

图谱清晰可辨。除 90-2 和 90-3、23 和 30 外,其他 26 株分离株的酶切图谱各不相同。可见, *Spe I* 酶切对椰毒假单胞菌酵米面亚种具有足够的分辨率,可以用于该菌的 PFGE 分型。

3.3 中国椰毒假单胞菌酵米面亚种分离株的分子分型

本研究中,采用 BioNumerics 数据库软件,结合分离株的来源信息,对 29 株椰毒假单胞菌酵米面亚种分离株的带型进行分析。指纹图谱完全一致的分离株 90-2 和 90-3,均来自同一食物中毒事件的中毒食品。来自黑龙江省的分离株中,14、28、23 和 30 指纹图谱相似度较高,其中 23 和 30 的酶切图谱完全一致。另外,指纹图谱相似度较高的 3 和 21 均来自黑龙江省(具体来源不详)。但是,同时从辽宁建平县分离到的 2 株椰毒假单胞菌酵米面亚种(分离株 1 和 2)PFGE 指纹图谱的相似度只有 68.75%。

PFGE 用稀有位点的限制性内切酶进行酶切,可以获得菌种某亚种特有的电泳图谱。从整个基因组的角度考虑菌株间的关系,在暴发调查以及疾病控制方面能够发挥较大的作用,已经成为分子流行病学调查研究中最有效的手段之一。本实验室建立的椰毒假单胞菌酵米面亚种 PFGE 分型方法及对国内分离株的分型研究为食品和环境中的该菌污染的分

子溯源提供了技术储备。

参考文献

- [1] 孟昭赫. 食品卫生检验方法注解(微生物学部分)[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:222-223.
- [2] 陈炳卿. 营养与食品卫生学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:320-323.
- [3] 焦振泉,刘秀梅,杨瑞馥,等. 椰毒假单胞菌酵米面亚种鸟嘌呤和胞嘧啶含量的测定及 2 种测定方法的比较[J]. 卫生研究,2000,29(4):243-245.
- [4] JIAO Z, KAWAMURA Y, MISHIMA N, et al. Need to differentiate lethal toxin-producing strains of *Burkholderia gladioli*, which cause severe food poisoning: description of *B. gladioli pathovar cocovenans* and an emended description of *B. gladioli* [J]. *Microbiol Immunol*, 2003, 47(12): 915-925.
- [5] DREVINEK P, VOSAHLIKOVA S, CINEK O, et al. Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic[J]. *Med Microbiol*, 2005, 54(Pt 7): 655-659.
- [6] CHANTRATITA N, VESARATCHAVEST M, WUTHIEKANUN V, et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a discriminatory typing technique for the bioterror agent *Burkholderia mallei* [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2006, 74(3): 345-347.
- [7] SEGONDS C, CLAVEL-BATUT P, THOUVEREZ M, et al. Microbiological and epidemiological features of clinical respiratory isolates of *Burkholderia gladioli* [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(5): 1510-1516.

实验技术与方法

中国部分水产品副溶血性弧菌毒力基因的分布特征

李薇薇 王晓英 郭云昌

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:目的 了解中国部分水产品中副溶血性弧菌毒力基因的分布情况。方法 通过聚合酶链反应测定从中国部分水产品中分离的 192 株副溶血性弧菌是否携带毒力基因 *tdh*、*trh*,及种特异性基因 *tlh*、*toxR*。结果 192 株实验菌株 *tdh* 全阴性,4 株 *trh* 阳性,毒力基因携带率 2.08%;而 *tlh*、*toxR* 的携带率均为 100%。结论 中国副溶血性弧菌水产品分离株毒力基因携带率非常低。

关键词:副溶血性弧菌;基因;聚合酶链反应;溶血素类

中图分类号:R155.5⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2010)03-0239-05

收稿日期:2010-03-01

作者简介:李薇薇 女 硕士研究生 研究方向食品卫生学 E-mail: liww_1984@hotmail.com

通信作者:郭云昌 男 副研究员 E-mail: yunchangguo2006@yahoo.com.cn

Distribution of Virulence Genes in *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Seafood in China

LI Wei-wei, WANG Xiao-ying, GUO Yun-chang

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

Abstract: Objective To study the distribution characteristics of virulence genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood in China. **Method** Using polymerase chain reaction to detect the virulence genes *tdh* and *trh*, and to detect the species-specific genes *tlh* and *toxR* in 192 experiment strains. **Results** There was no strain carrying *tdh* gene, and 4 stains carrying *trh* gene, accounted for 2.08% of strains in 192 food isolates. The strains carrying *tlh* and *toxR* genes were 100%. **Conclusion** The rate of carrying virulence gene in *Vibrio parahaemolyticus* from seafood isolates was very low in China.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; Genes; Polymerase Chain Reaction; Hemolysins

副溶血性弧菌是革兰氏阴性嗜盐菌,世界各地都有副溶血性弧菌引起的食物中毒事件发生,但主要集中在东南亚各国和美国,而欧洲少有报道^[1],主要是由于这些国家地区海水温度高且海产品摄入量多,导致副溶血性弧菌感染高发。副溶血性弧菌于1950年首次在日本一起食物中毒事件中发现,当时由于摄入了半干的小沙丁鱼造成了272人患病,20人死亡^[2]。副溶血性弧菌感染主要引起肠胃炎,虽然具有自限性,但由于在中国海产品中检出率比较高,引起食物中毒的比例比较大,是我国主要致泄病原菌,因此需要引起足够的重视。虽然欧美也有副溶血性弧菌引起暴发的报道,但与空肠弯曲菌和沙门菌相比,发病率相对要低,文献报道几乎所有临床分离菌株都携带毒力基因,而环境分离株,包括食品分离株毒力基因携带率 < 1%^[3]。目前对中国的食品尤其是水产品中分离的副溶血性弧菌毒力基因携带情况还没有进行全面的检测,对其携带情况未知,因此本研究对国家食源性疾病监测网收集的18个省、自治区和直辖市的副溶血性弧菌分离株进行了毒力基因的筛选,以了解中国水产品中副溶血性弧菌毒力基因的分布特征。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株来源 192株副溶血性弧菌是2007年国家食源性疾病监测网18个省、自治区和直辖市从水产品中分离而来的。副溶血性弧菌标准株ATCC17802为本实验室保存,RIMD2210633、AQ4037、AT4由军事医学科学院提供;阴性对照大肠杆菌ATCC25922为本实验室保存。

1.1.2 培养基和试剂 脑心浸液肉汤(brain heart infusion, BHI)和脑心浸液琼脂(brain heart infusion agar, BHA)购自OXOID公司。PCR反应所需Taq酶、dNTPs、10 × buffer、DNA Marker DL2000(TaKaRa,大连宝生物工程有限公司)。

1.1.3 仪器设备和耗材 高通量PCR仪、电泳槽、电泳仪均为美国BIO-RAD公司产品;手掌离心机(TOMOS,中国)、微型PCR板离心机(LabNet,美国)、GEL DOC XR凝胶成像系统(BIO-RAD公司)、96孔PCR反应板(Axygen,美国)。

1.1.4 引物合成 本实验中所用的引物参照美国FDA细菌操作手册及相关文献^[4,6],引物由大连宝生物公司合成。引物序列见表1。

表1 副溶血性弧菌毒力基因和种特异性基因引物序列

基因	引物名称	产物长度(bp)	退火温度(°C)	引物序列	参考文献
<i>tlh</i>	tl450F	450	58	L-tlh: AAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	Bej ^[4]
	tl450R			R-tlh: GCTACTTCTAGCATTTTCTCTGCG	
<i>tdh</i>	tdh251F	251	55	L-tdh: GGTACTAAATGGCTGACATC	Tada ^[5]
	tdh251R			R-tdh: CCA CTACCACTCTCATATGC	
	tdh269F	269	58	L-tdh: GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC	Bej ^[4]
	tdh269R			R-tdh: GGAATAGAACCCTTCATCTTCACC	
<i>trh</i>	trh250F	250	55	L-trh: GGCTCAAAATGGTTAAGCG	Tada ^[5]
	trh250R			R-trh: CATTTC CGCTCTCATATGC	
	trh500F	500	58	L-trh: TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	Bej ^[4]
	trh500R			R-trh: CATAACAAACATATGCCCATTTCC	
<i>toxR</i>	toxR367F	367	60	L-toxR: GTCTTCTGACGCAATCGTTG	Kim ^[6]
	toxR367R			R-toxR: ATACGAGTGGTTGCTGTCATG	

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 模板的制备 实验中所用的 192 株副溶血性弧菌保存在含 3% NaCl 和 40% 甘油的 BHI 中, -80 °C 保存。细菌接种于含有 3% NaCl 的 2 ml BHI 中, 37 °C 过夜培养。划线接种在 BHA 上, 培养 16 ~ 18 h。挑取 2 ~ 3 个菌落在含有 300 μl 无菌超纯水的离心管中混匀, 100 °C 煮沸 10 min 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清即模板 DNA -20 °C 保存。

1.2.2 PCR 扩增反应 反应体系均为 25 μl, 即在 96 孔 PCR 板中依次加入 10 × buffer 2.5 μl、dNTPs 2 μl (4 种 dNTP 各 200 μmol/L)、上下游引物各 1 μl (20 μmol/L)、Taq 酶 0.2 μl (1U)、模板 1 μl, 加水至 25 μl。用大肠杆菌 ATCC25922 作阴性对照, RIMD2210633 作 *tdh* 阳性对照, AQ4037、AT4 分别作 *trh1* 和 *trh2* 阳性对照, ATCC17802 作副溶血性弧菌种特异性基因的阳性对照。*tlh* (450 bp)^[4]、*tdh* (251 bp)、*trh* (250 bp)^[5] PCR 反应条件: 预变性 94 °C 60 s, 94 °C 60 s, 55 °C 60 s, 72 °C 60 s 扩增 35 个循环, 最后 72 °C 终延伸 7 min。*tdh* (269 bp)、*trh* (500 bp) 多重 PCR 反应条件^[4]: 预变性 94 °C 60 s, 94 °C 60 s, 58 °C 60 s, 72 °C 2 min 扩增 30 个循环, 最后 72 °C 终延伸 5 min。*toxR* (367 bp) PCR 反应条件^[6]: 94 °C 60 s, 94 °C 60 s, 63 °C 1.5 min、72 °C 1.5 min 扩增 20 个循环, 最后 72 °C 终延伸 7 min。扩增产物立即点样或 -20 °C 保存。

1.2.3 PCR 产物电泳及照相 各取 5 μl PCR 产物点样在含 EB 0.5 μg/ml 的 1.5% 琼脂糖中凝胶电泳, DNA Marker DL2000 点样 5 μl 作为分子量参考标准, 电压 100 V, 电泳 50 min。用 GEL DOC EQ 凝胶成像系统, UV 照射下成像, 获取图像。

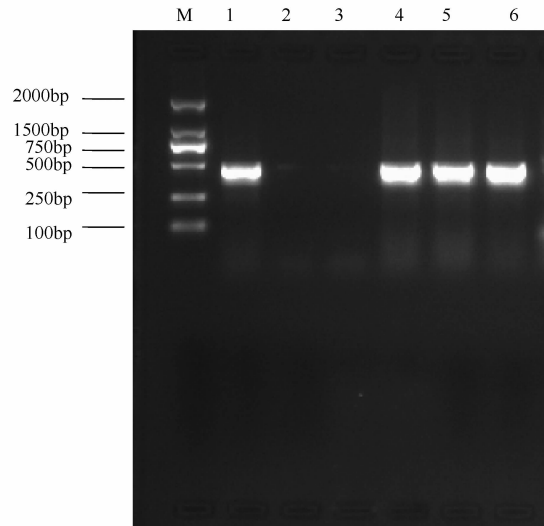
2 结果

2.1 引物扩增结果

192 株实验菌株都是从鲜冻水产品、生食水产品 and 熟食水产品中分离。采样地点包括了超市, 农贸市场和餐饮门店。样品涵盖了鱼类, 贝类和甲壳类水产品。采样地区包括了从南到北, 沿海到内陆的 18 个省、自治区和直辖市。引物扩增结果见图 1 ~ 图 4。如表 2, 4 株实验菌株 *trh* 阳性, 除 1 株来自熟食水产品, 另外 3 株均来自鲜冻水产品。而且沿海、内陆地区均分离到 *trh* 阳性菌株。阳性菌株是从超市和餐饮门店中分离的。

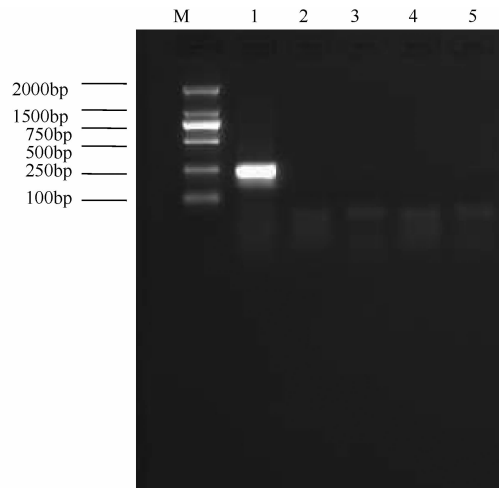
2.2 我国水产品中副溶血性弧菌基因分布特征

实验中所用的 192 株水产品分离株 *tlh* 阳性率为 100% (192/192), *tdh* 无 1 株阳性, *trh* 阳性率为



注: M 为 DNA 分子量标准, Lane1 为 ATCC17802 *tlh* 扩增片段, Lane2 为 ATCC25922 阴性对照, Lane3 为空白对照, Lane4 ~ 6 为实验菌株。

图 1 水产品中分离的副溶血性弧菌 PCR 扩增 *tlh* 基因电泳图



注: M 为 DNA 分子量标准, Lane1 为 RIMD2210633 *tdh* 扩增片段, Lane2 为 ATCC25922 阴性对照, Lane3 为空白对照, Lane4 ~ 5 为实验菌株。

图 2 水产品中分离的副溶血性弧菌 PCR 扩增 *tdh* 基因电泳图

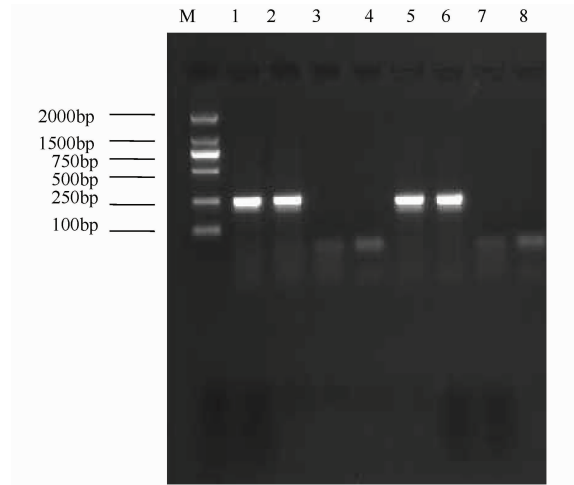
2.08% (4/192)。 *toxR* 阳性率为 100% (192/192)。阳性对照均扩增出目的条带而阴性对照未扩增出目的条带。

表 2 副溶血性弧菌 *trh* 阳性菌株信息

菌株编号	样品名称	样品分类	地区
07VP30	冻鲑鱼	鲜冻水产品	辽宁
07VP36	海蛭子	鲜冻水产品	陕西
07VP43	鲤鱼	鲜冻水产品	陕西
07VP189	南美熟对虾	熟食水产品	江苏

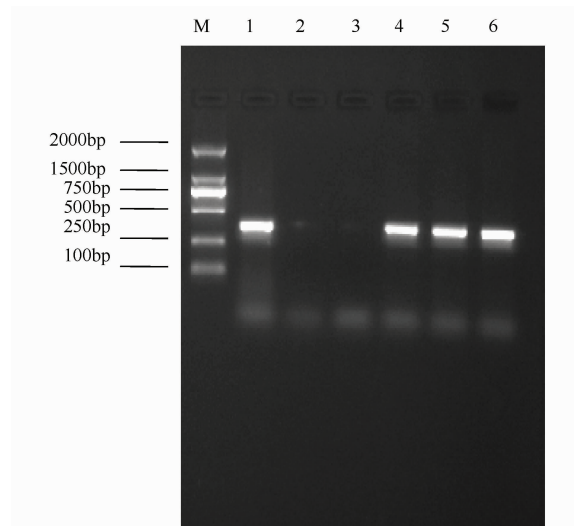
3 讨论

早期流行病学研究表明神奈川现象 (Kanagawa



注: M 为 DNA 分子量标准, Lane1 为 AQ4037 *trh1* 扩增片段, Lane2 为 AT4 *trh2* 扩增片段, Lane3 为 ATCC25922 阴性对照, Lane4 为空白对照, Lane5 ~ 8 为实验菌株。

图 3 水产品中分离的副溶血性弧菌 PCR 扩增 *trh* 基因电泳图



注: M 为 DNA 分子量标准, Lane1 为 ATCC17802 *toxR* 扩增片段, Lane2 为 ATCC25922 阴性对照, Lane3 为空白对照, Lane4 ~ 6 为实验菌株。

图 4 水产品中分离的副溶血性弧菌 PCR 扩增 *toxR* 基因电泳图

phenomenon, KP) 与肠胃炎有很强的相关性, 耐热直接溶血素 (TDH) 诱导副溶血性弧菌在我妻式血琼脂上产生 β-溶血现象, 即神奈川现象。研究发现 KP(+) 株携带 *tdh* 基因^[7], 中国和日本学者合作设计了针对 2 个拷贝的引物, 并成功扩增, 证明了 KP(+) 株通常携带 2 个染色体基因拷贝, 即 *tdh1*、*tdh2*^[8], 而 *tdh2* 对 TDH 的产生贡献更大。本研究中检测的 192 株菌株无 1 株携带 *tdh* 基因。有研究显示虽然 KP(+) 株在肠道和环境中的生存能力比 KP(-) 株强^[9], 致病性强, 但是 KP(+) 株在环境中数量要少于 KP(-) 株, 此外由于现在的培养方

法更容易检出 KP(-) 菌, 造成有毒菌株漏检率增高^[1]。临床患者由于摄食了海产品才引起腹泻, 而环境中未检测出很可能是因为现在的检测方法不适用于检出携带毒力基因的副溶血性弧菌, 造成漏检。但风险评估时不能忽略漏检和存活但不可培养 (VBNC) 状态菌株的存在。

1985 年在马尔代夫 (Maldives) 发生的一起旅游者腹泻病例中, 第一次分离出 KP(-) 的菌株, 不产 TDH, 但是产耐热直接溶血素相关溶血素 (TRH)^[10]。两种溶血素具有共同的抗原表位^[10], 已经有学者从分子水平上证实了两种溶血素的相似性, 而编码基因 *tdh*、*trh* 有 70% 的核苷酸序列相同^[11]。分子流行病学证据支持 *tdh*、*trh* 与肠胃炎的关系, 证明 *tdh*、*trh* 都是副溶血性弧菌的毒力基因^[12]。携带 *trh* 基因的副溶血性弧菌同样可以引起腹泻, 需要引起重视。本研究中发现中国海产品中 *trh* 基因的携带率为 2.08%, 高于 *tdh* 的检出率。提示海产品可能是中国副溶血性弧菌感染的潜在传染源。而且其中 1 株来自于熟食水产品, 可能存在交叉污染或加工后再污染的可能。

Kim^[6] 研究了针对副溶血性弧菌种特异性基因 *toxR* 的 PCR 方法来检测副溶血性弧菌。首先发现 *toxR* 基因能直接调节霍乱毒素操纵子表达^[13], 后来 Lin^[14] 发现副溶血性弧菌中也存在霍乱 *toxRS* 操纵子的同源序列, 在 *toxS* 存在情况下, *toxR* 能在转录水平上促进 *tdh2* 基因的表达。Crocini^[15] 比较了不同生化 and 分子方法鉴定副溶血性弧菌的效率, 发现 *toxR* 鉴定副溶血性弧菌灵敏度为 96%, 特异度为 100%, 符合率达到了 97%, 是各种方法中最可靠的。*toxR* 基因普遍存在于临床和环境中的副溶血性弧菌中, 因此可将其作为检测副溶血性弧菌的种特异性基因, 而且 PCR 扩增时间短。

不耐热溶血素 (TLH) 由 *tlh* 基因编码产生, 虽然在血平板上不会产生溶血现象, 但是所有副溶血性弧菌都能检测出 *tlh* 基因, 而同为弧菌属的霍乱、创伤等都不携带此基因^[16]。而且 *tlh* 基因 G + C 含量为 47.6%, 与副溶血性弧菌基因组 G + C 含量几乎相同^[17]。很多研究将其作为副溶血性弧菌的种特异性基因^[4]。Bej^[4] 用多重 PCR 的方法在一个 PCR 反应体系中同时检测总副溶血性弧菌 (*tlh*) 和致病性副溶血性弧菌 (*tdh*、*trh*)。本研究中采用的是针对 *tdh* (251 bp)、*trh* (500 bp) 的多重 PCR, 因为 *tlh* 扩增产物长度是 450 bp 与 *trh* 扩增产物条带易融合一起, 不易区分。溶藻弧菌标准株 ATCC17749 中扩增出 *tlh* 的目的条带, 因此应用 PCR 方法对副溶血性弧菌进行快速检测时可以考虑扩增多个种特异性

基因如 *tlh*、*toxR*、*gyrB* 和 *VPM* 等,以防止漏检和误判。

对于副溶血性弧菌的鉴定,现在大多采用传统培养分离的方法,参考 ISO 8914:1990 和美国 FDA 细菌分析手册进行,通过生化反应鉴定副溶血性弧菌。由于 API20E、API20NE 和 VITEK 生化鉴定卡准确度超过 90%,已广泛用于日常的鉴定工作。但生化鉴定会出现假阳性和假阴性的结果,因此许多学者建议结合 PCR 的结果进行鉴定。

虽然中国水产品中副溶血性弧菌检出率很高,但是用 PCR 方法检测出的毒力株很少,这与临床分离株的高检出率形成鲜明对比。本研究结果提示,食源性副溶血性弧菌高检出率与副溶血性弧菌食物中毒高发是否存在必然联系需要对食源性副溶血性弧菌分离株和临床分离株的致病性、适应性、同源性进行深入研究才能确定。另外,应完善副溶血性弧菌检测方法,增加对毒力基因的检测,通过检出率和毒力基因携带率可以得出中国海产品中有毒株的比例,为今后风险评估和监测提供基本数据。

参考文献

- [1] European Commission. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* (in raw and undercooked seafood) [R]. Brussels: EC, 2001:1-64.
- [2] FUJINO T, OKUNO Y, NAKADA D, et al. On the bacteriological examination of Shirasu food poisoning[J]. Med J Osaka Univ, 1953, 4:299-304.
- [3] THOMPSON CA, VANDERZANT C, RAY S M. Serological and hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* from marine sources[J]. J Food Sci, 1976, 41:204-205.
- [4] BEJ A K, PATTERSON D P, BRASHER C W, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh* [J]. J Microbiol Methods, 1999, 36(3): 215-225.
- [5] TADA J, OHASHI T, NISHIMURA N, et al. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction [J]. Mol Cell Probes, 1992, 6(6): 477-487.
- [6] KIM Y B, OKUDA J, MATSUMOTO C, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(4): 1173-1177.
- [7] Miyamoto Y, KATO T, OBARA Y, et al. *In vitro* hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity [J]. J Bacteriol, 1969, 100(2): 1147-1149.
- [8] NISHIBUCHI M, KAPER J B. Duplication and variation of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Mol Microbiol, 1990, 4(1): 87-99.
- [9] JOSEPH S W, COLWELL R R, KAPER J B. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios [J]. CRC Crit Rev Microbiol, 1982, 10:77-124.
- [10] HONDA T, NI Y, MIWATNI 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 [J]. Infect Immun, 1988, 56(4): 961-965.
- [11] KISHISHITA M, MATSUOKA N, KUMAGAI K, et al. Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Appl Environ Microbiol. 1992, 58(8): 2449-2457.
- [12] SHIRAI H, ITO H, HIRAYAMA T, et al. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis[J]. Infect Immun, 1990, 58(11): 3568-3573.
- [13] DIRITA V J. Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in *Vibrio cholerae*[J]. Mol Microbiol, 1992, 6:451-458.
- [14] LIN Z, KUMAGAI K, BABA K, et al. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholera* *toxRS* Operon That Mediates Environmentally Induced Regulation of the Thermostable Direct Hemolysin Gene [J]. J Bacteriol, 1993, 175(12): 3844-3855.
- [15] CROCI L, SUFFREDINI E, COZZI L, et al. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J Appl Microbiol, 2007, 102(1): 229-237.
- [16] TANIGUCHI H, OHTA H, OGAWA M, et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes [J]. J Bacteriol, 1985, 162(2): 510-515.
- [17] TANIGUCHI H, OHTA H, OGAWA M, et al. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microb Pathog, 1986, 1(5): 425-432.