

食品中副溶血性弧菌 PCR 快速检测方法的研究

钟 凯 田 静 李业鹏 刘秀梅 计 融

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘 要:为建立食品中副溶血性弧菌(VP)的 PCR 检测方法,选取 *tl* 基因作为靶序列设计一对引物,用该引物对 14 株从国内食品中分离的副溶血性弧菌(经传统方法验证)和 30 株非副溶血性弧菌进行 PCR 扩增,并用此方法对人工污染食品进行检测。扩增片段表现出极好的特异性,对人工污染的冷冻虾仁、沙丁鱼的检出限为 10 CFU/g,且与传统方法结果吻合。该方法适宜于食品中副溶血性弧菌的检测。

关键词:聚和酶链反应;弧菌,副溶血性;食品

Faster detection of *Vibrio parahaemolyticus* in foods by PCR technique

Zhong Kai Tian Jing Li Yepeng Liu Xiumei Ji Rong

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021)

Abstract: The purpose of this study is to establish a new technique for detection *Vibrio parahaemolyticus* (VP) faster and validate its practicability. The new technique involves designing a primer pair targeting *tl* gene and using the primer pair for PCR amplification. The technique was tried in 14 VP strains and 30 non-VP strains, and also in factitiously contaminated food samples. The results showed that the technique offered excellent differentiation and lower detection limit (10 CFU/g). The full course of assay could be completed in 13 hours, which was significantly shorter than the time needed by conventional techniques. It is concluded that the technique is practical with advantages of simple operation, higher specificity, less time-consuming and lower detection limit. Nevertheless, more trial is needed because the technique was validated in only 2 kinds of actual food samples.

Key Words: Polymerase Chain Reaction; *Vibrio parahaemolyticus*; Food

传统的副溶血性弧菌鉴定方法(GB 4789.7—1994)是分离培养、氯化钠三糖铁反应、格兰氏染色镜检、嗜盐性试验、生化鉴定和动物实验,不仅需要近 6 d 时间,而且操作复杂,灵敏度有限。随着人民生活水平的提高,对外经贸的发展,迫切需要一种更灵敏、更快捷的检测方法以适应新的需求。我国学者也已对副溶血性弧菌的分子生物学检测进行了研究和应用。^[2,3]本研究以 PCR 技术为基础,建立一套食品中副溶血性弧菌检测方法,该方法能大大缩短检测周期,提高检测灵敏度。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与设备 PTC-200 核酸扩增仪(美国 MJ 公司)、5415D 微量台式离心机(德国 eppendorf 公

司)、BIO-RAD300 电泳仪(美国伯乐公司)、SW22 恒温摇床(JULABO 公司)、微波炉(Galanx 公司)、VD2 5132 凝胶成像系统(法国 VL 公司)、微量进样器(法国吉尔森公司)、PL5243 纯水仪(美国 PALL 公司)、QF100 制冰机(斯科特罗公司)、MS-2 涡旋振荡器(德国 IKA 公司)、PYX-DHS-50×65-1 隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)、CC1 水浴锅(HUBER 公司)。

1.1.2 试剂 RNA 酶、DNA 提取试剂盒、PCR 反应试剂盒均为 Promega 公司产品。

1.1.3 引物合成 根据文献报道的引物序列,委托上海生物工程技术有限公司合成副溶血性弧菌特异性引物 *tl* 基因^[4]其序列如下:

上游引物 5'-AAAGCGGATTATGCAGAA GCACTG-3'

This research was supported by the Grant from National Science and Technology Program Funds of Ministry of Science and Technology, China. (2001 BA804A03)

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA804A03)

作者简介:钟凯 男 实习研究员

下游引物 5 - GCTACTTCTAGCATTCTCTCTGC - 3

1.1.4 菌种 菌种均来自于实验室分离菌株。其中 14 株副溶血性弧菌分别来自浙江和福建省疾病预防控制中心的食品检样,其它 30 株非副溶血性弧菌来自北京市临床药理研究所。

1.1.5 样品 冷冻虾仁、沙丁鱼罐头均购于北京某超市。

1.2 方法

1.2.1 模板提取方法 选择浙江省疾控中心提供的一株副溶血性弧菌为代表菌。用嗜盐菌选择性琼脂和氯化钠结晶紫增菌液对菌株进行分离培养和 37 过夜振荡培养。过夜液体培养物 1 mL, 8 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 加 600 μ L DNA 裂解液, 80 孵育 8 min, 加 RNA 酶 37 孵育 30 min, 加 200 μ L 蛋白沉淀液, 涡旋 20 s, 冰浴 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于另一管, 加等体积异丙醇, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加 70% 乙醇沉淀, 12 000 r/min 离心 5 min, 干燥 10 min, 加 200 μ L 重旋液后置 4 过夜。

1.2.2 基因扩增条件 总体积 20 μ L 的反应体系中, 10 μ mol/L 的上下游引物各 0.5 μ L, 模板 DNA 0.5 μ L, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2.0 μ L, 2 mmol/L dNTP 2.0 μ L, 2.5 u/ μ L Taq 酶 0.2 μ L, 10 \times buffer 缓冲液 2.0 μ L, 去离子水 12.3 μ L。PCR 反应条件为: 预变性 94 5 min, 变性 94 60 s, 退火 58 60 s, 延长 72 60 s, 30 个循环, 再延长 72 7 min。

1.2.3 PCR 结果的电泳检测 用 0.5 \times TBE 缓冲液配制 1.2% 琼脂糖凝胶, 将 PCR 扩增产物与溴化乙锭 (EB, 终浓度为 0.5 μ g/mL) 混合物及 100 bp mark-

er, 分别点样 5 μ L, 100 V 电泳 60 min。用凝胶成像系统观察电泳结果, 并对其进行分析。

1.2.4 菌种准备 副溶血性弧菌的分离培养与鉴定按 GB 4789.7—1994^[5] 进行。非副溶血性弧菌菌株经传统方法鉴定后平板划线, 37 培养 24 h, 挑取单个菌落接种于普通营养肉汤中, 37 过夜振荡培养。

1.2.5 样品及其前处理 冷冻虾仁及沙丁鱼均从某超市购买。根据 GB 4789.7—1994, 以无菌操作将待检样品 25 g 放于含有 225 mL 氯化钠结晶紫肉汤的无菌均质袋中均质成 1:10 的均匀稀释液作为副溶血性弧菌的培养基备用。

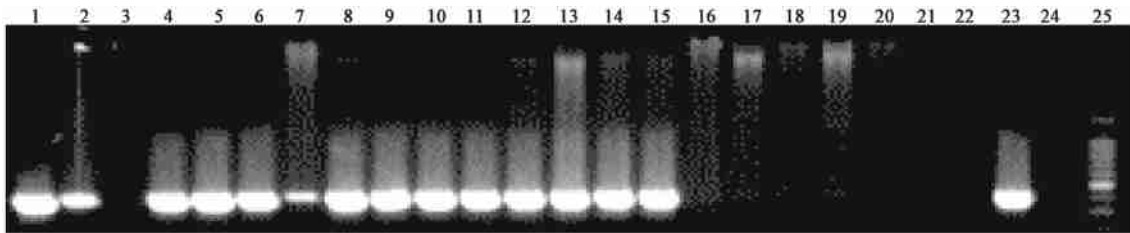
1.2.6 特异性检测 选用经本实验室已经过传统方法验证的 14 株副溶血性弧菌和 30 株非副溶血性弧菌进行 PCR 特异性验证。

1.2.7 灵敏性检测 以无菌操作将副溶血性弧菌代表菌株的过夜培养液按 10 倍递增稀释 $10^{-1} \sim 10^{-8}$, 提取 DNA, 进行 PCR 检测。

1.2.8 人工染菌 以无菌操作将副溶血性弧菌菌株的过夜培养液按 10 倍递增稀释 $10^{-1} \sim 10^{-8}$, 并选择 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 3 个稀释度作细菌菌落计数, 同时 10 倍稀释于待检试样均质液中, 37 振荡培养, 分别于培养后不同时间段取 1 mL 菌液, 提取模板 DNA, 设空白对照。

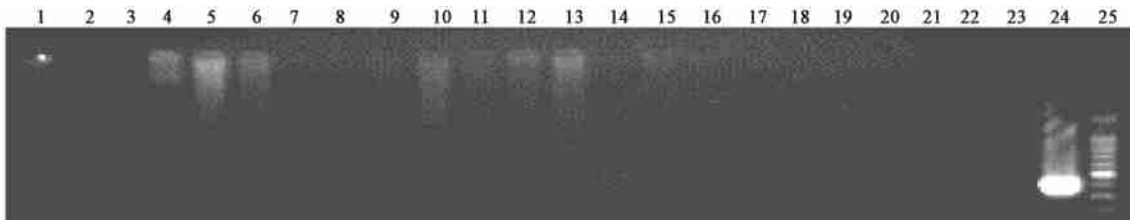
2 结果与讨论

2.1 方法的特异性 对从食品中分离确认的 14 株副溶血性弧菌进行 PCR 检测, 阳性率为 100%, 其他 30 株菌均为阴性, 见图 1, 图 2。



1, 2 副溶血性弧菌; 3 明斯特沙门氏菌; 4~15 副溶血性弧菌; 16 痢疾 1 型志贺氏菌; 17 奇异变形杆菌; 18 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 19 阴沟肠杆菌; 20 蜂房哈夫尼亚菌; 21 臭鼻克雷伯氏菌; 22 粘质沙雷氏菌; 23 阳性对照; 24 阴性对照; 25 100 bp Marker。

图 1 副溶血性弧菌 PCR 的引物特异性(1)

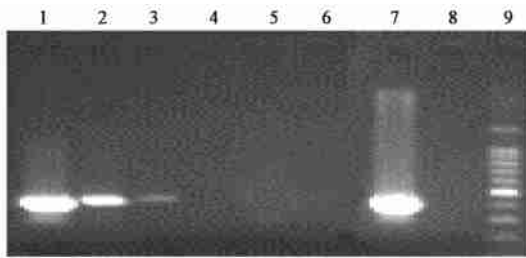


1 弗劳地枸橼酸杆菌; 2 雷极氏变形杆菌; 3 肠炎沙门氏菌; 4 肿瘤克雷伯氏菌; 5 乙型副伤寒沙门氏菌; 6~12 大肠杆菌; 13 宋内氏志贺氏菌; 14 鲍氏型志贺氏菌; 15 蜡样芽胞杆菌; 16~18 单增李斯特氏菌; 19~22 金黄色葡萄球菌; 23 阴性对照; 24 阳性对照; 25 100 bp Marker。

图 2 副溶血性弧菌 PCR 的引物特异性(2)

2.2 方法的灵敏性

图3 结果表明对于副溶血性弧菌的纯培养, PCR 的检出限为 10^6 CFU/mL。



1 10^8 CFU/mL; 2 10^7 CFU/mL; 3 10^6 CFU/mL; 4 10^5 CFU/mL; 5 10^4 CFU/mL; 6 10^3 CFU/mL; 7 阳性对照; 8 阴性对照; 9 100 bp Marker。

图3 副溶血性弧菌 PCR 的灵敏性

2.3 人工污染副溶血性弧菌的沙丁鱼罐头 PCR 检验方法

经氯化钠结晶紫增菌液过夜振荡培养的副溶血性弧菌的起始菌量为 7.4×10^7 CFU/mL, 沙丁鱼匀浆液 (10 mL 匀浆液相当于 1 g 试样的量) 中含副

溶血性弧菌分别为 1 CFU/mL、10 CFU/mL、 10^2 CFU/mL。10 h 后, 菌量分别增至 5.8×10^8 、 5.8×10^8 、 6.4×10^8 CFU/mL。结果表明该 PCR 检测系统在 10^2 CFU/mL 增菌 4 h、1、10 CFU/mL 增菌 6 h 后可检出副溶血性弧菌。即沙丁鱼罐头中副溶血性弧菌菌量达 10 CFU/g 时, 该检验方法可以检出, 见图 4。

2.4 人工污染副溶血性弧菌的冻虾仁 PCR 检验方法

经氯化钠结晶紫增菌液过夜振荡培养的副溶血性弧菌的起始菌量为 7.4×10^7 CFU/mL, 冻虾仁匀浆液 (10 mL 匀浆液相当于 1 g 试样的量) 中含副溶血性弧菌分别为 1 CFU/mL、10 CFU/mL、 10^2 CFU/mL。在 10 h 后副溶血性弧菌菌量分别增至 4.8×10^8 CFU/mL、 3.4×10^8 CFU/mL、 8.2×10^8 CFU/mL。结果表明, 该 PCR 检测系统在 10 CFU/mL、 10^2 CFU/mL 增菌 4 h 后可检出, 在 1 CFU/mL 增菌 6 h 后可检出。即虾仁中副溶血性弧菌菌量达 10 CFU/g 时, 该检验方法可以检出, 见图 5。



1 起始菌液; 2 起始菌液 10 倍稀释; 3 起始菌液 100 倍稀释; 4 起始菌液 1 000 倍稀释; 5 10^2 CFU/mL 增菌 4 h; 6 10 CFU/mL 增菌 4 h; 7 1 CFU/mL 增菌 4 h; 8 增菌液空白对照; 9 10^2 CFU/mL 增菌 6 h; 10 10 CFU/mL 增菌 6 h; 11 1 CFU/mL 增菌 6 h; 12 增菌液空白对照; 13 10^2 CFU/mL 增菌 8 h; 14 10 CFU/mL 增菌 8 h; 15 1 CFU/mL 增菌 8 h; 16 增菌液空白对照; 17 10^2 CFU/mL 增菌 10 h; 18 10 CFU/mL 增菌 10 h; 19 1 CFU/mL 增菌 10 h; 20 增菌液空白对照; 21 阳性对照; 22 阴性对照; 23 100 bp Marker。

图4 人工污染副溶血性弧菌的沙丁鱼罐头 PCR 检验结果



1 起始菌液; 2 起始菌液 10 倍稀释; 3 起始菌液 100 倍稀释; 4 起始菌液 1 000 倍稀释; 5 10^2 CFU/mL 增菌 4 h; 6 10 CFU/mL 增菌 4 h; 7 1 CFU/mL 增菌 4 h; 8 增菌液空白对照; 9 10^2 CFU/mL 增菌 6 h; 10 10 CFU/mL 增菌 6 h; 11 1 CFU/mL 增菌 6 h; 12 增菌液空白对照; 13 10^2 CFU/mL 增菌 8 h; 14 10 CFU/mL 增菌 8 h; 15 1 CFU/mL 增菌 8 h; 16 增菌液空白对照; 17 10^2 CFU/mL 增菌 10 h; 18 10 CFU/mL 增菌 10 h; 19 1 CFU/mL 增菌 10 h; 20 增菌液空白对照; 21 阳性对照; 22 阴性对照; 23 100 bp Marker。

图5 人工污染副溶血性弧菌的冻虾仁 PCR 检验结果

2.5 结论

食品匀浆液中含有副溶血性弧菌 1、10、 10^2 CFU/mL, 在氯化钠结晶紫增菌液中增菌 10 h 后副溶血性弧菌菌量均可增至 10^8 CFU/mL。在增菌液

中副溶血性弧菌量达 10^6 CFU/mL 时, 该 PCR 检测系统可以检出。增菌 6 h 后, 可以达到最低检出要求。在对经分离确认的 14 份副溶血性弧菌样品和 30 份

其他菌样品的检测中,符合率为 100%,且该反应体系能很好地排除杂菌干扰,显示出很高的特异性和灵敏度。

3 讨论 实际工作中,多数学者选取副溶血性弧菌的耐热溶血素基因 *tdh* 和耐热相关溶血素基因 *trh* 用于检测,也有研究者使用其它基因,如 *gyrB* 基因、*Fla* 基因、*toxR* 基因、核糖体 RNA 基因等。^[3,6,7] 然而,值得注意的是 *tdh* 和 *trh* 基因是和副溶血性弧菌致病性密切相关的,但并非所有的副溶血性弧菌都携带 *tdh* 或 *trh* 基因。同时,*tdh* 基因与 *trh* 基因都不是单一基因,其中 *tdh* 基因族的同源性达到 80% 以上,而 *trh* 基因与 *tdh* 基因的同源性为 68%,因此一对引物无法检测所有的 *tdh* 和 *trh* 基因。^[1] 同时,*tdh⁻trh⁻* 脲酶阳性副溶血性弧菌的致病因素也不能忽视。因此,为进行预防性检测,我们针对属特异性基因 *tl* 设计引物用于 PCR。

在本研究中,我们选取冻虾仁和沙丁鱼作为海产品代表尝试建立 PCR 快速检测方法。通过设计特异性引物,优化 PCR 反应条件,对 14 株副溶血性弧菌和 30 株其他细菌进行扩增检测。结果表明,该方法有很好的种属特异性,检出限达到 10 CFU/g,且与传统鉴定方法的结果吻合。通过选择性增菌,使该方法具有较强的抗杂菌干扰能力。从试样检测开始到获得结果仅需要 13 h(增菌 6 h,DNA 提取 4 h,PCR 反应 2 h,电泳 1 h),大大缩短了报告周期,可以为疾病暴发的诊断与控制赢得宝贵时间。

本实验建立的食品中副溶血性弧菌的 PCR 检测方法与传统方法相比,操作简便,特异性好,报告

周期短,检出限低,检测结果准确、稳定。另外,由于有很好的重复性,有利于检测程序的标准化,和实验室之间的比对。该方法适应食品微生物检验发展的需要,具有较高的使用推广价值。但由于本研究所涉及的食物种类有限,所以此方法还需在实践中进行进一步的验证。

参考文献:

- [1] Kelly M, Stroh E. Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest[J]. J Clin Microbiol, 1989, 27:2820—2822.
- [2] 封幼玲,陈太基,王为云,等. 应用 PCR 技术快速检测食品中副溶血性弧菌[J]. 中国卫生检验杂志, 1997, 7(4):241—242.
- [3] 寇运同,马洪明,刘晨光. 用 PCR 方法快速检测水产品中的副溶血性弧菌[J]. 海洋科学, 2002, 26(9):66—67.
- [4] Asim K Bej, Donald P Patterson, Cynthia W Brasher, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*[J]. Journal of Microbiology Methods, 1999, 36: 215—225.
- [5] GB 4789.7—1994. 副溶血性弧菌的检验方法[S].
- [6] S Marshall, C G Clark, G Wang, et al. Comparison of molecular methods of typing *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Clin Microbiol, 1999, 37(8):2473—2478.
- [7] 周化民,苏永全,王军. 副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) *Fla I* 基因的合成及其克隆与鉴定[J]. 自然科学进展, 2002, 12(1):101—103.

[收稿日期:2004-04-18]

中图分类号:R15;TS201.3;R378.3 文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2004)04-0317-04

[上接第 316 页]

参考文献:

- [1] CAC. Codex alimentary basic text hazard analysis and critical control point system and guidelines for its application [Z]. annex to CAC/PCR 1-1969, rev. 3 1997.
- [2] 徐蛟. HACCP 与其他质量保证体系在食品工业中应用[J]. 中国食品卫生杂志, 2001, 13(6):49—53.
- [3] 李怀林. 食品安全控制体系(HACCP)通用教程[M]. 北京:中国标准出版社, 22—51.
- [4] GB 12695—1990. 饮料厂卫生规范[S].
- [5] CAC/RCP1—1969, 食品卫生通则[S].
- [6] GB 1481—1994. 食品企业通用卫生规范[S].
- [7] 朱光富. 谈 HACCP 与 SSOP 的关系以及 CCP 的判定

[J]. 中国标准化, 2002, (3):44—46.

- [8] 李恬,廖华淳. 浅谈食品卫生监督管理中的问题和对策[J]. 中国卫生事业管理, 1999, 3:151—153.
- [9] Willid H S. The newer HACCP system: The HACCP system is a preventive and dynamic system which can significantly improve the safe of our food supply [J]. Food technology, 1991, 6:116—119.
- [10] Food and Drug Administration. 21 CFR Part 120 RIN 0910-AA43, Hazard analysis and critical control point (HAACP); Procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice[Z]. Final Rule, 2001-01-19.

[收稿日期:2004-02-11]

中图分类号:R15;TS201.1

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2004)04-0313-05