

文章编号: 1674-5566(2019)06-0848-09

DOI:10.12024/jsou.20181102433

虾源副溶血弧菌致病基因检测与 ERIC-PCR 分型

张海强, 安伟, 肖雨

(上海市水产研究所 上海市水产技术推广站, 上海 200433)

摘要: 为了监测上海市养殖对虾中副溶血弧菌致病基因的携带情况及潜在致病株流行情况, 采用 PCR 方法对上海地区不同对虾养殖单位中分离获得的 19 株副溶血弧菌分离株及 1 株标准菌株进行 6 种致病基因的检测筛查, 并采用 ERIC-PCR 方法进行基因分型分析。结果发现: 19 株副溶血弧菌中未检测出携带 *tdh*、*ORF8* 基因, 只有 1 株携带 *trh* 基因, 而 *tox RS/new* 基因携带率较高, 19 株中有 14 株检出阳性, 基因携带率为 73.7%。对能够引起对虾急性肝胰腺坏死病 (AHPND) 的副溶血弧菌特异性质粒基因的检测中发现, *API* 和 *AP2* 基因均有 3 株检测出阳性, 基因携带率均为 15.8%。通过 ERIC-PCR 分型技术将 20 株副溶血弧菌分成 7 个不同的类群, 其分辨力指数 *DI* 值为 0.811, 表明 ERIC-PCR 具有较好的基因分型能力, 分型结果发现该方法能够有效区分不同时间段获得的菌株, 而对不同地理位置获得的菌株区分并不明显。以上结果表明从养殖对虾中分离得到的副溶血弧菌致病基因携带率总体偏低, 但存在一定的流行风险, 需要防范一些新的致病株的流行, 这些可以为对虾养殖单位中副溶血弧菌致病流行株的预防控制提供相关参考。

关键词: 副溶血弧菌; 致病基因; ERIC-PCR; 基因分型

中图分类号: S 917.1; TS 201.3 **文献标志码:** A

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, Vp) 是一种革兰氏阴性、无芽孢的兼性厌氧杆菌, 广泛存在于海洋及河口等水域环境及鱼、虾、贝类等水生生物的体内^[1]。人们生食或食用不完全煮熟的被该致病菌污染的水产品可导致食物中毒, 从而引发肠胃炎、败血症等疾病^[2]。目前, 该菌已成为我国首要的食源性致病菌^[3]。副溶血弧菌不仅是引起人类急性食物中毒的重要致病菌, 同时也是多种水生动物的条件致病菌, 可引起大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)^[4]、杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*)^[5]、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[6]、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[7]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[8] 等水生动物发病。此外, 携带有特异性质粒的副溶血弧菌还能导致对虾患急性肝胰腺坏死病 (acute hepatopancreas necrosis disease, AHPND)^[9], 且发病后死亡率高达 100%。由此可见, 由副溶血弧菌引起的水生动物病害往往会给水产养殖业造成巨大的经济

损失, 需引起足够重视。

当前, 国内外学者^[3,10] 针对弧菌对人体及水生动物的致病机理开展了大量的研究工作。研究表明: 弧菌的致病性主要取决于弧菌与宿主间的相互作用, 主要致病过程包括: 粘附、侵袭、增殖以及产生毒素等; 在整个过程中, 溶血性毒素、尿素酶、粘附相关因子、胞外蛋白酶、Ⅲ型分泌系统等诸多致病因子发挥着重要作用^[3]。然而, 还不太清楚弧菌对于水生动物的分子致病机理, 它们的关键毒力基因还未被确定^[10], 但有研究^[11] 证实, 高毒力副溶血弧菌的特异性 *pVA* 质粒上携带 *API* 或 *AP2* 基因时, 可导致对虾急性肝胰腺坏死病的发生。

快速、准确地对副溶血弧菌进行细致分型及比较菌株间亲缘关系, 对副溶血弧菌流行病学调查、预防和控制具有重要意义^[12]。传统的血清学分型方法分辨率不高、操作复杂、耗时长, 且很多菌株不能用此法分型; 而从基因水平进行分型可

收稿日期: 2018-11-15 修回日期: 2019-03-26

基金项目: 上海市农委青年人才项目 (SYXF011719); 上海市虾类产业技术体系 (沪农科产字 [2014] 第 5 号); 上海市科技兴农重点攻关项目 (沪农科政字 [2014] 第 7-3-5 号)

作者简介: 张海强 (1989—), 男, 硕士, 工程师, 研究方向为水生动物病原诊断与防治。E-mail: hqzhang021@126.com

从根本上区分菌株的差异,且结果比血清学分型方法更具可靠性^[13]。随着细菌基因分型方法的快速发展,利用肠杆菌基因间共有重复序列 PCR 技术 (enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR, ERIC-PCR) 开展副溶血弧菌的基因分型研究已有一些报道^[14],目前国内外学者针对副溶血弧菌的相关致病基因及基因分型开展相关研究^[15-16],但试验菌株是从海产品和环境等分离得到的,而针对分离自低盐度淡化养殖的虾源副溶血弧菌开展相关研究则未见报道。此外,针对携带特异性 *pVA* 质粒的副溶血弧菌的研究,目前国内仅见少量报道^[17]。

本研究以从上海市郊区低盐度淡化养殖的对虾体内分离到的 19 株副溶血弧菌为研究对象,同时设置 1 株标准菌株作为参考菌株,对该菌的 4 种致病基因 *tdh*、*trh*、*ORF8*、*tox RS/new* 携带情况进行检测,并针对能够引起对虾 AHPND 的副溶血弧菌特异性 *pVA* 质粒基因 *API*、*AP2* 进行了筛查,同时运用 ERIC-PCR 分子分型方法对分离株基于基因片段大小及其分子多态性开展了分型研究,旨在了解上海地区虾源副溶血弧菌相关致病基因的携带及基因分型情况,分析其潜在致病性菌株的分布,为进一步开展该菌的流行趋势预测及同源性追踪等方面研究工作提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及编号

2014 年 7 月—2015 年 9 月,从上海地区 19 个池塘养殖虾类样品中陆续分离获得 19 株副溶血性弧菌,菌株保藏编号为 B01901 ~ B01919,并按分离时间顺序分别编号为 Vp1 ~ Vp19,1 株副溶血弧菌标准株 ATCC17802 编号 Vp20,购自中国科学院微生物研究所。19 株分离株中 Vp1 ~ Vp10 为 2014 年分离,Vp11 ~ Vp19 为 2015 年分离,所有菌株经生化鉴定和分子生物学 16S rDNA

鉴定,并采用甘油冷冻保存法将所有分离株保存于 -80 °C 冰箱。其中:Vp1、Vp3、Vp4 分离自同一养殖单位;Vp2、Vp6、Vp7、Vp9、Vp10、Vp14 分离自同一养殖单位;Vp5、Vp8、Vp13、Vp17 分离自同一养殖单位;菌株中 Vp1 ~ Vp18 均分离自凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*),Vp19 分离自罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)。

1.2 主要试剂

胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB) 购自北京陆桥技术有限责任公司;Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、Agarose B、4s Red plus 核酸染色剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司;PCR Premix *Taq* 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 菌株活化

将保存于 -80 °C 冰箱的菌株冻存液室温解冻后,用接种环挑取 1 环菌液划线接种到 TSA 斜面培养基上,然后置于生化培养箱中,于 30 °C 培养 24 h 后,挑取单个菌落接种到 TSB 液体培养基中,置于摇床培养箱,37 °C、180 r/min 振荡培养 8 ~ 12 h,获得的菌悬液用于提取细菌基因组 DNA 和质粒 DNA。

1.4 致病基因检测方法

1.4.1 基因组和质粒 DNA 的提取

分别取适量上述经活化的菌悬液,置于离心管内,8 000 r/min 离心 2 min,收集菌体,分别按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒和柱式细菌质粒 DNA 抽提试剂盒说明步骤进行操作,提取各菌株基因组和质粒 DNA,保存于 -20 °C 冰箱备用。

1.4.2 引物设计与合成

参照茆丹^[1]的方法设计合成基因组基因 *tdh*、*trh*、*ORF8*、*tox RS/new* 检测引物;参照 LEE 等^[18]的方法设计合成质粒基因 *API*、*AP2* 检测引物,引物序列见表 1,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 6 种致病基因的引物序列

Tab.1 Primer sequences of 6 pathogenic genes

目的基因 Target gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	PCR 产物大小 PCR product size/bp
<i>tdh</i>	F:GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC R:TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC	269
<i>trh</i>	F:TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT R:CATAACAAACATATGCCCAATTCCG	500
<i>ORF8</i>	F:GTTCCGATACAGTTGAGG R:AAGTACAGCAGGAGTGAG	700
<i>tox RS/new</i>	F:TAATGAGGTAGAAACA R:ACGTAACGGCCTACA	651
<i>API</i>	F:CCTTGGGTGCTTAGAGGATG R:GCAAACATATCGCGCAGAACACC	700
<i>AP2</i>	F:TCACCCGAATGCTCGCTTGTGG R:CGTCGCTACTGCTAGCTGAAG	700

1.4.3 致病基因的 PCR 扩增

PCR 反应体系(50 μL):PCR Premix 25 μL , 上、下游引物各 1 μL , DNA 模板 2 μL , 补充无菌双蒸水至 50 μL , 实验同时设置无菌双蒸水作为阴性对照模板。

PCR 反应程序为 *tdh*、*trh* 基因:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。*ORF8* 基因:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。*tox RS/new* 基因:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s,46 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。*API*、*AP2* 基因:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.4.4 PCR 产物检测

采用 100 $\mu\text{L/L}$ 4s Red plus 核酸染色剂染色,1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物检测,用 DL2 000 DNA 标准分子质量作为对照。在 5 V/cm 电压条件下电泳 30 min 后,用紫外凝胶成像系统观察电泳结果并拍照。

1.5 分离株的 ERIC-PCR 分型

1.5.1 引物设计与合成

参照马月姣等^[19]方法设计分离株分型引物,引物序列为 ERIC-F:5'-ATGTAAGCTCCTGGGGA TTCAC-3',ERIC-R:5'-AAGTAAGTACTGGGCTG AGCG-3',由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.5.2 ERIC-PCR 扩增

PCR 扩增反应体系为 25.0 μL ,体系中含有

2.5 μL 10 \times PCR 反应缓冲液,1.5 μL 2.5 mmol/L Mg^{2+} ,1.5 μL 2.0 mmol/L dNTP,1.0 μL 正反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)混合液,1.0 U *Taq* 聚合酶以及 1.0 μL 模板 DNA,补充无菌水至 25.0 μL ,同时设置无菌双蒸水作为阴性对照模板。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5.3 ERIC-PCR 产物的电泳检测

采用 100 $\mu\text{L/L}$ 4s Red plus 核酸染色剂染色,1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物检测,用 DL10 000 DNA 标准分子质量作为对照。在 5 V/cm 电压条件下电泳 40 min 后,用紫外凝胶成像系统观察电泳结果并拍照。

1.5.4 ERIC-PCR 图谱分析

ERIC-PCR 电泳图谱首先采用 Quantity One (Bio-Rad, USA) 软件进行扩增条带分析,识别结果记录方法:针对某一条带,软件自动识别后“有”记做“1”,“无”记做“0”,并辅助相应的人工校对;再采用 NTSYSpc 2.1 软件计算得到 Jaccard 的遗传相似性系数矩阵和遗传距离矩阵,随后利用遗传距离矩阵采用非加权配对算术平均法(unweighted pair-group method with arithmetic mean,UPGMA)对分离株进行遗传聚类分析;最后根据聚类结果进行系统进化树的构建,比较不同来源菌株间的亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 分离株致病基因检测结果

所有菌株均未检测出 *tdh* 和 *ORF8* 致病基

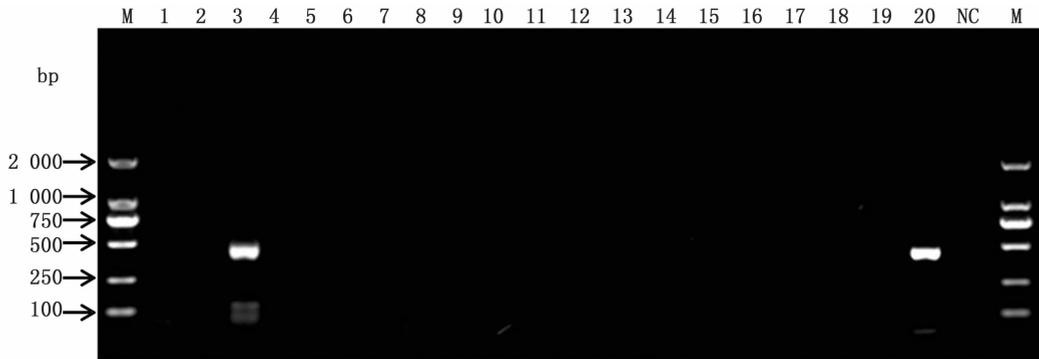
因;仅分离株 Vp3 和标准株 Vp20 检出 *trh* 基因,其余分离株均未检出(图 1),该基因在 19 株分离株中携带率为 5.3%;除分离株 Vp5、Vp10、Vp11、Vp13 和 Vp19 及标准株 Vp20 未检出 *tox RS/new* 基因外,其余 14 株分离株均检出 *tox RS/new* 基因(图 2),在 19 株分离株中基因携带率为 73.7%。

针对能够引起虾类 AHPND 的高毒力副溶血弧菌特异性质粒上携带 *API* 或 *AP2* 致病基因的检测结果表明, Vp12、Vp14、Vp19 分离株检出携带 *API* 致病基因(图 3), Vp14、Vp18、Vp19 分离株检出携带 *AP2* 致病基因(图 4),两者的携带率均为 15.8%。由图 3、图 4 可知, *API*、*AP2* 致病基因作为同一特异性质粒上的 2 个不同基因片段

均可在 Vp14、Vp19 分离株中检出,而 Vp12 和 Vp18 分离株仅能检出 *API* 或 *AP2*。

2.2 分离株 ERIC-PCR 扩增结果

由图 5 可知,运用 ERIC-PCR 法能扩增出较为清晰的 ERIC 图谱,每个分离株的 ERIC 条带大小都在 250~4 000 bp 之间,扩增条带数介于 5~10 之间。由图 5 可知, Vp1 和 Vp4, Vp8 和 Vp9, Vp12 和 Vp14 分离株的扩增图谱分别较为一致, Vp3、Vp5、Vp7 分离株的扩增图谱也基本一致,此外 Vp11~Vp18 分离株的扩增图谱也较为相似。但 Vp19 分离株仅扩增出 5 个条带,明显区别于 Vp11~Vp18 分离株,而 Vp2、Vp6、Vp10、Vp20 分离株的扩增图谱亦分别与其他分离株存在一定差异。

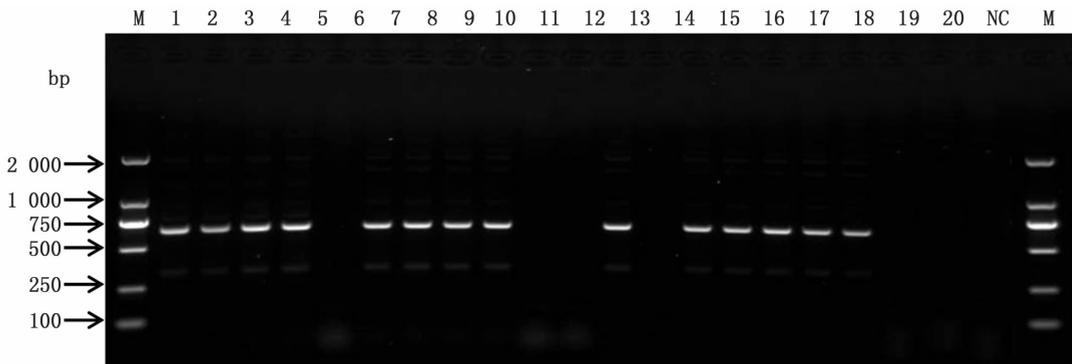


M 为 DL 2 000 DNA Marker; 1~19 分别代表 Vp1~Vp19 分离株,20 代表 Vp20 标准株,NC 代表阴性对照

M mesas DL 2 000 DNA Marker; 1 to 19 represent isolated strains Vp1 to Vp19,20 represent standard strain Vp20,NC represent negative control

图 1 *Trh* 基因 1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Result of 1.0% agarose gel electrophoresis of *trh*

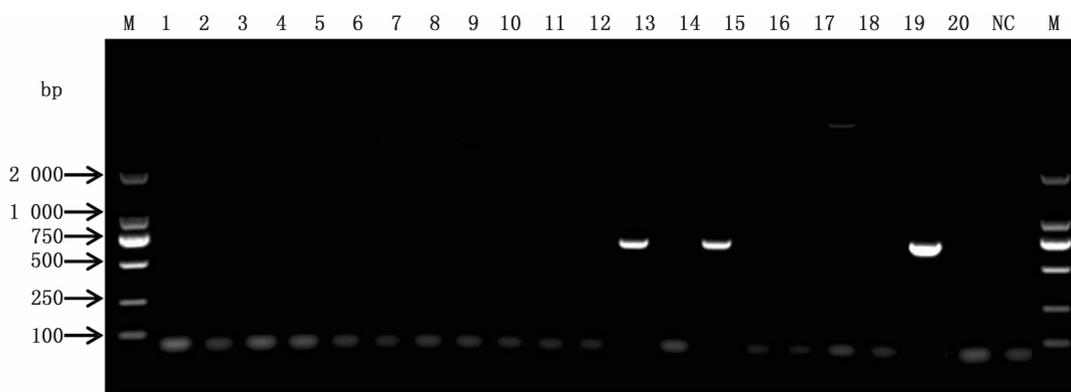


M 为 DL 2 000 DNA Marker;1~19 分别代表 Vp1~Vp19 分离株,20 代表 Vp20 标准株,NC 代表阴性对照

M mesas DL 2 000 DNA Marker; 1 to 19 represent isolated strains Vp1 to Vp19,20 represent standard strain Vp20,NC represent negative control

图 2 *Tox RS/new* 基因 1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Result of 1.0% agarose gel electrophoresis of *tox RS/new*

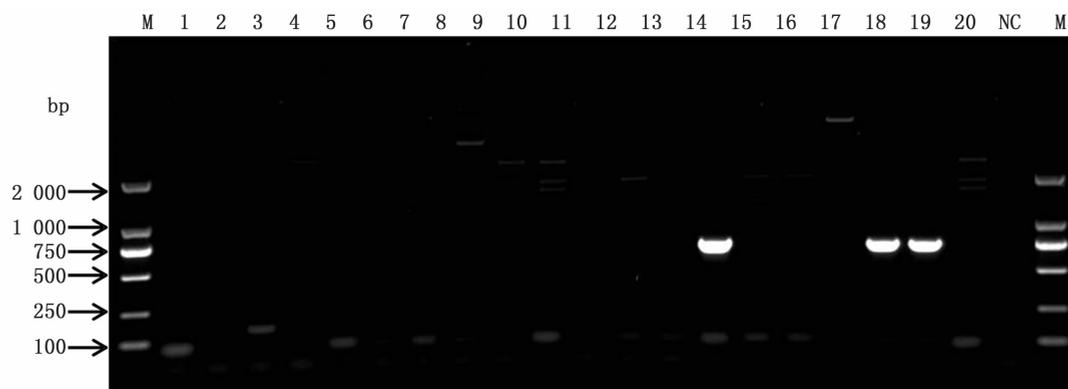


M 为 DL 2 000 DNA Marker; 1 ~ 19 分别代表 Vp1 ~ Vp19 分离株, 20 代表 Vp20 标准株, NC 代表阴性对照

M mesas DL 2 000 DNA Marker; 1 to 19 represent isolated strains Vp1 to Vp19, 20 represents standard strain Vp20, NC represents negative control

图 3 API 基因 1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 3 Result of 1.0% agarose gel electrophoresis of API

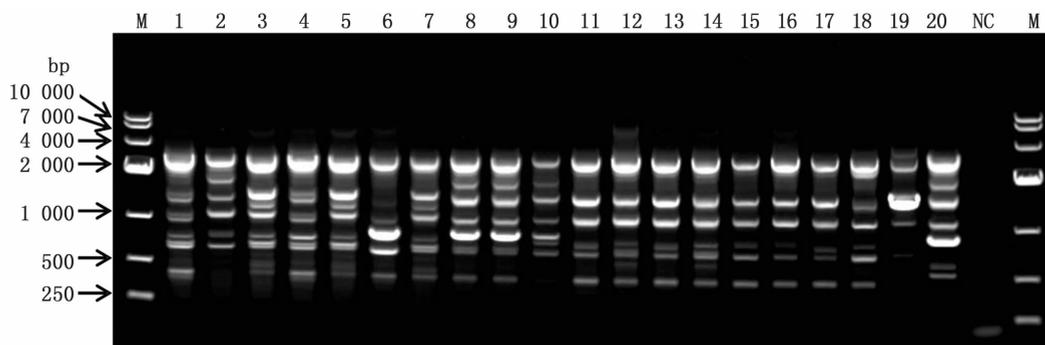


M 为 DL 2 000 DNA Marker; 1 ~ 19 分别代表 Vp1 ~ Vp19 分离株, 20 代表 Vp20 标准株, NC 代表阴性对照

M mesas DL 2 000 DNA Marker; 1 to 19 represent isolated strains Vp1 to Vp19, 20 represents standard strain Vp20, NC represents negative control

图 4 AP2 基因 1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 4 Result of 1.0% agarose gel electrophoresis of AP2



M 为 DL 10 000 DNA Marker; 1 ~ 19 分别代表 Vp1 ~ Vp19 分离株, 20 代表标准株 Vp20, NC 代表阴性对照

M mesas DL 10 000 DNA Marker, 1 to 19 represent isolated strains Vp1 to Vp19, 20 represents standard strain Vp20, NC represents negative control

图 5 20 株副溶血弧菌的 ERIC-PCR 电泳图谱

Fig. 5 Results of ERIC-PCR electrophoresis of 20 *V. parahaemolyticus* strains

2.3 分离株 ERIC-PCR 图谱分析

运用 NTSYSpc2.1 软件对上述 ERIC 电泳图谱进行聚类分析,使用非加权配对平均法(UPGMA)计算得到聚类树状图,从图 6 中可以看到:Vp1 和 Vp4, Vp2 和 Vp10, Vp6、Vp8 和 Vp9, 亲缘关系较近而分别聚为一支;扩增图谱带型较为一致的菌株 Vp11 ~ Vp18 也基本聚在一起;Vp3、Vp5、Vp7 和 Vp19 分别与其他菌株亲缘关系均较远,标准株 Vp20 与实验中其他 19 株分离株关系均较远,单独聚为一支,分型结果发现 Vp11 ~ Vp18 亲缘关系较近,且均分离自 2015 年。这说明该方法能够有效区分不同时间段获得的菌株,而对不同地理位置分离株间区分并不明显。

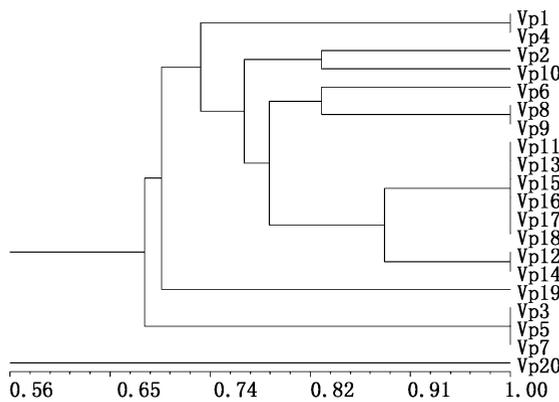


图 6 20 株副溶血弧菌的 ERIC-PCR 聚类图
 Fig. 6 ERIC-PCR clustering figure of 20 *V. parahaemolyticus* strains

根据聚类图谱亲缘远近关系,在相似值 80.0% 的水平上,20 株副溶血弧菌通过 ERIC-PCR 分型统计共分为 7 个不同的类群(表 2),其中:遗传多样性优势群为群体 IV,菌株所占比例为 40.0%;使用 HUNTER 等^[20]的方法计算出此分

表 2 20 株副溶血弧菌的 ERIC-PCR 分型聚类表
 Tab. 2 ERIC-PCR clustering table of 20 *V. parahaemolyticus* strains

类群 Group	菌株编号 Strains No	比例 Percentage/%
I	Vp1, Vp4	10.0%
II	Vp2, Vp10	10.0%
III	Vp6, Vp8, Vp9	15.0%
IV	Vp11, Vp12, Vp13, Vp14, Vp15, Vp16, Vp17, Vp18	40.0%
V	Vp19	5.0%
VI	Vp3, Vp5, Vp7	15.0%
VII	Vp20	5.0%

型方法的分辨力指数 *DI* 值为 0.811。这表明 ERIC-PCR 方法可以对该实验中副溶血弧菌进行较好的基因分型。

3 讨论

溶血性毒素是副溶血弧菌极其重要的致病因子,副溶血弧菌的耐热直接溶血毒素(thermostable direct hemolysin, *tdh*)和耐热相关溶血毒素(*tdh*-related hemolysin, *trh*)被认为是极为重要的两个致病因子。*tdh* 和 *trh* 都具有溶血活性、细胞毒性、肠毒素活性^[21],可以直接作用于红血球并产生神奈川现象(Kanagawa phenomenon, KP),即溶血现象^[22]。*tox RS/new* 是副溶血弧菌转座子 *tox RS* 变化之后的名称,*tox RS* 上的 *tox R* 和 *tox S* 转座子能编码跨膜蛋白,增强副溶血弧菌的侵袭能力并且此致病基因被认为是 1996 年后的流行致病株特有^[23],对于了解潜在新流行致病株具有重要意义。致病基因 *ORF8* 是丝状噬菌体 ϕ 237 的开放阅读框,该噬菌体是副溶血弧菌所特有,只拥有唯一的开放阅读框,并且被认为与副溶血弧菌的大流行株有关^[24],*ORF8* 能编码一种粘附蛋白,从而增加副溶血弧菌对人类肠道细胞的粘附能力,增强其致病性。本研究对从上海市不同单位养殖的对虾中分离得到的副溶血弧菌进行 6 种致病基因的检测筛查,结果发现:*trh* 基因的携带率较低,19 株分离株中仅有一株分离株 Vp3 检出阳性,说明该菌株存在一定的致病能力,对 *tdh* 和 *ORF8* 基因检测未发现阳性菌株,该结果与环境及海产品分离株中 *tdh* 基因检出率较低等研究结果基本一致^[14];对 *tox RS/new* 基因的检出率较高,19 株副溶血分离菌株中 14 株为阳性菌株,基因携带率为 73.7%。以上结果表明,上海市 6 个对虾养殖单位中,从对虾中分离到的副溶血弧菌毒性并不强,但存在一定的流行性,这可能导致一些新的流行致病株的产生。

对能够引起对虾急性肝胰腺坏死病的特异性副溶血弧菌检测结果发现 *API* 基因携带菌株为 Vp12、Vp14、Vp19, *AP2* 基因携带菌株为 Vp14、Vp18、Vp19。 *API* 和 *AP2* 两个基因均是副溶血弧菌质粒基因,携带有这种质粒的副溶血弧菌理论上能够引起南美白对虾的急性肝胰腺坏死病(AHPND)^[11,18],本研究对这两种基因的检测结果并不完全一致,其原因可能是由于质粒基

因具有转染能力,存在一定的基因丢失情况,也可能与这种特异性副溶血弧菌的质粒致病机理有关。有研究报道,不仅在副溶血弧菌中存在这种特异性质粒,在其他弧菌中也有该特异性质粒存在^[25],表明该质粒基因存在地理范围及跨种扩张的趋势,应当引起重视,但该质粒基因的致病机理仍需进一步探索研究。

ERIC-PCR 技术是一种简单快速易操作的分子分型技术,相对于传统血清学分型方法具有稳定性好和分辨率高等优点,也被越来越多地应用于菌株溯源和菌种分类等研究中。也有研究^[26]表明,同一血清型的不同来源菌株通过 ERIC-PCR 分型技术仍有明显图谱差异,说明 ERIC-PCR 分型技术在种内分型溯源上更有优势。本研究采用 ERIC-PCR 技术对 19 株副溶血弧菌分离株进行基因分型,通过对指纹图谱的软件分析得到聚类树,初步探索不同菌株间的亲缘关系远近,并通过类群中的菌株分布了解了上海地区 6 家不同对虾养殖单位中副溶血弧菌的分子遗传差异,结果发现 19 株副溶血弧菌分离株中,从不同养殖单位取样分离得到的菌株,其分型结果并没有明显的地理关系,这可能与本研究样品数量有限而本身地理位置较近所致,可以后续结合传统血清学分型技术进行进一步研究探索;而从不同时间取样分离保存的菌株,结果发现 2015 年分离得到的 Vp11 ~ Vp18 菌株间关系较近,而与 2014 年分离得到的菌株区分较明显,这可能是由于不同时间分离得到的这些菌株来源于 1 个相似的流行株^[27],这也与本研究这些菌株流行相关基因 *tox RS/new* 携带率较高结果相符合。通过对 20 株副溶血弧菌 ERIC-PCR 分型聚类,结果表明 ERIC-PCR 可以快速方便的分析致病菌背景,结合菌株的分离时间、地点,可以有效的对潜在的流行致病菌株进行流行病学溯源,为对虾养殖单位中副溶血弧菌的流行与预防控制提供相关参考。

参考文献:

- [1] 茆丹. 不同来源副溶血弧菌分子分型及其毒力基因筛查 [D]. 上海: 上海交通大学, 2014.
- MAO D. Molecular typing and virulence genes screening of *Vibrio parahaemolyticus* from different sources [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2014.
- [2] 陈志芸, 施春雷, 周秀娟, 等. 上海市售海产品中副溶血

性弧菌的分布状况[J]. 中国食品学报, 2015, 15(8): 196-202.

CHEN Z Y, SHI C L, ZHOU X J, et al. Distribution status of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood markets of Shanghai [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(8): 196-202.

- [3] 马立芝, 郭李平, 邱业峰. 副溶血弧菌的致病机制[J]. 生物技术通讯, 2013, 24(6): 871-876.
- MA L Z, GUO L P, QIU Y F. Pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Letters in Biotechnology, 2013, 24(6): 871-876.
- [4] 葛明峰, 郑晓叶, 王国良. 大黄鱼感染致病弧菌的检测及其病害的预测预警[J]. 水产学报, 2014, 38(12): 2068-2074.
- GE M F, ZHENG X Y, WANG G L. Detection of pathogenic vibrios infection in *Larimichthys crocea* and its forecast and warning of disease [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(12): 2068-2074.
- [5] 陈蓉, 刘建勇, 曾碧健, 等. 杂色鲍消化道副溶血弧菌的分离与微生物学鉴定[J]. 湛江师范学院学报, 2012, 33(3): 100-104.
- CHEN R, LIU J Y, ZENG B J, et al. Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* in digestion guts of abalone, *Haliotis diversicolor* [J]. Journal of Zhanjiang Normal College, 2012, 33(3): 100-104.
- [6] 王金霞, 李士虎, 王笃彩, 等. 中华绒螯蟹苗种生产中副溶血性弧菌病的诊断与防治[J]. 淮海工学院学报, 2003, 12(1): 52-54.
- WANG J X, LI S H, WANG D C, et al. Diagnosis, prevention and curing of *Vibrio parahaemolyticus* in the production of river crab larvae [J]. Journal of Huaihai Institute of Technology, 2003, 12(1): 52-54.
- [7] 陶保华, 胡超群, 吴蔚. 斑节对虾弧菌病的病原生物学研究[J]. 热带海洋学报, 2001, 20(2): 80-87.
- TAO B H, HU C Q, WU W. Studies on pathogenetic biology of vibriosis occurring in *Penaeus monodon* [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2001, 20(2): 80-87.
- [8] 张晓君, 陈翠珍, 阎斌伦, 等. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 病原副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 的表型及分子特征[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 654-662.
- ZHANG X J, CHEN C Z, YAN B L, et al. Phenotypic and molecular characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Penaeus vannamei* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2009, 40(5): 654-662.
- [9] 文国樑, 曹煜成, 徐煜, 等. 养殖对虾肝胰腺坏死综合症研究进展[J]. 广东农业科学, 2015, 42(11): 118-123.
- WEN G L, CAO Y C, XU Y, et al. Review on hepatopancreas necrosis syndrome of shrimp [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2015, 42(11): 118-123.
- [10] 谢珍玉, 周永灿, 冯永勤. 对虾弧菌病的研究进展——回顾对虾弧菌病的病原种类、致病机制与条件、症状与组织病变及对虾的防御机制[J]. 海南大学学报(自然科学

- 版), 2007, 25(1): 88-95.
- XIE Z Y, ZHOU Y C, FENG Y Q. The research advance in shrimp vibriosis—reviewed on shrimp pathogens of vibriosis, pathogenic mechanisms and pathogenic conditions, symptoms and histopathological changes of the disease shrimp, and the elimination mechanisms of shrimp to vibrio [J]. Natural Science Journal of Hainan University, 2007, 25(1): 88-95.
- [11] JOSHI J, SRISALA J, TRUONG V H, et al. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) [J]. Aquaculture, 2014, 428-429: 297-302.
- [12] 贺连华, 吴平芳, 陈妙玲, 等. 食品中副溶血弧菌血清学分型与分子分型的研究[J]. 中国热带医学, 2011, 11(11): 1373-1375.
- HE L H, WU P F, CHEN M L, et al. Analysis of pulsed-field gel electrophoresis molecular subtyping and serotyping of *Vibrio parahaemolyticus* in food [J]. China Tropical Medicine, 2011, 11(11): 1373-1375.
- [13] 方伟. 副溶血性弧菌分型研究进展[J]. 中华疾病控制杂志, 2008, 12(5): 468-472.
- FANG W. Review on subtyping study of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Chinese Journal of Disease Control and Prevention, 2008, 12(5): 468-472.
- [14] 丁久法, 潘迎捷, 陈洪友, 等. 副溶血性弧菌 ERIC-PCR 分型及毒力基因检测研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8): 137-141.
- DING J F, PAN Y J, CHEN H Y, et al. Genotyping of *Vibrio parahaemolyticus* by ERIC-PCR and virulence gene detection [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(8): 137-141.
- [15] 帅慧群, 张睿, 詹丽. 多血清型副溶血性弧菌引起食物中毒的毒力基因检测和分子分型[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(18): 3524-3526, 3529.
- SHUAI H Q, ZHANG R, ZHAN L. Virulence gene detection and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* in a food poisoning [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2013, 23(18): 3524-3526, 3529.
- [16] MALUPING R P, RAVELO C, LAVILLA-PITOGO C R, et al. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from the Philippines by PCR-based methods [J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(2): 383-391.
- [17] 贾丹, 史成银, 黄健, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)病原分离鉴定及其致病性分析[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 103-111.
- JIA D, SHI C Y, HUANG J, et al. Identification and pathogenicity analysis of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the pacific shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 103-111.
- [18] LEE C T, CHEN I T, YANG Y T, et al. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(34): 10798-10803.
- [19] 马月姣, 孙晓红, 赵勇, 等. REP-PCR 及 ERIC-PCR 法对分离自海产品副溶血性弧菌分型分析[J]. 食品科学, 2013, 34(10): 263-267.
- MA Y J, SUN X H, ZHAO Y, et al. REP-PCR and ERIC-PCR analysis for the typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from sea products marketed in Shanghai [J]. Food Science, 2013, 34(10): 263-267.
- [20] HUNTER P R, GASTON M A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems; an application of Simpson's index of diversity [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1988, 26(11): 2465-2466.
- [21] NISHIBUCHI M, KAPER J B. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Bacteriology, 1985, 162(2): 558-564.
- [22] 杨振泉, 焦新安. 副溶血弧菌毒力因子及其致病机理研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(11): 1070-1073.
- YANG Z Q, JIAO X A. Advances research on virulence factors and pathogenic mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2008, 24(11): 1070-1073.
- [23] LIU W W, ZHENG W L, XIE J, et al. Identification of genes related to carcinogenesis of oral leukoplakia by oligo cancer microarray analysis [J]. Oncology Reports, 2011, 26(1): 265-274.
- [24] KONDOH N, OHKURA S, ARAI M, et al. Gene expression signatures that can discriminate oral leukoplakia subtypes and squamous cell carcinoma [J]. Oral Oncology, 2007, 43(5): 455-462.
- [25] LIU L Y, XIAO J Z, ZHANG M M, et al. A *Vibrio owensii* strain as the causative agent of AHPND in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2018, 153: 156-164.
- [26] 金莉莉, 王秋雨, 侯潇. ERIC-PCR 技术在李斯特氏菌种、菌株鉴定中的应用[J]. 遗传, 2003, 25(2): 195-197.
- JIN L L, WANG Q Y, HOU X. ERIC-PCR on identification of *Listeria* species and strain [J]. Hereditas (Beijing), 2003, 25(2): 195-197.
- [27] NAIR G B, RAMAMURTHY T, BHATTACHARYA S K, et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3: K6 and its serovariants [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2007, 20(1): 39-48.

Pathogenic gene detection of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp and genotyping by ERIC-PCR

ZHANG Haiqiang, AN Wei, XIAO Yu

(Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai Fisheries Technical Extension Station, Shanghai 200433, China)

Abstract: In order to monitor the carrying status of pathogenic genes and the prevalence of potential pathogenic strains of *Vibrio parahaemolyticus* from shrimp in Shanghai, the polymerase chain reaction (PCR) and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) were applied to detect pathogenic genes and to make genotyping analysis of 1 standard *V. parahaemolyticus* strain and 19 *V. parahaemolyticus* strains isolated from shrimp in Shanghai. The results showed no *tdh* and *ORF8* genes were detected in 19 isolated strains and only 1 strain carried *trh* gene, while the *tox RS/new* gene was detected in 14 positive strains and the carrying percentage was 73.7%. The *API* and *AP2* genes were detected in specificity *V. parahaemolyticus* which could cause acute hepatopancreas necrosis disease (AHPND) and the result showed there were 3 positive strains of both genes, and the gene carrying percentage was both 15.8%. The 20 *V. parahaemolyticus* strains were divided into 7 groups by ERIC-PCR, and the discrimination index (DI) was 0.811, which indicated ERIC-PCR have a good genotyping capability. According to the results of ERIC-PCR, the method could distinguish strains obtained from different periods of time effectively, while the distinction among different geographical strains was not obvious. These results suggested that the carrying percentage of pathogenic genes in *V. parahaemolyticus* from shrimp was relatively low, while there was a risk of prevalence of new pathogenic strains. These results will provide reference for the prevention and control of *V. parahaemolyticus* strains in shrimp farms.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; pathogenic gene; ERIC-PCR; genotyping