

实验技术与方法

2 种弧菌的实时荧光 PCR 快速检测

冯家望 王小玉 李丹琳 唐食明 游淑珠
(珠海出入境检验检疫局,广东 珠海 519015)

摘要:目的 为快速、特异、灵敏的检测致病性弧菌,建立致病性弧菌的实时荧光 PCR 方法。方法 针对霍乱弧菌的种特异性基因 *ompW*、毒力基因 *tcpA*、*ctxA* 和副溶血性弧菌的种特异性基因 *tl*、毒力基因 *tdh* 设计引物和 Taqman 荧光探针,建立实时荧光 PCR 检测方法。结果 该方法能够特异地检出副溶血性弧菌或霍乱弧菌,并进一步确定其是否携带 *tdh*、*tcpA* 或 *ctxA* 毒力基因,检测的灵敏度可达到 10 CFU/ml 或 0.171 6 μg/ml (pg/μl) DNA 模板浓度。结论 该方法特异性强、灵敏度高,适用于食品中致病性弧菌的快速检验。

关键词:聚合酶链反应;弧菌属;弧菌;霍乱;弧菌,副溶血性;毒力;基因;食品

Study on Rapid Detection of 2 kinds of *Vibrio* spp. in Food by Real-Time Fluorescence PCR

FENG Jia-wang, WANG Xiao-yu, LI Dan-lin, TANG Shi-ming, YOU Shu-zhu

(Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the P. R. C, Guangdong Zhuhai 519015, China)

Abstract: Objective To develop a real-time fluorescence PCR assay to detect *Vibrio cholera* and *Vibrio parahaemolyticus* in food. **Method** The virulence genes of *tcpA*, *ctxA* and *tdh* were selected as target sequences, *ompW* gene was selected as a

本研究发现 Fitmate 便携式肺功能测试仪和 Douglas-Haldane 法对 RMR 的比对测定后经统计学分析两种仪器的测定值差别无统计学意义且相关性良好。但在试验过程中也发现了一些影响试验测定的因素,主要体现在以下几方面:第一,同一人一段时间内 RMR 值在两种仪器测定过程中不可能保持完全相同,这不同于其它类仪器的比对研究能使用标准品;第二,测试过程中受试者对两种仪器的反应不同,受试者普遍反应对 Douglas-Haldane 法的测定方式(鼻塞夹住鼻子,只用嘴呼吸)不太适应,不符合正常呼吸的情况。而对 Fitmate 反应要好些,认为该仪器测试时对正常呼吸影响不大,但是由于使用的面罩都是一个规格,有些受试者在测试过程中有漏气现象发生,漏气会使测定的 RMR 值骤减。该仪器可提示面罩漏气,发生这类现象时需要将漏气时间段的 RMR 删除,不计算在最终 RMR 值内,如果漏气严重需要重新测定 RMR;第三, Douglas-Haldane 法中对 Douglas 袋中气体成分的分析 and 气体流量的测定都存在系统误差和随机误差。因此在今

后的比对试验中要加强对以上因素的控制。

参考文献

- [1] 葛可佑,主编.中国营养科学全书[M].北京:人民卫生出版社,2004.
- [2] DUFFIELD R, DAWSON B, PINNINGTON H C, et al. Accuracy and reliability of a Cosmed K4b2 portable gas analysis system[J]. *Sci Med Sport*, 2004, 7(1):11-22.
- [3] EISENMANN J C, BRISKO N, SHADRICK D, et al. Comparative analysis of the Cosmed Quark b2 and K4b2 gas analysis systems during submaximal exercise[J]. *Sports Med Phys Fitness*, 2003, 43(2):150-155.
- [4] 陈炳卿,主编.营养与食品卫生学[M].北京:人民卫生出版社,2001.
- [5] WEIR. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism[J]. *Physiol*, 1949, 109(1-2):1-9.
- [6] NIEMAN D C, AUSTIN M D, BENEZRA L, et al. Validation of cosmed's fitmate in measuring oxygen consumption and estimating resting metabolic rate[J]. *Research in Sports Medicine*, 2006, 14:1-8.

[收稿日期:2007-08-02]

中图分类号:R15;R333.6 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2007)06-0512-03

基金项目:珠海出入境检验检疫局科研项目(ZH2003-7)

作者简介:冯家望 男 工程师

specific genomic marker for *Vibrio cholera* and *tl* for *Vibrio parahaemolyticus*. The primer and Taqman probes were designed and synthesized for rapid detection and identification of pathogenic Vibrios and other closely related *Vibrio*. **Results** It is shown that the method could specifically identify *Vibrio cholera* and *Vibrio parahaemolyticus* and confirm whether they contain *tdh*、*tcpA* or *ctxA* virulence gene or not. The sensitivity of the assay was 10 CFU/ml or 0.171 6 μg/ml. **Conclusion** The real-time fluorescence PCR assay could have high sensitivity and specialty, and it could be well suited for detect *Vibrio cholera* and *Vibrio parahaemolyticus* in food.

Key word: Polymerase Chain Reaction; *Vibrio*; *Vibrio cholerae*; *Vibrio parahaemolyticus*; Virulence; Gene; Food

弧菌属(*Vibrio*)广泛分布于自然界,尤以水中为多,有 100 多种,主要致病菌为霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*),霍乱弧菌及副溶血性弧菌的检测目前以传统的培养方法为主,但操作繁琐,耗时长,不能适应快速检测(特别是出入境口岸)的要求。传统的 PCR 技术存在着耗时、易污染、易出现假阳性等缺点。实时荧光 PCR 具有操作简单、灵敏度高、不易污染等优点,并且可以在 PCR 结束或 PCR 过程中进行同步定性或定量检测。本研究选用霍乱弧菌的种特异性基因 *ompW*、毒力基因 *tcpA*、*ctxA* 和副溶血性弧菌的种特异性基因 *tl*、毒力基因 *tdh* 设计引物和 Taqman 荧光探针,建立实时荧光 PCR 检测体系,快速灵敏检测和鉴定非致病性和致病性霍乱弧菌与副溶血性弧菌。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 引物及探针 用 Primer Express2.0 设计引物和 Taqman 荧光探针,送由上海基康公司合成,详见表 1。

表 1 引物和 Taqman 探针

扩增基因	引物(探针)序列	扩增片段
<i>ompW</i>	5 - GCCCTACAAAAAGGAAAACG - 3	82 bp
	5 - GCAAAATACAGGACGGCTAGT - 3	
	FAM - TTTGCCTAGCCGTAICTTGCA GCC - TAMARA	
<i>ctxA</i>	5 - TCCGGAGCATAAGCTTGGA - 3	80 bp
	5 - TCGATGATCTTGGAGCATTCC - 3	
	FAM - CCGTGGATTTCATCATGCACCCGCCG - TAMARA	
<i>tcpA</i>	5 - TCTCATTCCACGAAACTCTGC - 3	86 bp
	5 - AACCAAAGTCTTACATTGTGCTTG - 3	
	FAM - TCAA GCCACCCGACTGTAATTGCCGAATGC - TAMARA	
<i>tl</i>	5 - CATTACTCCCGCTTGCTTCTG - 3	113 bp
	5 - CGGAACATAGGATAGGTTGGT - 3	
	FAM - TGCCGAAAGCCAACCTTATCACCAGAA - TAMARA	
<i>tdh</i>	5 - AATGGTGTGACATCTACATGACTG - 3	112 bp
	5 - ACTTGACCTGATTTTACGAACACA - 3	
	FAM - AATGACCCGCTCTTATA GCCAGACACCCG - TAMARA	

1.1.2 菌种 共 22 株,其中序号 1 到 14 的为标准菌株,序号 A 到 H 的为本实验室从实测样品中分离得到的菌株,来源、编号等见表 2。

1.1.3 试剂 DNA 裂解提取液为珠海科登生物有限公司产品;克隆试剂盒 pMD18 - T Vector、DNA Marker DL 2000、Ex Taq DNA 聚合酶、dATP、dUTP、dCTP、dGTP、PCR 缓冲液、MgCl₂,为宝生物(大连)有限公司产品。

1.1.4 仪器 LightCycler 荧光 PCR 仪, Roche 公司产品; Hema TGL - 18R 型高速台式离心机,珠海黑马公司产品; ND - 1000 型 DNA 浓度测定仪,美国 NanoDrop 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的制备及浓度测定 用 DNA 裂解提取液直接裂解制备, DNA 浓度测定仪测定浓度。

1.2.2 实时荧光 PCR 反应 利用设计的引物和探针在 LightCycler 荧光 PCR 仪上进行扩增,反应条件为 37 5 min, 95 3 min, 然后 95 15 s, 60 45 s, 40 个循环。

1.2.3 特异性实验 用 1.1.2 中标号 1 到 12 的细菌的 DNA 作为阴性对照,煮沸 10 min 后, 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为荧光 PCR 反应的模板。

1.2.4 灵敏性实验 将阳性对照菌液通过分光光度计测 A 值,估算每毫升菌液中的细菌数,然后 10 倍梯度稀释菌液,直到每微升中细菌个数达到个位数的数量级。然后在 LightCycler 荧光 PCR 仪上进行反应,以仪器能够检测到的最少细菌个数作为荧光 PCR 反应体系的灵敏度。

测定阳性对照模板 DNA 浓度, 10 倍梯度稀释至 10⁻⁸ (0.017 16 pg/μl), 然后在 LightCycler 荧光 PCR 仪上进行反应。

1.2.5 目的基因克隆和测序 用大肠杆菌 JM109 进行感受态细胞的制备^[2,3], 连接、转化等参照说明书进行。测序委托上海博亚生物技术有限公司进行。

2 结果

2.1 反应的特异性 利用自行建立的荧光 PCR 反应体系对不同引物和探针进行实时检测,所选用的引物均具有很好的特异性。

表2 实验用菌种详情表

序号	菌种名称	拉丁学名	编号	来源 ^a	备注
1	溶藻弧菌	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1. 1833	D	
2	费氏弧菌	<i>Vibrio furnissii</i>	1. 1612	D	
3	河弧菌	<i>Vibrio fluvialis</i>	总 10 - 90	E	
4	宋内志贺菌	<i>Shigell sonnei</i>	51334	A	
5	嗜热链球菌	<i>Streptococcus thermophilus</i>	CCTCCAB200049	B	
6	乙型副伤寒沙门菌	<i>Salmonella paratyphi B</i>	CCTCCAB94008	B	
7	绿脓杆菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCTCCAB91095	B	
8	蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	CCTCCAB92023	B	
9	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CCTCCAB94006	B	
10	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	CCTCCAB200068	B	
11	单增李斯特杆菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	CCTCCAB97021	B	
12	副溶血性弧菌	<i>V. parahaemolyticus</i>	VPL4 - 90	C	
13	霍乱弧菌	<i>V. cholerae</i>	17020	A	
14	白色念珠菌	<i>Candida albicans</i>	2. 2086(02. 4)	D	
A	副溶血性弧菌	<i>V. parahaemolyticus</i>			自备分离菌株
B	副溶血性弧菌	<i>V. parahaemolyticus</i>			自备分离菌株
C	副溶血性弧菌	<i>V. parahaemolyticus</i>			自备分离菌株
D	副溶血性弧菌	<i>V. parahaemolyticus</i>			自备分离菌株
E	霍乱弧菌	<i>V. cholerae</i>			自备分离菌株
F	霍乱弧菌	<i>V. cholerae</i>			自备分离菌株
G	霍乱弧菌	<i>V. cholerae</i>			自备分离菌株
H	霍乱弧菌	<i>V. cholerae</i>			自备分离菌株

注 :a 表示 A 来源为中国微生物菌种保藏管理委员会医学细菌中心 ;B 为中国典型培养物保藏中心 ;C 为中国科学院广州微生物研究所 ;D 为中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心 ;E 为上海市疾病预防控制中心。

2.1.1 *tl* 引物的特异性实验 阳性模板(副溶血性弧菌标准菌株,序号 12)和自备分离菌株(序号 A - D)的荧光呈“S”形增长,而其他 13 种标准菌株(序号 1 - 11,13,14)和空白对照荧光值基本没有变化,都是阴性(图 1),表明 *tl* 引物具有很好的种特异性。

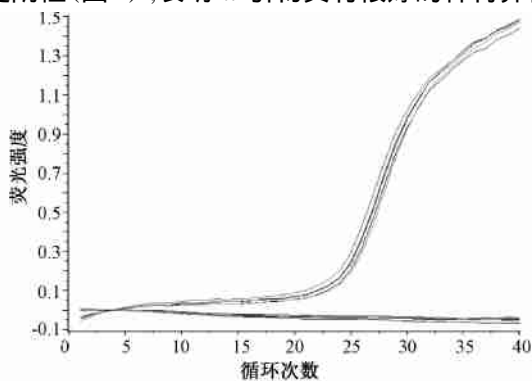


图 1 荧光 PCR 反应检测 *tl* 引物的反应曲线图

2.1.2 *tdh* 引物的特异性实验 阳性模板(12)和 B、C 2 株自备副溶血性弧菌荧光呈“S”形增长,而其他 13 种菌株(1 - 11,13,14)、A、D 两株自备副溶血性弧菌和空白对照荧光值基本没有变化,都是阴性(图 2)。

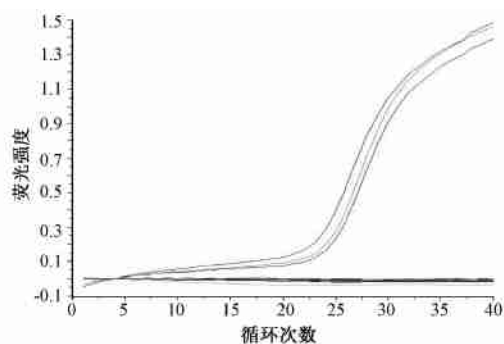


图 2 荧光 PCR 反应检测 *tdh* 引物的反应曲线图

2.1.3 *ompW* 引物的特异性实验 阳性模板(13)和 4 株自备霍乱弧菌荧光呈“S”形增长,而其他 13 种菌株(1 - 12,14)和空白对照荧光值基本没有变化,都是阴性(图 3),*ompW* 引物具有很好的种特异性。

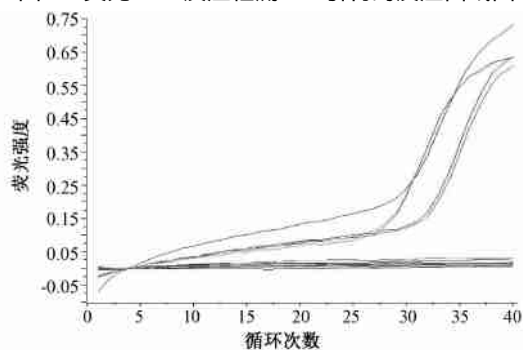


图 3 荧光 PCR 反应检测 *ompW* 引物的反应曲线图

2.1.4 *tcpA* 引物的特异性实验 阳性模板(13)和自备霍乱弧菌 E 菌株荧光呈“S”形增长,而其他 13 种菌株(1 - 12,14)、F、G、H 3 株自备霍乱弧菌和空白对照荧光值基本没有变化,都是阴性(图 4)。

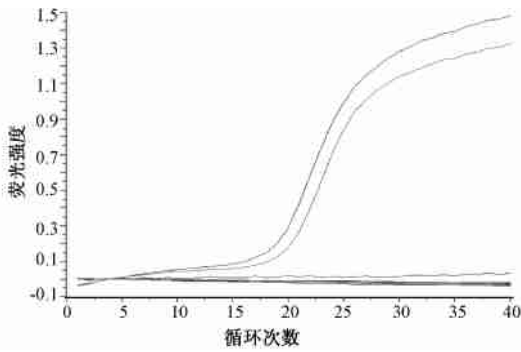


图 4 荧光 PCR 反应检测 *tcpA* 引物的反应曲线图

2.1.5 *ctxA* 引物的特异性实验 阳性模板 (13) 和自备霍乱弧菌 E 菌株荧光呈“S”形增长,而其他 13 种菌株 (1 - 12, 14)、F、G、H 3 株自备霍乱弧菌和空白对照荧光值基本没有变化,都是阴性 (图 5)。

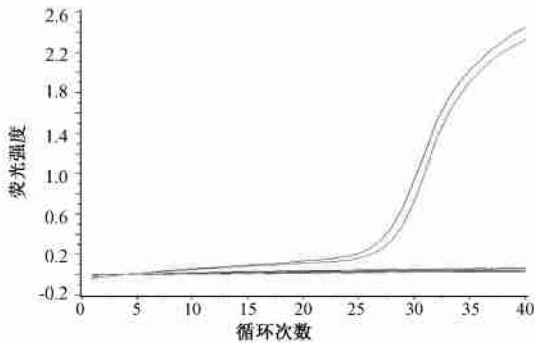


图 5 荧光 PCR 反应检测 *ctxA* 引物的反应曲线图

2.2 反应的灵敏度 选取副溶血性弧菌 *tdh* 和 *tl* 引物分别作细菌模板 DNA 浓度和细菌个数灵敏度实验。

2.2.1 细菌模板 DNA 浓度灵敏度试验 用 Nanodrop 分光光度计确定细菌模板 DNA 浓度为 1 716 ng/μl,作 10 倍梯度稀释,从图 6 可知该荧光 PCR 检测体系可检测到 10^{-7} (0.171 6 pg/μl),即细菌模板 DNA 浓度灵敏度为 0.171 6 pg/μl,所得校正曲线 (图 7)表明 DNA 含量与 C_t 值之间是线性关系,曲线斜率为 - 3.752,方差系数 (R^2) 为 0.999 3。

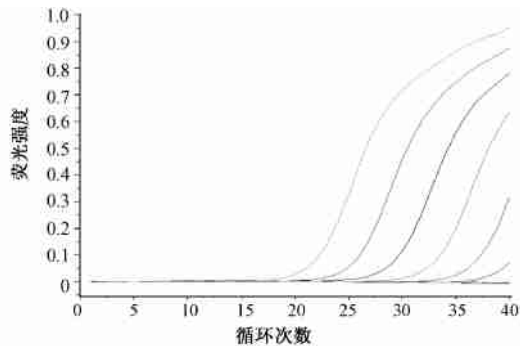


图 6 荧光 PCR 细菌模板 DNA 浓度灵敏性反应曲线图

2.2.2 细菌菌落数灵敏度试验 细菌菌落数 10 倍梯度稀释之后进行荧光 PCR,结果见图 8,浓度大于

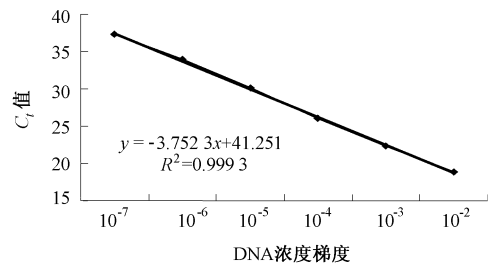
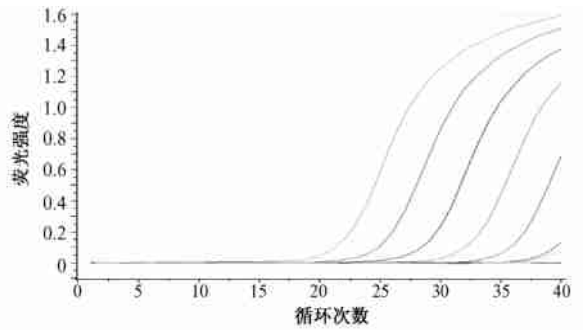


图 7 校正曲线



细菌浓度梯度从左到右依次是 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1

图 8 荧光 PCR 细菌浓度灵敏性反应曲线图

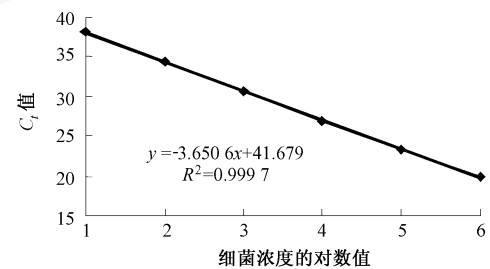


图 9 校正曲线

10 CFU/ml 的全部是阳性,小于 10 CFU/ml 的是阴性,即该荧光 PCR 检测体系可以达到检测 10 CFU/ml 细菌的灵敏度,所得校正曲线 (图 9) 表明细菌菌落数与 C_t 值之间是线性关系,曲线斜率为 - 3.650 6,方差系数 (R^2) 为 0.999 7。

2.3 荧光 PCR 产物克隆测序结果 副溶血性弧菌 *tl*、*tdh* 基因和霍乱弧菌 *ompW*、*tcpA*、*ctxA* 基因的扩增片段分别为 113、112、82、86 和 80 bp。克隆载体测序结果在 GenBank 中进行序列比对,同源性依次为 93 %、97 %、91.46 %、100 % 及 100 %。

3 讨论

食品中霍乱弧菌的检测目前尚无国家标准,检测方法主要是依据卫生部“霍乱防治手册”中的培养法^[4],以及 SN/T 1022—2001 行业标准“出口食品中霍乱弧菌的检测方法”^[5]进行,上述二种方法的检测时间为 5~10 d,对于急性肠道传染病而言,时间过长,另外也不利于进出口食品要求的快速检测。该方法的灵敏度有限^[6],并且由于霍乱弧菌在生化反

实验技术与方法

弯曲菌菌种冷冻保存及复苏方法的研究

骆海朋 陈倩

(北京市疾病预防控制中心,北京 100013)

摘要:目的 探索一种简单、方便、有效的弯曲菌菌种保存方法。方法 采用含30%甘油的脑心浸液肉汤,将实验室保存的19株弯曲菌于-30℃和-70℃分别保存,每个菌株3个菌种管。1年后,采用5%脱纤维羊血的布氏肉汤进行增菌,然后转种哥伦比亚血平板,比较存活效果。结果 -30℃条件下采用多管法保存弯曲菌可以获得与-70℃条件下保存相当的效果。结论 采用多管法(每株菌3个菌种管)于-30℃冷冻保存弯曲菌是一个简单、方便、有效、实用的方法。

关键词:弯曲杆菌属;保存;生物学;低温保存

Studies of Methods of Freezing Storage of Campylobacter and Recovery of Frozen Storage Strain

LUO Hai-peng, CHEN Qian

(Beijing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China)

Abstract: **Objective** To find an easy and effective method for the storage of campylobacter. **Method** Campylobacter strains were stored in the content of 30% glycerine brain heart broth. 19 isolates were used in this study and stored at -30℃ and -70℃ and every strain had 3 copies. After one-year store, the frozen strains were recovered in the content of 5% sheep blood preston broth for 24 hours, and then were subcultured on the Columbia blood plate. **Results** In one-year store, the storage of the strains in the temperature of -30℃ had the same effect as the storage of strains in the temperature of -70℃. **Conclusion** The method of storage of campylobacter in multi tubes in the temperature of -30℃ may be an easy and effective method.

Key word: Campylobacter; Preservation, Biological; Cryopreservation

应、毒素、噬菌体敏感性、药敏性等方面都存在一定的变异^[7],易于造成漏检。食品中的霍乱弧菌含量相对较少,且有一定程度的损伤和(或)抑制,致使检测更加困难。副溶血性弧菌的检测同样存在着上述类似的问题。荧光PCR的高灵敏度、高特异性,特别是如果从食品样品直接提取DNA则3h左右能出结果的快速性,能有效地解决以上困难,很好地满足对食品中致病性弧菌快速检测的需要。

参考文献

[1] 郁庆福. 现代卫生微生物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995, 1401.

[2] F. 奥斯伯, R. E. 金斯顿, R. 布伦特, 著. 颜子颖, 王海林, 译. 精

编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2001, 22-23, 104-105.

[3] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔, 著. 黄培堂, 汪嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京:科学出版社, 2002, 68-105, 618-628.

[4] 卫生部疾病控制司霍乱防治手册编写组. 霍乱防治手册[M]. 第5版:北京:卫生部疾病控制司, 1999.

[5] SN/T 1022—2001. 出口食品中霍乱弧菌检验方法[S].

[6] 王家豪. PCR技术应用于霍乱监测的效果探讨[J]. 中国公共卫生学报, 1999, 18(5): 260-262.

[7] 蒋小皖. O139霍乱弧菌生物学特性分析[J]. 江苏预防医学, 1999, 10(4): 28-29.

[收稿日期:2007-07-25]

中图分类号:R15;Q93-33;R446.5 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2007)06-0514-05

作者简介:骆海朋 男 主管技师 硕士