基于弧菌毒力基因多重 PCR 法的建立及其在副溶血弧菌毒力基因检测中的应用

冼钰茵[1]，易敏英[2]，魏霜[3]，余翀[1]，李志勇[2]，吴希阳[1,4]，凌莉[2]

（1.暨南大学理工学院，广东广州 510000）（2.广东省出入境检验检疫局，广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室，广东广州 510000）（3.汕头出入境检验检疫局，广东汕头 515000）（4.广东省食品安全卫生应急技术研究中心，广东广州 510000）

摘要：针对副溶血弧菌常见的 11 种毒力基因（*toxR*、*Collagenase*、*toxS*、*trh*、*tdh*、*tlh*、*UreR*、*FlaA*、*ompW*、*AspA*、*fur*），建立了两套六重 PCR 检测体系，应用于副溶血弧菌环境分离株和水产品分离株的毒力基因分布情况调查。在调查的 248 株副溶血弧菌中，鞭毛丝蛋白基因 *FlaA*、外膜蛋白基因 *ompW* 和铁吸收调节蛋白基因 *fur* 的分布最广（100%），其次为碱性丝氨酸蛋白酶基因 *AspA*（99.60%），胶原蛋白酶基因 *Collagenase*、不耐热性溶血毒素基因 *tlh* 以及毒力调控基因 *toxR* 和 *toxS* 的分布率均在 90%以上且 *toxR* 和 *toxS* 的分布极为相似，尿素酶基因 *UreR* 的分布极少（1.21%），而耐热直接溶血素基因 *tdh* 和耐热相关溶血素基因 *trh* 在这 248 株副溶血弧菌中没有检出。本研究建立的多重 PCR 检测体系能快速、高效地检测多个毒力基因的分布情况，为副溶血弧菌的毒力机制研究和风险评估提供方法和依据。

关键词：副溶血弧菌；毒力基因；多重 PCR

文章篇号：1673-9078(2015)7-309-315 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.048

Novel Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay to Detect Virulence-related Genes in *Vibrio parahaemolyticus*

XIAN Yu-yin[1], YI Min-ying[2], WEI Shuang[3], YU Chong[1], LI Zhi-yong[2], WU Xi-yang[1,4], LING Li[2]

(1.College of Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510000, China) (2.Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangdong Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal, Plant and Food, Guangzhou 510000, China) (3.Shantou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shantou 515000, China) (4.Food Safety and Health Emergency Technical Research Center of Guangdong Province, Guangzhou 510000, China)

Abstract: Two multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay systems were developed to detect 11 common virulence-related *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) genes (*toxR*, collagenase gene, *toxS*, *trh*, *tdh*, *tlh*, *UreR*, *FlaA*, *ompW*, *AspA*, and *fur*). The two systems were applied to investigate the distribution of these virulence genes in 248 strains of *V. parahaemolyticus* isolated from the environment and aquatic products. The results showed that *FlaA*, encoding flagellin protein; *ompW*, encoding the outer membrane protein; and *fur*, encoding the ferric uptake regulator were the most widely distributed (100%) genes, followed by the alkaline serine protease gene, *AspA* (99.60%). Genes with > 90% distribution included collagenase gene; *tlh*, encoding the thermolabile hemolysin; and the virulence regulatory genes, *toxR* and *toxS*, and *tlh* and *toxR* possessed similar distribution. The urease encoding *UreR* was distributed at a very low level (1.21%), while the thermostable direct hemolysin gene, *tdh* and the thermostable related hemolysin gene, *trh* were not detected in any of the 248 *V. parahaemolyticus* strains. The multiplex PCR assays established in this study can be kconsidered as a rapid and efficient method to investigate the distribution of virulence genes, which can provide data for virulence research and ris assessment regarding *V. parahaemolyticus*.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; virulence genes; multiplex polymerase chain reaction

收稿日期：2014-12-31

基金项目：广东省自然科学基金项目（S2012010008479；S2012030006235）；广东出入境检验检疫局科技计划项目（2015GDK27）

作者简介：冼钰茵（1990-），女，硕士研究生，研究方向：食品安全

通讯作者：凌莉（1978-），女，工程师，研究方向：食品安全

副溶血弧菌是一种重要的食源性病原菌，由副溶血弧菌感染引发的食物中毒已经成为世界范围内严重的食源性公共卫生问题之一。我国的食源性疾病监测网数据显示，近年来由副溶血弧菌引起的食物中毒呈显著上升趋势，副溶血弧菌居微生物食源性疾病爆发

的首位[1]。

目前副溶血弧菌对人类的致病性已得到广泛的重视，但副溶血弧菌对哺乳动物特别是人类的致病机理尚未完全研究清楚，很多研究都只集中在单个毒力基因的毒力研究上，对不同毒力基因之间的协同或拮抗作用以及这些毒力基因的分布状况仍缺乏深入的了解。

弧菌的毒力机制是一套复杂的系统，包括细胞毒素、肠毒素、溶血素、粘附因子等，这些方面综合起来使弧菌对动物和人类具有潜在的致病性[2]。目前，副溶血弧菌造成人类患病的主要毒力基因已被发现，包括各类溶血素基因（*trh*、*tdh*、*tlh*）、毒力调控基因（*toxR*、*toxS*）以及毒力相关基因（*Collagenase*、*UreR*、*FlaA*、*ompW*、*AspA*、*fur*）等[3~6]。许多研究均证实不同的弧菌毒力基因具有分布差异，会对毒力产生影响，如 Xie 等人[9]就曾针对中国广东沿海地区环境分离的副溶血弧菌和溶藻弧菌，利用单一 PCR 对 7 种毒力基因（*tlh*、*trh*、*tdh*、*toxR*、*toxRS*、*ctxA*、*VPI*）进行分布调查。由于使用单一 PCR 方法费时费力，直接限制了调查的毒力基因数量，因此不能满足大规模、大范围的较为全面的调查要求。本研究针对这些副溶血弧菌的主要毒力基因开展调查，在这些毒力相关基因序列的保守区域设计引物，建立了两套多重 PCR 体系，应用于从环境及水产品分离的副溶血弧菌的研究，以研究其毒力基因的分布特征及流行规律，为食品环境中副溶血弧菌的毒力机制研究和风险评估提供方法和依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

阳性对照菌株副溶血弧菌 P28 和 P129 由上海交通大学农业与生物学院施春雷副教授馈赠，分离自上海市临床病人，其中含有 *toxR*、*Collagenase*、*toxS*、*tdh*、*trh*、*tlh*、*UreR*、*ompW*、*FlaA*、*AspA*、*fur* 等 11 个副溶血弧菌的毒力相关基因。

单增李斯特菌（ATCC19111）、大肠杆菌（ATCC25922）、金黄色葡萄球菌（ATCC43300）、伤寒沙门氏菌（ATCC14028）、枯草芽孢杆菌（ATCC6633）、蜡样芽胞杆菌（ATCC11778）和空肠弯曲杆菌（ATCC33291）这些常见食源性致病菌的标准菌株由广东省出入境检验检疫局检验检疫技术中心食品实验室微生物实验室提供。

从环境及水产品中共分离得到 248 株副溶血弧菌，其中 87 株分离自广州市天河区的几个肉菜市场售卖的花螺、花甲，青口，沙甲，白贝，大头蛤，沙蛤，鲍鱼，扇贝，海瓜子，蛏子和贵妃蚌等水产品。其余 161 株副溶血弧菌由广东省出入境检验检疫局检验检疫技术中心食品实验室微生物实验室提供，分离自海水、珠江水等水样及进出口的凤尾虾、草虾、生蚝、罗非鱼等水产品。

本实验中所用实验菌株皆经过 16S rDNA 测序确认其为副溶血弧菌。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中已经公布的基因序列和已经报道的副溶血弧菌溶血素相关基因（*trh*、*tdh*、*tlh*）[7]、毒力调控基因（*toxR*、*toxS*）和毒力贡献基因（*Collagenase*、*UreA*、*FlaA*、*ompW*、*AspA*、*fur*）[8~10]这些常见毒力相关基因的资料，利用 Primer Premier V5.0 和 Oligo V6.22 软件进行引物设计，其中种特异性引物（$Collagenase^{VP}$ 和 $Collagenase^{VA}$）参考已报道文献并保留特异性较强的引物，用 Primer Premier V5.0 中的 Multiplex/ Nested Primers 功能来筛选引物组合，进行适当的修饰以满足多重 PCR 引物设计的要求。引物由上海生工生物技术有限公司合成（见表 1）。

1.3 副溶血弧菌 DNA 的提取

副溶血弧菌在 TCBS 培养基上活化后，挑单菌落接种于 3% NaCl 的 TSB 培养基中，于 37 ℃，150 r/min 恒温震荡培养箱中过夜培养。取 1 mL 菌种过夜培养液 10000 r/min 离心 1min，弃去上清液，用 150 μL TE 重悬，放入 100 ℃沸水浴中加热 15 min 后立即置冰上 5 min，12000 r/min 离心 5 min 后取 100 μL 上清液作为副溶血弧菌的 DNA 模板，置于-20 ℃的冰箱中保存备用。

1.4 副溶血弧菌毒力基因的多重 PCR 扩增

根据多重 PCR 反应试剂盒（Multiplex PCR Assay Kit，TaKaRa）说明书，反应体系为 50 μL，包括 Mix2 溶液 25 μL、Mix1 溶液 0.25 μL、各基因引物混合物（反应浓度见表 1）和 2 μL DNA 模板。反应条件均为预变性 94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，59 ℃ 90 s，72 ℃ 90 s，35 个循环；72 ℃延伸 10 min。待 PCR 反应结束后，取 5 μL PCR 产物上样于 2.5 %的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 1 目的基因名称及引物序列

Table 1 Target genes and primer sequences

Pool	目标基因	GeneBank ID	引物序列（5'-3'）	产物大小 /bp	反应浓度 /(μmol/L)
Pool 1	*toxR*	AY527397.1	GGATTCAACCAAATCTCCAGAGT GCTCAATAGAAGGCAACCAGTT	434	0.4
	Collagenase^{VP}	AF326572.1	GAAAGTTGAACATCATCAGCACGA GGTCAGAATCAAACGCCG	271	0.2
	toxS	AB063111.1	GCCGTATCTATCCTTTTCAGTGG GCCTTGTGCGAACAGTTTG	228	0.2
	trh	DQ359749.1	GCCTTTCAACGGTCTTCACAA TAACAAACATATGCCCATTTCCG	179	0.2
	tdh	JQ074092.1	ATAAAGACTATACAATGGCAGCGG GAATAGAACCTTCATCTTCACCAAC	138	0.2
	tlh	GU971655.1	CGAACGAGAACGCAGACATT CTTTGTTGATTTGATCTGGCTG	108	0.2
Pool 2	*Collagenase*^{VA}	DQ097161.1	GTACTACGACATTGGCGAAGG CCCGACCATACATTTCATACTG	591	0.4
	UreR	AB112354.1	AATGAGTCTGGAGTGGATGTGC TTGCGTTTGAAAGCGTCG	320	0.2
	FlaA	GQ433373.1	AATCAATGGAGCGTTTGTCTTC GCTACACGTTCTGCTTTTGAGTTAG	253	0.2
	ompW	DQ425109.1	TCGTGTCACCAAGTGTTTTCG CGTGGCTGAATGGTGTTGC	213	0.2
	AspA	DQ185575.1	GCATGGTACTCACGTAGCGG CTTTCACAAGACCAGAAGAGTAACC	146	0.2
	fur	AB003752.1	ATTAACCCTTTGAAGTTCGTGG TGACATATACTTTCCCGTTGGATC	111	0.2

2 结果与讨论

2.1 多重 PCR 体系的建立

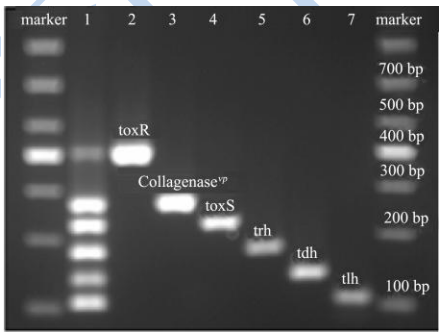


图 1 Pool 1 多重 PCR 与单一 PCR 结果对照

Fig.1 Result comparison of Pool 1 multiplex PCR and single PCR

调整了多重 PCR 体系中各个引物浓度比、Mg^{2+}浓度、退火温度等参数。当采用表 1 的各个引物反应浓度，Mg^{2+}浓度为 3 mmol/L，退火温度为 59 ℃时，各个毒力基因的条带亮度较一致，阳性对照菌株副溶血弧菌 P28 多重 PCR 检测结果与单一 PCR 检测结果一致（图 1、图 2）。

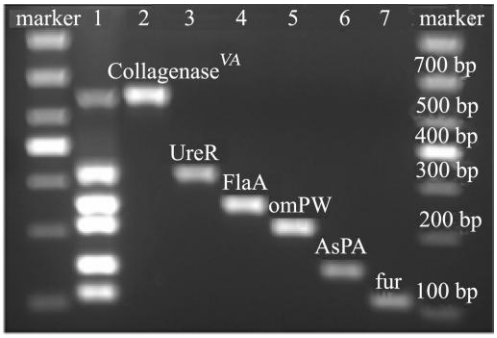


图 2 Pool 2 多重 PCR 与单一 PCR 结果对照

Fig.2 Result comparison of Pool 2 multiplex PCR and single PCR

2.2 多重 PCR 体系的特异性评价

利用副溶血弧菌 P28 与 7 种非目标菌对多重 PCR 体系的特异性进行评价，结果显示仅副溶血弧菌扩增

出特异性条带，而其它非目标菌均未出现特异性条带（图 3）。

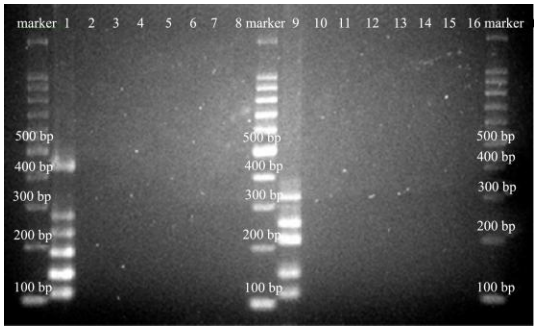


图 3 Pool 1 多重 PCR 与 Pool 2 多重 PCR 体系的特异性评价

Fig.3 Specificity evaluation of Pool 1 and Pool 2 multiplex PCR systems

Note: Lane 1~8: Pool 1 multiplex PCR. Lane 9~16: Pool 2 multiplex PCR. Lane 1, *Vibrio parahaemolyticus* P28; lane 2, *Listeria monocytogenes* (ATCC19111); lane 3, *Escherichia coli* (ATCC25922); lane 4, *Staphylococcus aureus* (ATCC43300); lane 5, *Salmonella typhimurium* (ATCC14028); lane 6, *Bacillus subtilis* (ATCC6633); lane 7, *Bacillus cereus* (ATCC11778); lane 8, *Campylobacter jejuni* (ATCC33291); lane 9, *Vibrio parahaemolyticus* P28; lane 10, *Listeria monocytogenes* (ATCC19111); lane 11, *Escherichia coli* (ATCC25922); lane 12, *Staphylococcus aureus* (ATCC43300); lane 13, *Salmonella typhimurium* (ATCC14028); lane 14, *Bacillus subtilis* (ATCC6633); lane 15, *Bacillus cereus* (ATCC11778); lane 16, *Campylobacter jejuni* (ATCC33291).

2.3 多重 PCR 体系的灵敏度评价

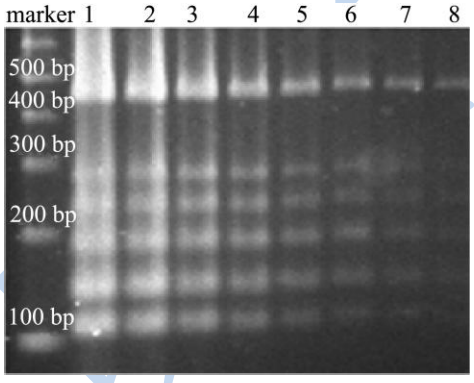


图 4 Pool 1 多重 PCR 体系的灵敏度评价

Fig.4 Sensitivity evaluation of Pool 1 multiplex PCR system

Note: 泳道1~8：菌液浓度依次为10^8~10^1 CFU/mL；The concentration of *Vibrio parahaemolyticus* P28 gradiented from 10^8~10^1 CFU/mL: lane 1, 10^8 CFU/mL; lane 2, 10^7 CFU/mL; lane 3, 10^6 CFU/mL; lane 4, 10^5 CFU/mL; lane 5, 10^4 CFU/mL; lane 6, 10^3 CFU/mL; lane 7, 10^2 CFU/mL; lane 8, 10^1 CFU/mL.

将约 10^8 CFU/mL 的副溶血弧菌 P28 菌液的 DNA 进行 10 倍梯度稀释后作为模板进行多重 PCR 灵敏度的评价。从图 4 可以看出，Pool 1 多重 PCR 体系在 10^8~10^3 CFU/mL 之间均可扩增出明显的 6 条带，其中 *toxR* 基因的灵敏度高达 10 CFU/mL。从图 5 可以看出，Pool 2 多重 PCR 体系在 10^8~10^4 CFU/mL 之间均可扩增出明显的 5 条带，其中 *FlaA* 和 *ompW* 基因的灵敏度高达 10^2 CFU/mL。

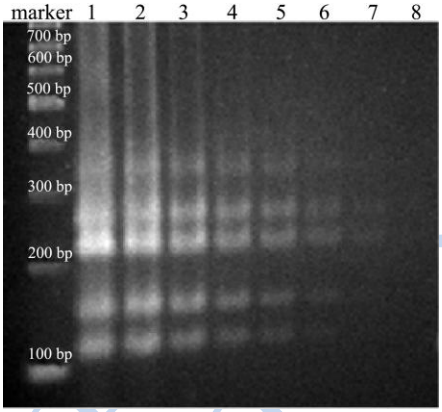


图 5 Pool 2 多重 PCR 体系的灵敏度评价

Fig.5 Sensitivity evaluation of Pool 2 multiplex PCR system

Note: 泳道 1~8: 菌液浓度依次为 10^8~10^1 CFU/mL; The concentration of *Vibrio parahaemolyticus* P28 gradiented from 10^8~10^1 CFU/mL: lane 1, 10^8 CFU/mL; lane 2, 10^7 CFU/mL; lane 3, 10^6 CFU/mL; lane 4, 10^5 CFU/mL; lane 5, 10^4 CFU/mL; lane 6, 10^3 CFU/mL; lane 7, 10^2 CFU/mL; lane 8, 10^1 CFU/mL.

2.4 利用建立的多重 PCR 体系进行副溶血弧菌的毒力基因调查

利用建立的多重 PCR 调查从环境及水产品分离的 248 株副溶血弧菌毒力基因分布情况，主要的毒力基因阳性菌株数及所占比例列于表 2。在这 248 株副溶血弧菌中，耐热性溶血素基因 *tdh* 和 *trh* 的阳性株率均为 0%；不耐热性溶血毒素基因 *tlh* 阳性株率却高达 93.55%。副溶血弧菌的毒力相关基因如鞭毛丝蛋白基因 *FlaA*、外膜蛋白基因 *ompW* 和铁吸收调节蛋白 *fur* 的分布最广，所有菌株都同时携带这 3 个毒力相关基因；其次为碱性丝氨酸蛋白酶基因 *AspA*，只有 1 株副溶血弧菌（P-17，分离自白贝）没有携带 *AspA* 基因。毒力调控基因 *toxR* 和 *toxS* 的阳性株率在 90%以上，而且两者之间的分布情况相当接近。此外，胶原蛋白酶基因 *Collagenase*^{VP} 与 *toxS*、*tlh* 三者之间的分布情况更是基本一致：*Collagenase*^{VP} 与 *toxS* 的分布仅有 3 株（P-60，分离自海瓜子；VP123，分离自扇贝；VP173，分离自冻罗非鱼）差异；*Collagenase*^{VP} 与 *tlh* 的分布也仅有 3 株（P-17，分离自白贝；VP123，分离自扇贝；VP173，分离自冻罗非鱼）差异；*toxS* 与 *tlh* 的分布仅

有 2 株（P-17，分离自白贝；P-60，分离自海瓜子）差异。在这批菌株中尿素酶基因 *UreR* 的分布极少，仅有 3 株（VP99 分离自冻去头虾；VP137 分离自海水；VP161 分离自冻虾）副溶血弧菌含有这个基因。溶藻弧菌种特异性的 *Collagenase*^{VA} 基因在这批菌株也有分布，这 4 株（P-4 分离自花甲；P-5 分离自花甲；P-77 分离自沙甲；P-78 分离自贵妃蚌）弧菌都不能扩增 *Collagenase*^{VP} 的产物，可是经过 16S rRNA 测序结果均为副溶血弧菌，这与副溶血弧菌跟溶藻弧菌胶原蛋白酶的高度同源有关。

表 2 副溶血弧菌的毒力基因分布调查结果

Table 2 Distribution of virulence-related genes among *Vibrio parahaemolyticus* strains

毒力基因	*toxR*	*Collagenase*^{VP}	*toxS*	*trh*	*tdh*	*tlh*	*Collagenase*^{VA}	*UreR*	*FlaA*	*ompW*	*AspA*	*fur*
阳性菌株数	228	229	230	0	0	232	6	3	248	248	247	248
阳性率/%	91.94	92.34	92.74	0	0	93.55	2.42	1.21	100	100	99.60	100

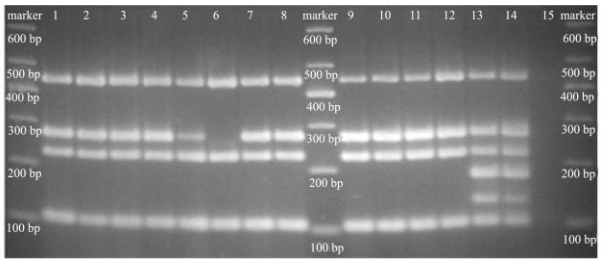


图 6 副溶血弧菌毒力基因的多重 PCR（Pool 1）扩增

Fig.6 Multiplex PCR amplification of virulence-related genes of *Vibrio parahaemolyticus* (Pool 1)

Note: Lane 1, VP118; lane 2, VP119; lane 3, VP120; lane 4, VP121; lane 5, VP122; lane 6, VP123; lane 7, VP124; lane 8, VP125; lane 9, VP126; lane 10, VP127; lane 11, VP131; lane 12, VP132; lane 13, positive control P28; lane 14, positive control P129; lane 15, negative control.

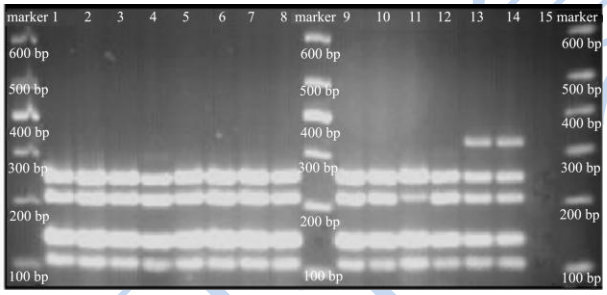


图 7 副溶血弧菌毒力基因的多重 PCR（Pool 2）扩增

Fig.7 Multiplex PCR amplification of virulence-related genes of *Vibrio parahaemolyticus* (Pool 2)

Note: Lane 1, VP118; lane 2, VP119; lane 3, VP120; lane 4, VP121; lane 5, VP122; lane 6, VP123; lane 7, VP124; lane 8, VP125; lane 9, VP126; lane 10, VP127; lane 11, VP131; lane 12, VP132; lane 13, positive control P28; lane 14, positive control P129; lane 15, negative control.

2.5 讨论

本团队前期工作建立了在扩增内标存在下同步快速检测副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌 4 种食源性致病菌的五重 PCR 方法[11]。为了实现对于食品和环境分离的副溶血弧菌携带的毒力基因的快速筛查和毒力评估，本研究针对副溶血弧菌的 11 种主要毒力基因构建了两套多重 PCR 体系，这些毒力基因除了 *Collagenase*^{VA} 和 *Collagenase*^{VP} 外，所有的引物均是在副溶血弧菌和溶藻弧菌的同源区域设计，而不是单纯的参考以往报道的引物，使调查结果更为准确可信。每套多重 PCR 体系各包含 6 对毒力基因引物，扩增产物长度在 100~500 bp 之间从而提高了各基因的检测灵敏度。在设计引物的同时，调整引物的 Tm 值均在 72 ℃左右，可以统一在 59 ℃的退火温度下保持良好的扩增效率和特异性，因此构建的这两套多重 PCR 体系不仅适用于副溶血弧菌的毒力基因调查，也同样适用于溶藻弧菌的毒力基因调查，还克服了使用单一 PCR 方法费时费力，不能满足大规模、大范围的较为全面的调查要求的缺点，为弧菌毒力基因的研究提供了更为简便快速的方法，本方法快速、灵敏、高通量，在国内外文献中未见报道。但是，作为常规的多重 PCR 体系，本方法只能进行毒力基因的定性检测，不能实现对于样品中各种毒力基因分布的定量。

溶血素是副溶血弧菌致病的主要因素。副溶血弧菌的溶血素：耐热直接溶血素（TDH）、耐热直接相关溶血素（TRH）和不耐热溶血素（TLH）分别由 *tdh*、*trh*、*tlh* 基因编码，其中 TDH 和 TRH 是主要的致病因子，TDH 能在我妻氏血平板上引起β -溶血（神奈川现象，Kanagawa phenomenon），具有细胞毒性和肠毒素作用；TRH 则是 KP 阴性菌株中重要的致病因子，具有与 TDH 相似的毒性，但不耐热；TLH 是一种非典型的磷脂酶，本身并没有直接的溶血活性，只有在卵磷脂存在的条件下才具有溶血活性[2~6,12,13]。流行病学调查显示[9,12,13]：副溶血弧菌的环境分离株和水产品分离株极少携带 *tdh* 基因，临床分离的副溶血弧菌则大多携带 *tdh* 基因；*trh* 基因无论是在临床株还是环境株检出率均较低，但也有与 *tdh* 基因共存的情况出现；无论是临床分离株还是环境分离株，大多数副溶血弧菌均携带 *tlh* 基因，这与本研究的毒力基因调查结果

基本一致。

本研究中所有菌株均携带有 *FlaA*、*ompW* 和 *fur*，*AspA* 的分布率也接近 100%，由于缺乏流行病学的相关调查资料，无法从本次研究的调查结果中发现它们之间是否有密切联系，只能确定这四个基因在副溶血弧菌中的分布极为广泛。本研究还发现副溶血弧菌的毒力调控基因 *toxR* 和 *toxS* 在环境分离株和水产品分离株的分布情况相当接近。在这 248 株副溶血弧菌中，这两个毒力调控基因的分布仅在 12 个菌株中出现差异，分布相似率高达 95.16%。由于这两个基因都对副溶血弧菌的毒力有调控作用，因此推断在副溶血弧菌的基因组中有可能是以捆绑的形式同时出现。更为突出的是本研究的调查结果中 *Collagenase*^{VP} 与 *toxS*、*tlh* 三者之间的分布情况基本一致，在 248 株副溶血弧菌中仅有 4 个菌株这三个毒力基因的携带情况不一致，分布相似率高达 98.39%。虽然这三个基因对副溶血弧菌的致病性与毒力的影响作用不同，但从近似相同的分布情况来看这三个基因在副溶血弧菌的遗传学方面具有很高的关联性，甚至也有可能在基因组中以捆绑的形式。

本研究的调查结果中，有 3 株副溶血弧菌具有尿素酶基因 *UreR*。分子流行病学数据显示[14]，尿素酶阳性菌株与 *trh* 基因的携带具有明显的正相关性：Okuda 等对 1979-1995 年从美国西海岸分离的 60 株副溶血弧菌尿素酶阳性菌株进行检测，发现 59 株(98%)携带 *trh*(*trh1* 和/或 *trh2*)；Suthuenkul 等对从泰国腹泻病人获得的 37 株副溶血弧菌尿素酶阳性菌株进行检测，发现全部携带 *trh* 基因。本研究中 3 株具有 *UreR* 基因的副溶血弧菌都没有携带 *trh* 基因，与过去的研究结果有较大差异。查阅文献发现，Park 等[15]利用核酸序列分析表明 *Ure* 基因簇包含有 8 个结构基因，即 *UreDABCEFG* 和 *UreR*。其中 *UreR* 基因位于 *Ure* 基因簇上游 5.2 kb 处，与其余 7 个结构基因方向相反。通过进一步的基因组分析，他们发现在含有 *trh* 基因的副溶血弧菌中，*Ure* 基因簇和 *trh* 基因都位于小的复制子上，而且两者的基因序列位于染色体 DNA 相邻的编码区，利用长距和精确 PCR 测得 *Ure* 基因簇和 *trh* 基因之间的距离小于 8.5 kb，结合他们之前发现在副溶血弧菌的临床株中结构基因 *UreC* 和 *trh* 基因的分布完全一致的结果，得出了包含 *Ure* 基因簇和 *nik* 基因以及 *trh* 基因的基因序列只存在于含有 *trh* 基因的副溶血弧菌中，而不存在于 KP 阳性菌株及副溶血弧菌的环境分离株中的结论。可是随着副溶血弧菌流行病学调查的数据资料日趋完善，同时含有 *trh* 和 *tdh* 基因的副溶血弧菌日渐被研究者发现，尿素酶阳性菌株中与 *trh* 基因的携带具有正相关性的是整个 *Ure* 基因簇还是只是单个结构基因 *UreC* 或 *UreR*，仍需要更多的副溶血弧菌的毒力基因调查数据前补充、验证才能得出更具有说服力的结论。

3 结论

本研究建立的多重 PCR 体系能快速、高效地检测多个毒力基因的分布情况，可用于副溶血弧菌的毒力基因大规模、大范围调查，对于研究其毒力基因的分布特征及流行规律，以及副溶血弧菌的毒力机制研究和副溶血弧菌的食品安全风险评估都是大有裨益的。

参考文献

[1] WU Yong-ning, WEN Jian, MA Yi, et al. Epidemiology of Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Vibrio parahaemolyticus*, China, 2003-2008 [J]. Food Control, 2014, 46:197-202

[2] 夏凡,杨丽君,王静,等.病原性海洋弧菌致病机理及其快速检测方法研究进展[J].食品工业科技,2011,32(1):366-370, 376
XIA Fan, YANG Li-jun, WANG Jing, et al. Research Progress in Pathogenetic Mechanism and Rapid Detection of Pathogenicm Marine *Vibrio* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(1): 366-370, 376

[3] CHAO Guo-xiang, JIAO Xi-nan, ZHOU Xiao-hui, et al. Distribution, Prevalence, Molecular Typing, and Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Different Sources in Coastal Province Jiangsu, China [J]. Food Control, 2009, 20: 907-912

[4] Broberg C A, Calder T J, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* Cell Biology and Pathogenicity Determinants [J]. Microbes and Infection, 2011, 13: 992-1001

[5] Gennari M, Ghidini V, Caburlotto G, et al. Virulence Genes and Pathogenicity Islands in Environmental *Vibrio* Strains Nonpathogenic to Humans [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 82: 563-573

[6] 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: 1-9

[7] Bej A K, Patterson D P, Brasher C W, et al. Kaysner C. A. Detection of Total and Hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish Using Multiplex PCR Amplification of *tlh*, *tdh* and *trh* [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 36(3): 215-225

[8] Pinto A D, Ciccarese G, Tantillo G, et al. A Collagenase -targeted Multiplex PCR Assay for Identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(1): 150-153

[9] Xie Z Y, Hu C Q, Chen C, et al. Investigation of Seven *Vibrio* Virulence Genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* Strains from the Coastal Mariculture Systems in Guangdong, China [J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 41: 202-207

[10] González-Escalona N, Blackstone G M, Depaola A. Characterization of a *Vibrio alginolyticus* Strain, Isolated from Alaskan Oysters, Carrying a Hemolysin Gene Similar to the Thermostable Direct Hemolysin-related Hemolysin Gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7925-7929

[11] WEI Shuang, ZHAO Hui, XIAN Yu-yin, et al. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2014, 79: 115-118

[12] 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

[13] ZHANG Hong-zi, SUN Shuang-fu, SHI Wei-ming, et al. Serotype, Virulence, and Genetic Traits of Foodborne and Clinical *Vibrio parahaemolyticus* Isolates in Shanghai, China [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2013, 10(9): 796-804

[14] Okuda J, Ishibashi M, Abbott S L, et al. Analysis of the Thermostable Direct Hemolysin (*tdh*) Gene and the *tdh*-Related Hemolysin (*trh*) Genes in Urease-Positive Strains of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated on the West Coast of the United States [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(8): 1965-1971

[15] Park K S, Iida T, Yamaichi Y, et al. Genetic Characterization of DNA Region Containing the *trh* and *ure* Genes of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Infection and Immunity, 2000, 68(10): 5742-5748