *et al.* Cloning and sequence of a region encoding a surface polysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 and characterization of the insertion site in the chromosome of *Vibrio cholerae* O1. *Mol Microbiol*, 1996, **19**(4): 815 – 826.
- [16] Stine OC, Sozhamannan S, Gou Q, *et al.* Phylogeny of *Vibrio cholerae* based on *recA* sequence. *Infect Immun*, 2000, **68**(12): 7180 – 7185.
- [17] Lan R, Reeves PR. Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. *Microbiology*, 1998, **144**(Pt 5): 1213 – 1221.
- [18] Fukushima M, Kakinuma K, Kawaguchi R. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *J Clin Microbiol*, 2002, **40**(8): 2779 – 2785.
- [19] Yamamoto S, Harayama S. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, **46**(2): 506 – 511.

Classification and identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* isolates based on *gyrB* gene phylogenetic analysis

HOU Xiao-li¹, CAO Qing-yi¹, PAN Jin-cao², CHEN Zhi^{1*}

(¹ Institute of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital, Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

(² Hangzhou Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310006, China)

Abstract: In order to validate the usefulness of *gyrB* genotype for the classification and identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* isolates, the phylogenetic analysis of 13 *V. cholerae*, 8 *V. parahaemolyticus*, 2 *Aeromonas hydrophila* and 1 *Plesiomonas shigelloides* strains was carried out using the partial coding sequence of *gyrB*, a gene that encodes the B subunit of DNA gyrase (topoisomerase type II) in bacteria. These strains were separately clustered at species level and typed by the DNA sequences of reference strains from GenBank. *CtxA* positive *V. cholerae* strains including 8 clinical isolates of O139 and 2 clinical isolates of O1 formed one cluster. Four *V. parahaemolyticus* strains of 1 isolate from 2002 Zhejiang outbreak patient (*tdh* positive), 2 clinical isolates from 2004 and 1 strain from Japan were grouped with an environmental isolate (*trh* positive) from 2001. *GyrB* genotype is applicable to species identification of *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *A. hydrophila* and *P. shigelloides* isolates. The *ctxA* positive O139 and O1 group of *V. cholerae* are closely related, as reflected by *gyrB* sequence divergence. Furthermore, the toxigenic *V. parahaemolyticus* strain isolated from environments may be the potential pathogen to the local prevalent and sporadic cases.

Keywords: *gyrB* gene; Phylogenetic analysis; *Vibrio cholerae*; *Vibrio parahaemolyticus*; *Aeromonas hydrophila*; *Plesiomonas shigelloides*