DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251020007
引用格式: 江艳华, 王婷, 曲梦, 等. 环渤海区副溶血性弧菌的多位点序列分型分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(6): 48–57.
JIANG YH, WANG T, QU M, *et al*. Multilocus sequence typing analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Bohai Rim Region [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(6): 48–57. (in Chinese with English abstract).

环渤海区副溶血性弧菌的多位点序列分型分析

江艳华[1], 王　婷[1,2], 曲　梦[1], 李风铃[1], 郭莹莹[1], 朱文嘉[1], 李　娜[1], 王联珠[1], 姚　琳[1*]

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 青岛　266071; 2. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛　266404)

摘　要: 目的　通过多位点序列分型技术, 分析副溶血性弧菌的遗传多样性和进化情况。**方法**　对环渤海区产贝类分离的 81 株副溶血性弧菌进行 7 种管家基因(*dnaE*、*gyrB*、*recA*、*dtdS*、*pntA*、*pyrC*、*tnaA*)扩增和测序, 通过序列确定序列型(sequence type, ST), 并绘制遗传关系进化树。**结果**　81 株副溶血性弧菌共含有 71 种 ST, 其中 5 个为单个位点变异型和 61 个单体, 首次发现的 ST 有 51 种, 占总体 71.83%, ST2369 和 ST433 出现频率最高。等位基因数(新等位基因数)分别为 49 种 *dnaE* (5)、54 种 *gyrB* (6)、47 种 *recA* (3)、45 种 *dtdS* (3)、33 种 *pntA* (2)、47 种 *pyrC* (3)和 34 种 *tnaA* (4); 核苷酸多样性最低的管家基因是 *pntA* (0.00873), 最高的是 *recA* (0.02234); 多肽位点占比最高的为 *dtdS* (14.19%), 最低的为 *tnaA* (5.67%); 7 个管家基因的 d_N/d_S 值均小于 1。聚类分析显示, ST 相同或高度相似的菌株聚在一簇, 但与菌株来源不一定成相关性。**结论**　环渤海区贝类来源副溶血性弧菌具有高度遗传多样性, 部分菌株存在跨区域传播潜力, 提示应加强海产品中副溶血性弧菌的监测, 为环渤海区食源性副溶血性弧菌的风险评估和防控提供基础数据。

关键词: 副溶血性弧菌; 多位点序列分型; 遗传多样性; 进化关系

Multilocus sequence typing analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Bohai Rim Region

JIANG Yan-Hua[1], WANG Ting[1,2], QU Meng[1], LI Feng-Ling[1], GUO Ying-Ying[1], ZHU Wen-Jia[1], LI Na[1], WANG Lian-Zhu[1], YAO Lin[1*]

(1. *Yellow Sea Fisheries Research Institute*, *Chinese Academy of Fishery Sciences*, *Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality*, *Ministry of Agriculture and Rural Affairs*, *Qingdao* 266071, *China*; 2. *College of Food Science and Engineering*, *Ocean University of China*, *Qingdao* 266404, *China*)

ABSTRACT: Objective　To analyze the genetic diversity and evolution of *Vibrio parahaemolyticus* using multilocus sequence typing. **Methods**　A total of 81 *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from shellfish in Bohai Rim Region were subjected to amplification and sequencing of 7 kinds of housekeeping genes (*dnaE*, *gyrB*, *recA*,

收稿日期: 2025-10-20
基金项目: 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022024022); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2023TD76)
第一作者: 江艳华(1980—), 女, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为水产品中生物危害物检测与控制。E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn
***通信作者:** 姚琳(1980—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为水产品中生物危害物风险评估。E-mail: yaolin@ysfri.ac.cn

dtdS, *pntA*, *pyrC*, *tnaA*). Sequence types (ST) was determined based on the sequences, and a phylogenetic tree was constructed to analyze genetic relationships. **Results** The 81 *Vibrio parahaemolyticus* strains comprised 71 kinds of STs, including 5 single-locus variants and 61 singletons. Among these, 51 kinds of STs were newly identified, accounting for 71.83% of the total. ST2369 and ST433 were the most frequently observed. The numbers of alleles (new alleles) are 49 for *dnaE* (5), 54 for *gyrB* (6), 47 for *recA* (3), 45 for *dtdS* (3), 33 for *pntA* (2), 47 for *pyrC* (3) and 34 for *tnaA* (4), respectively. Nucleotide diversity was lowest in *pntA* (0.00873) and highest in *recA* (0.02234). The proportion of polymorphic sites was highest for *dtdS* (14.19%) and lowest for *tnaA* (5.67%). The d_N/d_S ratios for all 7 kinds of housekeeping genes were below 1. Phylogenetic analysis revealed that strains with identical or highly similar ST clustered together, however, this clustering pattern did not necessarily correlate with the source of the strains. **Conclusion** *Vibrio parahaemolyticus* strains from shellfish in Bohai Rim Region exhibit high genetic diversity, and some strains possess the potential for cross-regional transmission, underscoring the importance of enhanced monitoring of this pathogen in seafood. These findings provide fundamental data for risk assessment and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in the Bohai Rim region.

KEY WORDS: *Vibrio parahaemolyticus*; multilocus sequencing typing; genetic diversity; evolutionary relationship

0　引　言

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种广泛存在于海洋环境及海产品中的嗜盐性革兰氏阴性细菌, 能够引起急性肠胃炎、伤口感染和败血症等, 是全球最重要的食源性致病菌之一, 也是我国引起食物中毒事件和病例最多的微生物病原[1−4]。随着我国经济的迅速发展与国民健康知识的增长, 人们的膳食结构不断优化, 水产品所占比重逐渐增加。然而, 由副溶血性弧菌引起的食物中毒发生事件也有明显的上升趋势[4]。食源性致病菌的流行病学调查、监管和溯源对食品安全、公共卫生具有决定性意义, 而细菌分型是重要的调查手段之一[5]。

多位点序列分型(multi-locus sequence typing, MLST)技术是1998年由MAIDEN等[6]提出的一种分型溯源技术, 通过对细菌的管家基因进行核酸序列分析, 根据不同序列位点对菌株进行分型, 该方法十分适用于流行病学的研究[7−8]。细菌的管家基因有着高度保守性, 但由于每种等位基因上可能发生核苷酸突变, 因此不同菌株之间也有差异。管家基因的所有等位基因通过串联能够组成一个等位基因谱, 在数据库中有着对应的序列(sequence type, ST)型。MLST 技术能够克服传统表型分型方法的局限性, 其具有操作简单、重复性好、分辨率高、特异性强、灵敏度高和结果验证简便的优点, 此外, MLST 建立的数据库可在全球范围内实现数据交流与共享, 也可使研究者长期追踪并不断补充完善[9]。

目前, 针对副溶血性弧菌的MLST研究已在全球多个海域及水产品中展开, 公共数据库(如 PubMLST)中已积累大量 ST 型及其地理、宿主来源信息。然而, 现有研究多集中于我国东海、南海等传统海域, 而对环渤海区域这一我国北方重要的水产养殖与消费区的副溶血性弧菌的种群结构、遗传多样性及潜在风险仍缺乏系统性的 MLST 分析。环渤海地区具有独特的水文环境、养殖模式及消费习惯, 其菌株的遗传特征可能与南方海域存在差异, 因此开展该区域的分子分型研究, 对于补充我国副溶血性弧菌 MLST 数据库、揭示区域特异性流行型别、评估本地化食品安全风险具有重要意义。本研究通过对环渤海区域贝类来源的 81 株副溶血性弧菌进行 7 种管家基因扩增、测序、ST 型分析, 并通过构建系统发育树解析菌株间的遗传关系与群体结构, 研究结果将初步阐明该区域副溶血性弧菌的遗传多样性特征及可能的进化联系, 为环渤海区食源性副溶血性弧菌的传播追踪、风险预警与防控策略制定提供重要的基础数据。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

1.1.1　菌株来源

81 株副溶血性弧菌分离自 2018 年环渤海区养殖场采集的不同贝类中。样本采集采用随机抽样策略, 每季度从辽宁省、山东省及河北省的主要养殖区域分别采集代表性贝类样品。采集后立即置于低温保存箱, 并于 24 h 内送至实验室进行实验。菌株具体来源构成如下: 按样品品种来源统计, 菲律宾蛤仔 32 株、海湾扇贝 3 株、毛蚶 1 株、青蛤 15 株、四角蛤蜊 27 株、栉孔扇贝 2 株和文蛤 1 株, 按产地来源统计, 辽宁省 36 株, 山东省 33 株, 河北省 12 株。每个菌株都来自不同的样本, 命名为 Vp2018001~Vp2018081。

1.1.2　试剂和培养基

酵母粉、胰蛋白胨(英国 Oxoid 公司); 琼脂粉(北京索莱宝科技有限公司); NaCl(国药集团化学试剂有限公司); 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]; 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增用试剂 Premix Taq™、DNA 分子量标准 D2000[宝生物工程(大连)有限公司]; PCR 扩增用引物、DiaSpin 柱式 PCR 产物纯化试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.2 仪器与设备

TC-96/G/H(B)3 PCR 仪(杭州博日科技有限公司); nanophotometer 微量核酸蛋白测定仪(德国 Implen 公司); Infinity3026 凝胶成像系统(法国 Vilber 公司); Neofuge 15R 高速冷冻离心机(上海力申科学有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取

含盐的卢里亚-贝尔塔尼(Luria-Bertani, LB)培养基按如下配方配制: 酵母粉 5.0 g/L, 胰蛋白胨 10.0 g/L, NaCl 30.0 g/L, 琼脂粉(固体培养基用)15 g/L, pH 7.2。

将–80 ℃保存的副溶血性弧菌菌株在含盐的 LB 液体培养基中活化, 36 ℃培养过夜, 培养液于 12000 r/min 离心 5 min, 收集菌体沉淀, 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。通过电泳(电压 110 V, 时间 30 min)判断基因组 DNA 质量, 采用微量核酸蛋白测定检测仪 DNA 的浓度和纯度。

1.3.2 等位基因扩增及测序

根据副溶血性弧菌 pubMLST 网站(http://www.pubmlst.org/vparahaemolyticus)公布的多位点序列分型方法[10], 针对副溶血性弧菌 7 种管家基因(*dnaE*、*gyrB*、*recA*、*dtdS*、*pntA*、*pyrC*、*tnaA*)分别合成特异性引物(表 1), 引物序列经 BLAST 比对验证, 确认其对副溶血性弧菌靶基因具有特异性。PCR 扩增体系为 50 μL, 其中 2×Premix Taq 25 μL, 10 μmol/L 引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 用无菌去离子水补足 50 μL。扩增程序为: 95 ℃预变性 3 min, 95 ℃变性 60 s, 58 ℃退火 60 s, 72 ℃延伸 60 s, 共 35 个循环, 最后 72 ℃延伸 7 min。通过琼脂糖凝胶电泳(电压 110 V, 时间 30 min)确认其片段大小符合预期且无非特异性条带。扩增片段用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收后提交给生工生物工程(上海)股份有限公司, 以通用引物 M13F 和 M13R 进行双向测序。

表 1 管家基因引物序列及长度[10]

Table 1 Sequence and length of primers for housekeeping gene[10]

基因名称	引物	序列(5′→3′)	片段大小/bp
dnaE	dnaE-F	tgtaaaacgacggccagtCGRATMACCGCTTTCGCCG	596
	dnaE-R	caggaaacagctatgaccGAKATGTGTGAGCTGTTTGC	
gyrB	gyrB-F	tgtaaaacgacggccagtGAAGGBGGTATTCAAGC	629
	gyrB-R	caggaaacagctatgaccGAGTCACCCTCCACWATGTA	
recA	recA-F	tgtaaaacgacggccagtGAAACCATTTCAACGGGTTC	773
	recA-R	caggaaacagctatgaccCCATTGTAGCTGTACCAAGCACCC	
dtdS	dtdS-F	tgtaaaacgacggccagtTGGCCATAACGACATTCTGA	497
	dtdS-R	caggaaacagctatgaccGAGCACCAACGTGTTTAGC	
pntA	pntA-F	tgtaaaacgacggccagtACGGCTACGCAAAAGAAATG	470
	pntA-R	caggaaacagctatgaccTTGAGGCTGAGCCGATACTT	
pyrC	pntA-F	tgtaaaacgacggccagtAGCAACCGGTAAAATTGTCG	533
	pntA-R	caggaaacagctatgaccCAGTGTAAGAACCGGCACAA	
tnaA	tnaA-F	tgtaaaacgacggccagtTGTACGAAATTGCCACCAAA	463
	tnaA-R	caggaaacagctatgaccAATATTTTCGCCGCATCAAC	

1.3.3 多位点序列分析

采用 DNAstar 软件对副溶血性弧菌的 7 个管家基因的正向和反向测序结果进行拼接, 对两端序列进行剪接后上传至 pubMLST 网站, 查询等位基因编号, 若该等位基因或 ST 型与数据库不匹配, 则将序列与测序峰图文件上传给数据库管理员, 以获取新的等位基因编号或新的 ST 型。

1.3.4 克隆复合物和系统发育分析

通过 goeBURST (http://www.phyloviz.net/goeburst/)软件对 81 株副溶血性弧菌的 ST 型及其对应的等位基因谱进行克隆复合体分析[11]。当两个 ST 型的 7 个管家基因中有 6 个或 7 个相同时, 这两个 ST 型为同分型组, 当有 1 个位点不同, 两个 ST 型互为单个位点变异型(single-locus variant, SLV)。如果该组有足够多的 ST 型, 那么该组被认定为克隆复合体, 该组中的一个 ST 型可以暂定为一个可行度高的始祖 ST 型。不能被归到任何组的 ST 型称为单体。

1.3.5 种群遗传分析

采用 DnaSP 软件计算 7 种管家基因的 GC 含量、核苷酸多样性、多态位点数、非同义与同义替换之比(d_N/d_S)[12]。

1.3.6 构建系统发育树

将 81 株菌的 7 个管家基因序列按照 *dnaE-gyrB-recA-dtdS-pntA-pyrC-tnaA* 的形式进行串联, 通过 MEGA 软件进行序列比对, 按最大似然法构建系统发育树[13]。

1.4 数据处理

测序结果经 DNAstar v8.1 拼接后, 通过 pubMLST 数据库分配等位基因编号及 ST 型。采用 goeBURST v1.2.1 进行克隆复合体分析。采用 DnaSP v6.0 计算 GC 含量、多态位点数、核苷酸多样性及 d_N/d_S。将 7 个管家基因串联后, 用 MEGA v10.0 以最大似然法构建系统发育树, 步长检验设定为 500 bp。

2 结果与分析

2.1 ST 多样性及其地域分布特征

81 株副溶血性弧菌的 ST 型信息见表 2。81 株副溶血性弧菌共分为 71 种 ST 型, 其中 51 种为本研究首次发现的

表 2　81 株不同来源副溶血性弧菌的等位基因和 ST 型

Table 2　Allele profiles and ST types of 81 *Vibiro parahaemolyticus* strains from different sources

菌株编号	样品名称	采样地点	*dnaE*	*gyrB*	*recA*	*dtdS*	*pntA*	*pyrC*	*tnaA*	ST
Vp2018001	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	98	104	136	243	26	11	99	2361*
Vp2018002	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	60	197	31	18	106	150	26	1256
Vp2018003	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	33	197	96	103	28	11	9	2362*
Vp2018004	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	98	4	112	107	77	97	23	433
Vp2018005	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	84	103	79	46	62	46	60	1756
Vp2018006	四角蛤蜊	山东东营	188	22	199	117	26	3	1	2363*
Vp2018007	四角蛤蜊	辽宁营口	98	4	112	107	77	97	23	433
Vp2018008	四角蛤蜊	辽宁营口	254	113	72	181	248	116	262	1829
Vp2018009	四角蛤蜊	山东东营	158	541*	97	13	26	27	282*	2364*
Vp2018010	四角蛤蜊	山东滨州	20	84	31	212	50	157	23	2365*
Vp2018011	四角蛤蜊	山东滨州	36	184	188	218	28	82	23	2366*
Vp2018012	四角蛤蜊	山东滨州	405*	338	127	150	18	111	284*	2367*
Vp2018013	毛蚶	辽宁大连	3	546*	292	75	152	447*	94	2368*
Vp2018014	菲律宾蛤仔	山东寿光	32	217	187	189	55	5	26	2369*
Vp2018015	菲律宾蛤仔	山东寿光	32	217	187	189	55	5	26	2369*
Vp2018016	菲律宾蛤仔	山东寿光	32	217	187	189	55	5	26	2369*
Vp2018017	菲律宾蛤仔	山东潍坊	100	123	110	13	11	96	57	218
Vp2018018	菲律宾蛤仔	山东潍坊	93	77	144	67	60	201	33	2370*
Vp2018019	菲律宾蛤仔	山东潍坊	60	13	67	294	31	18	255	1687
Vp2018020	青蛤	山东潍坊	115	357	361	67	6	11	137	1795
Vp2018021	青蛤	山东潍坊	115	357	361	67	6	11	137	1795
Vp2018022	青蛤	山东潍坊	406*	90	175	353	26	295	9	2371*
Vp2018023	青蛤	山东潍坊	406*	90	192	220	71	295	17	2372*
Vp2018024	菲律宾蛤仔	山东潍坊	98	106	30	19	77	73	82	2373*
Vp2018025	菲律宾蛤仔	山东潍坊	98	4	191	222	28	10	26	2374*
Vp2018026	菲律宾蛤仔	山东潍坊	73	260	191	180	156	202	71	2375*
Vp2018027	菲律宾蛤仔	河北秦皇岛	118	52	72	76	50	104	54	2377*
Vp2018028	菲律宾蛤仔	河北秦皇岛	118	253	188	406	28	184	23	2378*
Vp2018029	文蛤	河北秦皇岛	36	184	299	89	26	168	23	2379*
Vp2018030	菲律宾蛤仔	河北唐山	79	72	397*	492*	61	410	33	2380*
Vp2018031	菲律宾蛤仔	河北唐山	407*	446	112	107	61	280	33	2381*
Vp2018032	四角蛤蜊	河北唐山	98	4	61	190	50	97	20	2382*
Vp2018033	四角蛤蜊	河北唐山	176	284	101	29	78	406	47	2383*
Vp2018034	四角蛤蜊	河北唐山	233	75	64	67	26	7	17	794
Vp2018035	四角蛤蜊	河北唐山	49	350	64	89	4	11	51	2385*
Vp2018036	四角蛤蜊	河北唐山	5	532	90	494*	120	5	203	2386*
Vp2018037	青蛤	山东潍坊	2	113	72	94	26	83	23	411
Vp2018038	青蛤	山东潍坊	93	77	72	19	23	201	23	2387*
Vp2018039	青蛤	山东潍坊	254	113	144	181	248	116	262	2389*
Vp2018040	青蛤	山东潍坊	93	77	72	19	23	201	23	2387*
Vp2018041	青蛤	山东潍坊	69	92	144	114	54	71	24	2390*
Vp2018042	菲律宾蛤仔	辽宁绥中	98	4	112	107	77	97	23	433
Vp2018043	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	264	542*	69	29	26	45	12	2391*
Vp2018044	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	5	41	366	19	249	218	23	1837
Vp2018045	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	33	543*	366	5	26	5	1	2392*
Vp2018046	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	112	104	23	447	18	445*	26	2393*
Vp2018047	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	84	103	188	46	62	46	60	2394*
Vp2018048	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	227	184	188	191	28	168	23	647
Vp2018049	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	33	276	206	5	10	213	94	565
Vp2018050	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	96	228	31	3	120	141	33	2395*
Vp2018051	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	71	259	183	212	26	11	24	2388*
Vp2018052	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	19	125	168	19	2	256	23	2396*
Vp2018053	菲律宾蛤仔	辽宁丹东	167	147	109	19	145	219	12	1696
Vp2018054	四角蛤蜊	辽宁营口	27	84	127	139	54	124	37	283
Vp2018055	四角蛤蜊	辽宁营口	33	276	206	5	10	213	94	565

表 2(续)

菌株编号	样品名称	采样地点	*dnaE*	*gyrB*	*recA*	*dtdS*	*pntA*	*pyrC*	*tnaA*	ST
Vp2018056	四角蛤蜊	辽宁营口	49	201	398*	237	61	446*	285*	2397*
Vp2018057	四角蛤蜊	辽宁营口	2	113	72	94	69	83	23	122
Vp2018058	四角蛤蜊	辽宁营口	306	544*	31	19	218	45	217	2398*
Vp2018059	四角蛤蜊	辽宁营口	98	4	112	107	77	97	204	916
Vp2018060	四角蛤蜊	辽宁营口	266	316	263	249	150	5	62	2399*
Vp2018061	四角蛤蜊	辽宁营口	33	84	307	378	276*	10	157	2400*
Vp2018062	四角蛤蜊	辽宁锦州	80	88	111	377	143	95	2	2401*
Vp2018063	四角蛤蜊	辽宁锦州	408*	319	186	493*	273*	68	26	2402*
Vp2018064	四角蛤蜊	辽宁锦州	84	268	202	227	4	203	145	547
Vp2018065	四角蛤蜊	辽宁锦州	167	147	109	19	4	10	20	2403*
Vp2018066	四角蛤蜊	辽宁锦州	98	4	112	107	77	97	204	916
Vp2018067	四角蛤蜊	辽宁锦州	77	212	3	19	4	5	57	2404*
Vp2018068	菲律宾蛤仔	辽宁葫芦岛	137	171	19	146	18	136	12	304
Vp2018069	菲律宾蛤仔	辽宁葫芦岛	409*	141	399*	112	28	122	33	2405*
Vp2018070	海湾扇贝	山东烟台	228	261	98	264	28	7	286*	2406*
Vp2018071	海湾扇贝	山东烟台	228	261	98	264	28	7	286*	2406*
Vp2018072	四角蛤蜊	山东寿光	313	25	199	117	26	3	1	2407*
Vp2018073	海湾扇贝	山东潍坊	83	188	44	117	26	3	1	2408*
Vp2018074	青蛤	山东潍坊	256	214	145	13	28	43	47	855
Vp2018075	青蛤	山东潍坊	47	58	53	19	50	37	26	162
Vp2018076	青蛤	山东潍坊	278	545*	145	249	23	8	84	2409*
Vp2018077	青蛤	山东潍坊	363	246	109	335	26	10	57	2410*
Vp2018078	青蛤	山东潍坊	256	214	19	13	28	43	47	2411*
Vp2018079	青蛤	山东潍坊	47	58	53	19	50	37	26	162
Vp2018080	栉孔扇贝	河北秦皇岛	60	170	263	145	2	130	26	2384*
Vp2018081	栉孔扇贝	河北秦皇岛	26	393	287	19	154	171	47	2376*

注: *为首次发现。

新 ST 型, 占比为 71.83%。这 71 种 ST 型中出现频率最高的为 ST2369 和 ST433, 其中 ST2369 对应菌株 Vp2018014、Vp2018015 和 Vp2018016 均分离自山东寿光的菲律宾蛤仔样品中, 而 ST433 对应菌株 Vp2018004、Vp2018007 和 Vp2018042 分别来自辽宁的不同地区的不同样品。此外, ST162、ST565、ST916、ST1795、ST2387 和 ST2406 各出现了 2 次, 其中 ST162、ST1795、ST2387 的菌株均来自山东潍坊, ST2406 的菌株来自山东烟台, 而 ST565、ST916 的菌株则分别来自辽宁不同地市。进一步比较环渤海 3 省(辽宁、山东、河北)的 ST 型分布发现: 辽宁地区(n=36)检出 ST 型 32 种, 山东地区(n=33)检出 ST 型 27 种, 河北地区(n=12)检出 ST 型 12 种, 3 省间未发现共有 ST 型。初步表明, 部分 ST 型可能具有一定地域特异性, 而部分则呈现跨近缘地域分布的特征。

2.2 等位基因的核苷酸多样性

81 株副溶血性弧菌的等位基因信息见表 2 和表 3。7 种管家基因的等位基因数(括号内为新等位基因数)分别为 49 种 *dnaE* (5)、54 种 *gyrB* (6)、47 种 *recA* (3)、45 种 *dtdS* (3)、33 种 *pntA* (2)、47 种 *pyrC* (3)和 34 种 *tnaA* (4)。等位基因型频率最高的(出现次数)分别是 *dnaE*98 (9)、*gyrB*4 (7)、*recA*72 (6)、*recA*112 (6)、*dtdS*19 (12)、*pntA*26 (13)、*pyrC*5 (7)和 *tnaA*23 (14)。副溶血性弧菌 MLST 的核苷酸序列分析见表 3, GC 含量最低的管家基因是 *pntA* (43.78%), 最高的是 *dtdS* (50.25%)。核苷酸多样性最低的管家基因是 *pntA* (0.00873), 最高的是 *recA* (0.02234)。多肽位点占比最高的为 *dtdS* (14.19%), 其次为 *recA* (9.33%), 最低的为 *tnaA* (5.67%)。7 个管家基因的 d_N/d_S 值均小于 1, 表明这些基因受到强烈的纯化选择压力, 这与管家基因的功能保守性一致。值得注意的是, *recA* 基因虽然多态性最高, 但其 d_N/d_S 值(0.011)仍远小于 1, 说明该基因的非同义突变受到严格限制。

2.3 克隆复合物

为了概述分离株的克隆关系, 通过 goeBURST 分析获得了一个“种群快照”(图 1)。71 种 ST 型中以单体为主(61 个), 仅形成 5 个 SLV 对, 分别为 ST855-ST2411、ST122-ST411、ST433-ST916、ST1829-ST2389 和 ST175-ST2394。这些 SLV 对差异位点分别位于 *recA*、*pntA*、*tnaA*、*recA* 和 *recA* 等位基因上。进一步分析 SLV 对菌株的地域来源发现, ST855-ST2411 这一 SLV 对中的菌株均分离自山东潍坊, 支持其潜在的近期共同进化起源, 而其他 SLV 对(如 ST122-ST411、ST1829-ST2389)的菌株则分离自不同的省份, 提示这些亲缘关系密切的菌株可能存在跨地域传播。此外, ST1696-ST2403 和 ST2407-ST2408 这两对后 4 个等位基因相同的 ST 型, 其菌株分别来自同一省份的不同地区与不同样品。

表 3　81 株副溶血性弧菌 MLST 位点的核苷酸序列变化

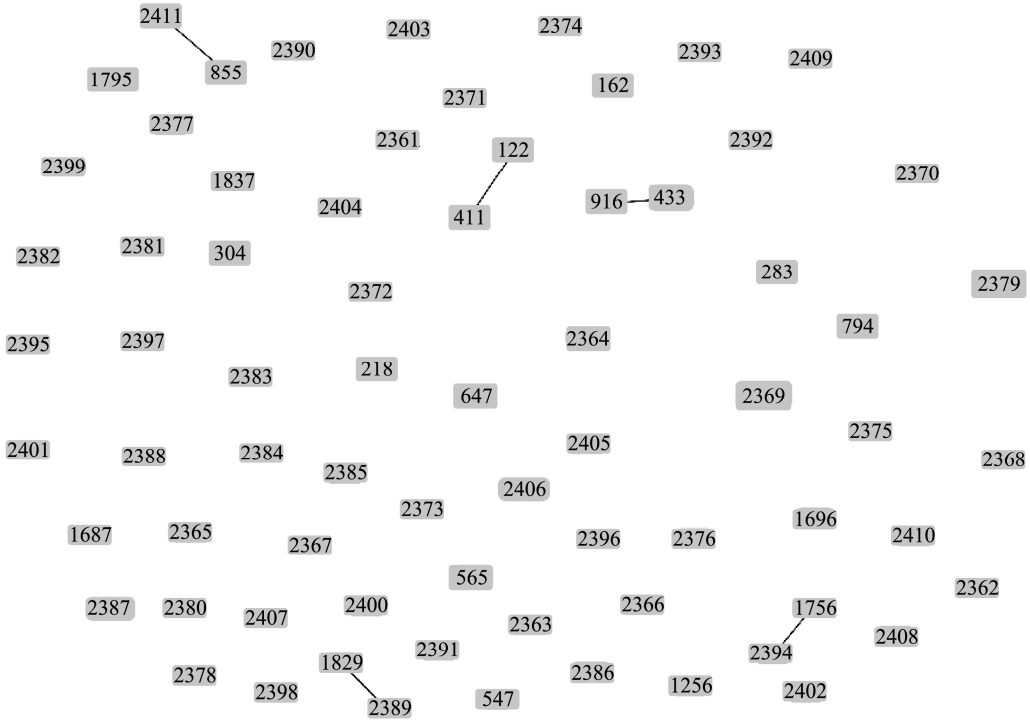
Table 3　Nucleotide sequence variations of each MLST locus for 81 *Vibrio parahaemolyticus isolates*

管家基因	片段大小/bp	等位基因数量	GC 含量/%	核苷酸多样性	多态位点数量/%	d_N/d_S
dnaE	557	49	48.65	0.01048 (0.00046)	43 (7.72)	0.0320
gyrB	592	54	47.64	0.01384 (0.00035)	46 (7.77)	0.0000
recA	729	47	45.15	0.02234 (0.00069)	68 (9.33)	0.0110
dtdS	458	45	50.25	0.02181 (0.00191)	65 (14.19)	0.0036
pntA	430	33	43.78	0.00873 (0.00062)	32 (7.44)	0.0250
pyrC	493	47	48.26	0.01145 (0.00064)	34 (6.90)	0.0370
tnaA	423	34	48.79	0.01058 (0.00047)	24 (5.67)	0.0067

2.4　系统发育分析

基于最大似然法对 81 株副溶血性弧菌构建的系统发育树见图 2, 可以看出这 81 株副溶血性弧菌呈现较高的遗传多样性。ST 型相同或高度相似的菌株聚集明显, 如出现 3 次的 ST2369 和 ST433, 出现 2 次的 ST162、ST1795、ST2387、ST2406、ST565 和 ST916 各自对应的菌株均聚类在一簇; 此外 5 个 SLV 型菌株(ST433-ST916、ST855-ST2411、ST122-ST411、ST1829-ST2389 和 ST2394-ST1756)和 4 个等位基因相同的 ST 型菌株(ST1696-ST2403 和 ST2407-ST2408)均有聚集现象; 具有 3 个等位基因相同的 ST2371 和 ST2372 对应菌株也聚类在一簇。

对聚类簇进行地理溯源分析发现, ST2369 簇(山东寿光菲律宾蛤仔)、ST162 簇(山东潍坊青蛤)、ST855-ST2411 簇(山东潍坊青蛤)、ST1756-ST2394(辽宁丹东菲律宾蛤仔)、ST2371-ST2372(山东潍坊青蛤), 这些菌株在地理和宿主上高度一致, 符合局部流行特征; ST433 簇(辽宁 3 地)、ST122-ST411 簇(辽宁-山东)、ST1829-ST2389 簇(辽宁-山东), 这些菌株跨越不同省份, 结合环渤海区地域特征和贝类贸易路线, 推测可能存在海流或养殖贝类跨区域流通介导的微生物扩散。



注: 直线连接的 ST 型为 SLV 型; 灰色底框及字体越大, 表明此 ST 型菌株数量越多。

图 1　由 goeBURST v1.2.1 构建的 81 株副溶血性弧菌的“种群快照”

Fig.1　“Population snapshot” of 81 *Vibrio parahaemolyticus* isolates created by goeBURST v1.2.1

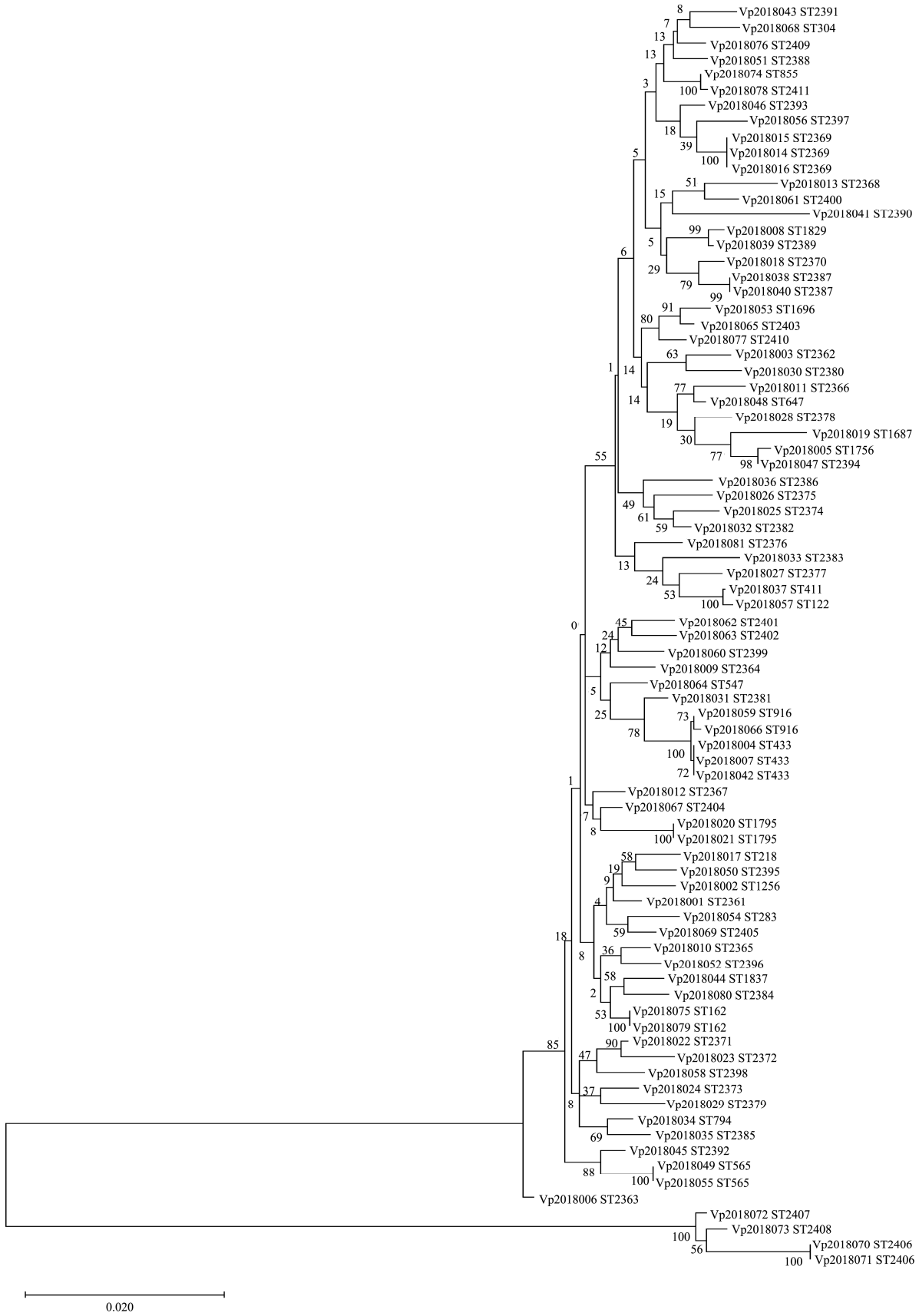


图 2 基于 81 株副溶血性弧菌 7 种管家基因序列构建的进化树

Fig.2 Phylogenetic tree constructed based on the sequences of 7 kinds of housekeeping genes from 81 strains of *Vibrio parahaemolyticus*

3　讨论与结论

副溶血性弧菌是引起食源性疾病的重要病原菌之一, 在突发公共卫生事件时, 流行病学调查和溯源要求分型方法分辨力高和快速溯源。目前, 细菌的分子分型技术主要有脉冲场凝胶电泳、多位点可变数目串联重复序列分型、随机扩增多态性 DNA 分析和 MLST 等技术, 其中 MLST 分型法作为一种标准化、重复性好和操作简便的分型方法, 已广泛应用于细菌的遗传进化和分子流行病学研究[5]。本研究系统地对环渤海区域(山东、辽宁、河北等地)贝类来源的副溶血性弧菌进行了 MLST 分析, 揭示了该地区菌株的群体遗传特征, 并发现了一系列新的 ST 型, 补充了国际 MLST 数据库的多样性。

本研究在 81 株副溶血性弧菌中共发现了 71 种 ST 型, 其中 51 种(71.83%)为首次发现。7 个管家基因中, *gyrB* 数量最多(54 种), *pntA* 数量最少(33 种), 表明在缓慢进化的位点中存在高度的基因型多样性。核苷酸多样性最低的管家基因是 *pntA* (0.00873), 最高的是 *recA* (0.02234)。多态位点比例最高的管家基因为 *dtdS* (14.19%), 其次为 *recA* (9.33%), 这与周颖等[14]研究结果的趋势相似, 其多态位点最高的管家基因为 *dtdS* (5.2%), 其次为 *recA* (3.3%)。值得注意的是, 虽然部分研究强调 *recA* 对副溶血性弧菌系统发育关系和种群结构具有重大影响[15–16], 但本研究的数据显示 *dtdS* 等位基因同样具有高度分化且频繁重组的潜力, 表明不同地域或宿主来源的菌株群体, 其主导多样性的基因位点可能有所差异, 这提示未来在进行跨区域比较时, 需关注特定管家基因的进化动力学是否具有地域特性。此外, 7 个管家基因的 d_N/d_S 比值均小于 1, 表明这些基因均受到强烈的纯化选择, 这与许多文献的报道一致[10,17–18]。

已有研究结果显示, 不同来源的副溶血性弧菌存在显著的遗传差异, 来自海产品的菌株展现出较为丰富的 ST 型多样性, 而临床分离株则主要集中在少数几个 ST 型。郑晶莹对 115 株水产品和临床样本中分离的副溶血性弧进行了 MLST 分析, 共鉴定出 90 种序列类型, 其中 41 种 ST 型(45.56%)为首次发现, 在海产品菌株中发现了 55 种 ST 类型, 而在淡水产品菌株中发现了 28 种 ST 类型, 最常见的是 ST3 (14.78%), 均来自临床样本[19]。LI 等[20]对 138 株食品和环境来源副溶血性弧菌和 68 株临床来源副溶血性弧菌进行 MLST 分析, 发现了 105 个 ST 型, 其中有 56 个新 ST 型, 临床菌株最主要包括 ST2516 (7.3%)、ST3 (6.8%)、ST1124 (2.4%)。目前研究公认的与副溶血性弧菌致病性相关的序列型主要有 ST3[21–24]、ST8[25]、ST34[26]、ST36[27]、ST631[26,28]、ST674[26]等, 其中 ST3 与疾病大流行的关联最为密切。本研究中的菌株均不含有这些 ST 型, 初步表明环渤海地区贝类携带的副溶血性弧菌在本次调查中呈现较低的潜在致病风险。

在系统发育分析中, 本研究观察到 ST 型相同或高度相似的菌株容易聚类在一簇。进化树中聚类在一簇的 ST 型中, ST2369、ST162、ST1795、ST2387、ST2406、ST2411-ST855、ST2394-ST1756 和 ST2371-ST2372 对应来源菌株的地区和样品相同, 其中 ST162、ST1795、ST2387、ST855、ST2411、ST2371 和 ST2372 来源的 10 株菌均为山东潍坊的青蛤样品, 而 ST433、ST565、ST1829-ST2389、ST1696-ST2403、ST411-ST122、ST2407-ST2408 对应来源菌株的地区和样品均有差异, 这说明不同产地和来源的菌株可能是相同的 ST 型或具有高度相似的管家基因序列, 而同一产地分离的菌株也可能是不同 ST 型, 菌株的来源与其系统发育亲缘性不存在相关性, 这和以往的报道结果一致[29–30]。对于一些相同或高度相似的 ST 型(如 ST433、ST565 等)出现在不同采样地点和不同贝类宿主中这一现象, 本研究推测这些 ST 型可能对应着适应力广、扩散能力强的菌株谱系, 其跨地域分布的原因不仅可能涉及海洋水体交换等自然因素, 更可能与我国活跃的沿海水产养殖、贸易及海产品跨区域流通密切相关。

通过 MLST 分型, 从环渤海区贝类中分离的 81 株副溶血性弧菌 ST 型种类丰富, 但未检出高风险流行 ST 型, 这为该区域贝类产品的特定风险研判提供了初步的分子依据。 发现的大量新 ST 型和高比例独特型别, 提示本地菌株群体具有独特的进化历史或生态适应性, 这也表明建立和持续更新菌株分子分型数据库十分必要。总之, 这些发现为评估环渤海区贝类的食用安全风险、优化监测方案以及未来开展高分辨率溯源研究奠定了重要的分子数据基础。由于样本的空间覆盖度和时间跨度有限, 可能未能完全代表环渤海区整体菌群的多样性, 其次, 研究主要基于 MLST 分型, 其分辨率虽高, 但对于紧密相关的克隆或近期传播事件的解析能力仍不及全基因组测序。未来的监测和研究在考虑增加样本量的同时, 对关键 ST 型(特别是跨地域出现的相同 ST 型)进行全基因组测序, 深入分析以揭示其传播潜力、致病性及微进化关系, 并结合详细的流行病学与溯源数据, 将分子分型信息与海产品流通轨迹进行关联分析, 从而为制定精准的源头防控策略提供直接的科学依据。

参考文献

[1] HONDA T, IIDA T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins [J]. Reviews in Medical Microbiology, 1993, 4(2): 106–113.

[2] DANIELS NA, MACKINNON L, BISHOP R, *et al*. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973—1998 [J]. Journal

of Infection Diseases, 2000, 181(5): 1661–1666.

[3] WU Y, WEN J, MA Y, *et al.* Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus*, China, 2003—2008 [J]. Food Control, 2014, 46: 197–202.

[4] 范鹏辉, 李红秋, 褚遵华, 等. 2023 年中国大陆食源性疾病暴发监测结果分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(10): 1199–1208.
FAN PH, LI HQ, CHU ZH, *et al.* Analysis of foodborne diseases outbreak surveillance in China's Mainland, 2023 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(10): 1199–1208.

[5] 吴雨辰, 胡燕燕, 张嵘. 细菌分型方法的研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(5): 617–623.
WU YC, HU YY, ZHANG R. Advances in bacterial typing methods [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2021, 21(5): 617–623.

[6] MAIDEN M, BYGRAVES JA, FEIL E, *et al.* Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(6): 3140–3145.

[7] 邹敏, 何冬梅, 欧阳方竹, 等. 广东省 2020—2022 年 O10: K4 型副溶血性弧菌的病原学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2025, 37(2): 124–130.
ZOU M, HE DM, OUYANG FZ, *et al*. Pathogenic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O10: K4 in Guangdong Province from 2020 to 2022 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2025, 37(2): 124–130.

[8] AL-FADHLI AH, JAMAL WY, KHODAKHAST FB, *et al. Salmonella* enterica serotypes causing infection in Kuwait during 2018—2021, determined by multi-locus sequence typing or whole genome sequencing [J]. Microbiology Spectrum, 2025: e0224824. DOI: 10.1128/SPECTRUM.02248-24

[9] 徐嘉良, 杜小莉, 刘俊含, 等. 亚洲副溶血弧菌临床菌株的基于碱基序列和肽链序列的多位点序列分型研究[J]. 军事医学, 2016, 40(9): 722–724, 745.
XU JL, DU XL, LIU JH, *et al.* Population analysis of clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains from Asia based on multilocus sequence typing and AA-multilocus sequence typing [J]. Military Medical Sciences, 2016, 40(9): 722–724, 745.

[10] GONZÁLEZ-ESCALONA N, MARTINEZ-URTAZA J, ROMERO J, *et al.* Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(8): 2831–2840.

[11] FRANCISCO AP, BUGALHO M, RAMIREZ M, *et al.* Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach [J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10: 152.

[12] ROZAS J, FERRER-MATA A, SÁNCHEZ-DELBARRIO JC, *et al*. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2017, 34(12): 3299–3302.

[13] LI Y, YIN HQ, XIA J, *et al*. Population structure and genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* from a coastal area of China based on a multi-locus sequence typing (MLST) scheme [J]. Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 2019, 112: 1199–1211.

[14] 周颖, 高耿, 李智, 等. 武汉市市售淡水小龙虾中副溶血性弧菌的分离鉴定及多位点序列分型[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(18): 4548–4551, 4559.
ZHOU Y, GAO G, LI Z, *et al.* Isolation, identification and multilocus sequence typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from freshwater *Cambarus clarkii* in Wuhan markets [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(18): 4548–4551, 4559.

[15] HAN D, TANG H, LU J, *et al.* Population structure of clinical *Vibrio parahaemolyticus* from 17 coastal countries, determined through multilocus sequence analysis [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107371.

[16] THEETHAKAEW C, FEIL EJ, CASTILLO-RAMÍREZ S, *et al.* Genetic relationships of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical, human carrier, and environmental sources in Thailand, determined by multilocus sequence analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(7): 2358–2370.

[17] JIANG Y, CHU Y, XIE G, *et al.* Antimicrobial resistance, virulence and genetic relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood from coasts of Bohai Sea and Yellow Sea, China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 290: 116–124.

[18] HAN D, TANG H, REN C, *et al.* Prevalence and genetic diversity of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates from China, revealed by multilocus sequence typing scheme [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 291–291.

[19] 郑晶莹. 吉林省食源性副溶血性弧菌流行特征及全基因组测序分析[D]. 长春: 吉林大学, 2025.
ZHENF JY. Epidemiological characteristics and whole-genome sequencing analysis of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in Jilin Province [D]. Changchun: Jilin University, 2025.

[20] LI M, XU H, TIAN Y, *et al.* Comparative genomic analysis reveals the potential transmission of *Vibrio parahaemolyticus* from freshwater food to humans [J]. Food Microbiology, 2023, 113: 104277.

[21] 王伟杰, 张铭琰, 冯怡博, 等. 2023 年辽宁省大连市食源性疾病中副溶

血性弧菌的分子流行病学研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(16): 149–156.

WANG WJ, ZHANG MY, FENG YB, *et al*. Molecular epidemiology study of *Vibrio parahaemolyticus* in foodborne diseases in Dalian City, Liaoning Province in 2023 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(16): 149–156.

[22] 王小龙, 邹文燕, 朱莉勤, 等. 苏州市副溶血性弧菌耐药、血清型及分子特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2025, 41(6): 574–582.

WANG XL, ZOU WY, ZHU LQ, *et al*. Drug resistance, serotypes, and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in Suzhou [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2025, 41(6): 574–582.

[23] HAN D, YU F, TANG H, *et al*. Spreading of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 and its serovariants: A re-analysis of strains isolated from multiple studies [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 188.

[24] ZHONG XJ, PAN ZH, MU YJ, *et al*. Characterization and epidemiological analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different marine products in East China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2022, 380: 109867.

[25] HAENDIGES J, JONES J, MYERS RA, *et al*. A nonautochthonous U. S. strain of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Chesapeake Bay oysters caused the outbreak in Maryland in 2010 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82: 3208–3216.

[26] XU F, ILYAS S, HALL JA, *et al*. Genetic characterization of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* from the Northeast USA reveals emerging resident and non-indigenous pathogen lineages [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 272.

[27] MARTINEZ-URTAZA J, VAN-AERLE R, ABANTO M, *et al*. Genomic variation and evolution of *Vibrio parahaemolyticus* ST36 over the course of a transcontinental epidemic expansion [J]. mBio, 2017, 8: e01425–17–e01425–17.

[28] XU F, GONZALEZ-ESCALONA N, HAENDIGES J, *et al.* Sequence type 631 *Vibrio parahaemolyticus*, an emerging foodborne pathogen in North America [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2017, 55: 645–648.

[29] ZIN H, LIM J, SHIN Y, *et al.* Genomic insights into *Vibrio parahaemolyticus* from Southern Korea: Pathogenicity, antimicrobial resistance, and phylogenetic distinctions [J]. Microorganisms, 2024, 12: 2497.

[30] CHANGSEN C, LIKHITRATTANAPISAL S, LUNHA K, *et al.* Incidence, genetic diversity, and antimicrobial resistance profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in Bangkok and eastern Thailand [J]. Peer J, 2023, 11: e15283.

(责任编辑: 冯东慧 蔡世佳)