

荧光定量 PCR 法检测副溶血弧菌 *tlh* 和 *tdh* 基因的表达式差异

陈星 潘迎捷 孙晓红 赵勇*

(上海海洋大学 食品学院 上海 201306)

摘要: 副溶血弧菌是广泛存在于近海区域, 盐湖和海产品中的食源性致病菌, 会引起大规模的食物中毒。TLH (不耐热溶血毒素)和 TDH (耐热直接溶血毒素)是副溶血弧菌最主要的毒力基因, 通过比较毒力基因的表达量可以间接比较同种菌株在不同应激条件下以及不同菌株之间的毒力差异。本文以在不同条件下培养的3株Vp为材料, 分别提取其总RNA, 以16S rRNA为内标基因, 运用荧光定量PCR技术检测副溶血弧菌TLH和TDH基因在不同应激条件下的表达式差异。结果表明: 不同菌株和同种菌株在不同应激条件下 *tlh*、*tdh* 基因表达式差异均显著; *tlh* 的最适表达式条件分别为5%盐度和20℃; *tdh* 的最适表达式条件分别为1%盐度和25℃。运用SPSS软件对实验结果进行统计学分析表明: 菌株对 *tlh* 表达式的影响大于盐度大于温度; 菌株对 *tdh* 表达式的影响大于温度大于盐度。

关键词: 副溶血弧菌, *tlh*, *tdh*, RT-PCR, 基因表达式

Detection of *tlh* and *tdh* expression differences in *Vibrio parahaemolyticus* by real-time quantitative PCR

CHEN Xing PAN Ying-Jie SUN Xiao-Hong ZHAO Yong*

(Food College, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* is a foodborne pathogenic bacteria which could be widely found in coastal areas, salt lakes and seafoods, it could cause large-scale food poisoning. *Tlh* (Thermolabile hemolysin) and *tdh* (Thermostable direct hemolyticus) are two of the most important virulence genes of Vp, we can compare the virulence of strains which in different stress conditions, as well as differences strains by comparing the expression levels of *tlh* and *tdh* indirectly. In this paper, three kinds of Vp cultured under different conditions, total RNA were extracted from them, 16S rRNA as an internal stan-

基金项目: 国家 863 计划重点项目(No. 2008AA100804); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字[2009]第 6-1 号); 国家“十一五”科技支撑计划课题—世博科技专项(No. 2009BAK43B17)

* 通讯作者: Tel: 86-21-61900379; E: yzhao@shou.edu.cn

收稿日期: 2010-11-16; 接受日期: 2011-02-22

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

dard gene, using real-time quantitative PCR (RT-PCR) detect Vp's *tlh* and *tdh* gene expression under different conditions. The results showed that gene *tlh* and *tdh* expression difference were significant in different strains and in same strains that under different condition, *tlh* optimal expression conditions were 5% salinity and 20 °C; *tdh* optimum expression conditions were 1% salinity and 25 °C. The use of SPSS software for statistical analysis of experimental results show that: factor that affect the expression of *tlh* is strain greater than salinity greater than temperature; factor that affect the expression of *tdh* is strain greater than temperature greater than salinity.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, *tlh*, *tdh*, RT-PCR, Gene expression

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, 简称 Vp)是一种革兰氏阴性嗜盐菌, 广泛分布于近海区域、盐湖及鱼、贝类等海产品中, 是沿海地区引起食物中毒的重要病原菌, 可导致患者出现腹泻、肠痉挛、恶心、呕吐、发烧等典型胃肠炎反应, 严重者可引起败血症^[1]。近年来, 由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, 在日本, 由该菌引起的食物中毒占全国食物中毒例数的 20%–30%; 我国国家食源性疾病预防网数据显示, 沿海省份, 副溶血弧菌引起食物中毒的发生规模及人群暴露规模呈明显上升趋势, 已经高居微生物食物中毒首位^[2]。为确保食品安全, 保护人民身体健康, 欧盟、美国等发达国家对水产品中的副溶血性弧菌做出了明确的规定, 如欧盟规定副溶血弧菌不得检出, 而美国规定 $<1\times 10^4$ CFU/g。我国已将该菌列为主要的检验或监测对象。目前, 该菌是多数进出口水产品必检的致病菌之一^[3]。

目前研究认为副溶血弧菌的主要致病因子是其产生的多种溶血毒素, 主要有耐热的直接溶血毒素(Thermostable direct hemolyticus, TDH), 相对耐热的直接溶血毒素(Tdh-related hemolysin, TRH)和不耐热溶血毒素(Themolabile hemolysin, TLH)。国内外研究表明 TLH 是一种非典型的磷脂酶, 能溶解人和马的红细胞^[4], 美国 Gooch 等人根据副溶血弧菌无论是临床分离株, 还是环境分离株都含有 TLH 基因, 并具有种属特异性的特点, 利用 TLH 基因制备基因探针检测和监测副溶血弧菌^[5]。TDH 具有溶血活性, 肠毒素活性, 细胞毒性和心脏毒性, 被公认为是副溶血弧菌最主要的致病因子。神奈川现象主要由 TDH 引起^[6]。Tyagi 等人利用 *tdh* 基因通过

SYBR green 染料检测和检测贝类产品中的副溶血弧菌^[7]; 用传统的 PCR 方法通过检测 *tlh*、*tdh* 和 *trh* 基因来检测地中海区域火鸡肉中的副溶血弧菌的研究已经有报道^[8]。本文运用 RT-PCR 法检测副溶血弧菌不同菌株和同种菌株在不同的生长条件(盐度, 温度)下 *tlh* 和 *tdh* 基因 mRNA 的表达差异, 通过比较毒力基因的表达进而间接推断菌株的毒力变化, 研究结果对于探讨副溶血弧菌致病能力强弱和环境适应性之间的关系提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的副溶血弧菌: ATCC17802、ATCC33846、ATCC33847 均购自中国科学院微生物研究所; 3 株副溶血弧菌的基因型见表 1。

表 1 3 株副溶血弧菌的基因型			
Table 1 Gene type of 3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> strains			
菌株 Strain	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>
ATCC17802	+	–	+
ATCC33846	+	+	–
ATCC33847	+	+	–

RNA 提取和 RT-PCR 及相关试剂如 Trizol 试剂、琼脂糖购自 Invitrogen 公司; 氯仿/异戊醇(24:1, *V/V*), 异丙醇、无水乙醇、氯仿、焦碳酸二乙酯(DEPC), 购自上海生工生物有限公司; DNase I, PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒等购自 TaKaRa 公司; SYBR green mixture 等购自 ABI。

1.2 不同条件下培养副溶血弧菌

将 3 株副溶血弧菌 ATCC17802、ATCC33846

和 ATCC33847 接种于含 1% NaCl 的 TSB 培养基中 37 °C 培养过夜, 以 10% 的比例转接于含 1% NaCl 的 TSB 培养基中, 37 °C 培养 3 h 至 OD_{600} 为 0.8, 离心沉淀; 菌体用不同 NaCl 浓度(1%, 3%, 5%, 8%, 10%)的 TSB 培养基重悬, 37 °C 继续培养 3 h, 或者菌体在含 1% NaCl 的 TSB 培养基中重悬, 分别放在不同温度下(4 °C、10 °C、20 °C、25 °C、30 °C、37 °C)继续培养 3 h; 离心沉淀, 抽提总 RNA 用于 *tlh* 和 *tdh* 基因转录水平差异的检测。

1.3 总 RNA 的提取与反转录

用经典的 Trizol 法提取总 RNA: 取副溶血弧菌菌液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min; 弃上清, 菌体用液氮速冻, 磨成粉末, 把粉末转到 1.5 mL 离心管中(液氮上操作, 保证低温), 加入 800 μ L Trizol, 振荡 1 min, 冰上静置 3 min, 反复振荡 3 次; 加入 200 μ L 氯仿/异戊醇(24:1); 12 000 r/min 离心 5 min; 将上清 500 μ L 转入 1.5 mL 离心管中(不要吸取中层物质, 否则会有 DNA 污染), 加入与上清等体积的异丙醇(预冷), -20 °C 放置 1 h 或更长时间(充分沉淀); 12 000 r/min 离心 5 min; 小心移去上清, 用 70% 的乙醇洗 2 遍, 每次 700 μ L, 12 000 r/min 离心 3 min; 小心的尽可能吸走上清, 超净台上倒置将酒精空干, 加入 40 μ L DEPC 水溶解; -80 °C 保存^[9]。

总 RNA 提取后的纯化: 用无 RNase 的 DNase I 处理消除总 RNA 池中污染的少量 DNA。依据 DNase I 试剂的说明书进行 RNA 的纯化。普通 PCR 验证基因组 DNA 已完全降解。

反转录反应按试剂盒说明书操作, 产物 cDNA 置于 -20 °C 保存。

1.4 实时荧光定量 PCR 反应检测 *tlh* 和 *tdh* 基因的表达差异

采用 16S rRNA 为内标基因, 内标基因与目的基因各设 3 个平行反应管。引物由上海生工生物有限公司合成, 序列见表 2。

反应体系为 30 μ L, 其中 15 μ L SYBR green mixture, 上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, 加水至 30 μ L。

表 2 实验所用引物 Table 2 Primers used in the experiment			
细菌 Bacteria	扩增区域 Amplified region	引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')
Vp	16S rRNA	上游	GGTTACCTTGTTACG ACTT
		下游	AGAGTTTGATCCTGG CTCAG
	<i>tlh</i>	上游	AAAGCAGATTATGCA GAAGCACTG
		下游	GCTACTTCTAGCATT TTCTCTGC
	<i>tdh</i>	上游	GTAAAGGTCCTCTGAC TTTGGAC
		下游	TGGAATAGAACCTTC ATCTTCACC

95 °C 30 s, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 循环 40 次。60 °C、1 min 时读取荧光值, 同时进行 ROX 值校正, 最后进行荧光 PCR 产物溶解曲线分析。

2 结果与分析

2.1 3 株副溶血弧菌在不同盐度和温度下的菌数比较

2.1.1 3 株副溶血弧菌在不同盐度下的菌数比较: 依据 1.2 中的方法培养副溶血弧菌, 用分光光度计测量不同培养盐度下 3 株副溶血弧菌菌液在 600 nm 处的吸光值(OD_{600}) (图 1), 由图 1 可以看出 3 株副溶血弧菌都在 1% 的盐度下取得最大 OD 值, 进而得出副溶血弧菌在其他条件相同的情况下, 最适生长盐度是 1%。

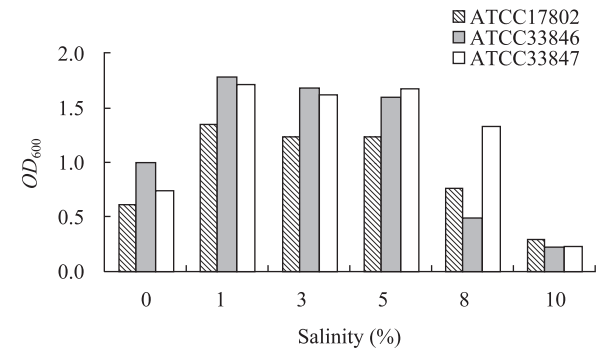


图 1 3 株副溶血弧菌在不同盐度下的菌数柱状图
Fig. 1 Bacterial counts histogram of three strains of *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity

2.1.2 3 株副溶血弧菌在不同温度下的菌数比较: 依据 1.2 中的方法培养副溶血弧菌, 用分光光度计测量不同培养温度下 3 株副溶血弧菌菌液在 600 nm 处的吸光值(OD_{600}) (图 2), 由图 2 可以看出 3 株副溶血弧菌都在 25 °C 下取得最大 OD 值, 进而得出副溶血弧菌在其他条件相同的情况下, 最适生长温度是 25 °C。

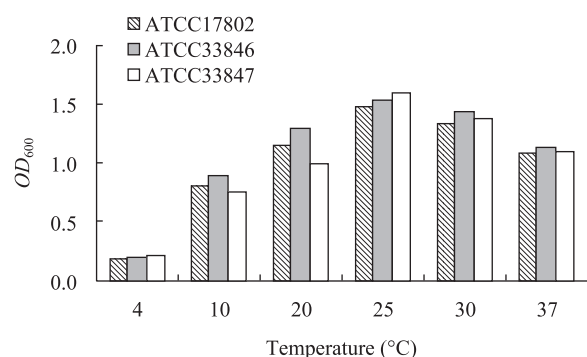


图 2 3 株副溶血弧菌在不同温度下的菌数柱状图
Fig. 2 Bacterial counts histogram of three strains of *Vibrio parahaemolyticus* at different temperature

由以上两图可以看出, 3 株副溶血弧菌在 25 °C、1% 的盐度下生长最好, 即它的最适条件是 25 °C、1% 的盐度。

2.2 实时荧光定量 PCR 法检测 3 株副溶血弧菌 TLH 基因的表达差异

运用 1.3 中的方法, 提取副溶血弧菌的总 RNA, 并验证其不含基因组 DNA 后, 对提取出的总 RNA 进行反转录, 用 1.4 中的方法对反转录得到的 cDNA

进行实时荧光定量 PCR 反应。

2.2.1 提取出的总 RNA 的纯化结果: DNase I 处理副溶血弧菌总 RNA 后, 普通 PCR 扩增 *tlh* 基因, 1% 凝胶电泳显示无 *tlh* 条带, 说明抽提的副溶血弧菌总 RNA 中基因组 DNA 已经完全被酶解(图 3), 可以进行接下来的荧光定量 PCR 反应。

2.2.2 实时荧光定量 PCR 结果: 分析 16S rRNA 和 *tlh* 基因融解曲线可见只有单峰值, 排除了非特异性扩增, 阴性对照无扩增曲线, 表明加样时无交叉污染^[10](图 4)。

由表 3 和表 4 可以看出, 不同菌株间和不同应激条件下 *tlh* 基因表达差异显著: (1) 3 株实验菌株中, ATCC33847 的 *tlh* 基因表达量最高, ATCC33846 的表达量最低; (2) 在 5% 的盐度下, 3 株副溶血弧菌 *tlh* 基因的表达量均显著大于在其他盐浓度条件; (3) 在 20 °C 下, 3 株副溶血弧菌 *tlh* 基因的表达量均显著大于在其他温度条件下。

进而可以得出, 副溶血弧菌 *tlh* 基因的最适表达条件是 5% 盐度和 20 °C, 这与该菌的最适生长条件不一致, 可见副溶血弧菌的生长与毒力基因的表达并不同步。

2.3 荧光定量 PCR 法检测 3 株副溶血弧菌 TDH 基因的表达差异

由图 5 分析 16S rRNA 和 *tdh* 基因融解曲线可见只有单峰值, 排除了非特异性扩增, 阴性对照无扩增曲线, 表明加样时无交叉污染。

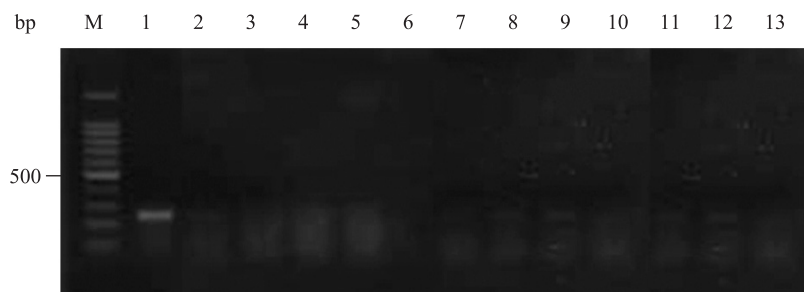


图 3 副溶血弧菌总 RNA 中 *tlh* 基因的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplification of *tlh* gene in total RNA of *Vibrio parahaemolyticus*

注: M: 100 bp DNA ladder; 1: DNA 阳性对照; 2-13: 提取的总 RNA。

Note: M: 100 bp DNA ladder; 1: DNA positive control; 2-13: Total RNA.

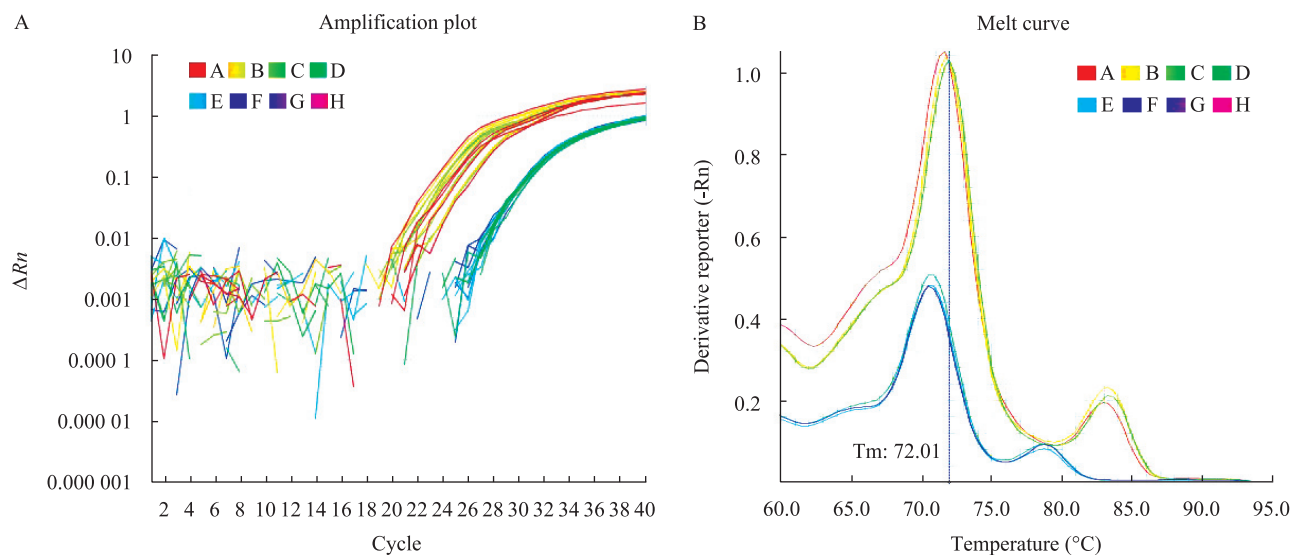


图4 副溶血弧菌 cDNA 中 16S rRNA 和 *tlh* 基因的荧光定量 PCR 实时扩增曲线(A)和融解曲线(B)

Fig. 4 Real-time fluorescence quantitative PCR amplification curves (A) and melting curve (B) of 16S rRNA and *tlh* gene in cDNA of *Vibrio parahaemolyticus*

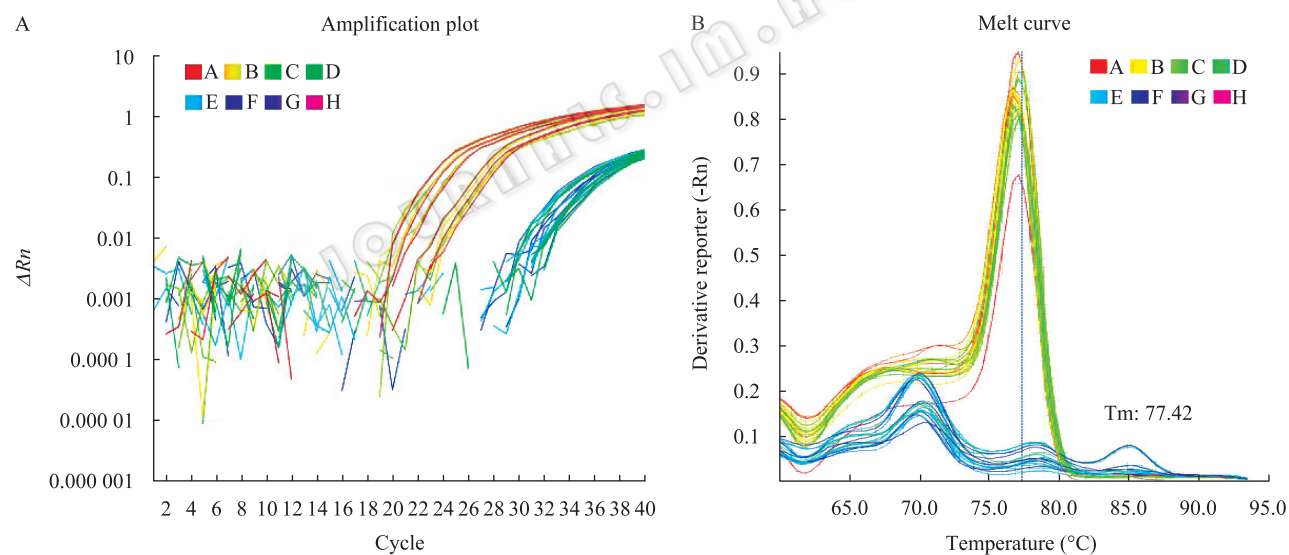


图5 副溶血弧菌 cDNA 中 16S rRNA 和 *tdh* 基因的荧光定量 PCR 实时扩增曲线(A)和融解曲线(B)

Fig. 5 Real-time fluorescence quantitative PCR amplification curves (A) and melting curve (B) of 16S rRNA and *tdh* gene in cDNA of *Vibrio parahaemolyticus*

由表 5 和表 6 可以看出,不同菌株间和不同应激条件下 *tdh* 基因表达差异显著:(1) 3 株实验菌株中,ATCC33847 的 *tdh* 基因的表达量高于 ATCC33846;(2) 在 1%盐度下,2 株副溶血弧菌 *tdh* 基因的表达量均显著大于其他盐浓度条件;(3) 在

25 °C 下,2 株副溶血弧菌 *tdh* 基因的表达量均显著大于在其他温度条件下。

进而可以得出,副溶血弧菌 *tdh* 基因的最适表达条件是 1%的盐度和 25 °C,这与该菌的最适生长条件一致,可见副溶血弧菌毒力基因的表达与生长

表 3 3 株不同副溶血弧菌 TLH 基因在不同盐度下的表达差异

Table 3 Expression differences of tlh gene under different salinity in 3 *Vibrio parahaemolyticus* strains

菌株 Strain	盐度 Salinity (%)	$\Delta\Delta C_T$	$2^{(-\Delta\Delta C_T)}$
ATCC17802	1	1.08±0.01	0.47±0.01
	3	-1.09±0.01	2.14±0.01
	5	-2.97±0.02	7.85±0.02
	8	-0.66±0.01	1.58±0.01
	10	0.77±0.01	0.58±0.01
ATCC33846	1	0±0.01	1.01±0.01
	3	0.52±0.02	0.69±0.02
	5	-0.83±0.02	3.57±0.02
	8	1.08±0.01	0.47±0.01
	10	2.57±0.01	0.16±0.01
ATCC33847	1	-2.00±0.02	4.02±0.02
	3	-1.66±0.01	3.16±0.01
	5	-2.87±0.01	7.32±0.01
	8	-0.88±0.03	1.85±0.03
	10	0±0.01	1.01±0.01

表 4 3 株不同副溶血弧菌 TLH 基因在不同温度下的表达差异

Table 4 Expression differences of tlh gene under different temperature in 3 *Vibrio parahaemolyticus* strains

菌株 Strain	温度 Temperature (°C)	$\Delta\Delta C_T$	$2^{(-\Delta\Delta C_T)}$
ATCC17802	4	0±0.01	1.01±0.01
	10	-1.69±0.01	3.24±0.01
	20	-2.28±0.02	4.87±0.02
	25	-1.65±0.01	3.14±0.01
	30	-1.47±0.01	2.77±0.01
	37	-1.37±0.01	2.58±0.01
ATCC33846	4	2.92±0.01	0.13±0.01
	10	1.06±0.02	0.47±0.02
	20	0±0.01	1.01±0.01
	25	0.58±0.01	0.66±0.01
	30	1.87±0.03	0.27±0.03
	37	2.04±0.01	0.24±0.01
ATCC33847	4	0.62±0.02	0.65±0.02
	10	-1.01±0.01	2.01±0.01
	20	-2.97±0.01	7.86±0.01
	25	-1.82±0.01	3.53±0.01
	30	-2.04±0.01	4.11±0.01
	37	-2.49±0.02	5.62±0.02

表 5 两株不同副溶血弧菌 TDH 基因在不同盐度下的表达差异

Table 5 Expression differences of tdh gene under different salinity in 3 *Vibrio parahaemolyticus* strains

菌株 Strain	盐度 Salinity (%)	$\Delta\Delta C_T$	$2^{(-\Delta\Delta C_T)}$
ATCC33846	1	0±0.01	1.01±0.01
	3	2.19±0.01	0.21±0.01
	5	2.05±0.02	0.24±0.02
	8	5.95±0.01	0.01±0.01
	10	5.68±0.01	0.02±0.01
ATCC33847	1	-0.51±0.03	1.41±0.03
	3	0.01±0.01	0.98±0.01
	5	0.64±0.01	0.64±0.01
	8	0.79±0.02	0.57±0.02
	10	1.76±0.01	0.29±0.01

表 6 两株不同副溶血弧菌 TDH 基因在不同温度下的表达差异

Table 6 Expression differences of tdh gene under different temperature in 3 *Vibrio parahaemolyticus* strains

菌株 Strain	温度 Temperature (°C)	$\Delta\Delta C_T$	$2^{(-\Delta\Delta C_T)}$
ATCC33846	4	5.26±0.02	0.03±0.02
	10	4.62±0.01	0.04±0.01
	20	2.28±0.01	0.21±0.01
	25	0±0.01	1.01±0.01
	30	3.64±0.01	0.08±0.01
	37	4.35±0.01	0.05±0.01
ATCC33847	4	0.52±0.01	0.69±0.01
	10	0.44±0.01	0.73±0.01
	20	-3.41±0.02	10.61±0.02
	25	-4.64±0.01	25.01±0.01
	30	-2.22±0.03	4.66±0.03
	37	-1.07±0.01	2.11±0.01

有一定的相关性。

综上，副溶血弧菌的两种毒力基因 *tlh* 和 *tdh* 的最适表达条件不一致，且与该菌的最适生长条件也不一致，可见不仅是细胞内部转录调节因子，环境对基因的表达也有显著影响。

3 讨论

应用 SPSS 统计分析软件对上述数据进行分析，进一步探讨基因表达和环境变化之际的关系。

表 7 TLH 基因的表达差异
Table 7 Expression differences of *tlh*

因素 Factors	Sum of squares	<i>df</i>	Mean squares	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
盐度 Salinity	35.614	4	8.904	1.912	0.185
温度 Temperature	14.602	5	2.920	0.535	0.746
菌株 Strain	49.629	2	24.815	6.606	0.004

表 8 TDH 基因的表达差异
Table 8 Expression differences of *tdh*

因素 Factors	Sum of squares	<i>df</i>	Mean squares	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
盐度 Salinity	0.394	4	0.099	0.309	0.861
温度 Temperature	226.522	5	45.304	0.735	0.623
菌株 Strain	91.427	1	91.427	3.245	0.087

根据表 7 和表 8, 通过比较 *F* 值, 可以得出以下结论: (1) 影响 TLH 基因表达的因子之间的关系: 菌株>盐度>温度; (2) 影响 TDH 基因表达的因子之间的关系: 菌株>温度>盐度。综合所有因素, 进一步比较 *F* 值, 可以得出以下结论: 盐度对 *tlh* 的影响大于对 *tdh* 的影响; 温度对 *tlh* 的影响小于对 *tdh* 的影响; 菌株对 *tlh* 的影响大于对 *tdh* 的影响。

综上所述, 菌株的不同, 即菌株内部转录调节因子的不同对毒力基因的表达影响最大。其次是环境因素的影响, 包括温度、盐度、酸碱度等。且不同的环境条件对不同毒力基因表达的影响程度不一致, 在研究中, 我们可以通过比较毒力基因表达量的大小来间接比较该致病菌的毒力大小, 即该菌对人体危害程度的大小。这时, 就更需要注意不同的环境因素对不同毒力因子的影响, 并通过改变环境条件来抑制毒力基因的表达, 进而达到通过改变环境控制该菌致病力大小的目的。

本研究运用荧光定量 PCR 法检测副溶血弧菌不同菌株和同种菌株在不同的生长条件(盐度, 温度)下 *tlh* 和 *tdh* 基因 mRNA 的表达差异, 不仅得出副溶血弧菌在不同条件下的生长差异及最适生长条件, 同时也得出 *tlh* 和 *tdh* 基因的表达差异和最适表达条件, 并由此得出菌株、温度和盐度影响下表达差异性的大小, 对研究外界环境对 Vp 的 *tlh* 和 *tdh* 基因

表达的影响提供基础, 进而为探讨 *tlh* 和 *tdh* 基因的功能和致病性打下基础。通过比较毒力基因的表达进而间接推断菌株的毒力变化, 研究结果对于探讨副溶血弧菌致病能力强弱和环境适应性之间的关系提供基础。

对于本文得出的结论, 即影响副溶血弧菌毒力基因 *tlh* 和 *tdh* 毒力大小的环境条件, 可以依照这些环境条件培养该菌, 并通过蛋白表达来进一步探讨毒力基因的表达差异, 或许会是接下来的研究方向。

参 考 文 献

[1] Douet JP, Castroviejo M, Dodin A, et al. Study of the haemolytic process and receptors of thermostable direct haemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Res Microbiol, 1996, 147(9): 687–696.

[2] 刘代新, 宁喜斌, 张继伦. 响应面分析法优化副溶血性弧菌生长条件[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 306–310.

[3] 许如苏, 陈茹, 林彩华, 等. 副溶血性弧菌 LUXTM 荧光 PCR 快速检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(12): 1075–1079.

[4] Shinoda S, Matsuoka H, Tsuchie T, et al. Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene[J]. J Gen Microbiol, 1991, 137(12): 2705–2711.

[5] Gooch JA, DePaola A, Kaysner CA, et al. Evaluation of two direct plating methods using nonradioactive probes for enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(2): 721–724.

[6] Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium[J]. Infect Immun, 1995, 63(6): 2093–2099.

[7] Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh*[J]. J Microbiol Methods, 1999, 36(3): 215–225.

[8] Cook DW, Bowers JC, DePaola A. Density of total and pathogenic (*tdh*+) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf coast molluscan shellfish at harvest[J]. J Food Prot, 2002, 65(12): 1873–1880.

[9] 陈星, 潘迎捷, 孙晓红, 等. 四种副溶血弧菌总 RNA 提取方法的比较[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(6): 1177–1182.

[10] 王淑娜, 方维焕. 荧光定量 PCR 法检测副溶血弧菌 *tdh* 基因的表达差异[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(9): 25–27.