

实验技术与方法

基于内参的副溶血性弧菌实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立

王建昌,王金凤,李静,孙晓霞,陈瑞春

(河北出入境检验检疫局检验检疫技术中心,河北 石家庄 050051)

**摘要:**目的 建立基于内参的副溶血性弧菌实时荧光定量 PCR 方法,快速检测样品中的副溶血性弧菌。方法 根据 GenBank 已公布的副溶血性弧菌基因组序列,筛选特异性靶基因,设计特异性引物探针,优化反应体系,并在体系中加入内参(IAC),通过标记不同荧光基团的 TaqMan 探针来监测 IAC,进而实时监控整个 PCR 反应。按照 5~50 cfu/25 g 的细菌量人工污染样品,以评价所建立反应的体系。结果 以副溶血性弧菌基因组 DNA 为模板,最低检测限为 1 pg/ $\mu$ l;以 10 倍梯度稀释的菌液经水煮法提取的 DNA 为模板,最低检测限为  $4 \times 10^2$  cfu/ml;以含有 *gyrB* 的质粒为模板,最低检测极限可以达到 100 copies/ $\mu$ l;建立 *gyrB* 和 *gyrB*-IAC 标准曲线,*Ct* 值与模板拷贝数均呈良好线性关系( $r^2=0.999$ );人工污染初始菌量为 7 cfu/25 g 时,样品中副溶血性弧菌增菌 6 h 即可检出。结论 本研究所建立的 *gyrB*-IAC 实时荧光定量 PCR 方法,既能有效检测食品中副溶血性弧菌,又能实时监控 PCR 反应过程,有效防止“假阴性”的发生,结果可靠,有利于实现海产品中副溶血性弧菌实时荧光定量 PCR 检测方法的标准化。

**关键词:**副溶血性弧菌; *gyrB*; 实时荧光定量 PCR; IAC; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号:R155; Q93-33 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)04-0408-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.04.013

Establishment of a fluorescence quantitative PCR assay in detection of  
*Vibrio parahaemolyticus* based on internal reference

WANG Jian-chang, WANG Jin-feng, LI Jing, SUN Xiao-xia, CHEN Rui-chun

(Technology Center of Hebei Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Hebei Shijiazhuang 050051, China)

**Abstract: Objective** Based on *Vibrio parahaemolyticus* real-time fluorescent quantitative PCR method, rapid detection method of *Vibrio parahaemolyticus* was developed. **Methods** According to the *Vibrio parahaemolyticus* gene sequences published in GenBank, specific target genes were selected for primers and probes design, and the reaction system was optimized. An internal amplification control (IAC) was added to the reaction system. This IAC was detected by TaqMan probes labeled with different fluorophore. The samples were artificially contaminated in 5-50 cfu/25 g, and were used to evaluate the performance of the reaction system. **Results** The assay could be used reliably for detection of *Vibrio parahaemolyticus* with the sensitivity of 1 pg/ $\mu$ l. For the 10-fold dilutions bacteria DNA extracted by cooking water, the lowest detection limit was  $4 \times 10^2$  cfu/ml; and for the plasmid with *gyrB*, the lowest detection limit could reach 100 copies/ $\mu$ l. The standard curves of *gyrB* and *gyrB*-IAC were established, which the quantification was linear between *Ct* and template copy number ( $r^2=0.999$ ). When the initial sample amount of artificially contaminated bacteria was 7 cfu/25 g seafood, the *Vibrio parahaemolyticus* could be detected after 6 hours culture. **Conclusion** The *gyrB*-IAC fluorescence quantitative PCR assay was developed. It could not only be applied for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food, but also monitor the PCR reaction system to prevent ‘false negatives’. Therefore, the *gyrB*-IAC fluorescence quantitative PCR assay further ensures the reliability of the results and is helpful to standardize quantitative PCR method for *Vibrio parahaemolyticus* in seafood.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; *gyrB*; real-time fluorescent quantitative PCR; IAC; foodborne pathogen; food safety

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰阴性嗜盐菌,主要存在于近海岸的海水、海水沉积物和鱼虾、贝类等海产品中,其中,牡蛎中含量最高<sup>[1-2]</sup>。人类食用生的或未煮熟的被该菌污染的海产品后会导致急性肠胃炎、反应性关节炎等疾病,严重时还可引起败血症。国家食源性疾病监测网数据表明我国近年来副溶血性弧菌中毒事件发生数呈上升

收稿日期:2015-03-04

基金项目:质检公益性行业科研专项(201210128;201310126)

作者简介:王建昌 男 中级 研究方向为食源性微生物

E-mail:18630135980@163.com

通讯作者:陈瑞春 男 研究员 研究方向为食品安全

E-mail:crcede@163.com

趋势,已成为我国最严重的食源性公共卫生问题之一。目前,在中国沿海地区的食物中毒病例中,副溶血性弧菌已成为微生物性食物中毒的首要病原菌<sup>[3]</sup>。

目前,我国对副溶血性弧菌检测的国家标准为 GB 4789. 7—2013《食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》<sup>[4]</sup>,整个检测过程需要 5 ~ 7 d,工作量大且操作复杂,副溶血性弧菌特异性检测能力不强,因而不适合大量样品快速检测的需求。现已建立的副溶血性弧菌的免疫学检测方法主要有酶联免疫吸附(ELISA)法、免疫荧光抗体技术、胶体金技术,这些方法的优点是检测时间短、操作简单、便于推广,但其灵敏性不高,只适用于大量样品的初筛;与普通 PCR 法相比,实时荧光定量 PCR 法具有更高的敏感性和特异性,目前已成为病原检测的重要方法。目前国内外学者已经建立了以副溶血性弧菌 *tlh*、*tdh*、*toxR* 基因为检测靶点的 PCR 法和荧光定量 PCR 方法,但大都未对增菌后的样品提取核酸进行研究评估<sup>[-5-10]</sup>。在 PCR 检测方法的实际应用中,部分样品基质复杂,存在大量未知的复杂成分,可能会存在影响 PCR 扩增的物质,同时核酸提取过程中残留的物质也可能导致 PCR 扩增的抑制,从而出现定量值较低或“假阴性”结果。

本研究所建立的副溶血性弧菌检测方法是一种基于内参(*IAC*)的实时荧光定量 PCR 方法,在反应体系中添加 *IAC* 以对整个过程进行实时监测,从而有效的防止“假阴性”结果的产生,并通过水煮法和商业化试剂盒法对增菌后样品提取的核酸进行靶基因检测,有助于取得理想的检测结果,同时推动了副溶血性弧菌实时荧光定量 PCR 检测方法的标准化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验菌株

本试验所用菌株来源见表 1。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

核酸蛋白分析仪(德国 Eppendorf)、PCR 仪(意大利 Techne)、ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI)。

碱性蛋白胨水(APW)、硫代硫酸钠、柠檬酸钠、胆盐蔗糖(TCBS)琼脂培养基均购自北京陆桥公司,基因组 DNA 提取试剂盒、2 × *Taq* PCR master mix 均购自天根生化科技(北京)公司, Premix Ex *Taq*、pMD® 19-T simple vector 均购自日本 TaKaRa。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA 提取

水煮法:将 1ml 增菌液样品转入 1.5 ml 离心管

表 1 试验菌株来源

Table 1 Strains in this study			
菌种名称	菌种来源	扩增内参引物探针 PCR 结果	靶基因扩增 PCR 结果
副溶血性弧菌	CICC 21617	-	+
创伤弧菌	ATCC 27562	-	-
霍乱弧菌	ATCC 14035	-	-
拟态弧菌	ATCC 33653	-	-
哈维弧菌	ATCC 33842	-	-
溶藻弧菌	ATCC 17749	-	-
鳃弧菌	ATCC 19019	-	-
大肠埃希菌 O157: H7	CICC 21530	-	-
单核细胞增生李斯特菌	ATCC 19114	-	-
鼠伤寒沙门菌	CICC 22956	-	-
阪崎肠杆菌	ATCC 29544	-	-
空肠弯曲杆菌	ATCC 33291	-	-
溶血性曼杆菌	本实验室分离	-	-
地衣芽胞杆菌	本实验室分离	-	-
蜡样芽胞杆菌	CICC 10468	-	-
志贺菌	CICC 21679	-	-
金黄色葡萄球菌	ATCC 6538	-	-
阴沟肠杆菌	本实验室分离	-	-

注: - 表示阴性结果; + 表示阳性结果

中 5 000 ~ 8 000 r/min 离心 5 min,弃上清收集菌体;加入 200 μl 无菌去离子水,振荡混匀,100 ℃ 水浴 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,上清为 DNA 模板,-20 ℃ 保存备用。

水洗法加提取试剂盒法:取 1 ml 增菌液样品转入 1.5 ml 离心管中,800 r/min 离心 5 min 或静置 5 ~ 10 min;取上清液,8 000 r/min 离心 5 min,收集菌体;倒去上清液后,用无菌双蒸水重悬浮菌体,离心洗涤 3 次;将沉淀用试剂盒进行 DNA 提取。

#### 1.2.2 引物和探针设计

根据文献[11-12],选择 *gyrB* 作为副溶血性弧菌检测靶基因。从 GeneBank 中下载 *gyrB* 靶序列,应用 DNASTAR 软件对下载的多个靶序列进行比对,查找保守序列。用 Primer Express 3.0 软件设计引物和探针,用 BLAST 工具进行比对,分析其特异性,将探针的 5'端标记 FAM,3'端标记 Eclipse,见表 2。

表 2 引物探针序列

Table 2 Information about the primers and probe		
引物探针	引物序列(5'-3')	片段大小/bp
<i>gyrB</i>	F:CGGTAGTAAACGCACTGTCAGAA	77
	R:ACGGTAAGTTTGCGTGTGGAT	
探针	FAM-TGGTACTAACCATCCATCGTGGCGGTC-Eclipse	123
<i>IAC</i>	F:AATGGAGAAAGCCCCTGTGAAG	
	R:TCACGTGAACCTGGAATTTGAC	
探针	CY5-CACTGCGCATCTAGTCCCCTGAAC-BHQ3	

#### 1.2.3 扩增内参的建立

采用复合引物法<sup>[12]</sup>构建扩增内参(*IAC*),选择乳仓鼠肾细胞(BHK-21)的 *Nmi* 基因作为内参基

因,使用 Primer Express 3.0 软件设计扩增内参引物和探针(见表 2),将内参探针标记 *CY5* 荧光基团,在内参引物 5'末端分别连接上 *gyrB* 检测引物,形成一对内参引物和目标引物的长引物,经长引物扩增后得到扩增内参。内参片段连接载体 *pMD19-T*,转化感受态细胞,测序验证;提取质粒,测定浓度, -20 ℃ 保存备用,菌液于甘油中 -80 ℃ 保存。

#### 1.2.5 实时荧光定量 PCR 反应及条件优化

反应体系的建立:以副溶血性弧菌基因组 DNA 作为模板,取不同浓度的引物和探针组合,以最低 *Ct* 值和最高荧光强度的组合为最佳组合。反应体系(25  $\mu\text{l}$ ):12.5  $\mu\text{l}$  2  $\times$  *Taq* PCR master mix,上下游引物设定终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8  $\mu\text{mol/L}$ ,探针设定终浓度为 0.12、0.14、0.16、0.18  $\mu\text{mol/L}$ ,ROX II 0.5  $\mu\text{l}$ ,模板 DNA 50 ~ 100 ng,用 ddH<sub>2</sub>O 定容至 25  $\mu\text{l}$ 。反应条件:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 复性 35 s,40 个循环,60 ℃ 时收集荧光。

条件优化:在确定的靶基因最佳引物探针浓度基础上,对反应体系中内参探针浓度进行优化。探针终浓度分别设 0.12、0.14、0.16、0.18  $\mu\text{mol/L}$ ,反应体系中包含 10<sup>6</sup> copies *IAC*,反应条件同前,以能给出最低 *Ct* 值和最高荧光强度的最小 *IAC* 探针浓度为最佳浓度。

*IAC* 添加量过多会抑制靶基因的扩增,需要对 *IAC* 添加量进行优化。在其他条件已确定的基础上,在反应体系中添加 10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> copies *IAC*,选取能获得 *IAC* 扩增阳性信号,同时又不影响靶基因扩增的添加量作为 *IAC* 最佳添加量。

#### 1.2.5 特异性试验

根据试验优化后最终的引物探针浓度和反应条件,水作为空白对照,提取表 1 中副溶血性弧菌和其他菌株的基因组 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增,通过观察扩增曲线验证所建立的副溶血性弧菌实时荧光 PCR 方法的特异性。

根据 *IAC* 最佳探针浓度和添加量,建立加入 *IAC* 后的副溶血性弧菌实时荧光定量 PCR (*gyrB-IAC*) 反应体系。对表 1 中菌株提取基因组 DNA,进行实时荧光 PCR 扩增,确定 *IAC* 添加后对本研究建立的副溶血性弧菌检测体系的特异性影响。

#### 1.2.6 *gyrB-IAC* 实时荧光定量 PCR 方法的灵敏性和定量范围

将已知浓度的副溶血性弧菌标准菌株基因组 DNA 做 10 倍梯度稀释,每个稀释度各取 1  $\mu\text{l}$  为模板,按照 *gyrB-IAC* 实时荧光定量 PCR 方法,进行 PCR 扩增,能得到扩增曲线的最低浓度即为该反应体系检测的最高灵敏度。

将副溶血性弧菌标准菌株经过夜培养后,用灭菌 PBS 作 10 倍梯度稀释,并选择 10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup> 倍 3 个稀释度进行平板计数,以此计算原始菌落数。同时每个稀释度各取 1 ml 菌液,用水煮法提取基因组 DNA,用 50  $\mu\text{l}$  灭菌水溶解 DNA,取 1  $\mu\text{l}$  为模板,进行 PCR 扩增。

#### 1.2.7 副溶血性弧菌实时荧光定量 PCR 检测标准曲线的构建

将 *gyrB* 靶基因连接到 *pMD19-T* 载体上,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑取阳性克隆,将鉴定正确的菌液提取质粒,并测定浓度,计算对应的拷贝数,做 10 倍列稀释,最终稀释至 1 copies/ $\mu\text{l}$ ,制成标准模板溶液,分别取 1  $\mu\text{l}$  作为模板进行 *gyrB* 和 *gyrB-IAC* 实时荧光定量 PCR 反应,通过不同 *Ct* 值和浓度,分别建立标准曲线。最终得到线性方程,确认 *IAC* 对副溶血性弧菌检测精确度的影响。

#### 1.2.8 模拟样品检测

将副溶血性弧菌标准菌株经过夜纯培养后,用灭菌 PBS 做 10 倍列稀释,选取 10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup> 倍稀释度作平板计数,计算纯培养的初浓度。经稀释后,选取 5 ~ 50 cfu 的初始菌量分别添加到 25 g 鳕鱼饼、生鱼肉、虾肉 3 种不同基质样品(经 GB/T 4789.7—2013 法检测均为副溶血性弧菌阴性)中,再添加到 225 ml APW 中,同时做空白对照(加 1 ml 生理盐水)。人工污染样品在 37 ℃ 150 r/min 条件下摇床振荡培养。前增菌后 6、8、10 h,分别取培养液 1 ml,采用 1.2.1 中的 2 种方法进行细菌基因组 DNA 提取,取 3  $\mu\text{l}$  作为模板进行检测,试验重复 3 次。

## 2 结果与分析

#### 2.1 *gyrB* 实时荧光定量 PCR 体系中引物、探针浓度优化结果

选择荧光信号最强,且曲线出现最早的引物探针组合为最佳引物探针浓度。如图 1 所示,确定引物为 0.8  $\mu\text{mol/L}$ ,探针为 0.16  $\mu\text{mol/L}$  时为 *gyrB* 反应体系最佳浓度。

#### 2.2 *gyrB* 实时荧光定量 PCR 方法的特异性试验结果

对副溶血性弧菌标准菌株和其他细菌基因组 DNA 进行检测,结果 *gyrB* 引物探针仅对副溶血性弧菌基因组 DNA 为阳性扩增,呈现典型的扩增曲线,对其他菌株均无扩增曲线,显示较好的特异性,结果见图 2。

#### 2.3 *gyrB* 实时荧光定量 PCR 反应体系中 *IAC* 探针浓度和添加量的优化

当 *IAC* 探针浓度为 0.18  $\mu\text{mol/L}$  时,荧光信号

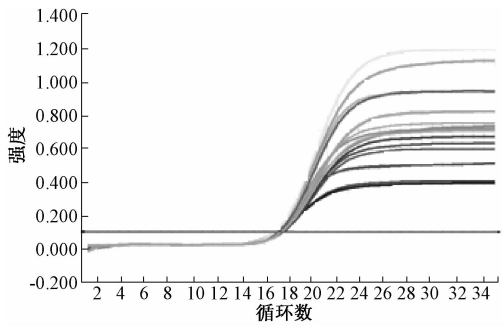


图 1 *gyrB* 实时荧光定量 PCR 体系中引物探针浓度  
优化结果  
Figure 1 Primer and probe concentration optimization results  
of real-time PCR system for *gyrB*

最强,曲线出现最早,确定为最佳工作浓度。当 *IAC* 的添加量为  $10^5$  copies 时,既能出现明显的 CY5 信号 ( $C_t$  值  $< 25$ ),又不会对 *gyrB* 的检测有明显影响。最终选择每 25  $\mu\text{l}$  反应体系添加  $10^5$  copies 的 *IAC* 为最佳添加量,即对 *gyrB* 靶基因扩增影响最小。

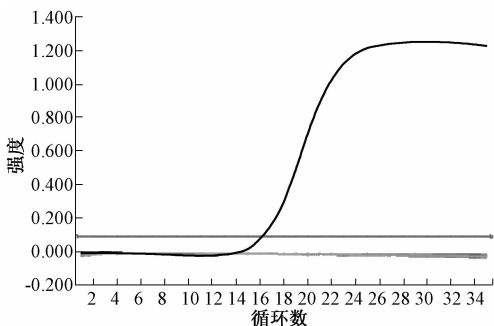
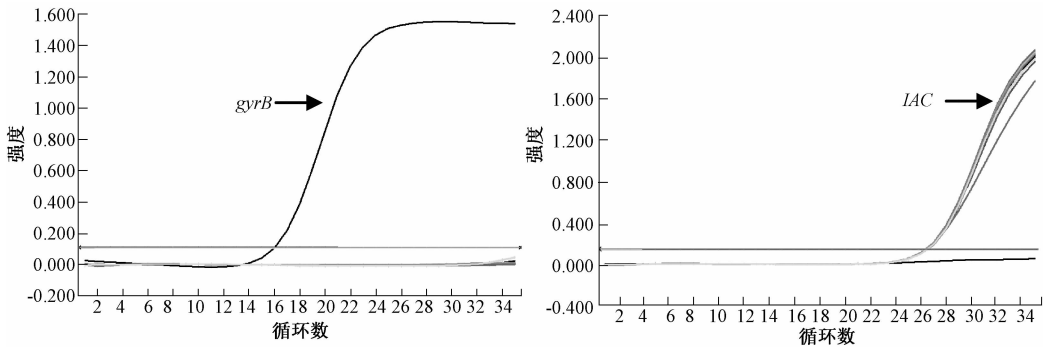


图 2 *gyrB* 实时荧光定量 PCR 特异性试验  
Figure 2 Specific test of real-time PCR for *gyrB*

## 2.4 *gyrB*-*IAC* 实时荧光定量 PCR 特异性结果

如图 3 所示,添加 *IAC* 后 *gyrB* 实时荧光定量 PCR 仅对副溶血性弧菌为阳性扩增,其余菌株未扩增;同时所有反应中 *IAC* 均扩增良好。结果说明在反应体系中添加  $10^5$  copies *IAC* 对 *gyrB* 靶基因扩增的特异性以及整个反应体系均没有任何影响,*IAC* 可以有效地指示假阴性,同时保证结果的可靠性。



注:A 为不添加 *IAC* 实时荧光定量 PCR 结果;B 为添加 *IAC* 实时荧光定量 PCR 结果

图 3 *gyrB*-*IAC* 实时荧光定量 PCR 特异性试验  
Figure 3 Specific test of *gyrB*-*IAC* real-time PCR

## 2.5 *gyrB*-*IAC* 实时荧光定量 PCR 的灵敏性试验结果

分别以 10 倍梯度稀释的副溶血性弧菌基因组 DNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 反应,结果显示无论反应体系中是否加入 *IAC*,对靶基因的扩增均没有任何影响,灵敏度结果未发生改变,35 个循环之内,检测灵敏度为 1 pg,见图 4。

通过梯度稀释平板计数,以水煮法提取各梯度基因组 DNA,通过 *gyrB*-*IAC* 实时荧光定量 PCR 检测靶基因,在添加 *IAC* 的情况下,各个梯度基因组 DNA 均有扩增曲线,表明本文建立的方法对于水煮 DNA 提取方法提取的核酸均可检测。35 个循环时,该方法对副溶血性弧菌的检测限为  $4 \times 10^2$  cfu/ml,见图 5。

## 2.6 质粒 DNA 标准曲线的建立

*gyrB* 实时荧光定量 PCR 反应所建立的标准曲线,斜率为  $-3.258$ ,反应效率为  $1.027$ , $r^2 = 0.999$ ,线

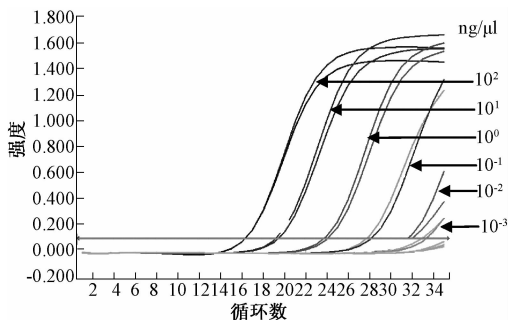


图 4 *IAC* 对副溶血性弧菌检测灵敏性的影响  
Figure 4 *IAC* detection sensitivity effects on *Vibrio parahaemolyticus*

性方程为  $y = -3.258\log x + 42.198$ ; *gyrB*-*IAC* 实时荧光定量 PCR 反应所建立的标准曲线,斜率为  $-3.162$ ,反应效率为  $1.023$ , $r^2 = 0.999$ , $y = -3.162\log x + 41.068$ 。结果表明无论是否添加 *IAC*,不同浓度模板拷贝数的对数与  $C_t$  值均呈良好的线性



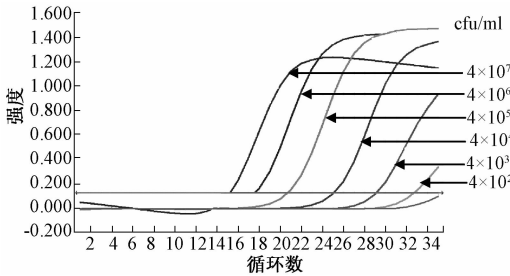


图 5 *gyrB*-IAC 实时荧光定量 PCR 对副溶血性弧菌的定量检测结果

Figure 5 Quantitative results of *gyrB*-IAC real-time PCR for *Vibrio parahaemolyticus*

关系,IAC 的添加不影响整个反应的精确度,最低检测极限可以达到 100 copies/ $\mu$ l。

表 3 3 种样品在不同条件中副溶血性弧菌检测 Ct 值结果  
Table 3 Result for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood

样品类别	6 h			8 h			10 h		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
鲳鱼饼	27.05 (32.15)	25.31 (31.31)	24.86 (28.35)	21.33 (25.77)	20.45 (24.38)	19.55 (21.53)	16.67 (19.54)	16.54 (17.89)	15.92 (15.37)
鱼肉	27.89 (33.25)	25.12 (31.67)	23.79 (29.59)	21.05 (26.33)	20.43 (24.26)	19.13 (22.34)	16.56 (20.43)	16.11 (18.56)	15.83 (16.63)
虾肉	28.32 (32.49)	27.67 (30.97)	26.56 (28.67)	23.67 (26.24)	22.53 (24.03)	20.89 (21.89)	19.79 (20.29)	19.14 (18.2)	18.79 (17.98)

注:1、2、3 分别代表接菌量为 7、15、30 cfu/25 g;括号外的数值是由试剂盒法所测得,括号内的数值是由水煮法所测得

3 讨论

荧光定量 PCR 技术具有灵敏度高、重复性好、反应高效、准确性高等优点,已广泛应用于生物学和医学领域研究。本研究选取副溶血性弧菌 *gyrB* 靶基因设计探针和引物,通过在反应体系中添加 IAC,利用靶基因和 IAC 的同时扩增来防止假阴性结果的产生。IAC 在反应体系中可以监控 PCR 抑制、试验操作的错误等,如果实际样品检测过程中出现靶基因检测为阴性,而 IAC 也没有扩增信号,说明整个试验不成立,PCR 反应是无效的,存在 PCR 抑制反应等,需要查找原因重新进行检测,以保证检测结果的准确性和可靠性。本研究为快速、大批量的进行实际样品检测,因而设置 35 个循环数,在保证检测结果的基础上进一步减少检测时间,以满足监管部门快速检测需求。

*gyrB*-IAC 实时荧光定量 PCR 的  $r^2$  与扩增效率  $E$  决定荧光定量的检测能力<sup>[13]</sup>。试验结果表明,本研究建立的 *gyrB*-IAC 标准曲线 Ct 值与拷贝数的对数呈良好的线性关系,在循环数为 35 时,最低能检测到 100 copies/25  $\mu$ l 反应体系。灵敏性和定量范围的结果显示,无论反应中是否加入  $10^5$  copies IAC,

2.7 *gyrB*-IAC 实时荧光定量 PCR 方法对副溶血性弧菌人工污染样品的检测

所有样品空白对照均未检出副溶血性弧菌,而人工污染样品无论采取何种基因组 DNA 提取方法,当样品中接菌量为 7 cfu/25 g,增菌时间为 6 h 时,反应体系中 IAC 扩增均为阳性,副溶血性弧菌即可检出。

本研究建立的 *gyrB*-IAC 实时荧光定量 PCR 法,在样品经 6 h 增菌后,经 3 次重复试验,无论采取水煮法和试剂盒方法,均可以从副溶血性弧菌起始菌量为 0.28 cfu/g 海产品及其加工产品中检测到副溶血性弧菌,但水煮法扩增 Ct 值较试剂盒法靠后 1 ~ 5 个循环,尤其在 6 h 表现明显。结果见表 3,Ct 值均为 3 次重复试验的平均值。

模板浓度与 Ct 值均呈现良好的线性关系,灵敏度和定量均不受影响,最低能检测到 1 pg/ $\mu$ l 的模板 DNA。系列梯度稀释副溶血性弧菌液进行水煮法核酸提取后,检测限为  $4 \times 10^2$  cfu/ml。

本研究对海产品中两种副溶血性弧菌基因组 DNA 提取方法对实时荧光 PCR 检出限的影响分析表明,无论采取何种基因组 DNA 提取方法,在初始菌量为 7 cfu/25 g 时,样品经前增菌 6 h 后均能检测到靶基因,结果可靠。何晓华等<sup>[14]</sup>建立的副溶血性弧菌 PCR 检测方法在初始染菌量为 1.24 cfu/25 g 样品时,经 8 h 增菌后采用水煮法提取基因组 DNA 可检测到副溶血性弧菌。因此,可以以水煮法提取增菌后样品中细菌 DNA 作为模板,通过荧光定量 PCR 方法检测到海产品中的副溶血性弧菌。本研究 中 3 种基质在 10 h 增菌后,两种提取方法对副溶血性弧菌检测的 Ct 值没有明显差异,因此增菌 10 h 后进行副溶血性弧菌检测可以不用考虑样品复杂成分对检测结果的影响。本研究根据两种提取方法的检测结果并结合 GB 4789.7—2013 的要求,将所有检测样品的时间定为 10 h。本研究结果表明建立的 *gyrB*-IAC 实时荧光定量 PCR 方法具有结果准确可靠、特异性强、灵敏度高、时间短等优点。水煮

法和试剂盒方法均能在前增菌 6 h 时检出副溶血性弧菌, IAC 均扩出, 表明两种方法均可采用。对于两种不同的细菌基因组 DNA 提取方法, 水煮法更简便, 费用低, 试剂盒方法提取的核酸纯度较水煮法高, 杂质少, 因而在实际检测中, 建议根据不同基质样品和食品检测需求选择提取方法。

综上所述, 本研究所建立的基于内参的副溶血性弧菌实时荧光定量 PCR 方法, 既能快速检测样品中的副溶血性弧菌, 又能实时监控 PCR 体系以防止假阴性结果的发生, 在进行大量食品样品的检测工作时, 是一种可靠、有效的初筛方法。

参考文献

[ 1 ] Akio Y, Jun'ichiro I, Varaporn V, et al. Quantitative modeling for risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in bloody clams in southern Thailand[ J]. Internat J Food Microbiol, 2008, 124( 1 ): 70-78.

[ 2 ] 林强, 李宁求, 付小哲, 等. 牡蛎中副溶血性弧菌荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用[ J]. 中国水产科学, 2011, 18( 1 ): 96-102.

[ 3 ] 刘阳, 孔繁德, 徐淑菲, 等. 副溶血性弧菌检测技术的研究进展[ J]. 经济动物学报, 2012, 16( 1 ): 49-62.

[ 4 ] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 4789. 7—2013 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验[ S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.

[ 5 ] 孙宏迪, 杜晰颖, 汪周佳, 等. 副溶血性弧菌实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立[ J]. 解放军医学杂志, 2010, 35( 8 ): 969-972.

[ 6 ] 王淑娜, 周向阳, 胡兴娟, 等. 基于 TaqMan 探针的双重荧光定量 PCR 方法检测海产品中的副溶血性弧菌[ J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26( 5 ): 455-458.

[ 7 ] HE P Y, CHEN Z W, LUO J Y, et al. Multiplex real-time PCR assay for detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains[ J]. Molecular and Cellular Probes, 2014, 28( 5 ): 246-250.

[ 8 ] 覃倚莹, 吴晖, 肖性龙, 等. *toxR* 基因作为荧光定量 PCR 靶基因设计 TaqMan 探针快速检测副溶血性弧菌[ J]. 生物工程学报, 2008, 24( 10 ): 1837-1842.

[ 9 ] WEI S, ZHAO H, XIAN Y, et al. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control[ J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2014, 79( 2 ): 115-118.

[ 10 ] 张晓君, 梁利国, 阎斌伦, 等. 水产动物致病性副溶血性弧菌双重 PCR 检测方法的研究[ J]. 海洋科学, 2010, 34( 10 ): 7-12.

[ 11 ] Pascual J, Macian M C, Arahal D R, et al. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes[ J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 60( 1 ): 154-165.

[ 12 ] Siebert P D, Larrick J W. PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR[ J]. Biotechnology, 1993, 14( 2 ): 244-249.

[ 13 ] 苏裕心, 高珊, 康琳, 等. 荧光定量 PCR 快速检测金黄色葡萄球菌方法的建立[ J]. 军事医学科学院院刊, 2010, 34( 1 ): 25-29.

[ 14 ] 何晓华, 余水静, 陈万义, 等. 添加有扩增内标的副溶血性弧菌 PCR 检测方法[ J]. 微生物学报, 2010, 50( 3 ): 387-394.

实验技术与方法

离子色谱法测定辣椒粉中的二氧化硫

徐慧, 沈文雯, 王柯, 刘畅  
(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

**摘要:**目的 建立一种快速准确的离子色谱法测定辣椒粉中二氧化硫残留量。方法 样品在酸性条件下加热蒸馏, 二氧化硫被 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 吸收氧化为硫酸根, 通过离子色谱法测定。结果 二氧化硫含量在 0 ~ 667.0 mg/kg 范围内线性良好, 回归方程  $y = 1.01809x - 0.07779$ , 相关系数  $r = 0.999\ 9$ ; 加标浓度为 1.0、10、100 mg/kg 时, 回收率为 82.79% ~ 108.7%, 相对标准偏差 (RSD) 均 < 5% ( $n = 6$ ); 检出限为 0.1 mg/kg。结论 本方法前处理简单, 干扰少, 准确度、灵敏度高, 适合辣椒粉中二氧化硫残留检测。

**关键词:** 二氧化硫; 离子色谱; 辣椒粉; 食品污染物; 残留限量

**中图分类号:** R155.5; S641.3; O622.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456(2015)04-0413-04

**DOI:** 10.13590/j.cjfh.2015.04.014