

- new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(9): 597-602.
- [2] Shakil S, Azhar EI, Tabrez S, et al. New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1): an update[J]. *J Chemother*, 2011, 23(5): 263-265.
- [3] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(12): 5046-54.
- [4] Tan TT. "Future" threat of Gram-negative resistance in Singapore [J]. *Ann Acad Med Singapore*, 2008, 37(10): 884-890.
- [5] Cornaglia G. Fighting infections due to multidrug-resistant Gram-positive pathogens[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2009, 15(3): 209-211.
- [6] Baiden F, Owusu-Agyei S, Webster J, et al. The need for new antibiotics[J]. *Lancet*, 2010, 375(9715): 637-638.
- [7] Heddini A, Cars O, Qiang S, Tomson G. Antibiotic resistance in China-a major future challenge [J]. *Lancet*, 2009, 373(9657): 30.
- [8] Vento S, Cainelli F. The need for new antibiotics [J]. *Lancet*, 2010, 375(9715): 637.
- [9] Wise R, Piddock L. The need for new antibiotics [J]. *Lancet*, 2010, 375(9715): 638.
- [10] Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America[J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 48(1): 1-12.
- [11] Rice LB. The clinical consequences of antimicrobial resistance[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12(5): 476-481.
- [12] Page MG, Heim J. Prospects for the next anti-pseudomonas drug [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(5): 558-565.
- [13] Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(6): 2227-2238.
- [14] Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, et al. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams[J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(7): 1145-1148.
- [15] Walsh TR. Combinatorial genetic evolution of multiresistance[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(5): 476-482.
- [16] Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 64(suppl 1): i3-i10.
- [17] Walsh TR, Toleman MA, Jones RN. Comment on: occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M beta-lactamases in Enterobacteriaceae from Indian hospitals[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59(4): 799-800.
- [18] Hawkey PM. Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(suppl 1): 159-165.
- [19] Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(5): 466-75.
- [20] Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59(2): 165-174.
- [21] Harish BN, Menezes GA, Shekatkar S, et al. Extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from blood culture[J]. *J Med Microbiol*, 2007, 56(7): 999-1000.
- [22] Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 64(suppl 1): i29-i36.
- [23] Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria[J]. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9(4): 228-236.
- [24] Gaibani P, Ambretti S, Berlingeri A, et al. Outbreak of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in northern Italy, July to August 2011[J]. *Euro Surveill*, 2011, 16(47): 2-4.
- [25] Halaby T, Reuland AE, Al Naiemi N, et al. A case of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* with putative secondary transmission from the Balkan in the Netherlands[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(5): 2790-2791.
- [26] Shahid M, Malik A, Adil M, et al. Comparison of beta-lactamase genes in clinical and food bacterial isolates in India[J]. *J Infect Dev Ctries*, 2009, 3(8): 593-598.

(收稿日期: 2012-05-07)

• 综 述 •

海洋致病菌全基因组测序研究进展

张河林¹综述, 刘晓斐², 胡成进^{2△}审校

(1. 辽宁医学院, 辽宁锦州 121001; 2. 济南军区总医院实验诊断科, 山东济南 250031)

关键词: 海洋致病菌; 基因组测序; 克隆扩增型; 单分子测序型**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 21. 032**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)21-2630-03

海洋生物与陆地生物的生活环境迥异, 高压、低营养和高盐等环境造成了海洋生物的多样性和特殊性。海洋致病菌适应海洋环境后有了新的特异性, 能产生陆栖微生物所不能产生的结构新颖、作用特殊的活性物质。由于目前的监测技术和手段的局限性, 海洋致病菌在实验室培养时生长条件得不到满足, 从而导致了致病菌的不可培养或难以形成肉眼可见的菌落而被忽略^[1]。基因组包含了整个生物体的遗传信息, 海洋致病菌也不例外, 而测序技术能够真实地反映基因组 DNA 的遗传

信息, 进而全面揭示海洋致病菌的复杂性和多样性。因此, 快速和准确的全基因组测序在获取海洋致病菌的遗传信息及其相关研究中扮演了重要的角色。

1 海洋致病菌全基因组测序策略

全基因组测序分为草图绘制和精细图绘制两个阶段, 基于鸟枪法的全基因组测序策略主要有 2 种: 以克隆为基础的鸟枪测序法和全基因组鸟枪测序法^[2], 以下重点介绍后者。

1.1 基因组随机文库构建和测序 由于海洋病原菌基因组一

△ 通讯作者, E-mail: hcj6289@163.com。

一般在数百个 kb 至数个 mb,快速测序的策略采用经典鸟枪法又称为随机测序法。首先将 1 条完整的目标序列随机打断成许多小片段,分别构建大小不同的 2 套文库^[3];小片段文库一般选择 1.6~2 kb 的切割产物,大片段文库可以根据基因组中重复序列和难以克隆区域的大小进行构建并分别测序,然后利用这些小片段的重叠关系将它们拼接成 1 条一致序列。

1.2 缺口填充 测序的后期则需进行序列的缺口填补,一般需用几种方法相互组合才能完成,能否完成缺口填补是完成全基因组测序的关键^[4]。鸟枪法文库采用末端随机测序,获得的结果用计算机进行拼接产生多个序列重叠群,各重叠群之间的部分称为缺口;有模板相对应,只是测序未测到的缺口称为测序缺口;没有模板相对应的缺口称为物理缺口^[1]。两种缺口采用不同的策略进行填充;测序缺口常采用步移法进行填充;物理缺口的填充有 DNA 杂交分析、利用大片段文库对重叠群进行定位、蛋白联接法、PCR 连接法和组合 PCR 法,用前四种方法都不能定位的重叠群,采用组合 PCR 法完成最后缺口的填充^[5]。

2 测序流程

根据测序技术的进展,可将其分为具有不同亚代的 3 代,第 1 代测序技术已经帮助人们完成了从噬菌体基因^[6]到人类基因组草图等大量的测序工作,但其存在成本高、速度慢等缺点,并不是最理想的测序方法。目前运用最多的是第 2 代测序技术,根据样本在测序前是否需要扩增,大致可分为克隆扩增型和单分子测序^[7]。克隆扩增型主要包括 Roche Applied Science 公司 454 焦磷酸测序仪、Applied Biosystems 公司的 Solid 系统、Illumina 公司的 Solexa 测序等^[8-10]。单分子测序主要包括 Helicos 公司的全内反射显微镜技术^[11]、Pacific Biosciences 公司的零级波导纳米结构技术及 VisiGen 公司的荧光共振能量转移技术等^[12-13]。它们最大的特点是不需要模板的预先扩增,而是一个在单一 DNA 分子组成的阵列上利用各种物理技术手段来观察和记录 DNA 聚合酶合成 DNA 的过程,但都遵循了类似的工作流程^[14],见图 1、2。

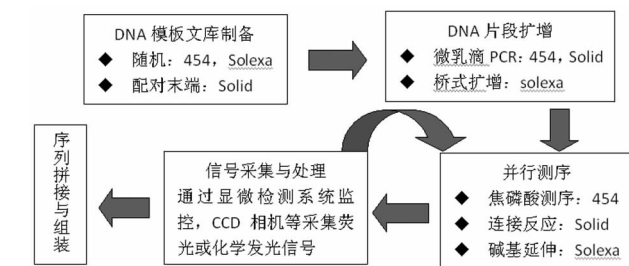


图 1 克隆扩增型测序流程图

3 全基因组测序在海洋致病菌研究中的应用

海洋致病菌以金黄色葡萄球菌,铜绿假单胞菌,以及弧菌属的副溶血弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌等较为常见,目前这 5 个菌种中有 25 株金黄色葡萄球菌、4 株铜绿假单胞菌、3 株创伤弧菌和 1 株副溶血弧菌完成了精细图的绘制,有 48 株金黄色葡萄球菌、5 株铜绿假单胞菌、6 株副溶血弧菌和 2 株溶藻弧菌完成了草图的绘制。海洋致病菌的基因组测序对于人类认识海洋致病菌的完整生物学功能具有重要意义,有助于对海洋致病菌形态、结构、代谢途径、毒力岛等的发现及致病与耐药机制的研究,为研制特异的诊断试剂、有效药物和保护性强的疫苗提供科学的依据。

3.1 建立灵敏、特异和快速的海洋病原菌分子生物学诊断技术 致病性弧菌属是海洋环境创伤感染的重要致病菌,可引起人类肠道传染和伤口感染、食物中毒、疏松结缔组织炎甚至原发性败血症,后者的病死率超过 50%^[15]。临床上常规分离培养不适宜大量样品的分析,而且由于弧菌的表型不稳定,非典型菌株很常见,使得鉴定复杂化^[16]。根据染色体上的保守序列设计探针和引物,采用 PCR 技术和环介导等温扩增(LAMP)技术针对致病菌的某个特异性的基因可以进行快速、定量、敏感和特异的检测,目前创伤弧菌^[17-18]、溶藻弧菌和副溶血弧菌等都有相关报道^[19-20]。随着三株创伤弧菌基因组测序工作的完成,为研究创伤弧菌的基因组结构和功能打下坚实的基础,更为建立创伤弧菌分子生物学检测技术提供了丰富的基因水平的信息。目前用于 LAMP 技术快速诊断创伤弧菌的特异性基因有 *vcgC*^[18]、*vvhA*^[21]、*rpoS*^[22] 等,其中 Thanai Surasilp 等人建立了基于 *rpoS* 基因靶点的 LAMP 与横向流动试纸条法联合检测技术^[22],具有更好的特异性和灵敏度,并且操作安全、简便、快捷,具有广泛的应用前景。

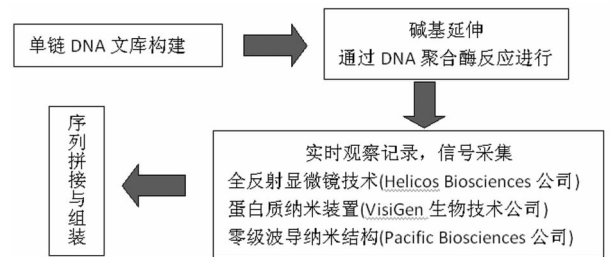


图 2 单分子测序流程图

3.2 基因组测序在海洋致病菌毒力岛研究中的应用 近年来,人们发现在许多病原菌中都存在着毒力岛并具有以下特点:(1)毒力岛通常是染色体上一个 20~100 kb 的编码细菌毒力的 DNA 片段;(2)毒力岛两侧常有重复序列和插入元件;(3)毒力岛往往位于细菌染色体的 tRNA 位点附近或位于与质粒、噬菌体整合有关的位点;(4)毒力岛 DNA 片段的 G+C 百分比、密码使用与宿主菌染色体具有明显差异;(5)毒力岛具有不稳定性,并含有一些潜在的可移动成分,如插入序列、插入酶、转位酶等。因此在基因组测序完成之后,根据以上特点应用生物信息学软件可以发现海洋致病菌新的毒力岛及其相关致病机制^[23]。Cohen 等^[24]在研究创伤弧菌分型时利用六个管家基因的多位点测序分型法将 63 株来自不同标本的创伤弧菌划分成两大谱系^[24],I 系仅由生物 1 型构成,II 系由部分 1 型和全部 2 型构成。而且发现 I 系菌株有一个 33 kb 大小的毒力岛Ⅷ区,通过比较基因组学发现,毒力岛有三分之一的区域为该物种所特有,Ⅷ区包含一个芳基硫酸酯酶基因族,一个硫酸盐还原系统,两个软骨素酶基因和一个短肽 ATP 结合盒转运系统共同发挥清除作用,有利于创伤弧菌在人体或水生环境中生存,在人类的致病过程中也发挥着重要作用。同时 González-Escalona 等^[25]利用 16S-23S rRNA 基因间隔区扩增法也得出了相似的结论,另外测序发现两谱系间隔 1 区的 5'和 3'端都含有一个保守序列,两谱系的主要区别在于构成间隔 1 区的 tRNA 基因不同,相同谱系的间隔 1 区由于在 5'或 3'端的保守序列中插入了 35 bp 大小的插入序列也不完全相同。因此利用细菌基因组的测序数据结合生物信息学方法可以实现对细菌的毒力因子、微进化、tRNA 和 rRNA 预测等方面的全

面认识,为细菌致病机制的研究提供了一个切实可行的思路^[26-27]。

4 展 望

随着微生物基因组大规模测序的开展,已有近 2 000 株细菌完成了基因组测序和注释工作,随即进入了功能基因组学研究,而海洋致病菌的基因组学研究尚处于起步阶段。在基因组测序工作完成之后,可通过生物信息学的方法寻找耐药基因和编码保护性抗原的基因,通过相关生物学软件进行药物和疫苗设计,进而能够缩短药物和疫苗研制的时间,成为药物开发和疫苗设计的一种非常可行的方法。基因组实际存在的天然产物生物合成途径比有机体产生的天然产物更多,借鉴陆栖微生物的研究方法,通过基因组序列分析并人工诱导沉默基因表达而得到新的生物活性物质等,为人们探索新的生物活性物质提供了又一有效的手段,以期有更多的微生物药物通过这种途径在海洋致病菌中被发现^[28]。全基因组测序完成后也有助于以前由于成分复杂而难以发现的致病基因的发现,为我们了解海洋致病菌的致病性和毒力因子提供了有效的途径,对于认识海洋致病菌的进化规律、阐述海洋致病菌的致病机制以及预测新发传染病等方面也具有重要的意义。

参考文献

[1] 张元钦,郑玉果,那可,等. 海洋致病菌实验室培养[J]. 中国医药工业杂志,2011,42(9):692-703.

[2] Batzoglou S, Berger B, Mesirov J, et al. Sequencing a genome by walking with clone-end sequences: a mathematical analysis[J]. Genome Res, 1999, 9(12):1163-1174.

[3] 刘先凯,王恒糅,黄留玉,等. 微生物基因组研究进展[J]. 生物技术通讯,2004,15(5):481-485.

[4] Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, et al. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(2):996-1001.

[5] Fleischmann RD, Adams MD, White O, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd[J]. Science, 1995, 269(5223):496-512.

[6] Sanger F, Coulson AR, Hong GF, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA [J]. J Mol Biol, 1982, 162(4):729-773.

[7] 沈树泉. 单分子测序与个体医学[J]. 生理科学进展, 2009, 40(3):283-288.

[8] 孙海汐,王秀杰. DNA 测序技术发展及其展望[J]. e-Science 技术, 2009, 1(6):19-29.

[9] 严安,熊慧. 测序技术在临床诊疗中的应用[J]. 广东医学, 2010, 31(3):279-280.

[10] 解增言,林俊华,谭军. DNA 测序技术的发展历史与最新进展[J]. 生物技术通报, 2010, 14(8):64-70.

[11] Harris TD, Buzby PR, Jarosz M, et al. Optical train and method for TIRF single molecule detection and analysis; United States, US2008/0088823A1[P]. 2008-04-17.

[12] Levene MJ, Korlach J, Turner SW, et al. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations[J]. Science, 2003, 299(5607):682-686.

[13] Hardin S, Gao X, Briggs J, et al. Methods for real-time single molecule sequence determination; United States, US2005/0260614A1 [P]. 2005-11-24.

[14] 占爱瑶,罗培高. DNA 测序技术概述[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(4):584-588.

[15] Harris TD, Buzby PR, Babcock H, et al. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome[J]. Science, 2008, 320(5872):106-109.

[16] 陈艳,付萍. 创伤弧菌检测方法的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2008, 35(2):92-96.

[17] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucl Acids Res, 2000, 28(12):e63.

[18] Han F, Wang F, Ge B. Detecting potentially virulent *Vibrio vulnificus* strains in raw oysters by quantitative loop-mediated isothermal amplification[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(8):2589-2595.

[19] Cai SH, Lu YS, Wu ZH, et al. Loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Vibrio alginolyticus*, the causative agent of vibriosis in mariculture fish[J]. Lett Appl Microbiol, 2010, 50(5):480-485.

[20] Nemoto J, Ikedo M, Kojima T, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. J Food Prot, 2011, 74(9):1462-1467.

[21] Han F, Ge B. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Vibrio vulnificus* in raw oysters[J]. Foodborne Pathog Dis, 2008, 5(3):311-320.

[22] Surasilp T, Longyant S, Rukpratanporn S, et al. Rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick targeted to *rpoS* gene[J]. Mol Cell Probes, 2011, 25(4):158-163.

[23] Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, et al. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution[J]. Mol Microbiol, 1997, 23(6):1089-1097.

[24] Cohen AL, Oliver JD, DePaola A, et al. Emergence of a virulent clade of *Vibrio vulnificus* and correlation with the presence of a 33-kilobase genomic island[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(17):5553-5565.

[25] González-Escalona N, Jaykus LA, DePaola A. Typing of *Vibrio vulnificus* strains by variability in their 16S-23S rRNA intergenic spacer regions[J]. Foodborne Pathog Dis, 2007, 4(3):327-337.

[26] Horner DS, Pavesi G, Castrignanò T, et al. Bioinformatics approaches for genomics and post genomics applications of next-generation sequencing[J]. Brief Bioinform, 2010, 11(2):181-197.

[27] Medvedev P, Stanciu M, Brudno M. Computational methods for discovering structural variation with next-generation sequencing[J]. Nat Methods, 2009, 6(11 Suppl):S13-S20.

[28] 邢芸,刘景晶,顾觉奋. 激活沉默基因以产生新抗生素的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2010, 31(2):49-53.

(收稿日期:2012-05-04)