

改良分子信标—实时 PCR 快速检测霍乱弧菌

扈庆华¹, 郑薇薇², 石晓路¹, 叶宝英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 检测霍乱弧菌的快速方法, 应用于霍乱监测。方法 根据 GenBank 公布的霍乱弧菌肠毒素基因 A 亚单位 (ctxA) 的保守序列, 设计一对引物和改良分子信标探针, 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霍乱弧菌的实时 PCR 反应体系, 应用于霍乱监测。结果 霍乱弧菌改良分子信标检测体系检测 12 种细菌, 只有霍乱弧菌有荧光信号, 与其他细菌无交叉反应, DNA 灵敏度为 102.4fg/ul, 菌液灵敏度为 32cfu/ml 或 3 cfu/PCR 反应体系。对 100 份海产品和 30 份腹泻病人大便标本进行检测, 结果都为阴性。检测时间仅需 2h。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, 可用于霍乱的快速诊断, 为霍乱的分子流行病学调查提供新的检测手段。

关键词: 霍乱弧菌; 改良分子信标; 实时 PCR; ctxA; 快速检测

中图分类号: R378.3 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2004)04-499-03

Rapid detection of *Vibrio cholera* by using modified molecular beacon based real-time PCR technique HU Qing-hua¹, ZHENG Wei-wei², SHI Xiao-lu¹, et al (1. Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, Guangdong, P. R. China; 2. Life Science College of Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, P. R. China)

Abstract: Objective To develop a modified molecular beacons and real-time PCR for rapid detection of *Vibrio cholera* and surveillance of cholera. **Methods** One set of primers was selected from the core sequence of ctxA gene in GenBank and the corresponding modified molecular beacon labeled with fluorophors was designed. The molecular beacon and primer set was tested against numerous strains from 12 different bacterial species. Real-time PCR assay for the detection of *V. cholera* was established & applied to cholera surveillance. **Results** Only *V. cholera* strains possessing ctxA gene generated fluorescent signals, and no cross-reaction was observed with other 11 bacteria. The sensitivity achieved was 32cfu/ml or 3cfu/PCR reaction. 100 sea food samples & 30 stools were tested, all samples were negative by real time PCR & traditional culture method. **Conclusion** The modified molecular beacons-based real-time PCR assay was rapid, sensitive, and specific. It required 2 hours. It could be applied to the rapid diagnosis of cholera.

Key words: *V. cholera*; Modified molecular beacon; ctxA; Real-time PCR; Rapid detection

弧菌属广泛分布于自然界, 尤以水中为多, 有 100 多种, 主要致病为霍乱弧菌和副溶血弧菌。前者引起霍乱, 后者引起食物中毒。霍乱为甲类传染病, 以传播快, 发病急, 流行面广而备受重视。如何及时控制霍乱的发生, 早发现、早诊断是关键。目前霍乱弧菌检测仍以传统培养法为主, 其操作繁琐, 耗时长。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、无需后电泳、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, 本文采用改良分子信标技术建立霍乱弧菌的实时 PCR 方法, 并用于霍乱快速诊断, 现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 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 株大肠杆菌、1 株金黄色葡萄球菌、1 株蜡芽芽孢杆菌、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。霍乱弧菌的分离鉴定和肠毒素实验按照《霍乱防治手册》(1999 年版) 操作。其他 11 种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。

1.2 菌样模板提取 (1) DNA 提取: 菌株经 LB 增菌培养过夜后, 菌体用 500μTE buffer 悬浮, 加入终浓度为 50μg/ml 溶菌酶, 37℃作用 1hr, 然后再加入终浓度

¹ 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(A2003709)

作者单位: 1. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518020; 2. 厦门大学生命科学院, 福建 厦门 361005.

作者简介: 扈庆华(1968~), 女, 硕士, 副主任技师, 主要从事细菌快速诊断和分子分型研究.

为 1% SDS 和 0.2 μg/ml 的蛋白酶 K, 55 °C 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 5 μl 即可用于实时 PCR 反应。

1.3 样品模板 DNA 提取 (1) 大便、呕吐物标本: 用生理盐水悬浮, 煮沸, 10 000rpm 离心 2min, 取 5 μl 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 6~8h 后, 取 1ml 菌液富集, 煮沸, 再取 5 μl 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。

1.4 霍乱弧菌改良分子信标检测体系的建立

1.4.1 引物和探针设计 根据 GenBank 公布的霍乱弧菌肠毒素基因(ctxA)的序列并比较分析, 自行设计一对引物和探针。ctxA-F: 5' - TCCGAGCATAGACTTGA - 3' cxA-R: 5' - TCGATGATCITGGAGCA TTCC - 3', cxA-Probe: HEX- 5' - CCGTGGATTCATCATGCACCGCC ACGG- 3' Dabcyl, 扩增片段为 80bp。引物的探针均由上海 Sangon 公司合成。

1.4.2 PCR 反应条件 反应总体积为 25 μl, 内含 5 μl 模板, 2.5 μl 10 × PCR 缓冲液, 1.5 mmol MgCl₂, 0.25 mmol/L dNTP, 1U Taq 酶, 25 pmol 引物, 25 pmol 探针。实时 PCR 反应参数为: 94 °C 预变性 5min, 40 个循环中 94 °C 变性 45s, 62 °C 退火 1min, 72 °C 延伸 1min。采用 iCycler 实时 PCR 扩增仪(Bio-Rad 公司)退火阶段检测荧光。

1.4.3 特异性检测 以沙门氏菌、志贺氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌、蜡样芽孢杆菌、李斯特氏菌、深藻弧菌、河弧菌、创伤弧菌和副溶血弧菌的 DNA 作对照, 对霍乱弧菌进行 cxA 改良分子信标实时 PCR 扩增。

1.4.4 灵敏度分析 选一株小川型霍乱弧菌(编号为 V25)作为灵敏度分析的代表株。包括 DNA 灵敏分析和菌液灵敏度分析。DNA 灵敏度分析按常规 DNA 方法提取模板 DNA。用 Ultraspec2000 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 1 μl 用于实时 PCR 反应, 菌液灵敏度分析为 V25 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。同时相对应的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。

1.5 应用 对 50 株 O1 群和 O139 霍乱弧菌进行 cxA 改良分子信标-实时 PCR 检测。并应用于 100 份海产品和 30 份腹泻病人大便标本的检测。

2 结果

2.1 特异性分析 12 种细菌经改良分子信标体系检

测, 只有霍乱肠毒素实验阳性的霍乱弧菌有荧光信号, 其他细菌无荧光信号。见表 1 和图 1。

表 1 霍乱弧菌实时 PCR 特异性分析

Table 1 Specificity of real-time PCR detection of *V. cholera*

细菌 Bacteria	实验用菌株 Number tested	肠毒素 Enterotoxin	实时 PCR 阳性数 Number testing positive by cxA real-time PCR
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	1	—	0
蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	1	—	0
单增李斯特氏菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	1	—	0
志贺氏菌 <i>Shigella</i>	1	—	0
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	1	—	0
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	1	—	0
变形杆菌 <i>Proteus</i>	1	—	0
河弧菌 <i>V. fluidis</i>	1	—	0
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	1	—	0
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	1	—	0
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	40	—	0
霍乱弧菌 <i>V. cholera</i>	5	—	0
霍乱弧菌 <i>V. cholera</i>	45	—	45

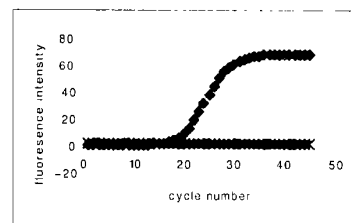
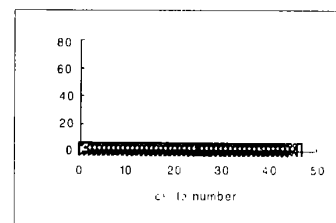


图 1 改良分子信标-实时 PCR 检测霍乱弧菌, 上边图为阴性对照和空白对照, 下边图为霍乱弧菌阳性。

Fig 1 The modified molecular beacon based real-time PCR detection of *V. cholera*. The cxA probe was labeled by HEX. The top one is for empty & negative control, the lower one is positive for VC.

2.2 灵敏度结果 霍乱弧菌 DNA 灵敏度为 102.4 fg/μl, 菌液灵敏度为 3 cfu/PCR 反应体系, 对原始样品而言, 菌液灵敏度为 32 cfu/ml。结果见表 2~3。

表 2 霍乱弧菌实时 PCR 检测体系 DNA 灵敏度

Table 2 Sensitivity of real-time PCR detection of *V. Cholerae* DNA

DNA 循环数 No. cycle	200ng	40ng	8ng	1. 6ng	320pg	64pg	12. 8pg	2. 56pg	512fg	102. 4fg	20. 48fg	阴性 N/A Negative
	15. 1	18. 2	20. 4	21. 6	24. 3	26. 1	28	30. 9	34. 5	36. 2		

表 3 霍乱弧菌实时 PCR 检测体系菌液灵敏度

Table 3 Sensitivity of real-time PCR detection of *V. Cholera*

cfu/ml	3. 2×10 ⁸	3. 2×10 ⁷	3. 2×10 ⁶	3. 2×10 ⁵	3. 2×10 ⁴	3. 2×10 ³	3. 2×10 ²	32	3	0
cfu/PCR reaction	3. 2×10 ⁷	3. 2×10 ⁶	3. 2×10 ⁵	3. 2×10 ⁴	3. 2×10 ³	3. 2×10 ²	32	3	0	0
循环数 No. cycle	9. 7	16. 9	18. 5	22. 6	27. 2	31	33	37. 4	N/A	NA/A

2.3 应用 50 株 O1 群和 O139 霍乱弧菌, 45 株菌株 (40 株为 O1 群霍乱弧菌流行株, 5 株为 O139 病人分离的菌株) 改良分子信标实时 PCR 阳性, 5 株非流行株实时 PCR 阴性; 100 份海产品和 30 份腹泻病人大便标本荧光 PCR 阴性, 相对应的传统培养方法为阴性。该检测体系灵敏度高, 特异性强, 检测时间仅需 2h。

3 讨论

本文在改良分子信标技术的基础上, 建立了实时 PCR 检测霍乱弧菌的方法。研究表明: (1) 此方法灵敏度高, 每毫克或每毫升样品含 32 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) 适用于霍乱弧菌的快速诊断和大量样品的检测。检测大便标本仅需 2h 检测时间, 检测海产品标本仅需 1d 时间 (包括样品的前期处理)。在单一实时 PCR 研究的基础上, 最终实现多重 PCR 同时诊断 10 种食源性致病菌, 满足常见食源性疾病的快速诊断的要求。

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列短, 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, 本文设计引物和分子信标探针一次成功, 检测反应体系灵敏度高、特异性强, 进一步说明了改良分子信标的优势。

霍乱作为甲类传染病, 一直受到各级政府的重视, 腹泻病人和外环境的霍乱监测是霍乱防治的重点。外环境监测包括水和海产品检测。由于水和海

产品中含大量弧菌, 采用传统方法往往需花很多时间用于霍乱弧菌和其他弧菌的区别, 耗时耗力, 因此需采用简便快速的检测技术达到快速筛选的目的, 荧光 PCR 技术以其灵敏、操作简单、不需电泳的特点满足了快速检测的需要。而且编码霍乱肠毒素 A 亚单位的基因 (ctxA) 是 O1 群霍乱弧菌和 O139 霍乱弧菌的一个最重要的毒力因子, 凡 O1 群霍乱弧菌流行株和 O139 霍乱弧菌 (病人标本分离) 都含有这一致病基因。因此本文采用 ctxA 实时荧光 PCR 检测海产品和大便标本, 简单、快速, 节省人力物力, 可用于大量样品的快速检测。

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。这就对快速诊断技术提出了更高的要求, 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] Palmares. 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 Ashok. 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.

收稿日期: 2004- 04- 22