

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00096

牡蛎中副溶血弧菌荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用

林强^{1,2}, 李宁求¹, 付小哲¹, 刘礼辉¹, 石存斌¹, 吴淑勤¹

1. 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 广东 广州 510380;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 以副溶血弧菌毒素调控基因(toxin regulations, *toxR*)作为靶标基因, 设计特异性引物及TaqMan探针, 以含*toxR*基因的质粒为模板, 建立质粒拷贝数与 C_T 值的标准曲线, 分别采用含*toxR*基因质粒、纯培养的副溶血弧菌和添加副溶血弧菌的牡蛎(*Ostrea*)模拟样品进行灵敏度试验, 结果表明, 其灵敏度分别为 15 拷贝、18 CFU/mL和 180 CFU/mL。同一个样品的 30 次重复性试验表明, 试验内及试验间的变异系数分别为 0.95%和 1.5 %。结果显示, 本研究建立的副溶血弧菌荧光定量PCR检测方法特异性强、灵敏度高、重复性好, 可用于牡蛎等水产品中副溶血弧菌的定量检测。[中国水产科学, 2011,18(1): 96–102]

关键词: 副溶血弧菌; 荧光定量 PCR; *toxR* 基因

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2011)01–0096–07

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一种生长在港湾和河口地区的革兰氏阴性嗜盐菌, 在富含微粒、浮游生物及其他几丁质的环境中生长较好, 可通过水生动物的滤食活动富集在生物体内^[1], 因此广泛存在于多种海产品中, 包括鱼类、甲壳类、双壳贝类等, 其中, 牡蛎中含量最高^[2]。人食用污染有该菌的海产品后可引起急性胃肠炎, 严重时还可引起败血症^[3–4]。近年来, 由副溶血弧菌引起的食物中毒在全球范围内暴发, 其引发的食源性疾病已成为当前全球面临的公共卫生问题之一。目前, 在中国沿海地区的食物中毒病例中, 副溶血弧菌已成为微生物性食物中毒的首要病原菌^[5]。

副溶血弧菌的定量检测多采用多管发酵法(MPN), 该方法通过扩大培养和概率计算, 测定样品中含有副溶血弧菌的最大可能数。但该方法检测周期在 3~7 d, 操作繁琐、工作量大、易污染。荧光定量 PCR 具有快速、直观、准确等优势,

已在病原菌检测中得到广泛应用^[6]。目前副溶血弧菌荧光定量PCR检测方法主要以*tlh*(thermolabile hemolysin)^[7]、*gyrB*(gyrase subunit)^[8]、*toxR*(toxin regulations)^[9]为靶基因进行定量检测。本研究以*toxR*为靶基因, 通过筛选, 建立了副溶血弧菌荧光定量PCR检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株

用于本实验的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC17802、ATCC33846 菌株购自美国标准生物品收藏中心, 溶藻弧菌(*V. cholerae*, As1.1833)、创伤弧菌(*V. vulnificus*, As1.1758)、海螵弧菌(*V. neresis*, As1.1623)、坎氏弧菌(*V. campbellii*, As1.1597)、河流弧菌(*V. fluvialis*, As1.1610)、灿烂弧菌(*V. splendidus*, As1.1606)、海利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*, As1.1590)、需钠弧菌(*V. natriegens*, As1.1617)、漂浮弧菌(*V. natriegen*,

收稿日期: 2010–01–11; 修订日期: 2010–03–16.

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA100308); 农业部公益性行业科研专项(200903055).

作者简介: 林强(1983–), 硕士研究生, 专业方向为水产动物疾病与免疫. E-mail: lin9902057@163.com

通讯作者: 吴淑勤 (1956–), 研究员. E-mail: wushuqin001@21cn.com

As1.1594)购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。溶藻弧菌(*V. alginolyticus*, TrH020801)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*, EcGY 020401)、鳗李斯特菌(*V. anguillarum*, E3-11)、约氏黄杆菌(*Flabobacterium columnare*, GQYgc 0711)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, LYK080701)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*, GhAn080314)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*, Lf080802)由本实验室从病鱼上分离、鉴定、保存。

1.2 引物与 TaqMan 探针设计

从 GenBank 数据库中获得所有弧菌属的 *toxR* 基因序列, 采用 Vector NTI Suite 9.0 软件对其进行同源性分析。针对副溶血弧菌 *toxR* 基因的特异性序列, 采用 Premier 5.0 生物学软件设计特异引物和探针, 引物序列为: Forward 5'-ATTGACGC CTCTGCTAATGAG-3', Reverse 5'-TACGCAAATC GGTAGTAATAGTG-3', 探针序列为: 5'-(FAM)AG CCGCCTTTAACGACGACTTCTGA(Eclipse)-3'。将此引物和探针进行 BLAST 同源性比较分析, 确保该引物和探针对副溶血弧菌具有高度的特异性。该引物和探针由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 荧光定量反应体系的建立及反应条件优化

参照 Premix Ex TaqTM(DRR039A, Takara)说明书, 将上、下游引物, 探针, Premix(Takara) Ex TaqTM 和 ROX Reference Dye (50x) 加入到反应体系中, 于 ABI7500 荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR 扩增。对荧光定量 PCR 反应体系中引物、探针浓度和退火温度进行优化, 以获得最低的 C_T 值和较高的荧光强度增加值。选 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、0.8 $\mu\text{mol/L}$ 、1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的引物终浓度和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、0.6 $\mu\text{mol/L}$ 、0.8 $\mu\text{mol/L}$ 的探针终浓度, 选不同的退火温度 56、58、60、62, 筛选引物和探针的最佳浓度和最佳退火温度。

1.4 引物及探针的特异性检测

以 1.1 列出的实验菌株 DNA 为模板, 双蒸水作为空白对照, 用 1.3 中优化出的荧光定量 PCR

反应体系和反应程序, 进行荧光定量 PCR 反应扩增, 通过观察扩增曲线验证引物、探针的特异性。

1.5 标准品的制备及标准曲线的建立

以副溶血弧菌标准菌株 ATCC17802 的 DNA 为模板, 采用优化的反应条件扩增目的基因, 获得片段大小为 180 bp 的 PCR 产物。将含有目的扩增片段的 PCR 产物切胶回收, 纯化, 连接到 PMD18-T(Takara)质粒载体中制备重组质粒标准品, 经 PCR 和测序分析验证。用核酸测定仪(Spectrophotometer UV-6000, Metash)测定标准品的浓度, 根据阿伏伽德罗常数换算出 1 μL 标准品的拷贝数。用双蒸水对标准品进行 10 倍比稀释, 采用优化好的体系进行荧光定量 PCR 反应, 同时做 3 个平行样品, 确保试验的准确性, 建立质粒拷贝数与 C_T 值对应关系的标准曲线。

1.6 副溶血弧菌荧光定量 PCR 灵敏度的检测

1.6.1 含 *toxR* 基因质粒的最低检出限 对已知拷贝数的标准品进行 10 倍梯度稀释, 对各稀释度进行荧光定量 PCR 检测, 确定该方法对靶基因的最低检出限。

1.6.2 副溶血弧菌纯培养物的最低检出限 利用平板计数法, 对副溶血弧菌标准菌株 ATCC17802 进行计数, 调节菌液浓度达到 1.8×10^8 CFU/mL, 再按 10 倍梯度稀释, 取 1 mL 各浓度菌液, 用 bacterial DNA kit 试剂盒提取 DNA 作为检测模板(终体积 50 μL)。进行荧光定量 PCR 检测, 确定该方法对副溶血弧菌纯培养物的最低检出限。

1.6.3 添加副溶血弧菌的牡蛎模拟样品的最低检出限 选取经国标法^[10]检测为副溶血弧菌阴性的牡蛎 25 g 与 225 mL 3% 的盐水混合, 用均质器拍击成浆, 取 10 mL 浆液 7 份, 分别加入 $1.8 \times 10^5 \sim 1.8 \times 10^7$ CFU 的副溶血弧菌 ATCC17802 菌液, 混匀作为模拟样品。各取 1 mL 上述处理的模拟样品用水煮法提取细菌基因组 DNA, 进行荧光定量 PCR 检测, 确定该方法对模拟样品的最低检出限。

1.7 副溶血弧菌荧光定量 PCR 重复性的检测

取副溶血弧菌 ATCC17802 DNA 在 1 次试验中

重复 30 次, 观察其 C_T 值变异系数。同时观察在 30 个不同试验中此样品的 C_T 值变异系数。

1.8 检测方法的初步应用

2009 年 3–11 月间, 在广东某养殖场采集牡蛎 (*Ostrea*) 活体样品, 在清洁的流水中洗刷净牡蛎外壳, 以无菌操作打开贝壳, 取出全部组织。称取 25 g 样品放于均质袋中, 用灭菌剪刀充分剪碎, 加入灭菌的 3% 氯化钠 225 mL 均质 90 s, 制备成 1:10 稀释液。用灭菌吸管吸取 1:10 稀释液 1 mL, 用 bacterial DNA kit (D3350-01, Omega) 试剂盒提取细菌 DNA。按照 1.3 的反应体系和反应条件进行荧光定量检测。对部分采集样品用 MPN 培养法进行定量检测, 参照行业标准 SN 0173-92^[10] 对新鲜样品进行处理, 选择 3 个连续适宜的稀释度, 分别以 1 mL 无菌吸管各吸取 1 mL 稀释液, 接种于 10 mL 单料氯化钠多黏菌素 B 肉汤中, 进行选择性的增菌培养, 每一稀释度接种 3 管。37 °C 培养 24 h 后, 用 PCR 方法检测各培养管, 按增菌培养阳性管数, 查表得出 1 g 样品中的副溶血弧菌 MPN 值。

2 结果与分析

2.1 PCR 反应体系及反应条件

引物和探针浓度均为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 时, 获得的 C_T 值较小而且荧光强度增加值较大。优化后的反应体系为: Premix (Takara) Ex TaqTM (2 $\times$) 10 μL ; PCR Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ; PCR Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ; ROX Reference Dye (50 $\times$) 0.4 μL ; Taqman 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ; DNA 模板 2.0 μL ; 去离子水 6.4 μL , 体系总体积 20 μL 。退火温度为 60 °C 时, 扩增效果最好。优化后的反应程序为: 95 °C 预变性 10 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s (收集 FAM 荧光信号) 扩增 40 个循环, 反应耗时 54 min。

2.2 标准曲线的建立

重组质粒所含的 *toxR* 序列和 GenBank 中副溶血弧菌的 *toxR* 基因序列相同。经核酸测定仪 (Spectrophotometer UV-6000, Metash) 测定后, 确定其质粒浓度为 48.67 ng/ μL , OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.857, 证明该重组质粒的纯度较高。根据质粒的分子量

将质粒样品浓度换算为拷贝数浓度为: 1.5×10^{10} 拷贝/ μL 。

标准曲线在 $15 \sim 1.5 \times 10^7$ 拷贝/ μL 之间有较好的线性关系, 相关系数 $R^2 = 0.9995$, 斜率为 3.355, 截距为 39.496, 扩增效率 $\text{Eff}(\%) = 98.642\%$ 。得出质粒拷贝数 (X) 与 C_T 值之间的线性方程为: $C_T = -3.355 \lg X + 39.496$ 。(图 1)

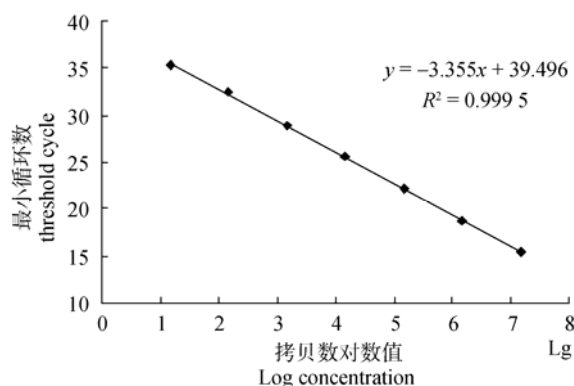


图 1 副溶血弧菌质粒拷贝数与最小循环数 (C_T) 的标准曲线

Fig.1 Standard curve of *Vibrio parahaemolyticus* plasmid copies and threshold cycle (C_T)

2.3 引物及探针的特异性

对 18 株试验菌株进行荧光定量 PCR 检测, 只有副溶血弧菌 ATCC17802 和 ATCC33846 出现 S 型的扩增曲线, 为阳性; 而溶藻弧菌、哈维氏弧菌、霍乱弧菌等 16 株非副溶血弧菌样品和空白对照均未产生 S 型的扩增曲线, C_T 值无法读取, 为阴性 (图 2)。实验结果表明, 以 *toxR* 为靶基因设计的荧光定量 PCR 检测方法的特异性高。

2.4 检测灵敏度

含 *toxR* 基因质粒灵敏度试验表明, 该检测方法每个反应最低能检测到 15 个 DNA 拷贝数 (表 1)。副溶血弧菌纯培养物灵敏度试验表明, 该检测方法最低可检测到的浓度为 18 CFU/mL (表 2)。牡蛎模拟样品灵敏度试验表明, 该检测方法最低检测到的浓度为 180 CFU/mL (表 2)。

2.5 重复性试验结果

对同一样品在同一次试验和不同试验间获得的 C_T 值进行统计, 同一次试验内的 30 个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本上重合 (图 3), C_T 值平均读数为 23.8, 标准差为 0.061, 变异系数为

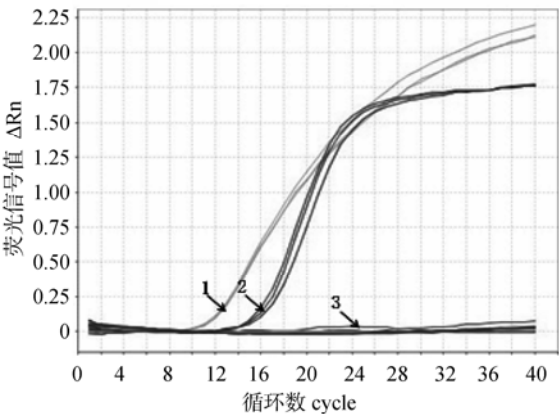


图 2 副溶血弧菌荧光定量 PCR 检测的特异性
1.副溶血弧菌 ATCC17802; 2.副溶血弧菌 ATCC33846; 3.未产生荧光信号的菌株, 包括溶藻弧菌、哈维氏弧菌、霍乱弧菌、创伤弧菌、鳃弧菌、沙蚕弧菌、坎氏弧菌、河流弧菌、灿烂弧菌、海利斯顿氏菌、需钠弧菌、漂浮弧菌、柱状黄杆菌、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌、无乳链球菌及空白对照.
Fig.2 Specificity of real-time PCR for *Vibrio parahaemolyticus* detection
1.VP ATCC17802; 2. VP ATCC33846; 3.Strains with no positive signal including *Vibrio cholerae* As1.1833, *Vibrio vulnificus* As1.1758, *Vibrio neresis* As1.1623, *Vibro campbellii* As1.1597, *Vibrio fluvialis* As1.1610, *Vibrio splendidus* As1.1606, *Listonella anguillarum* As1.1590, *Vibrio natriegens* As1.1617, *Vibrio natriegen* As1.1594, *Vibrio alginolyticus* TrH020801, *Vibrio harveyi* EcGY020401, *Vibrio anguillarum* E3-11, *Flabobacterium columnare* GQYgc0711, *Aeromonas hydrophila* LYK080701, *Edwardsiella tarda* GhAn080314, *Streptococcus agalactiae* Lf080802 and blank.

0.95%。同一样品在不同 30 次试验中所获得的 C_T 值也基本相同, C_T 值平均值为 24.18, 标准差为 0.362 7, 变异系数为 1.5%。以上统计结果表明, 本实验所建立的副溶血弧菌荧光定量PCR快速检测方法重复性好。

2.6 荧光定量 PCR 检测方法的应用

从 2009 年 3 月到 2009 年 11 月在广东某养殖场采集了 178 份牡蛎样品, 采用建立的荧光定量 PCR 检测方法进行检测, 检测到阳性样品 168 份, 在所有阳性样品中最低检测浓度为 10 CFU/g, 最高检出浓度为 318 180 CFU/g。从 3 月到 11 月, 牡蛎样品中月平均检测浓度依次为 72 CFU/g、213 CFU/g、678 CFU/g、3 764 CFU/g、894 CFU/g、35 276 CFU/g、408 CFU/g、71 CFU/g、54 CFU/g, 副溶血弧菌的浓度先上升再下降, 其中 8 月份的浓度最高, 11 月份浓度最低(图 4)。MPN 最低检测浓度为低于 3 CFU/g, 最大检出浓度为高于 1 100 CFU/g。荧光定量 PCR 检测和 MPN 法检测结果显示, 荧光定量 PCR 检测方法灵敏度高于 MPN 培养检测法(表 3)。

3 讨论

副溶血弧菌是一种食源性病原菌, 存在于多种水产品中, 是食品致病微生物检测项目之一。目前, 采用MPN法对食品中的副溶血弧菌进行检测, 此方法需要 3~7 d的时间, 且容易出现交叉污染和假阳性。近年来已有针对副溶血弧菌*tlh*基因和*gyrase*基因应用荧光定量PCR技术检测水产品中副溶血弧菌的报道^[11-12], 这些基因在不同弧菌种间的同源性较高, 检测时易造成假阳性。*toxR*基因相对于上述 2 种基因在种间同源性相对较低, Yung等^[13]以*toxR*为靶基因设计引物, 对 373 株副溶血弧菌和 290 株非副溶血弧菌菌株

表 1 副溶血弧菌质粒荧光定量 PCR 检测的灵敏度
Tab. 1 Sensitivity of real-time PCR for *Vibrio parahaemolyticus* plasmid detection

拷贝数 copy number	C_T			平均值 mean	标准差 SD
	重复 1 replicate 1	重复 2 replicate 2	重复 3 replicate 3		
1.5×10^7	15.42	15.46	15.27	15.38	0.10
1.5×10^6	18.66	18.77	18.62	18.68	0.08
1.5×10^5	22.20	22.17	22.1	22.16	0.05
1.5×10^4	25.69	25.58	25.47	25.58	0.11
1.5×10^3	28.95	28.84	28.8	28.86	0.08
1.5×10^2	32.31	32.48	32.53	32.44	0.11
1.5×10^1	35.30	34.94	35.62	35.29	0.35
1.5	-	-	-	-	-

注: “-”表示未检出。
Note: “-” represent undected.

表 2 副溶血弧菌样品荧光定量 PCR 检测的灵敏度
Tab. 2 Sensitivity of real-time PCR for detection of *Vibrio parahaemolyticus* samples

细菌浓度/(CFU·mL ⁻¹) bacterium concentration	纯培养物检测 detect of pure culture of bacteria		模拟牡蛎样品检测 detect of simulated <i>Ostrea</i> sample	
	循环数 C _T	实测浓度/(CFU·mL ⁻¹) measured concentration	循环数 C _T	实测浓度/(CFU·mL ⁻¹) measured concentration
1.8×10 ⁶	18.64	1.65×10 ⁶	19.69	8.01×10 ⁵
1.8×10 ⁵	22.02	1.62×10 ⁵	23.02	8.14×10 ⁴
1.8×10 ⁴	25.08	1.98×10 ⁴	26.46	7.68×10 ³
1.8×10 ³	28.59	1.78×10 ³	29.98	6.86×10 ²
1.8×10 ²	31.94	1.78×10 ²	32.96	8.87×10 ¹
1.8×10 ¹	36.40	8.37×10 ⁰	—	—
1.8×10 ⁰	—	—	—	—
空白 NTC	—	—	—	—

注：“—”表示未检出。
Note: “—” represents undetected.

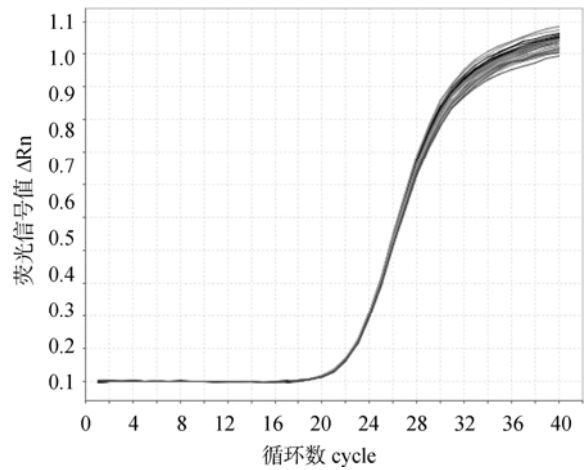


图 3 副溶血弧菌荧光定量 PCR 30 次重复试验结果
Fig.3 Results of 30 repetitious *Vibrio parahaemolyticus* detections by real-time PCR

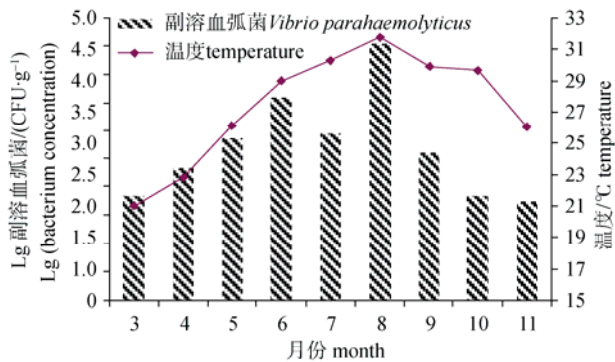


图 4 牡蛎样品副溶血弧菌检测结果
Fig.4 Detection results of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster samples

进行检测，仅副溶血弧菌能扩增出条带，因此以 *toxR* 基因为靶基因，设计特异的引物和探针，具

有高特异性。覃倚莹等^[9]报道了副溶血弧菌的荧光定量PCR检测方法，该方法主要针对食品中的副溶血弧菌进行检测。本研究以 *toxR* 为靶基因设计荧光定量PCR检测方法，针对水产养殖中一些常见的细菌，特别是弧菌属的细菌进行了特异性检测，适用于牡蛎养殖过程中副溶血弧菌的检测。

本研究建立的副溶血弧菌重组质粒拷贝数和 C_T 值之间的标准曲线，曲线斜率为 -3.355，扩增效率达到 98.642%，相关系数 R²=0.999 5，表示拷贝数和 C_T 值之间的相关性可信度极高。本研究对重组质粒的检测灵敏度达到每个反应 15 个 DNA 拷贝数，和覃倚莹等^[9]得出的 25 个拷贝数的结果相当。对纯培养物和模拟牡蛎样品直接检测的灵敏度分别为 18 CFU/mL 和 180 CFU/mL，用同样的方法覃倚莹等^[9]的研究结果为 21 CFU/mL 和 210 CFU/mL，焦红等^[8]的研究结果为 10 CFU/mL 和 100 CFU/mL。Linda 等^[14]采用多重荧光定量 PCR 方法对副溶血弧菌进行检测，细菌纯培养物浓度为 10⁴ CFU/mL 时，C_T 值为 28.29±0.26，当细菌浓度为 10³ CFU/mL 时，已经检测不到荧光信号。原因可能是多重荧光探针在多重荧光定量 PCR 扩增过程中会产生副产物，增加荧光背景，使灵敏度降低。增加荧光探针的浓度到一定值，报告基团和淬灭基团的比例减少，导致反应荧光信号减少。本研究将荧光定量 PCR 法与 MPN 法进行比较，在副溶血弧菌含量较低时，荧光定量 PCR 方法换算出来的副溶血弧菌浓度高于 MPN

表 3 荧光定量 PCR 和 MPN 培养法检测牡蛎样品中副溶血弧菌的拷贝数

Tab. 3 *Vibrio parahaemolyticus* copy number in oyster samples detected by real-time PCR and MPN culture methods

样品 sample	检测方法 detection method	
	荧光定量 PCR real-time PCR	MPN 培养法 MPN culture
050601	29	9.1
050602	26	3
050603	67	39
050604	ND	ND
050605	22	23
050606	35	23
061601	10	ND
061602	94	43
061603	110	39
061604	198	23
061605	80	23
061606	36	9.1
072701	9604	1100
072702	544	9.1
072703	123	1100
072704	1448	1100
072705	378	43
072706	536	23
080301	163088	> 1100
080302	318180	460
080303	109785	240
080304	134465	> 1100
080305	85810	> 1100
080306	24788	1100
091601	351	43
091602	340	43
091603	81	23
091604	66	ND
091605	214	43
091606	331	240

注：ND 表示未检测到阳性信号。

Note: ND represents no positive signal was detected.

法，可能是 MPN 法主要针对样品中的活菌进行检测，而荧光定量 PCR 方法能同时检测活菌、缺陷菌体和死亡菌体，但两者的数量级基本是一致的。当副溶血弧菌浓度较高时，荧光定量 PCR 检测法换算出来的量比 MPN 法高出很多，可能是由于 MPN 法的检测范围限制所造成。由此可看

出荧光定量 PCR 法更适合对牡蛎养殖过程中副溶血弧菌的检测。

根据广东阳江某养殖场牡蛎中副溶血弧菌的检测结果，在 8 月份牡蛎中副溶血弧菌的浓度最高，11 月牡蛎中副溶血弧菌的浓度最低。林祥田^[15]及孙旦等^[16]研究均表明，副溶血弧菌于每年 6–10 月份检出，9 月份检出率最高。本研究表明副溶血弧菌的含量和温度成正相关。在一定的水温范围内，温度对副溶血弧菌的对数总密度的影响近似成线性关系^[17–18]。DePaola 等^[19]对副溶血弧菌季节性变化研究发现，水温对副溶血弧菌含量的影响非常显著 ($P<0.05$)，副溶血弧菌与水温呈季节性变化，二者具有显著的相关性 ($P<0.000\ 1$, $r=0.51$)，说明副溶血弧菌的流行可能和温度有关。

本研究建立的荧光定量 PCR 检测副溶血弧菌的方法与 MPN 法相比，不仅特异性强、灵敏度高，而且不受产物污染和交叉污染等因素影响。因此，该方法作为副溶血弧菌的检测方法将更科学和有效，可为副溶血弧菌流行病学调查和风险评估提供有力的工具。

参考文献：

[1] Venkateswaran K, Kiiyukia C, Nakanishi K, et al. The role of sinking particles in the overwintering process of *Vibrio parahaemolyticus* in a marine environment[J]. FEMS Microbiol Ecol, 1990, 73:159–166.

[2] Akio Y, Jun'ichiro I, Varaporn V, et al. Quantitative modeling for risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in bloody clams in southern Thailand[J]. Internat J Food Microbiol, 2008, 124:70–78.

[3] Doyle M P. Foodborne bacterial pathogens[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1989:552–554.

[4] Altekruse S F, Bishop R D, Baldy L M, et al. *Vibrio gastroenteritis* in the US Gulf of Mexico region: the role of raw Ostrea[J]. Epidemiol Infect, 2000, 124:489–495.

[5] 程苏云, 罗芸, 叶菊莲, 等. 副溶血弧菌快速检测方法研究[J]. 疾病监测, 2007, 22(9): 642–645.

[6] Espy M J, Uhl J R, Sloan L M, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(1):165–256.

- [7] 陈丽, 张红河, 曹海芬. 荧光聚合酶链式反应检测副溶血弧菌弧菌TLH与TDH[J]. 检疫医学, 2007, 22(4): 450–454.
- [8] 焦红, 翁文川, 王芳金, 等. 食品中副溶血弧菌 FQ-PCR 快速检测方法的研究[J]. 卫生研究, 2005, 34(4): 457–460.
- [9] 覃倚莹, 吴晖, 肖性龙, 等. *toxR* 基因作为荧光定量 PCR 靶基因设计 TaqMan 探针快速检测副溶血弧菌[J]. 生物工程学报, 2008, 24(10):1837–1842.
- [10] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. SN 0173-92 出口食品副溶血弧菌检验方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1992: 1–9
- [11] Cai T, Jiang L, Yang C, et al. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in eastern China[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 46(2):180.
- [12] Jessica L, Michael C L, George M B, et al. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oyster[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(18):5840–5847.
- [13] Yung B K, Jun O, Chiho M, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(4): 1173–1177.
- [14] Linda N, Asim K. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(3): 2031–2042.
- [15] 林祥田. 94 起副溶血弧菌食物中毒流行病学特征分析[J]. 营养与食品卫生, 2006, 18(3):141–143.
- [16] 孙旦, 徐瑞良. 副溶血性弧菌、志贺氏菌属 10 年监测分析[J]. 江苏预防医学, 1998, 1: 44–45.
- [17] DePaola A, Hopkins L H, Peeler J T, et al. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US coastal waters and Oyster[J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56:2299–2302.
- [18] FAD. Draft risk assessment on the public health impact of *Vibrio parahaemolyticus* in raw molluscan shellfish[Z]. 2000.
- [19] DePaola A, Jessica L, John C, et al. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(3):1521–1526.

Development and application of a real-time PCR assay for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster

LIN Qiang^{1,2}, LI Ningqiu¹, FU Xiaozhe¹, LIU Lihui¹, SHI Cunbin¹, WU Shuqin¹

1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* (VP) is a pathogen that is the leading cause of shellfish-associated cases of bacterial food poisoning. To establish a real-time PCR for quantitative analysis of *toxR* gene, a pair of specific primers and TaqMan fluorescent probe of *toxR* gene of VP were designed. The positive recombinant plasmids of *toxR* gene served as templates to establish standard curve, which showed corresponding relationship between the copies of plasmids and threshold cycle (C_T) values. The lowest limit detection was 15 copies of *toxR* gene for plasmid, and the sensitivity of pure cultures and simulated oyster sample was 18 CFU/mL and 180 CFU/g, respectively. The coefficient of variation was 0.95% for intra-assay test and 1.5% for inter-assay test. One hundred and sixty eight positively established samples were detected from 178 oysters collected from a farm in Guangdong Province. The result showed that the real-time PCR assay for VP had high specificity, sensitivity, repeatability and it was time saving, so it can be used for detecting and monitoring VP in aquatic products. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 96–102]

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; real-time PCR; *toxR* gene

Corresponding author: WU Shuqin. E-mail: wushuqin001@21cn.com