

中国 O139 群霍乱弧菌核糖体基因多态性的研究

曲梅 阚飙 祁国明 刘延清 高守一

【摘要】 目的 分析国内 O139 群霍乱弧菌分离株的遗传多态性。方法 以 16s rRNA 和 23s rRNA 核糖体基因作探针,对内切酶消化的菌株染色体 DNA 进行 Southern 杂交,分析杂交图谱。结果 选择的 122 株 O139 群霍乱弧菌得到 10 种核糖体基因型。9 株 *ctxAB*、*zot* 和 *RS* 均为阴性的无毒菌株,分属于 4 种独特的核糖体基因型。结论 O139 群霍乱弧菌在遗传分化及克隆群的地区分布上存在多态性,提示国内 O139 霍乱流行的复杂性。

【关键词】 霍乱弧菌 O139 群;核糖体基因分型

A study on genetic polymorphism of rRNA gene pattern of *Vibrio cholerae* O139 in China QU Mei, KAN Biao, QI Guoming, LIU Yanqing, GAO Shouyi. Priority Laboratory of Molecular Medical Bacteriology of Ministry of Health, Institute for Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective To investigate the genetic polymorphism of the isolated strains using ribotyping method. **Methods** One hundred twenty-two strains of *V. cholerae* O139 isolated from different areas of China from 1993 to 1999 were selected and characterized with ribotyping, including 16s rDNA and 23s rDNA probes. **Results** One hundred twenty-two strains were differentiated into 10 different ribotypes (RT1-RT10) on the basis of rRNA gene probes hybridization (with Bgl I digestion), which consisted of 7-9 bands between 12 and 1.5 kb in size. RT1 and RT3, as two predominant ribotypes, comprised most number of the strains which spread to the extensive range. Nine strains, which are negative to *ctxAB*, *zot* and *RS* individually, belong to 4 special ribotypes. The dendrogram revealing genetic relationship among different clones of *V. cholerae* O139 showed that the clones belonging to RT1 and RT2 had genetic similarity on high degree, although they were isolated from different regions. The two predominant ribotypes (RT1 and RT3) were distant in genetic relationship. **Conclusion** Results showed the clonal diversity and the wide area distribution of *V. cholerae* O139 strains in China, suggesting the multiple origins of O139 epidemics.

【Key words】 *Vibrio cholerae*, serogroup O139; Ribotyping

霍乱是以急性腹泻为主要症状的烈性肠道传染病。历史上发生的七次霍乱大流行,都是由 O1 群霍乱弧菌引起的。1992 年印度、孟加拉国发生 O139 群霍乱弧菌引起的霍乱样疾病的爆发性流行,这一新的血清群被 WHO 宣布为引起霍乱的又一病原体^[1]。关于 O139 群霍乱弧菌的来源问题,一直是一个研究的热点。许多研究已证实 O139 群菌株与 O1 群 El Tor 型菌株遗传上具有很高程度的相似

性,与 O22 群菌株的相似性也有报道^[2]。一般产毒的 O139 群菌株与 O1 群产毒株都携带有毒力基因 *ctxAB*、*zot* 和 *RS* 序列^[3]。1993 年 5 月,我国新疆局部地区首次出现 O139 群霍乱弧菌爆发性流行,随后内地一些地区以及东南沿海地区出现流行或散发,而且从一些水体和食品中也分离到 O139 群菌株。从时间、来源及地区分布等方面考虑,本研究选择了我国 1993~1999 年 O139 群霍乱出现以来各省区送检的菌株,采用核糖体基因分型,分析了 O139 群菌株的克隆群构成,揭示了菌株遗传分化的多态性,从群体遗传学角度,明确了我国 O139 群霍乱弧菌核糖体基因分型方法,为进一步探索 O139 群菌株的来源及传播规律,提供依据。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870031)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所卫生部医学分子细菌学重点实验室

通信作者:阚飙, E-mail: kanb@btmail.net.cn

第一作者现在单位:100083 北京大学生育健康研究所

材料与amp;方法

1. 菌株 从 1993~1999 年全国 13 个省市卫生防疫站收集的 O139 群菌株中共选择 122 株, 详细资料见表 1。

表1 试验所用 O139 群菌株的来源及核糖体基因分型结果

地区	分离菌株数	16s 核糖体基因型别及菌株数
新疆	37 株(1993 年)	RT3 型 31 株, RT1、3、4、6、8 型各 1 株
浙江	20 株(1994、1996、1997 及 1998 年)	RT1 型 17 株, RT2 型 2 株, RT7 型 1 株
北京	17 株(1994 年)	RT1 型 17 株
广东	14 株(1993、1994、1995、1997 及 1998 年)	RT1 型 9 株, RT2 型 2 株, RT4 型 2 株, RT4、11 型各 1 株
江西	10 株(1994、1998 年)	RT1 型 2 株, RT2 型 5 株, RT5 型 3 株
安徽	9 株(1996、1998 年)	RT3 型 8 株, RT9 型 1 株
江苏	6 株(1997、1998 和 1999 年)	RT1 型 5 株, RT2 型 1 株
黑龙江	3 株(1998 年)	RT2 型 3 株
湖南	2 株(1997 年)	RT1、3 型各 1 株
内蒙古	1 株(1996 年)	RT1 型 1 株
海南	1 株(1996 年)	RT1 型 1 株
山东	1 株(1997 年)	RT6 型 1 株
辽宁	1 株(1997 年)	RT1 型 1 株

2. 试剂 限制性内切酶为 *Bgl* I (华美生物工程公司产品); 地高辛(Dig)探针标记、检测试剂盒(Roche)。

3. DNA 探针制备、Southern blotting 及 DNA 杂交:

(1) 染色体制备、酶切及转膜: 见参考文献 4。

(2) PCR 及探针制备 扩增制备 16s rRNA 基因(16s rDNA) 探针的引物为: 引物 1: 5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3', 引物 2: 5'-AAG GAG GTG ATC CAA CCG CA-3', 扩增产物 1.5 kb。扩增参数: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 50 s, 58℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 60 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min。扩增制备 23s rRNA 基因(23s rDNA) 探针的引物为: 引物 1: 5'-AAT AAA AAC ACA GCA CTG TGC-3', 引物 2: 5'-CGG CAG ATA GCG ACC GAA CTG-3', 扩增产物 842 bp。扩增参数: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 50 s, 55℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 50 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min。均以古典型霍乱弧菌 O395 的染色体 DNA 为模板。PCR 产物经凝胶电泳回收纯化, 方法详见文献 4。 Dig 标记探针及免疫

检测按试剂盒说明书进行。

结果

对 122 株 O139 菌株提取染色体, 用限制性内切酶 *Bgl* I 消化, 分别用 Dig 标记的 16s rRNA、23s rRNA 基因探针杂交。根据杂交条带数目、带型差异, 得到 16s 和 23s 核糖体基因分型(表 1)。16s rRNA 的探针杂交图谱模式图如图 1(同一株菌染色体 DNA 的 23s rRNA 基因探针杂交带型比 16s rRNA 基因探针的少, 显出的条带在 16s rRNA 基因杂交图谱中均可找到, 因此本文中未列出)。16s 核糖体基因型的聚类分析图如图 2。

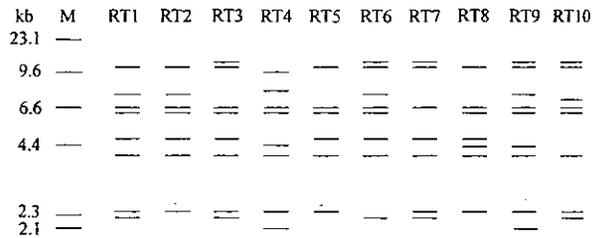


图1 中国 13 个地区 122 株 O139 群霍乱弧菌 16s rRNA 基因杂交图谱模式图

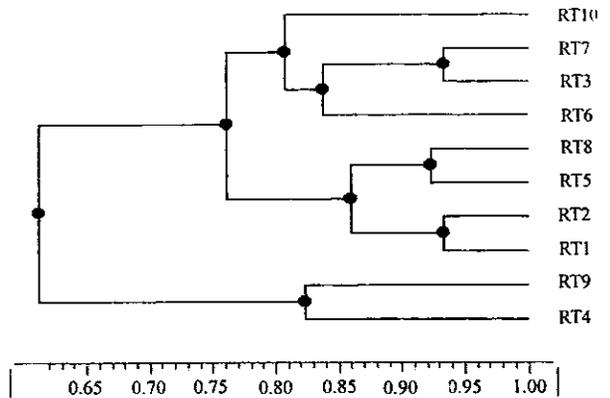


图2 中国 13 个地区 122 株 O139 群霍乱弧菌 16s rRNA 基因杂交图谱聚类图

在所分析的菌株中, 两种核糖体分型得到了一致的优势型 RT1 和 RT3。① RT1 来源于 1993~1998 年的各年份、各地区(包括北京、浙江、广东、江西、江苏、海南、内蒙古、湖南的菌株)。北京地区 1994 年分离的 17 株菌都属于这一型别; 浙江分离的全部 20 株菌中有 85% 属于这一型别; 广东分离的 14 株菌中有 64.3% 属于这一型别; 江苏 6 株菌有 83.3% 属于这一型别; 而收集的来自于新疆的 37 株菌只有 1 株菌属于该型别; 海南、内蒙古、辽宁、湖南

等地的代表性菌株也属于这一型别;江西 1994 年的 2 株菌也属于这一型别。②RT3:新疆 1993 年分离的 37 株菌中 86.5% 属于该型,安徽 1998 年分离的 8 株菌全部属于这一型别。③RT2:主要来源于江苏 1998 年分离的 5 株菌和黑龙江 1998 年分离的 2 株,还有浙江、广东等地的变异株。④RT6~RT8:每一型为 1~2 株菌,多是新疆、江苏、广东等地的变异株。⑤RT4、RT5、RT9、RT10 型:共 9 株,均为无毒株。

讨 论

rRNA 基因高度保守,在所有细菌基因组中存在一至多个拷贝,在霍乱弧菌中一般存在 8 个拷贝。16s rRNA 的基因作为细菌进化的标志,已广泛用于细菌的克隆分化研究中^[5,6]。本研究中的 122 株 O139 群霍乱弧菌,16s rRNA 核糖体基因型(RT)与 23s rRNA 核糖体基因型得到一致的分类结果,即 16s RT 型为 10 种,23s RT 型也为 10 种,在 16s RT 中属于同一型别的菌株,23s RT 中也属于同一型。我们分析了霍乱弧菌 *rrn* 操纵子结构,发现个别 *rrn* 操纵子中 16s rDNA 序列中有 *Bgl* I 切点,尚未在 23s rDNA 中发现该切点,因此 16s rRNA 的探针杂交结果与 23s rRNA 的探针杂交结果应是有联系的。因为 23s rRNA 基因杂交带型(4~8 条)比 16s rRNA 基因(7~9 条)的少,显出的条带在 16s rRNA 基因杂交图谱中均可找到,且同一菌株两图谱分型相同;另外 16s rRNA 基因序列中存在着 *Bgl* I 识别位点的碱基序列变异^[3],因此在用 *Bgl* I 酶切染色体再杂交来反映菌株遗传分化上的差异上,用 16s rRNA 基因探针杂交比用 23s rRNA 基因探针得到更多的条带和信息。

在核糖体基因分型中以 RT1 和 RT3 型为优势型别。本文所定义的优势型是从两方面考虑:①从菌株的数量。每次爆发性流行中随机抽样,根据每一地区所出现的各个型别中所占的菌株比例。②该型别菌株所波及的地区和影响范围。根据 16s rRNA 基因杂交图谱所做的聚类分析图(图 2)显示了我国不同 RT 克隆 O139 群菌株的遗传相似关系。比较常见的 RT 型中以 RT1 和 RT2 型相似度高,江西菌株为 RT1、RT2 和 RT5 型,遗传上较为相近,北京分离株 RT1 型与新疆分离株 RT3 型遗传发生上相距较远,RT4、RT9 型是无毒株,与常见的产毒株

遗传发生上相距较远。

16s rRNA 核糖体基因分型在 O139 菌株的克隆群分析、菌株差异性比较以及为分析菌株来源提供线索方面有重要的意义。我们对我国 O139 群菌株的分析得到下列结论:①各省份本地区分离株的相关关系,研究的新疆 1993 年分离株绝大多数属于 RT3 型,但有少量分离株属于 RT1、RT4 和 RT6 型,提示有多个疫点,既有本地的流行,也有无关联性的散发病例;北京 1994 年出现一些病例,都属于 RT1 型,虽然北京流动人口多,有输入传播的可能,但因这些菌株型别集中,说明在本地有 O139 群菌株的传播,应及时进行出现病例点的疫情控制,防止扩散。②新疆 1993 年分离株与随后发生的流行的关系:作为最先引起流行的新疆 1993 年分离株绝大多数属于 RT3 型,1994 年北京、江西、广东、浙江等地均分离到 O139 群菌株,这些菌株与 1993 年新疆流行菌株的 RT 型不同,说明不是新疆流行的延续。从检测菌株综合分析,我国 O139 群菌株存在克隆分化上的多样性,各省区有 O139 群霍乱的流行或散发。虽有多处病例的报道,根据发生规模及菌株的遗传特征,从全国范围来看不同克隆群的 O139 菌株分布是复杂的,呈多点发生。

参 考 文 献

- Hall RH. *Vibrio cholerae* non-O1 serogroup associated with cholera genetically resemble O1 El Tor cholera strains. *Infect Immun*, 1994, 62:3859-3863.
- Dumontier S, Berche P. *Vibrio cholerae* O22 might be a putative source of exogenous DNA resulting in emergence of the new strain of *Vibrio cholerae* O139. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 164:91-98.
- Berche P, Poyart C, Abachin E, et al. The novel epidemic strain O139 is closely related to the pandemic strain O1 *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis*, 1994, 179:701-704.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 林枫, 译. 北京:科学出版社, 1993. 474-490.
- Sharma C, Nair GB, Mukhopadhyay AK, et al. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains isolated between 1992 and 1995 in Calcutta, India: evidence for the emergence of a new clone of El Tor biotype. *J Infect Dis*, 1997, 175:1134-1141.
- Karaolis DKR, Lan R, Reeves PR. Molecular evolution of the seventh-pandemic clone of *Vibrio cholerae* and its relationship to other pandemic and epidemic *V. cholerae* isolates. *J Bacteriol*, 1994, 176:6199-6206.

(收稿日期 2001-09-11)

(本文编辑:张林东)