

特异性三重 PCR 快速检测副溶血性弧菌

陈丽萍^{1*} 刘忠民¹ 陈芸¹ 张继伦² 彭云霞¹

(1. 云南出入境检验检疫局 云南 昆明 650228)

(2. 上海出入境检验检疫局 上海 200135)

摘要:【目的】建立同时检测副溶血性弧菌 *gyrase*、*tdh*、*trh* 基因的三重 PCR 快速检测方法。

【方法】将已报道的这 3 种基因的引物加入一个 PCR 反应管中, 对引物浓度和退火温度进行优化, 找到最佳引物比例和扩增条件。通过特异性验证、灵敏度验证以及方法间对比进行方法确认, 其 PCR 产物使用全自动毛细管电泳分析系统进行分析。【结果】仅在 91、269、485 bp 处分别出现预期 DNA 扩增条带; 纯培养条件下, 扩增 *gyrase*、*tdh*、*trh* 的菌浓度检测限分别为 6.6×10^1 、 6.6×10^2 和 6.6×10^1 CFU/mL; 本底干扰物存在时, 扩增 *gyrase*、*tdh*、*trh* 的菌浓度检测限分别为 6.6×10^3 、 6.6×10^4 和 6.6×10^3 CFU/mL; 模板 DNA 浓度检测限为 1.36 μ g/L。检测进境海产品时, 检测结果和 FDA 2004 标准结果一致, 且更易辨认和判断。【结论】此检测方法的成功建立, 为副溶血性弧菌及携带 *tdh* 和/或 *trh* 基因的致病性副溶血性弧菌的检测提供了一种准确、高效、便捷的分子技术手段。

关键词: 副溶血性弧菌, 三重 PCR, *gyrase* 基因, *tdh* 基因, *trh* 基因, 全自动 DNA 毛细管电泳

Specific multiplex-PCR method for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*

CHEN Li-Ping^{1*} LIU Zhong-Min¹ CHEN Yun¹ ZHANG Ji-Lun² PENG Yun-Xia¹

(1. Yunnan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Kunming, Yunnan 650228, China)

(2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: [Objective] This study aims to establish a rapid specific multiplex-PCR detection of *Vibrio parahaemolyticus* by targeting *gyrase*, *tdh*, *trh* genes simultaneously. [Methods] Three pairs of reported primers were mixed in a single PCR tube. Through optimizing the concentration of primers and anneal temperature, the best reaction condition and primers ratio were determined. This method was validated by specificity test, sensitivity test and comparison test. The PCR-amplified products were analyzed by automatic capillary electrophoresis device. [Results] The predicted DNA amplified bands exhibited at sequences of 91, 269 and 485 bp, indicating high specificity. Assay on sensitivity

基金项目: 国家认证认可监督管理委员会行业标准专项项目(No. 2010B152)

*通讯作者: Tel: 86-871-64631113; 信箱: chenlpcig@189.cn

收稿日期: 2013-04-17; 接受日期: 2013-06-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

of cell concentration in pure culture condition showed that the detection limit of amplified *gyrase*, *tdh* and *trh* genes were 6.6×10^1 , 6.6×10^2 and 6.6×10^1 CFU/mL respectively. When background interference existed, the detection limit of cell concentration of amplified *gyrase*, *tdh* and *trh* genes were 6.6×10^3 , 6.6×10^4 and 6.6×10^3 CFU/mL respectively. The sensitivity experiment for testing genomic DNA template concentration showed that the detection limit was 1.36 μ g/L. This method was applied to the test for imported seafood, the results matched the FDA 2004 standard. The amplified bands can be distinguished from each other more easily, comparing with those of FDA 2004 standard. **[Conclusion]** The multiplex-PCR method was successfully established. It is accurate, rapid and convenient. It can be applied to detect *Vibrio parahaemolyticus* or pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* with *tdh* gene or *trh* gene.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, Multiplex-PCR, *gyrase* gene, *tdh* gene, *trh* gene, Automatic capillary electrophoresis

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种嗜盐性弧菌,主要存在于近海岸的海水、浮游生物、海底沉积物、鱼、虾、蟹、螺、贝类等鲜海产品或盐渍加工品中^[1-3]。人可因食用被副溶血性弧菌污染而未煮熟的海产品而引起腹泻、肠痉挛、恶心、呕吐、发烧等胃肠炎反应^[1-3]。在夏秋季副溶血性弧菌是全球沿海地区人腹泻的主要病原菌,在我国,此菌也较长期居于食物中毒已检出致病菌的前列^[1-2]。部分国家对食品中的副溶血性弧菌有严格限量。我国要求食品中不得检出副溶血性弧菌。

我们从食品微生物检测工作中发现,海产品中副溶血性弧菌的检出率很高,有时可达 100%。但据文献报道,自然环境中分离的副溶血性弧菌有 95%是非致病性的,仅有 5%的是致病性的^[4-6]。海产品经冷冻或冷藏、烹调等加工处理后,副溶血性弧菌可能处于活的非可培养的状态,但致病性副溶血性弧菌携带的耐热溶血毒素(*tdh*)和耐热直接溶血毒素相关溶血毒素(*trh*)依然存在^[7-9]。统计显示,人们食用海产品引发的腹泻率远低于海产品的携带率。为此,筛检出致病性副溶血性弧菌,比只检出副溶血性弧菌更有价值^[10]。另外,判定患者呕吐或腹泻是否由致病性副溶血性弧菌引起,也需要对患者的呕吐物、粪便物或肛拭进行致病性副溶血型弧菌的检测。目前,参照 GB/T 4789.7-2008、ISO/TS 21872-1-2007、GB/T 26426-2010 和 SN/T 0173-2010 标准对致病性副溶血性弧菌的检测步骤

是:分离培养、生化鉴定、神奈川实验和血清学实验^[11-14],整个过程检测工作量巨大,检测周期很长,工作繁琐,操作和判定也不容易,而且成本较高,当检测大量样品时难以应付。行标 SN/T 2424-2010 以及 SN/T 2754.5-2011 已采用分子生物学手段检测是否携带副溶血性弧菌,但不能检测是否携带致病性副溶血性弧菌^[15-16]。因此需要建立能够快速、准确、简便的检测致病性副溶血性弧菌的标准。

本研究响应致病性副溶血性弧菌检测标准建立的需要,使用 FDA 2004 标准推荐的靶基因为副溶血性弧菌耐热溶血毒素(*tdh*)致病基因和耐热直接溶血毒素相关溶血毒素(*trh*)致病基因的引物^[17],以及我国行标 SN/T 2424-2010 推荐的靶基因为副溶血性弧菌 *gyrase* 保守基因的引物^[15],通过优化 3 种引物的浓度、引物间比例以及退火温度,建立在一个反应管中同时扩增 *gyrase*、*tdh*、*trh* 3 种目标基因的三重 PCR 检测方法。方法确认经过特异性验证、灵敏度测试以及方法间对比实验的步骤。此方法内容为行标 No. 2010B152 《产毒副溶血性弧菌快速检验方法》的第一法,将为副溶血性弧菌及致病性副溶血性弧菌的检测提供便捷的分子检测手段。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及来源

本文所用副溶血性弧菌菌株根据标本来源,可分为五类。第一类来源于本局微生物实验室从进口海产品中分离并保存的菌株,共 2 株,编号分别

为 R1 和 R2。第二类是副溶血性弧菌的标准菌株 ATCC33847 和 ATCC17802, 共 2 株。第三类来源于上海交通大学提供的同时含有 *tdh* 和 *trh* 基因的 A121 混合菌株; 第四类来源于上海出入境检验检疫局提供的临床门诊腹泻者肛拭腹泻株, 共 6 株, 编号分别为 P1、P2、P3、P4、P5 和 P6, 第五类来源于上海出入境检验检疫局从出口中转或饭店暂养水以及近海的水体中分离并保存的菌株, 共 3 株, 编号分别为 W1、W2 和 W3。合计 14 株。

其他菌株: 河弧菌(*Vibrio fluvialis*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7)、沙门氏菌(*Salmonella*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*)、粘氏沙雷菌(*Serratia marcescens*)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)各一株, 均来自本局微生物实验室。

1.2 主要试剂

Premix Taq Version 2.0 PCR 反应预混包装购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司; 引物由 TaKaRa 宝生物工程有限公司合成; 细菌基因组 DNA 提纯试剂

盒购自德国 QIAGEN 公司。引物信息详见表 1。

1.3 取样及模板 DNA 制备

若需增菌检测的样品, 无菌操作称取 25 g (mL) 待测样品剪碎或粉碎后, 加入 225 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨增菌液(蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 30 g/L, pH 8.5±0.2, 1×10⁵ Pa 灭菌 15 min)中 37 °C 培养 6–8 h。吸取表层增菌液 1 mL 放入灭菌 1.5 mL 离心管中, 8 000 r/min 离心 5 min 后尽量弃净上清, 加入 1 mL 无菌 ddH₂O, 混匀清洗 1 次后, 8 000 r/min 离心 5 min 后尽量弃净上清, 然后采用细菌 DNA 提纯试剂盒抽提 DNA。

若无需增菌直接检测的样品(含菌量较高的患者腹泻样或呕吐物), 取豌豆大样品放入灭菌 2.0 mL 离心管中, 加入 1.5 mL 无菌 ddH₂O, 盖上盖子, 充分振荡混匀, 室温静置 5 min 后, 取 1 mL 液体, 8 000 r/min 离心 5 min 后尽量弃净上清, 加入 1 mL 无菌 ddH₂O, 混匀清洗 1 次后, 8 000 r/min 离心 5 min 后尽量弃净上清, 然后采用细菌 DNA 提纯试剂盒抽提 DNA。

若为副溶血性弧菌的可疑菌落, 用接种针针尖直接挑取少量菌苔(菌量以肉眼可见即可)涂抹在 0.2 mL PCR 反应管管壁上, 加入 70 μL 无菌 ddH₂O, 混匀, 100 °C 沸水浴或电加热 10 min, 4 °C 放置 5 min 后, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液即可; 若不太浑浊较透明也可以不用离心, 直接吸取作为模板。

表 1 引物序列及扩增产物大小
Table 1 Primer sequence and amplicon size

靶基因 Target gene	方向 Direction	序列 Primer sequence (5'→3')	扩增产物大小 Amplicon size (bp)	引用 Reference
<i>gyrase</i>	F	CGGTAGTAAACCCACTGTCAG	91	[15]
	R	GTTTCAGGCTCACCATGACG		
<i>tdh</i>	F	GTAAAGGTCTCTGACTTTTGAC	269	[17]
	R	TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC		
<i>trh</i>	F	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	485	[17]
	R	CATAACAAACATATGCCCATTTCCG		

1.4 三重 PCR 扩增体系的建立

通过引物浓度、比例以及退火温度的优化过程, 确定最佳反应体系: Premix Taq Version 2.0 (TaKaRa) 12.5 μL , 模板 DNA 2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ *gyrase* 基因的上下游引物各 0.25 μL (终浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$)、10 $\mu\text{mol/L}$ *tdh* 基因的上下游引物各 0.5 μL (终浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$)、10 $\mu\text{mol/L}$ *trh* 基因的上下游引物各 0.75 μL (终浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$), 补充无菌 ddH₂O 至 25 μL 。

设立空白对照、阴性对照和阳性对照。空白对照: 以 ddH₂O 代替 DNA 模板; 阴性对照: 非目标菌 DNA 作为 PCR 反应的模板; 阳性对照: 含有检测序列 *trh* 和/或 *tdh* 的副溶血性弧菌 DNA 作为 PCR 反应的模板。

为防止液体蒸发并获得最佳扩增效果, 在盖上 PCR 管盖前, 所有 PCR 管中各滴加 1 滴 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存的无 DNA 酶污染的灭菌石蜡油。

PCR 最佳反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。其产物经全自动毛细管电泳分析系统(QIAGEN)进行比较。

1.5 三重 PCR 特异性和敏感性验证

1.5.1 三重体系中的单重 PCR 实验: 以 A121 混合菌株的 DNA 为模板, 各引物进行单重 PCR 特异性扩增和三重 PCR 特异性扩增。

1.5.2 特异性验证: 14 株副溶血性弧菌和 16 株非副溶血性弧菌进行三重 PCR 特异性检测。

1.5.3 模板 DNA 浓度灵敏度检测: 将过夜培养 A121 混合菌株的菌悬液吸取 1 mL, 提取 DNA, 测定 DNA 的浓度。对 DNA 溶液从原液到 10^{-7} 进行梯度稀释, 并将每一个稀释度的 DNA 作为三重 PCR 的模板。

1.5.4 纯培养菌浓度灵敏度检测: 无菌条件下将过夜培养 A121 混合菌株的菌悬液 10 倍稀释, 选择 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 稀释度菌悬液涂平板计数。按 1.2.1 方法从与原液到 10^{-7} 稀释度菌悬液提取各

稀释度菌液 DNA 进行三重 PCR 检测。

1.5.5 本底物干扰实验及其菌浓度灵敏度检测: 本底物为 2.5 g 剪碎的虹鳟鱼鱼肉泥和 2.5 g 米饭(事先检测过不含副溶血性弧菌)的混合物, 在其中加入 20 mL 含有 6.6×10^6 CFU/mL A121 混合菌株的 3%氯化钠碱性蛋白胨增菌液, 混匀后, 做 10 倍梯度稀释。按 1.2.1 方法从与原液到 10^{-6} 稀释度菌悬液提取各稀释度菌液 DNA 进行三重 PCR 检测。

1.5.6 进行海产品检测结果的对比: 13 个进口海产品经 3%氯化钠碱性蛋白胨增菌液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h 后的菌悬液, 提取 DNA 后, 同时分别运用国标 FDA 2004 标准^[17](*tdh* 269 bp, *tlh* 450 bp, *trh* 485 bp)和本研究方法(*gyrase* 91 bp, *tdh* 269 bp, *trh* 485 bp)进行副溶血性弧菌的检测, 进行实验结果的对比。

2 结果与分析

2.1 三重体系中的单重 PCR 实验结果

经过优化的三重 PCR 体系能够同时在 91、269、485 bp 处扩增出 *gyrase*、*tdh* 和 *trh* 基因的相应条带, 如图 1 所示。三重 PCR 特异性强, 引物间无交叉反应, 未出现非特异性扩增, 并且扩增出的 3 个片段与单重 PCR 对应片段大小一致。

2.2 三重 PCR 体系特异性验证结果

采用本研究的三重 PCR 检测体系对 14 株副溶血弧菌和 16 株非副溶血弧菌分别进行扩增检测, 发现以副溶血弧菌基因组 DNA 为模板都能扩增出 91 bp 的 *gyrase* 基因片段, A121 混合菌株还可以同时扩增出 269 bp 的 *tdh* 基因片段和 485 bp 的 *trh* 基因片段, R2 菌株、P1 菌株、P2 菌株、P3 菌株、P4 菌株、P5 菌株、P6 菌株都扩增出 269 bp 的 *tdh* 基因片段, 而以非副溶血弧菌基因组 DNA 为模板时没有任何扩增条带, 如图 2 和图 3 所示。可见, 此三重 PCR 体系具有很好的副溶血弧菌检测特异性。

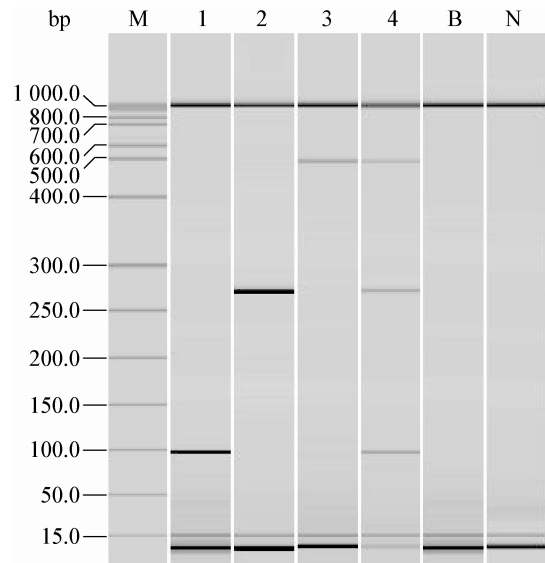


图 1 各引物进行单重 PCR 以及三重 PCR 扩增结果
Figure 1 Products of single PCR and multiplex-PCR

注：M：DNA marker (QIAGEN size marker)；1： *gyrase* 单重 PCR 结果；2： *tdh* 单重 PCR 结果；3： *trh* 单重 PCR 结果；4： *gyrase*、*tdh* 和 *trh* 三重 PCR 结果；B：空白对照(ddH₂O 为模板)；N：阴性对照(河弧菌 DNA 为模板)。
Note: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1: Single PCR product of *gyrase*; 2: Single PCR product of *tdh*; 3: Single PCR product of *trh*; 4: Multiplex-PCR products of *gyrase*, *tdh* and *trh*; B: Blank control (ddH₂O as template); N: Negtive control (the DNA of *Vibrio fluvialis* as template).

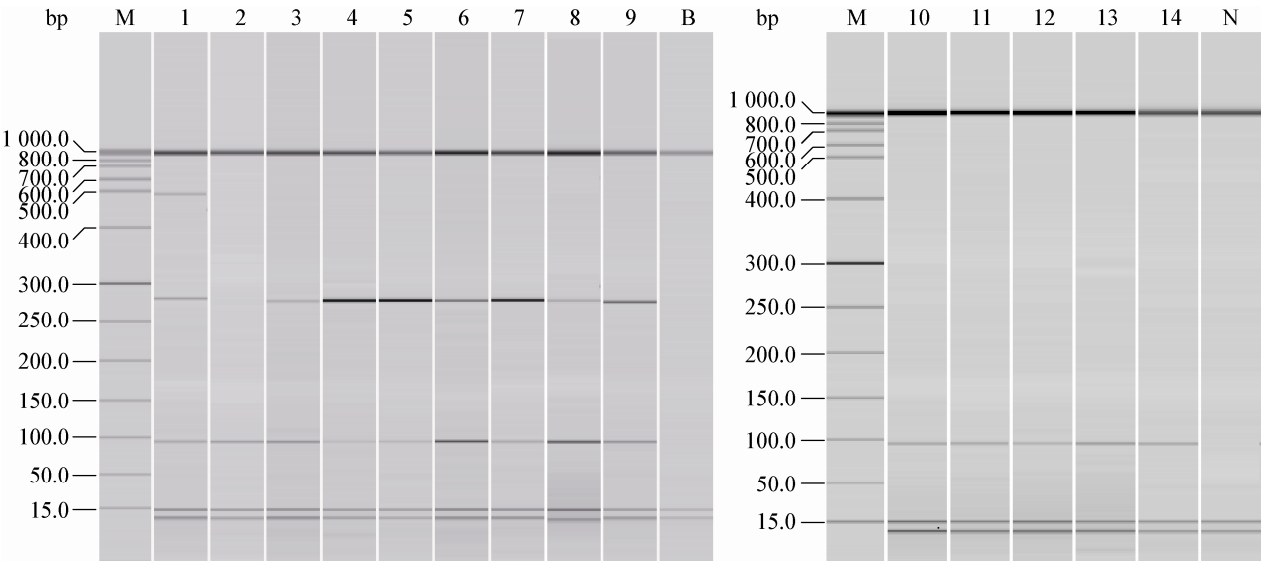


图 2 14 株副溶血性弧菌的三重 PCR 扩增结果
Figure 2 Multiplex-PCR products of 14 *Vibrio parahaemolyticus* strains

注：M：DNA marker (QIAGEN size marker)；1： A121；2： R1；3： R2；4： P1；5： P2；6： P3；7： P4；8： P5；9： P6；10： W1；11： W2；12： W3；13： ATCC 33847；14： ATCC 17802；B：空白对照(ddH₂O 为模板)；N：阴性对照(河弧菌 DNA 为模板)。
Note: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1: A121; 2: R1; 3: R2; 4: P1; 5: P2; 6: P3; 7: P4; 8: P5; 9: P6; 10: W1; 11: W2; 12: W3; 13: ATCC 33847; 14: ATCC 17802; B: Blank control (ddH₂O as template); N: Negtive control (the DNA of *Vibrio fluvialis* as template).

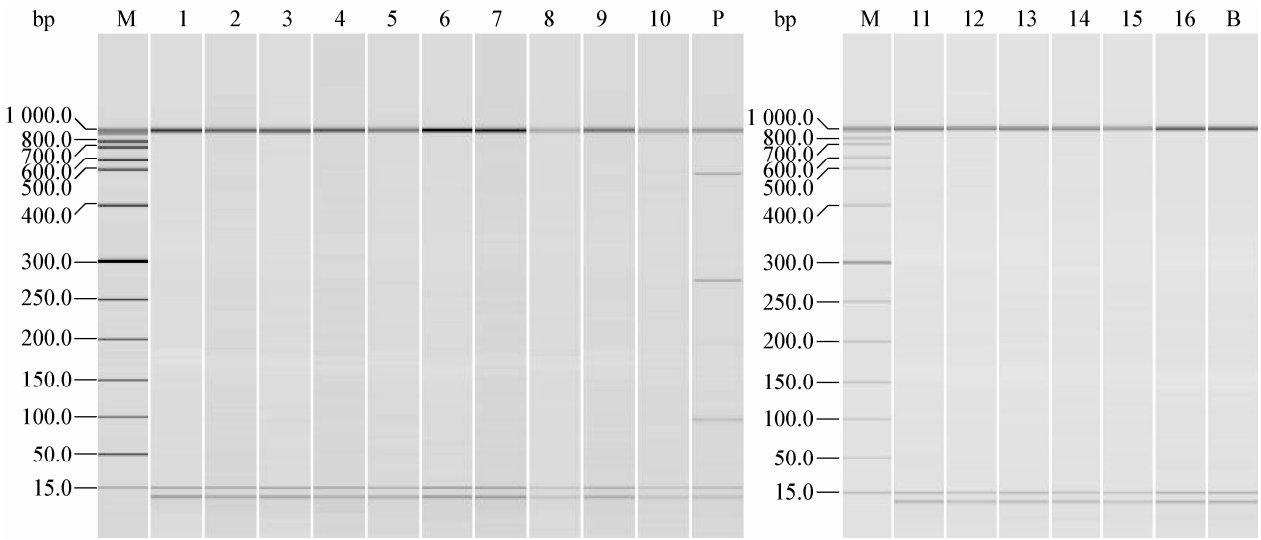


图 3 16 株非副溶血性弧菌的三重 PCR 扩增结果

Figure 3 Multiplex-PCR products of 16 non-*Vibrio parahaemolyticus* strains

注: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1: 河弧菌; 2: 霍乱弧菌; 3: 溶藻弧菌; 4: 金黄色葡萄球菌; 5: 大肠杆菌 O157:H7; 6: 沙门氏菌; 7: 肠炎沙门氏菌; 8: 阴沟肠杆菌; 9: 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 10: 产酸克雷伯菌; 11: 粘氏沙雷菌; 12: 福氏志贺氏菌; 13: 弗氏柠檬酸杆菌; 14: 绿脓杆菌; 15: 产气肠杆菌; 16: 奇异变形杆菌; B: 空白对照(ddH₂O 为模板); P: 阳性对照(A121 菌 DNA 为模板).

Note: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1: *Vibrio fluvialis*; 2: *Vibrio cholera*; 3: *Vibrio alginolyticus*; 4: *Staphylococcus aureus*; 5: *Escherichia coli* O157:H7; 6: *Salmonella*; 7: *Salmonella enteritidis*; 8: *Enterobacter cloacae*; 9: *Yersinia enterocolitica*; 10: *Klebsiella oxytoca*; 11: *Serratia marcescens*; 12: *Shigella flexneri*; 13: *Citrobacter freundii*; 14: *Pseudomonas aeruginosa*; 15: *Enterobacter aerogenes*; 16: *Proteus mirabilis*; B: Blank control (ddH₂O as template); P: Positive control (A121 DNA as template).

2.3 模板 DNA 浓度的灵敏度检测结果

经测定,提取的致病性副溶血性弧菌(A121 混合菌株)纯菌落模板 DNA 的浓度为 1.36×10² mg/L。将此 DNA 从 10⁻¹ 逐级稀释到 10⁻⁷,以各稀释度的 DNA 作为模板进行本研究的三重 PCR 实验。当模板 DNA 稀释到 1.36×10⁻⁴ mg/L 时,仍然可以得到 *tdh* 和 *trh* 的扩增条带,但是 *gyrase* 条带很淡,不易判断。当模板 DNA 小于 1.36×10⁻⁴ mg/L 时 3 种目标基因的扩增产物都没有了,因此本研究副溶血性弧菌和携带 *trh*、*tdh* 致病基因的副溶血性弧菌模板 DNA 浓度的检测限均为 1.36×10⁻³ mg/L,即 1.36 μg/L,如图 4 所示。

2.4 纯培养物菌浓度灵敏度检测结果

通过菌落平板计数得知过夜培养 A121 混合菌株的菌悬液的菌浓度为 6.6×10⁶ CFU/mL。将其从 10⁻¹ 逐级稀释到 10⁻⁷,提取各稀释度菌液 DNA 进行本研究三重 PCR 检测。当菌浓度稀释到

6.6×10² CFU/mL 时,都能得到 *gyrase*、*tdh* 和 *trh* 的扩增产物,当菌浓度稀释到 6.6×10¹ CFU/mL 时,只能得到 *gyrase* 和 *trh* 的扩增产物,当菌浓度小于 6.6×10¹ CFU/mL 时, *gyrase*、*tdh* 和 *trh* 基因的扩增产物都没有了。因此副溶血弧菌种特异性基因 *gyrase*、致病基因 *tdh* 和 *trh* 的检测限分别为 6.6×10¹、6.6×10² 和 6.6×10¹ CFU/mL,如图 5 所示。

2.5 本底物干扰实验及其菌浓度灵敏度检测结果

添加本底物与未添加的检测结果一致,但是检测灵敏度受影响,当菌浓度稀释到 6.6×10⁴ CFU/mL 时,都能得到 *gyrase*、*tdh* 和 *trh* 的扩增产物,当菌浓度稀释到 6.6×10³ CFU/mL 时,只能得到 *gyrase* 和 *trh* 的扩增产物,当菌浓度小于 6.6×10³ CFU/mL 时, *gyrase*、*tdh* 和 *trh* 基因的扩增产物都没有了。因此,非菌落纯培养条件下, *gyrase*、*tdh* 和 *trh* 的检测限分别为 6.6×10³、6.6×10⁴ 和 6.6×10³ CFU/mL,如图 6 所示。

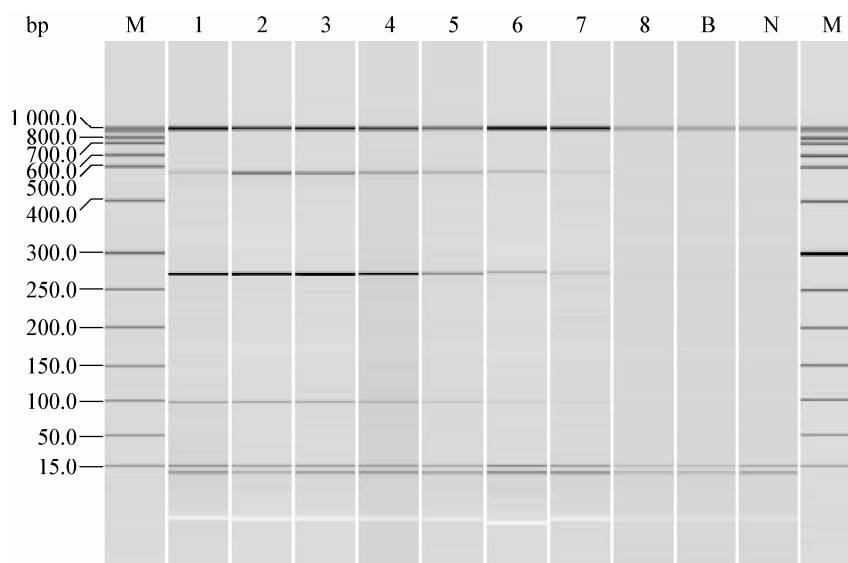


图4 模板 DNA 浓度灵敏度的验证

Figure 4 The sensitivity of DNA template concentration

注: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1: 1.36×10^2 mg/L; 2: 1.36×10^1 mg/L; 3: 1.36 mg/L; 4: 1.36×10^{-1} mg/L; 5: 1.36×10^{-2} mg/L; 6: 1.36×10^{-3} mg/L; 7: 1.36×10^{-4} mg/L; 8: 1.36×10^{-5} mg/L; B: 空白对照(ddH₂O 为模板); N: 阴性对照(河弧菌 DNA 为模板).

Note: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1: 1.36×10^2 mg/L; 2: 1.36×10^1 mg/L; 3: 1.36 mg/L; 4: 1.36×10^{-1} mg/L; 5: 1.36×10^{-2} mg/L; 6: 1.36×10^{-3} mg/L; 7: 1.36×10^{-4} mg/L; 8: 1.36×10^{-5} mg/L; B: Blank control (ddH₂O as template); N: Negative control (the DNA of *Vibrio fluvialis* as template).

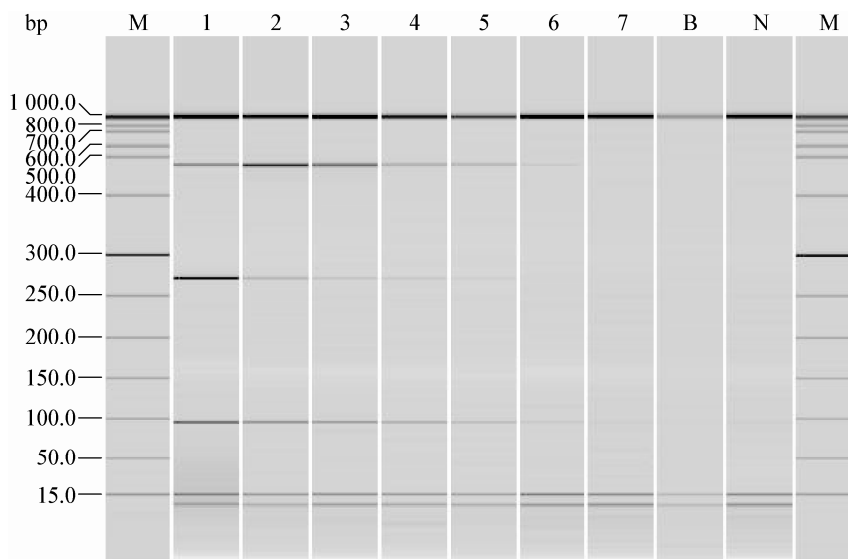


图5 纯培养条件下 A121 菌浓度的灵敏度验证

Figure 5 The sensitivity of A121 strain cell concentration in pure culture condition

注: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1: 6.6×10^6 CFU/mL; 2: 6.6×10^5 CFU/mL; 3: 6.6×10^4 CFU/mL; 4: 6.6×10^3 CFU/mL; 5: 6.6×10^2 CFU/mL; 6: 6.6×10^1 CFU/mL; 7: 6.6 CFU/mL; B: 空白对照(ddH₂O 为模板); N: 阴性对照(河弧菌 DNA 为模板).

Note: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1: 6.6×10^6 CFU/mL; 2: 6.6×10^5 CFU/mL; 3: 6.6×10^4 CFU/mL; 4: 6.6×10^3 CFU/mL; 5: 6.6×10^2 CFU/mL; 6: 6.6×10^1 CFU/mL; 7: 6.6 CFU/mL; B: Blank control (ddH₂O as template); N: Negative control (the DNA of *Vibrio fluvialis* as template).

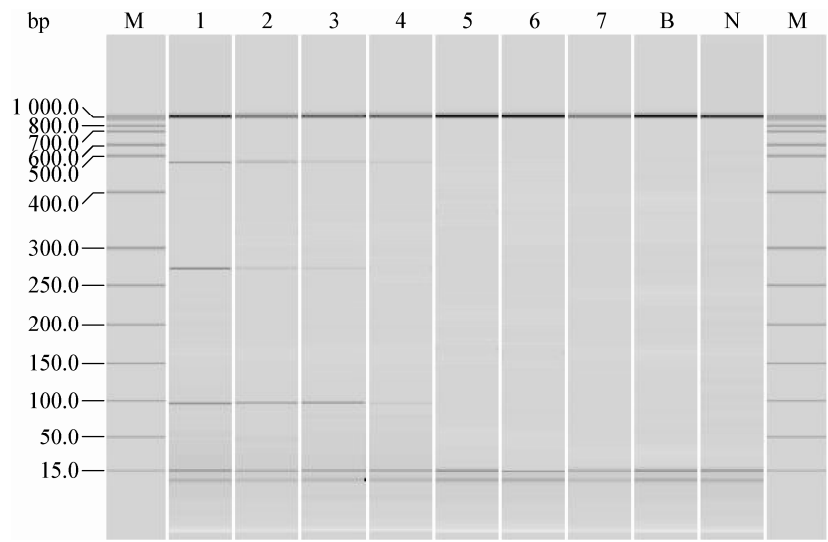


图 6 本底物干扰存在时 A121 菌浓度的灵敏度验证

Figure 6 The sensitivity of A121 strain cell concentration while background interference existing

注: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1: 6.6×10^6 CFU/mL; 2: 6.6×10^5 CFU/mL; 3: 6.6×10^4 CFU/mL; 4: 6.6×10^3 CFU/mL; 5: 6.6×10^2 CFU/mL; 6: 6.6×10^1 CFU/mL; 7: 6.6 CFU/mL; B: 空白对照(ddH₂O 为模板); N: 阴性对照(河弧菌 DNA 为模板).
Note: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1: 6.6×10^6 CFU/mL; 2: 6.6×10^5 CFU/mL; 3: 6.6×10^4 CFU/mL; 4: 6.6×10^3 CFU/mL; 5: 6.6×10^2 CFU/mL; 6: 6.6×10^1 CFU/mL; 7: 6.6 CFU/mL; B: Blank control (ddH₂O as template); N: Negative control (the DNA of *Vibrio fluvialis* as template).

2.6 进行海产品检测时不同方法的对比结果

对 13 个进口海产品分别运用国标 FDA 2004 标准^[17](*tdh* 269 bp, *tlh* 450 bp, *trh* 485 bp)以及本研究方法(*gyrase* 91 bp, *tdh* 269 bp, *trh* 485 bp)进行副溶血性弧菌的检测结果是—致的,如图 7 所示,除 11 号样品外都含有副溶血性弧菌,并且 3、4、10、12 号样品还含有产毒副溶血性弧菌的致病基因 *tdh*。比较发现,本研究的扩增条带特别是 *trh* 的条带比 FDA 2004 标准的扩增条带还要清晰易辨,而且 3 条条带间的电泳距离差异更大,更易于判断(图 8)。

3 结论与讨论

3.1 实验结果总结

实验结果表明,以副溶血性弧菌种特异性基因 *gyrase*、致病基因 *tdh* 和 *trh* 进行三重 PCR 检测时的最佳引物比例为 *gyrase:tdh:trh*=1:2:3 (引物浓度均为 10 μmol/L)。此三重 PCR 体系特异性强,灵敏度高。对副溶血性弧菌的纯菌落模板 DNA 的浓度灵敏度验证结果表明:模板 DNA 的浓度检测限

为 1.36 μg/L。纯培养条件下菌浓度灵敏度验证结果表明:副溶血性弧菌种特异性基因 *gyrase*、致病基因 *tdh* 和 *trh* 检测限分别为 6.6×10^1 、 6.6×10^2 和 6.6×10^1 CFU/mL。本底物干扰情况下,菌浓度灵敏度验证结果表明:副溶血性弧菌种特异性基因 *gyrase*、致病基因 *tdh* 和 *trh* 的检测限分别为 6.6×10^3 、 6.6×10^4 和 6.6×10^3 CFU/mL。对进口的 13 个海产品分别运用国标 FDA 2004 标准^[17]以及本研究方法进行副溶血性弧菌的检测,两种结果一致,而且和 FDA 2004 标准的扩增结果相比,本研究的扩增条带特别是 *trh* 条带更清晰,3 条目标条带的电泳间距更大,更易判断。

3.2 关于阴性结果的讨论

若实验结果为 3 条扩增条带都是阴性,不能认为样品不含副溶血性弧菌和携带 *trh*、*tdh* 致病基因的副溶血性弧菌,需排除两个因素:(1) 样品含有待测副溶血性弧菌的菌浓度或模板 DNA 的浓度低于检测限;(2) 排除导致 PCR 假阴性的因素。

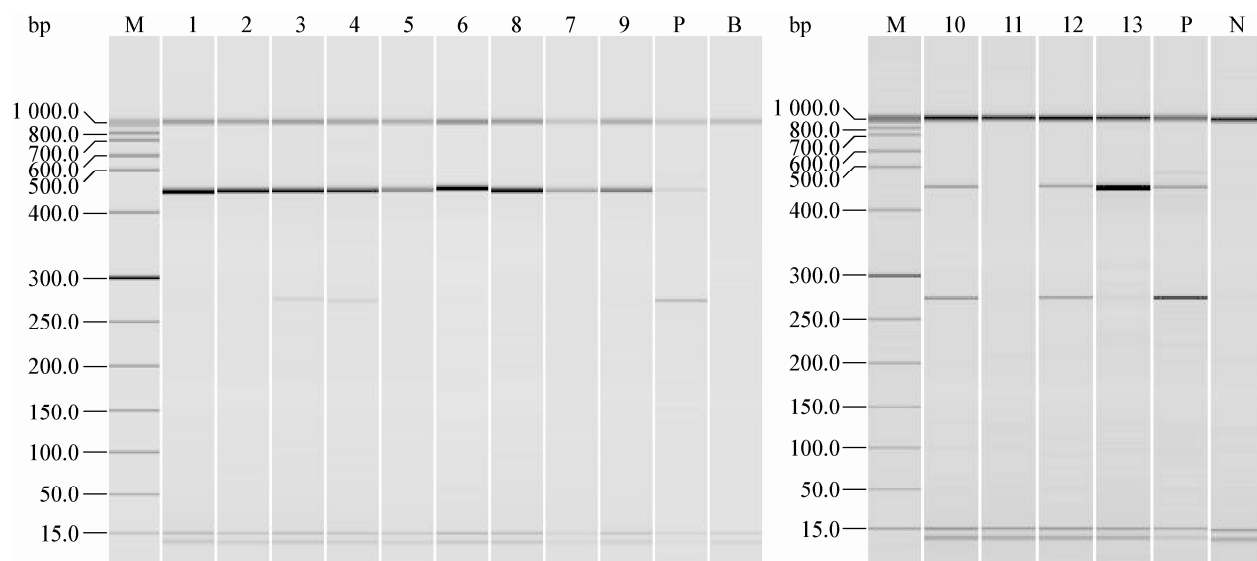


图 7 运用 FDA 2004 标准对 13 个进口海产品的副溶血性弧菌的检测结果

Figure 7 *Vibrio parahaemolyticus* detection results of 13 imported seafoods applied FDA 2004 standard

注: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1-13: 13 个进口海产品; B: 空白对照(ddH₂O 为模板); N: 阴性对照(河弧菌 DNA 为模板); P: 阳性对照(A121 菌 DNA 为模板). FDA 2004 标准的预期 DNA 扩增条带的大小为: *tdh* 269 bp, *tlh* 450 bp, *trh* 485 bp.
Note: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1-13: 13 imported seafoods; B: Blank control (ddH₂O as template); N: Negative control (the DNA of *Vibrio fluvialis* as template); P: Positive control (A121 DNA as template). The predicted DNA amplified bands exhibited at sequences of *tdh* 269 bp, *tlh* 450 bp, *trh* 485 bp in FDA 2004 standard.

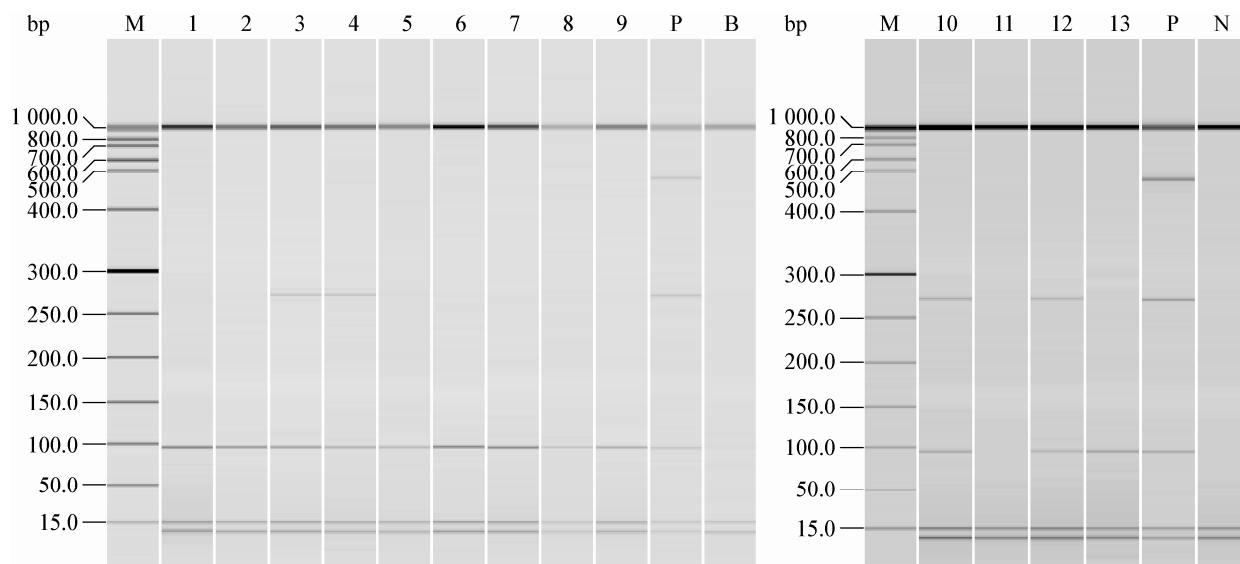


图 8 运用副溶血性弧菌特异性三重 PCR 快速检测方法对 13 个进口海产品的副溶血性弧菌检测结果

Figure 8 *Vibrio parahaemolyticus* detection results of 13 imported seafoods applied specific multiplex-PCR method for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*

注: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1-13: 13 个进口海产品; B: 空白对照(ddH₂O 为模板); N: 阴性对照(河弧菌 DNA 为模板); P: 阳性对照(A121 菌 DNA 为模板). 本研究方法的副溶血性弧菌预期 DNA 扩增大小为: *gyrase* 91 bp, *tdh* 269 bp, *trh* 485 bp.

Note: M: DNA marker (QIAGEN size marker); 1-13: 13 imported seafoods; B: Blank control (ddH₂O as template); N: Negative control (the DNA of *Vibrio fluvialis* as template); P: Positive control (A121 DNA as template). The predicted DNA amplified bands exhibited at sequences of *gyrase* 91 bp, *tdh* 269 bp, *trh* 485 bp in this study.

若实验结果只有 *gyrase* 基因的产物, 不能认为样品只含副溶血性弧菌而不含携带 *trh*、*tdh* 致病基因的副溶血性弧菌, 出现这样的情况不必考虑导致 PCR 假阴性的因素, 但仍需排除两个因素: (1) 样品含有的致病性副溶血性弧菌的菌浓度或模板 DNA 的浓度低于检测限; (2) 排除导致假阳性的可能。

从灵敏度实验结果可以推断: 副溶血性弧菌和携带 *trh*、*tdh* 致病基因的副溶血性弧菌模板 DNA 浓度的检测限均为 1.36 $\mu\text{g/L}$, 满足此限以上才可保证检出这 3 种基因片段; 纯菌落培养条件下, 副溶血性弧菌和携带 *trh* 致病基因的副溶血性弧菌的菌浓度的检测限均为 6.6×10^1 CFU/mL, 满足此限以上才可保证检出 *gyrase* 基因片段和 *trh* 基因片段; 纯菌落培养条件下携带 *tdh* 基因的副溶血性弧菌的菌浓度满足 6.6×10^2 CFU/mL 以上, 才可保证检出 *tdh* 基因片段, 样品中副溶血性弧菌和携带 *trh* 基因的致病性副溶血性弧菌的菌浓度满足 6.6×10^3 CFU/mL 以上, 才可保证在样品中检出 *gyrase* 基因片段和 *trh* 基因片段; 样品中携带 *tdh* 基因的副溶血性弧菌的菌浓度满足 6.6×10^4 CFU/mL 以上, 才可保证检出 *tdh* 基因片段。比较这些灵敏度实验结果发现: 本底物的存在会降低检测的灵敏度, 因此若待测样品不是含菌量极高的腹泻物或呕吐物或者不确定含有多少可疑副溶血性弧菌时, 务必进行前增菌过程, 增菌时间因样品而异。

运用此三重 PCR 方法检测一些母蟹和鳗鱼中的副溶血性弧菌时发现, 当用纯水直接煮沸裂解法制备 DNA 模板进行 PCR 检测时, PCR 结果很弱甚至是阴性, 这与传统国标、行标的传统培养方法的检测结果不符, 即出现假阴性结果。这是因为在增菌液中含有蟹黄、鳗鱼油, 杂离子(离子表面活性剂), 多糖等, 可影响和抑制 PCR 扩增及 *Taq* 酶活性, 如果清洗不够且只用纯水煮沸裂解法直接制备 DNA 模板, 这些杂质很难除去, 就会导致假阴性的检测结果^[18-20]。我们也尝试过在 PCR 体系中

添加内标引物, 希望通过此能提示 PCR 反应系统中是否存在抑制剂会导致假阴性结果, 但是摸索了很长时间这样的四重 PCR 没有成功。因此, 在进行样品检测时, 本研究只好选择先采用多次离心清洗菌落沉淀的措施, 后采用较好的也较昂贵的细菌 DNA 提纯试剂盒的方法来得到模板 DNA, 以尽可能的避免抑制剂影响, 从而得到较准确的检测结果。

3.3 关于阳性结果的讨论

若实验结果为阳性, 也不能认为样品中就含有副溶血性弧菌或致病性副溶血性弧菌, 需排除假阴性问题。模板 DNA 的起始浓度仅为 1.36 $\mu\text{g/L}$, 极其敏感, 因此在操作过程中应严格控制污染问题, 特别是气溶胶污染造成的假阳性问题。运用本研究方法进行检测时, 样品、空白对照、阴性对照以及阳性对照应做至少两个平行对照, 而且样品、阴性对照和阳性对照应从提取 DNA 开始就分别提取作为平行样。各平行对照间的结果应一致, 空白、阴性对照、阳性对照应出现预期结果, 那么样品的检测结果才具可靠性。

另外, 无论死菌活菌, 只要 DNA 没有降解, PCR 的结果都会出现阳性。对于非致病性副溶血性弧菌高估其阳性检测率势必高估载体样品的食品安全风险情况。本研究采取的方法是: 利用副溶血性弧菌是需氧菌的特点, 采取 36 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养方法, 尽量靠近液面吸取菌液以提取 DNA, 这样获得的扩增结果大多数是活菌的检测结果, 可降低一部分死菌造成的阳性率。对于致病性副溶血性弧菌, 无论死菌活菌检测出致病基因都具有非常重要的监控和诊断意义, 因为菌失活了其产生的毒素还可能依然存在, 特别是 *tdh* 是耐热性溶血毒素^[7-10]。

3.4 关于多重 PCR 技术的讨论

多重 PCR 是在同一个 PCR 反应管中加入多对引物, 同时检测多种目标基因的 PCR 方法^[21-25]。三重 PCR 是多重 PCR 的一种, 即检测 3 种目标基因的 PCR 方法^[22]。多重 PCR 的运用, 在节约试剂

成本、缩短检测时间以及高效产出几个检测结果等方面都大大具有优势,值得在检测领域中推广,但是寻找多重 PCR 特别是三重以上 PCR 引物间最佳配伍的反应条件却是艰难且无规律可循的^[21-25]。

本研究起初是对多个基因片段设计了多对引物,同时参照已报道的引物,根据单重梯度 PCR 的检测结果挑选可以工作的引物,并在理论上排除引物间相互作用和扩增片段大小重叠的情况后,进行不同对引物间的组合。之后,再通过梯度 PCR 找到适合几对引物同时工作的反应温度,调节引物间的比例关系,才找到最佳反应条件的。优化反应条件的工作量非常大,幸而结合 Eppendorf mastercycler ep gradient 96 PCR 仪和全自动毛细管电泳分析系统(QIAGEN)的运用才使得寻找引物间配伍的反应条件相对快速和轻松。另外,本研究使用包含了 dNTP、Mg²⁺和 Taq 酶在内的 PCR 反应预混液(Pemix Taq Version 2.0),无需再优化这些固有的试剂配比,只需每次吸取需要量,加入引物组合,混匀分液,再加入模板即可,因而反应的重复性和稳定性能够有所保障。

本研究找到的引物配伍其实不止本文提供的这一组,考虑到本文采用的 *gyrase*、*tdh* 和 *trh* 引物的序列来自于行标和 FDA 国际标准,只要扩增出预期大小的片段就无需再验证扩增产物是否为目标片段,否则还需进行胶回收再测序的验证过程。本研究所做的工作是将这几对公认好用的引物放在一个反应里,找到他们的配伍关系和反应条件,这是本研究的努力与创新之处。

多重 PCR 基于能同时检测不少目标基因的优势已经扩展到很多领域^[26-27],甚至还有多重荧光 PCR 方法^[28]。虽然基因杂交芯片能检测更多目标基因^[29],但其杂交过程相对繁琐、成本相对较高、检测时间也不可能在 2 h 内完成^[29],因此当检测项目在 4 个以内,采用多重 PCR 方法更具优势。创立各种实用性极强的多重 PCR 检测方法,将使得检测和鉴定的手段更加便捷和多元化。

总而言之,本研究的三重 PCR 方法不论是用于疑似副溶血性弧菌污染的食品检验还是诊断腹泻患者是否感染副溶血性弧菌,相对传统培养方法而言都是一个简便、快速和有效的检测方法。

参考文献

- [1] 孟昭赫,刘宏道,何晓青,等. 食品卫生检测方法注解 微生物学部分[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 179.
- [2] 石椿丽. 从进境的海产品中检出副溶血性弧菌[J]. 福建畜牧兽医, 2010, 32(3): 4-5.
- [3] 何玉芳,裘伟康,郭智成,等. 杭州市不同样品中副溶血性弧菌污染状况检测[J]. 中国公共卫生, 2007, 22(6): 745-746.
- [4] Nordstrom JL, Vickery MC, Blackstone GM, 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 oysters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(18): 5840-5847.
- [5] Miyamoto Y, Kato T, Obara Y, et al. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. 3. Enteropathogenicity[J]. Japanese Journal of Medical Science and Biology, 1968, 21(5): 325-331.
- [6] 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 Immunology and Medical Microbiology, 2006, 46(2): 180-186.
- [7] Wang HP, Zhang JL, Jiang T, et al. Insufficiency of the kamagawa hemolytic test for detecting pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Shanghai, China[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2011, 69(1): 7-11.
- [8] 岳友宏,苏良. 双重 PCR 检测副溶血性弧菌的 *tlh* 和 *tdh* 基因方法建立与初步应用[J]. 实用预防医学, 2012, 19(9): 1413-1415.
- [9] 史煜曼,陈少青,翁奕敏,等. 实时荧光 PCR 检测水产品中副溶血性弧菌[J]. 中国微生态学杂志, 2009(7): 624-625.
- [10] 宁喜斌,刘代新,张继伦. 副溶血性弧菌的致病性及其快速检测[J]. 微生物与感染, 2008, 35(3): 53-55.
- [11] 中华人民共和国卫生部中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.7-2008. 食品微生物学检测 副溶血性弧菌检测[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [12] ISO/TS 21872-1-2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*[S]. First edition. Switzerland: ISO Publishing Company, 2007.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 26426-2010. 饲料中副溶血性弧菌的检测[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 0173-2010. 进出口食品中副溶血性弧菌检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2424-2010. 进出口食品中副溶血性弧菌快速及鉴定检测方法 实时荧光 PCR 方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2754.5-2011. 出口食品中致病菌环介导恒温扩增(LAMP)检测方法 第5部分: 副溶血性弧菌[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [17] FDA. 2004 Bacteriological Analytical Manual Online Chapter 9[S]. Seventh Edition. American: Food and Drug Administration, 2004.
- [18] 吕淑霞, 祝儒刚, 刘月萍, 等. 扩增内标在副溶血弧菌多重 PCR 检测方法中的应用[J]. 沈阳农业大学学报, 2010, 41(6): 701-705.
- [19] 何晓华, 史贤明. 扩增内标及其在食源性致病菌 PCR 检测中的应用[J]. 微生物学报, 2010, 50(2): 141-147.
- [20] 刘斌, 史贤明. 扩增内标在沙门氏菌 PCR 检测方法中的应用[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 156-161.
- [21] 马保臣, 秦卓明, 蔡玉梅, 等. 多重 PCR 检测奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、停乳链球菌和酵母菌方法的建立与应用[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(11): 1202-1208.
- [22] 钟金栋, 花群义, 肖荣海, 等. 多重 PCR 同时检测口蹄疫病毒、猪水疱病病毒和水疱性口炎病毒[J]. 动物医学进展, 2006, 27(7): 55-58.
- [23] 黄金林, 潘志明, 颜卫, 等. 沙门菌、产单核细胞李斯特菌多重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(12): 1121-1123.
- [24] 杨少华, 柴同杰. 利用多重 PCR 检测兔肠致病性和魏氏梭菌的毒力基因[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(2): 228-231.
- [25] 唐文志, 周玉球, 张永良, 等. 单管多重 PCR 快速检测 STD 病原菌[J]. 现代检测医学杂志, 2006, 21(2): 26-28.
- [26] 何英, 吴正林, 吴润香, 等. 多重 PCR 技术检测病毒性肝炎相关病毒的研究[J]. 中国热带医学, 2011(5): 536-539.
- [27] 陈文炳, 李寿崧, 邵碧英, 等. 应用多重 PCR 检测食品中 SARS 靶基因的初步研究[J]. 中国食品学报, 2005, 5(3): 73-74.
- [28] 金大智, 张政, 罗芸, 等. 多重荧光定量 PCR 甄别3种霍乱弧菌相关毒素基因[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(12): 1065-1070.
- [29] 龙元海, 曾涛, 过玮, 等. 重要肠道病原菌多重 PCR 基因芯片检测方法研究[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(12): 79-84.

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, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与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。

本刊为中国自然科学核心期刊。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, 被选入新闻出版总署设立的“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, 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, 2014年每册定价58元, 全年696元, 我们将免邮费寄刊。

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: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413