

- (2017-07-07) [2021-09-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548870/>.
- [19] 化学品数据库. 萘砒碱[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<sup>1</sup>, 李斌<sup>1,2</sup>, 李凤琴<sup>1</sup>, 杨大进<sup>1</sup>, 徐进<sup>1</sup>, 董银苹<sup>1</sup>, 王伟<sup>1</sup>, 闫琳<sup>1</sup>, 江涛<sup>1</sup>

(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  $1.5 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ 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 Yao<sup>1</sup>, LI Bin<sup>1,2</sup>, LI Fengqin<sup>1</sup>, YANG Dajin<sup>1</sup>, XU Jin<sup>1</sup>, DONG Yinping<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, YAN Lin<sup>1</sup>, JIANG Tao<sup>1</sup>

(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

PCR method to evaluate the sensitivity, accuracy and specificity of the method. **Results** The established dual fluorescence PCR method could detect both *tdh* and *trh* virulence genes at the same time, and its sensitivity was  $1.5 \times 10^{-4}$  ng/μL. The accuracy and specificity were 100%. In 2015, the carrying rates of *tdh* and *trh* genes in foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in China were 0.26% (3/1 137) and 1.67% (19/1 137) respectively, and were 0.24% (4/1 634) and 0.43% (7/1 634) in 2016 respectively. **Conclusion** In this study, a dual real-time PCR method for simultaneous detection of *tdh* and *trh* virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* was established, which could quickly and accurately screen the virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus*. The carrying rate of *tdh* and *trh* virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from food in China was low. The dual real-time PCR method can be applied to the study of the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in food, and provide scientific data for the risk assessment of dietary exposure to *Vibrio parahaemolyticus* in China.

**Key words:** Real-time polymerase chain reaction; *Vibrio parahaemolyticus*; virulence genes; detection

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)属于革兰氏阴性嗜盐性弧菌,广泛分布于海水、盐湖、沿海环境、海产品和腌制食品中,是一种重要的食源性致病菌。副溶血性弧菌可在水生动物的肠道内黏附、聚集和繁殖,引发水生动物疾病,给海水养殖业带来巨大损失,亦可引起人类胃肠炎等疾病,严重者可引发伤口感染和败血症等<sup>[1]</sup>。近年来,副溶血性弧菌引发的食源性疾病暴发事件呈明显上升趋势,高居我国微生物性食源性疾病榜首<sup>[2]</sup>。副溶血性弧菌的致病因子包括溶血素、Ⅲ型分泌系统、尿素酶和荚膜多糖等<sup>[3]</sup>,其中溶血素是最主要的致病因子,包括直接耐热溶血素(Thermostable direct hemolysin, TDH)和直接耐热溶血素相关溶血素(TDH related hemolysin, TRH)两种,分别由 *tdh* 和 *trh* 毒力基因编码,TDH 具有细胞毒性、致死毒性和肠毒性,能溶解红细胞,TRH 具有肠毒性等生物学活性<sup>[4-5]</sup>。TDH 和 TRH 两种毒素与副溶血性弧菌的致病性密切相关,是区分致病性和非致病性菌株的重要标志<sup>[3,6]</sup>。

实时荧光定量聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)以其灵敏、快速、定量、无需 DNA 电泳检测 PCR 产物等突出优点被广泛应用到致病菌检测中,本研究通过设计针对 *tdh* 和 *trh* 两种毒力基因的双重荧光 PCR 引物和探针,优化荧光 PCR 反应程序,建立同时检测副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 两种毒力基因的双重实时荧光 PCR 方法,分别采用所建荧光 PCR 和参考文献中 PCR<sup>[7]</sup>两种方法检测我国 2015 年和 2016 年分离的 2 771 株食源性副溶血性弧菌中 *tdh* 和 *trh* 两种毒力基因携带率,为我国居民膳食暴露副溶血性弧菌的健康影响风险评估工作提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

弧菌属标准菌株 11 株,大肠埃希氏菌标准菌株

1 株,菌株信息详见表 1。经全基因组测序分析鉴定为 *tdh* 和 *trh* 基因双阳性的副溶血性弧菌分离株 1 株(编号为 VP177)。副溶血性弧菌分离株 2 771 株,其中 2015 年分离株 1 137 株,2016 年分离株 1 634 株,菌株源自国家食品污染和有害因素风险监测网采集的食品样品,采样地区覆盖全国 29 个省、自治区和直辖市,菌株信息见表 2。

表 1 副溶血性弧菌双重荧光 PCR 检测方法的建立所需标准菌株信息表

Table 1 Information of standard strains required for the establishment of dual real-time PCR detection method for

#### *Vibrio parahaemolyticus*

菌种名称	中文名称	菌株编号	菌株数量/株
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	副溶血性弧菌	CICC 21528	1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	副溶血性弧菌	CICC 21617	1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	副溶血性弧菌	ATCC 17802	1
<i>Vibrio alginolysis</i>	溶藻弧菌	CICC 10484	1
<i>Vibrio alginolysis</i>	溶藻弧菌	CICC 10889	1
<i>Vibrio vulnificus</i>	创伤弧菌	CICC 10383	1
<i>Vibrio vulnificus</i>	创伤弧菌	CICC 21615	1
<i>Vibrio cholerae</i>	霍乱弧菌	CICC 23794	1
<i>Vibrio cholerae</i>	霍乱弧菌	CICC 23795	1
<i>Vibrio fluvialis</i>	河流弧菌	CICC 21612	1
<i>Vibrio mimicus</i>	拟态弧菌	CICC 10474	1
<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希氏菌	ATCC 25922	1

表 2 2 771 株食源性副溶血性弧菌分离株信息表

Table 2 Information of 2 771 *Vibrio parahaemolyticus* isolated from food

食品来源	2015 年菌株数/株	2016 年菌株数/株
甲壳类	330	387
鱼类	449	688
软体动物类	267	401
预制水产品类	33	102
其他水产品类	58	56
合计	1 137	1 634

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

生物安全柜(新加坡 Esco),高压蒸汽灭菌器(日本 Sanyo),纯水仪(美国 Millipore),隔水式恒温

培养箱(德国 MMM),涡旋混匀仪(德国 IKA),恒温金属浴装置(杭州佑宁),台式高速离心机(德国 Sartorius),荧光定量仪(美国 Thermofisher qubit 4.0),基因扩增仪及荧光定量 PCR 仪(美国 Bio Rad),毛细管电泳仪、毛细管电泳卡夹及缓冲液(德国 Qiagen),细菌全自动生化分析仪、细菌浊度计、革兰氏阴性细菌鉴定卡(法国 Bio Mérieux, Vitek 2),弧菌显色培养基(法国 CHROMagar),胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptic Soy Agar, TSA, 美国 BD)。细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根),荧光定量 PCR 试剂 Probe master mix(北京天根),PCR 试剂 2×PCR Master Mix(北京全式金),氯化钠等化学试剂均为分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌株纯化

使用 10 μL 一次性无菌接种环,将 11 株弧菌属标准菌株和 2 771 株副溶血性弧菌分离株分别接种在弧菌显色平板上,37 °C 培养 24 h。依据弧菌显色培养基说明书,挑取疑似目标菌株单个菌落,再次划线接种于含 3% NaCl 的 TSA 平板培养 24 h。挑取新鲜菌落至 3 mL 无菌生理盐水中充分混匀,比浊至 0.5 麦氏浊度后,使用全自动生化鉴定系统进行菌种生化鉴定,确定其为副溶血性弧菌。

### 1.2.2 细菌基因组 DNA 提取

采用商品化细菌基因组 DNA 提取试剂盒,依据试剂盒说明书,提取 11 株弧菌属标准菌株和 1 株 *tdh*/*trh* 基因双阳性的副溶血性弧菌参考菌株基因组 DNA。使用荧光定量仪分别测定提取的 DNA 浓度后,保存于-20 °C 备用。

采用水煮裂解法提取副溶血性弧菌分离株基因组 DNA:用无菌棉拭子挑取适量新鲜菌落,均匀悬浮于 1 mL 无菌超纯水中,制成浓度为 1.0 麦氏浊度的菌悬液,置于金属浴中 100 °C 加热 10 min 后,于冰浴中迅速冷却,9 000 g 离心 2 min,取上清液移至 1.5 mL 无菌离心管中作为分子实验的 DNA 模板,保存于-20 °C 备用。

### 1.2.3 PCR 方法灵敏度检测

依据副溶血性弧菌 PCR 检测经典引用文献的引物序列<sup>[7]</sup>,由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成 *tdh* 和 *trh* 基因引物。使用超纯水将 *tdh* 和 *trh* 基因双阳性的副溶血性弧菌参考菌株 DNA 做 10 倍梯度稀释,依次稀释 8 个梯度后,分别取 DNA 原液和 8 个梯度的稀释液,按照文献所列 PCR 反应条件进行扩增,随后将 PCR 扩增产物用毛细管电泳仪进行电泳检测。

## 1.2.4 荧光定量 PCR 方法建立

### 1.2.4.1 引物设计

根据 *tdh* 和 *trh* 基因保守区序列,分别设计引物和探针,序列见表 3。其中 *tdh* 探针 5'端标记 FAM 荧光基团,3'端标记 BHQ1 淬灭基团;*trh* 探针 5'端标记 HEX 荧光基团,3'端标记-BHQ1 淬灭基团。引物和探针均由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

### 1.2.4.2 反应体系

单个荧光 PCR 反应体系为 25.00 μL,组分包括:Probe master mix 12.50 μL;上、下游引物各 0.80 μL;探针 0.50 μL;去除 DNA 酶和 RNA 酶的不菌水 5.40 μL;DNA 模板 5.00 μL。反应条件为:95 °C,15 min;95 °C 15 s,60 °C 20 s,72 °C 30 s,40 个循环。

### 1.2.4.3 判定标准

当 Ct 值小于 35 时,判定副溶血性弧菌毒力基因 *tdh* 或 *trh* 为阳性。当 Ct 值大于或等于 40 时,判定该基因为阴性。当 Ct 值大于或等于 35 且小于 40 时,需要重复检测,重复检测结果 Ct 值仍然在 35 至 40 之间,判定该基因为弱阳性。

### 1.2.4.4 设置对照

本实验室保藏的 1 株经全基因组测序分析鉴定为 *tdh* 和 *trh* 双阳性的副溶血性弧菌分离株基因组 DNA 为 PCR 反应的阳性对照,大肠埃希氏菌 ATCC 25922 的基因组 DNA 为阴性对照,去除 RNA 酶和 DNA 酶的水为空白对照。

表 3 副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 三种毒力基因检测的引物和探针序列

Table 3 Primers and probes of <i>tdh</i> and <i>trh</i> of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> using in real-time PCR method		
基因	引物和探针	序列(5'-3')
<i>tdh</i>	上游引物	TCACAACGTCAGGTAATAATGG
	下游引物	AGCAGAATGACCGTGCTTATAG
	<i>tdh</i> 探针	FAM-ACTATACAATGGCAGCGGTGCTGG-BHQ1
<i>trh</i>	上游引物	GGGTCGGTGAACTGTTATT
	下游引物	AACCGATTGACCGTATACATCTT
	<i>trh</i> 探针	HEX-CCCAGTTAAGGCAATTGTGGAGGA-BHQ1

注:\*所有引物和探针均使用超纯水配置成 10 μmol/L 浓度的工作液后使用

### 1.2.4.5 特异性及灵敏度检测

按照上述 1.2.4 步骤的反应体系和反应条件,使用 1.2.2 步骤制作的 11 株弧菌属标准菌株的 DNA 作为荧光 PCR 反应的模板,分别进行荧光 PCR 检测,确定荧光 PCR 检测的特异性。使用 1.2.3 步骤制作的 *tdh* 和 *trh* 基因双阳性副溶血性弧菌参考菌株 DNA 的 10 倍梯度稀释液作为荧光 PCR

反应的模板,分别进行荧光 PCR 检测,确定荧光 PCR 检测的灵敏度和检出限。

### 1.3 数据处理与方法评价

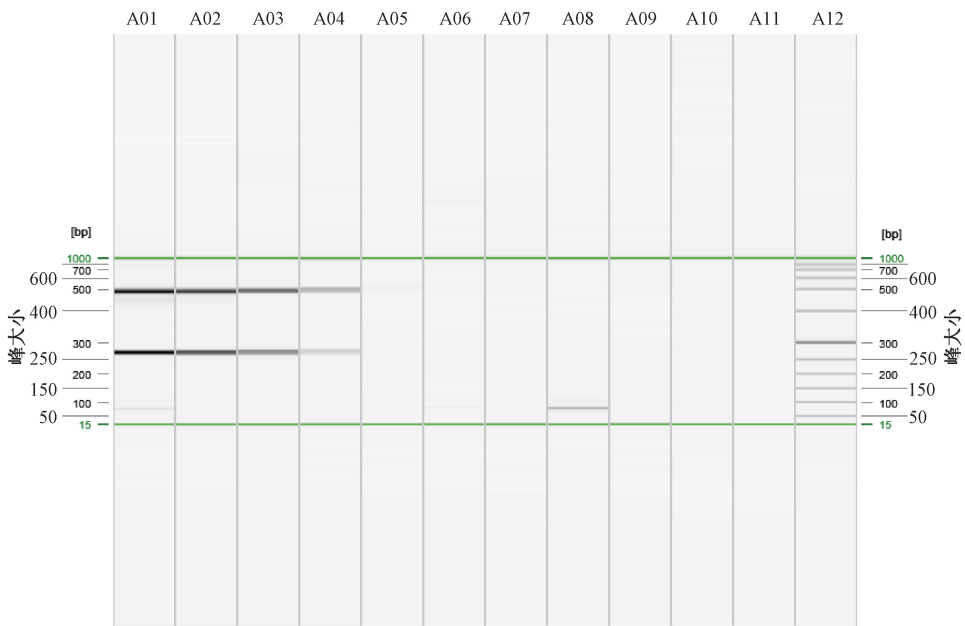
依据副溶血性弧菌 PCR 检测经典引用文献,用 PCR 方法检测 2 771 株副溶血性弧菌分离株中 *tdh* 和 *trh* 毒力基因携带率,使用毛细管电泳法检测目的基因扩增产物。应用本实验建立的双重荧光 PCR 方法,同时进行 *tdh* 和 *trh* 基因检测。将两种方法检测结果进行比对,评价本研究建立的双重荧光 PCR 方法与 PCR 方法对副溶血性弧菌毒力基因检测结果的一致性。

## 2 结果

### 2.1 PCR 灵敏度检测

经 Qubit 荧光定量仪测定,使用商品化细菌基因组提取试剂盒提取的 *tdh* 和 *trh* 基因双阳性副溶血性弧菌参考菌株 DNA 浓度为 15 ng/μL,使用超

纯水对其进行 10 倍梯度稀释后,DNA 浓度依次为:1.5、 $1.5 \times 10^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^{-2}$ 、 $1.5 \times 10^{-3}$ 、 $1.5 \times 10^{-4}$ 、 $1.5 \times 10^{-5}$ 、 $1.5 \times 10^{-6}$ 、 $1.5 \times 10^{-7}$  ng/μL,按照 PCR 方法进行扩增后,使用高分辨率的毛细管电泳卡夹进行电泳检测,电泳图谱显示:DNA 大小的分子标记泳道图谱清晰(A12 泳道);当 DNA 浓度为 15、1.5、 $1.5 \times 10^{-1}$  ng/μL 时,目的基因 PCR 扩增条带清晰可见(A01-03 泳道);DNA 浓度为  $1.5 \times 10^{-2}$  ng/μL 时,目的基因扩增条带虽可识别但信号较弱(A04 泳道);DNA 浓度为  $1.5 \times 10^{-3}$  ng/μL 时(A05 泳道),目的基因 *trh* 的片段大小为 500 bp,条带极弱,肉眼几乎不可识别,目的基因 *tdh* 的片段大小为 269 bp 肉眼已无法识别;DNA 浓度低于  $1.5 \times 10^{-3}$  ng/μL 时,未检测到目的基因 PCR 扩增条带(A06-09 泳道)。该反应体系中阴性对照和空白对照均无目的基因条带,PCR 检测体系正常(A10、A11 泳道)。详见图 1。



注: A01~A09 泳道 PCR 的副溶血性弧菌 DNA 模板浓度依次为:15、1.5、 $1.5 \times 10^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^{-2}$ 、 $1.5 \times 10^{-3}$ 、 $1.5 \times 10^{-4}$ 、 $1.5 \times 10^{-5}$ 、 $1.5 \times 10^{-6}$ 、 $1.5 \times 10^{-7}$  ng/μL, A10 泳道 PCR 的 DNA 模板为 ATCC25922, A11 泳道为空白对照, A12 泳道为 Size Marker.

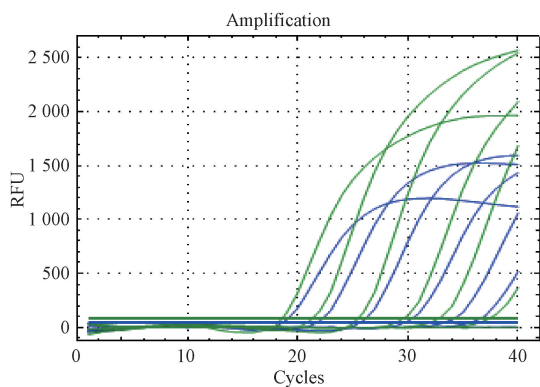
图 1 副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 基因 PCR 产物的电泳图

Figure 1 The electrophoretogram of *tdh* and *trh* PCR amplification of *Vibrio parahaemolyticus*

### 2.2 荧光 PCR 方法的特异性和灵敏性实验

使用本研究建立的荧光 PCR 方法,将除副溶血性弧菌之外的常见弧菌标准菌株 DNA 分别进行扩增,均未检测到荧光信号。在对副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 基因同时进行检测时,无交叉反应出现(绿色和蓝色曲线分别为副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 基因的扩增曲线),即本研究建立的荧光 PCR 方法对副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 毒力基因检测时特异性良好。该荧光 PCR 方法对副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 基因进行检测时,DNA 模板浓度越高,其扩

增曲线的 Ct 值越小,当 DNA 模板浓度为 1.5 ng/μL 时,*tdh* 和 *trh* 基因的 Ct 值小于 20(图 2 从左往右,首次出现的绿色和蓝色扩增曲线),随着 DNA 模板浓度的 10 倍梯度稀释,其 Ct 值逐渐增大,直到 DNA 模板浓度为  $1.5 \times 10^{-4}$  ng/μL 时,*tdh* 和 *trh* 两个基因 Ct 值仍小于 35,PCR 荧光信号强度高,而 DNA 模板浓度稀释至  $1.5 \times 10^{-5}$  ng/μL 时,其 Ct 值为 37,因此,双重荧光 PCR 方法检测副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 基因的灵敏度为  $1.5 \times 10^{-4}$  ng/μL (图 2)。



注:绿色和蓝色分别为副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 基因的扩增曲线;副溶血性弧菌荧光 PCR 扩增曲线从左往右,对应 DNA 模板浓度依次为:1.5、 $1.5 \times 10^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^{-2}$ 、 $1.5 \times 10^{-3}$ 、 $1.5 \times 10^{-4}$ 、 $1.5 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L  
图2 副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 毒力基因荧光 PCR 扩增曲线

Figure 2 Fluorescence PCR amplification curve of *tdh* and *trh* virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus*

### 2.3 方法评价与应用

使用 PCR 方法和荧光定量 PCR 方法,对我国 2015—2016 年 29 个省份分离的 2 771 株副溶血性弧菌基因组 DNA 分别进行检测,双重荧光 PCR 检测结果:2015 年从我国食品中分离的 1 137 株副溶血性弧菌中,3 株检出携带 *tdh* 基因,19 株检出携带 *trh* 基因,其中 2 株同时携带 *tdh* 和 *trh* 基因。2016 年从我国食品中分离的 1 634 株中,4 株检出携带 *tdh* 基因,有 7 株检出携带 *trh* 基因。PCR 检测结果与荧光 PCR 检测结果高度一致。

结合两种 PCR 方法分别对 2 771 株副溶血性弧菌分离株 *tdh* 和 *trh* 毒力基因的检测结果,对两种 PCR 方法分别进行评价,本研究建立的双重荧光定量 PCR 方法具有检测时间短、灵敏度显著提高为  $1.5 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L 等优势,评价指标详见表 4。

表 4 PCR 与荧光定量 PCR 检测副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 毒力基因方法评价与应用

Table 4 Evaluation and application of PCR and real-time PCR in detecting *tdh* and *trh* virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus*

评价指标	评价方法	
	PCR	荧光定量 PCR
检测时长	约 2.5 h	约 1.5 h
便捷性	需要电泳	无需电泳
特异性	无交叉反应	无交叉反应
一致性	一致	一致
是否定量检测	否	是
检测 <i>tdh</i> 基因灵敏度	$1.5 \times 10^{-2}$ ng/ $\mu$ L	$1.5 \times 10^{-4}$ ng/ $\mu$ L
检测 <i>trh</i> 基因灵敏度	$1.5 \times 10^{-2}$ ng/ $\mu$ L	$1.5 \times 10^{-4}$ ng/ $\mu$ L
2015 年菌株 <i>tdh</i> 检测	0.26% (3/1137)	0.26% (3/1137)
2015 年菌株 <i>trh</i> 检测	1.67% (19/1137)	1.67% (19/1137)
2016 年菌株 <i>tdh</i> 检测	0.24% (4/1634)	0.24% (4/1634)
2016 年菌株 <i>trh</i> 检测	0.43% (7/1634)	0.43% (7/1634)

### 3 讨论

实时荧光定量 PCR 方法具有特异性好、灵敏度高、省时高效、数据定量的优点,从经济、时间、人工、精准度等方面均适合大批量样本的科学研究。虽有前人建立了副溶血性弧菌毒力基因的 PCR 检测方法,但其灵敏度有待进一步提高,如: MUHAMMAD 等<sup>[8]</sup>对 *groEL*、*tdh* 和 *trh* 建立三重 PCR 方法检测副溶血性弧菌致病因子,检出限为 200 pg DNA;张捷等<sup>[9]</sup>对副溶血性弧菌毒力基因 *tdh*、*trh* 进行检测的检测限为 10 pg/反应,但需逐个基因进行检测;林佳琪等<sup>[10]</sup>建立的四重 PCR 同时检测副溶血性弧菌 *toxR*、*tdh*、*trh* 和 *tlh* 四种基因,其检测限为 50  $\mu$ g/L DNA;HE 等<sup>[11]</sup>针对 *toxR*、*tdh*、*trh* 基因建立的副溶血性弧菌三重荧光定量 PCR 方法检出限为 1.4 pg/反应。本研究针对 *tdh*、*trh* 靶基因序列设计了高特异性和高灵敏度的引物及探针,建立的双重荧光定量 PCR 方法对 *tdh*、*trh* 基因检测的灵敏度均为  $1.5 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L,优于之前同类荧光 PCR 研究方法 1 个数量级,大幅提高了对致病性副溶血性弧菌的检出限。利用双重荧光 PCR 检测 *tdh* 和 *trh* 毒力基因具有定量分析的特点,可对食源性疾病患者的致病剂量和致病菌毒力基因的携带水平进行定量研究,为副溶血性弧菌的定量风险评估提供技术与数据支撑。

近年来,副溶血性弧菌引发的食源性疾病暴发事件呈上升趋势,水产品中副溶血性弧菌的检出率较高。分子流行病学研究表明,*tdh*、*trh* 毒力基因阳性的菌株与人类食源性疾病暴发密切相关,致病性副溶血性弧菌通常携 *tdh* 和 *trh* 毒力基因的 1 种或 2 种<sup>[12-13]</sup>。本研究同时采用实时荧光定量 PCR 和普通 PCR 方法,对我国 2 771 株副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 基因进行检测,结果发现 *tdh* 和 *trh* 基因的阳性率分别为 0.25% 和 0.94%。本研究所用 2 771 株食源性副溶血性弧菌分离株的样品种类齐全,采样地区广泛,监测周期完善,全面反映出我国食源性副溶血性弧菌毒力基因携带情况。两种 PCR 检测结果高度吻合,与国内外文献报道中食品来源的副溶血性弧菌毒力基因携带率基本一致<sup>[14-17]</sup>,但远低于临床来源菌株中 *tdh* 及 *trh* 毒力基因的高携带率<sup>[16-19]</sup>,推测其原因可能为增菌培养过程中部分菌株的毒力基因发生移位或丢失,亦有可能存在部分活而不可培养状态的致病性菌株,使得传统培养过程中致病性菌株检出率降低等,进一步研究中可利用荧光定量 PCR 方法快速筛查产生 *tdh* 和 *trh* 两种重要毒素的致病性副溶血性弧菌,对比分析食品样

品培养前后毒力基因 *tdh* 及 *trh* 携带率的差异,有助于副溶血性弧菌引发食源性疾病的临床快速诊断,比单纯检出副溶血性弧菌具有更重要的应用价值。

## 参考文献

- [1] SU Y C, LIU C C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety[J]. Food Microbiology, 2007, 24 (6): 549-558.
- [2] 刘秀梅,陈艳,樊永祥,等. 2003年中国食源性疾病暴发的监测资料分析[J]. 卫生研究, 2006, 35(2): 201-204.
- [3] THEETHAKAEW C, FEIL E J, CASTILLO-RAMÍREZ S, et al. Genetic relationships of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical, human carrier, and environmental sources in Thailand, determined by multilocus sequence analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79 (7): 2358-2370.
- [4] CECCARELLI D, HASAN N A, HUQ A, et al. Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2013, 3: 97.
- [5] HONDA T, HIDA T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins[J]. Reviews in Medical Microbiology, 1993, 4 (2): 106-113.
- [6] 陈洪友,陈敏,盛跃颖,等. 副溶血性弧菌食源性疾病暴发分离株的血清型、核糖型及毒力基因研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(2): 114-118.
- [7] 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.
- [8] HOSSAIN M T, KIM Y O, KONG I S. Multiplex PCR for the detection and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* strains using the *groEL*, *tdh* and *trh* genes[J]. Molecular and Cellular Probes, 2013, 27 (5-6): 171-175.
- [9] 张捷,李兆杰,王煜,等. 基于分子马达生物传感器技术的副溶血性弧菌分子分型方法的初步研究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1279-1289
- [10] 林佳琪,苏国成,黄建炜,等. 四重 PCR 检测副溶血性弧菌及其毒力基因方法的建立[J]. 微生物学通报, 2016, 43 (11): 2521-2529.
- [11] HE P Y, CHEN Z W, LUO J Y, et al. Multiplex real-time PCR assay for detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains [J]. Molecular and Cellular Probes, 2014, 28 (5-6): 246-250.
- [12] GUTIERREZ WEST C K, KLEIN S L, LOVELL C R. High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79 (7): 2247-2252.
- [13] NISHIBUCHI M, KAPER J B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: A virulence gene acquired by a marine bacterium[J]. Infection and Immunity, 1995, 63 (6): 2093-2099.
- [14] 李薇薇,王晓英,郭云昌. 中国部分水产品副溶血性弧菌毒力基因的分布特征[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3): 239-243.
- [15] Vuddhakul V, Soboon S, Sunghiran W, et al. Distribution of virulent and pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* in three molluscan shellfish species (*Meretrix meretrix*, *Perna viridis*, and *Anadara granosa*) and their association with foodborne disease in southern Thailand [J]. Journal of Food Protection, 2006, 69 (11): 2615-2620.
- [16] Bhoopong P, Palittapongarnpim P, Pomwised R, et al. Variability of properties of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from individual patients [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45 (5): 1544-1550.
- [17] 马聪,朱海明,严纪文,等. 不同来源的副溶血性弧菌定性定量分析及毒素基因检测[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21 (5): 402-405.
- [18] 吴青,韩海红,余东敏,等. 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[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(4): 363-367.
- [19] CHEN Y, CHEN X, YU F, et al. Serology, virulence, antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains circulating in southeastern China from 2009 to 2013 [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2016, 22 (3): 258. e9-258. e16.