

改良分子信标- 实时 PCR 快速检测副溶血弧菌

扈庆华¹, 郑薇薇², 石晓路¹, 李庆阁², 王冰¹, 庄志雄¹, 刘小立¹

【摘要】 目的: 建立改良分子信标- 实时 PCR 检测副溶血弧菌的快速方法, 应用于副溶血弧菌食物中毒的快速诊断和海产品检验。方法: 根据 GenBank 公布副溶血弧菌的耐热直接溶血毒素基因 (TDH) 的保守序列, 设计一对引物和改良分子信标探针, 用 FAM 荧光剂标记探针的 5', 并进行特异性和灵敏度分析; 同时以 11 种细菌作对照, 建立改良分子信标检测副溶血弧菌的实时 PCR 反应体系, 应用于副溶血弧菌食物中毒快速诊断和食品微生物检测。结果: 检测 12 种细菌, 只有副溶血弧菌有荧光信号, 与其他细菌无交叉反应, DNA 灵敏度为 166.6 fg/μl, 菌液灵敏度为 69 cfu/ml 或 6 cfu/PCR 反应体系。改良分子信标- 实时 PCR 反应体系检测 40 株副溶血弧菌均出现特异的荧光信号, 无干扰。对 3 起细菌性食物中毒共 48 份样品和 100 份海产品进行检测, 9 份副溶血弧菌实时 PCR 阳性, 其中 7 份副溶血弧菌细菌培养阳性, 其余样品都为阴性。检测时间仅需 2 h。结论: 改良分子信标- 实时 PCR 检测体系快速、灵敏度高, 特异性强, 可用于副溶血弧菌食物中毒的快速诊断, 为食源性疾病的分子流行病学调查提供新的检测手段。

【关键词】 副溶血弧菌; 改良分子信标; 实时 PCR; TDH; 快速检测

【中图分类号】 R117 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-8507 (2004) 03-0441-03

RAPID DETECTION OF V. PARAHAEMOLYTICUS USING MODIFIED MOLECULAR BEACONS AND REAL-TIME PCR. HU Qing-hua, ZHENG Wei-wei, SHI Xiao-lu, et al. Center for Disease Control and Prevention of Shenzhen City, Xianen, 518020.

Abstract Objective: To develop modified molecular beacon based fluorescence PCR assay for the detection of V. parahaemolyticus. The established method was applied to the rapid diagnosis of V. parahaemolyticus food poisoning and sea food examination. **Methods:** Two sets of primers were selected from the core sequence of TDH gene published in GenBank, and the modified molecular beacon labeled at 5' end & 3' end with different fluorophores was designed. The molecular beacon and primer set were tested against numerous strains from 12 different bacterial species. Real-time PCR assay for V. parahaemolyticus was established. Then this assay was applied to the food poisoning diagnosis. **Results:** Only V. parahaemolyticus strains generated fluorescent signals, and no cross-reaction was observed with other 11 bacteria. The sensitivity achieved was 69 cfu/ml or 6 cfu/PCR reaction. The assay was used to detect 40 V. parahaemolyticus strains, no false signals were observed. Forty-eight food poisoning samples and 100 sea food samples were tested, nine samples were found V. parahaemolyticus positive by real time PCR. Among the tested positive samples, seven samples were detected positive by traditional culture method. The overall test could be finished within one day starting from sample preparation. **Conclusion:** The modified molecular beacon-based real-time PCR assay was rapid, sensitive, and specific. It required 2 hours for the detection. It could be applied to the rapid diagnosis of V. parahaemolyticus food poisoning & food microbiology examination.

Key words: V. parahaemolyticus; Modified molecular beacon; TDH; Real-time PCR; Rapid detection

副溶血弧菌广泛分布于自然界, 尤其以海产品携带率最高, 是引起细菌性食物中毒的一种重要致病菌。目前细菌性食物中毒在食源性疾病发病率中仍占较高的比率。沿海一带由于人们喜食海产品, 因此副溶血弧菌食物中毒发病率很高。如何及时控制副溶血弧菌食物中毒的发生, 快速诊断是

关键。目前副溶血弧菌检验仍以传统培养法为主, 但操作繁琐, 耗时长, 需 5 d 时间。而且副溶血弧菌鉴定的生化指标不稳定, 常常需重复 1~2 次实验, 才能最后确定是否为副溶血弧菌, 因此影响食物中毒的快速诊断和处理。

随着分子生物学技术的发展, 人们采用 PCR 技术应用于细菌的快速诊断。然而传统 PCR 技术易污染, 造成检测失败。自 1995 年美国 PE 公司提出实时 PCR 检测原理后, 实时 PCR 以其快速、定量、无需电泳、无交叉污染等突出优点而被广泛采用。改良分子信标是在分子信标探针基础上提出的一种新型分子探针, 以它为基础建立的实时 PCR 技术, 可以更好地实现多重实时 PCR 检测多种致病菌。本文采用改良分子信标技术建立副溶血弧菌的实时 PCR 方法, 并用于副溶血弧菌食物中毒的快速诊断, 现将结果报告如下:

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (30300281), 广东省卫生厅资助项目 (A 2003709)

【作者单位】 1 深圳市疾病预防控制中心, 厦门, 518020

2 厦门大学生命科学学院

【作者简介】 扈庆华, 女, 硕士, 副主任技师, 从事细菌分子生物学研究。曾获广东省科技进步三等奖一项、深圳市科技进步一等奖一项、广东省医药卫生科技进步二等奖一项。

1 材料和方法

1.1 实验用菌株 12 种细菌共 100 株菌株, 包括 1 株沙门氏菌、1 株志贺氏菌、1 株产毒性大肠杆菌、1 株金黄色葡萄球菌、1 株蜡样芽胞杆菌、1 株李斯特氏菌、1 株溶藻弧菌、1 株河弧菌、1 株创伤弧菌、1 株变形杆菌、40 株副溶血弧菌和 50 株霍乱弧菌。副溶血弧菌和霍乱弧菌都是从深圳市历年食物中毒或霍乱爆发流行中分离出的, 溶藻弧菌和创伤弧菌由广东省疾病预防控制中心微生物检验所提供, 其余菌株均购自中国药品生物制品检定所。

1.2 菌株的分离和鉴定 细菌的分离和鉴定均按照中华人民共和国颁布的《食品微生物学》国家检验标准操作。

1.3 模板提取 (1) DNA 提取: 菌株经 LB 增菌培养过夜后, 菌体用 500uITE buffer 悬浮, 加入终浓度为 50ug/u1 溶菌酶, 37 作用 1hr, 然后再加入终浓度为 1% SDS 和 0.2ug/u1 的蛋白酶 K, 55 作用 1hr 后, 用酚-氯仿抽提 DNA。(2) 取 1ml 菌液, 离心沉淀, 制备菌悬液, 煮沸, 取上清液 5u1 即可用于实时 PCR 反应。

1.4 引物和探针设计 根据 GenBank 公布的副溶血弧菌耐热直接溶血素基因 (TDH) 的序列并比较分析, 自行设计一对引物和探针。TDH - F: 5' - AAACATCTGCTTTTGA GCTTCCA - 3', TDH - L: 5' - CTC GAA-CAACAAACAATA TCTCA TCA G - 3', TDH 探针: FAM 5' - CCGGGGTGTCCCTTTTCTGCCCCGG - Dabcyl, 扩增片段为 75bp。引物和探针均由上海 Sangon 公司合成。

1.5 PCR 反应条件 反应总体积为 25u1, 内含 5u1 模板, 2.5u110 × PCR 缓冲液, 1.5mmolMgCl₂, 0.25mmol/L dNTP, 1U Taq 酶, 25pmol引物, 25pmol探针: 实时 PCR 反应参数为: 94 预变性 5min, 40 个循环中 94 变性 45s, 62 退火 1min, 72 延伸 1min。用 icycle 荧光 PCR 扩增仪 (Bio-Rad) 检测退火的荧光。

1.6 特异性检测 用上述 11 种细菌的 DNA 作对照, 对副溶血弧菌进行 TDH 改良分子信标实时 PCR 扩增。灵敏度分析: 选一株副溶血弧菌 (编号为 VP54) 作为灵敏度分析的代表株, 包括 DNA 灵敏度分析和菌液灵敏度分析。DNA 灵敏度分析: 按常规 DNA 提取方法提取模板 DNA。用 UItro-spec2000 紫外可见光蛋白核酸分析仪 (Pharmacia 公司) 测 DNA 的浓度, 然后进行 5 倍稀释, 每个稀释度取 1u1 用于实时 PCR 反应。菌液灵敏度分析: VP54 菌株经碱性蛋白胨水

(APW) 增菌过夜后, 进行 10 倍稀释, 共做 10 个稀释度, 然后依次取 10 个稀释度的 1ml 菌液进行实时 PCR 反应。同时按中华人民共和国颁布的《食品微生物检验标准》做细菌总数计数。

1.7 应用 对 40 株副溶血弧菌进行 TDH 实时 PCR 检测, 并用于 3 起细菌性食物中毒 48 份样品和 100 份海产品的检测。

2 结果

2.1 样品模板 DNA 提取 (1) 大便、呕吐物标本: 用生理盐水悬浮, 煮沸, 10000rpm 离心 2min, 取 5u1 上清液即可用于实时 PCR 反应。(2) 食品样品: 用碱性蛋白胨水增菌 6 ~ 8 小时后, 取 1ml 菌液富集, 煮沸, 再取 5u1 上清液即可用于实时 PCR 反应。上述方法不需酚-氯仿抽提, 快速简便有效, 适于大批样品的模板提取。

2.2 特异性分析 12 种细菌经改良分子信标体系检测, 只有副溶血弧菌有荧光信号, 其他细菌无荧光信号。见表 1。

2.3 灵敏度结果 DNA 灵敏度为 166.4 fg/u1, 菌液灵敏度为 6 cfu/PCR 反应体系, 对原始样品而言, 菌液灵敏度为 69 cfu/ml, 见表 2 和表 3。

2.4 应用 40 株副溶血弧菌改良分子信标实时 PCR 都为阳性, 48 份食物中毒样品中 9 份副溶血弧菌实时 PCR 阳性, 相对应的有 6 份样品副溶血弧菌培养阳性, 100 份海产品霍乱弧菌实时 PCR 阴性, 相对应的细菌培养全部为阴性。

表 1 副溶血弧菌实时 PCR 特异性分析

细菌	实验用菌株	实时 PCR 阳性数
大肠杆菌	1	0
蜡样芽胞杆菌	1	0
单增李斯特氏菌	1	0
志贺氏菌	1	0
沙门氏菌	1	0
金黄色葡萄球菌	1	0
变形杆菌	1	0
河弧菌	1	0
创伤弧菌	1	0
溶藻弧菌	1	0
副溶血弧菌	40	40
霍乱弧菌	50	0

表 2 副溶血弧菌实时 PCR 检测体系 DNA 灵敏度

DNA 量	325ng	65ng	13ng	2.6ng	520pg	104pg	20.8pg	4.16pg	832fg	166.4fg	35.5fg
域值	13.9	15.6	17.6	19.9	22.2	24.4	26.7	29	31.7	34.7	N/A

表 3 副溶血弧菌实时 PCR 检测体系灵敏度

cfu/ml	6.9 × 10 ⁸	6.9 × 10 ⁷	6.9 × 10 ⁶	6.9 × 10 ⁵	6.9 × 10 ⁴	6.9 × 10 ³	6.9 × 10 ²	69	5	0
cfu/PCR 反应体系	6.9 × 10 ⁷	6.9 × 10 ⁶	6.9 × 10 ⁵	6.9 × 10 ⁴	6.9 × 10 ³	6.9 × 10 ²	69	6	0	0
域值	12.8	14.2	15.9	19.8	23.8	26.2	31.2	38.2	N/A	N/A

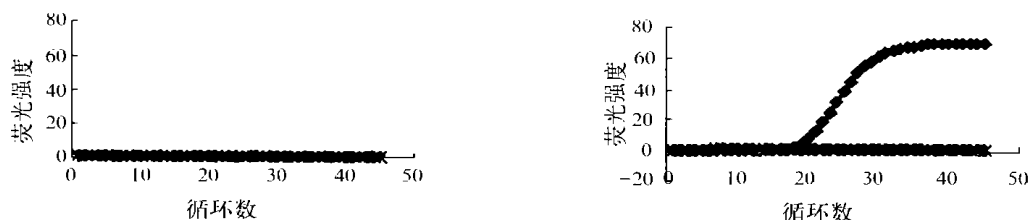


图1 分子信标-实时PCR检测副溶血弧菌

左图: 空白和阴性对照 右图: 副溶血弧菌PCR扩增阳性

3 讨论

本文在改良分子信标技术的基础上,建立了实时PCR快速检测副溶血弧菌的方法。研究表明:(1)此方法灵敏度高,每mg或每ml样品含69个细菌,即可检出。(2)特异性强,与对照组11种细菌无交叉反应。(3)操作简单,结果观察直观明了,可一次检测96份标本(含阴阳性对照)。(4)适用于副溶血弧菌食物中毒的快速诊断和大量样品的检测,无交叉污染。对于大便和呕吐物标本,从样品处理到检测结果仅需2h检测时间,对食品标本仅需1d时间(包括样品的前期处理)。在建立单一实时PCR快速检测细菌的基础上,最终实现多重实时PCR同时诊断10种食源性致病菌,满足常见细菌性食物中毒快速诊断的要求。

改良分子信标探针是为了提高杂交效率,在原来分子信标原理基础上提出的。改良分子信标的突出特点是将分子信标的臂部分也作为靶识别序列,而不仅仅是用于形成发夹结构的无关添加序列。对于同样长度的检测靶序列,改良分子信标比分子信标更短,而且由于臂序列不再悬空,因而与靶序列的结合更趋紧密。已经证明,改良分子信标比分子信标更易设计且成功率更高,同时对扩增条件要求不严。本文采用改良分子信标的设计思路,副溶血弧菌的引物和探针设计一次成功,而且与弧菌属的其他弧菌和革兰氏阴性杆菌以及革兰氏阳性球菌均无交叉反应,进一步说明了改良分子信标的优势。

溶血毒素是副溶血弧菌的致病因子,主要包括不耐热溶血毒素(TLH)、直接耐热溶血毒素(TDH)和相对耐热直接溶血毒素。其中TDH作为生物标志物广泛应用于副溶血弧菌的诊断。目前国外采用实时PCR技术快速检测副溶血

弧菌,国内未见实时PCR检测副溶血弧菌的文献报道,本文所建立的副溶血弧菌实时荧光PCR检测方法,可用于细菌性食物中毒的快速诊断和食品微生物的检验。随着生态环境的变化和抗生素的滥用,许多致病菌引起的临床症状越来越不典型,常常需要同时检测多种细菌才能确定病原。另外在食品微生物检验中,如果只采用单一分子信标体系检测单一细菌,就会出现成本高的缺点。这就对快速诊断技术提出了更高的要求:又快又能同时检测多种病原微生物,因此多重实时PCR技术同时检测多种细菌是未来发展的趋势。

[参考文献]

- [1] Blackstone GM, Nordstrom JL. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 53: 149-155.
- [2] Chen shu, Yee Arlene. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, 35: 239-250.
- [3] Palomares. Concepcion. Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR [J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003, 45: 183-189.
- [4] Fortin NY, Mulchandani A shok. Use of Real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Analytical Biochemistry* 2001, 289: 281-288.
- [5] Li Q, Liang J, Luan G, Zhang Y and Wang Q. Molecular Beacon-based homogeneous fluorescence PCR assay for the diagnosis of infectious diseases [J]. *Anal Sci*, 2000, 16 (2): 245-248.

(上接第440页) 是碘缺乏病监测的一个重要项目。我市儿童尿碘中位数从1995年的86.20提高到2002年的157.46%。从1997年起连续6年均大于100 $\mu\text{g}/\text{L}$, 2000-2002年连续3年尿碘中位数在100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 以上的人数达到了90%以上。证明通过以上防治措施的落实,儿童尿碘含量稳定在较高水平。

碘盐的质量直接影响碘缺乏病的防治效果,过高或过低都会危害人体的身体健康。全市碘盐合格率由1995年的49.35%上升到2002年的88.32%,非碘盐、不合格碘盐的

检出率逐年下降,到2002年已降至11.68%。但与消除碘缺乏病标准碘盐合格率大于90%还有一定差距。由于我市邻近产盐地区,受走私的非碘盐 and 不合格碘盐,甚至假冒伪劣盐的冲击较大,致使碘盐质量难以保证。因此,加大碘盐执法力度,对流入市场的非碘盐等不合格碘盐给予严厉打击,才能使国家计划供应的主渠道得以畅通,使我市碘缺乏病防治措施得到更好的落实。

[收稿日期] 2003—09—12