

# 多重实时 PCR 检测产毒素性霍乱弧菌和副溶血弧菌\*

张蔚 潘劲草\*\* 孟冬梅 于新芬 汪皓秋 郑伟

(杭州市疾病预防控制中心微生物检验科 杭州 310006)

**摘要** 设计引物和探针,优化多重实时 PCR 条件,以同时检测霍乱弧菌霍乱毒素基因 *ctxA*、副溶血弧菌种特异性基因 *gyrB* 和耐热肠毒素基因 *tdh*。该多重实时 PCR 方法检测产毒素性的 O1 群(3 株)和 O139 群(44 株)霍乱弧菌菌株、不产毒素的 O1 群(12 株)和 O139 群(6 株)及非 O1 非 O139 群(7 株)霍乱弧菌菌株的 *ctxA* 阳性和阴性结果与普通 PCR 检测结果 100% 符合;检测副溶血弧菌种特异性 *gyrB*, 116 株副溶血弧菌均阳性,而 9 株其它细菌和 72 株霍乱弧菌均阴性;检测 *tdh* 的阳性和阴性结果也与普通 PCR 结果完全一致。另外还建立了检测副溶血弧菌菌株 *trh1* 和 *trh2* 的单重实时 PCR 方法。

**关键词** 多重实时 PCR, 毒力基因, 霍乱弧菌, 副溶血弧菌

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)05-0950-05

## Development of Multiplex Real-time PCR for Detection of Toxigenic *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*\*

ZHANG Wei PAN Jin-Cao\*\* MENG Dong-Mei YU Xin-Fen WANG Hao-Qiu ZHENG Wei

(Hangzhou Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310006)

**Abstract** A multiplex real-time PCR was developed to detect *ctxA* of *Vibrio cholerae*, *gyrB* and *tdh* of *Vibrio parahaemolyticus* simultaneously. The multiplex real-time PCR were evaluated by detection for the three genes in 47 toxigenic *V. cholerae* O1 and O139 strains (*ctxA* + ; O1 = 3, O139 = 44), 25 non-toxigenic *V. cholerae* strains (*ctxA* - ; O1 = 12, O139 = 6, non-O1 and non-O139 = 7), 116 *V. parahaemolyticus* strains with or without *tdh* (73 or 43) and 9 other bacteria strains. The specificity and sensitivity of the multiplex real-time PCR in detection for the *ctxA* and the *tdh* genes in the strains tested were both 100.0%, compared to the results by routine PCRs. In the detection for *V. parahaemolyticus* specific *gyrB* using the multiplex real-time PCR, all of 116 *V. parahaemolyticus* strains were positive, and 9 other strains and 72 *V. cholerae* strains were all negative. The multiplex real-time PCR is a sensitive, specific and quick assay not only for detecting virulence genes of *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* but also for identifying *V. parahaemolyticus* at species level. In addition, two real-time PCRs for detection of *V. parahaemolyticus* virulence genes *trh1* and *trh2* were also developed.

**Key words** Multiplex real-time PCR, Virulence gene, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*

霍乱弧菌和副溶血弧菌是弧菌科细菌中 2 种重要的致人类腹泻的病原菌。霍乱弧菌的主要毒力因子是霍乱毒素(cholera toxin, CT), 由霍乱弧菌染色体上一种称为 CTXΦ 的溶原性丝状噬菌体基因组中的 *ctxAB* 所编码; 产霍乱毒素的 O1 群和 O139 群霍乱弧菌(*ctxA* +) 能引起霍乱的大流行。副溶血弧菌是沿海地区食物中毒和急性腹泻的主要病原菌, 耐热直接溶血素(thermostable direct hemolysin, TDH) 和耐热直接溶血素相关溶血素(thermostable direct

hemolysin-related hemolysin, TRH) 被认为是副溶血弧菌的主要毒力因子, 分别由副溶血弧菌小染色体上的 *tdh* 和 *trh* 编码; 临床来源的菌株往往携带 *tdh* 和/或 *trh*, 而绝大部分环境来源的菌株并不携带。近年证据显示, 一种新的仅 *tdh* 阳性的 O3:K6 群副溶血弧菌菌株引起了包括亚洲、美洲等多个国家在内的大流行<sup>[1,2]</sup>。

实时 PCR(Real-time PCR) 较常规 PCR 的优点有: 敏感、特异、快速、简便及产物污染可能性低等。

\* 杭州市科技发展计划(No.2003133B35)

\*\* 通讯作者 Tel: 0571-85177696, E-mail: jingcaopan@sina.com

收稿日期: 2007-01-27, 修回日期: 2007-05-23

本研究建立了多重 Real-time PCR 方法,在同一 PCR 反应管同时实时检测霍乱弧菌 *ctxA*、副溶血弧菌特异性 *gyrB* 和 *tdh*,*gyrB* 被作为在种水平上鉴定副溶血弧菌的靶基因。该法可应用于产毒素性霍乱弧菌和副溶血弧菌的鉴定以及在临床和环境标本中的快速筛检。另外还建立了检测 *trh* 的实时 PCR 方法,用于 *trh* 阳性副溶血弧菌的鉴定。

1 材料和方法

1.1 标本来源

1.1.1 菌株 :O1 群和 O139 群霍乱弧菌有 65 株,为本中心实验室从 1996 年至 2006 年分离保存(表 1)。副溶血弧菌有 116 株(表 1),其中 80 株为杭州市江干区疾病预防控制中心于 2006 年从食物中毒病人及食品中分离获得,23 株为杭州市萧山区疾病预防

控制中心于 2003 年从食物中毒病人及食品中分离获得,5 株为本实验室于 2002 年从散发腹泻病人中分离,6 株为本实验室于 2001 年从小水产品中分离,2 株 *trh* 阳性菌株(AQ4037 号菌株(*trh*1+)和 AT4 号菌株(*trh*2+))由日本京都大学 Nishibuchi 教授惠赠。溶藻弧菌 1 株来自 Nishibuchi 教授。15 株其它细菌均分离自小水产品(2001 年),包括有麦氏弧菌 2 株、非 O1 和非 O139 群霍乱弧菌 7 株、嗜水气单胞菌 1 株、恶臭假单胞菌 3 株、假单胞菌属菌 1 株和腐败希瓦菌(*Shewanella putrefaciens*)1 株等。以上菌株均经生化试验(必要时做血清型鉴定)鉴定确认。4 株 LT 阳性大肠埃希菌中,2 株购于中国医学细菌保藏管理中心,2 株本实验室保存,菌株携带 LT 的基因均经普通 PCR 和实时 PCR 确认(见另文)。

表 1 霍乱弧菌和副溶血弧菌菌株及其多重实时 PCR 检测结果

细菌	血清型	菌株数	多重实时 PCR			实时 PCR <i>trh</i>	普通 PCR
			<i>gyrB</i>	<i>tdh</i>	<i>ctxA</i>		
霍乱弧菌	O1 小川型	3	-	-	+		<i>ctxA</i> +
	O1 小川型	12	-	-	-		<i>ctxA</i> -
	O139	44	-	-	+		<i>ctxA</i> +
	O139	6	-	-	-		<i>ctxA</i> -
	非 O1 非 O139	7	-	-	-		<i>ctxA</i> -
副溶血弧菌		72	+	+	-	<i>trh</i> 1 -, <i>trh</i> 2 -	<i>tdh</i> + , <i>trh</i> -
		1	+	+	-	<i>trh</i> 1 -, <i>trh</i> 2 +	<i>tdh</i> + , <i>trh</i> +
		5	+	-	-	<i>trh</i> 1 -, <i>trh</i> 2 +	<i>tdh</i> - , <i>trh</i> +
		37	+	-	-	<i>trh</i> 1 -, <i>trh</i> 2 -	<i>tdh</i> - , <i>trh</i> -
		1	+	-	-	<i>trh</i> 1 + , <i>trh</i> 2 -	<i>tdh</i> - , <i>trh</i> +
溶藻弧菌		1	-	-	-	<i>trh</i> 1 -, <i>trh</i> 2 -	<i>tdh</i> - , <i>trh</i> -
麦氏弧菌		2	-	-	-		
嗜水气单胞菌		1	-	-	-		
恶臭假单胞菌		3	-	-	-		
假单胞菌属		1	-	-	-		
腐败希瓦菌		1	-	-	-		

1.1.2 腹泻病人粪便 :90 份散发腹泻病人的肛拭子标本于 2006 年 8 月采集自杭州市第一人民医院和浙江省儿童医院肠道门诊。

1.2 引物和探针

引物及探针见表 2,根据 TaqMan 复合荧光探针设计原则设计。引物由上海生工合成,探针由大连

TaKaRa 生物公司合成。

1.3 多重 Real-time PCR 方法的建立

荧光定量 PCR 仪为 Rotor Gene 公司产品,型号为 RG-3000。用矩阵法优化引物、探针和 MgCl<sub>2</sub> 浓度。PCR 反应试剂为 TaKaRa 生物技术公司的 EX Taq 酶。反应体积为 25μL,含 1 × buffer、MgCl<sub>2</sub>

3.0mmol/L、dNTP 各 0.2mmol/L、3 对引物( *gyrB*516F、*gyrB*626R、*tdh*244F、*tdh*362R、*ctxA*565F 和 *ctxA*706R ) 各 0.4 $\mu$ mol/L、3 条探针( *gyrB*542p、*tdhp*331 和 *ctxp*587 )各 0.24 $\mu$ mol/L、Ex Taq 酶 25U/mL。反应程序为 95℃ 3min 变性后 ,以 94℃ 15s、58℃ 45s 进行 45 个循环。于 58℃ 检测 FAM、HEX 和 ROX 通道的荧光信号。

表 2 引物和荧光探针核酸序列

Primer or probe	Sequence ( 5'→3' )	Nucleotide position	GenBank accession no	Reference
<i>gyrB</i> 516F	CCA AGA GAA CAT CTT CTG TTT CA	516 ~ 538		
<i>gyrB</i> 626R	TTA TCC ATA AAG CTG TTT AGC GT	626 ~ 604	AF007287	This study
<i>gyrB</i> 542p	FAM- ACA ACA TTC CAC AGC GCG ATG GTG -ECLIPSE	542 ~ 565		
<i>tdh</i> 244F	TTC ACA ACG TCA GGT ACT AAA TG	244 ~ 266		
<i>tdh</i> 362R	TTT ACG AAC ACA GCA GAA TGA C	362 ~ 341	AB112355	This study
<i>tdhp</i> 331	HEX- AGC CAG ACA CCG CTG CCA TTG TA -ECLIPSE	331 ~ 309		
<i>ctxA</i> 565F	CAT AGA GCT TGG AGG GAA GAG	565 ~ 585		
<i>ctxA</i> 706R	CTT TAG ATT GGT ATT CGT CAA GGA	706 ~ 683	AF175708	This study
<i>ctxp</i> 587	ROX- CGT GGA TTC ATC ATG CAC CGC CG -ECLIPSE	587 ~ 609		
<i>trh</i> 1F222	AAG CGT TCA CGG TCA ATC TA	222 ~ 241		
<i>trh</i> 1R318	AGC CAT YGT RTA GTT ATT TCC ATT	318 ~ 295	AB038238	This study
<i>trh</i> 1p244	FAM- TTC ACG ACT TCA GGC TCA AAA TGG T -ECLIPSE	244 ~ 268		
<i>trh</i> 2F176	TGG AGG ACT ATT GGA CAA ACC	176 ~ 196		
<i>trh</i> 2R306	GTT GTG ACC ATT GAT GTT GAC T	306 ~ 285	AB112354	This study
<i>trh</i> 2p274	FAM- CGC TTA ACC ACT TTG AAC CCG CAG -ECLIPSE	274 ~ 251		
<i>ctxA</i> F	CTC AGA CGG CAT TTG TTA GGC ACG			3
<i>ctxA</i> R	TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG			
<i>tdh</i> F	CCA CTA CCA CTC TCA TAT GC			4
<i>tdh</i> R	GGT ACT AAA TGG CTG ACA TC			
<i>trh</i> F	GGC TCA AAA TGG TTA AGC G			4
<i>trh</i> R	CAT TTC CGC TCT CAT ATG C			

1.4 单重 Real-timePCR

即加入一种引物和探针 ,其余条件与多重法相同。检测 *trh1* 和 *trh2* 的单重实时 PCR 的引物和探针组合分别为 :*trh*1F222 + *trh*1R318 + *trh*1p244 和 *trh*2F176 + *trh*2R306 + *trh*2p274。

1.5 普通 PCR

霍乱弧菌 *ctxA* 的 PCR 检测方法依据卫生部疾控司编写的《霍乱防治手册》第五版<sup>[3]</sup>进行。副溶血弧菌 *tdh* 和 *trh* 的 PCR 检测方法参考文献 [4]。

1.6 多重 Real-time PCR 方法直接检测肛拭子样品

取标本 100 $\mu$ L 加入到 4mL BP 增菌培养基中增

菌 6h 后 ,按煮沸法提取 DNA ,取 1 $\mu$ L 做模板。优化样品处理方法后 ,对 36 份腹泻儿童粪便样品进行多重 Real-time PCR 检测。

1.7 肛拭子样品中菌株培养分离和鉴定

将肛拭子样品分别划线接种于 4 号平板和 TCBS 平板 ,37℃ 过夜后 ,每平板挑取 4-6 个可疑菌落接种三糖铁斜面 ,阳性菌株用 ID 32E 生化反应鉴定条和血清凝集实验进行鉴定。菌株经 BP 增菌后 ,以煮沸法提取 DNA 模板 ,以多重 Real-time PCR 直接检测 *ctxA*、*tdh* 和 *gyrB*。

2 结果

2.1 多重实时 PCR 方法检测 *gyrB*、*tdh* 和 *ctxA* 的敏感性和特异性

多重实时 PCR 方法检测产毒素性的 O1 群(3 株)和 O139 群(44 株)霍乱弧菌菌株、不产毒素的 O1 群(12 株)和 O139 群(6 株)及非 O1 非 O139 群(7 株)霍乱弧菌的 *ctxA*, 阳性和阴性结果均与普通 PCR 法检测结果符合(表 1);检测 4 株不耐热肠毒素(LT)阳性大肠埃希菌,结果均为 *ctxA* 阴性。多重

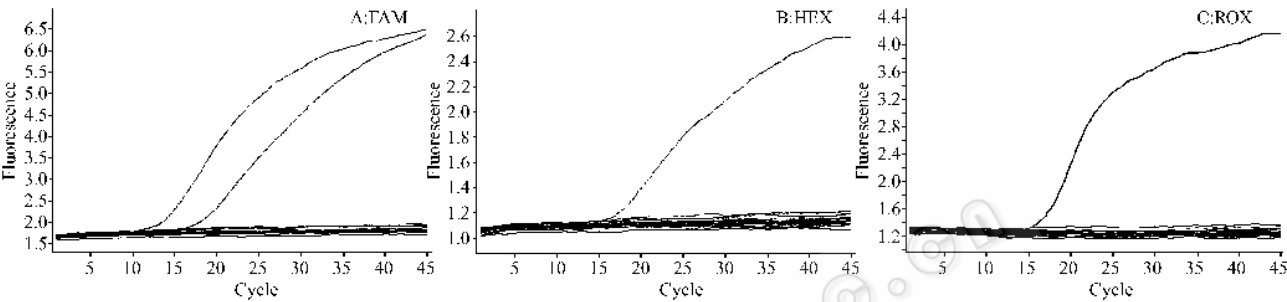


图 1 多重实时 PCR 方法检测 *gyrB*、*tdh* 和 *ctxA* 的荧光信号实时检测图  
A FAM 通道检测 *gyrB* 基因信号,图中产生阳性信号的二株菌均为副溶血弧菌;  
B HEX 通道检测 *tdh* 基因信号,图中产生阳性信号的菌为 *tdh* + 副溶血弧菌;  
C ROX 通道检测 *ctxA* 基因信号,图中产生阳性信号的菌为 *ctxA* + 霍乱弧菌

2.2 单重实时 PCR 方法检测 *trh1* 和 *trh2* 结果

用单重实时 PCR 分别检测 116 株副溶血弧菌菌株 *trh1* 和 *trh2*,结果 *trh1* 阳性 1 株、*trh2* 阳性 6 株,且此 7 株菌普通 PCR 检测 *trh* 均为阳性(其中 2 株是由 Nishibuchi 教授惠赠的、分别为 *trh1* + 和 *trh2* + 的菌株,结果也与实时 PCR 的相同);未检出 *trh1* 或 *trh2* 的菌株有 109 株,其中 31 株用普通 PCR 检测结果也均为 *trh* 阴性(表 1)。表明此 2 种单重实时 PCR 可用于 *trh* 的检测,并可区分 *trh1* 和 *trh2*。

2.3 肛拭子样品的多重实时 PCR 方法检测和菌株培养分离的比较

以多重 Real-time PCR 直接检测 90 份散发腹泻患者肛拭子样品的 *gyrB*、*tdh* 和 *ctxA*,结果 *ctxA* 均阴性,在 1 份标本中同时检出 *gyrB* 和 *tdh*(检出率为 1.1%)。培养分离 90 份肛拭子样品,未培养出霍乱弧菌;另在 2 份样品检出副溶血弧菌(检出率为 2.2%),其中 1 份即为多重 Real-time PCR 法直接检测阳性者,此 2 份样品中分离出的菌株均为 *gyrB* 和 *tdh* 阳性。多重实时 PCR 方法检测和菌株培养分离检测副溶血弧菌结果经配对  $\chi^2$  检验,差异无

实时 PCR 方法检测 *gyrB*,116 株副溶血弧菌均阳性,而 65 株 O1 群和 O139 群霍乱弧菌、7 株非 O1 非 O139 群霍乱弧菌和 9 株其它细菌均阴性(表 1),表明该法是可在种水平上鉴定副溶血弧菌。多重实时 PCR 方法检测 116 株副溶血弧菌菌株 *tdh*,阳性 73 株,阴性 43 株,其中 34 株(阳性 25 株,阴性 9 株)用普通 PCR 检测结果均符合(表 1)。多重实时 PCR 方法检测代表菌株的 *gyrB*、*tdh* 和 *ctxA* 的荧光信号实时检测图见图 1。

统计学意义(见表 3; $\chi^2 = 0.0, P > 0.05$ )。

表 3 多重实时 PCR 方法和培养分离法检测肛拭子副溶血弧菌的结果比较

培养分离	多重实时 PCR 方法	
	+	-
+	1	1
-	0	88

$\chi^2 = 0.0; P > 0.05$

3 讨论

常规 PCR 或者多重 PCR 需通过凝胶电泳进行结果的分析和判定,费时费力,且只能定性不能定量。实时 PCR 较常规 PCR 更为敏感和特异,操作简便快速,且检测时无需打开 PCR 管,使实验室污染的可能性得以减少。实时 PCR 在病原微生物检测方面的应用越来越广泛。多重实时 PCR 通过合理组合检测的靶基因、设计引物和探针及优化反应条件,可使病原细菌鉴定和筛检的效率更为提高。

有报道建立了双重实时 PCR(改良分子信标检测体系)检测霍乱弧菌 *ctxA* 和副溶血弧菌 *tdh*,可应

用于副溶血弧菌食物中毒快速诊断和霍乱监测<sup>[5]</sup>。然而仅检测副溶血弧菌 *tdh* 不能用于检测 *trh* 阳性而 *tdh* 阴性的副溶血弧菌。神奈川现象阴性但携有编码 TRH 基因( *trh* )的副溶血弧菌菌株也与胃肠炎的发生有关,并可引起食物中毒暴发。此外,在其它弧菌属细菌中,包括霍利斯弧菌和少数拟态弧菌和非 O1 群霍乱弧菌,也可携带有 *tdh*<sup>[6]</sup>。副溶血弧菌、拟态弧菌和非 O1 群霍乱弧菌间的 *tdh* 密切相关,可能与基因在菌株或菌种间的水平转移有关<sup>[6]</sup>,故仅检出 *tdh* 不能完全排除是其他细菌。

也有报道建立了针对 *gyrB* 基因的实时 PCR 技术用于定量检测副溶血弧菌<sup>[7]</sup>。然而,仅进行副溶血弧菌 *gyrB* 基因的特异性检测,只能用于种的水平上的菌株鉴定,不能反映菌株携带毒力基因的状况。在临床来源副溶血弧菌菌株携带 *tdh* 和/或 *trh*,而绝大部分环境来源的菌株并不携带毒力基因<sup>[8]</sup>,故仅以 *gyrB* 基因的实时 PCR 技术用于定量检测海产品中的副溶血弧菌,其医学意义有限。

为避免上述不足之处,本文建立了多重实时 PCR,同时检测霍乱弧菌 *ctxA*、副溶血弧菌特异性 *gyrB* 和 *tdh*。应用此多重实时 PCR 检测产毒素性或产毒素的 O1 群和 O139 群霍乱弧菌菌株及非 O1 非 O139 群霍乱弧菌菌株的 *ctxA*,阳性和阴性结果均与普通 PCR 法检测结果完全符合;另外考虑到 LT 基因与检测 *ctxA* 序列有一定程度的类似性,我们检测了 4 株 LT 阳性大肠埃希菌,发现此法均未扩增出阳性信号,结果表明此方法检测 *ctxA* 的敏感性和特异性均令人满意。应用此多重实时 PCR 检测多种来源的携带或不携带毒素基因的副溶血弧菌菌株及其它种属细菌的 *gyrB* 和 *tdh*,结果表明,该

法能在种水平上检测副溶血弧菌及其主要毒力基因 *tdh*。特别是由于溶藻弧菌与副溶血弧菌极为近缘,二者 *gyrB* 序列间的差异不大,但该方法仍能将溶藻弧菌和副溶血弧菌区分,而我们也曾试图建立过基于 *toxR* 基因序列的实时 PCR 检测方法,但无法有效区分溶藻弧菌和副溶血弧菌。另外本文建立了分别检测 *trh1* 和 *trh2* 的单重实时 PCR 方法,可用于当检出副溶血弧菌或扩增出副溶血弧菌特异性 *gyrB* 时,进一步检测其 *trh* 基因。

我们还将此多重实时 PCR 初步应用于散发腹泻患者肛拭子标本的筛检,并同时与常规细菌培养法进行比较,结果发现两种方法检测副溶血弧菌未见明显差异,但多重实时 PCR 在收到标本后可于 8h ~ 10h 内出结果(包括 BP 预增菌时间),而常规培养法需 3d ~ 4d;显示此多重实时 PCR 在突发食物中毒事件的病原鉴定方面有着极大的应用价值。

## 参考文献

- [1] Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, et al. J Clin Microbiol, 1997, 35: 3150 ~ 3155.
- [2] Wong HC, Liu SH, Wang TK, et al. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 3981 ~ 3986.
- [3] 卫生部疾控司. 霍乱防治手册. 第五版. 北京: 1999. pp. 82.
- [4] Tada J, Ohashi T, Nishimura N, et al. Mol Cell. Probes. 1992, 6: 477 ~ 487.
- [5] 唐庆华, 郑薇薇, 石晓路, 等. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(12): 1004 ~ 1007.
- [6] Nishibuchi M, Kaper JB. Infect Immun, 1995, 63: 2093 ~ 2099.
- [7] 蔡潭溪, 蒋鲁岩, 黄克和. 微生物学报, 2005, 45(4): 638 ~ 642.
- [8] 张蔚, 孟冬梅, 潘劲草, 等. 中华预防医学杂志, 2004, 38: 200 ~ 203.