

# 香港海鸥型菌 (*Laribacter hongkongensis*) 的鉴定方法研究现状

岑剑伟 李来好 郝淑贤 刁石强

(中国水产科学院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

**摘要:** 香港海鸥型菌是从香港肝硬化病人体内分离得到的新细菌菌属, 被认为是致腹泻病原菌。为给相关的研究提供参考, 介绍香港海鸥型菌选择性培养基的筛选, 生物学特征检测方法, 基因序列分析检测方法中的 16s rRNA 寡核苷酸序列分析定性鉴定核糖分型 (ribotyping) 与脉冲电场电泳, 自动化细菌鉴定系统。

**关键词:** 香港海鸥型菌; 鱼; 淡水; 食品微生物学

**Recent advances in research of** *Laribacter hongkongensis*

CEN Jian-wei, LI Lai-hao, HAO Shu-xian, DIAO Shi-qiang

(South China Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangdong Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** *Laribacter hongkongensis* is a new genus and species of bacteria which was first isolated from a Hong Kong cirrhotic patient and proposed to be a pathogenic bacteria of diarrhea. This review described its identification methods, hoping to provide some reference basis for related researches.

**Key word:** *Laribacter Hongkongensis*; Fishes; Fresh Water; Food Microbiology

香港海鸥型菌属原核细菌 (*Proteobacteria*) 亚纲, 奈瑟氏球菌科 (*Neisseriaceae*), 学名为香港海鸥型菌 (*Laribacter hongkongensis*)。有关该菌的报道最先发表于 2001 年, 由港大医学院微生物学系袁国勇教授和胡钊逸副教授等在 1 名因高烧和呼吸短促入住的肝硬化病人的血液和胸腔脓液中首先分离得到。一系列生物化学分析和分子生物学检测表明该菌表型特征和基因型特征与目前所有已知细菌均存在差异, 属新发现细菌菌属, 最初将之命名为 HKU1<sup>[1]</sup>。随着对该菌研究的进一步深入, 又相继在多名香港腹泻病人的粪便中分离到该菌的不同菌株, 加之其形态上的特殊性而被命名为香港海鸥型菌。

相关研究表明香港海鸥型菌只存在淡水鱼中, 在其它肉类食品未发现该菌的存在。约有 25% 的淡水鱼中存在香港海鸥型菌, 其中含该菌最多的是草鱼和鳙鱼<sup>[2]</sup>。怀疑人是由食入未经煮熟被该菌污染鱼肉或是被交叉污染的食物而被感染, 可以从血液或粪便中分离出来。目前该菌在香港、中国内地、日本、瑞士、非洲及中美洲相继被发现, 显示已在全球广泛存在<sup>[3]</sup>。随着各大传播媒体的报道,

香港海鸥型菌的发现及研究现状引起人们极大的关注, 有关人士认为该菌是水产品质量安全方面的新情况新问题, 对其进行密切监控是当前的一项重要工作。目前对于该菌的研究工作大部分还停留在该菌的分离鉴定方面, 本文就目前香港海鸥型菌分离鉴定方法的研究进展作一综述, 为香港海鸥型菌更加广泛深入地研究提供一定的借鉴。

## 1 选择性培养基筛选

香港海鸥型菌的研究得以顺利进行全有赖于其高度选择性培养基的筛选。最初的香港海鸥型菌实验是在血琼脂培养基上开展的, 香港海鸥型菌在这种培养基中于 37 °C 通风培养 24 h 后可形成直径 1 mm 的灰色菌落<sup>[1]</sup>。与羊血琼脂培养基相比, 麦康凯培养基 (MacConkey agar, MA) 适用于分离肠道的致病菌。但它们均非选择性培养基, 分离培养出的菌种多而杂, 不利于该菌的进一步分离纯化。随着对该菌理化特性研究的深入, 发现在培养基中加入适量的头孢哌酮不但不会影响香港海鸥型菌的生长, 还可以抑制大量其它细菌的生长, 从而增强其选择性。之后研制出的选择性培养基中最为典型的有碳

基金项目: 国家科技基础条件平台 (2004DEA70880-02-03-06); 广东省重点项目 (2003C32803)。

作者简介: 岑剑伟 男 硕士

通讯作者: 李来好 男 研究员

This work was supported by the National Facilities and Information Infrastructure for Science and Technology (2004DEA70880-02-03-06) and the Key Project of Guangdong Province. (2003C32803)

素头孢哌酮脱氧胆酸培养基(Charcoal cefoperazone deoxycholate agar,CCDA)和头孢哌酮麦康凯琼脂培养基(Cefoperazone MacConkey agar,CMA)。香港大学微生物系对CCDA与CMA这2种培养基进行对比实验,观测香港海鸥型菌的回收率及菌落形态。结果表明CMA在分离效果及菌落形态上都明显优于CCDA。HKU1菌株基本不能在CCDA培养基上生长,即便有生长的,其菌落也偏小,难以挑取。进一步研究确定头孢哌酮含量为32 mg/L的麦康凯培养基可以更好地抑制其它肠道细菌的生长,增强对香港海鸥型菌的选择性培养<sup>[4]</sup>。中山大学生命科学院陈定强、谢海平等采用CMA培养基从广东省淡水鱼中分离出的香港海鸥型菌的广东菌株,其形态及生化特征与香港菌株相似,基本认定为香港海鸥型菌<sup>[5]</sup>。

## 2 生物学特征检测方法

传统的细菌分类鉴定方法主要依赖于细菌的形态学、代谢产物、酶活性和表面抗原等。其中细菌形态通常是稳定的特征,对环境的影响有一定程度的独立性,从遗传角度看,即使个别基因突变,也不大会引起很大的形态变化。革兰染色反应是最普通有效的观察方法,如某些细菌具有荚膜、芽孢、鞭毛和菌毛等特殊结构的形态学特征,这些都是分类鉴定的重要依据<sup>[6,7]</sup>。胡钊逸海鸥型菌研究小组成员对香港海鸥型菌进行的常规生物化学性质检验确定,香港海鸥型菌菌株均为海鸥型或螺旋型、杆状,革兰染色阴性非芽孢菌,兼性厌氧。在绵羊血琼脂培养基上不发生溶血反应。至今在香港共发现7株菌株,后发现的菌株与典型菌株HKU1的生化特征基本相似,但在形态上存在一定的差异。HKU1菌株是非运动型而其它菌株为运动型,通过扫描电镜观察,发现HKU1菌株无鞭毛,螺旋型或细长棒状,而后来研究发现的6个菌株却是两端存在鞭毛,专家推测这是由于宿主免疫抗原反应的差异造成的<sup>[3]</sup>。该菌表现为氧化酶和过氧化氢酶阳性,精氨酸双水解酶和脲酶阳性,糖和糖醇的利用阴性,是非发酵菌。

随着对细菌耐药机制研究的不断深入,药敏结果与菌种间的相关性越来越密切,通过某些药敏试验结果可以修正或确认菌种鉴定<sup>[8]</sup>。对海鸥型菌的抗生素敏感性试验表明,所有的菌株对阿莫西林/克拉维酸钾、亚胺培南、庆大霉素敏感,而其中6株菌株对氨苄青霉素、头孢哌酮、头孢噻吩、头孢曲松有抗药性,只有1株菌株对左氟沙星和复方新诺明有抗药性<sup>[3]</sup>。

## 3 基因序列分析检测方法

3.1 16s rRNA 寡核苷酸序列分析定性鉴定 由于微生物物种的复杂性和生理生态学特点,目前使用的表型分类方法并非最有效<sup>[9]</sup>。自从PCR的发明和DNA测序的应用以来,通过对比不同菌属的基因序列表明了细菌16s rRNA具有高度的保守性,而且具有多拷贝、多信息、长度适中的特点,因此可以作为鉴定细菌菌属的黄金法则<sup>[10]</sup>。通过这种方法根据各菌种间的差异构建出系统进化树可以对不明菌种进行分类或者对已知菌种重新分类<sup>[11]</sup>。甚至对于一些不能通过培养得到的不明微生物的鉴定也可以用这个方法进行<sup>[12,13]</sup>。香港大学海鸥型菌研究小组之前已对16s rRNA鉴定微生物做过大量的工作。他们在提取香港海鸥型菌的DNA后,采用LPW264 5'-GAGT TTGATCMTGGCTCAG-3'和LPW265 5'-GNTAC CTGTGTTACGACTF-3'对该菌的16s rRNA进行PCR扩增后,通过琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,用LPW266 5'-TCCCA GTGTGG CAGATCAT-3'及LPW267 5'-GAAA GGGACCGGTAACCGCA-3'作为测序引物,对该菌的16s rRNA进行测序。确定了香港海鸥型菌HKU1菌株的16s rRNA的长度是1495个碱基,与基因数据库中的已知菌种的16s rRNA序列进行比较,均存在差异,因而判断为新菌种。该菌株序列现已登陆在国际生物技术信息中心(NCBI)的基因数据库<sup>[11]</sup>。根据16s rRNA基因序列的同源性分析,确定香港海鸥型菌属原核细菌并与现知的所有菌属存在差异,与其相关性比较接近的有*Microvirgula aerodenitrificans*, *Vogesella indigifera*, 和*Chromobacterium*,碱基对差异数分别为91(6.2%),112(7.7%)和116(8.2%),其中最接近的菌种为*M. aerodenitrificans*。而后分离出来的6株菌株的16s rRNA与HKU1菌株基本相同,仅有0~2个碱基的差异,说明其16s rRNA存在高度的序列保守性。故可以根据该菌的16s rRNA的序列设计引物对疑似菌检测。

3.2 核糖分型(ribotyping)与脉冲电场电泳 核糖分型是一个典型的限制性片段长度多态性分析(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP),使用限制性内切酶消化染色体DNA,可产生不同的RFLP带谱,可鉴别种内株间的差异。如果使用同一标准分子量作为对照,并使用统一的RFLP数据库,那么可将RFLP带谱作为未知菌株快速鉴定的方法之一<sup>[14,15]</sup>。脉冲电场电泳是在DNA凝胶电泳基础上发展起来的。它具有强大的分辨能力,分离DNA的分子量可达2000 kb,超过常规电泳技术的50倍。最初的应用是测定细菌、支原体等基因组的大小,现

在已应用脉冲电场电泳 (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 对某些病原体进行分型,它能区别进化上属于相同种系的菌株之间的基因微小差异,是当前流行病学研究的精细工具。过去借助很费时的 DNA 序列分析进行鉴别,而脉冲电场电泳的发展为这类分析提供了一种补充方法<sup>[16-19]</sup>。由于这 2 种方式各有利弊,可以互相弥补不足,能提供更完整详尽的 DNA 信息。港大微生物系香港海鸥型菌研究小组用核酸限制性内切酶 *PvuII* 将该菌的基因组完全消化并溶解后在琼脂糖凝胶进行电泳分离,发现从水产中分离得到的 25 个菌株有 6 种不同的电泳图谱。采用核酸限制性内切酶 *SpeI* 对该菌的基因组进行消化,测得了海鸥型菌的基因组的大小大约是 3 Mb,不同来源的菌株 DNA 经酶切后进行脉冲场凝胶电泳,其基因表型差异明显<sup>[3]</sup>,证明它们分别是不同的香港海鸥型菌菌株。核糖分型与脉冲电场电泳均发现从 1 例病人体内分离得到的香港海鸥型菌与其近期消费过的市场零售的鱼片中分离到的该菌有相同的谱带,说明该病人是由于食用被污染鱼肉而患病的。

#### 4 自动化细菌鉴定系统

自动化细菌鉴定系统是一套微量快速培养基和微量生化反应系统。至今已逐步实现了全自动鉴定过程,微生物鉴定系统使细菌鉴定过程规范化和程序化,将细菌对底物的生化反应类型与数据库中的类型相比较。自动化细菌鉴定系统原理主要是根据微生物的酶学反应,各种碳源代谢情况,挥发或非挥发酸产生情况等生物化学特性来进行鉴定,很大程度上简化了传统的细菌鉴定程序,无需复杂的预备和后续试验。港大微生物系香港海鸥型菌研究小组应用生物梅里埃公司的 Vitek system 和 API system 细菌鉴定系统对香港海鸥型菌的生化特性进行自动分析,得出的结论与常规检测结果一致,并从其数据库中找出了与其最相关的菌属以供参考<sup>[1-3]</sup>。

#### 5 结束语

自香港海鸥型菌发现以来,港大医学院微生物学系相继在具有重要影响的杂志上发表了一系列论文,初步就香港海鸥型菌形态特征,生物学表征进行了描述,为该菌临床学研究的深入提供了可靠的理论依据。目前对香港海鸥型菌的鉴定方法上有一定的创新性,但技术上仍有待进一步完善。将分子生物学研究方法运用于微生物鉴定方面,开发建立灵敏快速的检测方法仍是今后研究的重点。

#### 参考文献

- [1] Yuen K Y, Woo C Y, Teng J L, et al. *Laribacter hongkongensis* gen nov, sp nov, a Novel gram-negative bacterium isolated from a cirrhotic patient with bacteremia and empyema[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39: 4227-4232.
- [2] Woo C Y, Lau K P, Teng L L, et al. Association of *Laribacter hongkongensis* in community-acquired gastroenteritis with travel and eating fish: a multicentre case-control study[J]. The Lancet, 2004, 363: 1941-1947.
- [3] Woo C Y, Kühnert P, Burnens A P, et al. *Laribacter hongkongensis*: a potential cause of infectious diarrhea [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003, 47: 551-556.
- [4] Lau K P, Woo C Y, Hui W T, et al. Use of cefoperazone MacConkey agar for selective isolation of *Laribacter hongkongensis*[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 4839-4841.
- [5] 陈定强,谢海平,陆敢,等.淡水养殖鱼类中香港海鸥型菌 *Laribacter hongkongensis* 的分离和鉴定[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2004, 43(5): 131-132.
- [6] 朱建丰. 细菌鉴定中应注意的问题[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(1): 114.
- [7] Caspar F F, Andreas M L. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia [J]. Clinical Microbiology Reviews, 1999, 12(2): 243-285.
- [8] 龙建国,靳建忠. 抗生素在细菌鉴定中的作用[J]. 医学理论与实践, 2004, 17(4): 282-483.
- [9] Wilson K H. Molecular biology as a tool for taxonomy[J]. Clin Infect Dis, 1995, 20 (Suppl 2): S117-S121.
- [10] Lau K P, Woo C Y, Mok M Y, et al. Characterization of *Haemophilus segnis*, an important cause of bacteremia, by 16s rRNA gene sequencing[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(2): 877-880.
- [11] Olsen G J, Woese C R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny[J]. FASEB, (J 7): 113-123.
- [12] Lau K P, Woo C Y, Woo K S, et al. Catheter-related microbacterium bacteremia identified by 16s rRNA gene sequencing[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(7): 2681-2685.
- [13] Relman D A, Loutit J S, Schmidt T M, et al. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens[J]. N Engl J Med, 1990, 323: 1573-1580.
- [14] 鲁辛辛,王玫,周宇. 细菌核酸分类鉴定技术的研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(6): 394-397.
- [15] Abd El-Haleem D, Kheiralla Z H, Zaki S, et al. Multiplex-PCR and PCR-RFLP assays to monitor water quality against pathogenic bacteria [J]. J Environ Monit, 2003, 5: 865-870.
- [16] 韩黎,谭耕雯,陈世平. PFGE 在真菌基因研究中的应用[J]. 微生物学报, 1998, 38(2): 159-161.

# 转基因作物中外源基因在体内代谢途径的研究进展

殷召雪 徐海滨

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021)

**摘要:**为研究转基因食品中外源基因发生水平转移和其它危害的可能性,从而揭示转基因食品的安全性,综述了外源基因在体内代谢的途径及影响因素,外源基因在消化系统中的代谢降解,外源基因的水平转移以及外源基因在体内代谢途径的研究方法。

**关键词:**植物,转基因;基因,外源;代谢

## Current progresses on study of metabolic pathway of foreign gene from transgenic crops

YIN Zhao-xue, XU Hai-bin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

**Abstract:** To study the safety of transgenic foods and show the probability of gene horizontal transfer and other potential hazards of transgenic food, the metabolic pathway of foreign gene and influencing factors involved, the degradation of foreign gene in digestive system and the horizontal transfer of foreign gene were reviewed. In addition, research methods related were mentioned.

**Key word:** Plants, Transgenic; Gene, Foreign; Metabolism

随着生物重组技术的应用,转基因作物已在世界范围内广泛种植,毫无疑问这对于解决世界粮食问题有非常重要的意义。但近年来随着研究的深入以及食品安全意识的进一步提高,再加上转基因作物污染事件的出现,人们更加重视转基因作物及其产品的安全性。

转基因作物不同于传统作物在于它引入了各种外源基因(目的基因和标记基因),转基因作物被人或动物摄取后,外源基因随转基因作物进入体内之后首先暴露在消化系统中,在口腔咀嚼、胃中酸性环境及胃肠道消化酶的共同作用下,外源基因被降解成许多小的片段,最后可能完全降解成各种碱基进

一步代谢或者排出体外。一个令人关注的问题是那些未完全降解的片段是否会转移到肠道细菌或者整合到宿主组织、脏器基因组中。因而非常有必要研究外源基因进入体内之后的代谢途径,从而揭示其发生基因水平转移和其它危害的可能性。

### 1 外源基因在体内代谢途径的研究内容

转基因作物特别是其中外源基因的安全性的相关研究不断增多,研究内容涉及到其在体内外代谢的稳定性以及影响因素,能否与肠道细菌之间发生水平转移以及是否会进入宿主动物基因组中等,但就其性质而言,大多是检测性或描述性的,相关机制

[17] Richter S S, Heilmann K P, Beekmann S E, et al. The molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* with quinolone resistance mutations[J]. Clin Infect Dis, 2005, 40(2):225-235.

[18] De Moissac Y R, Ronald S L, Pepler M S. Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological study of bordetella pertussis in a whooping cough outbreak [J]. J

Clin Microbiol, 1994, 32(2):398-402.

[19] Duffy G, O'Brien S B, Carney E, et al. Characterization of *E. coli* O157 isolates from bovine hide and beef trimming in Irish abattoirs by pulsed field gel electrophoresis [J]. J Microbiol Methods, 2005, 60(3):375-382.

[收稿日期:2005-03-03]

中图分类号:R15;R378.1;S965.1 文献标识码:E

文章编号:1004-8456(2005)04-0341-04

基金项目:国家重点基础研究发展规划“973”(2001CB10901)

作者简介:殷召雪 男 硕士生

通讯作者:徐海滨 男 研究员

This work was supported by the National Basic Research Program of China. (2001CB10901)

中国食品卫生杂志

CHINESE JOURNAL OF FOOD HYGIENE

2005年第17卷第4期

