

• 综 述 •

溶藻弧菌分子分型技术的研究进展*

胡南霞^{1,2}, 马 聪¹综述, 李艳君^{1△}审校

(1. 海军总医院检验科, 北京 100048; 2. 南方医科大学, 广州 510515)

关键词:溶藻弧菌; 分子分型; 综述**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.038**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2014)13-1753-03

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)又名解藻朊酸弧菌,属弧菌科(*Vibrionaceae*)弧菌属(*Vibrio*),广泛分布于温带和热带海洋中,对鱼、虾、贝等具有较强的致病性,污染的海产品可引起人类食物中毒^[1-3]。此外,溶藻弧菌也可导致伤口感染,可引发渔民或海上作业人员伤口、外耳道等的感染,当人体免疫功能低下时,则能引起呼吸道、血液、颅内等部位的严重感染。近年来,随着溶藻弧菌食物中毒案例报道的增多,对该菌的流行病学调研引起人们越来越广泛的关注,细菌分型是流行病学研究的一个重要手段,对于判断菌株之间的亲缘关系,追溯病原菌来源,切断传播途径,制订有效应对措施具有非常重要的科学意义和应用价值。本文就溶藻弧菌分子分型研究进展作一综述。

1 随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNAs, RAPD)

RAPD 技术是 1990 年研究者提出的一项分析 DNA 多态性的技术,其原理是在人工合成的随机引物以及热稳定 DNA 聚合酶的共同作用下,扩增目的 DNA,得到一系列不连续 DNA 片段,电泳后,分析扩增产物的多态性,即为基因组 DNA 的多态性^[4]。

RAPD 技术具有极高灵敏度,能够成功区分出相似度极高的基因组间的差异,所以当分析整个基因组或比较相似度极高的基因组时,首选 RAPD 技术进行比较。在 1999 年,另有研究者相继指出可将 RAPD 技术运用于微生物多样性研究。但该技术仍有许多不足,如所用引物太短,使得退火温度过低,对实验条件要求苛刻,实验结果稳定性差,重复率低,缺乏标准化。

RAPD 技术用于溶藻弧菌的分型研究已有报道,2002 年 Sudheesha 等^[5]应用该方法对 9 株溶藻弧菌进行分型研究,将其分成 2 群。同年,陈岱等^[6]运用 8 条随机引物对分离自不同宿主、不同环境的 8 株溶藻弧菌菌株进行了 RAPD 分型研究,得到 46 条多态性条带,将 8 个菌株分为 3 个类群。2011 年欧阳吉隆等^[7]用该技术对海南地区 27 株溶藻弧菌分型研究表明,溶藻弧菌具有多种基因型,尤其是毒力菌株。2012 年邬长祥等^[8]优化 RAPD 条件,利用 10 条 RAPD 随机引物对来自 4 个地区的 127 株溶藻弧菌进行了分型研究,获得 164 个多态性位点。聚类结果将 127 株菌株分成 23 个类群,并将来自福建(34 株)、广西(21 株)、海南(22 株)、广东(50 株)的菌株分别分为 11、7、11、19 个类群。上述结果显示溶藻弧菌的同源性与其地理分布有关,来自同一地区的菌株同源性较高,反之亦然。

2 肠杆菌基因间重复共有序列 (enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC) PCR

ERIC 是一类长度为 127 bp 的基因间重复序列,主要存在于肠道细菌染色体上。由于其分布和拷贝数有种间的特异性,被广泛应用于细菌分型研究。根据 ERIC 序列建立的 ERIC-PCR 是在 RAPD-PCR 的基础上发展起来的一种细菌 DNA 指纹图谱分析法。Gillings 等^[9]研究指出,与 RAPD-PCR 相比,ERIC-PCR 不需要模板序列已知,可以直接进行扩增,而且具有结果稳定、重复性好的优点,由于其引物序列较长,退火温度较高,所以 PCR 产物经电泳后,可得到稳定及重复率高的图谱,以便进行细菌分型研究。

在细菌分型研究中,ERIC-PCR 不受纯培养的局限,且具有分析速度快、提供的信息量大的优点。同样 ERIC-PCR 也有不足,由于该技术基于 PCR 反应之上建立,固然受 PCR 本身的局限,如扩增时会存在偏差或错误,细胞生理状况会影响反应效率等。

在溶藻弧菌的分子分型研究中,陈岱等^[10]应用该技术对 8 株分离自不同宿主、不同环境的溶藻弧菌进行了分型研究,获得 55 个在数量上分布均匀的扩增条带,结果显示不同环境、不同宿主来源的溶藻弧菌具有较大的多样性。与 RAPD 结果比较,ERIC-PCR 结果更加稳定,且操作更加方便。2006 年 Ben Kahla-Nakbi 等^[11]用 ERIC-PCR 将 2003~2005 年间从感染的金头鲷和狼鲈中分离的 34 株溶藻弧菌分成 19 个基因型,并对不同季节致病溶藻弧菌的基因型分布情况做了初步探索与分析,表明了同一个体有时可以同时感染多种基因型的溶藻弧菌致病菌。

3 核糖体分型 (ribotyping)

在细菌进化过程中,与其他基因相比,细菌核糖体 RNA (rRNA) 基因具有相对保守的特点,所以可作为分子基础应用于细菌遗传分型和菌株鉴定。目前被认为是衡量生命进化史的最理想标尺。针对 rRNA 基因的核糖体分型能够产生重复性和精确性较高的指纹图,从而实现从种水平区分近缘细菌,因此该技术也被称作核糖体分型技术^[12-16]。

作为与核糖体蛋白结合的 RNA 分子,rRNA 参与蛋白质的翻译并起到关键作用。在原核生物中有 3 种形式(23S、16S 和 5S)。其中由于 16S rRNA 大小适中,最适合核糖体分型研究,该方法的原理是利用限制性内切酶酶切细菌 DNA,得到大小不同的数条不连续 DNA 片段,将其转移至膜上后,应用 rDNA 进行杂交,获得菌株核酸指纹图谱,由于各菌株间有差异,

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31170008)。 作者简介:胡南霞,女,硕士研究生,主要从事细菌基因组多态性研究。 △ 通讯作者,E-mail:liyanjun1230@163.com。

所得条带自然有所不同。最后进行样本或数据库比对,达到分型目的。随着基因组学的发展,几乎所有病原菌的 16S rRNA 基因测序均已完成。

由于 16S rRNA 基因序列具有保守、稳定及存在普遍的特点,使得在核糖体分型中应用该序列研究细菌分型具有重复率极高的优势。当然核糖体分型也有一定的局限性:其分辨力中等,流行病学上无关的菌株,有可能有相同的核糖体图谱,需要用到放射性同位素,成本很高,而且实验步骤较为繁琐。

作为微生物分型金标准,核糖体分型方法已被运用于溶藻弧菌的研究。2003 年 Zorrilla 等^[17]将分离自金头鲷等鱼类和海水环境中的 34 株溶藻弧菌进行了核糖体分型研究,应用 HindⅢ 内切酶酶切后将其分成 23 种核糖体型,发现不同分离宿主的菌株核糖体型有所不同,而且环境株和鱼类中分离到的菌株也分属于不同的核糖体型。1999 年 Zanetti 等^[18]对意大利的撒丁岛北部海域分离的 30 株溶藻弧菌进行了分型研究,为得到较好的分型效果,研究中采用了 3 种限制性内切酶 HindⅢ、Kpn I 和 Xba I、Xba I 酶切后产生了 7 种图谱,而 HindⅢ、Kpn I 分别产生了 3 种和 4 种图谱。

4 脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

PFGE 的原理是采用合适的核酸内切酶酶切目的 DNA,产生数个 DNA 片段,由于目的 DNA 不同,产生的片段在数量和大小上亦会有一些的差异,将所得片段在交变电场下电泳后,比较所得核酸图谱,达分型研究目的。可以说,在一定意义上,PFGE 也是一种 RFLP,即限制性核酸片段多态性分析法^[19]。与常规的电泳方法相比,由于 PFGE 使用交变电场,所以可以筛出相对分子质量高达 800 kb 的 DNA 分子,而常规的电泳方法最大约为 50 kb。Tenover 等^[20]在 1995 年统一了判断标准,即差异在 2~3 条酶切图谱,则认为两分离菌株关系密切;差异在 4~6 个条带时,为可能相关;7 个或 7 个以上条带,则为不同。后来,美国疾病预防控制中心对其进行了补充,建立了完善的 PulseNet 体系,规范化和标准化了 PFGE 操作体系及判断标准,同时建立了大规模食源性致病菌的数据库。目前该方法作为分型方法已广泛用于流行病的溯源性研究^[21-23],如弧菌属、肠杆菌属和沙门氏菌属等。

作为肠球菌、肠杆菌和葡萄球菌分子分型的金标准,PFGE 具有很高的分辨率和可重复性。但其主要的缺点在于需要长时间培育目的 DNA,非常耗时,所以不适合疾病暴发流行时的大样本的研究,同时需要昂贵的专业设备。

在溶藻弧菌研究中,2008 年 Ren 等^[23]利用低频限制性位点聚合酶链反应技术和 PFGE 方法对将 45 株溶藻弧菌进行分型,结果将 45 株溶藻弧菌分成了 24 个基因型。

5 低频限制性位点聚合酶链反应技术(infrequent-restriction-site PCR, IRS-PCR)

IRS-PCR 是美国研究人员在 1996 年提出的一种关于细菌分型研究的 DNA 指纹分析方法。其原理是采用高、低频率两种限制性内切酶一起切割目的基因组 DNA,由于酶切的 DNA 序列不同,产生的 DNA 条带亦不同,经连接体连接后,进行扩增、电泳后,产生不同的条带,从而达到分型的目的。国内外学者已应用 IRS-PCR 方法对多种细菌分型^[24-26],如铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肠炎沙门菌、鲍曼不动杆菌和沙雷菌、脓肿分枝杆菌、李斯特菌等。该方法可以与其他分子分型方法相结合,以便提供更加可靠的溯源资料。IRS-PCR 方法优点在于

其分辨率较高、重复性较好、操作简单、耗时短而且不需要特殊仪器。但是此方法对细菌分型具有局限,由于无法从克隆菌株中区分与零散的念珠菌群落,使之与 PFGE 结果有所不同^[24]。

目前该技术应用用于溶藻弧菌方面的研究较少,2008 年, Ren 等^[23]应用 IRS-PCR 对分离自广东大亚湾海水环境和鱼类中的 45 株溶藻弧菌进行分型研究,应用 Not I 和 Hha I 内切酶组合酶切扩增后,得到 24 种酶切图谱,与应用 PFGE 进行分型得到一致的结果,并且不同来源和不同宿主动物的菌株,ISR-PCR 型有所不同,提示溶藻弧菌在进化过程中由于基因转移、突变等原因导致了基因组多态性的产生,为分子流行病学调研提供分子基础。

6 小 结

溶藻弧菌的分子分型是流行病学调研重要手段之一,然而国内外对于溶藻弧菌分型和基因组的多态性研究报道不多,尚未见对溶藻弧菌进行系统的分子分型研究。综上所述,各分型方法由于区分菌株所用的参数不同,鉴定菌株的近缘关系的能力自然也不同,这在一定程度上会影响溶藻弧菌的溯源性研究。所以我们可以设法巧妙结合多种不同的分型方法进行分型研究,以弥补一种方法的不足。同时,有关分子分型的其他技术,如多位点测序(multi locus sequencetyping, MLST)、差异片段(different region, DFR)和多位点串联重复序列分析(multi locus vntr analysis, MLVA)等已经被用于副溶血弧菌、鼠疫耶尔森氏菌等细菌的基因分型和基因组多态性研究^[27-30],得到令人满意的分型溯源效果,目前尚未有报道将其应用于溶藻弧菌的分型研究,在今后的研究中将应用上述技术对溶藻弧菌的分型进行尝试。

参考文献

- [1] Jones EH, Feldman KA, Palmer A, et al. Vibrio infections and surveillance in Maryland, 2002 - 2008 [J]. Public Health Rep, 2013, 128(6): 537-545.
- [2] Sims JN, Isokpehi RD, Cooper GA, et al. Visual analytics of surveillance data on foodborne vibriosis, United States, 1973 - 2010 [J]. Environ Health Insights, 2011, 5(1): 71-85.
- [3] Schets, FM, Van den Berg HHJL, Marchese A, et al. Potentially human pathogenic vibrios in marine and fresh bathing waters related to environmental conditions and disease outcome [J]. Int J Hygiene Environ Health, 2011, 214(5): 399-406.
- [4] Sadok, K, Mejd S, Nourhen S, et al. Phenotypic characterization and RAPD fingerprinting of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio alginolyticus isolated during Tunisian fish farm outbreaks [J]. Folia Microbiol (Praha), 2013, 58(1): 17-26.
- [5] Sudheesh PS, Kong J, Xu HS. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of Vibrio parahaemolyticus and V. alginolyticus isolated from cultured shrimps [J]. Aquaculture, 2002, 207(1/2): 11-17.
- [6] 陈德, 胡超群, 张吕平, 等. 用 RAPD 技术对养殖环境溶藻弧菌遗传多样性的研究 [J]. 热带海洋学报, 2002, 14(1): 49-54.
- [7] 欧阳吉隆, 周永灿, 吴学贵, 等. 海南地区溶藻弧菌遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 海洋科学, 2011, 35(1): 30-36.
- [8] 郭长祥. 我国南方养殖海域溶藻弧菌的遗传多样性及部分毒力基因分布特征研究 [J]. 广东海洋大学学报, 2012, 24(1): 74-75.
- [9] Gillings M, Holley M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)

primers is not necessarily directed at ERIC elements[J]. Lett Appl Microbiol, 1997, 25(1): 17-21.

[10] 陈偿, 胡超群, 张吕平, 等. ERIC-PCR 和 RAPD 技术在弧菌遗传多样性分析中的应用[J]. 中国甲壳动物学会甲壳动物学论文集, 2003, 18(4): 341-347.

[11] Kahla-Nakbi AB, Chaieb K, Besbes A, et al. Virulence and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Tunisian cultured gilthead sea bream and sea bass outbreaks[J]. Veter Microbiol, 2006, 117(2): 321-327.

[12] Fakruddin M, Mannan KSB, Mazumdar RM, et al. Identification and characterization of microorganisms: DNA-fingerprinting methods[J]. Songklanakarin J Sci Technol, 2013, 35(4): 397-404.

[13] Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(22): 2001-2004.

[14] Will C, Thürmer A, Wollherr A, et al. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(20): 6751-6759.

[15] 马章林, 唐曙明, 楼许柏. 16S rRNA 在医学微生物鉴定中的应用探讨[J]. 吉林医学, 2011, 32(12): 2291-2292.

[16] 李莉, 谢旭阳, 曹延超, 等. rRNA 在水产动物细菌性病原鉴定中的应用[J]. 生物技术通报, 2013, 4(1): 27-32.

[17] Zorrilla I, Morinigo MA, Castro D, et al. Intraspecific characterization of *Vibrio alginolyticus* isolates recovered from cultured fish in Spain[J]. J Appl Microbiol, 2003, 95(5): 1106-1116.

[18] Zanetti S, Deriu A, Dupre I, et al. Differentiation of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Sardinian waters by ribotyping and a new rapid PCR fingerprinting method[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(5): 1871-1875.

[19] 王丽丽, 徐建国. 脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)在分子分型中的应用现状[J]. 疾病监测, 2006, 21(5): 276-279.

[20] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol

Sept, 1995, 33(9): 2233-2239.

[21] Allard MW, Luo Y, Strain E, et al. On the evolutionary history, population genetics and diversity among isolates of *Salmonella* Enteritidis PFGE pattern[J]. PLoS one, 2013, 8(1): e55254.

[22] Fox EM, DeLappe N, Garvey P, et al. PFGE analysis of *Listeria monocytogenes* isolates of clinical, animal, food and environmental origin from Ireland[J]. J Med Microbiol, 2011, 61(4): 540-547.

[23] Ren C, Hu C, Luo P, et al. Genotyping of *Vibrio alginolyticus* isolates from Daya Bay by infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis[J]. Mol Cell Probes, 2008, 22(4): 267-271.

[24] Jakubek D, Le Brun M, Leblon G, et al. Validation of IRS PCR, a molecular typing method, for the study of the diversity and population dynamics of *Legionella* in industrial cooling circuits[J]. Lett Appl Microbiol, 2013, 56(2): 135-141.

[25] Shin NY, Yoo JH, Park C, et al. Application of infrequent-restriction-site polymerase reaction(IRS-PCR) to the molecular epidemiologic analysis of methicillin resistant staphylococcus aureus(MRSA)[J]. Infect Chemother, 2011, 43(5): 396-405.

[26] 代文霞, 沈叙庄. 低频限制性位点聚合酶链反应在细菌分型中的应用[J]. 国外医学流行病学传染病学分册, 2005, 32(1): 60-62.

[27] Xiao X, Yan Y, Zhang Y, et al. A novel genotyping scheme for *Vibrio parahaemolyticus* with combined use of large variably-presented gene clusters(LVPCs) and variable-number tandem repeats(VNTRs)[J]. Int J Food Microbiol, 2011, 149(2): 143-151.

[28] Li Y, Cui Y, Hauck Y, et al. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci[J]. PLoS One, 2009, 4(6): e6000.

[29] Li Y, Dai E, Cui Y, et al. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China[J]. PLoS One, 2008, 3(5): e2166.

[30] Li Y, Cui Y, Cui B, et al. Features of variable number of tandem repeats in *Yersinia pestis* and the development of a hierarchical genotyping scheme[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66567.

(收稿日期: 2014-01-08)

• 综 述 •

MicroRNAs 在胰腺癌研究中的新进展

杨增俊¹综述, 陈 安²审校

(1. 第三军医大学学员旅学员四营, 重庆 400038; 2. 第三军医大学西南医院 医学检验系临床生物化学教研室, 重庆 400038)

关键词: 胰腺癌; miRNAs; 肿瘤标志物; 诊断与治疗

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 13. 039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)13-1755-04

胰腺癌是目前恶性程度最高的肿瘤之一, 其所致死亡在世界范围内居肿瘤死因的第 4 位, 是所有消化系统肿瘤中第 2 位最常见的恶性肿瘤^[1]。由于起病隐匿、缺乏可靠的早期诊断标志物, 大多数胰腺癌患者发现时已处于晚期, 少有手术切除机会, 且预后很差, 5 年生存率小于 5%^[2]。因此, 寻找胰腺癌特异性的早期诊断标志物显得尤为迫切。miRNAs 是一类由

17~25 个核苷酸组成的、内源性单链非编码 RNA 分子。miRNAs 不编码蛋白, 而是通过与 mRNA 的 3' 端非编码区(3' UTR)的靶向结合, 参与基因功能的调节^[3]。大量的研究表明, miRNAs 与肿瘤的进展密切相关, miRNAs 通过基因表达调控影响着细胞增殖、分化、凋亡、炎症反应、应激反应等病理生理过程, 是与肿瘤发生、发展密切相关的新的调节分子家族,