

论著

活的非可培养状态副溶血性弧菌实时荧光逆转录 PCR 检测方法的建立及其毒力研究

刘静宇<sup>1</sup>, 凌莉<sup>1</sup>, 邓翼惠<sup>2</sup>, 易敏英<sup>1</sup>, 胡科锋<sup>1</sup>, 陈碧玲<sup>1</sup>

(1. 广东出入境检验检疫局技术中心, 广东 广州 510623; 2. 深圳市龙岗区平湖预防保健所, 广东 深圳 518111)

**摘要:**目的 建立检测活的非可培养(VBNC)状态副溶血性弧菌的荧光逆转录 PCR 方法并研究其毒力基因表达。方法 将副溶血性弧菌 AS079 菌株添加到陈化海水中, 4℃ 冰箱内培养, 使其进入 VBNC 状态, 针对其管家基因、鉴定基因和毒力基因分别设计实时荧光逆转录 PCR 引物, 通过不同的 PCR 反应程序和引物浓度组合试验, 摸索最佳反应体系条件, 用于 VBNC 状态副溶血性弧菌的检测和毒力研究。结果 用所建立的检测 VBNC 状态副溶血性弧菌的实时荧光逆转录 PCR 方法, 对接种于陈化海水培养的不同时期的 AS079 副溶血性弧菌进行荧光定量逆转录 PCR 扩增, 结果显示, 随着培养时间的延长, 毒力基因 *tdh2* 和鉴定基因 *toxR* 表达水平持续下降, 但即使细菌进入 VBNC 状态, 这两个基因也能够得到很好的扩增, 说明以 *toxR* 基因和 *tdh2* 基因对进入 VBNC 状态的副溶血性弧菌进行检测和毒力研究方法可行。灵敏度试验表明, 鉴定基因 *toxR* 的最低检测限可达到 48 cfu/ml, 研究毒力基因 *tdh2* 的表达需要细菌浓度至少为  $4.8 \times 10^2$  cfu/ml, 同时试验证明此方法与其他相近食源性致病菌无交叉反应。结论 该实时荧光逆转录 PCR 方法检测快速、特异性强、敏感度高, 适用于 VBNC 状态副溶血性弧菌的检测和毒力分析。

**关键词:** 副溶血性弧菌; 活的非可培养; 实时荧光逆转录 PCR; 毒力基因; 食源性致病菌

中图分类号: R155. 5; TS201. 6 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)04-0309-07

Determination and analysis of potential virulence of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*

LIU Jing-yu, LING Li, DENG Yi-hui, YI Min-ying, HU Ke-feng, CHEN Bi-ling

(Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Guangzhou 510623, China)

**Abstract: Objective** To establish a real time RT-PCR method to detect VBNC *Vibrio Parahaemolyticus* and study the expression of virulence gene. **Methods** *V. parahaemolyticus* strain AS079 was induced into VBNC state by culturing in artificial seawater at 4℃. Real-time RT-PCR primers were designed for the *toxR*, *pvuA* and *tdh2* gene. Various PCR protocol and primer concentration combinations were tested to optimize the PCR procedures for VBNC *V. parahaemolyticus* as well as virulence analysis. *V. parahaemolyticus* AS079 samples collected after various periods of incubation were analyzed using real-time RT-PCR method established in this study. **Results** The result indicated that the expression levels of virulence gene *tdh2* and identification gene *toxR* decreased over incubation in artificial seawater. However, both genes were clearly detectable even after the bacteria had entered VBNC state, suggesting that the method could be used for detection and virulence analysis of *V. parahaemolyticus* under VBNC state. The sensitivity test showed that the detection limit for identification gene *toxR* was 48 cfu/ml; whereas evaluating the expression of virulence gene *tdh2* required  $4.8 \times 10^2$  cfu/ml at least. Meanwhile, no cross-reaction with other closely related food-borne pathogens had been found. **Conclusion** The real-time RT PCR method established in this study had advantages of fast detection, high specificity and sensitivity, and was suitable for detection and virulence analysis of VBNC *V. parahaemolyticus*.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; viable but nonculturable state; real time RT-PCR; virulence gene; food-borne pathogen

活的非可培养(viable but nonculturable state,

VBNC)状态指细菌处于不良环境条件时, 常规方法培养不能使其生长繁殖, 但仍具有代谢活性的一种特殊生理状态。它是细菌的一种特殊存活形式, 处于该状态的病原菌, 在一定条件下可以复苏并具有潜在的致病性<sup>[1]</sup>。副溶血性弧菌(*Vibrio parahemolyticus*)是一种嗜盐性弧菌, 常存在于海产

收稿日期: 2013-05-09  
基金项目: 广东省科技计划项目(2011B031500012); 广东检验检疫局科技计划项目(2010GDK30)  
作者简介: 刘静宇 女 高级工程师 研究方向为食品安全  
E-mail: liujingyu2002@163.com

品以及盐分较高的腌制食品中,在低温寡营养条件下极易进入 VBNC 状态,造成常规检验方法漏检,在我国,由副溶血性弧菌引起的食物中毒居细菌性食源性疾病之首<sup>[2]</sup>。因此,研究一种快速、准确检测食品中 VBNC 状态副溶血性弧菌及其毒力的方法,对于保证食品安全,保障人民生命健康具有重要的意义。

对于 VBNC 状态细菌的检测,目前常用的方法有经典方法和荧光染料直接检测法。但这些方法检测的都是细菌总数,无法检测自然环境中某种特定的致病菌,经典方法在很大程度上还受其他一些因素影响因而并不完全可靠,荧光染料直接检测法的各类染料都存在强烈的致癌作用,且价格较高<sup>[3-4]</sup>。本研究利用 mRNA 是存活细胞的中心标志,在死亡细胞中降解的特点<sup>[5-6]</sup>,通过检测副溶血性弧菌的 mRNA,特异性的检测 VBNC 状态下的副溶血性弧菌,并监测其毒力基因的表达情况,为评估其致病力大小提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

PSS 核酸自动提取仪、Biometra UNO II PCR 扩增仪、ABI 7300 定量荧光 PCR 扩增仪、BD FACSCanto II 分析型流式细胞仪。

LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability and Counting Kit (L34856) (Invitrogen 公司)、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo 公司)、Magtration-MagaZorb RNA Common Kit (艾拓思公司)、荧光 PCR 试剂盒、*Taq* 酶和 dNTP、100 bp ladder DNA Marker、副溶血性弧菌 AS079 菌株由本实验室保藏。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 VBNC 状态下副溶血性弧菌 AS079 的获得

##### 1.2.1.1 陈化海水的配制

在无菌水中加入海盐,配制成 3.3% 的人工海水, pH 调节至 8.0,经 0.22 μm 的滤膜过滤,分装成 200 ml/瓶,115 ℃ 20 min 高压灭菌后,置于 4 ℃ 冰箱陈化 5 d,备用。

##### 1.2.1.2 副溶血性弧菌 VBNC 状态的诱导及平板计数

将复壮后的副溶血性弧菌划线接种于 TCBS 平板,挑取 TCBS 平板上的单个菌落于 30 ml APW 肉汤中(36 ± 1) ℃ 纯培养 24 h 后,4 ℃ 4 500 r/min 离心 10 min,弃去上清液。用 5 ml 陈化后的人工海水清洗沉淀,再 4 ℃ 4 500 r/min 离心 10 min,弃去上清液。5 ml 陈化海水清洗沉淀两次后将沉淀加入

200 ml 的陈化海水中,置于 4 ℃ 冰箱保存。新制样本当天立即取 1 ml 于 9 ml 生理盐水中作 10 倍梯度稀释,每稀释度取 1 ml 菌液接种含 3% 氯化钠的 TSA 平板,选择合适的稀释度计算平板菌落数。此菌落数为样本的原始接种量。之后每隔 7 d 以同样的操作对样本进行平板菌落计数。直至常规培养条件下平板菌落计数为 0,表明细菌已经进入 VBNC 状态。

#### 1.2.2 引物的选择和合成

通过查找文献和 GenBank 获得副溶血弧菌 *toxR* 基因(序列号: AB029908.1)、*pvuA* 基因(序列号: DQ141608.1)和 *tdh2* 基因(序列号: JQ074090.1)的 DNA 序列,采用 DNASTar 软件中的 Seqman 进行同源性分析,确定在副溶血弧菌菌株内保守、其他菌株间特异的片段,并查找文献获得针对该保守片段设计的引物。通过 GenBank 数据库进行同源性比较分析,证实所选的引物对副溶血性弧菌具有高度特异,其序列和特征见表 1。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

表 1 实时荧光逆转录 PCR 检测引物

Table 1 Real time RT-PCR primers		
引物和探针	序列(5'-3')	扩增片段大小/bp
<i>pvuA</i> FP	CAAACTCACTCAGACTCCA	156
<i>pvuA</i> RP	CGAACCGATTCAACAGC	
<i>tdh2</i> FP	CAACTTTTAATACCAATGCAC	129
<i>tdh2</i> RP	GCCATTTAGTACCTGACG	
<i>toxR</i> FP	GCGACCTTCTCTGAAATATTAATTGT	90
<i>toxR</i> RP	CATTGCGGTGGCAACATC	

#### 1.2.3 引物特异性测试

以 7 株副溶血性弧菌 VPL4、ATCC17802、VP15、VP14、AS079、AS073、AS072 和 11 株相近的标准菌株:伤寒沙门氏菌 CMCC50071、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、志贺氏菌 CMCC51334、志贺氏菌 NICPBP51252、假结核耶尔森氏菌 CMCC53510、小肠耶尔森氏菌 CMCC52207、创伤弧菌 ATCC27562、阪崎肠杆菌 ATCC29544、大肠杆菌 ATCC25922、大肠杆菌 ATCC8739、大肠杆菌 CMCC44102 的基因组 DNA 为模板分别进行普通 PCR 扩增来检测引物的特异性。

#### 1.2.4 普通 PCR 扩增

采用 Taqmix 试剂盒进行 PCR 扩增,反应体系及反应条件参照说明书进行。PCR 反应体系的构成如下:2 × PCRMix 12.5 μl; *Tag* 酶 0.5 μl; Primer P1 (10 μmol/L) 1 μl; Primer P2 (10 μmol/L) 1 μl; DNA 模板 1 μl; H<sub>2</sub>O 9 μl。反应条件为 95 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min 30 个循环; 72 ℃ 10 min。

#### 1.2.5 死/活细胞计数

死/活细胞计数采用 LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight

Bacterial™ Viability and Counting Kit 进行。取 1 ml 样品, 10 319 r/min 离心 5 min, 弃上清获得细胞沉淀; 加 1 ml 0.85% 的 NaCl 洗涤细胞, 10 319 r/min 离心 5 min, 弃上清获得细胞沉淀; 加 1 ml 0.85% 的 NaCl 溶液重新悬浮细胞, 备用。在流式管中加入 977 μl 0.85% 的 NaCl 溶液, 然后分别加入 1.5 μl 3.34 mmol/L 的 SYTO9 和 1.5 μl 30 mmol/L 的 PI 染料, 加入 10 μl 的细胞样品, 室温避光孵育 15 min。最后, 加入 10 μl 含有荧光标记的微球, 充分悬浮混匀后在流式细胞仪上检测。

1.2.6 实时荧光逆转录 PCR 检测方法的建立

1.2.6.1 cDNA 模板的制备

菌液 RNA 用 Magratron-MagaZorb RNA Common Kit 在 PSS 核酸自动提取仪上完成, 逆转录使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 完成。逆转录反应体系为: 1 μg 总 RNA; 2 μl Random hexamer primer; 8 μl 5 × Reaction buffer; 2 μl Rnase inhibitor; 4 μl 10 nmol/L dNTP; 2 μl Reverse transcriptase, 补充 DEPC 水至 40 μl。逆转录反应条件为 25 ℃ 5 min; 42 ℃ 60 min; 70 ℃ 5 min, 得到的样品 cDNA 于 -20℃ 保存备用。

1.2.6.2 PCR 扩增条件的建立

扩增和检测在 ABI-7300 实时荧光定量 PCR 仪器上进行, 采用上海生工生物工程公司的 Green-2-Go qPCR mastermix 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 检测。各种试剂的加样量分别为每个反应管中含有 10 μl Green-2-Go Mastermix; 2 μl 逆转录后的 cDNA 模板; 适当的上下游扩增引物, 用 DEPC 水补足到反应总体积 20 μl。以逆转录 cDNA 作为阳性

模板, 将引物浓度设为 300 nmol/L, 将退火和延伸温度设定为同一温度, 选择 56、58 和 60 ℃ 3 个退火延伸温度, 使用两步法进行实时荧光逆转录 PCR 扩增测试, 选择最佳退火延伸温度。

1.2.6.3 最佳引物浓度测试

应用已建立的荧光 PCR 扩增条件, 以逆转录 cDNA 作为阳性模板, 分别选择 100、200、300、400 和 500 nmol/L 的引物浓度进行荧光 PCR 扩增来选择最佳引物浓度。

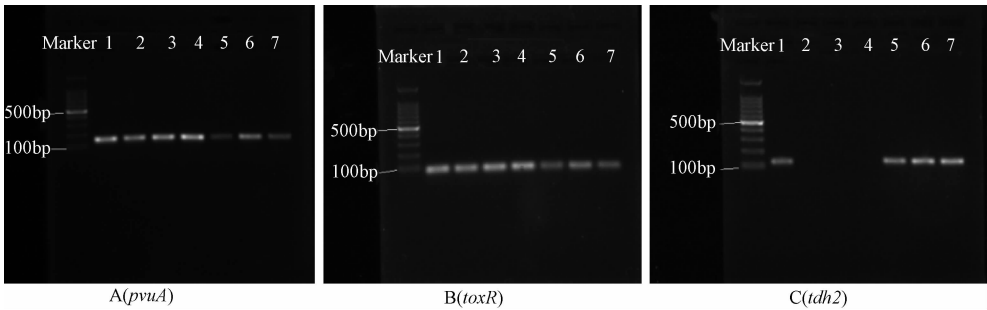
1.2.6.4 检测灵敏度试验

用陈化海水培养 83 d 进入 VBNC 状态的副溶血性弧菌为检测样品, 此时每毫升菌液含有 VBNC 细菌 483 871 个, 对其进行 10 倍系列稀释 ( $4.8 \times 10^0$  cfu/ml ~  $4.8 \times 10^5$  cfu/ml), 按照优化好的反应体系和反应程序检测实时荧光逆转录 PCR 方法的灵敏度。

2 结果

2.1 引物的特异性检测

利用本研究采用的针对副溶血性弧菌 *toxR*、*pvuA* 和 *tdh2* 基因的引物, 以 7 株副溶血性弧菌 VPL4、ATCC17802、VP15、VP14、AS079、AS073、AS072 和 11 株相近菌株的基因组 DNA 为模板, 分别进行普通 PCR 扩增。结果显示, 只有副溶血弧菌可扩增出与预期大小一致的扩增条带 (图 1), 而其它相近菌株均没有特异性扩增产物 (图 2), 表明方法选择的引物特异性良好。菌株 ATCC17802、VP15、VP14 不含有毒力基因 *tdh2*, 所以在图 1C 中未见扩增条带。



注: 电泳条带顺序从左至右分别为 100 bp Ladder Marker, 1: VPL4, 2: ATCC17802, 3: VP15, 4: VP14, 5: AS079, 6: AS073, 7: AS072。

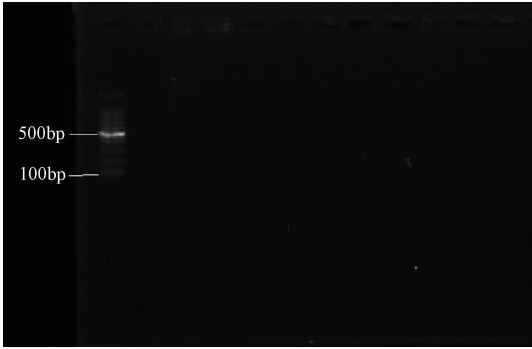
图 1 A、B、C 分别为 7 株副溶血性弧菌的 *pvuA*、*toxR* 和 *tdh2* 基因的 PCR 扩增结果

Figure 1 Agarose gel electrophoresis analysis on PCR products for gene *pvuA* (A), *toxR* (B), and *tdh2* (C) from 7 stains of *V. parahaemolyticus*

2.2 细菌计数结果

将接种到陈海水中的副溶血性弧菌置于 4 ℃ 的冰箱中培养, 由于海水中的有机物含量很低, 又处于低温条件下, 细菌不能正常地生长繁殖, 可培

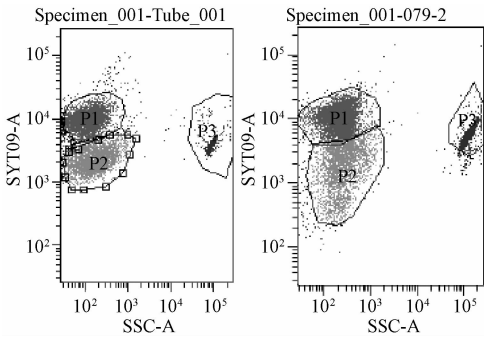
养的细菌数逐渐下降, 在第 69 天的时候平板计数结果为零, 说明此时细菌已经进入 VBNC 状态。流式细胞仪检测发现 (图 3), 虽然第 69 天后细菌在平板上都不能生长, 但是 7.4% 的细菌还处于存



注:从左至右分别为 100 bp Ladder Marker、CMCC50071、ATCC14028、CMCC51334、NICPBP51252、CMCC53510、CMCC52207、ATCC27562、ATCC29544、ATCC25922、8ATCC8739、CMCC44102。

图 2 11 株相近菌株的 *toxR* 基因的 PCR 扩增结果  
Figure 2 Agarose gel electrophoresis analysis on PCR product for gene *toxR* from 11 closely related bacterial strains

活状态。在整个试验过程中,细菌总数基本保持不变(图 4)。



注:P1 为活细胞;P2 为死细胞;P3 为计数磁珠。

图 3 流氏细胞仪检测图

Figure 3 Result of flow cytometry

### 2.3 副溶血性弧菌实时荧光逆转录 PCR 检测体系的建立

#### 2.3.1 最佳扩增程序的确定

用逆转录 cDNA 作为荧光 PCR 扩增的模板,以

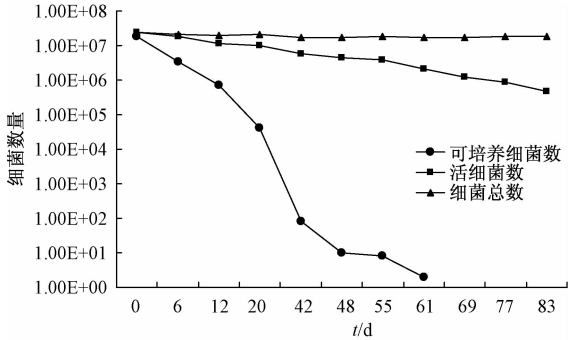


图 4 副溶血性弧菌的生长曲线

Figure 4 Growth curve of *V. parahaemolyticus*

300 nmol/L浓度的引物,将退火和延伸温度设定为同一温度,使用两步法进行实时荧光逆转录 PCR 扩增。在反应程序的退火延伸条件选择 3 个温度,结果显示在 56、58 和 60 ℃ 3 个退火延伸温度的扩增程序下,*tdh2*、*pvuA* 和 *toxR* 3 个基因均可见阳性扩增曲线,随着退火和延伸温度的提高,Ct 值增大(图 5)。56、58 和 60 ℃ 3 个退火延伸温度下的 Ct 值分别为 15.46、17.81 和 19.74。最后确定扩增程序为:95 ℃ 10 min;95 ℃ 15 s,58 ℃ 60 s,40 个循环。

#### 2.3.2 最佳引物浓度的确定

应用 2.3.1 的反应程序,分别选择引物浓度 100、200、300、400、500 nmol/L 进行扩增。以 Ct 值最小,扩增曲线也较明显的曲线所对应的引物浓度为最佳浓度。最终确定 *tdh2* 的引物浓度为 300 nmol/L,*pvuA* 的引物浓度为 300 nmol/L,*toxR* 的引物浓度为 400 nmol/L(图 6)。

#### 2.3.3 溶解曲线分析

为了证明反应体系中扩增片段的特异单一性,在 PCR 反应结束后进行溶解曲线分析。溶解曲线结果表明,*tdh2*、*pvuA*、*toxR* 都只有单一的溶解峰,说明在建立的反应体系中 3 个基因扩增的是单一特异产物(图 7)。

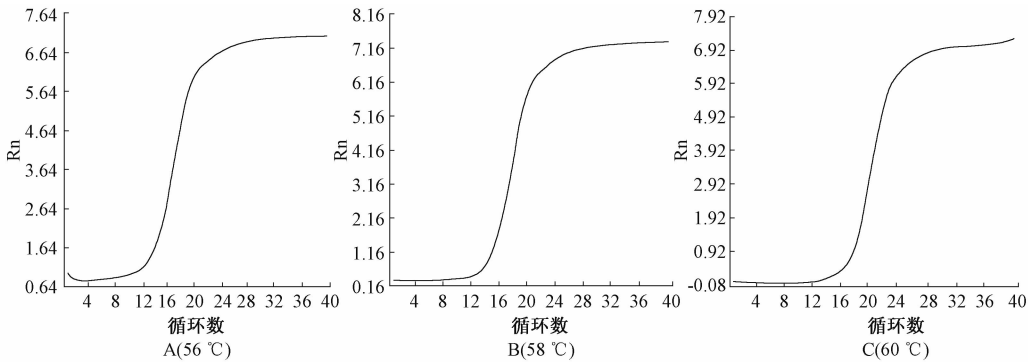


图 5 A、B、C 分别代表不同退火温度下的实时荧光逆转录 PCR 扩增曲线

Figure 5 Real time RT-PCR amplification curves at various annealing temperatures.

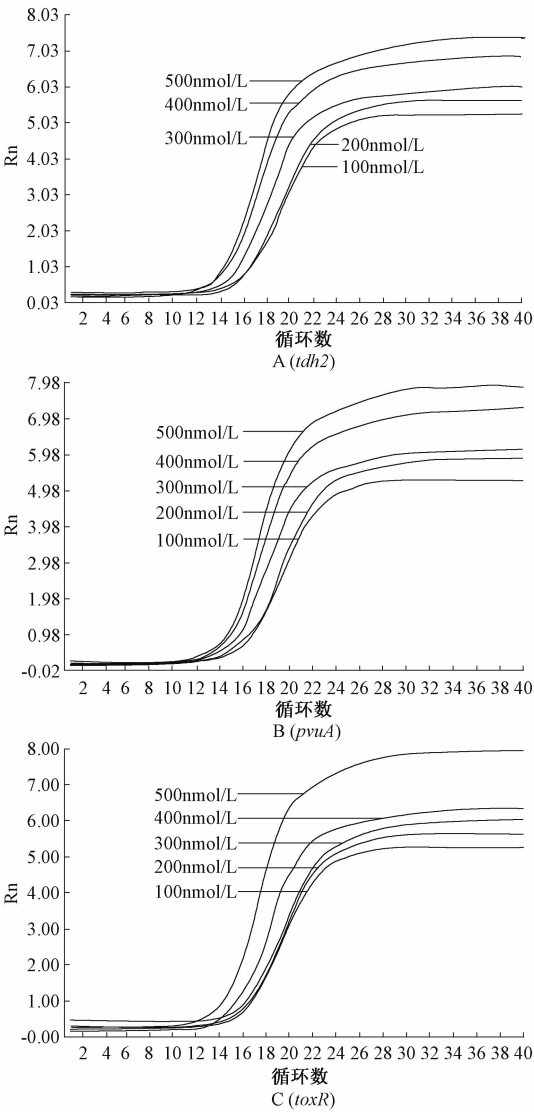


图6 不同引物浓度下的实时荧光逆转录 PCR 结果  
Figure 6 Real time RT-PCR amplification curves with different primer concentrations for *tdh2* gene(A), *pvuA* gene(B) and *toxR* gene(C)

2.3.4 检测灵敏度试验

灵敏度试验结果表明, *pvuA* 基因即使菌液稀释到  $4.8 \times 10^0$  cfu/ml 时仍然能够出现明显的扩增曲线(图 8A)。*toxR* 基因在  $4.8 \times 10^1$  cfu/ml 时才能有明显扩增(图 8B), 而 *tdh2* 基因需要细菌浓度达到

$4.8 \times 10^2$  cfu/ml 时才能得到扩增(图 8 C)。因此, 以 *toxR* 作为进入 VBNC 状态细菌的鉴定指标, 其检测限为 48 cfu/ml。

2.4 实时荧光逆转录 PCR 检测 VBNC 状态下的副溶血性弧菌及其毒力基因表达变化

根据以上优化的 PCR 扩增条件, 分别取 4 ℃ 陈化海水中培养不同时间的副溶血性弧菌提取 mRNA 并反转录为 cDNA 为模板进行实时荧光逆转录 PCR 扩增。以 *pvuA* 作为内参, 对 *tdh2* 和 *toxR* 基因在不同时期的表达情况进行相对定量分析。结果表明, *toxR* 和 *tdh2* 基因表达水平从试验处理第 6 天开始下降。但其中 *toxR* 基因一直处于相对比较高的表达量, 即使是第 61 天进入 VBNC 状态以后, *toxR* 的表达也没有很明显的变化。与 *toxR* 不同, 毒力基因 *tdh2* 在试验处理条件下处于持续下降状态, 特别是进入 VBNC 状态后其基因表达迅速下降, 但是在我们建立的反应体系中仍然能够很好地得到扩增, 试验结果见表 2、3 和图 9。

表2 副溶血性弧菌 *tdh2* 基因表达的相对定量荧光 PCR 检测结果

Table 2 Real time RT-PCR relative quantification results of <i>tdh2</i> expression level in <i>V. parahaemolyticus</i>			
时间/d	Ct	ddCt	2 <sup>-ddCt</sup>
0	16.32	0.000	1.000
6	17.96	0.631	0.650
12	17.12	0.811	0.570
20	18.36	1.152	0.450
42	18.95	1.434	0.370
48	18.97	1.358	0.910
55	19.02	1.431	0.370
61	20.36	30.589	0.120
69	20.52	2.9434	0.130
77	20.34	3.0589	0.120
83	20.99	3.3219	0.100

3 讨论

VBNC 状态是细菌在不良条件下的一种生存方式。VBNC 状态作为细菌的一种生理状态, 对传统微生物学产生了深远的影响。进入 VBNC 状态的细

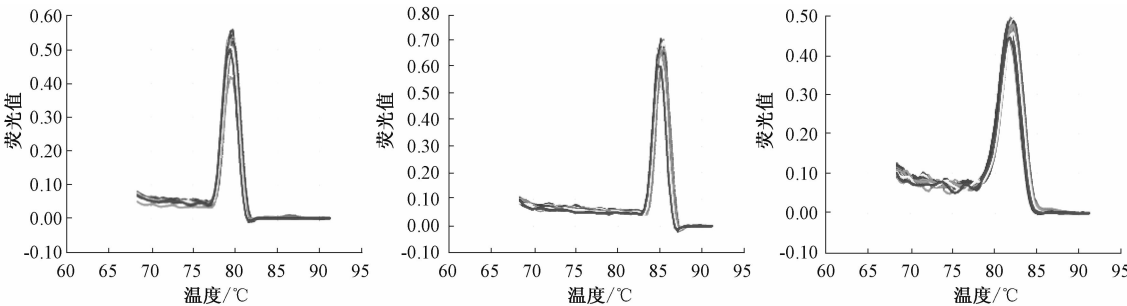
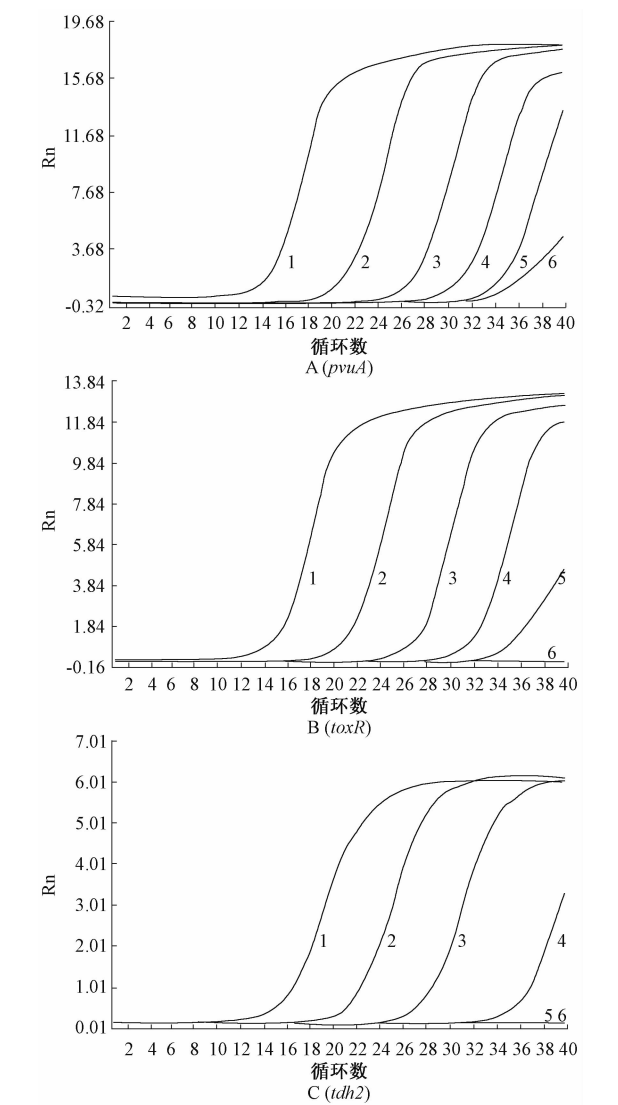


图7 PCR 溶解曲线分析结果  
Figure 7 PCR product melting curves



注:1~6 分别代表菌液浓度为  $4.8 \times 10^5 \sim 4.8 \times 10^9$  cfu/ml 时的 PCR 扩增曲线。

图 8 实时荧光逆转录 PCR 检测不同浓度菌液的扩增曲线  
Figure 8 Real time RT-PCR amplification curves of *pvuA* (A), *toxR* (B) and *tdh2* (C) from bacterial samples with different cell concentration

表 3 副溶血性弧菌 *toxR* 基因表达的相对定量荧光 PCR 检测结果

Table 3 Real time RT-PCR relative quantification results of <i>toxR</i> expression level in <i>V. parahaemolyticus</i>			
时间/d	Ct	ddCt	2 <sup>-ddCt</sup>
0	15.70	0.000	1.000
6	16.31	0.286	0.820
12	13.39	0.340	0.790
20	17.25	0.494	0.710
42	18.35	0.863	0.550
48	18.36	0.889	0.540
55	18.96	1.0291	0.490
61	19.06	1.000	0.500
69	19.36	1.059	0.480
77	19.59	1.089	0.470
83	19.85	1.152	0.450

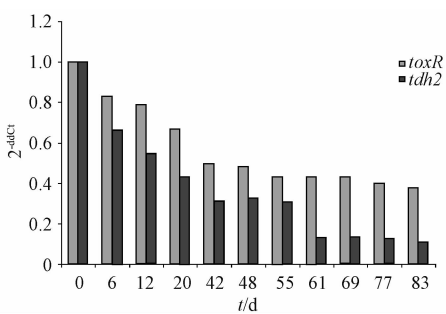


图 9 不同时间内 *toxR*、*tdh2* 基因表达定量结果柱状图  
Figure 9 Relative quantification results of *toxR* and *tdh2* gene expression level

胞发生了一系列变化,无法继续用常规培养方法检测。细菌 VBNC 状态的发现在医学健康、环境科学等领域产生了巨大的影响,对改进检测方法具有重要的意义<sup>[7]</sup>。

利用分子手段检测细菌已经成为一种趋势,目前基于 PCR 的各项技术已被广泛地应用到 VBNC 状态细菌的检测之中,因为当细菌处于 VBNC 状态时,仍能启动某些基因使其表达。但普通的以 DNA 为基础的 PCR 检测手段无法区分细胞的死活,死细胞或自由状态的 DNA 已经没有危害性却仍然可以被检测出来,导致假阳性结果。而 mRNA 由于在细胞代谢中的中心地位及其非常短暂的半衰期,被认为是细胞存活的一个很好的标志。死细胞中的 mRNA 很快降解,信号随即消失,因此 mRNA 的检测可作为判断细胞死活的标准之一。逆转录荧光 PCR 的检测方法即是基于这种原理,通过检测某种食源性病原菌的特异性基因的表达,即其特异性基因的 mRNA 是否存在,可特异性的检测出样品中是否存在处于 VBNC 状态的这种病原菌。同时还可以监测在其处于 VBNC 状态时的毒力基因是否表达,为评估其致病力提供参考。逆转录荧光 PCR 方法不仅大大提高了检测灵敏度而且比目前常用的染料法检测时间大为缩短,只需 4~5 h,常用的 DVC 染料法需 24 h 以上。所以以逆转录荧光 PCR 为基础的检测技术特异性强、敏感度高、反应速度快,能客观而准确地评价 VBNC 细菌的潜在危害<sup>[8]</sup>。

本研究分别针对副溶血性弧菌 AS079 菌株的管家基因 *pvuA*,毒力基因 *tdh2* 和鉴定基因 *toxR*,建立了实时荧光逆转录 PCR 快速检测进入 VBNC 状态副溶血性弧菌及其毒力基因表达的方法。普通 PCR 扩增结果显示,所选取的引物能特异性扩增副溶血性弧菌基因,而与相近菌株不发生交叉反应。根据优化的反应体系和条件,在 ABI-7300 荧光定量 PCR 仪上,对接种于陈化海水培养不同时期的 AS079 细菌进行荧光定量 PCR 扩增。结果显示,随

着培养时间的延长,毒力基因 *tdh2* 和鉴定基因 *toxR* 表达水平持续下降,但即使细菌进入 VBNC 状态,这两个基因也能够得到很好的扩增,检测灵敏度试验表明,进入 VBNC 状态后,鉴定基因 *toxR* 的最低检测限可达到 48 cfu/ml,毒力基因 *tdh2* 表达的最低检测限可达到  $4.8 \times 10^2$  cfu/ml。在常规培养方法无法检测的情况下,该方法可特异、快速的检测出 VBNC 状态下的副溶血性弧菌,提高食品中副溶血性弧菌检验的准确性和可重复性,更加科学准确地评价食品的卫生状况,保障食品安全。

根据我们的研究结果将副溶血性弧菌在 4 ℃ 陈化海水中培养后,虽然毒力基因 *tdh2* 的表达水平大幅度下降,但即使进入 VBNC 状态 20 多天后,仍可检测出毒力基因 *tdh2* 有表达,这一点与 Coutard<sup>[9]</sup> 在 2005 年发布的研究结果不符,Coutard 的研究表明进入 VBNC 状态的副溶血性弧菌中检测不到毒力基因 *tdh2* 的表达,对于两个不同的研究结果进行分析,认为可能有如下原因:一是我们与 Coutard 选择的副溶血性弧菌菌株不同,Coutard 使用的是 VP4 菌株,我们使用的是副溶血性弧菌 AS079 菌株,菌株的差异有可能造成实验结果的不同。第二个原因可能是 Coutard 采用的是普通逆转录 PCR 方法,用凝胶电泳的方式检测结果,灵敏度不高,而我们采用的灵敏度大大高于普通逆转录 PCR 方法的实时荧光逆转录 PCR 方法,有可能检出普通逆转录 PCR 检测不出的毒力基因 *tdh2* 的低水平表达。

论著

台州市食源性沙门菌耐药性、毒力因子及分子分型研究

沈伟伟<sup>1</sup>, 裘丹红<sup>1</sup>, 盛莹<sup>1</sup>, 罗芸<sup>2</sup>

(1. 台州市疾病预防控制中心, 浙江 台州 318000; 2. 浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051)

**摘要:****目的** 了解台州市食品中分离的沙门菌耐药性、毒力因子以及基因分型情况,建立食源性沙门菌的分子特征本底信息,为食源性疾病的防治提供技术支持。**方法** 对近几年从食品中分离的 22 株沙门菌进行 12 种抗生素药敏试验、10 种毒力基因 PCR 检测、脉冲电场凝胶电泳(PFGE)基因分型,用 BioNumerics 5.0 软件对分型数据进行聚类分析。**结果** 22 株食源性沙门菌的总耐药率为 59.1%,耐药率居前三位的抗生素分别是复方新诺明(36%)、四环素(27%)、茶啉酸(27%);所有菌株均检出 6 种以上毒力因子,1 株肠炎沙门菌存在毒力岛、质粒及噬菌体等多种毒力因子;PFGE 分型共得到 21 个条带,可分为 5 个基因型别,包括 18 种指纹图谱,各基因型别间同源性小于 70%。**结论** 台州市食源性沙门菌存在致病风险,建立的指纹图谱数据库可为食源性疾病的防治提供技术支持。

**关键词:**食源性致病菌; 沙门菌; 耐药性; 毒力因子; 基因分型

中图分类号:R117;Q503      文献标识码:A      文章编号:1004-8456(2013)04-0315-05

参考文献

[ 1 ]  陈道利,冉陆.“活的非培养态”致病菌研究进展[J]. 卫生研究,2008,37(3):372-376.

[ 2 ]  陈瑞英,鲁建章,等. 食品中副溶血性弧菌的危害分析、检测与预防控制[J]. 食品科学,2007,28(1):341-346.

[ 3 ]  寇运同,李伟才,顾绍平. 细菌的活的非可培养状态及其研究进展[J]. 四川食品与发酵,1999(3):13-18.

[ 4 ]  谭胜兵,朱兰兰. 细菌活的非可培养状态的研究现状及发展趋势[J]. 食品研究与开发,2007,28(4):182-187.

[ 5 ]  Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the  $\sigma$ S (RpoS) subunit of RNA polymerase [J]. Microbiol Mol Biol Rev,2002,66(3):373-395.

[ 6 ]  Leo M M, Pierobon S, Tafi M C, et al. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an Enterococcus faecalis viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm [ J ]. App Environ Microbiol,2000,66(10):4564-4567.

[ 7 ]  王秀娟,朱琳,陈中智,等. 细菌“活的不可培养状态”的生态意义及研究进展 [ J ]. 微生物学通报, 2008, 35 ( 12 ): 1938-1942.

[ 8 ]  Fischer-Le S M, Hervio-Heath D, Loaec S, et al. Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical Vibrio vulnificus strains in artificial seawater [ J ]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 ( 11 ): 5641-5646.

[ 9 ]  Coutard F, Pommepuy M, Loaec S, et al. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state [ J ]. Journal of applied microbiology,2005,98:951-961.