

# 北部湾茅尾海副溶血性弧菌的分离鉴定 与致病性分析

唐金利<sup>1</sup>, 李晓丽<sup>1</sup>, 陈星<sup>2</sup>, 赵华显<sup>1</sup>, 李楠<sup>1</sup>

(1. 南宁师范大学北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室, 广西南宁 530001)

(2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004)

**摘要:** 为解析北部湾海域及水产品中副溶血性弧菌的多样性特征与安全风险, 本研究采集了北部湾茅尾海养殖区域海水和水产经济动物样品, 利用硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基 (TCBS) 对所采样品进行海洋弧菌的分离和纯化, 共分离获得 109 株疑似弧菌菌株。通过 16S rDNA 和特异功能基因 *toxR* 的 PCR 扩增并测序鉴定, 共检出副溶血性弧菌 20 株, 检出率为 18.3%。此外, 通过系统发育分析还发现副溶血性弧菌的 *toxR* 和 *tdh* 基因序列都存在水平基因转移现象, 呈现出较大的多样性。对 20 个副溶血性弧菌菌株的毒力基因 *tdh* 进行分析, 结果表明有 4 株携带了 *tdh* 毒力基因, 检出率为 20%, 易引起食物中毒, 对公共卫生造成的威胁较大。因此, 本研究建议采用 PCR 技术开展副溶血性弧菌特异种属基因和毒力基因检测, 准确评估北部湾区域海水及其水产品的卫生安全性, 降低爆发水产养殖业病害和食源性疾病的风险。

**关键词:** 北部湾; 副溶血性弧菌; 16S rDNA; *toxR* 基因; *tdh* 基因; 系统进化树

文章编号: 1673-9078(2020)07-75-87

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.1202

## Isolation, Identification and Pathogenicity Analysis of *Vibrio parahaemolyticus* Strains from Maowei Sea, Beibu Gulf

TANG Jin-li<sup>1</sup>, LI Xiao-li<sup>1</sup>, CHEN Xing<sup>2</sup>, ZHAO Hua-xian<sup>1</sup>, LI Nan<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Environment Change and Resource Use in Beibu Gulf, Nanning Normal University, Nanning 530001, China) (2. School of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** To analyze the diversity characteristics of *V. parahaemolyticus* and safety risks in sea water and aquatic products in Beibu gulf, we collected samples from seawater and aquatic economic animals in the mariculture area of Maowei sea in Beibu gulf in this study. Marine vibrio was isolated from the samples by thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium (TCBS). Totally, 109 suspected vibrio strains were obtained. A total of 20 strains of *V. parahaemolyticus* were identified by DNA sequencing of 16S rDNA genes and specific function gene *toxR* after PCR amplification. Virulence gene *tdh* analysis showed that 4 of the 20 strains of *V. parahaemolyticus* carried the virulence gene *tdh*, with a detection rate of 20%. In addition, phylogenetic analysis also revealed that horizontal gene transfer happened in both the *toxR* and *tdh* gene sequences of *V. parahaemolyticus*. The results of this study indicated that *V. parahaemolyticus* in Beibu gulf had high genetic diversity, and some of them carry pathogenic factors, which is a risk of outbreak of aquaculture diseases and food-borne diseases in this area. Therefore, it is suggested to use PCR technology to detect specific species genes and virulence genes of *V. parahaemolyticus*, accurately evaluate the health safety in seawater and aquatic products in the

引文格式:

唐金利, 李晓丽, 陈星, 等. 北部湾茅尾海副溶血性弧菌的分离鉴定与致病性分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(7): 75-87

TANG Jin-li, LI Xiao-li, CHEN Xing, et al. Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Vibrio parahaemolyticus* strains from Maowei sea, Beibu gulf [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 75-87

收稿日期: 2019-12-06

基金项目: 国家自然科学基金 (41966005); 北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室 (南宁师范大学) 开放基金 (GTEU-KLOP-X1806; GTEU-KLOP-X1701); 广西自然科学基金 (2017GXNSFAA198081; 2018GXNSFDA281006)

作者简介: 唐金利 (1979-), 女, 硕士, 研究方向: 海洋微生物分子生态

通讯作者: 李楠 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 海洋微生物分子生态

Beibu gulf region, and reduce the risk of outbreak of aquaculture disease and food-borne diseases.

**Key words:** Beibu gulf; *Vibrio parahaemolyticus*; 16S rDNA; *toxR*; *tdh*; phylogenetic tree

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, 简称 *V.p*)是一种革兰氏阴性嗜盐菌,属于弧菌科弧菌属,广泛分布于海洋、河口等水生环境及水产品中。部分副溶血性弧菌具有致病性,极易引起腹泻、腹痛、肠痉挛、恶心、呕吐和水样便等肠胃炎反应,严重时可引起败血症和肾功能衰竭等临床反应,是近年来我国海洋环境中引起细菌性食物中毒的首要食源性致病菌之一<sup>[1-4]</sup>。因此,准确地对 *V.p* 进行分离鉴定并分析其致病性,无论对研究病菌致病机理还是预防和治疗疾病都具有重要的意义。

我国目前主要采用 GB/T 4789.7-2013 《食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》的方法进行 *V.p* 定性检测。该方法主要是对弧菌进行纯化培养,再根据弧菌的表型,包括菌落形态、生理特征以及免疫学特性等方面进行弧菌的鉴定。近年来,基于 PCR (Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链式反应)和生物信息学技术,已经建立了一些更为便捷和准确的 *V.p* 检测方法。如 Kim 等针对 16S rRNA 序列中寻找弧菌属特异性可变区,设计了特异性引物,进而成功地建立了一种高效检测和鉴别弧菌菌株的 PCR 方法<sup>[5]</sup>。然而,也有研究表明弧菌种间的 16S rRNA 基因序列相似性非常高,很难进一步做更细化的分类鉴定和系统发育进化分析<sup>[6,7]</sup>。最近的报道称,特异性功能基因和毒力基因对于弧菌分类具有独特的优势<sup>[8]</sup>。研究发现,与 16S rRNA 基因相比, *toxR* 基因的系统发育树显示了更大的差异性,可以更准确地将 *V.p*、哈维氏弧菌和坎贝氏弧菌 (*V.campbellii*) 区分开来<sup>[9]</sup>。因此,16S rRNA 测序技术和特异功能基因的结合,能更好地对 *V.p* 进行分类鉴定和系统发育分析,以确保鉴定结果的准确性<sup>[10,11]</sup>。另外, *toxR* 基因序列和毒力基因如 *tdh* (热稳定性直接溶血素)和 *trh* (耐热相关溶血素)的综合分析,因其快速、便捷等特点,可大幅提高疑似致病菌株筛查的针对性,可作为鉴定副溶血性弧菌致病性的辅助方法<sup>[12-14]</sup>。

北部湾沿海地区是我国海水养殖的主要基地之一,随着近海水域养殖规模地不断扩大,海水养殖环境中由弧菌引起的病害风险也在逐渐升高,对该地区海水养殖业的发展是严重的制约<sup>[15]</sup>。陈盛峰等对广西北海近岸养殖海域海水样品进行副溶血性弧菌、霍乱弧菌和河流弧菌等 3 种致病性弧菌进行分离鉴定,结果表明 *V.p* 约占总检出弧菌的 70.4%,

并且对四环素、卡那霉素和红霉素具有耐药性,可能是对北海近岸养殖威胁最大的弧菌类型之一<sup>[16]</sup>。与此同时,北部湾沿海地区及其辐射城市所销售的海产品被 *V.p* 感染非常普遍,检出率为 20.0%~55.77%,其中贝类中牡蛎检出率最高,可达 83.02%,其次是甲壳类,鱼类则相对较少<sup>[17-20]</sup>。因此,对北部湾海域及其养殖海产品进行 *V.p* 的分离鉴定及致病性分析对于提高食品安全性具有重要参考意义。然而,结合 16S rDNA 基因、*toxR* 基因和 *tdh* 基因对北部湾海水养殖海域及海产品 *V.p* 的系统进化特征及致病性分析,尚未见报道。为此,本研究在北部湾茅尾海区域采集海水、牡蛎等样品,使用 TCBS 培养基分离筛选弧菌菌株,基于 16S rDNA 基因和特异功能基因 *toxR* 的序列分析结果,对 *V.p* 进行分类鉴定,确定株间的亲缘关系。在此基础上,通过 *tdh* 毒力基因的分析,对其潜在致病性风险作进一步检测。本工作对该地区的 *V.p* 进行初步的风险性评估,可为水产养殖和食源性疾病预防提供技术支撑和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品采集

2017年3月,在北部湾广西钦州市茅尾海海域的5个采样点(图1)进行海水样品采集,每个采样点采集表层海水2L,装在无菌样品瓶中封好。活牡蛎样品则取自茅尾海两处水产养殖基地(钦州沙井天然采苗保苗基地和中下游茅尾海大蚝养殖基地),各5份。所有采集的样品置于冰盒内低温保存,所有样品24小时内带回实验室,进行后续处理。

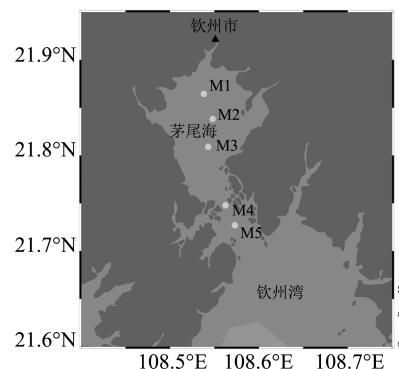


图1 茅尾海海水采样点示意图

Fig.1 Map of sampling sites of sea water in Maowei sea

### 1.1.2 主要试剂和仪器

硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基 (thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium, TCBS), 以及配制 SWYE 培养基所需琼脂粉、酵母粉、胰蛋白胨等购自索莱宝公司; 细菌基因组提取试剂盒、PCR 扩增反应试剂(10×Buffer、RNase、Taq 酶、dNTPs、DNA Marker) 购自中国北京天根生物技术有限公司; PCR 扩增用引物见表 1,

由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成; 主要仪器包括: 高压灭菌锅(LDZF-50KB), 上海申安; PCR 仪(ETC 811), 北京东胜创新生物科技有限公司; 超净工作台(Airtech SW-CJ-2FD), 苏州安泰空气技术有限公司; 小型台式离心机(Sigma 1-14), Sigma 公司, 凝胶成像系统(Tanon-1600), 上海天能公司。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物系列(正向和反向)	长度/bp	文献来源
16S rDNA	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1500	[21]
	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'		
<i>toxR</i>	5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3'	368	[12]
	5'-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3'		
<i>tdh</i>	5'-ATATCCATGTTGGCTGCATTC-3'	531	[22]
	5'-TTATTGTTGATGTTTACATTCAAAA-3'		

## 1.2 方法

### 1.2.1 样品处理与弧菌分离、培养

TCBS 培养基作为菌株分离筛选培养基, 121 °C 灭菌 30 min、倒平板, 备用。海水样品与无菌海水充分混合后, 连续做 10 倍梯度稀释, 得到 10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup> 不同稀释度样品, 备用。牡蛎样品用无菌海水将表面洗净, 取壳内软体组织制成匀浆悬浊液, 用二层无菌纱布过滤, 取组织悬液按 10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup> 共 6 个梯度进行稀释。

分别取以上各个稀释度的海水样、牡蛎组织悬液 100 μL 涂布于 TCBS 固体平板中, 每个稀释度做 5 个重复, 37 °C 恒温箱中培养 24 h。挑取特征菌落, 分别划线至新的 TCBS 培养基平板, 倒置于恒温箱中培养 24 h, 进一步分离得到单菌落。挑取单个菌落接种在 SWYE 平板培养基中, 30 °C 恒温箱培养 1~2 d, 获得纯培养菌株。将所分离的所有菌落进行编号, 并记录其大小、形状、颜色、黏度等形态特征。获得的单菌落进行甘油-80 °C 冷冻保存, 备用。

### 1.2.2 DNA 提取与 16S rDNA、*toxR*、*tdh* 基因测序

分别取 1 mL 过夜培养的菌液, 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN DP302)步骤, 提取各菌液样品 DNA, 置于-20 °C 冻存备用。使用上述提取得到的菌株 DNA 作为 PCR 扩增模板, 分别进行 16S rDNA、*toxR*、*tdh* 基因扩增和测序: 用无菌超纯水(ddH<sub>2</sub>O)稀释引物至浓度 10 pmol/L, -20 °C

保存备用。反应体系 20 μL, 2×EasyTaq PCR Super-Mix 10 μL, 上下游引物(10 pmol/L, 表 1)各 1.0 μL, DNA 模板 2.0 μL, 无菌超纯水(ddH<sub>2</sub>O) 6 μL。PCR 扩增反应程序: 95 °C 预变性 4 min, 95 °C 变性 1 min, 54 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min 为 1 个循环, 扩增 30 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增完成后, 取部分 PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 15~18 min, 置于紫外凝胶成像仪中观察目的条带并记录结果, 将合格产物送至武汉金开瑞生物工程有限公司测序。基因序列, 保存在 GeneBank:

(1) 16S rDNA 序列号: MN636738-MN636757; (2) *toxR* 序列号: MN726884-MN726903; (3) *tdh* 序列号: MN726904-MN726907。

### 1.2.3 数据处理与系统发育树的构建

将 16S rDNA、*toxR*、*tdh* 基因测序结果序列使用 ContigExpress 软件进行序列峰图校对, 正反向拼接。将所得的 20 条 16S rDNA 序列、20 条 *toxR* 基因序列和 4 条 *tdh* 基因序列分别使用 NCBI 网站的 BLAST 程序进行比对, 选取比对结果中相似性最高的物种信息用于菌株物种分类和基因注释<sup>[23]</sup>; 下载各基因 BLAST 匹配到的最高相似序列, 经过 ClustalX 软件对所得序列进行处理对齐<sup>[24]</sup>, 在 mega 7 软件中用邻接法(neighbor-joining)构建 16S rDNA 的系统发育树, 采用最大简约法(maximum-likelihood), 构建 *toxR* 和 *tdh* 基因的系统发育树, Bootstrap 值为 1000 次<sup>[7,25]</sup>, 隐藏可信度小于 50% 的自展值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 16S rDNA 分类鉴定结果

表 2 疑似菌株的 16S rDNA 序列 Blastn 结果

Table 2 Blastn results of 16S rDNA of Suspected strains

菌株编号(GenBank 序列号)	相似性高的菌株(GenBank 序列号)	序列的覆盖度/%	最大相似性/%
YSVP01 (MN636738)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG589511.1)	98	99
YSVP02 (MN636739)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (KR347290.1)	98	98
YSVP03 (MN636740)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (KR347290.1)	98	98
YSVP04 (MN636741)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (KR347290.1)	98	98
YSVP05 (MN636742)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG589511.1)	99	97
YSVP06 (MN636743)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG589511.1)	99	98
YSVP07 (MN636744)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (KT986147.1)	99	99
YSVP08 (MN636745)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (KR137715.1)	99	98
YSVP09 (MN636746)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MH375367.1)	99	98
YSVP10 (MN636747)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG386398.1)	99	99
YSVP11 (MN636748)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (KR347290.1)	98	99
YSVP12 (MN636749)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG386398.1)	99	98
YSVP13 (MN636750)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG386398.1)	99	98
YSVP14 (MN636751)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (KR347297.1)	98	98
YSVP15 (MN636752)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (KR347292.1)	98	98
YSVP16 (MN636753)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (KT986171.1)	99	98
YSVP17 (MN636754)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MF595600.1)	99	98
YSVP18 (MN636755)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MH375367.1)	99	98
YSVP19 (MN636756)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MK308579.1)	99	98
YSVP20 (MN636757)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (KR347292.1)	98	98

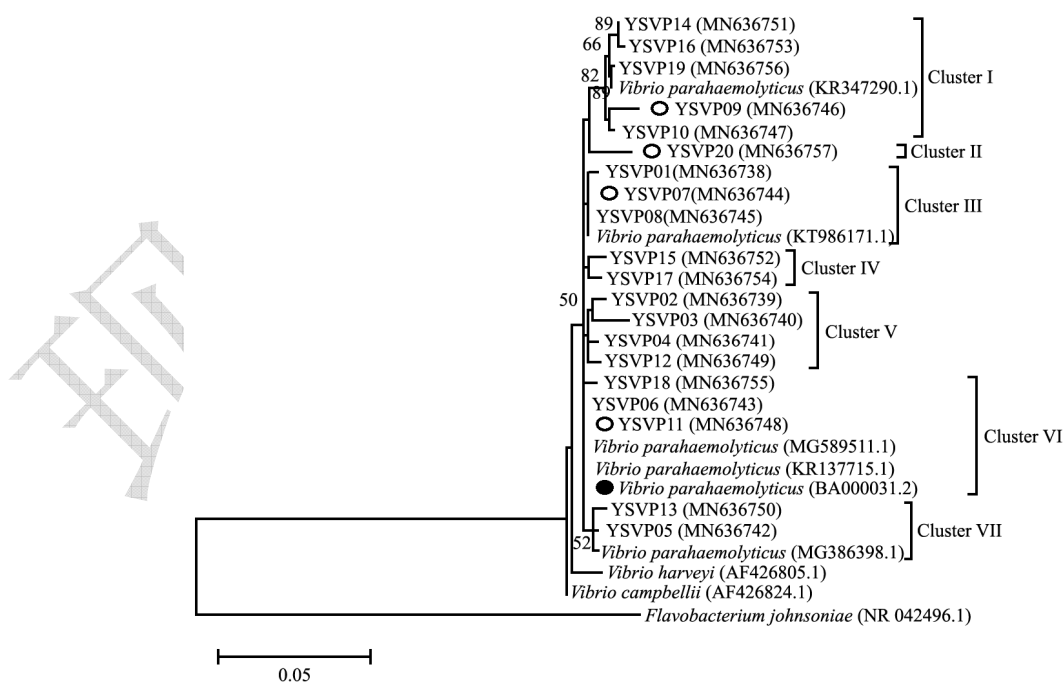


图 2 基于 16S rDNA 基因序列的邻接法系统发育树

Fig.2 Neighbor-joining phylogenetic distance tree based on 16S rDNA gene sequence

注: ●为典型临床爆发菌株; ○为 *tdh* 基因阳性菌株。

表 3 基于 16S rDNA 基因序列的遗传距离

Table 3 The genetic distances base on 16S rDNA gene

序号	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
01																			
02	0.011																		
03	0.017	0.015																	
04	0.008	0.008	0.015																
05	0.008	0.011	0.017	0.008															
06	0.004	0.007	0.013	0.004	0.004														
07	0.003	0.008	0.014	0.006	0.006	0.001													
08	0.003	0.008	0.014	0.006	0.006	0.001	0.000												
09	0.020	0.020	0.031	0.017	0.023	0.018	0.017	0.017											
10	0.014	0.017	0.023	0.014	0.014	0.010	0.011	0.011	0.011										
11	0.004	0.007	0.013	0.004	0.004	0.000	0.001	0.001	0.018	0.010									
12	0.010	0.006	0.017	0.007	0.010	0.006	0.007	0.007	0.024	0.015	0.006								
13	0.011	0.014	0.017	0.011	0.006	0.007	0.008	0.008	0.025	0.017	0.007	0.013							
14	0.015	0.015	0.024	0.015	0.015	0.011	0.013	0.013	0.013	0.007	0.011	0.017	0.015						
15	0.008	0.014	0.020	0.008	0.011	0.007	0.008	0.008	0.023	0.017	0.007	0.013	0.014	0.018					
16	0.017	0.017	0.024	0.017	0.017	0.013	0.014	0.014	0.014	0.008	0.013	0.018	0.017	0.001	0.020				
17	0.010	0.013	0.018	0.007	0.010	0.006	0.007	0.007	0.021	0.015	0.006	0.011	0.013	0.017	0.010	0.018			
18	0.008	0.011	0.017	0.008	0.008	0.004	0.006	0.006	0.023	0.014	0.004	0.010	0.011	0.015	0.011	0.017	0.010		
19	0.014	0.017	0.023	0.014	0.014	0.010	0.011	0.011	0.014	0.006	0.010	0.015	0.014	0.004	0.017	0.006	0.015	0.014	
20	0.017	0.023	0.027	0.018	0.020	0.015	0.017	0.017	0.028	0.020	0.015	0.021	0.023	0.023	0.021	0.024	0.020	0.020	0.021

注：序号 01~20 为菌株 YSVP01~YSVP20。

经过初筛和分离纯化后,根据菌落特征分别从海水样品中筛选出56个疑似弧菌菌株,从牡蛎样品中挑选53个疑似弧菌菌株,对这109个菌株进行16S rDNA测序。经过NCBI网站BLAST比对得出20株疑似副溶血性弧菌,检出率为18.3%。其中实验菌株的16S rDNA基因与*V.p*同源性的有4株,98%的15株,97%的1株(表2)。此外,尚有89株疑似弧菌未能获得最终鉴定,很有可能是其它种类的弧菌,如霍乱弧菌(*V. cholerae*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)和创伤弧菌(*V. vulnificus*)等等,此前这些种类的弧菌已在广西境内的海水和海产品中多次被检出<sup>[16,19,20,26-28]</sup>。

16S rRNA作为原核生物分类的重要分子标记,在*V.p*鉴定相关工作中已经起到了至关重要的作用<sup>[7,10,26,29]</sup>。在16S rDNA系统发育树(图2)和遗传距离分析表(表3)中可见,YSVP14、YSVP16、YSVP19、YSVP09和YSVP10与*V. parahaemolyticus*(KR347290.1)聚为1个分支Cluster I,分支内两两之间遗传距离为0.001~0.014,平均遗传距离为0.084,与其他分支的菌株之间遗传距离在0.010~0.031之间;YSVP20单独为Cluster II,与其他分支菌株遗传距离在0.015~0.028之间;YSVP01、YSVP07和YSVP08与*V. parahaemolyticus*(KT986171.1)聚为Cluster III,分支内两两之间遗传距离为0.000~0.003,平均距离为0.002,与其他分支的菌株之间遗传距离在0.001~0.020之间;YSVP15和YSVP17为Cluster IV,分支内两两之间的遗传距离为0.010,与其他分支的菌株之间遗传距离在0.006~0.021之间;YSVP02、YSVP03、YSVP04和YSVP12为Cluster V,分支内两两之间的遗传距离为0.006~0.017,与其他分支的菌株之间遗传距离在0.004~0.031之间;YSVP18、YSVP06和YSVP11与*V. parahaemolyticus*(登录号分别为KR137715.1、MG589511.1和BA000031.2)聚为1个分支,为Cluster VI,它们两两之间的遗传距离为0.000~0.004,与其他分支的菌株之间遗传距离在0.001~0.023之间;YSVP05和YSVP13为Cluster VII,它们之间的遗传距离为0.006,与其他序列的其他菌株遗传距离在0.004~0.025之间。由此可见,16S rDNA基因对弧菌的分辨率并不高,有些分支内部两两之间的遗传距离远大于与别的分支菌株的遗传距离。分支内与分支之间的差异性无法很好区分开来。同样地,前人的研究也已经表明,对于弧菌属而言,其种间的16S rDNA序列高度相似( $\geq 97.5\%$ ),

在种内与种间遗传距离上有着非常大的重叠,导致依靠16S rDNA基因进行种水平的鉴定十分困难<sup>[30,31]</sup>。而以往的研究结果却证实了*toxR*可作为鉴别*V.p*的特异功能基因<sup>[12,32,33]</sup>。因此,本文也选择该基因对16S rDNA基因测序比对及系统发育树分析初步鉴定出的20个疑似*V.p*做进一步的分子鉴定。

## 2.2 *toxR* 分类鉴定结果

对上述20个疑似*V.p*进行*toxR*基因PCR扩增,电泳检测结果如图3所示,所有样品均出现目标条带。所有20个PCR产物测序结果在NCBI网站进行BLAST比对,发现它们均与*V.p*的*toxR*基因具有非常高的一致性,有18是100%,其余2个是99%(表4)。通过系统进化树分析(图4)和基因的遗传距离分析(表5)结果显示,在遗传距离0.006水平上,可以分为6个Clusters(Cluster A~Cluster F,图4)。YSVP01、YSVP03、YSVP06、YSVP07、YSVP08、YSVP09、YSVP11、YSVP12、YSVP14、YSVP15、YSVP16和YSVP19与*V.p*(登录号为MG873152.1,CP034565.1, MF983557.1)聚为1个分支,为Cluster A;YSVP17和YSVP18为Cluster B;YSVP02和YSVP13与*V. parahaemolyticus*(MG873153.1)聚为1个分支,为Cluster C;YSVP04与*V. parahaemolyticus*(KT194120.1)聚为1个分支,为Cluster D;YSVP05和YSVP20与*V. parahaemolyticus*(CP028342.1)聚为1个分支,为Cluster E;YSVP10与*V. parahaemolyticus*(KT194144.1)聚为1个分支,为Cluster F。各个分支内部,菌株两两之间的*toxR*基因序列遗传距离都为0.000;各个分支之间的遗传距离为0.006~0.025之间。以上分析结果表明,特异功能基因*toxR*比16S rDNA序列有着更好的分类分辨率,更适合于海洋副溶血性弧菌的分类鉴定<sup>[27,34-36]</sup>。因此,这两种方法的相互验证,可以显著提高菌株分离鉴定的准确度。

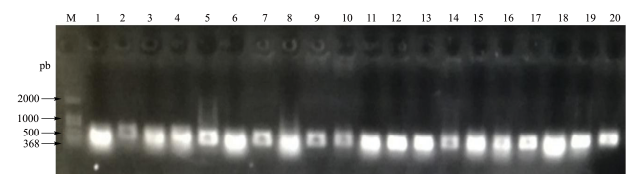


图3 疑似菌株的*toxR*基因PCR扩增产物电泳图

Fig.3 The electrophoresis map of the amplified product of suspected strains' *toxR* gene sequence

注: M: DNA Marker (DL2000); 1~20: 疑似菌株 YSVP01~YSVP20。

表 4 疑似菌株的 *toxR* 基因序列 Blastn 结果

Table 4 Blastn results of *toxR* gene sequence of suspected strains

菌株编号 (GenBank 序列号)	相似性高的菌株 (GenBank 序列号)	序列的覆盖度	最大相似性
YSVP01 (MN726884)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG873152.1)	100%	100%
YSVP02 (MN726885)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG873153.1)	100%	100%
YSVP03 (MN726886)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG873152.1)	100%	100%
YSVP04 (MN726887)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (KT194120.1)	100%	100%
YSVP05 (MN726888)	<i>V. parahaemolyticus</i> isolate (CP028342.1)	100%	100%
YSVP06 (MN726889)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG873152.1)	100%	100%
YSVP07 (MN726890)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG873152.1)	100%	100%
YSVP08 (MN726891)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG873152.1)	100%	100%
YSVP09 (MN726892)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG873152.1)	100%	100%
YSVP10 (MN726893)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (KT194144.1)	100%	100%
YSVP11 (MN726894)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG873152.1)	100%	100%
YSVP12 (MN726895)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (CP034565.1)	100%	100%
YSVP13 (MN726896)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG873153.1)	100%	100%
YSVP14 (MN726897)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MF983557.1)	100%	100%
YSVP15 (MN726898)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (CP034565.1)	100%	100%
YSVP16 (MN726899)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MF983557.1)	100%	100%
YSVP17 (MN726900)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG873152.1)	100%	99%
YSVP18 (MN726901)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG873152.1)	100%	99%
YSVP19 (MN726902)	<i>V. parahaemolyticus</i> strain (MG873152.1)	100%	100%
YSVP20 (MN726903)	<i>V. parahaemolyticus</i> isolate (CP028342.1)	100%	100%

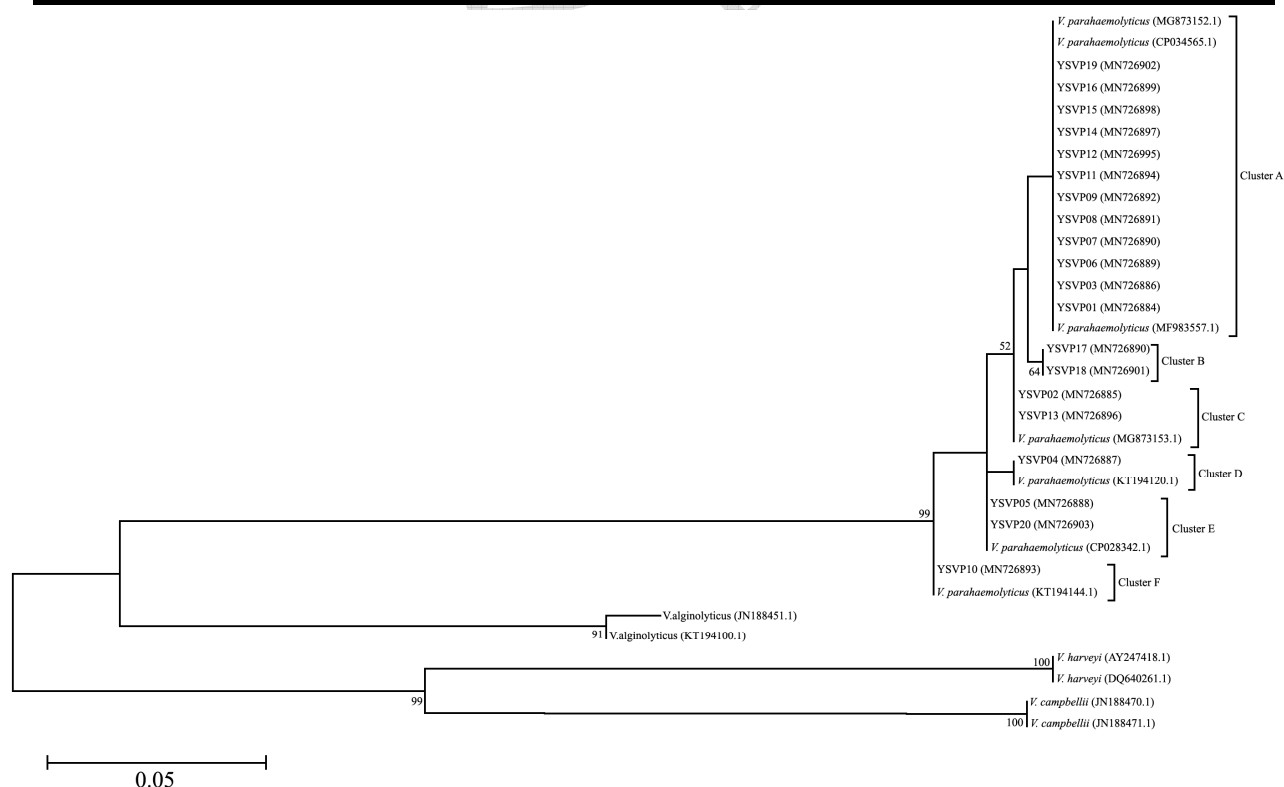


图 4 基于 *toxR* 基因序列的最大简约法系统发育树

Fig.4 Maximum likelihood phylogenetic distance tree based on *toxR* gene sequenc

表 5 基于 *toxR* 基因序列的遗传距离Table 5 The genetic distances base on *toxR* gene

序号	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
01																			
02	0.006																		
03	0.000	0.006																	
04	0.006	0.012	0.006																
05	0.012	0.006	0.012	0.006															
06	0.000	0.006	0.000	0.006	0.012														
07	0.000	0.006	0.000	0.006	0.012	0.000													
08	0.000	0.006	0.000	0.006	0.012	0.000	0.000												
09	0.000	0.006	0.000	0.006	0.012	0.000	0.000	0.000											
10	0.025	0.019	0.025	0.019	0.012	0.025	0.025	0.025	0.025										
11	0.000	0.006	0.000	0.006	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025									
12	0.000	0.006	0.000	0.006	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000								
13	0.006	0.000	0.006	0.012	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.019	0.006	0.006							
14	0.000	0.006	0.000	0.006	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.006						
15	0.000	0.006	0.000	0.006	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.006	0.000					
16	0.000	0.006	0.000	0.006	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000				
17	0.006	0.006	0.006	0.012	0.012	0.006	0.006	0.006	0.006	0.025	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006			
18	0.006	0.006	0.006	0.012	0.012	0.006	0.006	0.006	0.006	0.025	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.000		
19	0.000	0.006	0.000	0.006	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.006	0.006	
20	0.012	0.006	0.012	0.006	0.000	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.006	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012

注：序号 01~20 为菌株 YSVP01~YSVP20。



基于 16S rDNA 序列系统发育树将 20 株不同菌株分为 7 个 Cluster (图 2); 而基于 *toxR* 基因序列系统发育树则分为 6 个 Cluster (图 4)。这表明该海域在水产品养殖过程中的 *V.p* 污染途径不单一, 且 *V.p* 群体间交流频繁, *toxR* 基因的序列有水平基因转移现象, 存在交叉污染的风险<sup>[11]</sup>。

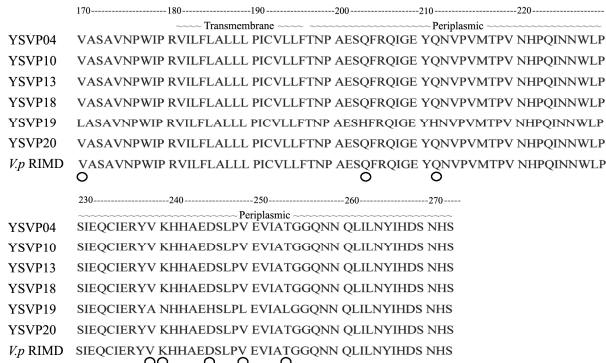


图 5 代表性 *toxR* 多序列比对结果

Fig.5 Sequence alignment of representative *toxR*

注: ○为残基变异位点。

本研究选取了 *toxR* 基因 Cluster A-F 代表序列, 与典型 *V.p* 临床爆发株 RIMD2210633 的 *toxR* 基因进行了氨基酸水平的多序列比对 (图 5)。结果发现 *toxR* 蛋白质序列具有高度的保守性, 但 YSVP19 菌株在 L170、H203、H211、A239、N240、H245、L249、L254 等位点产生变异。结合 *V.p* RIMD2210633 *toxR* 蛋白序列分析 (UniProtKB) 结

果, 本研究发现的 *toxR* 区段, 其蛋白产物主要位于跨膜及细胞周质部分 (图 5)。上述分析结果表明 *toxR* 基因在不同菌株中的进化存在差异。

### 2.3 *V.p* 菌株的致病性鉴定结果

溶血素是副溶血弧菌致病的主要因素, 包括 *tdh*、*trh* 和 *tth* (不耐热溶血素), 在临床上往往通过检测 *tdh* 基因来判定是否为流行株<sup>[2,32,37]</sup>。本研究对 20 个分离确认的 *V.p* 菌株进行 *tdh* 基因 PCR 扩增。电泳检测发现 4 条约 530 bp (*tdh*) 的目的条带, 提示这 4 个菌株可能具有致病性, 即潜在致病性 *V.p* 检出率为 20%。这些出现目标条带的 PCR 产物测序后, 进一步使用 BLAST 比对, 发现它们与副溶血性弧菌的 *tdh* 基因具有较高的相似性, 其中相似度最高的一个为 90%, 其余在 72%~89% (表 6)。系统进化树分析显示, 这 4 个菌株都与 *V.p* 聚集在一个大的分枝, 与魔鬼弧菌 (*V. diabolicus*) 和溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 明显区分 (图 6)。与前人<sup>[38]</sup>报道相似, 提示这些携带致病性基因的菌株, 极有可能引起食物中毒, 对公共卫生造成的威胁较大。但也有研究表明不携带 *tdh* 和 *trh* 基因的副溶血性弧菌也可以引起食物中毒<sup>[39-43]</sup>。因此, 传统分离鉴定方法和动物或细胞毒力试验仍是鉴定致病性的主要鉴定依据。

表 6 疑似菌株的 *tdh* 基因序列 Blasten 结果

Table 6 Blasten results of *tdh* genesequene of suspected strains

菌株编号 (GenBank 序列号)	相似性高的菌株 (GenBank 序列号)	序列的覆盖度	最大相似性
YSVP07 (MN726904)	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP023485.1)	96%	90%
YSVP07 (MN726904)	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP022243.1)	96%	89%
YSVP09 (MN726905)	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP022473.1)	97%	72%
YSVP11 (MN726906)	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP014046.2)	100%	79%
YSVP20 (MN726907)	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP022473.1)	99%	82%

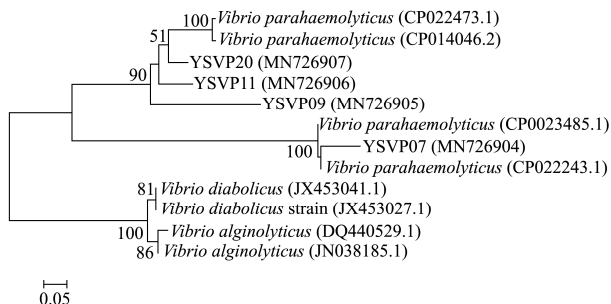


图 6 基于 *tdh* 毒力基因序列的最大简约法系统发育树

Fig.6 Maximum likelihood phylogenetic distance treebased on *tdh* genesequene

另外, 通过基于 16S rDNA 基因序列的邻接法

系统发育树 (图 2) 分析 4 株 *tdh* 阳性菌株与典型临床爆发菌株 *V.p* RIMD2210633 (BA000031.2) 的亲缘关系<sup>[44]</sup>, 发现临床爆发菌株 *V.p* RIMD2210633 与 YSVP11 聚为一个 Cluster, 其遗传距离为 0.000, 说明 YSVP11 可能与临床爆发菌株 *V.p* RIMD2210633 具有较近的亲缘关系。其它 3 株 *tdh* 阳性菌株 (YSVP07、YSVP09 和 YSVP20) 并未与临床爆发菌株 *V.p* RIMD2210633 聚为一个 Cluster, 它们分别在 3 个不同的 Clusters, 它们与临床爆发菌株 *V.p* RIMD2210633 之间的遗传距离分别为 0.001、0.018 和 0.015。这说明这 3 株 *tdh* 阳性菌株 (YSVP07、YSVP09 和 YSVP20) 与临床爆发菌株

*V.p* RIMD2210633 的亲缘关系较远。

### 3 结论

3.1 本研究通过 PCR 分子生物学方法, 从基于 TCBS 分离纯化的 109 株疑似弧菌中初步鉴定出 20 株 *V.p*, 进一步的系统发育树分析可以发现, 20 株不同菌株的 16S rDNA 和 *toxR* 基因序列仍具有一定的变异性, *toxR* 基因序列存在水平基因转移。与典型 *V.p* 临床爆发株 RIMD2210633 的 *toxR* 基因在氨基酸水平的多序列比对结果发现, 研究发现 *toxR* 蛋白质序列具有高度的保守性, 但不同菌株 *toxR* 基因之间存在位点产生变异。这表明 *toxR* 基因在不同菌株中的进化存在差异。因此, 北部湾茅尾海海域及其水产品的 *V.p* 呈现出较大的多样性, 下一步可以通过比较不同菌株基因之间的差异, 总结其变异规律, 进行相关毒力检测, 为 *V.p* 分型和致病性研究提供新的研究靶点<sup>[7,45]</sup>。

3.2 本研究所分离确认的 20 株 *V.p* 中, 有 4 株携带了 *tdh* 基因, 易引起食物中毒, 对公共卫生造成的威胁较大。当然, 除了 *tdh* 外, *V.p* 致病性是多种毒力因子(如 *trh*、*tlh*、III型分泌系统、粘附因子、鞭毛和铁摄取系统等)共同作用的结果。本研究发现的 4 株 *tdh* 阳性菌株中 YSVP11 与典型临床爆发菌株 *V.p* RIMD2210633 的亲缘关系较近, 说明 YSVP11 可能为潜在临床爆发菌株。其它 3 株 *tdh* 阳性菌株 (YSVP07、YSVP09 和 YSVP20) 并未与临床爆发菌株 *V.p* RIMD2210633 聚为一个 Cluster, 且亲缘关系较远。进一步说明, 携带 *tdh* 的副溶血性弧菌未必是高致病性菌株。因此, 亟需更进一步了解致病性 *V.p* 的生物学特性和明确其致病机制, 对致病性弧菌感染的临床诊断和防控有重要的意义。

3.3 16S rRNA 基因的分子鉴定技术已较成功地用于弧菌分类鉴定, 但该方法在特定情况下仍无法很好地鉴定副溶血性弧菌之间的差异。目前, 一般采用 *recA*、*gyrB*、*pyrH* 等管家基因, *tdh*、*tlh*、*trh* 等毒力基因和 16SrRNA 基因相结合进行特定弧菌的系统鉴定与分类研究。此外, 近年来, 基因组测序技术的快速发展和微生物基因组大数据的爆炸式增长将更有利于研究人员针对副溶血性弧菌基因组信息, 深入发掘可用于弧菌分类鉴定的功能性基因和管家基因资源, 通过不断探索新型基因分子靶标和特异性引物, 实现副溶血性弧菌精准鉴定, 完善分类系统, 从而促进海洋弧菌的多样性研究。总之, 传统的副溶血性弧菌检测方法, 已无法满足当前海洋致病性副溶血性弧菌的多样性研究和致病性菌株

的监测和防控工作需要<sup>[38]</sup>, 采用 PCR 技术研发新型特异种属的功能基因检测 *V.p* 特异种属基因和毒力基因检测势在必行。

**致谢:** 本研究在采样和样品测试过程中得到南宁师范大学本科生文洁媚和刘惠敏的大力支持, 在数据分析过程中得到南宁师范大学徐强胜博士、姜宫凌侠老师的指导, 在此一并致谢。

### 参考文献

- [1] 韩小龙, 张海燕, 曹明秀, 等. 我国海产品中副溶血性弧菌的污染现状与控制策略分析[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(7): 263-267  
HAN Xiao-long, ZHANG Hai-yan, CAO Ming-xiu, et al. Analysis on current pollution of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in China and its controlling strategy [J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(7): 263-267
- [2] Yin JF, Wang MY, Chen YJ, et al. Direct detection of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio alginolyticus* from clinical and environmental samples by a multiplex touchdown polymerase chain reaction assay [J]. Surgical Infections, 2018, 19(1): 48-53
- [3] Harth-Chu E, Espejo RT, Christen R, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for clonal identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by using capillary electrophoresis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(12): 4079-4088
- [4] Broberga C A, Caldera T J, Ortho K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants [J]. Microbes and Infection, 2011, 13(12): 992-1001
- [5] Kim MS, Jeong HD. Development of 16S rRNA targeted PCR methods for the detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environments [J]. Aquaculture, 2001, 193(3): 199-211
- [6] Kim M, Oh HS, Park SC, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64: 346-351
- [7] 冯博, 蓝英, 孙晓红, 等. 副溶血性弧菌 16S rRNA 基因序列变异规律分析[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(9): 928-934  
FENG Bo, LAN Ying, SUN Xiao-hong, et al. Sequence variation regularity analysis of 16S rRNA gene of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Food Science and

- Biotechnology, 2016, 35(9): 928-934
- [8] Crisafi F, Denaro R, Genovese M, et al. Comparison of 16S rDNA and *toxR* genes as targets for detection of *Vibrio anguillarum* in *Dicentrarchus labrax* kidney and liver [J]. Research in Microbiology, 2011, 162(3): 223-230
- [9] Franco PF, Hedreyda CT. Hedreyda, amplification and sequence analysis of the full length *toxR* gene in *Vibrio harveyi* [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 2006, 52(5): 281
- [10] 李小义,王丽萍,黄会,等.一株凡纳滨对虾病原弧菌的分离鉴定与毒力分析[J].应用海洋学学报,2015,2:190-196  
LI Xiao-yi, WANG Li-ping, HUANG Hui, et al. Isolation and identification of a bacterial pathogen, *Vibrio parahaemolyticus*, for vibriosis of *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Applied Oceanography, 2015, 2: 190-196
- [11] 周颖,高耿,李智,等.武汉市市售淡水小龙虾中副溶血性弧菌的分离鉴定及多位点序列分型[J].湖北农业科学, 2015,54(18):4548-4551  
ZHOU Ying, GAO Geng, LI Zhi, et al. Isolation, identification and multilocus sequence typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from freshwater *cambarus clarkii* in Wuhan markets [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(18): 4548-4551
- [12] Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(4): 1173-1177
- [13] Raghunath P, Acharya S, Bhanumathi A, et al. Detection and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the southwest coast of India [J]. Food Microbiology, 2008, 25(6): 824-830
- [14] 徐马俊坤,冯博,张昭寰,等.致病性副溶血性弧菌菌落杂交检测体系的优化[J].微生物学杂志,2018,38(3):23-28  
XU Ma-jun-kun, FENG Bo, ZHANG Zhao-huan, et al. Colony hybridization optimization to detect pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Microbiology, 2018, 38(3): 23-28
- [15] 李鹏飞,余庆,覃仙玲,等.广西北部湾海水养殖业现状与病害防控技术体系研究展望[J].广西科学,2018,25(1): 15-25  
LI Peng-fei, YU Qing, QIN Xian-ling, et al. Current situation and research prospects of disease control technology system of mariculture in Beibu gulf of Guangxi [J]. Guangxi Sciences, 2018, 25(1): 15-25
- [16] 陈盛峰,陈佳,禩金彩,等.北海近岸养殖海域 3 种弧菌的分离鉴定及耐药性分析[J].动物医学进展,2016,37(6): 29-34  
CHEN Sheng-feng, CHEN Jia, XUAN Jin-cai, et al. Isolation, identification and drug resistance analysis of three *Vibrio* species in aquaculture area of Beihai [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(6): 29-34
- [17] 李秀桂,唐振柱,车光,等.2006~2007 年南宁市零售水产品中副溶血性弧菌污染状况调查[J].预防医学论坛, 2009,15(2):107-109  
LI Xiu-gui, TANG Zhen-zhu, CHE Guang, et al. Survey on *Vibrio parahaemolyticus* (VP) contamination in retail seafood of Nanning city from 2006 to 2007 [J]. Preventive Medicine Tribune, 2009, 15(2): 107-109
- [18] 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  
LI Xiu-gui, HUANG Yan, TANG Zhen-zhu, et al. Active surveillance and risk assessment for *Vibrio parahaemolyticus* (VP) in aquatic products in Guangxi [J]. Practical Preventive Medicine, 2009, 16(4): 1136-1138
- [19] 姚雪婷,唐振柱,刘展华,等.广西 2010~2011 年动物性水产品副溶血性弧菌污染状况调查[J].现代预防医学, 2013,40(16):3006-3008  
YAO Xue-ting, TANG Zhen-zhu, LIU Zhan-hua, et al. Investigation on the contamination of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products of animal origin in Guangxi during 2010-2011 [J]. Modern Preventive Medicine, 2013, 40(16): 3006-3008
- [20] 李叶青,吴科明,黄嘉,等.防城港市 2011 年-2013 年食品中副溶血性弧菌污染状况与分析[J].中国卫生检验杂志, 2015,25(5):725-727  
LI Ye-qing, WU Ke-ming, HUANG Jia, et al. Monitoring and analysis of *Vibria parahaemolyticus* contamination in food in Fangchengang during 2011-2013 [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2015, 25(5): 725-727
- [21] William W G, Weisburg S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. Journal of bacteriology, 1991, 173: 697-703
- [22] YANG Zhen-quan, JIAO Xin-an, ZHOU Xiao-hui, et al. Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of

- eastern China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125: 279-285
- [23] Ok-Sun K, Yong-Joon C, Kihyun L, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62: 716-721
- [24] Neuwald AF. Gleaning structural and functional information from correlations in protein multiple sequence alignments [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2016, 38: 1-8
- [25] 孟俞辰,牛雪可,邱文,等.中国东海海水中弧菌的分离鉴定及耐药性分析[J].贵州医科大学学报,2018,43(4):11-15,21  
MENG Yu-chen, NIU Xue-ke, QIU Wen, et al. Isolation, identification and antimicrobial resistance of vibrio from East China Sea [J]. Journal of Guizhou Medical University, 2018, 43(4): 11-15, 21
- [26] 何萃萍,黄玉柳,陈秀荔,等.南宁市售文蛤中弧菌的分离鉴定[J].南方农业学报,2013,44(2):328-332  
HE Ping-ping, HUANG Yu-liu, CHEN Xiu-li, et al. Isolation and identification of vibrio strains from *Meretrix meretrix linnaeus* sold in Nanning [J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(2): 328-332
- [27] 李秀桂,蒋震羚,黄彦,等.广西北部湾海域产牡蛎中创伤弧菌污染监测调查[J].中国卫生检验杂志,2010,4:872-873  
LI Xiu-gui, JIANG Zhen-ling, HUANG Yan, et al. A survey of *Vibrio vulnificus* contamination in oysters from Beibu gulf of Guangxi [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2010, 4: 872-873
- [28] 黄玉柳,叶欣宇,黄国秋,等.文蛤生物体及内脏中弧菌的研究[J].安徽农业科学,2011,39(34):21057-21058  
HUANG Yu-liu, YE Xin-yu, HUANG Guo-qiu, et al. Research on vibrio in organism and internal organs in *Meretrix meretrix linnaeus* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(34): 21057-21058
- [29] 王国良,祝璨琳,金珊.养殖大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) 3种致病弧菌的分子鉴定及其系统发育学分析[J].海洋与湖沼,2008,39(2):162-167  
WANG Guo-liang, ZHU Jing-lin, JIN Shan. Molecular identification and phylogenetics of pathogenic vibrios in cultured large yellow croaker *pseudosciaena crocea richardson* [J]. Oceanologia & Limnologia Sinica, 2008, 39(2): 162-167
- [30] Thompson F, Gevers D, Thompson C, et al. Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of multilocus sequence analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5107-5115
- [31] Pascual J, Macin M C, Arahal D R, et al. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(1): 154-165
- [32] Haldar S, Neogi SB, Kogure K, et al. Development of a haemolysin gene-based multiplex PCR for simultaneous detection of *Vibrio campbellii*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 50(2): 146-152
- [33] 翁仕强,赵勇,潘迎捷,等.基于特异性基因的副溶血性弧菌快速分离鉴定[J].食品与生物技术学报,2011,30(3):417-421  
WENG Shi-qiang, ZHAO Yong, PAN Ying-jie, et al. Rapid isolation and identification method based on specific gene for *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(3): 417-421
- [34] 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  
LIN Jia-qi, SU Guo-cheng, HUANG Jian-wei, et al. Establishment of a quadruple PCR method for detecting pathogenic genes in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microbiology China, 2016, 43(11): 2521-2529
- [35] 曹冬梅,袁慕云,许龙岩,等.食品中副溶血性弧菌 *toxR* 和 *tdh* 基因双色荧光PCR检测方法的建立[J].食品安全质量检测学报,2013,4(5):1451-1457  
CAO Dong-mei, YUAN Mu-yun, XU Long-yan, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus toxR* and *tdh* genes in foods by dual-color fluorescent real-time PCR [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2013, 4(5): 1451-1457
- [36] 刘小青,李日升,黄静敏,等.副溶血性弧菌的检测研究[J].安徽农业科学,2017,45(32):79-80  
LIU Xiao-qing, LI Ri-sheng, HUANG Jing-min, et al. Detection research of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(32): 79-80
- [37] Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium [J]. Infection and

Immunity, 1995, 63(6): 2093-2099

- [38] 王红,唐振柱,李秀桂,等.广西不同来源副溶血性弧菌毒力基因分子特征研究[J].实用预防医学,2009,16(5):1369-1371  
WANG Hong, TANG Zhen-zhu, LI Xiu-gui, et al. Molecular virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from food and clinical samples in Guangxi [J]. Practical Preventive Medicine, 2009, 16(5): 1369-1371
- [39] 王尔群,舒玉聪,宋志琴,等.一起副溶血性弧菌食物中毒实验室检测分析[J].中国卫生检验杂志,2019,29(21): 2608-2610,2615  
WANG Er-qun, SHU Yu-cong, SONG Zhi-qin, et al. Virulence gene detection and homology analysis of one case of food poisoning caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2019, 29(21): 2608-2610, 2615
- [40] 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  
HUANG Yan, TANG Zhen-zhu, WANG Hong, et al. Detection of virulence gene and serotyping of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from one food poisoning [J]. Journal of Applied Preventive Medicine, 2012, 18(4): 197-199
- [41] 王均华,傅春玲.44株食物中毒来源副溶血性弧菌的毒力基因检测与分析[J].医疗装备,2016,29(2):52-53  
WANG Jun-hua, FU Chun-ling. Virulence gene detection and analysis of 44 strains of *Vibrio parahaemolyticus* from food poisoning [J]. Medical Equipment, 2016, 29(2): 52-53
- [42] 邵占涛,李颖,王园园,等.副溶血性弧菌食物中毒及腹泻菌株 III 型分泌系统的检测及分析[J].中国微生态学杂志,2015,27(2):159-162  
SHAO Zhan-tao, LI Ying, WANG Yuan-yuan, et al. Detection of type III secretion system in *Vibrio parahaemolyticus* from food poison cases and clinical diarrhea patients [J]. Chinese Journal of Microecology, 2015, 27(2): 159-162
- [43] 乔昕,唐震,郑东宇,等.江苏省食源性副溶血性弧菌毒力基因和同源性分析研究[J].食品安全质量检测学报, 2018,9(19):5076-5079  
QIAO Xin, TANG Zhen, ZHENG Dong-yu, et al. Virulence gene and homology analysis of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in Jiangsu province [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(19): 5076-5079
- [44] Broberg CA, Calder TJ, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants [J]. Microbes and Infection, 2011, 13(12-13): 992-1001
- [45] 谢红意,叶鸿雁,周方满,等.副溶血性弧菌海产品及临床分离株毒力基因及多位点序列分型分析[J].中国卫生检验杂志,2018,28(2): 169-171  
XIE Hong-yi, YE Hong-yan, ZHOU Fang-man, et al. Virulence genes and multilocus sequence typing of *Vibrio parahaemolyticus* seafood and clinical isolates [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2018, 28(2): 169-171

(上接第 62 页)

- [21] Fazeli P K, Lawson E A, Faje A T, et al. Treatment with a ghrelin agonist in outpatient women with anorexia nervosa: a randomized clinical trial [J]. J Clin Psychiatry, 2018, 79(1): 119
- [22] Kawai K, Nakashima M, Kojima M, et al. Ghrelin activation and neuropeptide Y elevation in response to medium chain triglyceride administration in anorexia nervosa patients [J]. Clin Nutr ESPEN, 2017, 17: 100-104
- [23] Monteleone AM, Castellini G, Volpe U, et al. Neuroendocrinology and brain imaging of reward in eating disorders: a possible key to the treatment of anorexia nervosa and bulimia nervosa [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2018, 80(Pt B): 132-142
- [24] 李玉霞,史正刚,祁辉.小儿开胃增食合剂对厌食症幼龄大鼠胃窦组织生长素、血管活性肠肽及其受体表达的影响[J].中国中医药信息杂志,2019,26(12):50-55  
LI Yu-xia, SHI Zheng-gang, QI Hui. Effect of Xiaokerkaiweizengshi mixture on the expression of ghrelin, vasoactive intestinal peptide and their receptors in gastric antrum of anorexia young rats [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine Information, 2019, 26(12): 50-55