

实验技术与方法

超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱筛查一起由生物碱引起的食物中毒

郭巧珍^{1,2}, 赵丽丛³, 张昕^{1,2}, 张晶^{1,2}, 邵兵^{1,2}

(1. 北京市疾病预防控制中心食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013;

2. 北京市预防医学研究中心, 北京 100013; 3. 石家庄市藁城区疾病预防控制中心, 河北石家庄 052160)

摘要:目的 采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-QTOF MS)技术对1起食物中毒事件的样本进行筛查,为患者救治及做好此类中毒的检测提供策略和依据。方法 患者的呕吐物、洗胃液和食物样本经酸化乙腈提取,C18固相萃取填料净化,利用UPLC-QTOF MS进行非依赖型全信息质谱数据采集,经UNIFI软件进行峰谱识别和谱库检索。结果 在5份人体样本中均检出莨菪碱,含量低于1 mg/kg,其中1人的胃液样本中筛出阿奇霉素;未发现莨菪碱代谢产物,与大鼠暴露实验结果一致。结论 由实验室检测结果推断本次事件是由莨菪碱引起的家庭食物中毒。UPLC-QTOF MS高分辨质谱筛查技术在处理由化学性物质引起的食物中毒突发事件中具有重要的实用价值。

关键词:生物碱;食物中毒;液相色谱-四极杆飞行时间质谱;莨菪碱

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)01-0049-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.01.010

Screening of a food poisoning caused by alkaloids by ultra-high-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry

GUO Qiaozhen^{1,2}, ZHAO Licong³, ZHANG Xin^{1,2}, ZHANG Jing^{1,2}, SHAO Bing^{1,2}

(1. Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing, 100013, China; 2. Beijing Research Center for Preventive Medicine, Beijing 100013, China; 3. Shijiazhuang Gaocheng District Center for Disease Control and Prevention, Hebei Shijiazhuang 052160, China)

Abstract: Objective Screening bio-samples from a food poisoning event based on ultra-high-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-QTOF MS), and to provide strategies and references for patient treatment as well as the event response. **Methods** Vomits, gastric lavage and food samples were extracted by acidic acetonitrile and purified by C18 sorbent and analyzed using UPLC-QTOF MS under data independent acquisition mode. Peak identification and spectrum library retrieval were carried out by the Unifi software. **Results** Hyoscyamine was detected in 5 human samples and the concentration was below 1 mg/kg. Azithromycin was also screened in one gastric lavage sample. No metabolites of hyoscyamine was found, which was consistent with the result of rat exposure experiment. **Conclusion** According to the screened result, it was inferred that this event was a family food poisoning caused by hyoscyamine. The UPLC-QTOF MS screening is of great significance in dealing with food poisoning emergencies.

Key words: Alkaloids; food poisoning; liquid chromatography high resolution mass spectrometry; hyoscyamine

近年来,我国发生多起食用野生动植物引起的中毒事件^[1-5],国家卫生健康委员会发布的《全国食物中毒事件情况的通报》显示由毒蘑菇或有毒动植物造成的死亡人数占有中毒死亡人数的一半以

上^[6],严重危害人们的身体健康,给居民的财产生活带来了巨大损失。野生动植物引起中毒的物质一般为动植物毒素,如河豚毒素,蘑菇毒素^[7-8]、吡咯里西啶碱^[9]、雷公藤碱^[10]、钩吻碱^[11]、秋水仙碱^[3]和乌头碱^[12]等。食物中毒具有突发性和复杂性,快速准确锁定致毒物质对患者临床救治和及时处理中毒事件具有至关重要的作用。

色谱质谱联用技术是目前动植物毒素分析的主要技术手段之一^[13-14]。对于已知化合物引起的食物中毒,可参考已有的文献或标准,采用靶向分

收稿日期:2021-10-08

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1602700)

作者简介:郭巧珍 女 助理研究员 研究方向为食品安全

E-mail: qiao037@126.com

通信作者:张晶 女 副研究员 研究方向为食品检测

E-mail: brightjing@163.com

析的方法开展检测。但有“法”可依的毒物仅占较少的比例,我国每年仍有一定数量的食物中毒事件无法确定中毒原因,应对这类食物中毒事件,开展毒物的非靶向筛查检测势在必行^[15]。高分辨质谱因具有较高的质量分辨率及较快的扫描速度,为样本快速筛查和毒物鉴定提供了有效的技术手段,目前广泛地应用于食品及生物样本中目标化合物的分析及未知物非靶向筛查。

本研究采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱的全扫描模式对1起中毒事件中的相关样本进行了分析,通过质谱库进行有毒有害物质筛查。结合流行病学调查和临床症状等综合分析、与标准对照品比对,判定了本次食物中毒事件的致毒原因。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

ACQUITY™ I-Class 超高效液相色谱仪 (Ultra-high-performance liquid chromatography, UPLC) 和 Vion 四极杆-飞行时间质谱仪 (Waters 公司, 美国) (Quadrupole time of flight mass spectrometry, QTOF MS), 电子天平 (万分之一) (梅特勒, 德国), 旋涡混合器 (KS501IKA, 德国), 冷冻离心机 (Beckman 公司, 美国), 样本粉碎机 (常州市英格尔仪器制造有限公司, 中国), 超声仪 (昆山市超声仪器有限公司, 中国), 移液器 (Eppendorf, 德国)。Millipore-Elix-QE-QG 超纯水机 (Millipore 公司, 美国)。

LC-MS 级、色谱级乙腈 (J. T. Baker 公司, 美国), 超低元素水 (Mili-Q Water System 纯化制备), 甲酸 (Acros Organics 公司, 纯度 >98%), 亮氨酸脑啡肽 (Leucine Enkephalin, LE), 购自 Sigma 公司, 纯度 >96%, 氯化钠为分析纯 (国药制剂), 阿奇霉素标准品为 Sigma 公司, 莨菪碱对照品 (纯度 >98%) 为北京索莱宝科技有限公司; 清洁健康 Wistar 雄性大鼠 (250 g 左右) 3 只, 约 6 月龄, 购自首都医科大学实验动物中心。

1.2 实验

1.2.1 中毒事件样本

2019 年 10 月 26 日, 某村发生一起疑似早餐中毒引起的事故, 致使一家 7 口发生不同程度的恶心、呕吐、意识模糊等症状。流行病学调查人员在患者家中及医院共采集 7 份样本, 其中包括患者呕吐物 2 份、3 名儿童洗胃液各 1 份、采集食品加工原材料黑豆、黑芝麻各 1 份, 以上 7 份样本于 10 月 28 日送至北京市疾病预防控制中心实验室进行检测。10 月 29 日, 采集了村子附近河岸边的曼陀罗籽 1 份送检。

1.2.2 大鼠实验样本

为了进一步验证中毒物质, 实验采用曼陀罗籽提取物对大鼠进行经口暴露。用水熬制曼陀罗籽粉末 5 h, 浓缩后将其给 2 只大鼠灌胃, 折合莨菪碱剂量为每只大鼠 20 mg/kg^[16]。另一只为空白对照, 给药期间禁食但自由饮水, 给药前收集大鼠尿液作为空白样本。单次给药, 取 0 min 的眼眶血作为空白, 停药后 10、30 min、1 和 3 h 眼眶取血 0.5 mL; 于 3 h 处死暴露组两只及对照组的一只, 取胃内容物, -20 °C 保存; 用代谢笼收集暴露期间的尿液。

1.2.3 样本提取

将黑芝麻、黑豆和曼陀罗籽样本分别用中草药粉碎机粉碎。

患者呕吐物和洗胃液称取约 0.2 g (精确至 0.01 g), 黑芝麻、黑豆和曼陀罗籽样本称取 0.1 g (精确至 0.01 g) 于 10 mL 离心管中, 加入 2 mL 含有 1% 甲酸的乙腈, 涡旋混匀, 超声提取 5 min, 加入 1.0 g 氯化钠, 震荡混匀后 4 °C 9 000 r/min 离心 5 min。取上层加入分散固相萃取 C18 填料 50 和 100 mg 无水硫酸钠净化, 旋涡后 4 °C 9 000 r/min 离心 10 min, 取上层 0.5 mL, 再加入超纯水 0.5 mL, 用 UPLC-QTOF MS 测定 (其中曼陀罗籽稀释 10 倍上机测定)。

大鼠尿液直接用 1% 甲酸乙腈稀释 2 倍上机检测, 大鼠血液用 3 倍 1% 甲酸乙腈沉淀后上机检测, 称取胃内容物 0.2 g, 采用提取呕吐物和洗胃液方法净化后上机测定。

1.2.4 样本分析

色谱条件: Waters ACQUITY UPLC™ BEH C18 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 粒径 1.7 μm) (美国 Waters 公司)。柱温: 50 °C, 流速: 0.45 mL/min, 进样体积: 5.0 μL, 流动相 A 为 0.1% 甲酸乙腈, 流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 见表 1。

表 1 流动相梯度条件

Table 1 The condition of mobile phase of UPLC

时间/min	A/%	B/%
0	2	98
0.25	2	98
20	99	0
24	99	0
25	2	98
30	2	98

质谱条件: 电喷雾电离源 (ESI⁺), 源温度为 120 °C; 毛细管电压为 1.0 kV; 脱溶剂气流量为 800 L/h, 温度为 500 °C; 采集模式为非依赖型全信息质谱数据采集 (MS^E) 模式, 质量扫描范围: m/z 50~1 000 Da。为保证质量数精度, 数据采集时以亮

氨酸脑啡肽(浓度 50 ng/mL, m/z :556.277 1)进行实时校准。质谱文件中包含 3 个通道(Function),其中 Function 1 和 Function 2 为不同碰撞能量(Collision energy, CE)下的质谱信息,Function 3 为亮氨酸脑啡肽的实时校正质谱图。Function 1 对应低碰撞能量 CE=6 eV;Function 2 对应高碰撞能量梯度 15~45 eV。

1.3 数据处理

实验数据采集和处理通过美国 Waters 公司 UNIFI 系统完成。利用 1.2.4 所述的参数条件采集数据,数据采集完成后,建立处理方法:导入已建立的质谱库信息,包括化合物名称、分子式、理论分子量数、预期碎片离子、保留时间等。选择可能的加合离子,正离子模式下通常包括 $M+H^+$ 、 $M+Na^+$ 、 $M+K^+$ 等。设置保留时间漂移值为 ± 0.2 min,母离子的目标匹配容差 5 ppm,碎片离子匹配容差 10 ppm,进行筛查检索。

2 结果

2.1 样本筛查

采用超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱的 MS^E 模式对样本提取液进行质谱信息采集,获得样本总离子流图(图 1 为其中一份洗胃液的色谱质谱图),5 份生物样本和曼陀罗籽中在保留时间 3.70 min 均出现一个色谱峰,一级离子 m/z 为 290.174 9,二级碎片离子有 m/z 124.111 8、 m/z 93.069 5、 m/z 260.164 3。此外,1 例患者的洗胃液样本在保留时间 5.11 min 还出现了丰度较强的色谱峰,一级离子 m/z 为 749.515 3,二级碎片离子有 m/z 591.421 2、 m/z 573.410 9、 m/z 434.310 9。通过 UNIFI 软件的谱峰识别,导入高分辨质谱数据库,利用 1.3 数据处理方法,进行筛查鉴定,确定保留时间为 3.70 min 的是莨菪碱,其质谱断裂信息见图 2;保留时间为 5.11 min 的是阿奇霉素,两种物质的筛查信息见表 2。

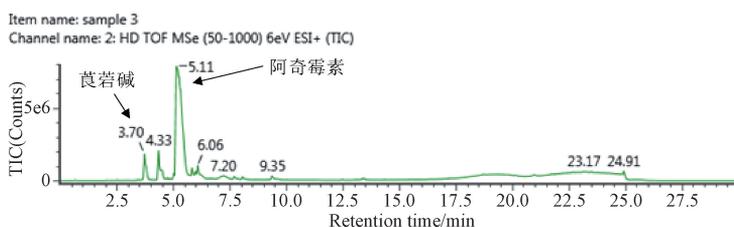


图 1 洗胃液的液相色谱质谱图

Figure 1 The chromatogram of gastric juice

名称: sample 2

通道名: hyoscyamine [+H]: (23.3 PPM) 290.1746: DT=5.11 至 5.51 ms

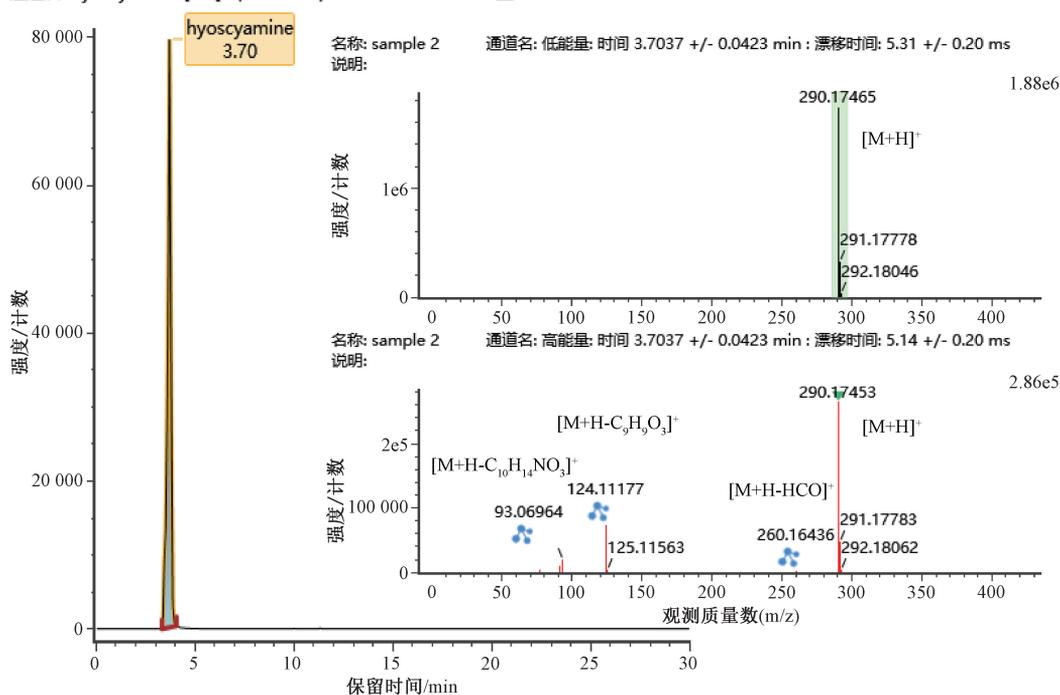


图 2 莨菪碱的质谱图

Figure 2 Mass spectrum of hyoscyamine

表2 样本筛查结果信息

Table 2 The information of sample screening results

序号	RT /min	筛查结果	一级离子		二级离子			化学式
			观测离子 /m/z	质量数误差 /ppm	理论离子 /(m/z)	观测离子 /(m/z)	质量数误差 /ppm	
1	3.70	Hyoscyamine 莨菪碱	290.174 9	-0.4	124.112 1	124.111 8	-2.21	$C_8H_{14}N$
					93.069 8	93.069 5	-3.16	C_7H_9
					260.164 5	260.164 3	-0.84	$C_{16}H_{22}NO_2$
2	5.11	Azithromycin 阿奇霉素	749.515 3	-0.5	591.421 5	591.421 2	-0.39	$C_{30}H_{59}N_2O_9$
					573.410 9	573.410 9	-0.08	$C_{30}H_{57}N_2O_8$
					434.311 2	434.310 9	-0.76	$C_{22}H_{44}NO_7$

为了进一步确认筛查结果,在相同的仪器条件下分析莨菪碱(图3B)和阿奇霉素(图3D)的标准溶液,

发现样本中两物质(图3A和C)的保留时间、一级离子和二级碎片离子丰度均与标准品高度一致。

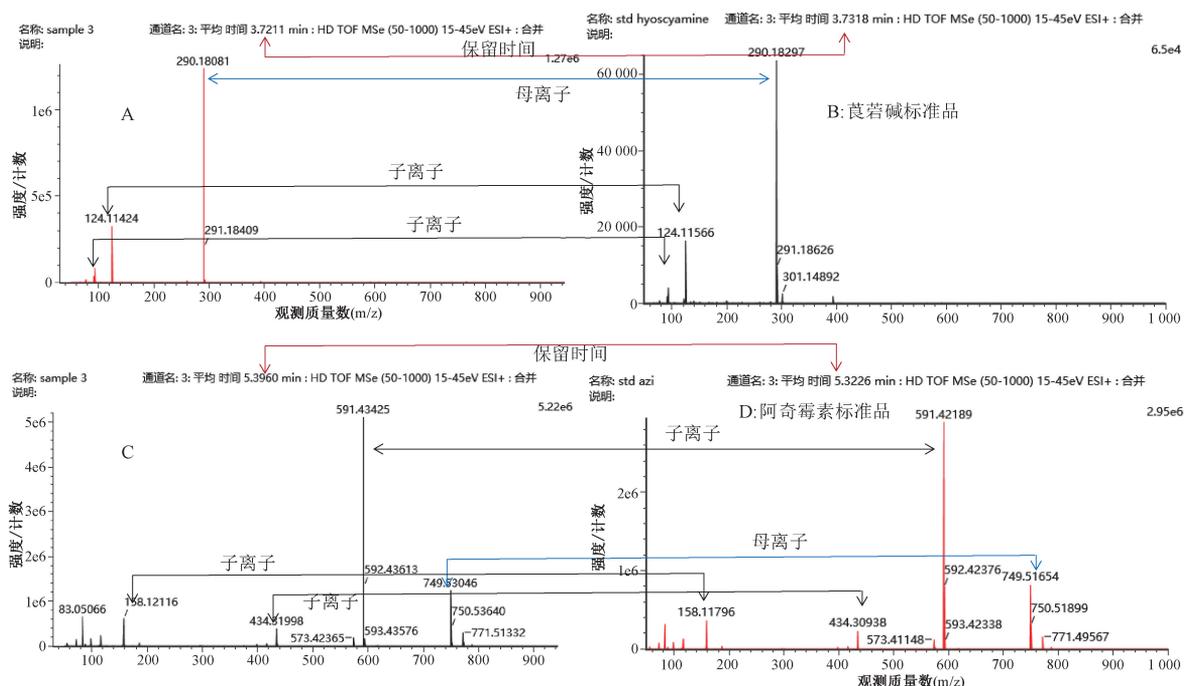


图3 样本中莨菪碱、阿奇霉素和相应标准品的对照图

Figure 3 The mass spectrums of hyoscyamine and azithromycin in the sample and corresponding standards

2.2 定量分析

配制不同浓度系列的莨菪碱对照品,用一级离子的提取色谱峰面积为纵坐标,标准溶液浓度为横坐标绘制标准曲线,对5份人体样本和1份曼陀罗籽中的莨菪碱进行定量。结果表明,两份食品加工原料中未检出莨菪碱,5份人体样本中莨菪碱浓度范围103~896 $\mu\text{g}/\text{kg}$,曼陀罗籽中莨菪碱含量为16 mg/kg ,约为0.32%。与文献报道中曼陀罗籽中莨菪碱含量范围一致^[17]。

2.3 大鼠暴露实验

实验发现大鼠3h内的尿液和胃内容物中均可检测到莨菪碱,其中3h的胃内容物中莨菪碱的浓度约为20 $\mu\text{g}/\text{g}$,明显高于尿液中的含量水平(约1.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。10、30 min、1和3h采集的大鼠血液中均可检出莨菪碱,浓度分别约为8、44、40和20 ng/mL 。

3 讨论

莨菪碱是从天仙子、洋金花中分离的颠茄生物碱之一,是一种副交感神经抑制剂^[18],药理作用似阿托品,但毒性较大,临床应用较少。莨菪碱有止痛解痉功能,对坐骨神经痛有较好疗效,有时也用于治疗癫痫、晕船等。据了解每到秋季,该村老年人有采集曼陀罗籽泡酒治疗风湿的习惯,患者事发前曾在河岸边采集了曼陀罗籽。事发日该家庭食用自制杂粮豆浆作为早餐,早餐已经食用完并清洗干净,因此未能采集到成品豆浆或残渣。根据筛查结果,怀疑造成此次食物中毒的可能原因是误将曼陀罗籽混入豆类、粮谷内,经加工后被误食。除莨菪碱外,还在1人的洗胃液里筛查出阿奇霉素,通过流行病学调查得知该患者处于感冒期间,早餐后口服了阿奇霉素片剂。

曼陀罗籽中的毒生物碱主要为东莨菪碱、莨菪碱、山莨菪碱、阿托品等。不同品种曼陀罗籽的生物碱的分布和含量有所不同,总生物碱含量一般在 0.2%~0.49% 之间^[17]。本次事件中采集到的曼陀罗籽中只检出了莨菪碱,含量约为 0.32%。莨菪碱急性毒性的最低致死剂量 (LDLo) 为 1 471 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ ^[19],在本次事件人体样本中莨菪碱浓度为 103~896 $\mu\text{g}/\text{kg}$,虽无人员死亡,但患者的中毒症状表现为呼吸异常、神志不清、头晕、昏迷,严重危害人体健康。受现场条件等诸多因素的限制,实验室收到的送检呕吐物和洗胃液样本的量很少,仅够做一次或两次提取。由于样本呈悬浊液态或糊状,均匀性欠佳,且不便开展均质实验和重复测定,所以不能准确评价样本提取的回收率,所得浓度值仅供参考。大鼠暴露实验表明服用莨菪碱 3 h 后胃内容物中目标物的浓度仍然很高,洗胃是临床最快最便捷的降低莨菪碱含量的方法。

动物暴露实验结果显示 3 h 时大鼠尿液和胃内容物中均只检出莨菪碱,未发现其代谢物。文献表明莨菪碱可在肝脏中代谢为托品酸、托品和莨菪碱葡萄糖醛酸苷,而通过尿液是原型排泄^[20]。大鼠胃内容物中仅发现莨菪碱残留,未检出代谢产物,这一点与中毒患者洗胃液和呕吐物中仅检出莨菪碱原型的结果一致,也与文献报道相符。

未知食物中毒样本的筛查离不开快速可靠的提取净化前处理技术和强大的仪器分析技术,如气相色谱质谱技术、液相色谱质谱技术等。液相色谱四极杆飞行时间质谱筛查数据库包括生物碱^[21]、农兽药、受国家管制的麻醉品和毒品等,可以准确地分析鉴定毒害化合物,为中毒事件的筛查奠定了技术基础。本实验利用实验室技术积累,通过质谱筛查和大鼠暴露实验,结合流行病学调查确证本次中毒事件由莨菪碱引起。由于致毒物质的筛查结果不仅与筛查技术相关,还与筛查样本息息相关。事件现场往往会受到人员、环境、时机等多种现实因素的影响,实验室检测人员应与流行病学调查人员充分沟通和配合,尽可能全面地收集和分析中毒样本,包括食物样本,生物样本(呕吐物、洗胃液、血液、尿液)等以确保筛查分析结果的准确性和全面性。

参考文献

- [1] XU F, ZHANG Y Z, ZHANG Y H, et al. Mushroom poisoning from *Inocybe serotina*: A case report from Ningxia, northwest China with exact species identification and muscarine detection [J]. *Toxicol*, 2020, 179: 72-75.
- [2] XU X M, MENG Z, ZHANG J S, et al. Analytical method

development for α -amanitin and β -amanitin in plasma at ultra-trace level by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry and its application in poisoning events[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 190: 113523.

- [3] RAZINGER G, KOZELJ G, GORJUP V, et al. Accidental poisoning with autumn *Crocus* (*Colchicum autumnale*): A case series[J]. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa)*, 2021, 59 (6): 493-499.
- [4] HUANG H N, LU J L, LIN S E, et al. Simultaneous determination of twelve paralytic shellfish poisoning toxins in bivalve molluscs by UPLC-MS/MS and its applications to a food poisoning incident[J]. *Toxicol*, 2020, 174: 1-7.
- [5] QU D, DONG-FANG Q, CHEN X C, et al. Fatal poisoning by accidental ingestion of the "heartbreak grass" (*Gelsemium elegans*) verified by toxicological and medico-legal analyses[J]. *Forensic Science International*, 2021, 321: 110745.
- [6] 国家卫生健康委员会卫生应急办公室. 国家卫生计生委办公厅关于 2015 年全国食物中毒事件情况的通报 [EB/OL]. (2016-04-01) [2021-09-20]. <http://www.nhc.gov.cn/yjb/s7859/201604/8d34e4c442c54d33909319954c43311c.shtml>.
- [7] 吴春蕾, 黄信有, 张芝平, 等. 奥米粉裙蕈中毒事件调查分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2021, 33(1): 114-117.
- [8] 颜芝闻, 吴晓旻, 裴红兵, 等. 武汉市一起毒蘑菇中毒事件现场调查和鉴定[J]. *中国食品卫生杂志*, 2020, 32(5): 566-569.
- [9] 陈顺安, 黄新球, 张强, 等. 云南有毒蜜粉源区蜂蜜中的主要有毒生物碱分析[J]. *中国食品学报*, 2018(6): 330-337.
- [10] 赵琴, 莫湘桂, 谭昱. 基于 HS-SPME-GC-MS 对云南地区雷公藤有毒蜜的分析[J]. *中国蜂业*, 2020, 71(12): 64-66.
- [11] 冯涛, 陶森, 阮世勇, 等. 基于 GC-MS 技术对钩吻碱食物中毒的应急检测[J]. *现代食品*, 2021(6): 156-160.
- [12] 翟雨佳. 植物药酒中常见有毒生物碱研究进展[J]. *现代食品*, 2019(5): 37-39.
- [13] 石银涛, 罗敬峰, 李恒, 等. 高分辨液质联用仪检验中毒事件中的生物碱[J]. *中国法医学杂志*, 2020, 35(2): 230-231.
- [14] IZZO L, RODRÍGUEZ-CARRASCO Y, TOLOSA J, et al. Target analysis and retrospective screening of mycotoxins and pharmacologically active substances in milk using an ultra-high-performance liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry approach[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103 (2): 1250-1260.
- [15] FISHER C M, CROLEY T R, KNOLHOFF A M. Data processing strategies for non-targeted analysis of foods using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 136: 116188.
- [16] 陈怀侠, 杜鹏, 韩凤梅, 等. 液相色谱-串联质谱法鉴定大鼠血浆中的山莨菪碱及其代谢物[J]. *中国药理学杂志*, 2006, 41(15): 1178-1181.
- [17] 张姮, 向莉, 尹群. 1 例急性重度曼陀罗中毒病人的急救与护理[J]. *全科护理*, 2016, 14(35): 3776-3779.
- [18] U. S. Department of Health & Human Services. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Hyoscyamine. [EB/OL]

- (2017-07-07) [2021-09-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548870/>.
- [19] 化学品数据库. 萘砷碱[EB/OL]. (2017-11-03) [2021-09-20]. <http://www.basechem.org/chemical/1175>.
- [20] MYERS J H, MORO-SUTHERLAND D, SHOOK J E. Anticholinergic poisoning in colicky infants treated with hyoscyamine sulfate [J]. *The American Journal of Emergency Medicine*, 1997, 15 (5): 532-535.
- [21] 唐晓琴, 赵舰, 贺丽迎, 等. 72种生物碱高分辨质谱数据库建立与应用[J]. *中国食品卫生杂志*, 2020, 32(3): 228-233.

实验技术与方法

双重实时荧光 PCR 检测副溶血性弧菌毒力基因方法的建立和应用

白瑶¹, 李斌^{1,2}, 李凤琴¹, 杨大进¹, 徐进¹, 董银苹¹, 王伟¹, 闫琳¹, 江涛¹

(1. 国家食品安全风险评估中心, 国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021; 2. 中国食品发酵工业研究院有限公司, 北京 100026)

摘要:目的 建立一种同时检测副溶血性弧菌两种毒力基因 *tdh* 和 *trh* 的双重荧光聚合酶链式反应(PCR)方法, 并对我国 2 771 株食源性副溶血性弧菌携带的毒力基因进行全面检测。方法 针对副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 毒力基因分别设计荧光 PCR 引物和探针, 优化荧光 PCR 反应体系及反应程序, 建立可同时检测两种毒力基因的双重荧光 PCR 检测方法。应用所建方法对我国 2015 年和 2016 年分离的 2 771 株食源性副溶血性弧菌携带的毒力基因进行检测, 并与 PCR 方法检测结果进行对比, 评价方法的灵敏性、准确性和特异性。结果 建立的双重荧光 PCR 方法可同时检测 *tdh* 和 *trh* 两种毒力基因, 其灵敏度达 1.5×10^{-4} ng/ μ L, 准确性和特异性均为 100%。我国 2015 年食源性副溶血性弧菌中 *tdh* 和 *trh* 基因携带率分别为 (0.26%, 3/1 137; 1.67%, 19/1 137), 2016 年食源性副溶血性弧菌中 *tdh* 和 *trh* 基因携带率分别为 (0.24%, 4/1 634; 0.43%, 7/1 634)。结论 本研究建立了一种同时检测副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 毒力基因的双重荧光定量 PCR 方法, 能够快速、准确地筛查副溶血性弧菌毒力基因; 我国食品来源副溶血性弧菌分离株 *tdh* 和 *trh* 毒力基因携带率较低; 双重荧光 PCR 方法可应用于食品中副溶血性弧菌致病性研究, 为我国居民膳食暴露副溶血性弧菌的风险评估工作提供科学数据。

关键词: 实时荧光定量聚合酶链式反应; 副溶血性弧菌; 毒力基因; 检测

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2022)01-0054-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2022.01.011

Establishment and application of dual real-time PCR for detection of virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus*

BAI Yao¹, LI Bin^{1,2}, LI Fengqin¹, YANG Dajin¹, XU Jin¹, DONG Yinping¹, WANG Wei¹, YAN Lin¹, JIANG Tao¹

(1. Key Laboratory of Food Safety Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Assessment, Beijing 100021, China; 2. China National Research Institute of Food and Fermentation Industries Co., Ltd, Beijing 100026, China)

Abstract: Objective A dual real-time polymerase chain reaction (PCR) method for simultaneous detection of two virulence genes *tdh* and *trh* of *Vibrio parahaemolyticus* was established, and the virulence genes carried by 2 771 strains of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in China were comprehensively detected. **Methods** According to the *tdh* and *trh* virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus*, PCR primers and fluorescent probes were designed respectively, the real-time PCR reaction system and reaction procedure were optimized, and a dual real-time PCR detection method which can detect the two virulence genes at the same time was established. The virulence genes carried by 2 771 strains of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* isolated in 2015 and 2016 were detected by the established method, and compared with the result of

收稿日期: 2021-11-05

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFC1606404-2)

作者简介: 白瑶 女 副研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: baiyao@cfsa.net.cn

通信作者: 江涛 男 研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: jiangtao001@cfsa.net.cn