

浙江沿海地区海产品及环境中副溶血弧菌的分离与主要毒力基因分析

金培婕^{1,2} 吴蓓蓓² 王淑娜² 俞 盈² 钱永华¹ 方维焕^{2*}

(1. 西北农林科技大学动物医学院 陕西 杨凌 712100)
(2. 浙江大学动物预防医学研究所 浙江 杭州 310029)

摘要: 2007~2008 年间, 我们调查了浙江沿海地区海产品和养殖环境中副溶血弧菌的污染状况, 并分析了不同来源副溶血弧菌中主要毒力相关基因 *tdh*、*trh*、*ureC* 和 T3SS2(*vscC2*、*vcrD2*) 的分布特征及溶血表型与尿素酶表型。结果显示, 566 份样品中共分离到 395 株副溶血弧菌, 检出率高达 70%, 毒力相关基因分析结果发现, *tdh* 基因阳性率为 10.1%, *trh* 与 *ureC* 基因阳性率分别为 20.0% 与 11.1%, 40 株 *tdh*⁺ 菌中组成 T3SS2 的 *vscC2* 基因阳性率为 32.5%, 其中 38 株 *tdh*⁺ 菌的神奈川试验亦呈阳性; 但在 44 株 *trh*⁺-*ureC*⁺ 菌株中, 尿素酶表型阳性只有 6 株。试验表明, 浙江沿海地区海产品及其养殖环境中副溶血弧菌污染状况比较严重, 且有相当比例的菌株携带毒力或疑似毒力基因。研究结果为深入探索副溶血弧菌的致病性、基因结构与功能(或表型)及其分子演化提供基础。

关键词: 海产品, 副溶血弧菌, 毒力基因

Analysis of Major Virulence Genes in *Vibrio Parahaemolyticus* Isolates from Coastal Areas in Zhejiang Province

JIN Pei-Jie^{1,2} WU Bei-Bei² WANG Shu-Na² YU Ying²
QIAN Yong-Hua¹ FANG Wei-Huan^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)
(2. Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China)

Abstract: Several aquatic species and their environments were examined for presence of *Vibrio parahaemolyticus* between 2007 and 2008 in the coastal areas in Zhejiang province, and some virulence-related genes such as *tdh*, *trh*, *ureC* and *vscC2* were investigated from the isolates. *V. parahaemolyticus* was recovered from 70% of the samples tested (395/566). The genes *tdh*, *trh* and *ureC* existed in 10.1%, 20.0% and 11.1% respectively from 395 isolates. Among the 40 *tdh*-positive isolates, 32.5% harbored the *vscC2* gene, one of the type three secretion system 2 (T3SS2) gene family. Thirty-eight of the 40 *tdh*-positive isolates were positive for the Kanagawa phenomenon. Out of 44 *trh*-and-*ureC*-positive isolates, only six exhibited urease phenotype. Overall, this study reveals the significant prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods and their habitats with high diversity of virulence genes. Representative *V. parahaemolyticus* isolates could be

used for further investigation into their pathogenicity, functional genomics, and molecular evolution.

Keywords: Aquatic species, *Vibrio parahaemolyticus*, Virulence genes

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一种革兰氏阴性嗜盐菌,广泛存在于河口和海洋环境中,它不仅严重危害海水养殖业,还能引发人类胃肠炎等食物中毒病。我国部分沿海地区副溶血弧菌引起的食物中毒在细菌性食物中毒中居首位,主要因误食受该病原菌污染或加工不当的海产品而引起,近年来由其引发的食物中毒事件层出不穷^[1-3]。耐热直接溶血素(TDH)和TDH-相关溶血素(TRH)被认为是副溶血弧菌主要的致病因子^[4,5],分别由165个氨基酸组成,两者的同源性为67%,并且有相同的生物学活性,如溶血活性、肠毒活性、细胞毒性和心脏毒性^[6,7]。几乎所有临床分离株都可产生神奈川现象(Kanagawa phenomenon, KP),这种现象与TDH有关^[8],虽然环境分离株很少有KP阳性者,但只要携带*tdh*或*trh*基因就可被认为是毒力株^[5]。与其它弧菌一样,部分副溶血弧菌临床分离株产生尿素酶^[9],研究表明纯化的尿素酶能引起乳鼠肠液的积聚^[10],而*ureC*基因是尿素酶基因簇中最稳定的结构基因^[6],有学者认为副溶血弧菌尿素酶阳性与携带*trh*基因有关,尿素酶基因簇与*trh*基因连锁^[11,12]。此外,近期在对副溶血弧菌临床株RIMD2210633(KP+, O3: K6)的研究中发现了另外一类毒力因子——三型分泌系统(T3SS),由位于染色体1和2上的T3SS1及T3SS2两个基因簇构成,分别与细菌对机体的细胞毒性和肠毒性有关,其中T3SS2基因簇位于毒力岛上*tdh*的两个拷贝之间,且只在KP阳性的菌株中存在^[13]。

本研究调查了浙江沿海的舟山、宁波、温州、台州地区海产品和养殖环境中的副溶血弧菌污染状况,进而探索不同来源副溶血弧菌分离株中主要毒力相关基因*tdh*、*trh*、*ureC*和T3SS2(*vscC2*、*vcrD2*)的分布特征。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品收集与菌株分离:2007年9月至2008年7月,本实验室分5次赴舟山、宁波、温州、台州等地的海产品养殖区进行系统的样品采集,共收集样本566份,其中海产品样包括鱼类、蛤类、螺类、

蛏子、南美白对虾与蟹类等,养殖环境样包括养殖塘底泥、水。所有样本均单独放置于无菌的采样袋中,以避免交叉污染,从样品采集地到样品增菌处理时间不超过4 h。所有样品均根据国标法用碱性蛋白胨水(APW)增菌培养基预增菌,在TCBS选择性培养基上挑取绿色疑似菌落进行PCR鉴定。临床分离株ZJ15由浙江省疾病预防控制中心惠赠,参考株BJ1997购自中国普通微生物保藏管理中心。

1.1.2 试剂:*Taq*酶、10×PCR buffer、4×dNTP均购自北京鼎国生物技术有限责任公司;碱性蛋白胨水、TCBS琼脂培养基购自北京陆桥生物技术有限公司;莪麦氏琼脂培养基、尿素酶琼脂基础购自中国进出口商品检验技术研究所北京陆桥技术有限责任公司。

1.2 引物的设计与合成

本实验所用引物由上海英骏生物技术有限公司合成(表1)。

1.3 细菌基因组DNA的提取

参照Abolmaay改良方法^[14]提取供试株细菌基因组DNA,取1 mL 37℃过夜培养的供试株菌液于Eppendorf管中,12000 r/min离心2 min,弃上清;用灭菌水洗涤一次后分别加入40 μL灭菌水和2×TZ,充分混匀;−20℃放置45 min;沸水浴10 min后冰浴10 min;6000 r/min离心4 min,收集上清备用。

1.4 副溶血弧菌的双重PCR鉴定及其主要毒力基因的PCR扩增

采用本实验室建立的副溶血弧菌特异性双重PCR检测体系^[15],利用具有种特异性的副溶血弧菌*tlh*基因和*gyrB*基因保守区序列设计引物。副溶双重PCR鉴定及毒力基因扩增均在30 μL反应体系中进行,含1×PCR buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.16 mmol/L dNTPs, 0.83 μmol/L 相应引物, 47 U/mL *Taq*酶及3.3 μL模板DNA。反应条件为94℃ 3 min; 94℃ 40 s, 56℃ 35 s, 72℃ 40 s, 30个循环; 72℃ 5 min。*tdh*基因扩增条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35个循环; *ureC*、*vscC2*、*vcrD2*的扩增条件为: 95℃ 5 min; 94℃ 50 s, 58℃ 45 s, 72℃ 45 s, 30个循环; 72℃ 10 min。*trh*基因采

表1 PCR反应引物对和预扩增片段长度列表
Table 1 List of PCR primers and amplicon sizes

Genes		Sequences (5'-3')	Size (bp)	References
<i>gyrB</i>	<i>gyrB-a</i>	CGGCGTGGGTGTTTCGGTAGT	285	(Venkateswaran K <i>et al.</i> , 1998)
	<i>gyrB-b</i>	TCCGCTTCGCGCTCATCAATA		
<i>tlh</i>	<i>tlh-a</i>	AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	450	(Venkateswaran K <i>et al.</i> , 1998)
	<i>tlh-b</i>	GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC		
<i>tdh</i>	<i>tdh-F</i>	GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC	270	(Bej <i>et al.</i> , 1999)
	<i>tdh-R</i>	TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC		
<i>trh</i>	<i>trh-F</i>	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	486	(Bej <i>et al.</i> , 1999)
	<i>trh-R</i>	CATAACAAACATATGCCCATTTCCG		
	<i>trh-1</i>	ATCCATACCTTTTCTTCTCC	285	This study
	<i>trh-2</i>	TCTGATTTTGTGAAGACCGT		
<i>ureC</i>	<i>ureC-a</i>	GTCATTGCTGGTGAAGGTAATA	623	This study
	<i>ureC-b</i>	GAAGGATCTAAGTGATGGCAGAC		
<i>vscC2</i>	<i>vscC2-F</i>	AATACGAGCTTGCACTTGACCTG	261	This study
	<i>vscC2-R</i>	GATATTGTTGTGCCACCTTTTAC		
<i>vcrD2</i>	<i>vcrD2-F</i>	CGCAATAGAAAGCAACAAACGA	244	This study
	<i>vcrD2-R</i>	GGCGAAGTTACGTAAATCATCAT		

Note: Synthesis unit of each primer, nmol/OD; *gyrB-a*: 4.5, *gyrB-b*: 4.7; *tlh-a*: 3.5, *tlh-b*: 4.2; *tdh-F*: 4, *tdh-R*: 3.9; *trh-F*: 4, *trh-R*: 3.6; *trh-1*: 5.1, *trh-2*: 4.6; *ureC-a*: 3.8, *ureC-b*: 3.6; *vscC2-F*: 4, *vscC2-R*: 4.2; *vcrD2-F*: 3.6, *vcrD2-R*: 3.8.

用巢式PCR法扩增,其中取1 μL第1轮PCR产物作为第2轮PCR的模板,扩增条件均为:94°C 3 min; 94°C 1 min, 58°C 50 s, 72°C 50 s, 30个循环; 72°C 5 min。扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶成像系统下拍照记录结果。

1.5 神奈川溶血试验

将供试菌株在含3% NaCl的LB培养基中振荡培养至对数生长期,取10 μL培养液加在莪麦氏琼脂培养基中培养24 h,判定是否呈β溶血。

1.6 尿素酶试验

本试验改进了传统的用试管检测尿素酶表型的方法,采用96孔板细菌培养法。将供试菌株接种到含3% NaCl的LB液体培养基中37°C振荡培养10 h,取20 μL培养液于尿素酶琼脂培养基(96孔培养板)中,每孔加入100 μL灭菌的液体石蜡,培养24 h,观察培养基是否变色,呈玫瑰红色为阳性。

2 结果

2.1 海产品及其养殖环境中副溶血弧菌分布特征

从4个地区的海产品及养殖环境中共采集样品566份,分别为宁波101份、温州146份、台州100份、舟山219份,其中贝类112份、虾鱼蟹类156份、泥样145份、水样共计153份。由双重PCR

检测体系检测确定副溶血弧菌(部分菌株的PCR结果见图1)。副溶血弧菌的平均分离率为70% (395/566),不同地区的分离率在63%~87%之间(表2)。贝类等不同来源样品间的检出率差异具有显著性($P<0.01$)。

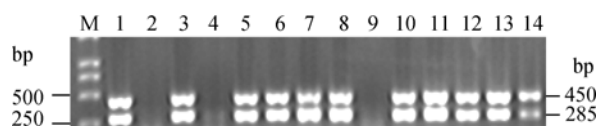


图1 双重PCR鉴定海产品中的副溶血弧菌

Fig. 1 Duplex PCR identification of the *Vibrio parahaemolyticus* isolates from seafoods

Note: M: DL2000; 1: BJ1997; 2: Negative control; 3-14: Seafood isolates.

2.2 副溶血弧菌表型及毒力相关基因检测结果

2.2.1 毒力相关基因检测:对海产品和环境分离株的毒力基因进行了检测,部分代表性菌株的PCR扩增结果见图2。395株分离株中,*tdh*、*trh*和*ureC*基因阳性株率分别为10.1%、20%和11.1%,*tdh*⁺-*trh*⁺菌株占4.3%(表3)。在40株*tdh*⁺菌株中,仅13株扩增到了*vscC2*基因,在62株*tdh*⁻-*trh*⁺菌株中未检测到*vscC2*基因。此外,只在55.7%(44/79)的*trh*⁺菌株中扩增出*ureC*基因。

表 2 浙江省沿海地区不同来源样品中 V.P 检出率
Table 2 The isolation rates of *Vibrio parahaemolyticus* from various regions and sources

	贝类 Shellfish			虾蟹鱼类 Shrimp/crab/fish			泥洋 Mud			水样 Water			总计 Total		
	样品数	阳性数	检出率(%)	样品数	阳性数	检出率(%)	样品数	阳性数	检出率(%)	样品数	阳性数	检出率(%)	样品数	阳性数	检出率(%)
宁波 Ningbo	28	26	93	29	25	86	31	26	84	13	11	85	101	88	87
温州 Wenzhou	34	28	63	21	13	62	45	34	78	46	36	78	146	107	73
台州 Taizhou	30	19	63	8	6	75	31	23	74	31	15	48	100	63	63
舟山 Zhoushan	20	17	85	98	73	74	38	20	53	63	27	41	219	137	63
总计 Total	112	85	76	156	117	75	145	104	72	153	89	58	566	395	70

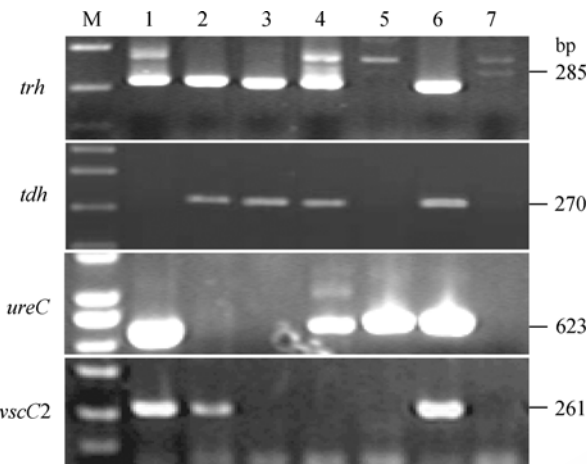


图 2 部分副溶血弧菌海产品及环境分离株毒力相关基因的 PCR 检测

Fig. 2 PCR identification of virulence associated genes in several representative *Vibrio parahaemolyticus* isolates
Note: M: DL2000; Lanes for *trh*, *tdh* and *ureC*: 1: BJ1997, 2-7: Seafood isolates; Lanes for *vscC2* gene: 1: ZJ15, 2-7: Seafood isolates.

表 3 副溶血弧菌分离株毒力相关基因及表型检出情况
Table 3 Analysis of virulence-related genes and phenotypes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates

	目的基因/表型 Target genes/ Phenotype	待检菌 株数 Test strains	目的基 因/表型 阳性菌 株数 Positive strains	目的基 因/表型 检出率 (%) Positive rates
Genotype	<i>tdh</i>	395	40	10.1
	<i>trh</i>	395	79	20.0
	<i>ureC</i>	395	44	11.1
	<i>vscC2</i>	40	13	32.5
	<i>vcrD2</i>	40	0	0
	<i>tdh-trh</i>	395	17	4.3
	<i>tdh-trh-ureC</i>	395	8	2.0
	<i>tdh-trh-ureC-vscC2</i>	395	0	0
Phenotype	Kanagawa phenomenon	40	38	95
	Urease	395	6	1.5

2.2.2 副溶血弧菌的溶血与尿素酶表型: 40 个 *tdh*⁺ 分离株中, KP 现象除两株为阴性外其余均阳性, 只是溶血环清晰度有差异。尿素酶试验结果显示, 在 44 株 *trh*⁺-*ureC*⁺ 分离株中尿素酶表型阳性仅有 6 株 (13.6%)(表 3)。

3 讨论

本研究结果显示副溶血弧菌广泛存在于海产品及其养殖环境中, 平均分离率达 70%, 与国内外报道中的 68.12%和 78.6%较接近^[16,17]。检出率与样品类型有关, 海产品中贝类、虾及蟹的平均分离率超过 75%, 而鱼的平均分离率为 36%, 其中深海网箱养殖的分离率仅达 17%(数据未显示), 而宁波和温州的鱼样是围塘养殖的, 其分离率较高, 这可能与深海养殖过程中海水快速净化结果相关。林祥田^[19]综合 1959~2004 年公开发表的文献得出 9 月份为副溶血弧菌引发食物中毒高发期, 林海^[20]对某市近 7 年来报告的副溶血弧菌中毒病的流行病学分析结果也表明 7~10 月份为发病高峰季节, 这与本试验调查显示的 9 月份分离率较其他采样月份高相一致, 说明高温天气有利于细菌在海产品中的增殖并增加由此引起食物中毒的发生概率。近年来有研究人员发现副溶血弧菌不仅存在于沿海地区及海产品中, 在内陆及冷冻腌制食品中也分离到了致病性菌株^[17,19]。综上所述, 相关部门应根据季节, 分点、定类对海产养殖与加工业环节及其产品进行副溶血弧菌污染的监测, 以有效控制相关食品中该菌的污染和食物中毒病的发生。

从 395 株副溶血弧菌环境分离株毒力相关基因检出情况来看, 3 个主要毒力基因 *tdh*、*trh*和 *ureC* 的携带率分别达到 10.1%、20%和 11.1%, 且有 8 株同时携带这 3 种基因, 携带率与国外一些报道基本一

致^[21,22], 高于另一些学者的调查结果^[4,17]。说明浙江沿海地区副溶血弧菌不仅分布广泛, 且有较高的毒力基因携带率, 对海产品安全构成很大的威胁。此外, 所有检测菌株 tdh 基因型与KP溶血表型基本一致, tdh 菌株的溶血表型阴性; tdh^+ 菌株的KP溶血表型大部分阳性(38/40), 只是溶血环清晰程度不同, 而研究发现溶血现象明显与否可能与菌株中 tdh 基因表达量高低有关, 推测这两株神奈川阴性株是由于这些菌株中 tdh 基因的表达量低所致^[4]。另外, 我们只在部分 tdh 和KP阳性菌株检测到T3SS2 基因簇中外膜蛋白基因 $vscC2$ (13/40), 被国外学者^[23]用来构建T3SS2 突变株的内膜蛋白基因 $vcrD2$ 也未检出, 这与国外研究人员Makino等^[13]提出的T3SS2 存在于KP阳性副溶血弧菌中的观点不符。以上现象提示T3SS2 在海产品相关分离株与临床株之间的基因结构可能有差异, 这种差异及其相关基因的功能还有待于进一步研究。

在79株 trh^+ 分离株中只有44株携带尿素酶结构基因 $ureC$, 而这44株 trh^+-ureC^+ 菌株中, 仅有6株尿素酶阳性, 即有38株尿素酶阴性菌携带有尿素酶基因簇中最稳定的结构基因 $ureC$, 提示菌株是否携带 trh 或 $ureC$ 基因与其尿素酶表型是否阳性之间无必然联系。我们还发现全部44株 $ureC^+$ 菌株均含有 trh , 其余35株 trh^+ 菌株的 $ureC$ 却为阴性, 这证实了 trh 与 $ureC$ 并非完全连锁的说法^[24], 推测尿素酶表达系统可能是由多基因调控的复杂系统。本实验中分离株携带不同毒力基因与动物致病性之间的关系及尿素酶表达系统调控机制等问题仍需进一步探讨。

综上所述, 本研究调查了近两年来浙江主要沿海地区海产品及其养殖环境中副溶血弧菌的流行情况及其毒力基因的分布, 结果显示这些地区海产品中副溶污染状况较为严重, 且其毒力基因呈现多态性分布, 某些潜在的致病菌株可能会引起食源性疾病的爆发。研究结果可以为卫生机构和海产品生产者进行安全评估、建立有效的检测方法及预防机制提供依据, 也为深入开展副溶血弧菌的功能基因和分子进化奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 张宏伟, 付建荣, 苏 东. 弧菌科细菌致急性腹泻的流行病学调查. 中华医学检验杂志, 1996, 19(1): 45.

- [2] 李晓艳, 吕碧锋, 潘海晖, 等. 529例副溶血弧菌中毒分析. 现代医药卫生, 2008, 24(5): 778.
- [3] 殷银香, 陈晓燕, 罗 萍, 等. 一起副溶血性弧菌食物中毒的实验室检测. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(11): 2084-2085.
- [4] Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immun*, 1995, 63(6): 2093-2099.
- [5] Shirai H, Ito H, Hirayama T, *et al*. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infect Immun*, 1990, 58(11): 3568-3573.
- [6] Park KS, Iida T, Yamaichi Y, *et al*. Genetic characterization of DNA region containing the trh and ure genes of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun*, 2000, 68(10): 5742-5748.
- [7] Nishibuchi M, Fasano A, Russell RG, *et al*. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin. *Infect Immun*, 1992, 60(9): 3539-3545.
- [8] Joseph SW, Colwell RR, Kaper JB. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic *Vibrios*. *Crit Rev Microbiol*, 1982, 10(1): 77-124.
- [9] Honda S, Matsumoto S, Miwatani T, *et al*. A survey of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from traveller's diarrhea, sea water and imported frozen sea foods. *Eur J Epidemiol*, 1992, 8(6): 861-864.
- [10] Cai Y, Ni Y. Purification, characterization, and pathogenicity of urease produced by *Vibrio parahaemolyticus*. *J Clin Lab Anal*, 1996, 10(2): 70-73.
- [11] Okuda J, Ishibashi M, Abbott SL, *et al*. Analysis of the thermostable direct hemolysin (tdh) gene and the tdh -related hemolysin (trh) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(8): 1965-1971.
- [12] Suthienkul O, Ishibashi M, Iida T, *et al*. Urease production correlates with possession of the trh gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. *J Infect Dis*, 1995, 172(5): 1405-1408.
- [13] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, *et al*. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet*, 2003,

- 361(9359): 743–749.
- [14] Abolmaaty A, Vu C, Oliver J, *et al.* Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. *Microbios*, 2000, **101**(400): 181–189.
- [15] Vongxay K, He XL, Cheng SY, *et al.* Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood and their processing environments as detected by duplex PCR. *J Sci Food Agri*, 2006, **86**: 1871–1877.
- [16] 江海洋, 李 磊, 莫庆宝, 等. 连云港市食用贝类副溶血性弧菌污染状况调查. *职业与健康*, 2008, **24**(20): 2128–2130.
- [17] Yang ZQ, Jiao XA, Zhou XH, *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. *Intl J Food Microbiol*, 2008, **125**(3): 279–285.
- [18] 石亚素, 张行钦, 薛超凌, 等. 舟山海产品副溶血性弧菌污染及毒力基因分析. *中国公共卫生*, 2007, **23**(9): 1135–1136.
- [19] 林祥田. 94 起副溶血弧菌食物中毒流行病学特征分析. *上海预防医学杂志*, 2006, **18**(3): 141–143.
- [20] 林 海. 副溶血性弧菌食物中毒 28 起流行病学分析. *职业与健康*, 2008, **24**(14): 1403–1404.
- [21] Hayat Mahmud Z, Kassu A, Mohammad A, *et al.* Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel, Japan. *Microbiol Res*, 2006, **161**(1): 25–37.
- [22] 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. *Food Microbiol*, 2008, **25**(6): 824–830.
- [23] Park KS, Ono T, Rokuda M, *et al.* Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun*, 2004, **72**(11): 6659–6665.
- [24] Kaufman GE, Myers ML, Pass CL, *et al.* Molecular analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from human patients and shellfish during US Pacific north-west outbreaks. *Lett Appl Microbiol*, 2002, **34**(3): 155–161.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及高新技术创新、应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究; 农业微生物学研究; 工业微生物学研究; 医学微生物学研究; 食品微生物学研究; 环境微生物学研究; 微生物功能基因组研究; 微生物蛋白组学研究; 微生物模式菌株研究; 微生物工程与药物研究; 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 2000 年再获中国科学院优秀期刊三等奖, 2001 年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 更换了彩色封面, 纸张改用铜版纸, 由原来的小 16 开本改为标准大 16 开本(210×297), 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2009 年的每册定价为 48 元, 全年 576 元, 我们将按期免费邮寄。

另, 本刊编辑部现存有少量过期期刊, 如有需要者可直接与编辑部联系, 款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: (010)64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; bjb@im.ac.cn;

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413