

论著

荧光 PCR 检测副溶血性弧菌致病基因方法的建立

韩玥, 张惠媛, 马师良, 吕雨莎, 李秋阳
(北京出入境检验检疫局, 北京 100026)

摘要:目的 建立一种准确、快速、特异地检测副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 致病基因的荧光 PCR 方法。方法 用 7 株已知其致病基因的 VP 标准菌株和检出菌分别对 6 种 VP 致病基因荧光 PCR 检测文献方法和本文建立的方法进行验证比较, 并用 6 种常见食源性病原菌对新建方法的特异性进行检验。结果 所建方法能够同时检测 VP 的 3 种溶血素, 其检测结果与菌株的溯源结果及普通 PCR 结果完全一致, 且与常见食源性病原菌无交叉反应。结论 本文建立的荧光 PCR 体系能够准确、快速、特异地检测 VP 的致病基因, 具有较好的实用性。

关键词: 荧光 PCR; 副溶血性弧菌; 食源性致病菌; 致病基因; 食品安全

中图分类号: R378.3; R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2013)05-0397-04

Establishment of a fluorescent PCR method for pathogenic gene *Vibrio parahaemolyticus* strains

HAN Yue, ZHANG Hui-yuan, MA Shi-liang, LV Yv-sha, LI Qiu-yang
(Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

Abstract: Objective To establish an accurate, rapid and specific fluorescent PCR method to detect pathogenic gene of *Vibrio parahaemolyticus* (VP). **Methods** 7 VP standard stains were used to verify 6 literary methods of fluorescent PCR and the new method establish in this study. The specificity was verified using 6 common foodborne pathogenic bacteria. **Results** The newly-established method could detect all 3 kinds of hemolysins simultaneously, and the results were consistent with those of stains tracing and standard PCR methods. There was no cross reaction with common foodborne pathogens. **Conclusion** The fluorescent PCR system could detect pathogenic gene of VP with better accuracy, reliability, speed and specificity, which was more applicable.

Key words: Fluorescent PCR; *Vibrio parahaemolyticus*; foodborne pathogens; pathogenic gene; food safety

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是一种嗜盐性细菌, 主要存在于近海岸的海水、海水沉积物和鱼虾、贝类等水产品中。人食用这些生、半生或交叉污染的水产品, 可能导致急性胃肠炎^[1]、反应性关节炎^[2], 有时甚至引起原发性败血症^[3]。国家食源性疾病监测网及国家食品安全信息监测系统数据显示: 2002—2007 年间暴发的细菌性食物中毒事件中, 由副溶血性弧菌引起的占 16.3%, 居细菌性食物中毒事件之首^[4-5]。

副溶血性弧菌的溶血素包括不耐热直接溶血素 (Thermostable hemolysin, TLH)、耐热直接溶血素 (Thermostable direct hemolysin, TDH) 和 TDH-相关溶血素 (TDH-related hemolysin, TRH)。其中, TLH

的致病性尚不清楚, 目前较多的应用为特异性检测的靶标, 而 TDH 和 TRH 是副溶血性弧菌最主要的致病因子。TLH、TDH 和 TRH 分别由 *tlh*、*tdh* 和 *trh* 基因编码。*tlh* 是种特异性基因, *tdh* 和 *trh* 是副溶血性弧菌的毒力基因^[6]。海产品中分离的副溶血性弧菌大约只有 0.3% ~ 5% 具有致病性^[7-8], 即含有 *tdh* 和/或 *trh* 基因。

目前我国国家标准 (GB/T 4789.7—2008) 中用于副溶血性弧菌致病性检测的为神奈川实验, 有文献表明, 神奈川实验与 TDH 相关^[9]。国际上应用较为普遍的副溶血性弧菌致病性的检测方法均为普通 PCR 方法, 如美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 和加拿大食品检验署 (Canada Food Inspection Agency, CFIA) 的方法。目前, 荧光 PCR 以其特异性强、灵敏度高、定量范围宽、全封闭反应、无需 PCR 后处理等优于普通 PCR 的特点, 逐步引起科研人员的重视, 并相继开展了研究工作。本文在参考国内外相关荧光 PCR 的技术参数条件下, 初步筛选并建立了一种特异性强、灵敏度高的副溶血性弧菌致病性荧光 PCR 检测方法。

收稿日期: 2013-07-10

基金项目: 国家质检总局科技计划项目 (2011K188)

作者简介: 韩玥 女 助理兽医师 研究方向为分子生物学

E-mail: hany@bjciq.gov.cn

通讯作者: 张惠媛 女 高级工程师 研究方向为食品微生物

E-mail: zhanghy@bjciq.gov.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验菌株

标准菌株:金黄色葡萄球菌 26001,大肠埃希氏菌 44110,单核细胞增生李斯特氏菌 54001,都柏林沙门氏菌 21497,副溶血性弧菌 1.1615、1.1997、ATCC17802、ATCC33847 购自中国医学细菌保藏管

理中心,中国工业微生物保藏管理中心,中国普通微生物菌种保藏管理中心和美国模式培养物集存库。分离菌株霍乱弧菌 RVC09001,溶藻弧菌 va,副溶血性弧菌 09099、10126 是实验室检测中保存的阳性菌株。副溶血性弧菌 09vp107 由中国疾病预防控制中心营养与食品安全所惠赠。经 CFIA^[10]方法验证,并经过菌株溯源,上述 VP 菌株携带致病基因情况如表 1 所示。

表 1 副溶血性弧菌携带致病基因情况

Table 1 Summary of pathogenic gene in VP

致病基因	1.1997	1.1615	ATCC17802	ATCC33847	09099	10126	09vp107
<i>tlh</i> ⁺	+	+	+	+	+	+	+
<i>tdh</i> ⁺	-	+	-	+	-	+	+
<i>trh</i> ⁺	+	-	+	-	-	+	+

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性

1.1.2 主要仪器与试剂

T1N1 琼脂和营养琼脂购自北京陆桥技术有限责任公司。TE(Tris-EDTA buffer, pH8.0)购自生工生物工程(上海)有限公司。引物由生工生物工程(上海)有限公司和美国 invitrogen 生命技术公司合成。TaqMan © Environmental Master Mix2.0 试剂盒由美国 AB 公司生产。荧光定量 PCR 仪选用美国 AB 公司的 7500 型荧光定量 PCR 仪。

1.2 方 法

1.2.1 核酸的制备

取一菌环待测菌株在 T1N1 琼脂或营养琼脂上的过夜培养物,至 200 μl TE 中,煮沸 10 min,13 000 r/min 离心 5 min 后取上层清液作为 PCR 反应模板。

1.2.2 文献中的荧光 PCR 方法检测 VP 菌株

选取 6 种国内外文献方法(方法 1~6)^[11-16],对 1.1.1 中的 7 株已知其致病基因的 VP 标准菌株和检出菌进行检测。

1.2.3 新建立的荧光 PCR 方法检测 VP 菌株

用本文新建立的荧光 PCR 方法检测 1.1.1 中的 7 株 VP 菌株。反应体系:总体积 25 μl,包含 2 × Master Mix 12.5 μl、*tlh*/*tdh*/*trh* 上下游引物各 0.6 mol/L、*tlh*/*tdh*/*trh* 探针各 0.3 mol/L、模版 1 μl。PCR 扩增条件:50 °C 2 min,95 °C 预变性 10 min、95 °C 变性 20 s,56 °C 退火延伸 31 s,45 个循环。引物、探针序列见表 2。

1.2.4 新建立方法特异性的验证

选取 1.1.1 中的 6 株常见食源性病原菌 26001、44110、54001、21497、va、RVC09001 以及副溶血性弧菌菌株 10126 对本文建立方法的特异性进行验证。使用本文建立的方法分别对上述 7 株菌,上述 6 种食源性病原菌的混菌,添加副溶血性弧菌菌株的 6 种病原菌的混菌以及空白对照进行检测。

表 2 新建立方法引物、探针序列

Table 2 Primers and probes sequence of new method

目标基因	序列名称	序列
<i>tlh</i>	TLH-F	5'-cgagaacgcagacattacgttc-3'
	TLH-R	5'-tgctccagatcggtgttg-3'
	PROBE	5'-FAM-tgccgctgacaatcgcttctcat- TAMRA -3'
<i>tdh</i>	TDH-F	5'-gtaraggtctctgactttggac-3'
	TDH-R	5'-ctacagaatgatggaatgtgaag-3'
	PROBE	5'-FAM -attttacgaacacagcagaatga- TAMRA -3'
<i>trh</i>	TRH-F	5'-ccatmataacctttctctcc-3'
	TRH-R	5'-acygtcatatagcgcttaac-3'
	PROBE	5'-FAM -tatttgygttagaataacaacaat- TAMRA -3'

2 结 果

2.1 文献中的荧光 PCR 方法对 VP 菌株检测的结果

6 种方法对试验菌株进行检测的结果(详见表 3)显示:只有方法 4 的检出效果最好,三个基因都能检出;方法 2 *trh* 无法全部检出,其他基因检测良好,且检测效率较高;方法 3 和 5 对种特异性基因 *tlh* 和致病基因 *tdh* 检测效果较好,但致病基因 *trh* 全都无法检出;方法 6 只能检出种特异性基因 *tlh*,致病基因 *tdh* 和 *trh* 全都无法检出;方法 1 不仅不能检出致病基因 *tdh* 和 *trh*,种特异性基因 *tlh* 也出现漏检现象。

2.2 新建立的荧光 PCR 方法对 VP 菌株检测的结果

结合国内外先进方法,并经过试验优化反应程序,建立了本文的新方法。所有菌株均检出了种特异性基因 *tlh*,09099 未检出致病基因,10126 和 09vp107 同时检出了 *tdh* 和 *trh* 基因,1.1997 和 ATCC17802 检出了 *trh* 基因,而 1.1615 和 ATCC33847 检出了 *tdh* 基因(见图 1)。7 株 VP 菌株检测结果与表 1 完全一致。

表 3 荧光 PCR 方法对副溶血性弧菌致病基因检出情况
Table 3 Result of fluorescent-PCR method to detect pathogenic gene of VP

菌株编号	方法 1			方法 2			方法 3			方法 4			方法 5			方法 6		
	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>
1. 1997	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
1. 1615	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
ATCC17802	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
ATCC33847	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
09099	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
10126	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
09vp107	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性

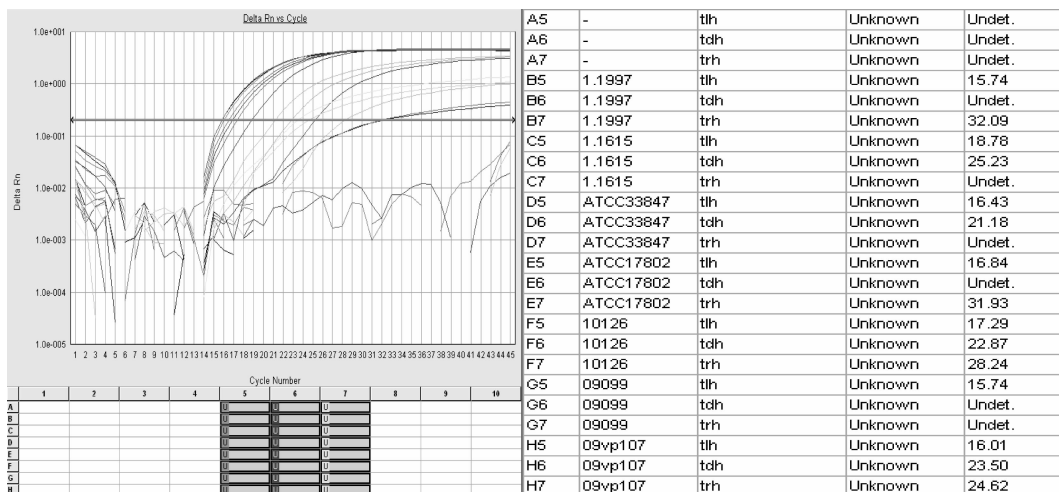


图 1 本文建立新方法对 7 株 VP 菌株的检测结果

Figure 1 Detection results of newly-established method on 7 VP strains

2.3 新建立方法特异性验证的结果

新建立方法特异性验证的结果如图 2 所示, 只有副溶血性弧菌 10126 以及添加 10126 的 6 种食源性病原菌的混菌扩增出了 3 种目的片段, 而 6 种食

源性病原菌以及它们的混菌均未扩增出任何目的片段。可见, 本文建立的方法特异性好, 与常见的食源性病原菌均无交叉。

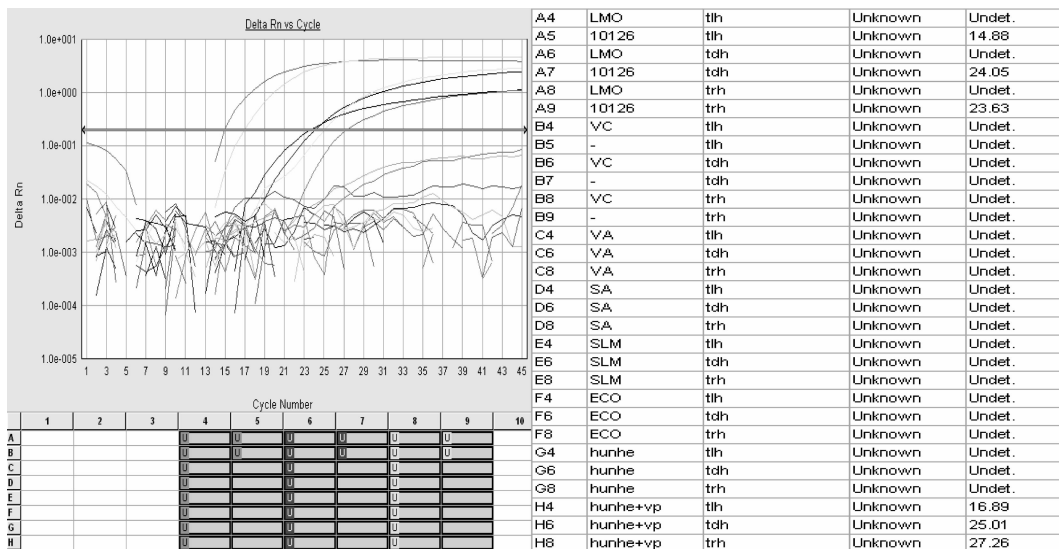


图 2 特异性试验结果

Figure 2 Result of specificity experimental

3 讨论

由于大约只有 0.3% ~ 5% 的副溶血性弧菌具有

致病性, 在采用传统方法 (如 GB/T 4789. 7—2008) 进行检测时, 会出现因检出非致病性副溶血性弧菌而

判定为不合格的情况,特别是副溶血性弧菌带菌率很高的水产品,将造成很大的经济损失,因此研究并开发致病性副溶血性弧菌的检测方法是非常有意义的。

国际对副溶血性弧菌致病基因的检测多采用普通 PCR 法。但是对于日益兴起的快速、简便、污染小的荧光 PCR 法,由于探针设计困难等原因,目前研究的并不多,而且也没有出现大家所公认的、较成熟的荧光 PCR 检测方法。同类研究中所使用的荧光 PCR 方法(方法 1~6),经试验证实,其效果均不理想。由此可见,现有的关于检测副溶血性弧菌致病基因的荧光 PCR 方法并不成熟,效果参差不齐、重现性低。

登陆“中国普通微生物菌株保藏管理中心”网站,标准菌株 1.1997 可以溯源到 ATCC17802^[17],标准菌株 1.1615 可以溯源到 ATCC33846^[18]。登陆“美国国立生物技术信息中心 NCBI”网站,可查阅到 ATCC17802 携带 *trh* 基因^[19]、ATCC 33846 携带 *tdh* 基因^[20]。用国际通用的 CFIA 方法检测 7 株副溶血性弧菌,其结果与溯源结果相符。以上对标准菌株的溯源以及与 CFIA 方法的比对,证明本文所建立方法的检测结果准确、可靠。此外,用除副溶血性弧菌以外的 6 种常见的食源性病原菌,对所建立方法的特异性进行验证,其结果也是可信的。

本文建立的荧光 PCR 方法与传统方法比较,更加简便、快捷;与普通 PCR 方法比较,污染小、安全性高。在食品安全关注度日益提高的今天,无疑将是口岸执法中的一项利器,为更好地保障人民的食品安全,提供了有力的技术支持。

参考文献

- [1] Hlady W G, Klontz K C. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981 - 1993 [J]. *Infect Dis*, 1996, 173 (5): 1176-1183.
- [2] 李巧萍, 刘晓红, 蒋德源. 副溶血弧菌耐热性直接溶血素的研究进展 [J]. *福建畜牧兽医*, 2010, 32 (06): 35-36.
- [3] Daniels N A, Mackinnon L, Bishop R, et al. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973 - 1998 [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181 (5): 1661-1666.
- [4] 刘秀梅, 陈艳, 樊永祥, 等. 2003 年中国食源性疾病暴发的监测资料分析 [J]. *卫生研究*, 2006, 35 (2): 201-204.
- [5] 马聪, 朱海明, 严纪文, 等. 不同来源的副溶血性弧菌定性定量分析及毒素基因检测 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2009, 21 (5): 402-405.
- [6] 朱雪兰, 陈艳, 刘秀梅, 等. 副溶血性弧菌溶血素基因及其检测的研究进展 [J]. *国外医学: 卫生学分册*, 2007, 34 (4):

233-237.

- [7] 王宏萍. 水产品中致病性副溶血性弧菌的检测 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2009.
- [8] 陈广全, 汪琦, 曾静, 等. 2006 年北京口岸进口鲜活海产品中副溶血性弧菌致病性分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2007, (3): 245-247.
- [9] 张继伦, 田植干, 何宇平, 等. 副溶血性弧菌五种致病性检测方法比较研究 [J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2011, 34 (5): 303-306.
- [10] CFIA. Specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* strains using a multiplex polymerase chain reaction (PCR) based on the R72H taxonomic marker and the hemolysin genes TDH and TRH [EB/OL]. (2006-03) [2013-03-04]. http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/res-rech/mlfp-23-eng.pdf.
- [11] 张红河, 范建中, 张卫英, 等. 实时荧光聚合酶链反应检测副溶血弧菌致病基因 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2006, 16 (11): 1313-1315.
- [12] Davis C R, Heller L C, Peak K K, et al. Real-time PCR detection of the thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes in a *Vibrio parahaemolyticus* cultured from mussels and mussel homogenate associated with a foodborne outbreak [J]. *J Food Prot*, 2004, 67 (5): 1005-1008.
- [13] Nordstrom J L, Vickery M C, Blackstone G M, et al. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73 (18): 5840-5847.
- [14] Ward L N, Bej A K. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72 (3): 2031-2042.
- [15] 王忠发, 顾松叶, 王虹玲, 等. 2009 年快速荧光定量 PCR 检测副溶血性弧菌及其毒力基因方法建立与应用效果评价的研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19 (8): 1745-1748.
- [16] Vickery M C, Blackstone G M, Nordstrom J L, et al. Detection and quantification of total and potentially virulent *Vibrio parahaemolyticus* using a 4-channel multiplex real-time PCR targeting the *tlh*, *tdh*, and *trh* genes and a novel PCR internal control [C]. ASM Annual Meeting, Washington, DC, 2003: 18-22.
- [17] 中国普通微生物菌株保藏管理中心. 标准菌株 1.1997 [EB/OL]. [2013-03-04]. <http://www.cgmcc.net/index.php/Contents/show/id/1283>.
- [18] 中国普通微生物菌株保藏管理中心. 标准菌株 1.1615 [EB/OL]. [2013-03-04]. <http://www.cgmcc.net/index.php/Contents/show/id/985>.
- [19] NCBI. *Vibrio parahaemolyticus* strain ATCC 17802 thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene, complete cds [EB/OL]. [2013-07-12] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GU971654.1>.
- [20] NCBI. *Vibrio parahaemolyticus* strain ATCC 17802 thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene, complete cds [EB/OL]. [2013-07-12] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GU971653.1>.