乙醇促进副溶血性弧菌直接耐热溶血素的基因表达

吴葵[1,2,3]，吴清平[2]，张菊梅[2]，乐贤松[1,2,3]

（1.中国科学院南海海洋研究所，广东广州 510301）（2.广东省微生物研究所，省部共建华南应用微生物国家重点实验室，广东省菌种保藏与应用重点实验室，广东广州 510070）（3.中国科学院大学，北京 100049）

摘要：研究乙醇对副溶血性弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）直接耐热溶血素(thermostable direct hemolysin，TDH)产生和它的编码基因 *tdh* 表达的影响。以 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、8.0%乙醇处理 2 株带有 *tdh* 副溶血性弧菌 ATCC33847 和 SZ32，研究对副溶血性弧菌有氧或者无氧生长的影响。选取 1.0%乙醇处理来研究 TDH 产量和 *tdh* 表达变化。使用 TDH 抗血清试剂盒测定副溶血性弧菌培养液上清中 TDH 水平；使用荧光定量 PCR 方法分析 *tdh* 基因表达状况。低浓度（0.5%、1.0%、2.0%）乙醇存在时，副溶血弧菌菌株的生长未受到显著影响，乙醇浓度 4.0%时副溶血性弧菌生长受到明显抑制，8%时未见有细菌生长。1.0%乙醇处理副溶血性弧菌培养液上清中 TDH 水平较未处理显著上升。胞内 *tdh* 表达水平升高，ATCC33847 在有氧和无氧时分别升高到 6.6 倍和 5.7 倍，SZ32 在有氧和无氧时分别升高到 5.9 倍和 8.6 倍。乙醇能够促进 *tdh* 基因表达从而使得 TDH 蛋白产量升高。本研究还比较了甲醇、乙醇、正丙醇对 *tdh* 表达的影响，发现它们对 *tdh* 表达均具有促进作用但相互之间没有明显差异。

关键词：乙醇；副溶血性弧菌；直接耐热溶血素

文章篇号：1673-9078(2015)5-43-48 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.008

Ethanol Treatment Enhances Expression of Thermostable Direct Hemolysin Gene by *Vibrio parahaemolyticus*

WU Kui[1,2,3], WU Qing-ping[2], ZHANG Ju-mei[2], LE Xian-song[1,2,3]

(1.South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 501301, China)

(2.Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China)

(3.University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The effect of ethanol on thermostable direct hemolysin (TDH) production and corresponding *tdh* gene expression by *Vibrio parahaemolyticus* was studied. Two *tdh*-positive *V. parahaemolyticus* strains, ATCC33847 and SZ32 were separately treated with 0.5%, 1.0%, 2.0%, 4.0%, and 8.0% ethanol solutions. The effects on aerobic or anaerobic growth of *V. parahaemolyticus* were monitored, while changes in TDH production and *tdh* gene expression were studied with 1.0% ethanol treatment. TDH concentration in *V. parahaemolyticus* culture supernatant was quantitatively analyzed using a TDH detection kit (KAP-RPLA, Denka Seiken Co., Japan), while *tdh* gene expression was analyzed by real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction. The results showed that *V. parahaemolyticus* growth was not influenced by the presence of ethanol at low concentrations (0.5%, 1.0%, and 2.0%). On the other hand, 4.0% and 8.0% ethanol caused significant and total inhibition of bacterial growth, respectively. With ethanol treatment, TDH titers of culture supernatants showed a significant increase under aerobic as well as anaerobic conditions and intracellular *tdh* expression was also elevated. Moreover, ATCC33847 strain showed an increase in *tdh* expression by 6.6- and 5.7-fold, while SZ32 strain showed an increase by 5.9- and 8.6-fold under aerobic and anaerobic conditions, respectively. Thus, ethanol treatment enhanced *tdh* gene expression, which may have resulted in an increase in TDH production. The effects of methanol, ethanol, and n-propanol on *tdh* gene expression were also compared and the results showed increased *tdh* gene expression by all three alcohols, however, the effects were not significantly different.

Key words: ethanol; *Vibrio parahaemolyticus*; thermostable direct hemolysin

收稿日期：2014-05-21

基金项目：广东省自然科学基金研究团队项目（S2012030006235）；广州市科技计划项目（201300000074）

作者简介：吴葵（1985-）男，博士研究生，主要从事副溶血性弧菌相关食品安全研究

通讯作者：吴清平（1962-），男，博士，研究员，主要从事微生物安全检测与控制研究

副溶血性弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）是一种中度嗜盐菌，广泛存在于各类水产食品的生产环境中，导致水产食品的污染。食用副溶血性弧菌污染的水产食品可致急性胃肠炎等食物中毒症状发生[1~2]。大多数副溶血性弧菌临床分离株带有 *tdh* 基因，而环境分离株极少检出为 *tdh* 阳性[3]。*tdh* 基因负责编码一种称为直接耐热溶血素（thermostable direct hemolysin，TDH）的毒力蛋白，使得带有 *tdh* 基因的副溶血性弧菌在“我妻氏血平板”（Wagatsuma agar）上生长时在菌落周围形成一个 β-溶血环，这个溶血现象也被称为 “神奈川现象”（Kanagawa phenomenon）[4]。TDH 被认为是副溶血性弧菌最为关键的毒力因子[5]，它是一种具有肠毒性和细胞毒性的穿孔素蛋白[6]，对热耐受，可使人的红细胞发生溶血。

由于TDH在副溶血性弧菌致病能力上发挥关键作用，人们研究了副溶血性弧菌细胞内外各种因素对TDH产生以及*tdh*基因表达的影响。在20世纪70年代，日本学者发现副溶血性弧菌的神奈川溶血现象与培养基中的各种组分有关[4]，甘露醇以及高浓度NaCl的出现能够促进TDH的产生和神奈川溶血。有学者研究了胆酸对TDH产生的影响[7]，结果表明胆酸能够促进TDH的产生。还有学者研究发现，副溶血性弧菌的转录调控因子Hfq抑制*tdh*基因的表达[8]。本文作者在研究副溶血性群体感应系统对*tdh*基因表达的调控作用时，发现作为酰基高丝氨酸内酯信号分子溶剂的甲醇对*tdh*表达具有促进作用。甲醇和乙醇均为常见的有机溶剂，而乙醇还与食品饮料息息相关，因而本文专门开展了乙醇对副溶血性弧菌直接耐热溶血素产生和基因表达的影响研究。通过分析分别在有氧和无氧条件下乙醇对副溶血性弧菌生长、*tdh*基因表达、TDH蛋白产量的影响，我们首次证实乙醇的存在促进了*tdh*基因的表达。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

表 1 本实验中使用的副溶血性弧菌菌株

Table 1 *Vibrio parahaemolyticus* strains used in this study

菌株	血清型	分离样本	分离地点	*tdh*
ATCC33847	O4:K11	粪便	马里兰州	+
SZ32	O3:K6	肛拭	深圳	+

表 1 为本实验所用副溶血性弧菌菌株。ATCC33847 购自美国典型菌物保藏委员会，为美国科研人员于马里兰州食物中毒病人腹泻样本中分离。SZ32 分离自深圳食物中毒病人的肛拭样本。两株副溶血性弧菌 O 抗原血清型通过 PCR 方法鉴定[9]，K 抗原血清型通过传统抗血清凝聚实验鉴定。两株副溶血性弧菌使用前均使用 PCR 方法鉴定为 *tdh* 阳性[10]。菌株以 15%甘油管-30 ℃保存。本实验所用培养基为缓冲蛋白胨水（Buffered Peptone Water，BPW，广东环凯），如无特别说明，培养基中氯化钠浓度调成 3%。

1.2 副溶血性弧菌生长曲线测定

向新鲜 BPW 培养基中无菌加入不同体积无水乙醇，使得乙醇终浓度分别为 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、8.0%，备用。将 ATCC33847 和 SZ32 复壮过夜。离心收集菌体。以新鲜无菌 BPW 培养基洗涤菌体两次，之后以不同浓度乙醇的 BPW 重悬菌体，调节菌悬液密度（以 600 nm 吸光值表示，OD_{600nm}）为 0.01。以 Bioscreen C 全自动生长曲线测定仪记录菌体有氧生长状况，向生长曲线测定板的每个孔中各加入 400 μL 不同浓度乙醇的菌悬液，37 ℃培养 24 h，每隔 2 h 记录 1 次 OD_{600nm}。无氧培养时，取 50 mL 菌悬液加入三角瓶中，置于厌氧手套箱 37 ℃培养，在 6 h、12 h、18 h、24 h 时取出，测定 OD_{600nm}。根据有氧和无氧条件下各时刻 OD_{600nm}，绘制生长曲线。每个条件下至少保证 3 个平行试验。

1.3 副溶血性弧菌胞外 TDH 产量测定

测定副溶血性弧菌 TDH 产量和 *tdh* 基因表达时，我们选取 1.0%乙醇作为处理条件，研究乙醇的影响。以乙醇处理培养物为对照，取含有 1.0%浓度乙醇 OD_{600} 为 0.01 的各菌悬液 50 mL，有氧或者无氧培养。有氧培养 5 h、无氧培养 12 h 后，分别取适当体积菌液离心，上清液用于测定副溶血性弧菌胞外 TDH 水平，菌体沉淀用于提取总 RNA 进行基因表达分析。参照日本学者的方法[7]，采用日本 Denka Seiken 一种针对副溶血性弧菌 TDH 的免疫血清试剂盒 KAP-RPLA 对上清液中的 TDH 进行定量分析[8]。具体操作简述如下：取一 V 型底的 96 孔板，将两种培养物上清液分别以试剂盒中的稀释剂进行 2 倍梯度稀释，每孔中液体体积为 25 μL，接着向梯度稀释的上清液加入 25 μL 含有抗 TDH 的免疫磁珠反应试剂。轻柔震荡混匀后，将 96 孔板置于室温下孵育 24 h 取出观察。出现磁珠扩散圈的反应孔判定为阳性，如果反应孔中的磁珠全部聚集在底部，则判定为阴性结果。把出现阳性结果的最高稀释度认定为上清液中的 TDH 效价，以 KAP-RPLA 滴度表示。

1.4 副溶血性弧菌总 RNA 提取

如前所述，将经过和未经过 1.0%乙醇处理的菌体

用于总 RNA 提取。总 RNA 采用天根公司 RNAprep pure Cell/Bacteria Kits 提取，过程参照说明书进行。提取过程中加入了 DNA 酶消化残留的基因组 DNA，故抽提的总 RNA 样本可以直接用于荧光定量分析。

1.5 荧光定量 PCR（Quantitative real-time PCR）

为了分析酒精处理对 *tdh* 基因表达水平的影响，我们对提取的总 RNA 进行了荧光定量 PCR 相对定量分析。目的基因为 *tdh*，内参选择为 16S rDNA 序列，引物设计如下表 2。tdh1f/tdh1r 用于扩增 *tdh* 的一段大小为 195 bp 的序列，174f/174r 引物用于扩增 16S rDNA 的一段大小为 174 bp 的序列。荧光定量 PCR 分析用两步法进行，首先将总 RNA 反转录成 cDNA，再针对 cDNA 进行荧光定量分析。利用天根公司 Quant cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录。反转录以试剂盒以 Random 引物扩增。反转录体系于 37 ℃水浴 1 h，得到 cDNA。以 cDNA 为模板使用天根公司 Taq PCR MasterMix 进行第二步扩增（Sybr Green 染料法）。扩增程序为：95 ℃预变性 2 min，95 ℃变性 20 s，55 ℃退火 20 s，68 ℃延伸 30 s，循环 40 次，每个循环结束采集信号，最后进行溶解曲线分析程序。扩增程序在 Mastercycler ep realplex 4 系统（Eppendorf，德国）进行。每个条件至少设置 3 个平行试验。

表 2 荧光定量 PCR 引物

Table 2 Primers for real-time fluorescence-base quantitative polymerase chain reaction

基因	引物名称	序列	产物大小/bp
tdh	tdh1f	aat acc caa gct ccg gtc aat g	195
	tdh1r	acc gct ctt ata gcc aga cac c	
16S rDNA	174f	atg gct cag att gaa cgc tg	174
	174r	tca tgc ggt att agc cat cg	

1.6 甲醇、乙醇和正丙醇处理副溶血性弧菌

取分别带有 1.0%甲醇、乙醇、正丙醇的新鲜 BPW 培养基各 50 mL，用于培养 ATCC33847 菌株。培养物初始菌体密度如前 1.1 所述 OD_{600nm} 为 0.01，于 37 ℃摇床培养。5 h 后测定 OD_{600nm}，同时收集菌体，按照 1.3 和 1.4 的方法抽提总 RNA 进行荧光定量分析。对照组为不添加有机溶剂的新鲜 BPW 培养基培养的 ATCC33847。数据处理方法参照 1.5。

1.7 统计学分析

荧光定量原始Ct值数据通过$2^{-\Delta\Delta CT}$法[11]转化成相对表达倍数，再利用Excel和SPSS软件对进行统计分析。平均值和标准误差从三个以上独立的平行试验结果得到。运行SPSS 11.0软件One-way ANOVA程序分析数据差异显著性。

2 结果与分析

2.1 乙醇对副溶血性弧菌生长的影响

乙醇作为一种天然的微生物次级代谢产物，低浓度时对微生物生长并无明显抑制作用，但是当浓度升高时能够造成蛋白质变性，抑制或者杀灭微生物，医学上常用 75%酒精进行皮肤表面的消毒。图 1 为在不同浓度乙醇处理下，ATCC33847 和 SZ32 在有氧和无氧培养时间的生长曲线。

ATCC33847 和 SZ32 有氧培养时，在乙醇浓度为 0.5%和 1.0%时，生长曲线与没有进行乙醇处理时生长曲线基本一致：接种培养后 6 h 菌体生长迅速，OD_{600} 超过 1.0，之后进入一个菌体密度缓慢上升的稳定期，24 h 时 OD_{600} 接近 1.7。乙醇浓度为 2.0%时，ATCC33847 和 SZ32 的有氧生长曲线也与对照一致但是 OD_{600} 稍低于对照。当乙醇浓度达到 4.0%，两株菌的生长曲线明显下移，最大菌体密度在 0.7 左右，且达到最大值后，菌体密度有缓慢的下降，显示部分细胞开始裂解。当乙醇浓度达到 8.0%时，两种菌株生长曲线处于基线水平，说明它们的有氧生长完全受到抑制。无氧培养条件下乙醇对副溶血性弧菌生长的影响与有氧培养条件下类似。因为无氧培养时，副溶血性弧菌生长较慢，且频繁取样容易导致无氧环境的破坏，所以测定生长曲线时仅选取 6 h、12 h、18 h、24 h 共 4 个时刻测定 OD_{600nm}。未经乙醇处理情况下，经过指数期生长，ATCC33847 和 SZ32 菌体密度在 12 h 达到稳定，ATCC33847 为 0.5 左右，SZ32 为 0.6 左右。0.5%和 1.0%乙醇处理的副溶血性弧菌生长曲线与无乙醇处理时基本一致。2.0%乙醇处理时，两株菌的生长曲线下移，说明菌体生长受到部分抑制；4.0%乙醇处理时，两株菌的生长曲线下移更为明显，菌体密度最大值仅在 0.2 左右，当乙醇浓度达到 8.0%时，未见菌体生长。

2.2 乙醇对 TDH 产生的影响

副溶血性弧菌食物中毒案例中，副溶血性弧菌可能在人体肠道中产生和分泌 TDH 蛋白，TDH 蛋白具有肠毒性和细胞毒性[4]，可直接作用于肠上皮细胞，导致急性腹泻的发生。本实验考察了 ATCC33847 和 SZ32 培养物上清的 TDH 水平。

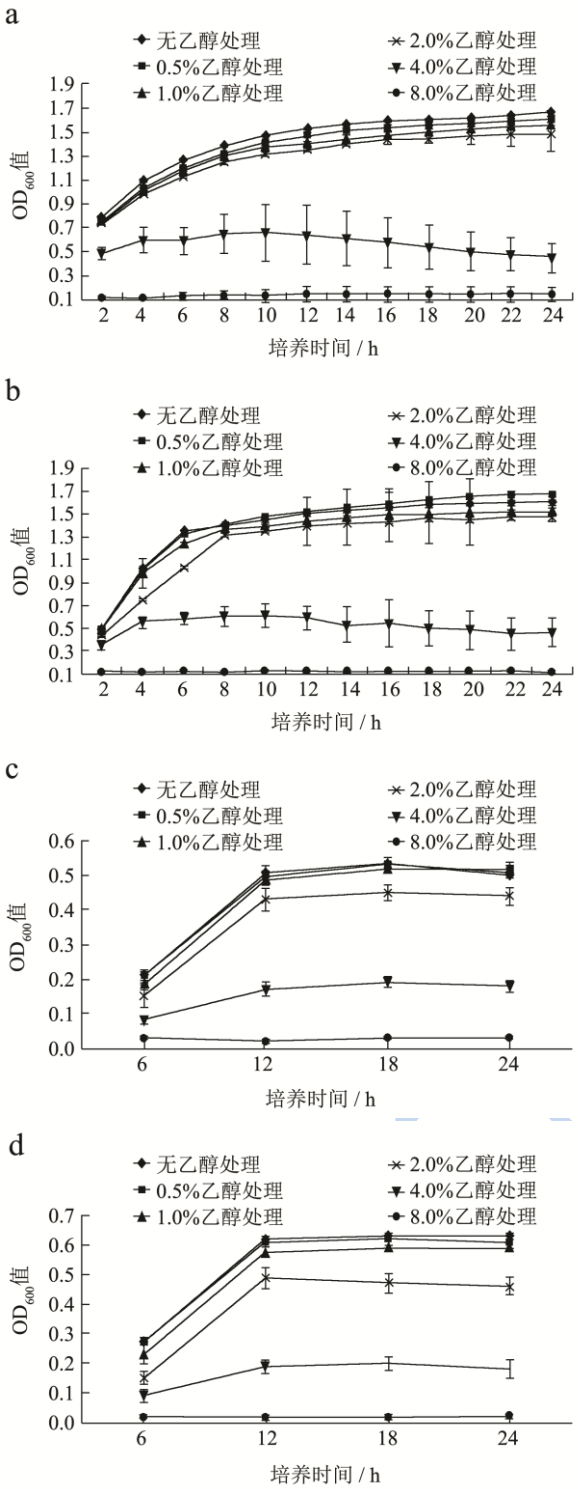


图 1 乙醇影响下副溶血性弧菌生长曲线

Fig.1 Effect of ethanol on growth curves of *V. parahaemolyticus* strains

注：a：ATCC33847 有氧生长曲线，b：SZ32 有氧生长曲线，c：ATCC33847 无氧生长曲线，d：SZ32 无氧生长曲线。

由于在有氧或者无氧培养条件下 0.5%和 1.0%乙醇浓度均不影响副溶血性弧菌生长，选取乙醇浓度 1.0%处理 ATCC33847 和 SZ32。图 2 为不同处理条件下副溶血性弧菌 TDH 产量变化。对照中 ATCC33847 在有氧培养 5 h 后上清液中 TDH 效价达到 1:32，而 1.0%乙醇处理后升高到 1:128；无氧培养时，对照 TDH 效价为 1:16 而乙醇处理升高到 1:128。SZ32 在有氧或者无氧条件下 1.0%酒精处理后 TDH 效价同样升高：有氧条件下由 1:32 升高到 1:128，无氧条件下有由 1:32 升高到 1:256。

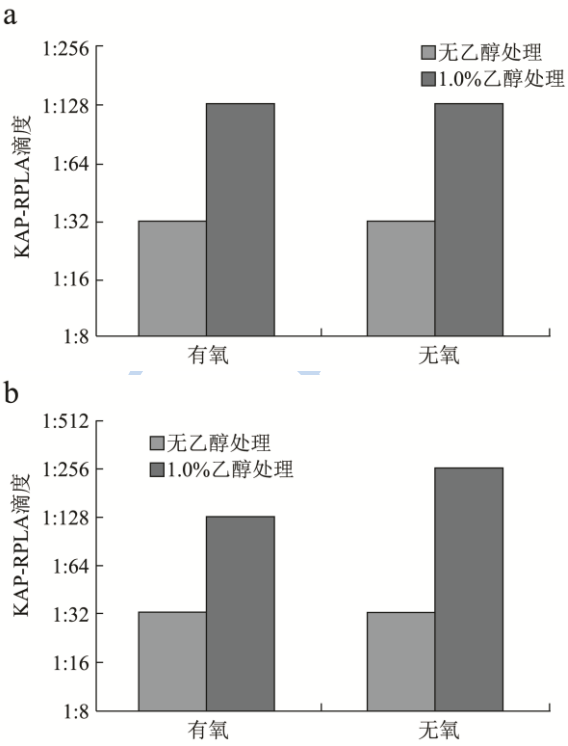


图 2 副溶血性弧菌 TDH 产量

Fig.2 Thermostable direct hemolysin (TDH) production by *V. parahaemolyticus* strains

注：ATCC33847 发酵上清液中 TDH 含量，SZ32 发酵上清液中 TDH 含量。

ATCC33847 和 SZ32 是两株没有明确亲缘关系的临床分离菌株，它们分离时间和地点不同，血清型分别为 O4:K11 和 O3:K6。然而乙醇处理后两株副溶血性弧菌有氧或者无氧培养时 TDH 产量均显示升高趋势，这表明乙醇能够提升副溶血性弧菌 TDH 的产量。这种提升不可能是通过增加副溶血性弧菌细胞数量达到，也不可能通过裂解副溶血性弧菌细胞从而加速 TDH 释放达到，因为生长曲线分析表明，1.0%乙醇基本不影响副溶血性弧菌的有氧或者无氧生长。乙醇促进副溶血性弧菌 TDH 产生的原因可能在于提高了 *tdh* 基因表达水平。

2.3 乙醇对 *tdh* 基因表达的影响

为了验证乙醇通过影响基因表达来促进 TDH 产生的猜测，本研究提取了副溶血性弧菌总 RNA，通过荧光定量分析 *tdh*-mRNA 基因相对于 16S rRNA 的丰

度状况。

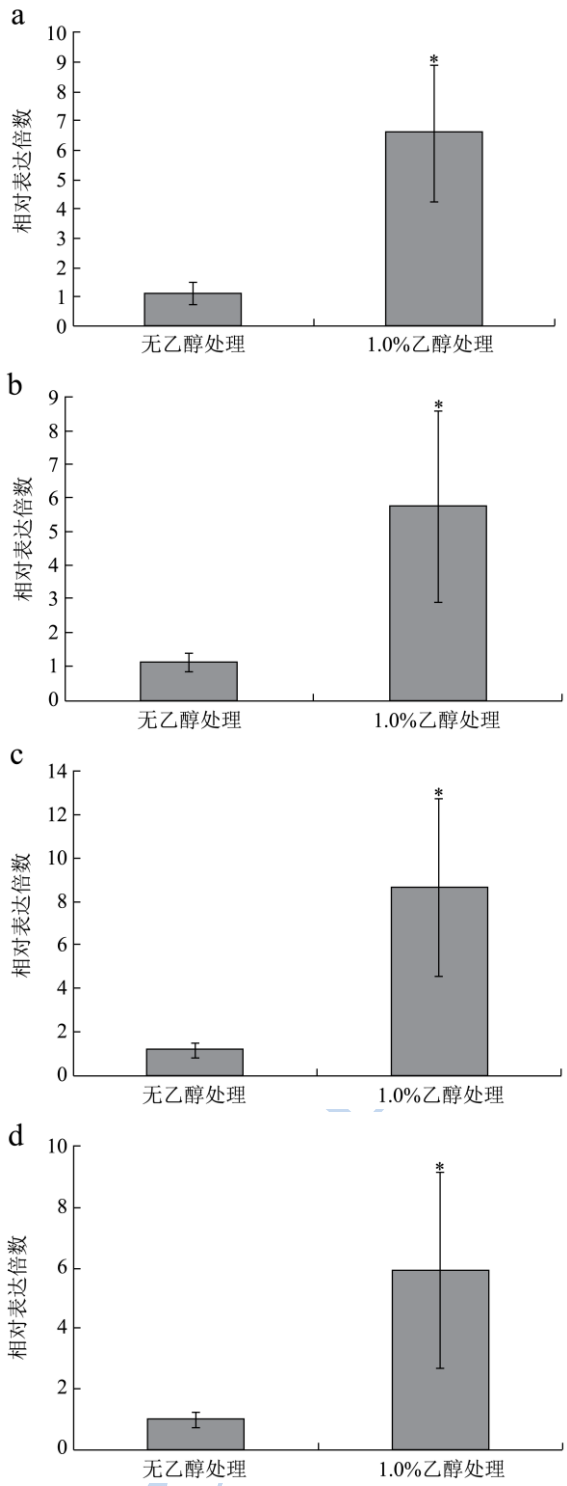


图 3 乙醇对副溶血性弧菌 *tdh* 表达的影响

Fig.3 Effects of ethanol on *tdh* expression by *V. parahaemolyticus*

注：a: ATCC33847 有氧培养，b: ATCC33847 无氧培养，c: SZ32 无氧培养，d: SZ32 有氧培养。*: 与对照相比差异性显著，P<0.05。

图 3 为有氧或者无氧条件下 1.0% 乙醇处理 ATCC33847和SZ32时*tdh* 表达水平相对内参基因的表达变化。ATCC33847在有氧培养条件下经1.0%乙醇处理后，*tdh*-mRNA丰度相对于未经过酒精处理的对照组提高到6.6倍；无氧培养时*tdh*-mRNA丰度达到对照组的5.7倍。SZ32在有氧培养条件下*tdh*-mRNA丰度经1.0%乙醇处理提高到对照组的5.9倍，无氧培养时提高到8.6倍。这说明乙醇提升TDH毒力蛋白的产量是由于促进副溶血性弧菌*tdh*基因表达实现的。

2.4 不同醇类对副溶血性弧菌 *tdh* 基因表达的影响

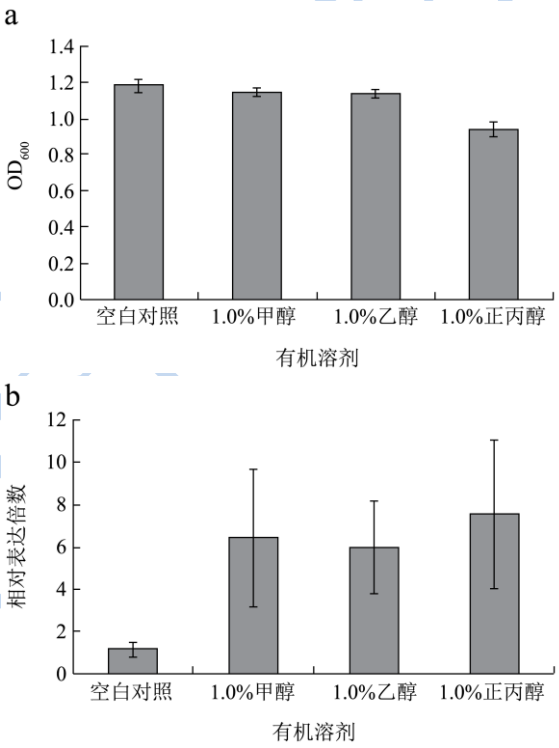


图 4 甲醇、乙醇、正丙醇对副溶血性弧菌 *tdh* 表达的影响

Fig.4 Effects of methanol, ethanol, and n-propanol on *tdh* expression by *V. parahaemolyticus*

注：a: ATCC33847 有氧生长 5 h，b: 甲醇、乙醇、正丙醇对 tdh 表达的影响。

为了探索乙醇对副溶血性弧菌 *tdh* 基因表达作用是否具有特异性，我们继续测试了甲醇、乙醇和正丙醇 3 种有机溶剂对 *tdh* 基因表达的作用。结果表明，醇类有机溶剂均能够促进 *tdh* 基因表达，如图 4 所示。摇床培养 5 h 后，1.0% 甲醇和 1.0% 乙醇处理的 ATCC33847 的菌体密度与对照组无明显差异，OD_{600nm} 约在 1.1~1.2 之间；而 1.0%丙醇处理后菌体生长有一定程度的抑制 OD_{600} 不超过 1.0（图 4a）。相对于对照组，无论是甲醇、乙醇还是正丙醇，均显著促进 *tdh* 基因表达：本试验中，1.0%甲醇、1.0%乙醇和 1.0% 正丙醇处理的 ATCC33847，*tdh* 表达倍数分别为对照

的 6.4、5.9、7.6 倍。然而 3 种有机溶剂处理组之间，*tdh* 表达倍数并无显著差异。推测醇类代谢相关的过程影响了 *tdh* 基因的表达。

3 结论

3.1 作为副溶血性弧菌最为关键的毒力因子，*TDH*产生和*tdh*表达受到较多的研究。NaCl、糖类等培养基组分能够影响副溶血性弧菌的*TDH*溶血活性[10]。胆酸在无氧条件下均能够促进*TDH*的产量[8]。在分子水平上，科研人员研究某些转录调控因子对*tdh*基因表达的影响，发现*Hfq*能够显著抑制*tdh*表达[11]。本研究首次发现：低浓度乙醇在不影响菌体生长的情况下能够促进副溶血性弧菌*tdh*表达水平上升从而提高*TDH*产量。台湾学者曾对副溶血性弧菌进行乙醇休克（ethanol shock）研究[12]，他们的研究结果中*TDH*产量与对照无明显差异，这与本实验研究结果不一致。原因在于本研究中乙醇是作为培养基的一部分一直存在于副溶血性弧菌培养体系中，能够持续作用于副溶血性弧菌；而对副溶血性弧菌进行乙醇休克研究时，使用的是亚致死浓度（5.0%），处理15~60 min后重新于无乙醇培养基中培养。本实验的结果适时反映了乙醇调节TDH产量和*tdh*表达的效果。乙醇促进*tdh*基因表达的具体机制目前还不得而知，但是由于乙醇是一种分子量极小的有机溶剂，基本不可能存在针对某个特定基因的专一性促进或者抑制作用（乙醇代谢基因相关除外），推测可能是通过影响副溶血性弧菌某种转录调控因子来实现。而且不仅仅乙醇存在这种影响，甲醇、正丙醇也能够促进*tdh*表达，说明这种影响可能是通过小分子醇类共同的代谢调控通路实现的。

3.2 副溶血性弧菌食物中毒事件中，酒精饮料的消费可能加剧中毒症状。人体的主要消化吸收器官为小肠，饮酒时大部分酒精由小肠吸收。饮酒后，由于食物的稀释和小肠的吸收，小肠中可能存在低浓度的乙醇。当饮酒者发生副溶血性弧菌感染时，低浓度乙醇与副溶血性弧菌共存于小肠中，促进副溶血性弧菌大量产生TDH毒素，加剧腹泻症状的发生。本研究利用体外实验模拟了食物中毒饮酒者的肠道环境，研究了酒精加剧副溶血性弧菌食物中毒的可能性。1.0%乙醇无论有氧还是无氧条件下，对包括O3:K6血清型在内的两株副溶血性弧菌临床分离菌株TDH产生和*tdh*表达均呈现明显的促进作用。这个结果暗示我们，在进食水产食品时饮酒将提升副溶血性弧菌食物中毒的风险。当然，这个推论还需要进行进一步的动物实验验证。

参考文献

[1] Suffredini E, Mioni R, Mazzette R, et al. Detection and quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish from Italian production areas [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, published online: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.016

[2] Wang D, Zhang D, Chen W, et al. Retention of Vibrio parahaemolyticus in oyster tissues after chlorine dioxide treatment [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 137(1):76-80

[3] Banerjee S K, Kearney A K, Nadon C A, et al. Phenotypic and genotypic characterization of Canadian clinical isolates of Vibrio parahaemolyticus collected from 2000 to 2009 [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(4): 1081-1088

[4] Chun D, Chung J K, Tak R, et al. Nature of the Kanagawa phenomenon of Vibrio parahaemolyticus [J]. Infection and Immunity, 1975, 12: 81-87

[5] Bechlarsa S, Wüstenhagen D A, Drägert K, et al. Cell-free synthesis of functional thermostable direct hemolysins of Vibrio parahaemolyticus [J]. Toxicon, 2013, 76: 132-142

[6] Raimondi F, Kao J P Y, Fiorentini C, et al. Enterotoxicity and cytotoxicity of Vibrio parahaemolyticus thermostable direct hemolysin in in vitro systems [J]. Infection and Immunity, 2000, 68(6): 3180-3185

[7] Osawa R, Arakawa E, Okitsu T, et al. Levels of thermostable direct hemolysin produced by Vibrio parahaemolyticus O3:K6 and other serovars grown anaerobically with the presence of a bile acid [J]. Current Microbiology, 2002, 44: 302-305

[8] Nakano M, Takahashi A, Su Z, et al. Hfq regulates the expression of the thermostable direct hemolysin gene in Vibrio parahaemolyticus [J]. BMC Microbiology, 2008, 8: 155. doi:10.1186/1471-2180-8-155

[9] Chen M, Guo D, W H, et al. Development of O-serogroup specific PCR assay for detection and identification of Vibrio parahaemolyticus [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 159(2): 122-129

[10] 宋曼丹,严纪文,朱海明,等.不同来源副溶血性弧菌分离株的耐药性和毒力分析[J].中国卫生检验杂志,2011,21(11): 2785-2787

SONG Man-dan, YAN Ji-wen, ZHU Hai-ming, et al. Analysis of drug resistance and virulence of Vibrio parahaemolyticus isolates from different sources [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2011, 21(11): 2785-2787

[11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2-ΔΔCT method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408

[12] Chiang M L, Chou C C. Expression of superoxide dismutase, catalase and thermostable direct hemolysin by, and growth in the presence of various nitrogen and carbon sources of heat-shocked and ethanol-shocked Vibrio parahaemolyticus [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 121: 268-274

现代食品科技