

# 沿海地区副溶血弧菌的 表型及其主要毒力基因分布特征

周向阳<sup>1</sup>,王淑娜<sup>1</sup>,周秀锦<sup>1</sup>,方维焕<sup>2</sup>

(1. 舟山出入境检验检疫局,浙江 舟山 316000; 2. 浙江大学 动物预防医学研究所,浙江 杭州 310029)

**摘要:** 为了调查浙江沿海地区副溶血弧菌的分布及其携带毒力基因的特征,在舟山、象山、温州三地实地采样 385 份,包括海水、泥土和水产品等,共分离到副溶血弧菌菌株 278 份,其中 27 株为 *tdh* 基因阳性,阳性率为 9.7%,*trh* 与 *ureC* 基因的阳性率分别为 22.3% 与 11.8%,提示浙江沿海地区广泛存在着致病性副溶血弧菌污染。将不同来源副溶血弧菌的 *tdh* 和 *trh* 基因进行序列测定,进化树分析发现,环境分离株中 *tdh* 基因与临床分离株中 *tdh* 基因区分为 2 簇,而环境分离株与临床分离株中 *trh* 基因之间却没有明显的差异。研究结果可为浙江沿海地区副溶血弧菌的风险评估提供参考。

**关键词:** 副溶血弧菌; 环境分离株; *tdh* 基因; *trh* 基因; *ureC* 基因

中图分类号: S43 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)01-0192-05

## *Vibrio parahaemolyticus* Strains from Zhejiang Coastal Areas: Phenomena and Distribution of Major Virulent Genes

ZHOU Xiang-yang<sup>1</sup>, WANG Shu-na<sup>1</sup>, ZHOU Xiu-jin<sup>1</sup>, FANG Wei-huan<sup>2</sup>

(1. Zhoushan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhoushan 316000, China;

2. Institute of Preventive Veterinary Medicine of Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** To investigate the distribution of virulence genes in *V. parahaemolyticus* isolates from the marine aquaculture system in the coastal cities in Zhejiang province, a total of 278 *V. parahaemolyticus* isolates were recovered from 385 samples of seawater, mud and seafoods in Zhoushan, Xianshan and Wenzhou city and then investigated for their hemolytic and urease producing phenotypes, presence of putative virulence genes *tdh* and *trh* genes. Twenty-seven isolates (9.7%) were *tdh*-positive while sixty-two isolates (22.3%) and thirty-three isolates (11.8%) were positive for *trh* and *ureC* genes, respectively, and the results showed that the contamination of pathogenic *V. parahaemolyticus* in Zhejiang coastal areas. The *tdh* and *trh* genes from the isolates which were detected positive by PCR were further cloned and sequenced, phylogenetic analysis indicated that all the *tdh* genes from seafood-related samples were clustered in the same group, while the *tdh* genes from clinical isolates fell into a separate group. There were no significant differences of the *trh* genes between seafood-related isolates and those from clinical source. The results gave the important reference for the *V. parahaemolyticus* risk assessment of Zhejiang province.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; Environmental strains; *tdh* gene; *trh* gene; *ureC* gene

副溶血弧菌是危害海水养殖业的主要病原菌之一,而且食用被该菌污染的海产品会引起人类食物中毒<sup>[1]</sup>。耐热直接溶血素(TDH)和TDH相关溶血素(TRH)分别由*tdh*和*trh*基因编码,它们被认为是副溶血弧菌主要致病因子<sup>[2]</sup>。研究表明,几乎所有的临床分离株都可产生神奈川现象(KP),而这与

TDH有关。Joseph等<sup>[3]</sup>曾检测了215份副溶血弧菌临床分离株,发现有52株(24.3%)仅携带*trh*基因。部分副溶血弧菌临床分离株可产生尿素酶,纯化的尿素酶可引起乳鼠肠液的积聚<sup>[4]</sup>。尿素酶阳性表型与副溶血弧菌携带*trh*基因有关,尿素酶基因簇与*trh*基因连锁<sup>[5]</sup>。然而,副溶血弧菌环境分

离株中很少检测到 *tdh* 与 *trh* 基因。

研究表明,大部分副溶血弧菌环境分离株并不会使人类致病,却能引起虾、蛤、蚌及鱼类的疾病,该菌在海水养殖环境中的分布与地理环境、水温以及盐度有关<sup>[6]</sup>。然而,从分子流行病学角度看,不同来源副溶血弧菌的主要毒力基因的分布及其与致病性的关系还需深入探讨。本研究调查了浙江沿海地区(舟山、象山、温州)副溶血弧菌的污染状况,初步探索了不同来源副溶血弧菌的主要毒力相关基因 *tdh*、*trh* 和 *ureC* 的分布特征,旨在为深入研究副溶血弧菌的致病性及其分子演化提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品收集与菌株分离

从舟山、象山、温州的水产养殖区采集样本 385 份,包括鱼类、贝类、虾类及养殖塘的泥土和水。样

本置于无菌独立采样袋中封好,根据国标法进行增菌培养后分离可疑副溶血弧菌<sup>[7]</sup>。副溶血弧菌临床株(来自食物中毒及胃肠炎病人)由浙江省疾控中心惠赠;参考株 BJ97 购自中国普通物种保藏中心。

### 1.2 试剂与仪器

*Taq* 酶、10 × PCR Buffer、dNTPs 购自北京鼎国生物技术公司;碱性蛋白胨水、TCBS 琼脂、莪麦氏琼脂购自北京陆桥公司;尿素酶试剂盒购自福建三强生化公司。试验仪器有 Hybaid PCR 仪、Sorall 高速冷冻离心机、核酸电泳仪、凝胶成像系统( PHAR-MACIA)等。

### 1.3 引物设计与序列测定

利用 Primer 3.0 设计 PCR 引物,并由上海英骏生物技术公司合成。所有 DNA 片段由上海英骏生物技术公司测序。

表 1 PCR 反应引物对、靶基因、预扩增片段长度

Tab.1 List of PCR primers ,target genes and amplicon sizes

| 基因<br>Genes |                | 序列( 5'-3')<br>Sequences( 5'-3') | 长度 /bp<br>Sizes | 参考文献<br>References                        |
|-------------|----------------|---------------------------------|-----------------|---|
| <i>gyrB</i> | <i>gyrB</i> -a | CGGCGTGGGTGTTTCGGTAGT           | 285             | ( Venkateswaran ,K<br><i>et al</i> ,1998) |
|             | <i>gyrB</i> -b | TCCGCTTCGCGCTCATCAATA           |                 |   |
| <i>tlh</i>  | <i>tlh</i> -a  | AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG        | 450             | ( Venkateswaran ,K<br><i>et al</i> ,1998) |
|             | <i>tlh</i> -b  | GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC        |                 |   |
| <i>tdh</i>  | <i>tdh</i> -F  | GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC         | 270             | ( Bej <i>et al</i> ,1999)                 |
|             | <i>tdh</i> -R  | TGGAATAGAACCCTTCATCTTCACC       |                 |   |
| <i>trh</i>  | <i>trh</i> -F  | TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT        | 486             | ( Bej <i>et al</i> ,1999)                 |
|             | <i>trh</i> -R  | CATAACAAACATATGCCCATTTCCG       |                 |   |
|             | <i>trh</i> -1  | ATCCATACCTTTTCCTTCTCC           |                 |   |
|             | <i>trh</i> -2  | TCTGATTTTGTGAAGACCGT            |                 |   |
| <i>ureC</i> | <i>ureC</i> -a | GTCATTGCTGGTGAAGGTAATA          | 623             | This study                                |
|             | <i>ureC</i> -b | GAAGGATCTAAGTGATGGCAGAC         |                 |   |

### 1.4 神奈川与尿素酶试验

副溶血弧菌在含 3% NaCl 的 LB 培养基中过夜培养,取 10 μL 菌液加至莪麦氏琼脂中培养 24 h,呈 β 溶血时判为 KP 阳性;取 100 μL 菌液加至尿素酶琼脂中培养 24 h,呈玫红色者判为尿素酶阳性。

### 1.5 O 血清型分型

取副溶血性弧菌过夜培养液,离心沉淀后用 3% 盐水作成较浓的菌悬液。菌悬液经 121℃ 高压 1 h,进行 O 抗血清玻片凝集试验。

### 1.6 双重 PCR 鉴定与毒力基因的检测

按照基因试剂盒法抽提副溶血弧菌基因组 DNA。PCR 反应体系为 10 × PCR Buffer 3 μL、10 mmol/L dNTP 0.5 μL、*tlh* 与 *gyrB*( 50 μmol/L ) 上下游引物各 0.5 μL、DNA 3 μL 和 *Taq* 酶 0.7 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 补充体积至 30 μL。PCR 反应条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 1 min ,58℃ 1 min ,72℃ 1 min ,30 个循环; 72℃ 5 min。反应后用含 0.5 mg/L Goldview 染料的

琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶成像系统下拍照并记录结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 副溶血弧菌污染状况调查

385 份样品均根据国标法预增菌,获得的目标细菌培养物经生化试验筛选,再经双重 PCR 反应体系检测,结果副溶血弧菌的检出率为 71.8% ,其中水样检出率 65.5% ( 57/87 ) ,贝类 78.6% ( 55/70 ) ,泥样 73.1% ( 68/93 ) ,虾类 84.5% ( 82/97 ) ,其他 42.1% ( 16/38 ) ( 图 1 )。

### 2.2 血清学分型结果

取 30 株 *tdh* 或/和 *trh* 基因阳性的副溶血弧菌环境分离株进行血清学分型,其中 O1 ,O10 ,O11 ,O5 ,O9 血清型分别占 29.2% ,13.3% ,6.67% ,10% ,3.35%。另外,有 4 株为 O3 血清型,3 株为 O4 血清型,该 7 株副溶血弧菌均采自温州。

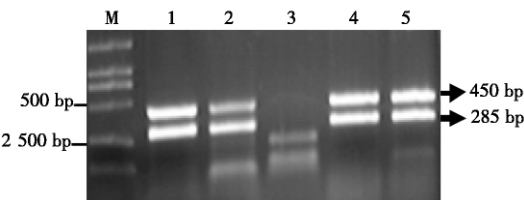
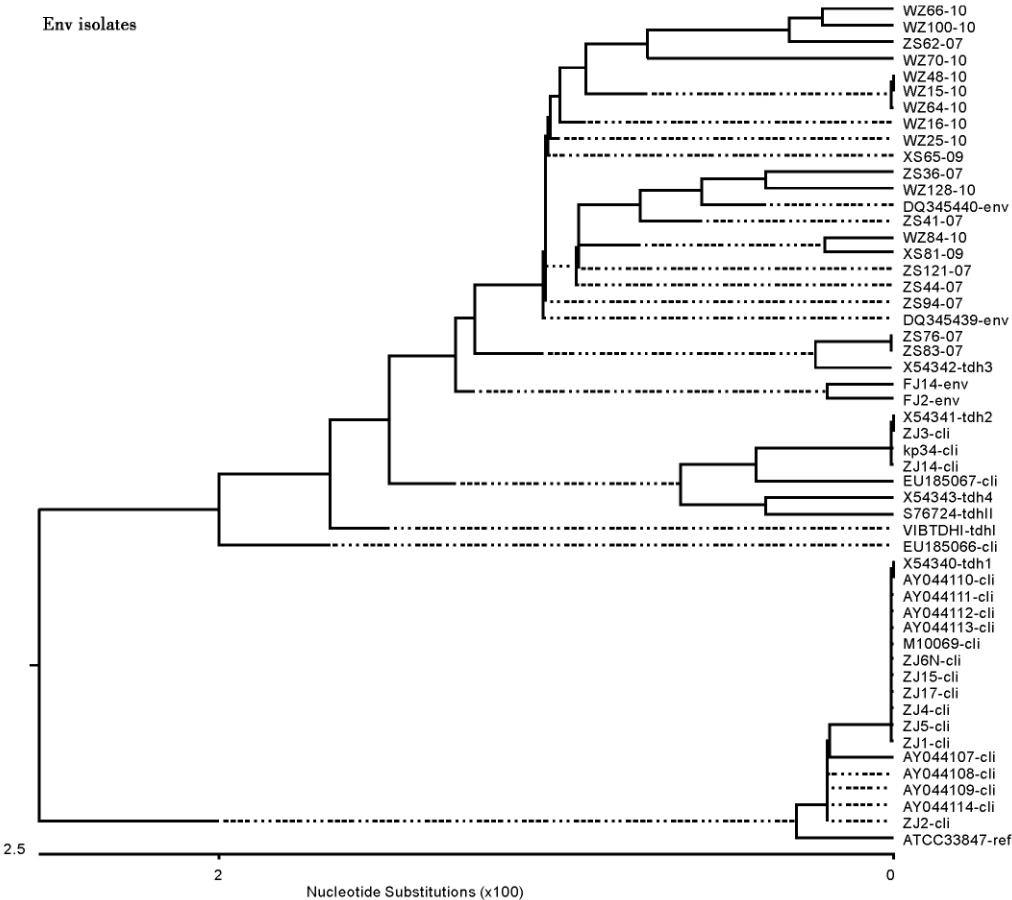


图1 双重PCR鉴定海产品相关样品中的副溶血弧菌  
Fig.1 Duplex PCR identification of the *V. parahaemolyticus* isolates from samples

2.3 副溶血弧菌海产品相关分离株的表型与基因型  
对278株海产品和环境分离株的检测发现 *tdh* 基因携带率为9.71% (27/278), *trh* 基因检出率为22.30% (62/278)。 *ureC* 基因为11.8% (33/278), 且该33株细菌均携有 *trh* 基因,然而仅3株呈尿素酶阳性表型。除了ZS121WZ66、*tdh* 基因阳性的海产品相关分离株均能在莪麦氏琼脂上表现明显的β-溶血现象。

2.3.1 *tdh* 基因分析 将27株携带副溶血弧菌的 *tdh* 基因全部克隆测序,并从Genbank数据库获取不同来源的副溶血弧菌 *tdh* 基因序列,用MegaAlign软件进行序列比对<sup>[7]</sup>(图2)。副溶血弧菌临床分离株与海产品相关分离株明显地分成2个分枝,其中所有海产品相关分离株均与 *tdh3* 基因(登陆号: X54342)关系较近,而临床分离株与 *tdh1* *tdh2* *tdh4* (登陆号为: X54340, X54341, X54343)基因处于同一簇,提示副溶血弧菌临床株与海产品相关株 *tdh* 基因之间有明显的差异。经 *tdh* 基因氨基酸序列比对发现,海产品相关分离株与临床分离株中 *tdh* 基因的氨基酸序列上主要有74,113,123 3个位点氨基酸发生了变异,临床分离株中为谷氨酸、丝氨酸和甘氨酸,而海产品相关分离株中三位点分别为赖氨酸、精氨酸和天冬氨酸。



| 变异位点 (570 bp)                                 | 核苷酸( nt) Nucleotide |                   |                   |                  |                  | 氨基酸( AA) Aminoacids |    |     |     |     |
|---|---------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|---------------------|----|-----|-----|-----|
| Variable sites                                | 220                 | 268               | 337               | 368              | 378              | 74                  | 90 | 113 | 123 | 126 |
| 临床株<br>Clinical isolates                      | C <del>C</del> A    | T <del>T</del> GC | A <del>A</del> GC | G <del>G</del> T | CAA <del>A</del> | E                   | L  | S   | G   | Q   |
| 海产品相关株<br><i>V. parahaemolyticus</i> isolates | C <del>C</del> A    | C <del>C</del> TC | C <del>C</del> GC | C <del>C</del> T | C <del>C</del> A | K                   | L  | R   | D   | Q   |

图2 基于 *tdh* 基因的不同来源的副溶血弧菌进化关系及序列分析  
Fig.2 The phylogenetic tree and sequence analysis based on *tdh* depicting the genetic relationship between 27 *V. parahaemolyticus* isolates and clinical isolates( Cli: clinical; env: environmental )

表 2 副溶血弧菌海产品相关分离株 *trh* 基因序列分析

Tab.2 Nucleotide sequences of the *trh* gene of *V. parahaemolyticus* homologous to those of the *trh1* and *trh2* genes

| 菌株 Isolates  | 同源性/% Homologous           |                            |                            |                            |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|  | <i>trh1</i><br>( DQ359748) | <i>trh1</i><br>( AY742213) | <i>trh2</i><br>( DQ359750) | <i>trh2</i><br>( AY034609) |
| WZ90 ,WZ115 , WZ23 ,XS65 ,ZS6-3 ,ZS49 ,<br>ZS51 ,ZS44 ,WZ15 ,XS73 ,DL60 ,H8 ,XS76 ,<br>FJ2 ,FJ14 | 99.2                       | 98.8                       | 83.7                       | 82.3                       |
| ZS16 ,ZS48   | 84.3                       | 84.7                       | 95.1                       | 96.3                       |
| ZS41 ,BJ97   | 85.4                       | 85.8                       | 95.1                       | 96.4                       |
| WZ66   | 84.7                       | 85.1                       | 94.7                       | 95.9                       |
| ZS46 ,ZS62   | 83.9                       | 84.3                       | 94.7                       | 95.9                       |
| ZS22   | 83.1                       | 83.5                       | 98.8                       | 100                        |
| H10  | 84.2                       | 84.6                       | 98.8                       | 100                        |

2.3.2 *trh* 基因分析 随机选取 22 株 *trh*<sup>+</sup> 副溶血弧菌弧菌海产品相关分离株 ,克隆其 *trh*( 285 bp) 基因并测序。序列比对结果见表 2 ,15 个菌株 *trh* 归属于 *trh1* ,7 个菌株 *trh* 归属于 *trh2*。相对于 *trh2* 基因 ,*trh1* 基因比较保守: 15 株副溶血弧菌 *trh1* 同源性均为 100%; 而 *trh1* 与 *trh2* 的同源性为 82.3% ~ 85.8% ,因而可根据该 285 bp 的 *trh* 序列进行分型。

3 讨论

在 278 株副溶血弧菌海产品相关分离株中 ,9.7% 的菌株 *tdh* 呈阳性 ,22.3% 的菌株都携带有 *trh* 基因 ,提示浙江沿海地区副溶血弧菌不仅分布广泛 ,而且具有较高的毒力基因携带率。试验过程中发现 ,同份样本中也可分离到其他种的弧菌 ,如拟态弧菌。Nishibuchi 于 1995 年曾报道拟态弧菌、霍乱弧菌等基因组中都有类似 *tdh*、*trh* 基因<sup>[8]</sup> ,这些基因在弧菌种属间的传播可能是副溶血弧菌海产品相关分离株中 *tdh*、*trh* 检出率高的原因之一。研究显示 ,夏季海水和海藻样品中 *tdh* 与 *trh* 的检出率分别为 41.7% ,16.7% ,秋季采样发现 ,两基因的检出率分别为 37.5% ,14.6%<sup>[9]</sup>。副溶血弧菌中 *tdh* 和 *trh* 的检出率呈现逐年上升趋势<sup>[10]</sup> ,Deepanjali 于 2005 年也报道副溶血弧菌中 *trh* 基因的检出率高达 59.3%<sup>[11]</sup>。然而 ,早期普遍认为副溶血弧菌环境株的 *tdh* 与 *trh* 的携带率仅在 1% ~ 2%<sup>[8]</sup>。

所有菌株中若 *tdh* 阴性 , $\beta$  溶血试验则呈阴性; *tdh* 阳性 ,溶血试验则大部分阳性。副溶血弧菌养殖海产品相关分离株 ZS121、WZ66 中 *tdh* 基因 PCR 检为阳性 ,却无溶血现象 ,可能是由于这些菌株中 *tdh* 基因的低量表达所致<sup>[8]</sup>。与临床株的 *tdh* 基因序列比对显示 ,副溶血弧菌海产品相关分离株所含 *tdh* 与 *tdh3* 基因亲缘关系更为接近。尽管只检测到 3 株尿素酶阳性的副溶血弧菌 ,而在 62 株 *trh* 基因阳性分离株中 ,仍然有 33 份可以检测到 *ureC* 基因 ,其中 *ureC* 基因是尿素酶基因簇中最稳定的结构基因<sup>[12]</sup>。部分

菌株尿素酶基因簇中的 *nik* 片段 PCR 检为阴性 ,推断无尿素酶表型者是由 *nik* 基因簇与其他伴侣基因的缺失或突变所致。有研究认为尿素酶是 *trh* 基因存在的标志<sup>[12]</sup> ,但两者并不存在完全的连锁 ,*trh* 与尿素酶基因的表达与调节关系还需深入探索。总之 ,不同来源副溶血弧菌分离株的毒力基因呈现多态性分布 ,副溶血弧菌海产品相关分离株的致病性、基因型等方面与临床分离株有明显的差别。

参考文献:

[1] 王璐华 ,宁喜斌. 副溶血性弧菌生长预测模型的建立与应用探讨[J]. 华北农学报 ,2008 ,23( 增刊) : 263 - 267.

[2] 胡兴娟 ,王淑娜 ,周向阳 ,等. 水产品中的副溶血弧菌和霍乱弧菌双重荧光定量 PCR 快速检测方法的建立[J]. 河南农业科学 ,2010( 9) : 121 - 124.

[3] Joseph S W ,Colwell R R ,Kaper J B. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios[J]. Crit Rev Microbiol ,1982 ,10: 77 - 124.

[4] Cai Y ,Ni Y. Purification ,characterization ,and pathogenicity of urease produced by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J Clin Lab Anal ,1996 ,10( 2) : 70 - 73.

[5] Okuda J ,Ishibashi M ,Abbott S L *et al.* Analysis of the *tdh* and the *trh* genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States[J]. J Clin Microbiol ,1997 ,35: 1965 - 1971.

[6] Mark L ,Tamplin. Coastal Vibrios: Identifying relationships between environmental condition and Human disease[J]. Hum and Ecol Risk Assess ,2001 ,7( 5) : 1437 - 1445.

[7] 王振军 ,刘玉霞 ,刘新涛 ,等. 用 16S rDNA 序列分析方法鉴定 4 个拈抗菌[J]. 河南农业科学 ,2006( 5) : 89 - 93.

[8] Nishibuchi M ,Kaper J B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium[J]. Infect Immun ,1995 ,63: 2093 - 2099.

[9] Zahid H M ,Afework K ,Alizadeh M ,*et al.* Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel ,Japan[J]. Microbiol Research ,2006 ,161: 25 - 37.

[10] Deepanjali A ,Kumar H S ,Karunasagar I *et al.* Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oysters along the southwest coast of India[J]. Appl Environ Microbiol ,2005 ,71: 3575 - 3580.

[11] DePaola A ,Kaysner C A ,Bowers J *et al.* Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington Texas and New York( 1997 and 1998) [J]. Appl Environ Microbiol ,2000 ,66: 4649 - 4654.

[12] Kwon-Sam Park ,Tetsuya Iida ,Yoshiharu Yamaichi ,*et al.* Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Infect and Immun ,2000 ,10: 5742 - 5748.