

## 溶藻弧菌相关分离株的分子及 VITEK 鉴定

郭静<sup>1</sup>, Liswaniso Gadafii<sup>1</sup>, 郭安南<sup>1</sup>, 阎永伟<sup>1</sup>,  
张德民<sup>1\*</sup>, 裘琼芬<sup>1</sup>, 黄素文<sup>2</sup>, 戴海平<sup>3</sup>

(1. 宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波出入境检验检疫局, 浙江 宁波 315012;

3. 浙江省宁波市鄞州区渔业技术管理服务站, 浙江 宁波 315012)

**摘要:** 哈维群弧菌是弧菌属的核心菌群, 包括溶藻弧菌在内的6个种在表型和遗传型上均十分相似, 要准确鉴定各种有一定难度。看家基因的研究及生化鉴定系统的出现为弧菌鉴定提供了多种方法, 本文比较了16S rRNA基因、*toxR*基因和*pyrH*基因以及VITEK 2 COMPACT GN鉴定卡对溶藻弧菌相关分离株的分辨力。哈维群弧菌基因组内16S rRNA基因是多拷贝的, 且拷贝间序列差异大于种间差异, 不适用于种的鉴定。单拷贝基因*toxR*和*pyrH*序列种内差异均小于种间差异。基于*toxR*基因相似性比较可清楚地将18个疑似溶藻弧菌分离株和5个参比株归并到4个种; *toxR*基因系统发育学分析也显示, 哈维群弧菌各种独立地聚类分支, 且溶藻弧菌种内存在两个明显的聚类分支, 说明两个分支的溶藻弧菌具有独立的进化方向。*pyrH*基因的相似性比较和发育学分析也得到类似的结果, 但*pyrH*基因具有较强的保守性, 因而分辨力稍低于*toxR*基因。VITEK 2 COMPACT GN鉴定卡在鉴定溶藻弧菌时也有一定的错误率, 且鉴定谱较窄。因此, 建议在实际应用中采用*toxR*基因比对作为溶藻弧菌快速鉴定的主要手段, 可再选用*pyrH*基因对鉴定结果进行验证。

**关键词:** 溶藻弧菌; 16S rDNA; *toxR*; *pyrH*; VITEK 2 COMPACT

**中图分类号:** S 917; Q 93-331

**文献标志码:** A

弧菌广泛存在于河口、海湾、近岸海域的海水和海洋动物体内, 一些弧菌如溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、鳗弧菌(*V. anguillarum*)等亦是海水养殖鱼<sup>[1]</sup>、虾<sup>[2]</sup>、贝类<sup>[3]</sup>的重要病原菌。弧菌感染海水养殖动物主要表现为体表溃疡、黑腮褐斑综合征、白斑病、红腿病及弧菌病(*Vibriosis*)<sup>[4]</sup>等, 给水产养殖业造成巨大经济损失。某些种类弧菌, 如溶藻弧菌、创伤弧菌等也能引起人类疾病<sup>[5-6]</sup>, 主要是接触海水、生食海鲜或进食被该菌污染食物所致。另一方面, 也有弧菌做益生菌的报道<sup>[7]</sup>。针对弧菌病, 养殖业早期主要使用抗生

素防治, 结果导致耐药菌株的出现及耐药基因的扩散, 引发人们对环境安全和食品安全的关注。因此, 生态调控和疫苗防治等措施, 成为今后病害防治发展方向。弧菌快速准确的鉴定是研究其致病机理、开发相关疫苗及其他病害防治措施的基础。

溶藻弧菌又称解藻朊酸弧菌, 是养殖环境中最常见的弧菌, 也是水产动物重要病原弧菌的代表之一。溶藻弧菌属于 $\gamma$ -变形杆菌纲弧菌科(*Vibrionaceae*)弧菌属(*Vibrio*)。溶藻弧菌最初被认为是副溶血弧菌的一个生物型, 后来独立为一个种。除此之外, 溶藻弧菌还与哈维氏弧菌、坎氏弧菌(*V. campbellii*)、需钠弧菌(*V. natriegens*)

收稿日期: 2011-08-31 修回日期: 2011-11-30

资助项目: 国家自然科学基金项目(30970104); 浙江省自然科学基金人才培养项目(R305333); 宁波市科技计划项目(2010C10013); 宁波大学人才工程项目(2010859); 宁波大学科研基金(xkl116)

通讯作者: 张德民, E-mail: zhangdemin@nbu.edu.cn

及轮虫弧菌(*V. rotiferianus*)等的关系密切,它们与副溶血弧菌一起构成弧菌属的核心菌群——哈维群弧菌。它们不论在表型还是遗传型上都十分相似,它们的16S rRNA基因相似性在99%左右,要准确鉴定各种具有一定难度<sup>[8]</sup>。后来人们开始使用其他保守基因分析弧菌的发育学地位<sup>[9-14]</sup>。Thompson等<sup>[11]</sup>应用*pyrH*,*rpoA*和*recA*基因,对弧菌进行多位点分析和鉴定,发现这些基因在种水平上比16S rRNA基因有更高的鉴别力,能较好地区分哈维群弧菌种。Pascual等<sup>[15]</sup>应用16S rRNA,*recA*,*pyrH*,*rpoD*,*gyrB*,*rctB*和*toxR*基因对哈维群弧菌进行系统发育学分析及分子鉴定,发现*toxR*基因对哈维群弧菌的鉴别力最强。溶藻弧菌也在多个商业化细菌鉴定系统的鉴定谱内<sup>[16]</sup>,如API 20E、VITEK 2 COMPACT等。VITEK 2 COMPACT GN鉴定卡能鉴定8种

重要的弧菌,其中就包括溶藻弧菌、副溶血弧菌。

基于16S rRNA基因序列从本实验室分离保藏的弧菌菌株中筛选疑似溶藻弧菌及其相近种的菌株,比较研究了16S rRNA基因、*toxR*基因和*pyrH*基因以及VITEK 2 COMPACT GN鉴定卡对这些菌株和溶藻弧菌模式株及参比菌株的分辨力,以期确定一个快速简便鉴定溶藻弧菌及其相关种的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养

实验所用弧菌共计24株,包括18株待鉴定的环境分离株、1个模式菌株、5个参比菌株(表1)。所有菌株在2216E培养基30℃培养过夜(12~16h),2216E斜面室温保存或液体培养物25%甘油于-80℃超低温冰箱保存。

表1 实验菌株来源信息表  
Tab.1 Strains used in this study

菌株 strain	种名 name as received	来源 source	菌株 strain	种名 name as received	来源 source
418	待鉴定	海水,北仑(2010)	H2X-5	待鉴定	蟹体,鄞州(2009)
448	待鉴定	海水,舟山(2010)	ZDS-6	待鉴定	蟹体,鄞州(2009)
461	待鉴定	海水,象山(2010)	OCW27	待鉴定	海水,象山(2010)
462	待鉴定	海水,象山(2010)	NSA1	待鉴定	金枪鱼,太平洋群岛(2011)
464	待鉴定	海水,象山(2010)	NSP1	待鉴定	虾仁,太平洋群岛(2011)
469	待鉴定	海水,象山(2010)	NSP3	待鉴定	虾仁,太平洋群岛(2011)
473	待鉴定	海水,象山(2010)	LZXC3	<i>V. alginolyticus</i>	海水,烟台莱州(2002)
474	待鉴定	海水,象山(2010)	HZBC71	<i>V. alginolyticus</i>	海水,山东日照(2004)
476	待鉴定	海水,象山(2010)	E0666	<i>V. alginolyticus</i>	鱼体腹水,广东汕尾(2008)
486	待鉴定	海水,象山(2010)	ATCC 17749 <sup>T</sup>	<i>V. alginolyticus</i>	竹筴鱼,日本(1961)
534	待鉴定	海水,象山(2010)	VP O1	<i>V. parahaemolyticus</i>	浙江省疾控中心
XHS1-3	待鉴定	养殖水,鄞州(2009)	V20007154 <sup>a</sup>	<i>V. alginolyticus</i>	大黄鱼肝脏,象山(2000) <sup>[3]</sup>

注:NSA1、NSP1、NSP3由宁波出入境检验检疫局提供菌株;菌株LZXC3(DQ659050)、HZBC71(EF155551)、E0666(未发表)由国家海洋局第三海洋研究所提供;a.V20007154菌株号也为H050815-1。

Notes:The strain NSA1, NSP1 and NSP3 were provided by Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau; The strain LZXC3 (DQ659050), HZBC71 (EF155551), E0666 (Unpublished) are provided by Third Institute of Oceanography; a. strain V20007154 is same as strain H050815-1.

### 1.2 弧菌常规鉴定及VITEK系统鉴定

弧菌形态、生理生化特征实验按照《伯杰氏细菌学鉴定手册》<sup>[17]</sup>和《食品卫生微生物学检验副溶血性弧菌检验》<sup>[18]</sup>国标法进行。细菌快速鉴定按照法国生物梅里埃公司VITEK 2 COMPACT鉴定系统GN鉴定卡说明书操作。

### 1.3 弧菌总DNA提取

从培养12~16h的弧菌平板上挑取单菌落至已加入50μL灭菌水的PCR管中,震荡混匀1min后置于PCR仪100℃保温15min,12000r/

min离心15min,取上清液于新的灭菌PCR管,-20℃保存。

### 1.4 16S rRNA, *toxR* 和 *pyrH* 基因扩增及测序

扩增弧菌16S rRNA,*toxR*和*pyrH*基因PCR反应体系包括:1μL DNA模板,2μL 10μmol/L引物,25μL rTaqase Mixture(TaKaRa),补无菌双蒸水至50μL。16S rRNA基因扩增引物:27f,5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1512r, 5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'<sup>[19]</sup>;采用降落PCR扩增:94℃5min;94℃1min,65~60℃

1 min, 72 °C 30 s, 10 个循环, 每个循环复性温度依次下降 0.5 °C; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 30 s, 18 个循环; 72 °C 5 min。 *toxR* 基因扩增引物: Toxrs, 5'-GANCARGGNTTYGARGTNGAYG-AYTC-3'; Toxras, 5'-TTDKKTTGNCNCYNG-TVGCATNAC-3'<sup>[15]</sup>。 *pyrH* 基因扩增引物: pyrH-04F, 5'-ATGASNACBAATCCWAAACC-3'; pyrH-02R, 5'-GTRAABGCNGMYARRTCCA-3'<sup>[11]</sup>。 *toxR* 和 *pyrH* 基因扩增反应条件相同: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 135 s, 72 °C 75 s, 3 个循环; 95 °C 35 s, 55 °C 135 s, 72 °C 75 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳确定特异条带, 送生工生物工程(上海)有限公司测序。

### 1.5 系统发育分析

所测序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 选取高同源性种模式株的相关序列, 下载用于系统发育分析, MEGA 4.1 软件进行多重序列匹配排列, 用邻接法(Neighbor-Joining 法) Kimura two-parameter 计算方法构建系统发育树, 并进行自举分析(Bootstrap)做置信度检测, 自举数集 1 000 次<sup>[20]</sup>。利用 Bioedit 软件计算多序列之间同源性。本研究获得的基因序列在 GenBank 中的登录号为 JN188401-JN188424(16S rRNA 基因)、JN188449-JN188472(*toxR* 基因)、和 JN408260-JN408283(*pyrH* 基因)。

## 2 结果

### 2.1 基于 16S rRNA 基因初判溶藻弧菌及其相近种

我们得到各弧菌分离株的 16S rRNA 基因的序列后, 在进行 BLAST 比对时, 经常会出现相互矛盾的结果, 一株菌可以跟多个弧菌种具有 99% 以上的相似性。由于网上序列及相应菌株的分类学背景不同, BLAST 的结果只能做参考。我们把所有与溶藻弧菌 BLAST 相似性高于 98% 的 18 株分离株全部收集起来, 进一步用其他分子和生化鉴定系统进行分析鉴定。我们从 RDP 数据库下载了哈维群弧菌所有 6 个种的模式株的 16S rDNA 序列, 比较了其 18 株分离株和 5 株参比菌株的 16S rDNA 序列的相似性。多数分离株同时与 2 个甚至多个种的模式菌株序列相似度都超过 98.6%, 相互间差异非常小。如果我们简单地

把相似性最高看作为初步判定种的依据, 则: 菌株 NSAI、OCW27、ZDS-6、469、486、H2X-5、473、474、NSP1、NSP3、418、461、448 等 13 株待鉴定菌株和 4 株溶藻弧菌参比菌株初步判定为溶藻弧菌; 菌株 462、464 和 476 初步判断为轮虫弧菌; 菌株 534 判定为吸钠弧菌; 菌株 XHS1-3 与溶藻弧菌和需钠弧菌两个种相似性一样, 无法判定。基于 16S rRNA 基因序列片段构建的系统发育树(图 1-a)显示, 溶藻弧菌的模式株和参比菌株分到几个不同分支, 初步判定的菌株发育学位置混乱。

### 2.2 基于 *toxR* 和 *pyrH* 基因序列的鉴定

基于 *toxR* 基因序列相似性比较, 5 株参比菌株均能正确地聚类到溶藻弧菌和副溶血弧菌的簇中, 18 个分离株也清楚地归并到 4 个种中(表 2)。菌株 469、486、473、474、NSAI、ZDS-6、OCW27、XHS1-3、H2X-5 等 9 株分离株和 4 株溶藻弧菌参比株与溶藻弧菌模式株的相似性为 80.6% ~ 99.7%, 明显大于其与其他种模式株的相似性(52.8% ~ 71.6%); 菌株 NSP1、NSP3、461、448、418 等 5 株菌和副溶血参比菌株 VP O1 与副溶血弧菌的相似性为 97.7% ~ 99.1%, 与另外 5 种的相似性不超过 72.0%; 菌株 462、464、476 与坎氏弧菌的相似性为 87.1% ~ 92.7%, 与其余各种的相似性不超过 71.9%; 菌株 534 与需钠弧菌的相似性为 99.1%, 远高于与其他种的 55.0% ~ 63.2%。基于 *toxR* 基因序列片段构建的系统发育树(图 1-b)也将这些菌株清晰地聚类到相应种模式株簇中, 溶藻弧菌簇内又有两个亚簇。

基于 *pyrH* 基因序列相似性比较, 5 株参比菌株也分别正确地归并到相应的种中; 菌株 NSAI、469、486、473、474、ZDS-6、OCW27、XHS1-3、H2X-5 等 9 株分离株和 4 株溶藻弧菌参比株与溶藻弧菌模式株的相似性为 96.4% ~ 98.7%, 明显大于其与其他种模式株的相似性(86.6% ~ 91.8%); 菌株 NSP1、NSP3、461、448、418 等 5 株菌和副溶血参比菌株 V<sub>p</sub> O1 与副溶血弧菌模式株的相似性为 97.4% ~ 97.9%, 与其余各种的相似性则不超过 95.1%; 菌株 462、464、476 与坎氏弧菌模式株的相似性为 99.2% ~ 99.4%, 与其余各种的相似性不超过 92.7%; 菌株 534 与吸钠弧菌模式株的相似性为 98.7%, 与其余各种的相似性不超过 93.1%(表 2)。基于 *pyrH* 基因序列构建的系统

发育树(图 1-c)与基于 *toxR* 基因构建的系统发育树具有相似的聚类分支,也显示溶藻弧菌种内存

在两个明显差异的聚类分支,说明两个分支的溶藻弧菌具有独立的进化方向。

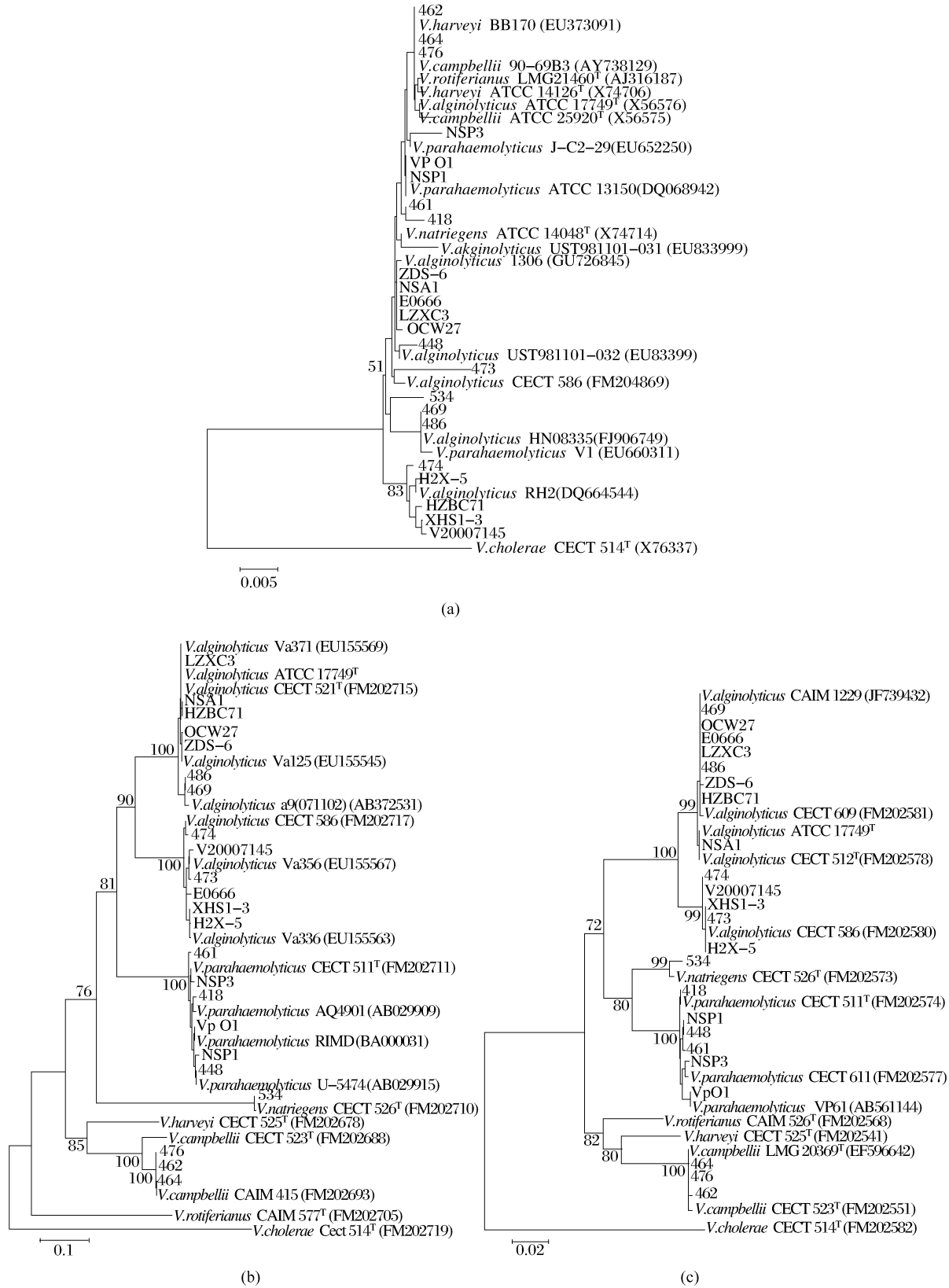


图 1 基于 16S rRNA (a), *toxR* (b) 和 *pyrH* (c) 基因构建的哈维群弧菌系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of harveyi group of *Vibrio* based on the sequences of 16S rRNA (a), *toxR* (b) and *pyrH* (c) genes

表 2 哈维群弧菌分离株与模式株之间 *toxR* 和 *pyrH* 基因同源性  
 Tab. 2 The similarity of *toxR* and *pyrH* genes between the isolate and the type strain of harveyi group of *Vibrio*

基因 gene	模式株 type strain	分离株 isolates				%
		<i>V. alg</i> (13)	<i>V. par</i> (6)	<i>V. cam</i> (3)	<i>V. nat</i> (1)	
<i>toxR</i>						
1	<i>V. alginolyticus</i> CECT 521 <sup>T</sup>	80.6 ~ 99.7	70.3 ~ 72.0	66.2 ~ 66.4	63.2	
2	<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 511 <sup>T</sup>	69.0 ~ 71.6	97.7 ~ 99.1	57.6 ~ 61.8	60.3	
3	<i>V. campbellii</i> CECT 523 <sup>T</sup>	59.9 ~ 67.5	59.2 ~ 60.5	87.1 ~ 92.7	54.7	
4	<i>V. natriegens</i> CECT 526 <sup>T</sup>	61.2 ~ 63.2	59.8 ~ 60.9	51.5 ~ 55.1	99.1	
5	<i>V. harveyi</i> CECT 525 <sup>T</sup>	59.5 ~ 64.6	62.0 ~ 63.4	67.6 ~ 71.9	54.9	
6	<i>V. rotiferianus</i> CECT 577 <sup>T</sup>	52.8 ~ 58.2	54.5 ~ 55.8	48.0 ~ 51.8	55.0	
<i>pyrH</i>						
1	<i>V. alginolyticus</i> CECT 521 <sup>T</sup>	96.4 ~ 98.7	90.7 ~ 91.2	86.2 ~ 86.4	90.5	
2	<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 511 <sup>T</sup>	89.7 ~ 90.3	97.4 ~ 97.9	88.3 ~ 88.4	93.1	
3	<i>V. campbellii</i> CECT 523 <sup>T</sup>	86.6 ~ 87.0	89.4 ~ 90.2	99.2 ~ 99.4	89.6	
4	<i>V. natriegens</i> CECT 526 <sup>T</sup>	91.4 ~ 91.8	94.4 ~ 95.1	89.4 ~ 89.6	98.7	
5	<i>V. harveyi</i> CECT 525 <sup>T</sup>	86.8 ~ 87.7	90.7 ~ 91.4	95.1 ~ 95.3	90.1	
6	<i>V. rotiferianus</i> CECT 577 <sup>T</sup>	86.8 ~ 87.7	88.1 ~ 88.7	92.6 ~ 92.7	90.2	

注:*V. alg.*, *V. alginolyticus*, 包括 9 个待鉴定菌株和 4 个参比菌株;*V. par.*, *V. parahaemolyticus*, 包括 5 个待鉴定菌株和 1 个参比菌株;*V. cam.*, *V. campbellii*, 包括 3 个待鉴定菌株;*V. nat.*, *V. natriegens*, 1 个待鉴定菌株。

Notes: *V. alg.*, *V. alginolyticus*, including 9 isolates and 4 reference strains; *V. par.*, *V. parahaemolyticus*, including 5 isolates and 1 reference strains; *V. cam.*, *V. campbellii*, including 3 isolates; *V. nat.*, *V. natriegens*, including 1 isolate.

### 2.3 弧菌常规鉴定及 VITEK 系统鉴定结果

23 株弧菌均能在 TCBS 平板生长、革兰氏阴性、具有溶血性、氧化酶阳性、发酵葡萄糖产酸不产气、都能够在 8% NaCl 胨水生长, 0% NaCl 胨水不生长; 部分能够在 10% NaCl 胨水生长, 因此, 初步判定为弧菌属细菌。VITEK 2 COMPACT GN 鉴定卡在 4 ~ 10 h 得出鉴定结果, 菌株 OCW27、469、474、473、534、H2X-5、ZDS-6、XHS1-3、NSA1 等鉴定为溶藻弧菌, 菌株 418、448、461、NSP1、NSP3 鉴定为副溶血弧菌, 菌株 486 鉴定为维罗纳气单胞菌(*Aeromonas veronii*), 菌株 464 鉴定为杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*), 菌株 462、476 不在鉴定谱内。

## 3 讨论

### 3.1 弧菌基因组内 16S rRNA 基因的多拷贝

16S rRNA 基因作为最早研究生物系统发育的分子钟, 为生物三域说的形成和发展做出了重要贡献。目前原核生物所有物种都能在基因库中找到其模式株的 16S rRNA 基因序列。因此, 16S rRNA 基因数据库 BLAST 比对也成为人们判定原核生物分离株的属和种的归属的最常用的快捷方式。多数情况下, BLAST 的比对结果对于细菌种的快速鉴定具有重要参考价值。但是对于弧菌

种的鉴定, 16S rRNA 基因 BLAST 判定则会引起混乱。其原因主要有: (1) 弧菌是自然界广泛分布, 与人类生活关系密切的一群细菌, 其种的分类得到了深入的研究, 很多种的种间差别较小, 判定一个弧菌新种的标准是总 DNA 杂交有 80% 的相似性, 而不是通用的 70%<sup>[21]</sup>, 因而弧菌种间的表型和遗传差异更小, 不易鉴别; 如溶藻弧菌和副溶血弧菌, 霍乱弧菌和拟态弧菌, 哈维氏弧菌和坎氏弧菌等; (2) 弧菌基因组内 16S rRNA 基因是多拷贝的, 其拷贝数为 8 ~ 13 个<sup>[22]</sup>, 基因组内的各个拷贝之间序列存在差异, 这种差异有时超过 1%<sup>[23]</sup>, 已明显大于不同种基因组间的差异。例如已测基因组序列的 *V. cholerae* N16961 基因组内 8 个 16S rRNA 基因序列间差别碱基数为 0 ~ 14 个<sup>[24]</sup>, *V. cholerae* N16961 与 *V. cholerae* 0395 菌株间 16S rRNA 基因序列最大碱基差异数为 20 个。灿烂弧菌(*V. splendidus*) 16S rRNA 基因系统发育分析表明, 菌株 PB1-10 的 13 个拷贝分别与 *V. splendidus*, *V. lentus*, *V. aestuarianus*, *V. tasmaniensis* 和 *V. anguillarum* 等 5 个种聚在一起<sup>[25]</sup>。在 NCBI 数据库中, 同一种的同一模式株的 16S rRNA 基因有多条序列, 如溶藻弧菌、哈维氏弧菌和坎氏弧菌各有 2 条, 副溶血弧菌有 3 条(表 3)。溶藻弧菌模式株 ATCC 17749<sup>T</sup> 的 2 个

16S rRNA 基因序列(X74690, X56576)之间的相似性只有 98.8%, 但序列 X74690 与哈氏弧菌(X74706)、副溶血弧菌(X74720)、坎氏弧菌(X74692)、需钠弧菌(X74714)和轮虫弧菌(AJ316187)等种模式株的相似性均高于 98.8%, 同时, 序列 X56576 与坎氏弧菌模式株的另一条序列(X56575)相似性也高于 98.8%。我们通过 PCR 产物直接测序得到的该模式株的序列(JN188438)与 X56576 和 X74690 的序列均不同,

相似度分别是 98.5% 与 99.4%, 而与副溶血弧菌(X74720)、坎氏弧菌(X74692)、需钠弧菌(X74714)和轮虫弧菌(AJ316187)等种模式株的相似性均高于 99.5%。因此 16S rDNA 比对于弧菌种的快速鉴定的参考意义已经不大, 应该寻找其他基因。这种基因应该满足以下条件:(1) 是基因组的核心基因, 普遍存在于弧菌各种中;(2) 基因保守性相对较低, 对弧菌各种的鉴别力较高<sup>[26]</sup>。*toxR* 和 *pyrH* 等基因就具备这两个条件。

表 3 哈维群弧菌各模式菌株 16S rRNA 基因序列间遗传距离及同源性

Tab.3 The genetic distance and similarity of 16S rRNA gene between the type strain sequences of *V. harveyi* group

模式菌 type strain	登录号 accession no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126 <sup>T</sup>	X74706	1		98.8	98.4	99.0	98.8	96.7	98.8	97.7	98.3	99.1	98.6	99.1
	AY75075	2	0.64		97.9	98.5	98.8	96.5	98.3	97.7	97.8	99.0	98.5	99.1
<i>V. alginolyticus</i> ATCC 17749 <sup>T</sup>	X56576	3	0.79	1.29		98.8	98.5	96.9	98.6	97.6	99.5	98.6	98.4	98.6
	X74690	4	0.64	1.15	0.43		99.4	97.1	99.7	98.5	98.7	99.3	99.2	99.2
	JN188438	5	0.86	1.07	0.79	0.36		97.4	99.5	98.9	98.5	99.5	99.5	99.5
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802 <sup>T</sup>	X56580	6	2.46	2.76	2.39	2.10	1.95		97.2	97.1	96.9	97.0	96.9	97.0
	X74720	7	0.79	1.29	0.57	0.14	0.21	1.95		98.6	98.6	99.2	99.2	99.1
<i>V. campbellii</i> ATCC 25920 <sup>T</sup>	AF388386	8	1.87	2.09	1.66	1.22	1.00	2.24	1.08		97.6	98.5	98.5	98.5
	X56575	9	0.93	1.44	0.29	0.57	0.79	2.39	0.57	1.66		98.6	98.3	98.6
<i>V. natriegens</i> ATCC 14048 <sup>T</sup>	X74692	10	0.57	0.79	0.64	0.50	0.43	2.24	0.50	1.29	0.64		99.2	99.8
	X74714	11	1.00	1.22	0.79	0.50	0.29	2.24	0.50	1.29	0.93	0.71		99.0
<i>V. rotiferianus</i> LMG 25920 <sup>T</sup>	AJ316187	12	0.50	0.71	0.62	0.57	0.50	2.31	0.57	1.36	0.71	0.07	0.79	

注: 对角线左下为哈维群弧菌模式株 16S rRNA 基因遗传距离(%), 利用 MEGA 4.1 软件 Maxium Composite Likelihood Model 法计算; 对角线右上为哈维群弧菌模式株 16S rRNA 基因序列间同源性, 利用 Bioedit 软件计算。

Notes: Data below the diaonal is genetic distance(%) of 16S rRNA gene between the type strain sequences of harveyi group, calculated by MEGA 4.1 using Maxium Composite Likelihood Model model; Data above the diaonal is similarity(%) of 16S rRNA gene between the type strain sequences of harveyi group, calculated by Bioedit.

### 3.2 溶藻弧菌的快速鉴定

目前, 对于弧菌一个新种的确定, 要对其做一系列生理生化试验, 并进行总 DNA 杂交, 测定其至少 7 个保守基因的序列, 做系统发育地位分析<sup>[27]</sup>。但对于一般的弧菌分离株的种属鉴别, 则只需找出一个简单、快速、可信的方法就可。

Pascual 等<sup>[15]</sup>报道 *toxR* 基因同源性在 4 株溶藻弧菌种内为 77.2% ~ 100%, 哈维群弧菌内为 33.8% ~ 72.5%, *pyrH* 基因同源性在溶藻弧菌种内为 97.3% ~ 100%, 哈维群弧菌内为 86.4% ~ 97.8%。本文中, 溶藻弧菌群中 4 株参考菌株和 9 株分离株的同源性 *toxR* 基因为 80.1% ~ 100%, *pyrH* 基因 97.2% ~ 100%; 与溶藻弧菌模式株同源性分别为 81.0% ~ 99.1% *toxR*, 96.4% ~ 98.7% *pyrH*, 明显高于与其他种弧菌的

同源性(52.8% ~ 71.6% *toxR*, 86.6% ~ 91.8% *pyrH*), 因此, *toxR* 和 *pyrH* 等 2 个基因可用于溶藻弧菌的鉴定, 但 *toxR* 基因较 *pyrH* 基因多态性位点更多, 因而具有更强的分辨力, 也是设计特异性引物和探针的理想靶基因。副溶血弧菌群中的 5 个分离株和 1 个参比菌株的同源性为 96.8% ~ 98.6% *toxR* 基因, 99.2% ~ 100% *pyrH* 基因; 与副溶血弧菌模式株的同源性为 97.7% ~ 99.1% *toxR* 基因, 97.4% ~ 97.9% *pyrH* 基因, 明显高于与其他种模式株的同源性。

在本实验中, 应用 VITEK 2 COMPACT 鉴定系统对 23 株弧菌进行了鉴定, 与分子结果一致的 19 株, 不一致的有 4 株, 其中 2 株不在鉴定谱内。如果以 *toxR* 基因和 *pyrH* 基因鉴定结果为准, 鉴定到种的准确率为 77.8%, 对溶藻弧菌鉴定正确

率为 88.9%。此外,溶藻弧菌三糖铁结果出现 2 种类型,部分副溶血弧菌能在 10% NaCl 脓水弱生长。因此,如要达到 100% 的可信度,需用分子方法复证。

综上所述,*toxR* 和 *pyrH* 基因都可用于溶藻弧菌的快速鉴定,也可作为溶藻弧菌种内分子分型的靶标基因。相比于 *pyrH* 基因,*toxR* 基因具有更强的种间鉴别力,建议在实际应用中先采用 *toxR* 基因对溶藻弧菌进行快速鉴定,如有必要,再选用 *pyrH* 基因对鉴定结果进行验证。由于溶藻弧菌在全球范围广泛存在,该鉴定方法是否具有地域差异性,需要进一步比较研究。

#### 参考文献:

- [1] 王国良,祝琳,金珊. 养殖大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 3 种致病弧菌的分子鉴定及其系统发育学分析[J]. 海洋与湖沼,2008,39(2):162-167.
- [2] 于占国,林凤翱,卞正和. 溶藻弧菌引起中国对虾红腿病的回接实验观察[J]. 海洋学报,1996,8:135-139.
- [3] 郑国兴,李何,黄宇宇,等. 文蛤病原菌(溶藻弧菌)的分离与性状及病文蛤组织的电镜观察[J]. 水产学报,1991,15(2):85-95.
- [4] 陈强,鄢庆枇,马牲. 溶藻弧菌致病性研究进展[J]. 海洋科学,2006,30(8):83-89.
- [5] 谢扬,李鹏,李肖莉,等. 溶藻弧菌急性胃肠炎 3 例报告[J]. 中国人兽共患病学报,2007,23(9):956.
- [6] 吴晓燕,倪侃翔,毕平安,等. 创伤弧菌所致败血症的报道[J]. 检验医学,2007(22):424.
- [7] Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews,2000,64(4):655-671.
- [8] Gomez-Gil B, Soto-Rodríguez S, García-Gasca A, et al. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms [J]. Microbiology, 2004, 150 (6): 1769-1777.
- [9] Nishiguchi M K, Nair V S. Evolution of symbiosis in the Vibrionaceae: a combined approach using molecules and physiology [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2003, 53(6):2019-2026.
- [10] Le Roux F, Gay M, Lambert C, et al. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus* related strains based on *gyrB* gene sequences[J]. Disease of Aquatic Organisms,2004,58:143-150.
- [11] Thompson F L, Gevers D, Thompson C C, et al. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71 (9): 5107-5115.
- [12] Ki J S, Rui Z, Wen Z, et al. Analysis of RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene sequences for the discriminative power of marine *Vibrio* species [J]. Microbiology Ecology,2009,58(4):679-691.
- [13] Kim Y B, Okuda J, Matsumoto C, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene [J]. Journal of Clinical Microbiology,1999,37(4):1173-1177.
- [14] Pham H N, Mohammad M S, Kiyofumi O, et al. The *dnaI* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species [J]. Systematic and Applied Microbiology,2006,30(4):309-315.
- [15] Pascual J, Macian M C, Arahal D R, et al. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2010, 60(1):154-165.
- [16] O'Hara C M, Sowers E G, Bopp C A, et al. Accuracy of six commercially available systems for identification of members of the family Vibrionaceae [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41 (12):5654-5659.
- [17] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:364-398.
- [18] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.7-2008 食品卫生微生物学检验副溶血性弧菌检验[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [19] 温丹,张德民,初航. 网箱养殖海区底泥产芽孢细菌多样性[J]. 海洋与湖沼,2009,40(5):615-621.
- [20] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4.0: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution,2007,24(8):1596-1599.
- [21] Fabiano L, Thompson, Tetsuya I, et al. Biodiversity of *Vibrios* [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews,2004,68(3):403-431.
- [22] Zarras M L, Carl B, Thomas M S. *rrnDB*: documenting the number of rRNA and tRNA genes

- in bacteria and archaea[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37 (suppl 1): 489 – 493.
- [23] Moreno C, Romero J, Espejo R T. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio* [J]. *Microbiology*, 2002, 148 (4): 1233 – 1239.
- [24] Stewart F J, Cavanaugh C M. Intragenomic variation and evolution of the internal transcribed spacer of the rRNA operon in bacteria [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2007, 65: 44 – 67.
- [25] Sigmund J, Petter F, Vigdis L T. The nonrandom microheterogeneity of 16S rRNA genes in *Vibrio splendidus* may reflect adaptation to versatile lifestyles [J]. *FEMS Microbiology Letter*, 2009, 294: 207 – 215.
- [26] Zeigler D R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53: 1893 – 1900.
- [27] Susumu Y, Minoru W, Kumiko K T, et al. *Vibrio azureus* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 1645 – 1649.

## Molecular and VITEK identification of *Vibrio alginolyticus*-related isolates

GUO Jing<sup>1</sup>, Liswaniso Gadafii<sup>1</sup>, GUO An-nan<sup>1</sup>, YAN Yong-wei<sup>1</sup>, ZHANG De-min<sup>1\*</sup>,  
 QIU Qiong-fen<sup>1</sup>, HUANG Su-wen<sup>2</sup>, DAI Hai-ping<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ningbo University, Ministry of Education, Ningbo 315211, China;

2. Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo 315012, China;

3. Fishery Administration and Tech-service Station of Yinzhou, Ningbo 315012, China)

**Abstract:** *Vibrio alginolyticus*, a member of the core group of the genus *Vibrio*, also called *V. harveyi* group, shares high phenotypic and genotypic resemblance with the other species of this group. It is very difficult to identify strains of *V. alginolyticus* from others. The housekeeping genes and various automated systems based on biochemical characteristics of bacteria provide more alternatives for identification. In this study, we compared the resolution of 16S rRNA gene, *toxR* gene, *pyrH* gene and VITEK 2 COMPACT GN card on *V. alginolyticus*-related isolates. There are multiple copies of 16S rRNA gene in the genome of *Vibrio* and the intragenomic heterogeneity among different copies might be higher than intergenomic heterogeneity in some strains. These facts make the 16S rRNA gene not suitable for the discrimination of *V. harveyi* group species. Both of single-copy genes *toxR* and *pyrH* show a considerable gap between the maximal interspecies similarity and the minimal intraspecies similarity. The *toxR* gene similarity analyses of eighteen isolates and five reference strains can clearly group them into four species. The phylogenetic tree based on *toxR* gene shows that strains of individual species clustered together independently, and there are two different clusters within *V. alginolyticus*, indicating that they have different evolving paths. The similarity and phylogenetic analyses based on *pyrH* gene come to the same result of *toxR* gene. The discriminatory power of *pyrH* gene is slightly lower than that of *toxR* gene. VITEK 2 COMPACT GN card presents one misidentification among 9 isolates of *V. alginolyticus* and its species database does not include *V. campbellii*, *V. rotiferianus* and *V. natriegens*. We suggested that *toxR* gene could be the first choice for fast identification of *V. alginolyticus* isolates, and *pyrH* gene may be used for verification.

**Key words:** *Vibrio alginolyticus*; 16S rDNA; *toxR*; *pyrH*; VITEK 2 COMPACT

**Corresponding author:** ZHANG De-min. E-mail: zhangdemin@nbu.edu.cn