

副溶血弧菌 EMA-PCR 检测技术的建立

伦镜盛¹ 夏常艳¹ 罗鹏² 梁嘉明¹ 黄通旺^{1*} 胡忠^{1*}

(1. 汕头大学生物系 广东 汕头 515063)

(2. 中国科学院南海海洋研究所 广东 广州 510301)

摘要: PCR 技术被广泛应用于副溶血弧菌的检测中, 但传统的 PCR 技术无法区分样品中的死细菌与活细菌, 往往使检测结果出现较高的假阳性。因此, 将叠氮溴乙锭(Ethidium monoazide bromide, EMA)与 PCR 技术结合, 建立一种快速、准确的副溶血弧菌检测方法。以 *dnaJ* 基因为检测副溶血弧菌的靶基因, 分别用副溶血弧菌的纯培养细胞及其基因组 DNA 作模板进行 PCR 检测, 灵敏度分别为 2.5×10^4 CFU/mL 和 6×10^2 fg/ μ L。在检测样品前处理过程中加入 EMA, 当 EMA 的浓度小于 5 mg/L 时, EMA 对活菌靶基因的扩增没有明显的抑制; 而终浓度为 2 mg/L 的 EMA, 能有效抑制 1×10^8 CFU/mL 副溶血弧菌死菌的扩增。活菌和死菌混合体系的 PCR 结果表明, EMA-PCR 能有效降低副溶血弧菌检测过程中的假阳性。

关键词: 副溶血弧菌, EMA-PCR, 死菌与活菌

Establishment of EMA-PCR detection method of *Vibrio parahaemolyticus*

LUN Jing-Sheng¹ XIA Chang-Yan¹ LUO Peng² LIANG Jia-Ming¹
HUANG Tong-Wang^{1*} HU Zhong^{1*}

(1. Department of Biology, Shantou University, Shantou, Guangdong 515063, China)

(2. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

Abstract: PCR technology has been widely used in the detection of *Vibrio parahaemolyticus*. However, traditional PCR appeared higher false-positive result because of the lack of differentiation between DNA from viable and dead microorganisms. Therefore, Ethidium Monoazide Bromide (EMA) was added in the process of PCR to establish a rapid and accurate detection method of *V. parahaemolyticus*. The *dnaJ* gene was used as the target gene for PCR detection of *V. parahaemolyticus* by utilizing its pure isolates and genomic DNA as the template, and the sensitivity was 2.5×10^4 CFU/mL and 6×10^2 fg/ μ L respectively. The use of 5 mg/L or less EMA did not inhibit the PCR amplification of DNA derived from viable bacteria. The PCR amplification of DNA derived from 1×10^8 CFU/mL *V. parahaemolyticus* dead cells can be

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2006B20501008, 2009B020309007); 广东省海洋渔业科技推广项目(No. A200901H06)

* 通讯作者: Tel: 86-754-82902081; ✉ twhuang@stu.edu.cn, hzh@stu.edu.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>
收稿日期: 2010-10-10; 接受日期: 2011-01-05

inhibited by 2 mg/L EMA. The results show that EMA-PCR can be used to minimize the false-positive results by inhibiting the PCR amplification of *V. parahaemolyticus* dead cells from a mixed bacterial population.

Keywords: *V. parahaemolyticus*, EMA-PCR, Viable and dead bacteria

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)是一种广泛存在于海洋环境中的嗜盐畏酸的人类致病菌。这种生物体通常能在各种生的海产中分离出来,特别是甲壳类动物。食用受副溶血弧菌污染的生的或半生的海产品会导致人们患上急性肠胃炎,症状有腹泻、头痛、呕吐、反胃和腹部绞痛^[1]。随着 PCR 技术的普及,基于 PCR 技术的检测方法被越来越多地应用于弧菌检测中,但传统的 PCR 技术无法区分样品中的死细菌与活细菌,往往使检测结果出现较高的假阳性^[2]。Rudi 等研究表明,叠氮溴化乙锭(Ethidium monoazide bromide, EMA)能穿过死细菌的细胞膜与基因组 DNA 结合,“屏蔽”死细菌和游离状态的 DNA,使其不能作为模板进行 PCR 扩增,从而大大提高了检测的准确性^[3]。本文旨在考察 EMA 在 PCR 过程中对副溶血弧菌死细菌和活细菌的影响,以探讨 EMA-PCR 技术应用于副溶血弧菌检测的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株: 副溶血弧菌 VPL4-90、溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus*、哈维氏弧菌 *V. harveyi*、河弧菌 *V. fluvialis*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 由实验室保存,用于验证副溶血弧菌引物的特异性。

试剂: 叠氮溴乙锭(Ethidium monoazide bromide, EMA, Biotium, USA), 购于海德创业(北京)生物科技有限公司。PCR TaqMix, 100 bp Marker 购于广州东盛生物科技有限公司。其余化学试剂均为国产分析纯。

仪器: PCR 仪(T-Gradient, Biometra, Germany), 凝胶成像系统(Gene Genius, Syngene, USA), 核酸蛋白检测仪(BioPhotometer, Eppendorf, Germany)。

1.2 副溶血弧菌活菌和死菌的制备

从 LB 平板中挑取副溶血弧菌 VPL4-90 单菌落,接种于 20 mL LB 液体培养基中,摇床培养(37 °C, 150 r/min)至 OD_{600} 约为 0.6,离心(6 000 r/min, 4 °C, 5 min)收集菌体沉淀,加入无菌生理盐水重悬沉淀制成活菌悬液(细胞密度约为 1×10^8 CFU/mL)。再将活菌悬液(1×10^8 CFU/mL) 95 °C 水浴 5 min,得到副溶血弧菌死菌悬液。另外,将死菌在 LB 平板上划线,于 37 °C 培养 24 h,以验证其灭活效果。

1.3 副溶血弧菌特异性检测引物及 PCR 条件

根据 Nhung 等的报道^[4],使用 *dnaJ* 基因引物(VP-*dnaJF*: 5'-CAGGTTTGYTGCACGGCGAAGA-3'; VP-*dnaJR*: 5'-TGCGAAGAAAGGCTCATCAGAG-3')作为副溶血弧菌的特异性检测引物,引物由北京赛百盛生物工程公司合成。PCR 反应体系: 2×PCR TaqMix 7.5 μL, 引物各 1 μL (终浓度 1 μmol/L), DNA 模板 1 μL, 最后加无菌去离子水补足至 15 μL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。电泳条带的光密度使用凝胶分析软件 Quantity One 4.6.2 中的 Density Tools (BIORAD, USA)进行分析。

1.4 EMA-PCR 样品的前处理

用无水乙醇配制 100 mg/L 的 EMA 母液, -20 °C 遮光保存。在样品中各加入所需浓度的 EMA, 室温避光处理 10 min, 然后将样品置冰上, 用碘钨灯(欧司朗, 500 W)在 20 cm 的距离处照射 10 min 使 EMA 光解。样品 6 000 r/min 离心 5 min 后加 10 μL 去离子水重悬细胞沉淀, 100 °C 水浴 5 min, 冷却至室温, 12 000 r/min、5 min 离心后取 1 μL 上清作为模板进行 PCR 扩增(PCR 引物及条件见 1.3)。

1.5 不抑制 PCR 反应的最大 EMA 浓度的确定

在含有 0.5 mL (1×10^8 CFU/mL)菌悬液的离心管中加入一定量的 EMA 母液(100 mg/L), 使其终浓度分别为 2、3、4、5、10 和 20 mg/L, 再按 1.4 的方

法进行样品处理和 PCR 产物检测。

1.6 抑制死菌 PCR 反应的最小 EMA 浓度的确定

在含有 0.5 mL 死菌悬液(1×10^8 CFU/mL)的离心管中加入一定量的 EMA 母液(100 mg/L), 使其终浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 mg/L, 再按 1.4 的方法进行样品处理和 PCR 产物检测。

1.7 EMA-PCR 对副溶血弧菌活菌/死菌混合物的检测

分别取副溶血弧菌活菌和死菌进行梯度稀释, 按表 1 所示比例进行混合。混合后把菌液分成对照组和实验组, 在对照组中不加入 EMA, 而在实验组中加入终浓度为 2 mg/L 的 EMA, 再按 1.4 的方法进行样品处理和 PCR 产物检测。

表 1 混合体系中死菌与活菌的比例
Table 1 The proportion of viable cells and dead cells in mixed system

	N	P	1	2	3	4	5	6	7	8
活菌 Viable cells (CFU/mL)			1×10^8	5×10^7	1×10^7	5×10^6	1×10^6	5×10^5	1×10^5	5×10^4
死菌 Dead cells (CFU/mL)	空白 对照	阳性 对照	5×10^4	1×10^5	5×10^5	1×10^6	5×10^6	1×10^7	5×10^7	1×10^8
活菌/死菌 Viable cells/Dead cells			2 000	500	20	5	0.2	0.05	0.002	0.000 5

2 结果与分析

2.1 副溶血弧菌 PCR 检测引物灵敏度和特异性分析

以 *dnaJ* 基因为检测副溶血弧菌的靶基因, PCR 反应能扩增出 96 bp 的产物, 如图 1 所示。分别将副溶血弧菌的纯培养细胞和基因组 DNA 按 10 倍梯度稀释, 取 1 μ L 作为 PCR 反应的模板; 结果显示, 副溶血弧菌纯培养细胞的检测灵敏度为 2.5×10^4 CFU/mL, 见图 1A, 而 DNA 的检测灵敏度为 6×10^2 fg/ μ L, 见图 1B。另外, 引物特异性检测结果显示, 只有副溶血弧菌的 PCR 扩增结果为阳性, 其它弧菌和非弧菌则为阴性, 说明引物具有特异性, 见图 1C。

2.2 副溶血弧菌 EMA-PCR 检测体系中 EMA 浓度的优化

当 PCR 反应体系中的 EMA 浓度小于 5 mg/L (包括 5 mg/L) 时, EMA 对活菌靶基因的扩增没有明显的抑制, 而当 EMA 浓度为 10 mg/L 时, PCR 反应表现出显著的抑制($P < 0.05$)。因此, 当活菌为 1×10^8 CFU/mL 时, 不抑制 PCR 反应的最大 EMA 浓度确定为 5 mg/L, 见图 2A。另外, 副溶血弧菌死菌 (1×10^8 CFU/mL) 的 EMA-PCR 结果显示, 当 EMA

的浓度大于 2 mg/L 时, 能有效抑制死菌的 PCR 反应 ($P < 0.01$), 当继续增加 EMA 浓度时(大于 2 mg/L), 其抑制效果没有明显的提高, 见图 2B。因此, 抑制副溶血弧菌死菌 PCR 反应的最小 EMA 浓度为 2 mg/L。

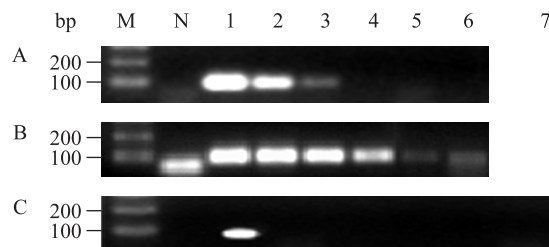


图 1 副溶血弧菌 PCR 检测引物的分析

Fig. 1 The analysis of *V. parahaemolyticus* detection primers

注: M: 100 bp marker; N: 空白对照。A: 以副溶血弧菌纯培养细胞为 PCR 模板, 1-6 菌液浓度分别为 2.5×10^6 – 2.5×10^1 CFU/mL; B: 以副溶血弧菌基因组 DNA 为 PCR 模板, 1-6 DNA 浓度分别为 6×10^7 – 6×10^2 fg/ μ L; C: 1-7 分别为副溶血弧菌、溶藻酸弧菌、河弧菌、哈维氏弧菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌。

Note: M: 100 bp marker; N: Negative control. A: Used *V. parahaemolyticus* pure isolates as the PCR template, the cells concentration of lanes 1-6 was 2.5×10^6 – 2.5×10^1 CFU/mL respectively; B: Used *V. parahaemolyticus* genomic DNA as the PCR template, the DNA concentration of lanes 1-6 was 6×10^7 – 6×10^2 fg/ μ L respectively; C: Lanes 1-7 was *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *E. coli*, *B. subtilis* and *S. aureus* respectively.

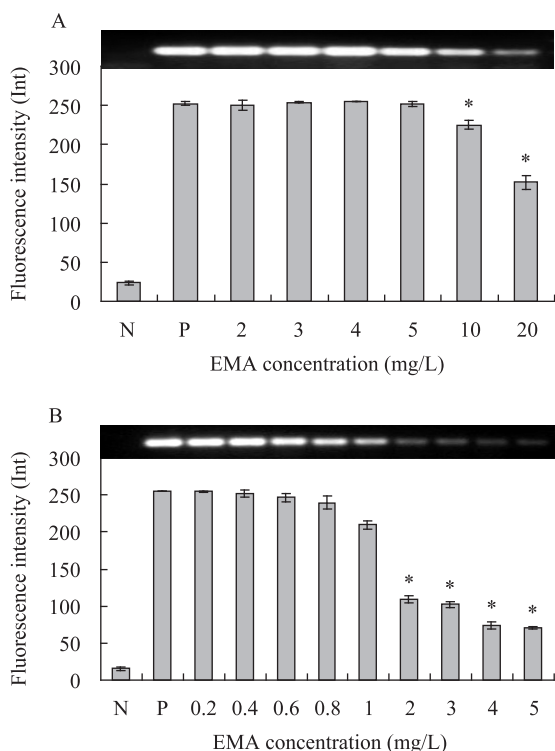


图2 副溶血弧菌 EMA-PCR 检测体系中 EMA 浓度的优化

Fig. 2 The optimization of EMA concentration

注: N: 空白对照; P: 阳性对照。A: EMA 浓度分别为 2、3、4、5、10 和 20 mg/L; B: EMA 浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1、2、3、4 和 5 mg/L。*: 与阳性对照比差异显著($P < 0.05$)。

Note: N: Negative control; P: Positive control. A: Varying concentrations of EMA (2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L and 20 mg/L respectively); B: Varying concentrations of EMA (0.2 mg/L, 0.4 mg/L, 0.6 mg/L, 0.8 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L and 5 mg/L respectively). *: The difference was significant ($P < 0.05$).

2.3 EMA-PCR 对副溶血弧菌活菌/死菌混合物的检测

如图 3A 所示, 对照组在不加入 EMA 的情况下, 死菌与活菌按不同比例混合后, 其 PCR 扩增的效果与阳性对照相比没有显著差异, 说明常规的 PCR 方法扩增无法将混合体系中的活菌区分出来。而在加入 EMA 的实验组中, 当混合体系中活细菌数较高时, PCR 扩增没有显著影响, 但当混合体系中死菌数较高时(活菌/死菌 < 0.05), PCR 扩增与阳性对照相比, 表现出显著的抑制作用($P < 0.05$), 见图 3B。此结果表明, EMA-PCR 能抑制混合体系中死菌扩增, 而不影响活菌扩增。

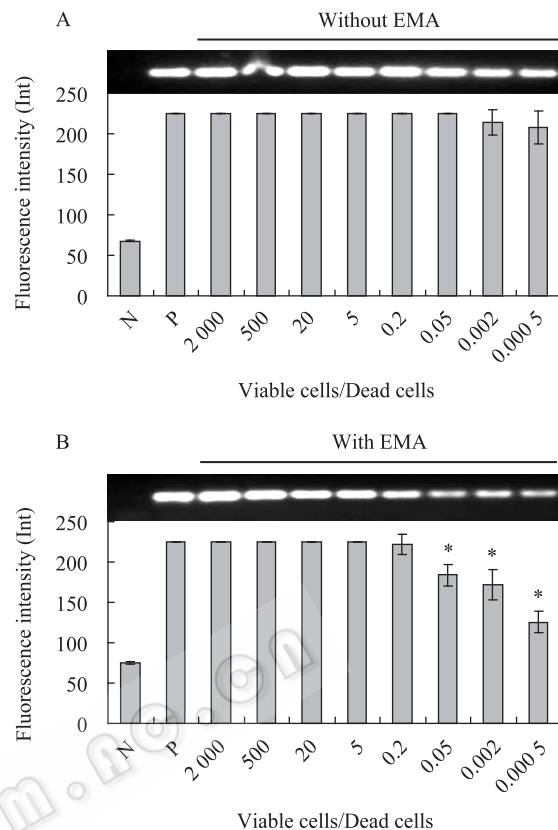


图3 EMA-PCR 对细菌混合物的检测

Fig. 3 The detection for mixed bacteria by EMA-PCR

注: N: 空白对照; P: 阳性对照; A: 在没有 EMA 的情况下, PCR 反应结果; B: 在加入 EMA 后, PCR 反应结果; *: 与阳性对照比差异显著($P < 0.05$)。

Note: N: Negative control; P: Positive control; A: PCR amplified without EMA; B: PCR amplified with EMA; *: The difference was significant ($P < 0.05$).

3 讨论

据统计, 副溶血弧菌暴发居微生物性食源性疾病暴发之首, 并且在近年来呈显著上升趋势^[5-6]。随着人民生活水平的提高和对外经贸的发展, 建立一个敏感、特异、准确的副溶血弧菌检测方法显得尤为重要。目前, 对副溶血弧菌的检测仍以传统的选择性培养基分离培养及鉴定为主, 操作繁琐、耗时。随着 PCR 和 Real-time PCR 技术的发展及普及, 这两项技术越来越多地被用于副溶血弧菌的检测。但这种基于核酸检测的技术难以区分样品中的死菌和活菌, 检测结果的假阳性往往较高, 这一问题严重限制了这类技术的应用^[7]。EMA 是上世纪 70 年代

发现的一种核酸荧光染料^[8]。Rudi 等发现 EMA 能选择性地与游离的 DNA 结合, 或者穿过死细菌的细胞膜与基因组 DNA 结合, 使其不能作为模板进行 PCR 扩增, 因而能降低 PCR 过程中由于游离 DNA 和死菌 DNA 造成的假阳性^[3]。目前, EMA 与 PCR、Real-time PCR 等技术结合, 已经被应用于创伤弧菌、军团杆菌、沙门氏菌等病原菌的检测, 以提高检测的准确性^[9-13]。

在弧菌属中, *dnaJ* 基因与 *reca*、*rpoa* 等持家基因相比, 序列保守性更低, 可作为弧菌鉴别的新工具^[14]。本研究利用 *dnaJ* 基因作为检测副溶血弧菌的靶基因, 不仅具有良好的特异性, 而且以副溶血弧菌纯培养细胞和基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 其检测的灵敏度分别达到了 2.5×10^4 CFU/mL 和 6×10^2 fg/ μ L。本文初步研究了 EMA 对副溶血弧菌死菌的抑制作用, 发现在样品前处理过程中加入终浓度为 2 mg/L 的 EMA, 能有效抑制副溶血弧菌死菌(1×10^8 CFU/mL)的扩增; 而在 EMA 浓度小于或等于 5 mg/L 时, 对副溶血弧菌活菌的 PCR 扩增没有显著的影响。另外, 在副溶血弧菌活菌/死菌混合体系中, 由于在活菌/死菌比例不同的混合组中, 副溶血弧菌的 DNA 含量相对固定, 因此, 常规的 PCR 反应所扩展出来的条带, 其光密度没有显著差异; 而当加入 EMA 后, 在死菌比例较高的混合组中, 由于死菌的 DNA 受到 EMA 的抑制, 能作为 PCR 模板的 DNA 含量相对减少, 因此, 与常规 PCR 反应相比, 扩展条带的光密度显著降低, 说明 EMA 能特异性地抑制混合体系中死菌的扩增。

本文建立的 EMA-PCR 检测技术, 能抑制副溶血弧菌 PCR 过程中死菌的扩增, 弥补了常规 PCR 无法区分活菌、死菌这一技术上的不足, 能使 PCR 检测过程中由于死菌含量过高造成的假阳性降低, 具有一定的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Su YC, Liu CC. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety[J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 549-558.
- [2] Nocker A, Camper AK. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1997-2004.
- [3] Rudi K, Moen B, Drømtorp SM, et al. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 1018-1024.
- [4] Nhung PH, Ohkusu K, Miyasaka J, et al. Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to *dnaJ* gene[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2007, 59(3): 271-275.
- [5] 刘秀梅, 陈艳, 王晓英, 等. 1992-2001 年食源性疾病暴发资料分析-国家食源性疾病预防网[J]. 卫生研究, 2004, 33(6): 729-731.
- [6] 刘秀梅, 程苏云, 陈艳, 等. 2003 年中国部分沿海地区零售海产品中副溶血性弧菌污染状况的主动监测[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 97-99.
- [7] Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 53: 175-183.
- [8] Boltont PH, Kearns DR. Spectroscopic properties of ethidium monoazide: a fluorescent photoaffinity label for nucleic acids[J]. Nucleic Acids Research, 1978, 5(12): 4891-4903.
- [9] Lee JL, Levin RE. Use of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead mixed bacterial flora from fish fillets by polymerase chain reaction[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67(3): 456-462.
- [10] Wang SS, Levin RE. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 64(1): 1-8.
- [11] Lee JL, Levin RE. Discrimination of viable and dead *Vibrio vulnificus* after refrigerated and frozen storage using EMA, sodium deoxycholate and real-time PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 79(2): 184-188.
- [12] Chang B, Sugiyama K, Taguri T, et al. Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/Real-Time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(1): 147-153.
- [13] 鲁玉侠, 郭祀远, 石磊, 等. EMA-LAMP 方法快速检测死/活的食源性沙门氏菌[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 324-327.
- [14] Nhung PH, Shah MM, Ohkusu K, et al. The *dnaJ* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2007, 30(4): 309-315.