

论著

北京市水产品污染与感染病例中副溶血性弧菌血清型和毒力基因型的比较研究

吴青^{1,2}, 韩海红², 余东敏², 胡豫杰², 王伟², 李志刚², 杜春明², 徐进²

(1. 中国疾病预防控制中心营养与健康所, 北京 100050;

2. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

摘要:目的 对北京市夏季市售水产品污染与感染病例中副溶血性弧菌血清型和毒力基因型进行比较研究, 为评估食品安全风险监测的目的与意义提供思路, 为北京市水产品副溶血性弧菌污染与临床感染病例的关联性研究提供技术支持。方法 对采集的水产品样品和哨点医院腹泻患者粪便样本进行副溶血性弧菌的分离鉴定, 采用血清玻片凝集法对分离出的副溶血性弧菌进行血清分型, PCR方法检测菌株的 *tlh*、*tdh*、*trh* 基因。结果 2014年7~9月共采集水产品样品164份, 检出副溶血性弧菌80份, 总污染率为48.78%; 其中淡水产品污染率为38.78% (19/49), 平均菌量浓度为66.63 MPN/g; 海水产品污染率为53.04% (61/115), 平均菌量浓度为38.14 MPN/g。80株副溶血性弧菌分属于9个血清群, 其中O2群28株, 占35.00%, O1群11株, 占13.75%, O5群10株, 占12.50%。80株菌 *tlh* 基因均为阳性, 只有1株菌携带 *tdh* 毒力基因, 所有菌株 *trh* 毒力基因均为阴性。哨点医院腹泻病人粪便样本中分离鉴定副溶血性弧菌21株, 血清型O3:K6占61.90% (13/21), O4:K8占28.57% (6/21); 毒力基因型 *tdh*(+)/*trh*(-) 占95.24% (20/21), *tdh*(-)/*trh*(-) 占4.76% (1/21)。结论 来源于食品样品的副溶血性弧菌绝大部分不具备致病性, 而导致消费者腹泻的副溶血性弧菌绝大部分携带致病性毒力基因, 表明目前的食品安全风险监测结果不能作为评估副溶血弧菌导致的食源性疾病暴发和散发的依据。

关键词: 水产品; 腹泻病例; 副溶血性弧菌; 血清型; *tlh*; *tdh*; *trh*; 毒力基因; 致病性; 风险监测; 食源性致病菌
中图分类号: R155.5; F762.6; R378.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)04-0363-05
DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.04.004

Comparative study of serotypes and virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from contaminated aquatic products and infection cases in Beijing

WU Qing, HAN Hai-hong, YU Dong-min, HU Yu-jie, WANG Wei, LI Zhi-gang, DU Chun-ming, XU Jin
(National Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective The comparative study of serotypes and virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from contaminated aquatic products and infection cases in Beijing not only provided clues for the assessment of food safety risk monitoring, but also offered technical support on the correlation research of aquatic products contaminated by *Vibrio parahaemolyticus* and clinical infections. **Methods** *Vibrio parahaemolyticus* isolates were separated from aquatic product and stool samples of patients with diarrhea. Serotypes were tested by serum agglutination. *tlh*, *tdh* and *trh* gene of the strains were detected by PCR. **Results** 164 aquatic product samples were collected from July to September. *Vibrio parahaemolyticus* was isolated from 80 aquatic product samples. Total incidence of *Vibrio parahaemolyticus* was 48.78%. The incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in sea products was 53.04%, and the incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater products was 38.78%. The average concentration in sea products was 38.14 MPN/g, and was 66.63 MPN/g in freshwater products. 80 isolates were divided into 9 O serogroups, among which O2 (35.00%), O1 (13.75%) and O5 (12.5%) were the main serotypes. All 80 isolates had *tlh* gene, only 1 isolate had *tdh* gene, and no *trh* gene was detected. From stool samples of sentinel hospital patients with diarrhea, 21 *Vibrio parahaemolyticus* strains were isolated and identified. Among 21 clinical strains, 13 strains were O3:K6 serotype, and 6 strains were O4:K8 serotype, with the ratio of 61.90% and 28.57% respectively. Virulence genotype *tdh*(+)/*trh*(-) had 20 strains, *tdh*(-)/*trh*(-)

收稿日期: 2015-05-04

作者简介: 吴青 女 硕士生 研究方向为食品卫生 E-mail: wuqing_jessie@163.com

通讯作者: 徐进 男 研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: xujin@cfsa.net.cn

had 1 strain, with the ratio of 95.24% and 4.76% respectively. **Conclusion** China's food safety risk monitoring was mainly to evaluate the occurrence of foodborne illness through monitoring in *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products. Most of the *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from aquatic product samples were not pathogenic, but all the *Vibrio parahaemolyticus* which led consumers to diarrhea carried pathogenic virulence genes, indicating that the current food safety risk monitoring results were not accurate for evaluating foodborne disease outbreaks or sporadic caused by *Vibrio parahaemolyticus*.

Key words: Aquatic product; diarrhea case; *Vibrio parahaemolyticus*; serotype; *tlh*; *tdh*; *trh*; virulence genes; pathogenicity; risk monitoring; food-borne pathogenic bacteria

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是广泛分布于近海岸海水、海产品和海底沉积物中的一种嗜盐性细菌,是引起我国沿海地区细菌性食物中毒的首要食源性致病菌,也是全国食源性疾病微生物病因的主要病原。2013年北京市食源性疾病主动监测结果表明:2013年哨点医院共采集腹泻病例样本5 617份,对沙门菌、副溶血性弧菌、志贺菌和肠致泻性大肠杆菌进行了检测,检出食源性致病菌阳性菌株954株。其中副溶血性弧菌检出372株,占38.99%;肠致泻性大肠埃希菌检出296株,占31.03%;沙门菌检出231株,占24.21%;志贺菌检出55株,占5.77%。可以预见,由副溶血性弧菌导致的食物中毒将是北京今后几年内威胁消费者健康的主要微生物性食品安全事件。本文对北京市夏季市售水产品污染副溶血性弧菌与食源性感染病例的副溶血性弧菌血清型和毒力基因型进行比较工作,为评估食品安全风险监测的目的与意义提供思路,为开展北京市市售水产品副溶血性弧菌污染与临床感染病例的关联性研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

水产品来源:以北京市丰台区新发地农产品批发市场、岳各庄农副产品批发市场和京深海鲜批发市场为采样地点。选择消费者购买频率高的水产品(海水产品为主),包括鱼、虾、蟹、贝类,分别采集53、44、30、37份。海水产品与淡水产品的采样比例为2:1,分别为115和49份。

粪便样本来源:选择北京市丰台区北京中医药大学东方医院、北京丰台医院、中国航天科工集团七三一医院3家医院作为监测哨点。以呕吐或腹泻等消化道症状为主诉就诊的门诊病例,凡24 h内腹泻大便次数 ≥ 3 次,粪便性状异常(稀便、水样便、粘液便或脓血便等)者均视为监测病例。

1.1.2 采样方法

水产品采样:选择副溶血性弧菌食源性疾病高发季节(7~9月),以每周为时间单位进行采样,每

种样品在每个采样地点采集不超过3份。

粪便样本的采样:在腹泻病高发时间段(5~10月),以周为时间单位进行采样。采集腹泻病人新鲜粪便5~10 g,置于医院专用无菌便盒中(无便时可采用肛拭子,将采便用蘸有甘油盐水的棉棒插入患者肛门内,轻轻转动,然后取出,插入带有编号的塑料试管中),样品采集后置于有冰块或冰袋的容器内带回实验室检测。

1.1.3 主要仪器与试剂

Gel Doc XR 凝胶成像系统、DNA Engine Tetrad 2 PCR仪、Sub-Cell® Model 96 Cell 电泳仪均购自美国Bio-Rad,隔水式恒温培养箱。

碱性蛋白胨水(APW)、脑心浸液琼脂(BHA)均购自北京陆桥技术有限责任公司,科马嘉弧菌显色琼脂(CV,法国科马嘉),API 20E 肠道菌试剂鉴定条及附加试剂(法国生物梅里埃),细菌基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司),肠炎弧菌检测用诊断血清O群、K型(日本生研)。

1.2 方法

1.2.1 水产品副溶血性弧菌定量检测

用流水将样品体表冲净,用75%的酒精棉球擦净体表,鱼类取鱼鳃和鱼肠,虾取腹节内肌肉,蟹取中心部分包括肉和内脏,贝类取全部内容物,无菌操作称取样品待检测部位25 g,加入含有225 ml 3% NaCl碱性蛋白胨水的匀质袋中,匀质1 min,制备成1:10的样品匀液,吸取1 ml样品匀液加入含有9 ml 3% NaCl APW的试管中制成1:100稀释液,采用倍比稀释法继续制备1:1 000或更高倍数的稀释液,每个稀释度3管。将稀释液37℃增菌培养18~24 h。选取3个适宜连续稀释度,分别划线接种于珂玛嘉弧菌显色琼脂平板,37℃培养18~24 h。挑取典型的紫红色菌落划线接种于3% NaCl脑心浸液琼脂平板,37℃过夜培养纯化。API 20E肠道菌试剂鉴定条进行生化鉴定。

1.2.2 粪便样本副溶血性弧菌检测

取粪便样本加入含有3% NaCl碱性蛋白胨水的试管中,37℃增菌培养18~24 h,用接种环取增菌液划线接种于珂玛嘉弧菌显色琼脂平板,37℃培

养 18~24 h。挑取典型的紫红色菌落划线接种于 3% NaCl 脑心浸液琼脂平板,37 °C 过夜培养纯化。API 20E 肠道菌试剂鉴定条进行生化鉴定。

1.2.3 PCR 检测 *tlh*、*tdh*、*trh* 基因

菌株 DNA 的提取使用细菌组 DNA 提取试剂盒。PCR 引物由上海英潍捷基公司合成,引物序列见表 1^[1]。PCR 反应体系 (25 μl): 2 × Taq PCR Master Mix (0.1 U/μl Taq polymerase, 500 μmol/L dNTP, 20 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.3), 100 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂) 12.5 μl, 上、下游引物各 1 μl, DNA 模板 1 μl, dd H₂O 9.5 μl。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 循环; 72 °C 延伸 7 min。取 5 μl PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电泳条件: 110 V, 50 min。

表 1 PCR 反应引物

Table 1 Primer pairs used in PCR

目的基因	引物序列	扩增产物大小/bp
<i>tlh</i>	F: 5'-AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG-3'	450
	R: 5'-GCTACTTTCTAGCATTCTCTGC-3'	
<i>tdh</i>	F: 5'-GTAAGGCTCTGACTTTTGGAC-3'	269
	R: 5'-TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC-3'	
<i>trh</i>	F: 5'-TTGGCTTCGATATTTTCACTATCT-3'	500
	R: 5'-CATAACAAACATATGCCCATTTCCG-3'	

1.2.4 血清学分型

副溶血性弧菌血清分型使用 11 种 O 抗原血清 (O1~O11 群) 和 71 种 K 抗原血清 (K1~K71 型)。先进行 O 抗原分型,取新鲜的 3% NaCl BHA 平板培养物,用含 3% NaCl、5% 甘油溶液制成菌悬液,121 °C 灭菌 1 h。4 000 r/min 离心 15 min,弃去上层液体,沉淀用生理盐水洗 3 次,每次 4 000 r/min 离心 15 min,最后一次离心后留少许上层液体,混匀制成菌悬液,进行玻片凝集。K 抗原分型,直接取新鲜的 3% NaCl BHA 平板培养物进行玻片凝集^[2]。

2 结果

2.1 水产品中副溶血性弧菌的污染情况

2014 年北京市夏季市售水产品中副溶血性弧菌污染总体情况见表 2。结果显示:164 份水产品样品中共检出副溶血性弧菌 80 份,总污染率为 48.78%,样品平均菌量浓度为 42.18 MPN/g。其中,淡水产品样品污染率为 38.78%,平均菌量浓度为 66.63 MPN/g;海水产品样品污染率为 53.04%,平均菌量浓度为 38.14 MPN/g。80 份阳性样品中,有 14 份样品的菌量浓度 >240 MPN/g。

不同种类水产品中副溶血性弧菌的污染情况见表 3。结果显示:贝类样品污染率为 59.46% (22/

表 2 2014 年北京市夏季市售水产品中副溶血性弧菌污染总体情况

Table 2 General information of aquatic product contaminated by *Vibrio parahaemolyticus* in Beijing in the summer of 2014

样品类型	样品数 /份	检出数 /份	污染率 /%	平均菌量浓度 / (MPN/g)
淡水产品	49	19	38.78	66.63
海水产品	115	61	53.04	38.14
合计	164	80	48.78	42.18

37); 虾类样品污染率为 59.09% (26/44); 蟹类样品污染率为 40.00% (12/30); 鱼类样品污染率为 37.74% (20/53)。7 月份采样污染率为 50.94% (27/53); 8 月份采样污染率为 50.00% (29/58); 9 月份采样污染率为 45.28% (24/53)。

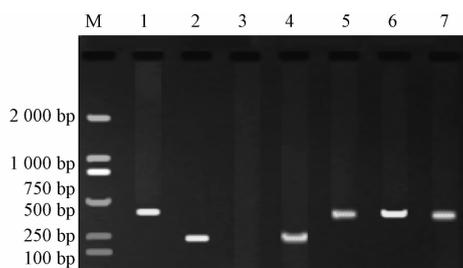
表 3 不同水产品中副溶血性弧菌的污染情况

Table 3 Contamination condition of *Vibrio parahaemolyticus* in different kinds of aquatic product

水产品种类	样品数 /份	检出数 /份	污染率 /%	平均菌量浓度 / (MPN/g)
鱼类	53	20	37.74	25.53
虾类	44	26	59.09	44.16
蟹类	30	12	40.00	55.48
贝类	37	22	59.46	54.33
合计	164	80	48.78	42.18

2.2 水产品中副溶血性弧菌毒力基因检测结果

对水产品样品中分离得到的 80 株副溶血性弧菌进行 *tlh*、*tdh*、*trh* 3 种基因的检测,检测结果显示 80 株副溶血性弧菌 *tlh* 基因全部为阳性,只有 1 株副溶血性弧菌检出 *tdh* 基因,*trh* 基因均未检出。阳性对照、阴性对照及部分菌株的 PCR 产物凝胶电泳图见图 1。



注: M 为 DL2000 Maker; 1~2 为 VP 标准菌株 *tlh*、*tdh* 基因; 3 为阴性对照; 4 为 *tdh* 基因阳性分离株; 5~7 为部分分离株的 *tlh* 基因

图 1 副溶血性弧菌 DNA PCR 产物凝胶电泳图
Figure 1 Agarose gel electrophoresis showing the results from PCR amplification of genomic DNA from *Vibrio parahaemolyticus*

2.3 水产品中副溶血性弧菌血清型分布情况

80 株副溶血性弧菌血清 O 抗原分型率较高,达 97.50% (78/80),除 2 株未分型外,其余 78 株分属于 9 个不同的 O 群,包括 O1、O2、O3、O4、O5、O6、O8、O10、O11。主要血清型集中在 O2、O1、O5 群,这

3种血清型占水产品菌株的61.25%(49/80),O2群为最主要血清型,占总数的35.00%(28/80)。水产品中副溶血性弧菌O抗原群分布情况见表4。K抗原分型率低,只有37.50%(30/80)。

表4 水产品中副溶血性弧菌O抗原群分布情况

Table 4 Distribution of O-antigen in *Vibrio parahaemolyticus* from aquatic product

O群	菌株数/株	占总数的比率/%
O2	28	35.00
O1	11	13.75
O5	10	12.50
O10	8	10.00
O11	7	8.75
O3	5	6.25
O4	5	6.25
O6	2	2.50
O8	2	2.50
未分型	2	2.50
合计	80	100.00

2.4 哨点医院监测结果

2014年7~9月哨点医院腹泻病人粪便样本中分离鉴定副溶血性弧菌21株,血清型O3:K6占61.90%(13/21),O4:K8占28.57%(6/21),有2株未分型;毒力基因型为 $tdh(+)/trh(-)$ 占95.24%(20/21), $tdh(-)/trh(-)$ 占4.76%(1/21)。

3 讨论

本次研究选择北京市丰台区新发地农产品批发市场、岳各庄农副产品批发市场中心和京深海鲜批发市场为采样地点,3大批发市场目前是北京市最大的鲜活水产品集散地,采样过程中也了解到丰台区很多的中、小市场和超市的水产品均由这3个市场供应。本次采样品种主要有鱼类(包括鲫鱼、草鱼、鲢鱼、多宝鱼等)、甲壳类(包括小龙虾、基围虾、大闸蟹、花蛤、扇贝等),均是北京市居民家庭餐桌和公共餐桌上常见的水产品种类,样品具有代表性。3个哨点医院同样位于丰台区,就诊患者多是丰台区居民选择就近就医。因此,哨点医院监测到的腹泻病例感染的副溶血性弧菌与导致水产品样品污染的副溶血性弧菌有着批发市场-零售-餐桌的食品供应链关系。

本研究证实北京市市售水产品的副溶血性弧菌血清型以O2、O1、O5群为主,O2群为最主要血清型,未分离出O3:K6型临床流行株,这与国内外其他研究结果类似^[3-5],表明市售水产品污染并非引起北京地区副溶血性弧菌中毒的主要原因。另外,本次还发现3株新菌型,血清型为O1:K33、O5:K33、O11:K34。O1、O2、O3、O4、O5这5种血清型均可引起食物中毒,其中O3、O4属暴发型,O1、O2、O5

属散发型^[6],表明北京市市售水产品仍具有很大的导致副溶血性弧菌中毒的潜在风险。

副溶血性弧菌致病性是由其产生的毒力因子决定的,即耐热直接溶血素(TDH)、耐热相关溶血素(TRH),以及不耐热溶血素(TLH),最主要的致病因素是TDH、其次是TRH^[7]。*tlh*基因具有种属特异性,本身并不具备溶血活性,其在副溶血性弧菌中是否起到致病作用目前不明确,研究发现无论是临床还是环境分离副溶血性弧菌均携带*tlh*基因^[8],因此*tlh*基因可作为副溶血性弧菌鉴定的辅助手段。副溶血性弧菌是否具有毒力,取决于是否携带有*tdh*或者*trh*基因^[9]。本研究水产品副溶血性弧菌总污染率为48.78%,但分离出的80株副溶血性弧菌中只有1株菌检出*tdh*基因,*trh*基因均未检出,表明水产品副溶血性弧菌分离株致病性较弱,这与相关文献报道的结果一致^[10]。但同期哨点医院腹泻病人粪便样本中分离的21株副溶血性弧菌毒力基因型绝大多数为 $tdh(+)/trh(-)$,占95.24%(20/21),表明腹泻患者分离株致病性较强,与水产品样品分离株毒力基因型差别较大。尽管有研究显示^[11-12],*tdh*、*trh*基因均为阴性的菌株仍能引起中毒,国内也有报道临床分离株并未携带*tdh*、*trh*基因的情形。本研究显示导致北京市消费者感染腹泻的副溶血性弧菌绝大部分携带*tdh*毒力基因,表明食品样品的监测结果未能与副溶血性弧菌感染病例建立因果关系的关联性,即水产品污染的副溶血性弧菌强弱不能说明副溶血性弧菌感染病例数量多少。

本研究通过对不同水产品中副溶血性弧菌的定量检测,结果显示北京市夏季市售水产品副溶血性弧菌总污染率为48.78%,淡水产品副溶血弧菌污染率达38.78%,尽管淡水产品中检出副溶血性弧菌时有报道^[13-14],但准确原因尚不明确,可能的原因包括:在运输过程中淡水产品和海水产品交叉污染;在销售过程中为使水产品易于存活,会在淡水中加入盐进行消毒,这也为副溶血性弧菌的生长提供了有利的环境。需要进一步对海水产品与淡水产品来源的副溶血性弧菌进行分子分型分析,通过遗传相似性和耐药性比较来阐述海水产品是否污染了淡水产品导致其副溶血弧菌污染,亦或是基于环境或者药物压力,使得副溶血弧菌也容易在淡水产品中存活。

综上所述,我国食品安全风险监测的目的主要是通过监测水产品副溶血性弧菌的污染来评估导致食源性疾病发生的可能性,2013年北京市食品安全风险监测各区疾病预防控制机构从水产品中分离到52

株副溶血性弧菌,但同期从腹泻患者粪便中分离出副溶血弧菌 372 株,本研究监测来源于水产样品的副溶血弧菌绝大部分不具备致病性,表明目前的食物安全风险监测手段尚不能准确的对副溶血性弧菌导致的食源性疾病的暴发和散发进行评估。本研究为是否重新梳理副溶血性弧菌食品安全风险监测目的与意义提供思路,为副溶血性弧菌外环境样本的监测与感染病例的关联性研究提供技术支持。

参考文献

- [1] 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]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(3): 215-225.
- [2] 陈洪友, 盛跃颖, 宋元君, 等. 上海地区副溶血性弧菌大流行菌株血清型及分子特征研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(1): 5-9.
- [3] 张蔚, 潘劲草, 孟冬梅, 等. 杭州地区 2000—2002 年副溶血弧菌的分子分型研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2006, 4(27): 343-346.
- [4] 黄锐敏, 陈辉, 袁月明. 2004—2006 年深圳南山区副溶血性弧菌菌群菌型分布及耐药分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(7): 1275-1335.
- [5] Tomoyasu T. Development of the immunomagnetic enrichment method selective for *Vibrio parahaemolyticus* serotype K and its

- application to food poisoning study [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(8): 2679-2682.
- [6] 李秀桂, 黄彦, 唐振柱, 等. 广西水产品中副溶血性弧菌主动监测及其危险性分析 [J]. *实用预防医学*, 2009, 16(4): 1136-1138.
- [7] Park K S, Iida T, Yamaichi Y, et al. Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(10): 5742-5748.
- [8] Shinoda S, Matsuoka H, Tsuchie T, et al. Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene [J]. *J Gen Microbiol*, 1991, 137(12): 2705-2711.
- [9] 陈茂义, 胡婕, 陈婷, 等. 副溶血性弧菌毒力基因研究进展 [J]. *公共卫生与预防医学*, 2013, 24(3): 65-67.
- [10] Nishibuchi M, Kaper J B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: virulence gene acquired by a marine bacterium [J]. *Infection and Immunity*, 1995, 63(6): 2093-2099.
- [11] 黄彦, 唐振柱, 王红, 等. 一起不同血清型食物中毒副溶血性弧菌毒力基因检测 [J]. *应用预防医学*, 2012, 18(4): 197-199.
- [12] 金周浩, 宋达锋, 顾青. 副溶血弧菌毒力基因的检测研究 [J]. *中国食品学报*, 2008, 8(3): 143-146.
- [13] 杨娟, 杨海玉, 周静. 泰州市淡水产品中副溶血性弧菌污染状况调查 [J]. *现代预防医学*, 2009, 36(4): 639-640.
- [14] 高璐, 唐伟, 杨振泉, 等. 江苏省淡水产品中主要弧菌菌群的 RAPD 分型 [J]. *江苏农业学报*, 2013, 29(3): 599-605.

论著

转基因 *WRII* 稻米的脂肪酸基因表达效果

叶专, 李小丽, 普永权

(海口市职业病防治所, 海南 海口 570102)

摘要:目的 分析比较 5 种 *WRII* 转基因稻米粗脂肪表达效果。方法 将椰子中的调节脂肪酸合成基因—*WRII* 基因导入粳稻品种中花 11 中, 获得再生植株 ZZWR1、ZZWR2、ZZWR3、ZZWR4 和 ZZWR5, 用索氏提取法提取转基因稻米及其对照稻米中的脂肪, 再将粗脂肪进行脂肪酸甲酯化, 并用气相色谱法-质谱联用法 (GC-MS) 对其进行定性定量测定。结果 与对照组的粗脂肪含量 2.59% 相比, ZZWR1、ZZWR2、ZZWR4 的粗脂肪含量范围为 2.62% ~ 2.77%, 其中 ZZWR4 的粗脂肪含量最高 (2.77%), $RSD = 0.96\%$, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。GC-MS 测定棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯和油酸甲酯含量, 其中油酸甲酯的含量最高。结论 椰子中的 *WRII* 基因的导入可提高稻米脂肪含量, 但不同 *WRII* 基因的插入位点可能会影响原有脂肪酸的表达, ZZWR4 植株插入基因位点比较得当, 具有良好的基因表达效果。

关键词:转基因稻米; 粗脂肪; 脂肪酸甲酯; 基因表达

中图分类号: R155; Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456(2015)04-0367-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.04.005

收稿日期: 2015-04-12

作者简介: 叶专 女 副主任检验技师 研究方向为理化检验 E-mail: yezhuan@163.com

通讯作者: 李小丽 女 实验师 研究方向为应用化学 E-mail: 763117461@qq.com