

副溶血弧菌海产品分离株 *tdh* 基因及其临近区域结构分析

王淑娜^{1,2}, Khamphouth VONGXAY¹, 沈飏², 周向阳², 金培婕¹, 陈健舜¹, 方维焕^{1*}

(浙江大学动物预防医学研究所, 浙江省动物预防医学重点实验室, 杭州 310029)

(舟山出入境检验检疫局综合技术服务中心, 舟山 316000)

摘要: 【目的】初步探索副溶血弧菌海产品分离株 *tdh* 基因区域的结构特征。【方法】采用长距离 PCR 和基因步移技术进行 *tdh* 基因侧翼序列扩增, 测序验证后拼接成疑似毒力基因片段, 将所获序列与 NCBI 数据库进行比较, 初步明确 *tdh* 基因侧翼序列的结构与功能。【结果】海产品分离株 ZS34 与参考菌株 RIMD2210633 的 *tdh* 基因区域 (VPA1310-VPA1327) 结构基本一致, 核苷酸同源性达 98.3% , 而 FJ14 与 WZ64 株基因组中的 *tdh* 基因均与 *tdh3* 的同源性最高, 在基因组中的位置也不同于 ZS34 株和参考菌株。FJ14 基因组中的 *tdh* 与 *trh-ure* 基因簇相连, *tdh* 与 *trh* 基因间的距离约为 15 kb , 中间分散着类插入序列; 菌株 WZ64 没有 *trh* 基因, 但 *tdh* 基因上游也有类插入序列。【结论】副溶血弧菌海产品分离株 *tdh* 基因区域具有多态性且存在类插入序列, 是毒力基因水平转移的佐证。

关键词: 副溶血弧菌; *tdh* 基因; 类插入序列; 基因水平转移

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2009) 12-1576-08

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, 简称 *V. p*) 是沿海地区主要的食源性病原菌之一, 可引起人类胃肠炎和败血症^[1-2]。日本的发生率约为每年 2 万例^[3]。我国 1992-2001 年间的微生物性食源性疾病暴发事件中, 由副溶血性弧菌引起的有 31% , 2003 年高达 40%^[4]。副溶血弧菌临床分离株都能在莪妻氏平板上呈现神奈川现象 (Kanagawa, KP), 该现象被认为是区分副溶血弧菌致病株与非致病株的主要标志^[5]。耐热直接溶血素 (TDH) 由 *tdh1-5* 基因编码, 其中 TDH2 被认为是引起神奈川现象的主要毒力因子^[6]。1988 年, Honda 等在 KP 阴性的临床分离株中发现了另外一种溶血素-TDH 相关溶血素 (TRH), TRH 和 TDH 具有相似的生物学特性, 例如溶血活性、肠毒性和细胞毒性^[6-7]。通常认为, 海产品分离株很少产生 TDH 或 TRH^[6,8]。而最近的研究表明海产品分离株中 *tdh+* 与/或 *trh+* 菌株呈现不

断上升趋势^[9]。2007 年夏秋季节, 本实验室在浙江沿海地区分离到 278 株副溶血弧菌, 其中 *tdh* 基因检出率高达 9.7% , 且大部分 *tdh+* 菌株表现出明显的神奈川现象 (未发表资料)。

副溶血弧菌临床分离株 RIMD2210633 (GenBank 登陆号: BA000032) 的全基因组序列已经公布, 但海产品分离株的主要毒力基因分布结构鲜见报道。不同来源副溶血弧菌的 *tdh* 基因有什么差异和特点, *tdh* 阳性的海产品分离株是否也有较强的毒力尚不明。本研究采用长距离 PCR (LA-PCR) 与基因步移方法, 获得海产品分离株 ZS34、FJ14 与 WZ64 在 *tdh* 基因两侧区域的序列, 并初步分析其功能。结果对于探明不同来源副溶血弧菌致病性差异的分子基础及主要毒力基因的水平转移机制具有重要意义。

基金项目: 国家自然科学基金 (30571436)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-571-86971242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

作者简介: 王淑娜 (1982-) 女, 河南登封人, 硕士, 主要从事微生物与食品安全研究。E-mail: shunawang@yahoo.cn

收稿日期: 2009-08-18; 修回日期: 2009-09-12

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 :副溶血弧菌海产品分离株 ZS34 (2005 年分离自浙江舟山南美白对虾) FJ14 (2006 年分离自福建牡蛎) 和 WZ64 (2007 年分离自温州围塘养殖的鳙鱼) 均携带 *tdh* 基因, 且在莪麦氏平板上均具有明显的神奈川现象; FJ14 菌株还携带 *trh* 基因。

1.1.2 主要试剂 : *Taq* 酶、10 × PCR buffer、dNTPs 均

购自北京鼎国生物技术有限公司, DNA 抽提试剂盒购自上海华舜核酸技术有限公司, 割胶回收试剂盒购于 AXYGEN 公司, 连接试剂盒、基因步移试剂盒购自大连宝生物有限公司。

1.2 引物设计与合成

基因步移引物按试剂盒要求设计。其它引物均采用 PrimerSelect 5.0 软件设计, 并由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 基因步移和长距离 PCR 反应的引物

Table 1 List of primers for genome walking and PCRs used in the study

<i>V. p</i> strains/Accession	Target genes	Primers	Sequence (5'→3')
	VPA1310 ^a	F2	CTCCAGACCCTACGCTTCCCGTC
	VPA1314	P3	GGGACAGATGGAAGCTCAAAGGCA
	VPA1312	F1	CGTCTGCACCTGTGTCCTGT
	VPA1314	P3	the same to P3 as referred above
	VPA1314	b-F	GGCAAAGTTATTAATCAATTCATG
		b-R	CGGAATTCCTATTGTGTGATGTTT
	VPA1315	c-F	TGTAGAAGCATATGAGAGTGGTAGTGG
	VPA1316	c-R	CGGGATAAATCCCAAGCGACT
RIMD2210633/ (BA000032)	VPA1316	d-F	TTAAAGGTGAACGACAAAGTCG
	VPA1321	d-R	TCATGTAGCTAAAGATGGAAATG
	VPA1321	e-F	CATGCACATTTGTCTTCCAAG
		e-R	TTAGAATAGTGAGGTCCATATGC
	VPA1321	f-F	ATTGGCATATGGACCTCAC
	VPA1325	f-R	ATAAGTTGCAGCATTAGGGC
	VPA1325	g-F	GCCCTAATGCTGCAACTTAT
	VPA1326	g-R	CTGTTCCGTATAACTTACACGA
	VPA1327	h-F	AATTCGTGTAAGTTATAGCGAAC
		h-R	CAATAGGAGGCAGATGTGAAGGT
WP1/ (M10069.1)	<i>tdh</i> gene	<i>tdh</i> -F	GTAAGGTCTCTGACTTTTGGAC
		<i>tdh</i> -R	TGGAATAGAACCTTCATCTTACC
FJ14	<i>tdh</i> region	<i>tdh</i> -u2-S1	GGAAGAAGTGCCTGAGAACCATGTT
		<i>tdh</i> -u2-S2	GACTACGGACAGCAAGCATAAGATG
		<i>tdh</i> -u2-S3 ^b	ACTACAAGCGAAGGTCAGCTCTAC
		<i>tdh</i> -u1-T1	TGCACAACGTCAGTACTAAATGG
		<i>tdh</i> -u1-T2	TCGGCTCAAGTACAGCTTCAACATTC
		<i>tdh</i> -u1-T3 ^c	GTAGAAGCATATGAAAGTGGTAGTGGT
		<i>tdh</i> -d1-P1	GTTACAGTTCATGTAGGATGTCAGCC
		<i>tdh</i> -d1-P2	CCTTTACATTGACCGGTGCATTTGGT
		<i>tdh</i> -d1-P3 ^d	same to above P3
		<i>tdh</i> -d2-w1	CGCTCTATACTTCAACTCCAACCTG
		<i>tdh</i> -d2-w2	TGCGATGGCGCGTGAATTTTGTGAG
		<i>tdh</i> -d2-w3 ^e	GACATCGAACACATACGGGACTG
		<i>tdh</i> -d3-n1	GGTATTCAGGAGTTAAAGAGGGCATC
		<i>tdh</i> -d3-n2	GGGCGCTATGTTGATTTTCTGACA
		<i>tdh</i> -d3-n3 ^f	CATCGCAGTCCCGTATGTGTTT
		<i>tdh</i> -d4-A1	CAGACGGTGTGGAATTTGTGTTATC
		<i>tdh</i> -d4-A2	GGCTGTCGTTGAATGATTTCTTGATGC
		<i>tdh</i> -d4-A3 ^g	CACACTTCACCCATGTTAGGAATCTC

续表

<i>V. p</i> strains/Accession	Target genes	Primers	Sequence (5'→3')		
WZ64	<i>tdh</i> region	<i>tdh</i> -L-1	GGCTGACATCCTACATGACTGTGAAC		
		<i>tdh</i> -L-2	GCGGGTCATTCTGCTGTGTTTCGTAA		
		<i>tdh</i> -L-3 ^b	CGGTGAAGATGAAGGTCTATTCC		
		<i>tdh</i> -R-1	TTACGAACACAGCAGAATGACCGCGC		
		<i>tdh</i> -R-2	GTTACAGTTCATGTAGGATGTCAGCC		
		<i>tdh</i> -R-3 ⁱ	CGGTTTGTCCAAAAGTCAGAGAC		
		FJ14 and WZ64	<i>tdh</i> region	FJ-up	CAGATCAAGTACAGCTTCAACATTC
				FJ-dn	GCTCTGGAGCATGGCTACTT
				P3	the same to P3 as referred above
P3-F3	GTAGAGCTGACCTTCGCTTGTA				
Ywn-1	CCTCAGTACAACTCTAAGATAAC				
Ywn-2	CATACGGGACTGATTCGGAA				
YZA	GGGTGAAGTGTGACAACTCCT				
ureG ^j	TGTGGGGTCAGGTAACACAG				
TH3996/ (AB038238) ^k	<i>trh</i> , <i>nik</i> and <i>ure</i> gene region	tp-1	ATCGCCACCTAACAACCTGC		
		tp-2	ATTGGCTTTGTTGCGTAATTC		
		trh-F	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT		
		trh-R	CATAACAACATATGCCCATTTCCG		
		TA-1	AGTGAAATGACTTGGATGATTG		
		TA-2	TGCTGTCTATGAATAATGTGTC		
		TB-1	CGTTGATAAATTGACACATTATTC		
		TB-2	ACATTTCTGCTCCTCGTGGA		
		TC-1	TACCACGAGGAGCAGAAATGT		
		TC-2	GTTGCTCCAGGCTAGTAATC		
		TD-1	TTCCTTGATTACTACGCCCTGG		
		TD-2	TCCGATGACATAACAGAGATAGC		
		TE-1	ACTATTGCTGCCGAAGATATTC		
		TE-2	CTCCATAACATCCAGTGATGC		

a. Designation of target genes was based on the complete genome sequence of *Vp* strain RIMD2210633 (GenBank : BA000032), b-g. Six sets of primers used to amplify the adjacent regions of *tdh* in *Vp* strain FJ14, h-i. Two sets of primers used to amplify the adjacent regions of *tdh* in *Vp* strain WZ64, j. The 8 primers employed to confirm the results of genome walking, k : *Vp* clinical strain TH3996 with BenBank No. AB038238 : Infection and Immunity. 2000, 68 (10) : 5742 - 5748.

1.3 PCR 扩增 *tdh* 基因的 5' 与 3' 端区域

按照基因步移试剂盒说明书, 扩增 *tdh* 基因的侧翼序列。以兼并引物 AP1 与上述特异性引物进行三轮 PCR 反应, 取上一轮的 PCR 反应液 1 μ L 作为第二、三轮 PCR 反应的模板。最后取三轮 PCR 反应液各 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳。

1.4 长距离 PCR 扩增

PCR 反应体积为 30 μ L, 含 1 \times PCR buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.16 mmol/L dNTPs, 0.83 μ mol/L 相应引物 A7 U/mL LA-*Taq* 酶及 3.3 μ L 模板 DNA。PCR 扩增条件为 : 94 $^{\circ}$ C 3 min ; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min/kb, 30 个循环 ; 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物用含 0.5 μ g/mL Goldview 染料的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 DNA 片段的序列测定、拼接与数据库对比

将 PCR 反应产物经割胶回收和纯化后, 连接至 pMD18-T 载体, 转化 DH5 α 大肠杆菌, 挑取阳性克隆子, 送上海英骏生物技术公司测序。获得的序列采

用 SeqMan 5.0 软件进行拼接, 然后以拼接的序列为模板设计引物进行 PCR 验证。已验证的序列通过 NCBI 数据库进行 Blastn 分析, 初步推测 *tdh* 侧翼序列的结构特点及其功能。

2 结果

2.1 长距离 PCR 和 *tdh* 区域基因步移

根据副溶血弧菌临床株 RIMD2210633 设计的八对引物, 对 ZS34、FJ14 和 WZ64 的 *tdh* 基因区域进行长距离 PCR 扩增。ZS34 能扩增到预期大小的 DNA 片段, 但 FJ14 与 WZ64 中均没有相应的 DNA 扩增片段。测序结果表明, ZS34 株与参考菌株 RIMD2210633 的 *tdh* 基因区域结构相似, 核苷酸同源率为 98.3%, 其中 *tdh* 基因与 *tdh2* (GenBank 登陆号 : X54341) 仅有一个碱基的差异, 序列同源率为 99.8% (图 1); 而 FJ14、WZ64 与参考菌株 RIMD2210633 在 *tdh* 基因邻近区域的结构差异很大。

对 ZS34、FJ14 和 WZ64 的 *trh* 与尿素酶基因簇进行长距离 PCR 扩增。5 个 PCR 反应中, FJ14 中均能扩增到预期大小的 DNA 片段。测序结果表明, FJ14 中 *trh*-尿素酶基因簇 (*trh-ureG*) 与参考菌株 RIMD2210633 的核苷酸同源性在 90% 以上 (图 1、表 2)。海产品分离株 ZS34 与 WZ64 基因组中仅能扩增出该基因簇中的 *nik* 基因序列, 表明这两株细菌的 *trh*-尿素酶基因簇区域序列结构不完整。

我们对长距离 PCR 未能扩增出相应 *tdh* 区域

的 FJ14 与 WZ64 株进行基因步移, 并用 PCR 验证。结果意外地发现, FJ14 菌株的 *tdh* 左侧约 1900bp 处为 *ureG*, 其间存在一个插入序列 (图 2) 表明在该菌株中 *tdh* 基因与 *trh*-尿素酶基因簇紧密相连。尽管我们对基因步移条件进行各种优化, 只扩增出 WZ64 株 *tdh* 基因上游的 2 个基因片段 (分别为插入序列和一个未知基因), 但未能扩增出其下游的片段 (图 2)。

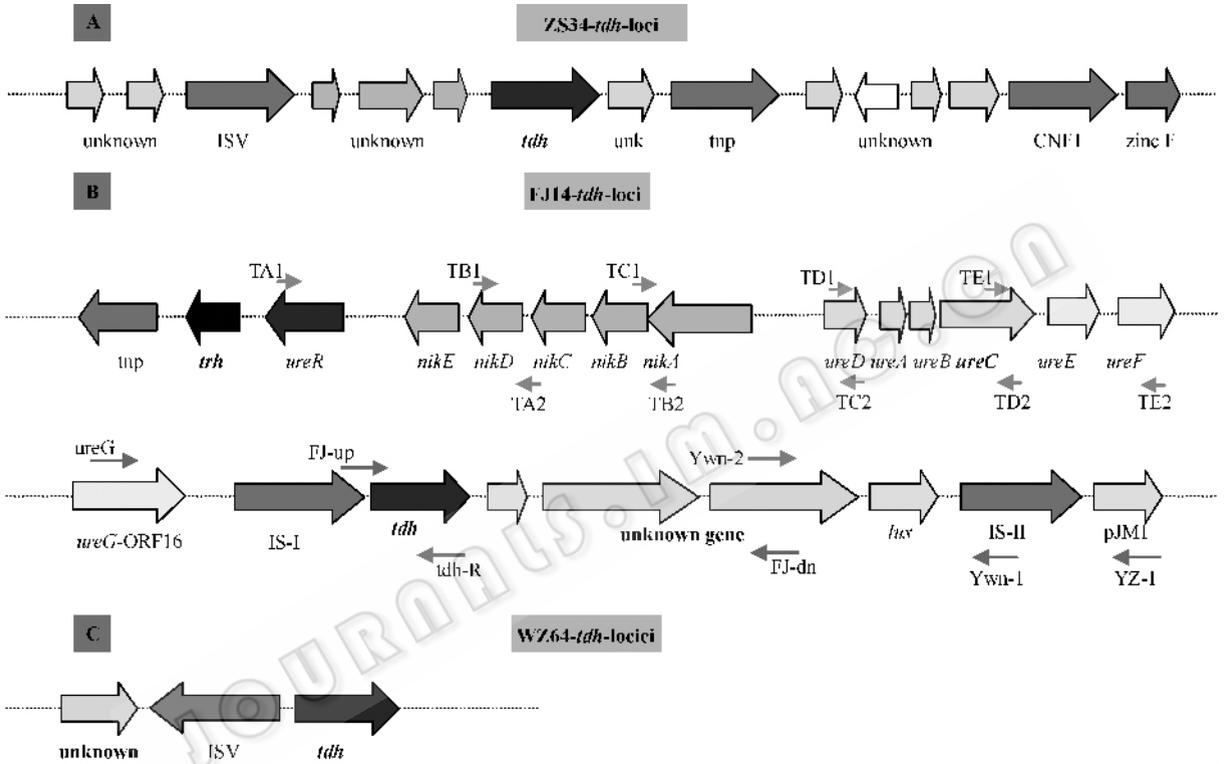


图 1 副溶血弧菌分离株 ZS34 (A)、FJ14 (B) 和 WZ64 (C) *tdh* 基因区域核苷酸序列结构图

Fig.1 The structural diagrams of *tdh*-adjacent loci of *Vibrio parahaemolyticus* strains ZS34, FJ14 and WZ64 by genome walking.

2.2 序列拼接及其与数据库比对结果

我们对基因步移和 PCR 验证扩增出的基因片段进行测序, 在 FJ14 的 *tdh* 基因区域测出长为 11128 bp 的 DNA 序列, Blastn 分析结果表明 (表 2), *tdh* 基因两侧均分布有类插入序列元件, 其左侧插入序列 (IS-I) 具有完整的 19 bp 反向重复序列 (RRS): GCCTTTGTTGCGTAATTCG。IS-I 序列与 ISV-3L 的同源性为 99%, 而 ISV-3L 是与 *tdh3* 相关联的类插入序列^[60]。IS-I 左侧为 *ureG* 基因, 即 *trh* 与尿素酶基因簇的末端序列, 由此可以推测 FJ14 的 *tdh* 基因与 *trh*-尿素酶基因簇在基因组的位置相邻, 由测通的序列可推断 *tdh* 与 *trh* 基因相距仅为 15 kb, 而 II da 等 1998 年报道 *tdh* 与 *trh* 基因的距离约为

40 kb^[61]。*trh*-尿素酶基因簇中未知功能的 ORF16^[61] 与副溶血弧菌中 ISV_{pa2} 同源性为 77%, 提示 ORF16 亦具有类插入序列结构。*tdh* 右侧插入序列 (IS-II) 具有 15 bp 的反向重复序列: TGTATTAGTTCGAC。IS-II 序列与创伤弧菌的 ISV_{vu4} 同源性为 87%^[62]。*tdh* 与 IS-II 之间扩出长约 4.9 kb 的未知基因序列。在 IS-II 下游有长为 522 bp 的 DNA 序列, 与质粒 pJM1 和 pJHC1 的同源性为 80%。

海产品分离株 WZ64 的 *tdh* 基因上游区域测出长为 4439bp 的 DNA 序列 (图 1-C、表 3)。*tdh* 基因的上游也有类插入序列, 与 FJ14 中插入序列具有 100% 的同源性, 但转录方向相反。该插入序列上游有长 500 bp 的未知基因, 功能不详。

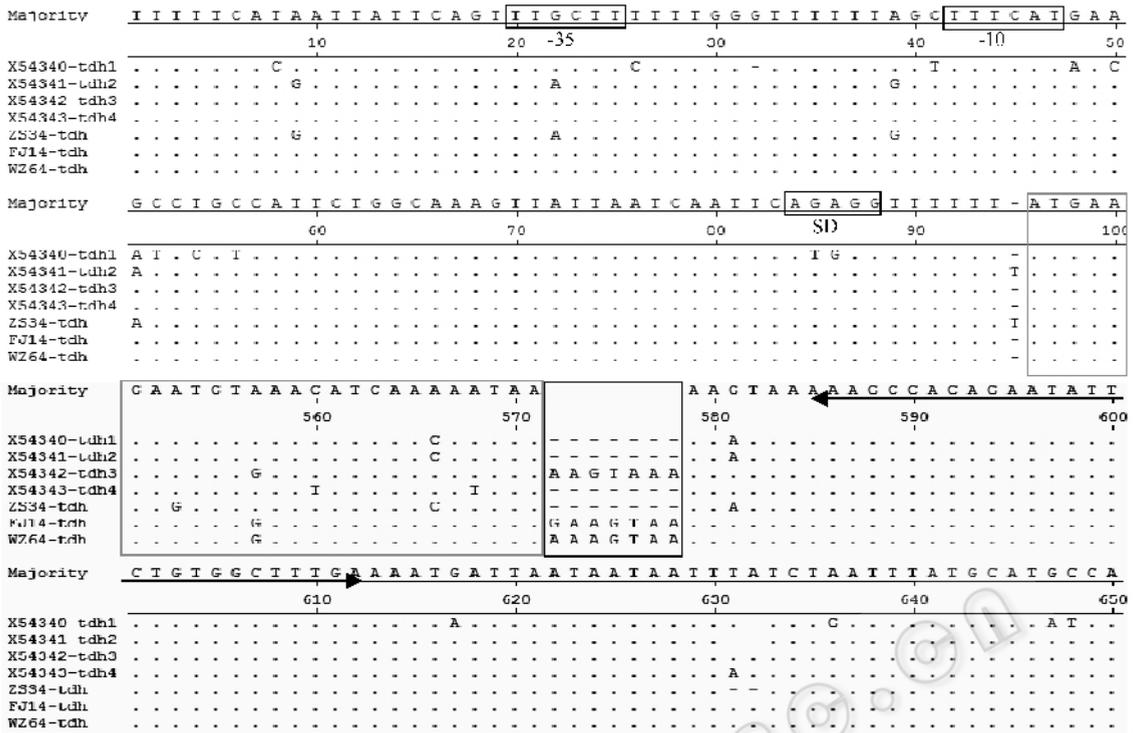


图 2 副溶血弧菌分离株 ZS34, FJ14 与 WZ64 的 *tdh* 基因启动子与终止子区域的对比

Fig. 2 Comparing the promoter and terminator sequences of the *tdh* genes cloned from *Vibrio parahaemolyticus* strains ZS34, FJ14 and WZ64.

表 2 副溶血弧菌 FJ14 株 *tdh* 基因毗邻序列与数据库序列的同源性分析

Table 2 Sequence analysis of *tdh*-adjacent locus of *Vibrio parahaemolyticus* strain FJ14

Location in FJ14	Location in reference strains	Identity	Blastn result	
			Nucleotide similarity/%	Origin (accession number)
83-1385 ^a	83-1134	ureG-ORF16	96	<i>V. p</i> (AB038238)
	860-1385	ISVpa2	77	<i>V. p</i> (AB353318)
	2034-3087	ISV-3L	99	<i>V. p</i> (M64121)
	2034-3088	ISV-5R	96	<i>V. p</i> (M64123)
	2459-3087	ISV-5L	98	<i>V. p</i> (M64122)
	2034-3087	transposase, Rhs family protein	96	<i>V. vulnificus</i> (BA000038)
	2104-2519	transposase	92	<i>V. vulnificus</i> (BA000037)
3033-4012	2169-8087	transposase	97	<i>V. p</i> (BA000032)
	2549-3088	pathogenicity island	95	<i>V. cholerae</i> (AF325733)
	3033-3722	<i>tdh</i>	97	<i>V. p</i> (AY195739)
	3073-4012	<i>tdh</i> A	96	<i>V. p</i> (BA000032)
	3090-3867	<i>tdh</i> S	93	<i>V. p</i> (BA000032)
	3390-3659	<i>tdh</i>	99	<i>V. p</i> (DQ345439)
4129-4279	3413-3636	<i>tdh</i>	99	<i>V. p</i> (EU185066)
	4129-4279	hypot protein	98	<i>V. p</i> (BA000032)
	4279-9211	unknown gene	0	—
9221-9658	9221-9658	lux operon	82	<i>V. harveyi</i> (EU192082)
9211-10415	9211-10415	transposase, ISVvu4	87	<i>V. vulnificus</i> (BA000038)
10511-11033	10092-10408	hypot protein; transposase	83	<i>Photobacterium profundum</i> (CR378667)
	10511-11033	pJMI; pEIB1/JM01 to JM44 genes; pJHC1 TAFb region	80	<i>L. anguillarum</i> (AY312585) <i>L. anguillarum</i> (AY255699) <i>V. anguillarum</i> (AF311973)

表3 副溶血弧菌 WZ64 株 *tdh* 基因毗邻序列与数据库序列的同源性分析Table 3 Sequence analysis of *tdh*-adjacent locus of *Vibrio parahaemolyticus* strain WZ64

Location in WZ64	Location in reference strains	Identity	Blastn results		
			Nucleotide similarity/%	Origin (accession number)	
1-499	1-499	unknown gene	0	—	
499-990	499-910	VC0818 gene	94	<i>V. cholerae</i> (DQ773585)	
	499-986	integrase domain transposase IS4 family	81	<i>Shewanella baltica</i> (CP000891)	
	499-986	transposase (reverse)	98	<i>V. p.</i> (BA000032)	
	499-489	ISV-3L	99	<i>V. p.</i> (M64121)	
	499-489	ISV-5R	97	<i>V. p.</i> (M64123)	
	499-989	ISV-5L	98	<i>V. p.</i> (M64122)	
	499-990	transposase (obverse)	95	<i>V. vulnificus</i> (BA000037)	
	862-990	hypothetical protein	82	<i>V. vulnificus</i> (BA000038)	
	956-2208	956-1826	<i>tdhX</i>	98	<i>V. p.</i> (S67841)
		970-2003	<i>tdh1</i>	98	<i>V. p.</i> (D90238)
975-1797		<i>tdh2</i>	96	<i>V. p.</i> (B112355)	
989-1993		<i>tdh</i>	91	<i>V. mimicus</i> (M64120)	
981-1981		NAG- <i>tdh</i>	94	<i>V. cholerae</i> (M55316)	
1030-1797		<i>tdh3</i> gene	98	<i>V. p.</i> (X54342)	
1029-1694		Vh- <i>tdh</i>	90	<i>V. hollisae</i> (M57900)	
1121-1693		<i>tdh</i>	95	<i>V. alginolyticus</i> (DQ44052)	
975-2012		<i>tdhA</i>	95	<i>V. p.</i> (BA000032)	

2.4 FJ14 和 WZ64 中 *tdh* 基因启动子与终止子区域的对比

利用 MegAlign 5.0 软件,将 ZS34、FJ14 与 WZ64 中 *tdh* 基因的 ORF、启动子与终止子区域的序列与 GenBank 数据库中的 *tdh1*、*tdh2*、*tdh3*、*tdh4* (登陆号分别为 X54340、X54341、X54342、X54343) 进行对比分析 (图 2)。ZS34 中 *tdhX* 的基因序列与 *tdh1*、*tdh2*、*tdh3*、*tdh4* 的同源性分别为 96.8%、99.8%、98.4% 和 98.4% ,其 *tdhX* 序列的启动子区域、-10 序列、-35 序列和 SD 序列^[6]与 *tdh2* 序列 (登陆号: X54341) 的相应位点均相同,提示 ZS34 基因组中的 *tdh* 与 *tdh2* 更为接近。FJ14 中 *tdhX* 的基因序列与 *tdh1*、*tdh2*、*tdh3*、*tdh4* 的同源性分别为 96.5%、98.4%、99.5% 和 98.4% ,WZ64 中 *tdhX* 的基因序列与它们的同源性分别为 96.3%、97.9%、98.9% 和 97.9% 与 *tdh3* 序列 (登陆号: X54342) 的核苷酸同源性最高。FJ14 与 WZ64 的 *tdhX* 启动子区域、-10 序列、-35 序列和 SD 序列均与 *tdh3* 序列相应位点也完全一致。此外,在终止子 TAA 的下游有 7 个碱基的插入,与 *tdh3* 序列类似,进一步提示海产品分离株 FJ14 和 WZ64 基因组中的 *tdh* 基因与 *tdh3* 基因更为接近。

3 讨论

TDH 是判断副溶血弧菌致病力的主要因素之一。副溶血弧菌海产品分离株 ZS34 与临床分离株 RIMD2210633 的 *tdh2* 基因区域结构相似,可能代表着一类高致病性的副溶血弧菌,人类可能因食用污染有这类菌株的海产品而发生食物中毒。

Xu 等^[3]1994 年报道,副溶血弧菌 TH3766 菌株呈现 KP 阳性,且含 *trh* 和 *tdhX* 基因,其中 *tdhX* 与 *tdh1* 具有较高的同源性。海产品分离株 FJ14、WZ64 亦可在莪斐氏兔血平板上呈现明显的神奈川现象,但其 *tdhX* 基因与 *tdh3* 序列 (GenBank 登陆号为 X54342) 同源性最高。一般认为 *tdh2* 是引起神奈川现象的主要因子^[4-15]。那么,在这些菌株中是否还存在着多拷贝的 *tdh* 基因 (包括 *tdh2* 基因) 而由于结构上的保守性而未能得到分别扩增,这尚待进一步探讨。

副溶血弧菌分离株 FJ14 同时携带 *tdh* 与 *trh* 基因,两者间相距仅有 15 kb (图 2-B),在基因组中的位置紧密相连,而 II DA 等报道表明,*tdh* 与 *trh* 基因间的距离约为 40 kb,且 *tdh* 在 *trh* 基因的上游^[1],与 FJ14 菌株该区域的结构有异。而分离株 WZ64 则无法利用基因步移获得该区域更多的序列,可能是因

为其基因组中的重复序列多难以进行扩增。同时也表明其在该区域的基因结构即不同于 ZS34 和参考菌株 RIMD2210633, 也不同于菌株 FJ14。

通过 Blastn 比对分析,可以看出 *tdh* 基因区域的 DNA 序列与其它弧菌,如拟态弧菌 (*V. mimicu*)、霍乱弧菌 (*V. cholerae*)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)、哈氏弧菌 (*V. harveyi*)、鳗弧菌 (*V. anguillarum*) 等海洋微生物的 *tdh* 基因、类插入序列及转座酶等有着相当程度的同源性 (表 2、表 3)。FJ14 和 WZ64 *tdhX* 侧翼的类似插入序列均属于 IS903 家族,它们之间的核苷酸同源性在 90% 以上^[6]。有报道认为,大多数弧菌均具有数量不等的插入序列,其 G + C 含量 (约 45%) 与弧菌全基因组的 G + C 含量相当,并明显高于 *tdh* 基因及其相关基因序列 (约 34%)。由此可推测 *tdh* 基因来源于其它种类的微生物,并由弧菌自身的类插入序列介导而发生水平转移^[7]。Nishibuchi 等认为 *tdh* 基因在弧菌属细菌中的广泛存在是由转座子或者质粒介导的基因水平转移引起,而 *trh* 基因的传播则是由于在某些选择压力下发生的基因漂移引起的^[4]。转座或基因漂移发生后,类插入序列在新的基因组中又诱发了基因间的重组与碱基突变等^[8]。根据其 DDE 模序、反向重复序列等特征,有些类插入序列的转座活性也得到了证实^[9-20]。然而,弧菌主要毒力基因水平转移的机制尚无定论。

鳗弧菌通过铁离子吸收系统从寄主细胞中获取铁元素,而鳗弧菌 775 菌株的载铁体正是由 pJM1 质粒编码。Tolmasky 等^[21]证实 pJM1 与 pJHC1 等多种质粒能高效地表达产生大量的载铁体,从而明显增强鳗弧菌的毒力。副溶血弧菌海产品分离株 FJ14 中 *tdh* 下游存在着与 pJM1 与 pJHC1 核苷酸同源性为 80% 的 DNA 序列,提示 FJ14 菌株 *tdhX* 所在的毒力岛中可能也存在与鳗弧菌类似的铁离子吸收系统,它可能是副溶血弧菌一种潜在的新毒力因子。

本研究通过对 3 个副溶血弧菌海产品分离株 *tdh* 基因临近区域的结构特征分析发现,不同分离株 *tdh* 基因临近区域结构具有多态性,并有类插入序列在其上下游存在,表明该菌多态性显然是基因水平转移的结果^[22]。

参考文献

[1] Blake PA, Weaver RE, Hollis DG. Diseases of humans (other than cholerae) caused by vibrios. *Annual Review of Microbiology*, 1980, 34: 341 - 367.

[2] Park K, Ono T, Rokuda M, et al. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin deletion mutants of *vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology and Immunology*, 2004, 48: 313 - 318.

[3] Kubota K, Iwasaki E, Inagaki S, et al. The human health burden of foodborne infections caused by *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Vibrio parahaemolyticus* in Miyagi Prefecture, Japan. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2008, 5: 641 - 648.

[4] 刘秀梅, 陈艳, 王晓英, 等. 1992 - 2001 年食源性疾病暴发资料分析-国家食源性疾病预防网. *卫生研究 (Journal of Hygiene Research)*, 2004, 33: 725 - 727.

[5] Honda T, Ni Y and Miwatani T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, 1988, 56: 961 - 965.

[6] Honda T and Iida T. The pathogenicity of *vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysin. *Review of Medical Microbiology*, 1993, 4: 106 - 113.

[7] Tang GQ, Iida T, Inoue H, et al. A mutant cell line resistant to *vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin its potential in identification of putative receptor for TDH. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1360: 277 - 282.

[8] Shirai H, Ito H, Hirayama T, et al. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infection and Immunity*, 1990, 58: 3568 - 3573.

[9] DePaola A, Kaysner CA, Bowers J, et al. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas and New York (1997 and 1998). *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 4649 - 4654.

[10] [S Finder], http://www-is.biotoul.fr/index.html?is-special_name=ISV3L, 2008, 5: 25.

[11] Iida T, Park K, Suthienkul O, et al. Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology*, 1998, 144: 2517 - 2523.

[12] [S Finder], http://www-is.biotoul.fr/index.html?is-special_name=ISVvu4, 2008, 5: 25.

[13] Okuda J and Nishibuchi M. Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct haemolysin gene. *Molecular Microbiology*, 1998, 30: 499 - 511.

- [14] Nishibuchi M and Kaper JB. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* ,1985 ,162 :558 – 642.
- [15] Xu M , Iida T , Yamamoto K , et al. Demonstration and characterization of simultaneous production of a thermostable direct hemolysin (TDH/I) and a TDH-related hemolysin (TRHx) by a clinically isolated *Vibrio parahaemolyticus* strain , TH3766. *Infection and Immunity* ,1994 , 62 :166 – 171.
- [16] [S Finder] , <http://www-is.biotoul.fr/is.html> , 2008 , 5.25.
- [17] 谢珍玉 胡超群. 弧菌毒力基因水平转移与进化的研究进展. 热带海洋学报 (*Journal of Tropical Oceanography*) 2005 24 :86 – 95.
- [18] Terai A , Baba K , Shirai H , et al. Evidence for insertion sequence-mediated spread of the thermostable direct hemolysin gene among *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology* , 1991 , 173 :5036 – 5046.
- [19] Kamruzzaman M and Nishibuchi M. Detection and characterization of a functional insertion sequence , ISVpa2 , in *Vibrio parahaemolyticus*. *Gene* , 2008 , 409 :92 – 99.
- [20] kamruzzaman M , Bhoopong P , Vuddhakul V , et al. Detection of a functional insertion sequence responsible for deletion of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) in *vibrio parahaemolyticus*. *Gene* , 2008 , 421 :67 – 73.
- [21] Tolmasky ME , Salinas PC , Actis LA , et al. Increased production of the siderophore anguibactin mediated by pJM12 like plasmids in *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity* ,1988 , 56 :1608 – 1614.
- [22] Makino K , Oshima K , Kurokawa K , et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* : a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. *Lancet* , 2003 361 :743 – 749.

Analysis of *tdh* gene and its adjacent loci of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from seafoods

Shuna Wang^{1,2} , Khamphouth VONGXAY¹ , Biao Shen² , Xiangyang Zhou² , Peijie Jin¹ , Jianshun Chen¹ , Weihuan Fang^{1*}

(Institute of Preventive Veterinary Medicine , Zhejiang University and Zhejiang Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine , Hangzhou 310029 , China)

(Zhoushan Entry-Exit Inspection And Quarantine Bureau , Zhoushan 316000 , China)

Abstract : [Objective] To analyze the structural characteristics of *tdh* gene and its adjacent loci of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from seafoods. [Methods] Long distance PCR and genome walking were used to amplify the DNA sequences flanking the *tdh* gene , and the sequences were analyzed by blastn against the NCBI database. [Results] The genetic structure of *tdh*-adjacent loci (VPA1312-VPA1327) from isolate ZS34 was similar to that of the reference strain RIMD2210633 , with the nucleotide identity of 98.3% . The *tdh* gene of isolates FJ14 and WZ64 was located in the loci different from the reference strain and ZS34 , and showed high nucleotide similarity to *tdh3* gene. In the genome of isolate FJ14 , *tdh* was 15kb away from the *trh-ure* cluster , with IS-like elements and transposase genes inserted therein. Isolate WZ64 lacked *trh* gene , but also harbored IS-like elements upstream of *tdh*. [Conclusion] The *tdh*-adjacent loci of *V. parahaemolyticus* seafood isolates exhibit high diversity , an additional evidence of lateral gene transfer in this particular species.

Keywords : *Vibrio parahaemolyticus* ; *tdh* gene ; IS-like elements ; Lateral gene transfer

(本文责编 张晓丽)