

## 四重 PCR 检测副溶血性弧菌及其毒力基因方法的建立

林佳琪<sup>1</sup> 苏国成<sup>1,2</sup> 黄建炜<sup>3</sup> 陈泽辉<sup>3</sup> 周常义<sup>1,2\*</sup>

(1. 集美大学食品与生物工程学院 福建 厦门 361021)

(2. 厦门市食品科技研发检测中心 福建 厦门 361021)

(3. 厦门市疾病预防控制中心 福建 厦门 361021)

**摘要:**【目的】建立同时检测副溶血性弧菌 *toxR*、*tdh*、*trh*、*tlh* 基因的四重 PCR 快速检测方法。【方法】分别以副溶血性弧菌的 *toxR*、*tdh*、*trh*、*tlh* 4 个基因为靶基因, 设计 4 对特异性引物, 对 4 对引物浓度和退火温度进行优化, 获得最佳引物比例和扩增条件, 建立快速检测致病性副溶血性弧菌的四重 PCR 体系。通过特异性验证、灵敏度验证以及模拟样品检测进行方法确认。【结果】四重 PCR 体系扩增条带与预期相符, 即 115 bp (*toxR*)、244 bp (*tdh*)、418 bp (*trh*)、759 bp (*tlh*) 4 个目的条带; 用 74 株副溶血性弧菌和 37 株非目标菌的测试结果表明, 所建立的方法有良好的特异性。该方法对模板 DNA 的检测灵敏度为 50 µg/L, 纯培养物的检测灵敏度为  $6.7 \times 10^3$  CFU/mL; 副溶血性弧菌含量为 1.36 CFU/g 的人工模拟样品增菌 6 h 后, *toxR*、*tlh*、*tdh*、*trh* 4 个基因可同时被检出。【结论】该方法可实现同时检测携带 *toxR*、*tdh*、*trh*、*tlh* 4 种基因的副溶血性弧菌, 对开展致病性副溶血性弧菌的检测研究具有一定现实意义。

**关键词:** 副溶血性弧菌, 四重 PCR, *toxR* 基因, *tdh* 基因, *trh* 基因, *tlh* 基因

Establishment of a quadruple PCR method for detecting pathogenic genes in *Vibrio parahaemolyticus*LIN Jia-Qi<sup>1</sup> SU Guo-Cheng<sup>1,2</sup> HUANG Jian-Wei<sup>3</sup> CHEN Ze-Hui<sup>3</sup> ZHOU Chang-Yi<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Food and Bioengineering, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

(2. Xiamen Food Research and Inspection Centre, Xiamen, Fujian 361021, China)

(3. Xiamen Centre for Disease Control and Prevention, Xiamen, Fujian 361021, China)

**Abstract:** [Objective] This study aimed at establishment of a rapid specific quadruple PCR assay for detecting *Vibrio parahaemolyticus* and its virulence genes. [Methods] Four pairs of primers were designed based on *toxR*, *tdh*, *trh* and *tlh* genes sequences of *V. parahaemolyticus*. Optimized the concentration of four pairs of primers and the annealing temperature to obtain the best ratio of primer and amplification conditions, the rapid quadruple PCR detection of pathogenic *V. parahaemolyticus* was established. The specificity and sensitivity of the quadruple PCR method were also evaluated.

**Foundation item:** Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2015J01614); Marine Economy Innovation Development Regional Demonstration Foundation of Xiamen (No.13PZP002SF24)

\*Corresponding author: Tel: 86-592-6181487; E-mail: chyizhou@163.com

Received: December 27, 2015; Accepted: May 23, 2016; Published online (www.cnki.net): May 24, 2016

基金项目: 福建省自然科学基金项目(No. 2015J01614); 厦门市海洋经济创新发展区域示范项目(No.13PZP002SF24)

\*通讯作者: Tel: 86-592-6181487; E-mail: chyizhou@163.com

收稿日期: 2015-12-27; 接受日期: 2016-05-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-24

**[Results]** The expected sizes of amplification bands were 115 bp, 244 bp, 418 bp and 759 bp for *toxR*, *tdh*, *trh* and *tlh*, respectively. The highly specificity of this method was evaluated by using 74 *V. parahaemolyticus* strains and 37 non-targeted bacteria. The detection limits of the multiplex PCR for DNA was 50 µg/L. Detection sensitivity of *V. parahaemolyticus* in pure culture condition was  $6.7 \times 10^3$  CFU/mL. Four targeted fragments were detected in artificially contaminated seafood with 1.36 CFU/g *V. parahaemolyticus* after 6 h enrichment. **[Conclusion]** The multiplex-PCR method can simultaneously detect *V. parahaemolyticus* with *toxR*, *tdh*, *trh* and/or *tlh*. It is of certain significance to carry out the detection of pathogenic *V. parahaemolyticus*.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, Quadruple PCR, *toxR* gene, *tdh* gene, *trh* gene, *tlh* gene

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)是在海洋环境中自然存在的一种嗜盐革兰氏阴性细菌,能够在不同的盐度及不同的温度环境中生存<sup>[1-2]</sup>。它广泛存在于海口、江口以及浮游生物、鱼类、虾类、贝类等水产品中<sup>[3-4]</sup>,是沿海国家普遍存在的食源性致病菌之一<sup>[5-9]</sup>。副溶血性弧菌主要通过消费者摄入生的或未煮熟的海产品,引起发热、腹痛、腹泻、恶心、呕吐等急性胃肠炎症状,严重时甚至导致昏迷、休克和死亡。自然界中存在的副溶血性弧菌大部分是非致病的,仅有0.3%~5.0%携带有致病因子<sup>[10-11]</sup>。

我国从2014年6月1日开始采用新版GB 4789.7-2013,该标准中的检验程序依然需要采用传统培养法进行增菌、分离培养、生化鉴定、神奈川试验和血清学试验。整个检测过程存在工作量大、检测周期长、工作繁琐、操作和判定不容易、成本高等缺陷。行业标准SN/T 2424-2010、SN/T 2641-2010、SN/T 2564-2010以及SN/T 2754.5-2011采用分子生物学技术进行副溶血性弧菌的检测,但不能判断其携带致病基因类型。

多重PCR技术(Multiplex PCR)是在常规PCR基础上发展起来的一种高效快速的分子生物学技术,在一个反应体系中加入一对以上的引物,能够同时进行扩增并得到不同的目的片段,既简化了工作流程、降低实验成本,又能快速、有效地达到大量样本的分析与鉴定。本研究在前期对临床致病副溶血性弧菌的研究基础上,选取副溶血性弧菌的*toxR*、*tdh*、*trh*、*tlh*基因,设计4对特异性引物,通过优化引物浓度和比例及退火温度等条件,建立在同一PCR反应体系中同时扩增*toxR*、*tdh*、*trh*、*tlh*4种目标基因的四重PCR方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

32株致病性副溶血性弧菌由厦门市疾病预防控制中心提供,均为食物中毒分离株,菌株编号为VP1-VP8、VP42、VP60、VP64、VP67-VP71、VP75、VP87-VP93、VP170、VP171、VP183-VP187、VP2011029;41株副溶血性弧菌菌株,本实验室从食品或环境中分离并保存的菌株,菌株编号为VPS201306、VPS201307、VPZ1432-VPZ1444、VPZ1451-VPZ1465、VPZ1539、VPZ1550、VPZ1555、VPH1602-VPH1609;1株标准菌株副溶血性弧菌(ATCC 17802)由厦门市食品科技研发检测中心提供。

22株非副溶血性弧菌,分别为溶藻弧菌、河弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌、弗氏弧菌、哈维弧菌、非O1型霍乱弧菌、鳗弧菌、嗜水气单胞菌、发光杆菌和嗜盐单胞菌,为本实验室保存菌株。

15株非副溶血性弧菌标准菌株,分别为金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、大肠埃希氏菌(ATCC 25922)、大肠埃希氏菌O157:H7(NCTC 12900)、乙型溶血性链球菌(ATCC 21059)、产气肠杆菌(ATCC 13048)、甲型副伤寒沙门菌(CMCC(B)50093)、乙型副伤寒沙门菌(CMCC(B)50094)、鼠伤寒沙门氏菌(ATCC 14028)、小肠结肠炎耶尔森氏菌[CMCC(B)52204]、单增李斯特菌(ATCC 19115)、伊氏李斯特菌(STCC 19119)、英诺克李斯特菌(ATCC 33090)、阪崎肠杆菌(ATCC 29544)、粪链球菌(ATCC 29212)、宋内志贺氏菌[CMCC(B) 51592],由厦门市食品科技研发检测中心提供。

## 1.2 主要试剂和仪器

DNA 基因组提取试剂盒、DNA Marker, 购自天根生化科技(北京)有限公司; Multiplex PCR Assay Kit Ver.2, 购自宝生物工程(大连)有限公司; 琼脂糖 Biowest Agarose G-10, 购自西班牙 Biowest 公司; GelStain 购自北京全式金生物技术有限公司。

LifeEco 基因扩增仪, BIOER 公司; 微量紫外分光光度计 Q5000, Quawell 公司; 凝胶成像仪 GenoSens1860, 上海勤翔科学仪器有限公司; 掌上离心机 D1008E, SCIOLOGEX 公司; 水平电泳槽、Power B 基础型电泳电源, 北京凯元信瑞仪器有限公司。

## 1.3 培养基

弧菌培养基 3% NaCl-APW、TCBS, 参照 GB4789.7-2013 配制; 其他菌培养基为常规培养基, 均购自广东环凯微生物科技有限公司。

## 1.4 引物设计与合成

利用分子信息学方法, 根据 NCBI 上 GenBank 中已发表的副溶血性弧菌的跨膜调控蛋白 R 基因 (Transmembrane regulatory protein R, *toxR*)、耐热直接溶血毒素基因 (Thermostable direct hemolysin, *tdh*)、耐热直接溶血毒素相关毒素基因 (Thermostable direct haemolysin-related haemolysin, *trh*)、不耐热溶血毒素基因 (Thermolabile hemolysin, *tlh*) 序列, 采用 DNAMAN 软件中的 Alignment 进行多序列比对, 确定各序列的保守片段, 利用 Primer Premier 5.0 设计引物, 利用 MFEprimer-2.0 在线软件进行引物间二聚体验证, 利用 BLAST 进行引物特异性验证。引物由上海英潍捷基公司合成(表 1)。

## 1.5 基因组 DNA 的制备

使用基因组 DNA 提取试剂盒进行副溶血性弧菌 DNA 提取, 测量 DNA 含量, 并用 TE 溶液稀释至 50 mg/L, 将所提取的基因组 DNA 置于 -20 °C 保存。

## 1.6 纯菌悬液 DNA 模板的提取

无菌条件下取副溶血性弧菌单菌落接种于 3%

表 1 引物序列及扩增产物大小

Table 1 Primer sequence and amplicon size

Target gene	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)
<i>toxR</i>	<i>vp<sub>toxR</sub></i> -2f	GTTCCAAAACGAGGCTATCA	115
	<i>vp<sub>toxR</sub></i> -2r	CAGAGGCGTCAATGTAATCAG	
<i>tdh</i>	<i>vp<sub>tdh</sub></i> -1f	CTTCCATCTGTCCCTTTTCC	244
	<i>vp<sub>tdh</sub></i> -1r	CCGCTGCCATGTATAGTCT	
<i>trh</i>	<i>vp<sub>trh</sub></i> -3f	TTTCCTTCTCTGGTTCCG	418
	<i>vp<sub>trh</sub></i> -3r	TATGTCCATTGCCGCTCT	
<i>tlh</i>	<i>vp<sub>tlh</sub></i> -4f	CGAAGAGCCAACCTTATCA	759
	<i>vp<sub>tlh</sub></i> -4r	TCCGTCAAACGAATCAGTG	

NaCl-APW 中, 37 °C、200 r/min 条件下培养 6 h。用无菌生理盐水对菌液进行 10 倍梯度稀释, 选择合适稀释度的菌悬液于 TCBS 平板上计数。将各稀释度的菌悬液各取 1 mL, 12 000 r/min 离心 5 min 后去上清, 用无菌生理盐水重悬至 1/10 原体积, 100 °C 沸水水浴 10 min, 使细菌细胞裂解, 然后立即放入 4 °C 冷却 5 min, 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清备用。

## 1.7 四重 PCR 体系的建立

通过对单重 PCR 体系退火温度的优化, 以及多重 PCR 体系中各引物浓度、比例以及退火温度的优化, 反应体系 (50 μL PCR 体系) 包括: 2×Multiplex PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup>, dNTP plus) 25 μL, Multiplex PCR Enzyme Mix 0.3 μL, 模板 5 μL, *vp<sub>trh</sub>*-3f/3r、*vp<sub>tdh</sub>*-1f/1r、*vp<sub>toxR</sub>*-2f/2r、*vp<sub>tlh</sub>*-4f/4r 各 2 μL, 无菌 ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL, 其中 4 对上下游引物浓度和比例通过参数优化确定, 按 *trh*、*tdh*、*toxR*、*tlh* 顺序依次进行二重、三重、四重组。引物浓度分别为: *trh* 引物终浓度 0.4 μmol/L, *tdh* 引物终浓度 0.2、0.1、0.067、0.05、0.04、0.03 μmol/L, *toxR* 引物终浓度 0.2、0.16、0.12、0.08、0.06、0.04 μmol/L, *tlh* 引物终浓度 0.2、0.16、0.12、0.08、0.06、0.04 μmol/L。

PCR 反应条件: 94 °C 1 min; 94 °C 30 s, 46 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。取 8 μL 扩增产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 用凝胶成像仪进行观察拍照。

## 1.8 四重 PCR 体系灵敏度试验

**1.8.1 基因组 DNA 的灵敏度检测:** 按 1.5 获得副溶血性弧菌基因组 DNA 溶液, 用无菌无核酸水将 DNA 溶液稀释至  $5.0 \times 10^4$ 、 $5.0 \times 10^3$ 、 $5.0 \times 10^2$ 、 $5.0 \times 10^1$ 、 $5.0 \times 10^0$ 、 $5.0 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/L}$ 。稀释后的各管 DNA 溶液作为模板进行四重 PCR 体系的灵敏度检测。

**1.8.2 纯培养菌液灵敏度检测:** 按 1.6 获得纯副溶血性弧菌各稀释度的菌悬液及 DNA 模板, 将菌悬液进行平板计数, 同时将 DNA 模板加入四重 PCR 体系, 根据平板计数结果和对应的四重 PCR 检测结果计算方法的细菌灵敏度。

## 1.9 四重 PCR 体系特异性试验

将所有副溶血性弧菌和非副溶血性弧菌菌株增菌后提取 DNA, 取 1  $\mu\text{L}$  进行四重 PCR 检测。

## 1.10 人工污染样品检测

取经过 GB 4789.7-2013 方法验证无副溶血性弧菌的牡蛎、对虾、鱿鱼、带鱼等样品, 无菌条件下称取 25 g 于均质杯中, 加入 225 mL 3% NaCl-APW 培养液, 由均质器进行均质制得匀浆。

添加 1.36 CFU/g 的溶血性弧菌悬液。同时以无菌生理盐水做空白对照, 得到不添加副溶血性弧菌的样品基质。将制备好的模拟样品置于 36  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 6 h 后, 各取 1 mL, 1 000 r/min 离心 10 min 取上清, 10 000 r/min 离心 10 min 去除上清, 用生理盐水洗涤 2 遍, 提取菌液 DNA 进行四重 PCR 检测。

## 2 结果

### 2.1 四重体系中的各单重 PCR 及四重 PCR 实验结果

对各目的片段进行单重梯度 PCR, 在 115、244、418、759 bp 处分别扩增出 *toxR*、*tdh*、*trh*、*tlh* 基因相应的目的条带。经过优化四重 PCR 体系的各引物浓度及其退火温度, 最终确定各对引物对的加入终浓度: *vp<sub>trh</sub>*-3f/3r 终浓度 0.4  $\mu\text{mol/L}$ 、*vp<sub>tdh</sub>*-1f/1r 终浓度 0.04  $\mu\text{mol/L}$ 、*vp<sub>toxR</sub>*-2f/2r 终浓度 0.08  $\mu\text{mol/L}$ 、*vp<sub>tlh</sub>*-4f/4r 终浓度 0.04  $\mu\text{mol/L}$  (图 1), 退火温度在 45–57.4  $^{\circ}\text{C}$  都能成功扩增出清晰的目的条带(图 2), 并且四重 PCR 体系的 4 个扩增条带与各单重 PCR 体系的 4 个扩增条带大小一致。

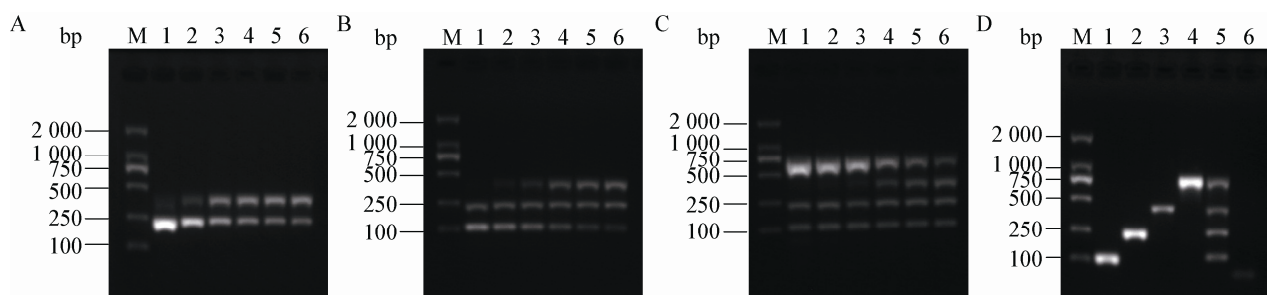


图 1 多重 PCR 引物浓度优化结果

Figure 1 Optimization results of different primers concentrations for multiple PCR

注: A: *trh*、*tdh* 基因双重 PCR 引物优化结果(M: D2000 DNA marker; 1–6: *trh* 引物浓度均为 0.4  $\mu\text{mol/L}$ , *tdh* 引物浓度依次为 0.2、0.1、0.067、0.05、0.04、0.03  $\mu\text{mol/L}$ ); B: *trh*、*tdh*、*toxR* 基因三重 PCR 引物浓度优化结果(M: D2000 DNA marker; 1–6: *trh* 引物浓度均为 0.4  $\mu\text{mol/L}$ , *tdh* 引物浓度均为 0.04  $\mu\text{mol/L}$ , *toxR* 引物浓度依次为 0.2、0.16、0.12、0.08、0.06、0.04  $\mu\text{mol/L}$ ); C: *trh*、*tdh*、*toxR*、*tlh* 基因四重 PCR 引物浓度优化结果(M: D2000 DNA marker; 1–6: *trh* 引物浓度均为 0.4  $\mu\text{mol/L}$ , *tdh* 引物浓度均为 0.04  $\mu\text{mol/L}$ , *toxR* 引物浓度均为 0.08  $\mu\text{mol/L}$ , *tlh* 引物浓度依次为 0.2、0.16、0.12、0.08、0.06、0.04  $\mu\text{mol/L}$ ); D: 各引物进行单重 PCR 以及四重 PCR 扩增结果(M: D2000 DNA marker; 1: *toxR* 单重 PCR 结果; 2: *tdh* 单重 PCR 结果; 3: *trh* 单重 PCR 结果; 4: *tlh* 单重 PCR 结果; 5: *toxR*、*tdh*、*trh*、*tlh* 四重 PCR 结果; 6: 空白对照)。

Note: A: Optimization results of primers concentration for duplex PCR (M: D2000 DNA marker; 1–6: *trh* (0.4  $\mu\text{mol/L}$ ), and the concentrations of *tdh* are 0.2, 0.1, 0.067, 0.05, 0.04, 0.03  $\mu\text{mol/L}$ ); B: Optimization results of primers concentration for triplex PCR (M: D2000 DNA marker; 1–6: *trh* (0.4  $\mu\text{mol/L}$ ), *tdh* (0.04  $\mu\text{mol/L}$ ) and the concentrations of *toxR* are 0.2, 0.16, 0.12, 0.08, 0.06, 0.04  $\mu\text{mol/L}$ ); C: Optimization results of primers concentration for quadruple PCR (M: D2000 DNA marker; 1–6: *trh* (0.4  $\mu\text{mol/L}$ ), *tdh* (0.04  $\mu\text{mol/L}$ ), *toxR* (0.08  $\mu\text{mol/L}$ ), and the concentrations of *tlh* are 0.2, 0.16, 0.12, 0.08, 0.06  $\mu\text{mol/L}$ , 0.04  $\mu\text{mol/L}$ ); D: Products of single PCR and multiplex-PCR (M: D2000 DNA marker; 1: Single PCR product of *toxR*; 2: Single PCR product of *tdh*; 3: Single PCR product of *trh*; 4: Single PCR product of *tlh*; 5: Multiplex-PCR products of *toxR*, *tdh*, *trh*, *tlh*; 6: Blank control).

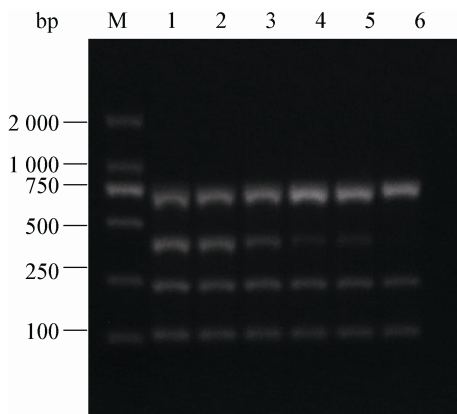


图 2 四重 PCR 退火温度优化结果  
Figure 2 Optimization results of annealing temperature for quadruple PCR  
Note: M: D2000 DNA marker; 1: 45.0 °C; 2: 46.0 °C; 3: 48.9 °C; 4: 53.5 °C; 5: 57.4 °C; 6: 59.6 °C.

2.2 四重 PCR 体系特异性试验结果

4 个基因的单重 PCR 及多重 PCR 产物电泳后, 将扩增产物送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。测序结果表明, 所建立的 4 个基因目的片段均得到了特异性扩增。对所有致病性副溶血性弧菌和其他非副溶血性弧菌进行多重 PCR 扩增。试验结果显示(表 2), VP1-22、VP42、VP60、VP75、VP2011029、VPZ1539、VPZ1550 和 VPH1604 携带 *tox*、*tdh*、*trh*、*tlh*、

VP87-93、VP64、VP170、VP171、PZ1555、Z1436 和 Z1440 携带 *toxR*、*tdh*、*trh*、*tlh*, VP67-71、VPS201306、VPS201307 和 ATCC 17802 携带 *toxR*、*trh*、*tlh*, VPZ1432、VPZ1434、VPZ1435、VPZ1437-PZ1439、VPZ1441-VPZ1444、VPH1602、VPH1603、VPH1605-VPH1609 和 VPZ1451-VPZ1465 携带 *toxR*、*tlh*, VPZ1433 携带 *toxR*, 扩增结果与实验室经荧光定量 PCR 验证及国标 FDA 2004 标准<sup>[12]</sup>检测结果一致。而其他非副溶血性弧菌均不能扩增出相应的 *toxR*、*tdh*、*trh*、*tlh* 条带。研究证明, 该四重 PCR 体系中的 4 对引物具有高度特异性。*toxR* 可以作为副溶血性弧菌种特异性基因, *tdh*、*trh*、*tlh* 3 对引物可以分别鉴别副溶血性弧菌不同致病因子。

2.3 四重 PCR 体系灵敏度试验结果

2.3.1 基因组 DNA 灵敏度试验结果: 经试验测定, 当模板 DNA 稀释至 50 µg/L 时, 4 条目的条带仍能明显扩增出来; 当模板 DNA 小于 50 µg/L 时, 未见有扩增产物(图 3)。因此, 同时检测副溶血性弧菌 *toxR* 和携带 *tdh*、*trh*、*tlh* 致病因子的副溶血性弧菌模板 DNA 浓度的检测限为 50 µg/L。

表 2 四重 PCR 体系特异性试验结果  
Table 2 The specificity results of multiple PCR

Bacterial specie and strain ID	Target gene			
	<i>toxR</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>tlh</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> No. 1-8, 42, 60, 67-71, 75, 183-185, 2011029, Z1539, Z1550, H1604	+	+	-	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> No. 87-93, 64, 170, 171, Z1555, Z1436, Z1440	+	+	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> No. 186, 187, S201306, S201307, ATCC 17802	+	-	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> No. Z1432, Z1434, Z1435, Z1437-Z1439, Z1441-Z1444, H1602, H1603, H1605-H1609, Z1451-Z1465	+	-	-	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> No. Z1433	+	-	-	-
Non- <i>Vibrio parahaemolyticus</i> *	-	-	-	-

注: \*: 非副溶血性弧菌包括: 溶藻弧菌、河弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌、弗氏弧菌、哈维弧菌、非 O1 型霍乱弧菌、鳃弧菌、嗜水气单胞菌、发光杆菌、嗜盐单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、乙型溶血性链球菌、产气肠杆菌、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、单增李斯特菌、伊氏李斯特菌、英诺克李斯特菌、阪崎肠杆菌、粪链球菌、宋内志贺氏菌。+: 阳性; -: 阴性。  
Note: \*: Non-*Vibrio parahaemolyticus* including *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio harveyi*, non-O1 *Vibrio cholerae*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila*, *Photobacterium* spp., *Halomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *beta hemolytic streptococcus*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Enterobacter sakazakii*, *Streptococcus faecalis*, *Shigella sonnei*. +: Positive; -: Negative.



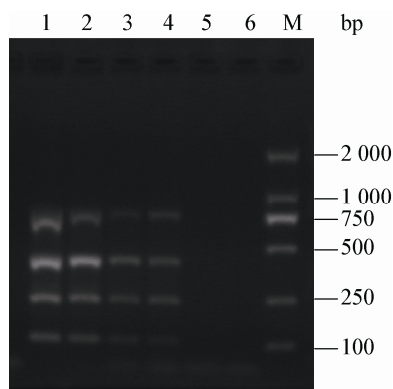


图3 四重 PCR 基因组 DNA 灵敏度试验结果

Figure 3 The sensitivity results of genome DNA template concentration for quadruple PCR

注 :M :D2000 DNA marker ;1-6 :DNA 模板浓度依次为  $5.0 \times 10^4$ 、 $5.0 \times 10^3$ 、 $5.0 \times 10^2$ 、 $5.0 \times 10^1$ 、 $5.0 \times 10^0$ 、 $5.0 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/L}$ .

Note: M: D2000 DNA marker; 1-6: The concentrations of genome DNA are  $5.0 \times 10^4$ ,  $5.0 \times 10^3$ ,  $5.0 \times 10^2$ ,  $5.0 \times 10^1$ ,  $5.0 \times 10^0$ ,  $5.0 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/L}$ .

**2.3.2 纯培养菌液灵敏度试验结果：**副溶血性弧菌经培养液富集培养之后，用无菌生理盐水按 10 倍梯度稀释，分别进行菌落计数和多重 PCR 检测。检测结果表明，当副溶血性弧菌模板含量在  $6.7 \times 10^3$  CFU/mL 时，4 个目的片段能够被同时检出(图4)；当副溶血性弧菌模板含量在  $6.7 \times 10^2$  CFU/mL 时，只有 *tdh*、*trh* 2 个目的片段被检出。因此该方法的检出灵敏度为  $6.7 \times 10^3$  CFU/mL。

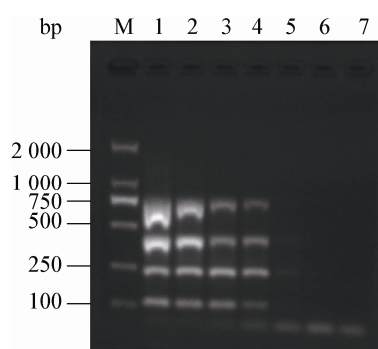


图4 四重 PCR 副溶血性弧菌纯培养液灵敏度试验结果

Figure 4 The sensitivity results of pure culture for quadruple PCR

注 :M :D2000 DNA marker ;1-7 :菌液浓度依次为  $6.7 \times 10^6$ 、 $6.7 \times 10^5$ 、 $6.7 \times 10^4$ 、 $6.7 \times 10^3$ 、 $6.7 \times 10^2$ 、 $6.7 \times 10^1$ 、 $6.7 \times 10^0$  CFU/mL.

Note: M: D2000 DNA marker; 1-7: The cell concentrations of pure culture are  $6.7 \times 10^6$ ,  $6.7 \times 10^5$ ,  $6.7 \times 10^4$ ,  $6.7 \times 10^3$ ,  $6.7 \times 10^2$ ,  $6.7 \times 10^1$ ,  $6.7 \times 10^0$  CFU/mL.

## 2.4 模拟样品检测及基因携带判定

通过向无副溶血性弧菌的水产品样品中加入副溶血性弧菌菌液，经液体培养基富集培养后，取适量样品进行多重 PCR 反应检测，同时做空白对照。当副溶血性弧菌含量为 1.36 CFU/g 的模拟样品富集 6 h 后，*toxR*、*tdh*、*trh*、*tlh* 4 个目的条带均成功扩增出来，条带清晰，因此，本方法可判定样品是否含副溶血性弧菌，并且同时检测携带 *tdh*、*trh*、*tlh* 致病基因的情况。

## 3 讨论

### 3.1 关于种特异基因和毒力基因的讨论

*tdh*、*trh*、*tlh* 基因和毒力调控基因 *toxR* 是致病性副溶血性弧菌研究中最重要毒力因子<sup>[13-23]</sup>，*tdh* 基因和 *trh* 基因分别表达耐热直接溶血毒素和耐热直接溶血毒素相关毒素，*tlh* 基因表达不耐热溶血毒素，是一种非典型磷脂酶。无论是临床分离株还是环境分离株，大多数副溶血弧菌均携带 *tlh* 基因，临床分离株则大多携带 *tdh* 基因，环境分离株和水产品分离株极少携带 *tdh* 基因<sup>[23]</sup>；临床株与环境株检出率 *trh* 基因较低，但也有与 *tdh* 基因共存的情况<sup>[24]</sup>。目前用于鉴别副溶血性弧菌的目的基因主要有 *toxR*、*pR72H*、*tlh*、*gyrB* 和 *vpm*<sup>[7,25-27]</sup>。*tlh* 基因由于其在副溶血性弧菌中出现的频率高而被大部分研究人员认为副溶血性弧菌的种特异性基因。但是，Klein 的研究表明 *tlh* 基因在弧菌属中除副溶血性弧菌外占有较高的比例，并且相似性较高<sup>[28]</sup>，所以 West 等并不赞成以 *tlh* 基因作为副溶血性弧菌的种特异基因<sup>[29]</sup>。有的研究者发现，*toxR* 基因的灵敏度高，用于分子方法鉴定副溶血性弧菌比 *tlh*、*gyrB*、*pR72H* 更可靠<sup>[30-31]</sup>。本团队对 2005-2011 年厦门市临床致病副溶血性弧菌的研究表明，食物中毒副溶血性弧菌分离株均携带 *toxR* 基因和 *tlh* 基因，而 *tdh* 基因的携带率为 84.96%-85.20%，*trh* 基因携带率为 7.96%<sup>[32-33]</sup>。因此，为实现对食品中致病性副溶血性弧菌的快速筛查，本研究对副溶血性弧菌的 *toxR*、*tdh*、*trh*、*tlh* 4 个基因建立四重 PCR 方法用于副溶血性弧菌及其毒力基因的检测。

### 3.2 关于多重 PCR 和多重荧光定量 PCR 的讨论

多重 PCR 既可以实现同时检测多重致病菌,又能实现同时检测一种菌的多个基因;既能提高通量,又能节省样品提高成本。国内外研究人员在针对副溶血性弧菌的检测研究当中,也有很多关于多重 PCR 的应用。陈丽萍等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,并使用自动毛细管电泳分析系统进行分析 PCR 产物,当基因组 DNA 浓度大于 1.36  $\mu\text{g/L}$ , 纯培养条件下菌浓度大于  $6.6 \times 10^2$  CFU/mL 时,3 个目的基因可同时检出<sup>[13]</sup>。Hossain 等对 *groEL*、*tdh* 和 *trh* 建立三重 PCR,实现总副溶血性弧菌和携带致病因子的副溶血性弧菌的快速检测研究,最低可检出 200 pg DNA<sup>[14]</sup>。张捷等以  $F_0F_1$ -ATPase 为核心构建分子马达,分别进行副溶血性弧菌 *tdh*、*trh*、*tlh* 和 *toxR* 分子分型方法研究,检测限可达 10 pg/反应,但需分管逐一进行分型<sup>[34]</sup>。本研究建立的副溶血性弧菌四重 PCR 的快速检测方法,可实现在同一反应体系中的 4 种分子分型检验,但由于四重体系含有较多组分,各个目的片段的扩增反应相互受到一定影响,检出限还有待进一步降低。

多重荧光定量 PCR 的检测灵敏度比普通多重 PCR 的检测灵敏度高 1-2 个数量级。许龙岩等建立对副溶血性弧菌特异性检测 *toxR* 基因和 *tdh* 毒力基因的 Taqman 探针荧光 PCR 检测方法<sup>[15]</sup>,最低检测浓度达到  $3.6 \times 10^2$  CFU/mL。张红芝等针对 *toxR* 和 *tlh* 基因建立添加内标的 PCR,成功排除假阴性的干扰<sup>[16]</sup>,对 DNA 灵敏度的检测限为 0.5  $\mu\text{g/L}$ 。Garrido 等对 *tdh*、*trh* 基因建立双重荧光定量 PCR 方法,该方法对 *tdh*、*trh1*、*trh2* 检测限分别为 6 CFU/25 g、11 CFU/25 g、8 CFU/25 g<sup>[17]</sup>。He 等也对 *toxR*、*tdh*、*trh* 基因建立副溶血性弧菌致病因子三重荧光定量 PCR 方法,该方法最低可检测 1.4 pg/反应<sup>[18]</sup>。但是,由于多重荧光定量 PCR 特异性探针的加入,使得体系中引物和探针的设计更为复杂,此外,荧光定量 PCR 试验所用的耗材、试剂和实验设备相比 PCR 试验而言均较昂贵,使得其难

以在基层实验室推广。

国内外也有不少研究是对多种致病菌建立多重 PCR 检测方法的<sup>[35-41]</sup>,如江迎鸿等<sup>[35]</sup>针对扩增霍乱弧菌、副溶血性弧菌和单核细胞增生李斯特氏菌建立三重 PCR 检测方法, Lee 等<sup>[36]</sup>对大肠杆菌、蜡样芽胞杆菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌 6 种食源性致病菌建立多重 PCR 方法,Zhang 等<sup>[37]</sup>也对生鲜虾中的副溶血性弧菌、单增李斯特菌和沙门氏菌建立多重实时荧光定量 PCR 方法等等。我们对水产品进行副溶血性弧菌检测时,也发现海产品中除了副溶血性弧菌之外,还携带有其他致病菌。因此,本研究建立的副溶血性弧菌四重 PCR 快速检测方法具有成本低、易操作等优点,并且可在同一 PCR 反应体系中同时检测副溶血性弧菌 4 个毒力基因和种特异基因,可用于致病性副溶血性弧菌的快速筛查。

## 4 结论

通过优化引物浓度和退火温度,本研究建立了副溶血性弧菌四重 PCR 体系,其中引物对的终浓度分别为:*trh* 0.4、*tdh* 0.04、*toxR* 0.08、*tlh* 0.04  $\mu\text{mol/L}$ ,对副溶血性弧菌模板 DNA 的检测灵敏度为 50  $\mu\text{g/L}$ ;纯培养条件下,*tdh*、*trh*、*tlh*、*toxR* 4 个基因同时检测的灵敏度为  $6.7 \times 10^3$  CFU/mL;*tdh*、*trh* 2 个基因同时检测的灵敏度为  $6.7 \times 10^2$  CFU/mL。副溶血性弧菌含量为 1.36 CFU/g 的人工模拟样品增菌 6 h 后,可用该体系检出副溶血性弧菌携带的 *tdh*、*trh*、*tlh*、*toxR* 基因。

本研究建立的副溶血性弧菌四重 PCR 的快速检测方法,相比于传统的培养方法具有耗时短、工作量小等优点,为基层实验室开展副溶血性弧菌及其毒力基因携带情况的检测提供了快速有效的方法,在大规模样品检测及食源性致病菌的风险评估中具有一定的潜在应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] Young I, Gropp K, Fazil A, et al. Knowledge synthesis to support risk assessment of climate change impacts on food and water safety: a case study of the effects of water temperature and

- salinity on *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters and harvest waters[J]. Food Research International, 2015, 68: 86-93
- [2] Xu XK, Wu QP, Zhang JM, et al. Prevalence, pathogenicity, and serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp from Chinese retail markets[J]. Food Control, 2014, 46: 81-85
- [3] Newton AE, Garrett N, Stroika SG, et al. Notes from the field: increase in *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption of atlantic coast shellfish-2013[J]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2014, 63(15): 335-336
- [4] Silvester R, Alexander D, Ammanamveetil MHA. Prevalence, antibiotic resistance, virulence and plasmid profiles of *Vibrio parahaemolyticus* from a tropical estuary and adjoining traditional prawn farm along the southwest coast of India[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(4): 2141-2149
- [5] Wu Y N, Wen J, Ma Y, et al. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus*, China, 2003-2008[J]. Food Control, 2014, 46: 197-20
- [6] Mao XD, Hu JF, Liu XM. Epidemiological characteristics of bacterial foodborne disease during the year 2003-2007 in China[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2010, 22(3): 224-228 (in Chinese)  
毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅. 2003-2007 年中国 1060 起细菌性食源性疾病流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3): 224-228
- [7] Letchumanan V, Yin WF, Lee LH, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shrimps in Malaysia[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 33
- [8] Cruz C, Hedderley D, Fletcher GC, et al. Long-Term study of *Vibrio parahaemolyticus* prevalence and distribution in New Zealand shellfish[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(7): 2320-2327
- [9] Haendiges J, Rock M, Myers RA, et al. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus*, Maryland, USA, 2012[J]. Emerging Infectious Diseases, 2014, 20(4): 718-720
- [10] Han Y, Zhang HY, Ma SL, et al. Establishment of a fluorescent PCR method for pathogenic gene *Vibrio parahaemolyticus* strains[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2013, 25(5): 397-400 (in Chinese)  
韩玥, 张惠媛, 马师良, 等. 荧光 PCR 检测副溶血性弧菌致病基因方法的建立[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(5): 397-400
- [11] Anonymous. 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]. Geneva, Switzerland: ISO, 2007
- [12] FDA BAM. Bacteriological analytical manual chapter 9: *Vibrio*[S]. 7th Edition. Washington DC: Food and Drug Administration, 2004
- [13] Chen LP, Liu ZM, Chen Y, et al. Specific multiplex-PCR method for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiology China, 2014, 41(4): 764-775 (in Chinese)  
陈丽萍, 刘忠民, 陈芸, 等. 特异性三重 PCR 快速检测副溶血性弧菌[J]. 微生物学通报, 2014, 41(4): 764-775
- [14] Hossain MT, Kim Y-O, Kong I-S. Multiplex PCR for the detection and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* strains using the *groEL*, *tdh* and *trh* genes[J]. Molecular and Cellular Probes, 2013, 27(5/6): 171-175
- [15] Xu LY, Yuan MY, Cao JJ, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* using duplex fluorescence real-time PCR with TaqMan probe[J]. Food Science, 2013, 34(18): 263-266 (in Chinese)  
许龙岩, 袁慕云, 曹际娟, 等. TaqMan 探针双重荧光 PCR 法检测副溶血性弧菌[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 263-266
- [16] Zhang HZ, Gu QF, Liu H, et al. Development and evaluation of PCR with internal control in detecting *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2011, 21(4): 921-924 (in Chinese)  
张红芝, 顾其芳, 刘弘, 等. 副溶血性弧菌的添加内标的 PCR 检测方法的建立及评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(4): 921-924
- [17] Garrido A, Chapela M-J, Ferreira M, et al. Development of a multiplex real-time PCR method for pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* detection (*tdh+* and *trh+*)[J]. Food Control, 2012, 24(1/2): 128-135
- [18] He P, Chen Z, Luo J, et al. Multiplex real-time PCR assay for detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains[J]. Molecular and Cellular Probes, 2014, 28(5): 246-250
- [19] Chen SY, Ge BL. Development of a *toxR*-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Vibrio parahaemolyticus*[J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 41
- [20] Robert-Pillot A, Copin S, Gay M, et al. Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: Fast and reliable quantification by real-time PCR[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 143(3): 190-197
- [21] Yamazaki W, Kumeda Y, Misawa N, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the *tdh* and *trh* genes of *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* Species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(3): 820-828
- [22] Sun W, Zhang YY, Ju XM, et al. Electrochemical deoxyribonucleic acid biosensor based on carboxyl functionalized graphene oxide and poly-L-lysine modified electrode for the detection of *tlh* gene sequence related to *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 752: 39-44
- [23] Xian YY, Yi MY, Wei S, et al. Novel Multiplex polymerase chain reaction Assay to detect virulence-related genes in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(7): 309-315 (in Chinese)  
冼钰茵, 易敏英, 魏霜, 等. 基于弧菌毒力基因多重 PCR 法的建立及其在副溶血弧菌毒力基因检测中的应用[J]. 现代食品科技, 2015, 31(7): 309-315
- [24] Theethakaew C, Feil EJ, Castillo-Ramirez 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
- [25] Suffredini E, Cozzi L, Ciccaglioni G, et al. Development of a colony hybridization method for the enumeration of total and potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 186: 22-31
- [26] Lee SK, Wang H, Law SH, et al. Analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine *vibriosis* for species-specific signature DNA sequences[J]. Marine Pollution Bulletin, 2002, 44(5): 412-420
- [27] Wei J, Zhou XM, Xing D, et al. Rapid and sensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus* in sea foods by electrochemiluminescence polymerase chain reaction method[J]. Food Chemistry, 2010, 123(3): 852-858
- [28] Klein SL, West CKG, Mejia DM, et al. Genes similar to the *Vibrio parahaemolyticus* virulence-related genes *tdh*, *tlh*, and *vscC2* occur in other *Vibrionaceae* species isolated from a pristine estuary[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(2): 595-602
- [29] West CKG, Klein SL, Lovell CR. High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(7): 2247-2252



- [30] Rosec JP, Simon M, Causse V, et al. Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish: comparison of PCR protocols using *pR72H* or *toxR* targets with a culture method[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 129(2): 136-145
- [31] Alaboudi AR, Ababneh M, Osaili TM, et al. Detection, identification, and prevalence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in fish and coastal environment in Jordan[J]. Journal of Food Science, 2016, 81(1): M130-M134
- [32] Weng QY, Zhang JM, Zhu F, et al. Analysis of the pathogenic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* from food-poisoning in Xiamen city from 2005 to 2011[J]. China Modern Medicine, 2014, 21(19): 4-8 (in Chinese)  
翁琴云, 张建梅, 朱滢, 等. 2005-2011 年厦门市食物中毒副溶血性弧菌的病原特征分析[J]. 中国当代医药, 2014, 21(19): 4-8
- [33] Lin X, Chen ZH, Weng QY, et al. Application of multiplex real-time PCR technique to detect *Vibrio parahaemolyticus* and its virulence genes[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2015, 25(6): 870-872 (in Chinese)  
林雪, 陈泽辉, 翁琴云, 等. 应用多重实时荧光 PCR 方法检测副溶血性弧菌及其毒力基因[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(6): 870-872
- [34] Zhang J, Li ZJ, Wang Y, et al. A preliminary study on molecular typing method for *Vibrio parahaemolyticus* based on molecular motor biosensor[J]. Microbiology China, 2013, 40(7): 1279-1289 (in Chinese)  
张捷, 李兆杰, 王煜, 等. 基于分子马达生物传感器技术的副溶血性弧菌分子分型方法的初步研究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1279-1289
- [35] Jiang YH, Tan GL, Chen YB, et al. Simultaneous detection of three food-borne bacterial pathogens by multiplex PCR[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(10): 135-137 (in Chinese)  
江迎鸿, 谭贵良, 陈亚波, 等. 多重 PCR 方法检测食品中霍乱弧菌、副溶血性弧菌和单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 广东农业科学, 2011, 38(10): 135-137
- [36] Lee N, Kwon KY, Oh SK, et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean Ready-to-Eat Food[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(7): 574-580
- [37] Zhang ZH, Xiao LL, Lou Y, et al. Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw shrimp[J]. Food Control, 2015, 51: 31-36
- [38] Turner JW, Malayil L, Guadagnoli D, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* with respect to seasonal fluctuations in temperature and plankton abundance[J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(4): 1019-1028
- [39] Garrido-Maestu A, Chapela M-J, Peñaranda E, et al. In-house validation of novel multiplex real-time PCR gene combination for the simultaneous detection of the main human pathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*)[J]. Food Control, 2014, 37: 371-379
- [40] Zhang ZH, Liu HQ, Lou Y, et al. Quantifying viable *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* simultaneously in raw shrimp[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(15): 6451-6462
- [41] Vinothkumar K, Bhardwaj AK, Ramamurthy T, et al. Triplex PCR assay for the rapid identification of 3 major *Vibrio* species, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio fluvialis*[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013, 76(4): 526-528