

双重实时 PCR 快速同时检测霍乱弧菌和副溶血弧菌

扈庆华 郑薇薇 石晓路 李庆阁 王冰 庄志雄 刘小立 贺连华 吴平芳

【摘要】 目的 建立改良分子信标-双重实时 PCR 同时检测霍乱弧菌和副溶血弧菌的快速方法,应用于霍乱监测、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 公布的霍乱弧菌肠毒素基因 A 亚单位(ctxA)和副溶血弧菌的耐热直接溶血毒素基因(TDH)的保守序列,分别设计引物和改良分子信标探针,以 10 种细菌作对照,建立双重实时 PCR-改良分子信标检测体系,应用于副溶血弧菌食物中毒快速诊断和霍乱监测。结果 改良分子信标-双重实时 PCR 反应体系 DNA 灵敏度为 102.4~166.6fg/μl,菌液灵敏度为 32~64CFU/ml 或 3~6CFU/PCR 反应体系,无交叉反应。此反应体系同时检测 40 株副溶血弧菌和 50 株霍乱弧菌,均出现特异的荧光信号,两种细菌检测互不干扰。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。从样品处理到检测结果仅需 1 天时间。结论 改良分子信标-双重实时 PCR 检测体系快速、灵敏度高、特异性强,可用于霍乱和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】 霍乱弧菌; 副溶血弧菌; 改良分子信标; 双重实时 PCR; 同步检测

Fast detection of *V. cholera* and *V. parahaemolyticus* by a modified molecular beacons and real-time PCR
HU Qing-hua*, ZHENG Wei-wei, SHI Xiao-lu, LI Qing-ge, WANG Bing, ZHUANG Zhi-xiong, LIU Xiao-li, HE Lian-hua, WU Ping-fang. *Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China
Corresponding author: HU Qing-hua, Email: hqh082002@yahoo.com

【Abstract】 Objective A dual detection of *V. cholera* and *V. parahaemolyticus* with modified molecular beacons and real-time PCR was developed. **Methods** Two sets of primers were selected from the core sequence of ctxA gene and TDH gene published in GenBank and two corresponding modified molecular beacons labeled with different fluorophores were designed. The molecular beacons and primer set were tested against numerous strains from 12 different bacterial species. Then the two assays were combined together to establish the dual real-time PCR assay. **Results** The sensitivity achieved was 102.4~166.6fg/μl, 32~64CFU/ml or 3~6 CFU/PCR reaction. There was no cross-reaction with other bacteria. The dual real-time PCR assay was used to detect 40 *V. parahaemolyticus* strains and 50 *V. cholera* strains, no false signals were observed. Forty-eight food poisoning samples and 100 sea food samples were tested, nine samples were *V. parahaemolyticus* positive by real time PCR. Among the tested positive samples, seven samples were positive detected by traditional culture method. The test could be completed in one day starting. **Conclusion** The modified molecular beacons-based dual real-time PCR assay was a fast, sensitive and specific one. It could be applied to the quick diagnosis of cholera and *V. parahaemolyticus* food poisoning.

【Key words】 *V. cholera*; *V. parahaemolyticus*; Modified molecular beacon; Dual real-time PCR; Simultaneous detection

弧菌属广泛分布于自然界,尤以水中为多,有 100 多种,主要致病菌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,流行面广而受到各级政府的重视。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,因此霍乱和副溶血弧菌食物中毒仍是沿海地区最主要的两种传染病。如何及时控制霍乱和副溶血弧菌食物中毒的发生,快速诊断是关键。目前霍乱弧菌和副溶血弧菌检验仍以传统培养法为主,但操作繁琐、耗时长,特别是副溶血弧菌检测需 5 天时间。随着分子生物学技术的发展,人们将 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

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),深圳市科技局资助项目(200404139)

作者单位:518020 深圳市疾病预防控制中心(扈庆华,石晓路,王冰,庄志雄,刘小立,贺连华,吴平芳);厦门大学生命科学院(郑薇薇,李庆阁)

通讯作者:扈庆华,Email: hqh082002@yahoo.com,电话:0755-25637131

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^[1-3]。改良分子信标是我们分子信标探针基础上提出的一种新型分子探针^[4], 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。我们采用改良分子信标技术建立霍乱弧菌和副溶血弧菌的双重实时 PCR 方法, 并用于霍乱和食物中毒的快速诊断。

材料和方法

实验用菌株: 12 种细菌共 104 株菌株。包括 1 株沙门菌、1 株志贺菌、5 株产毒性大肠杆菌(1 株血清学试验为阳性, 4 株血清学试验和肠毒素试验阳性)、1 株金黄色葡萄球菌、1 株蜡样芽孢杆菌、1 株李斯特菌、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以及 2 株产毒性大肠杆菌都是从深圳市历年食物中毒或霍乱暴发流行中分离, 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。

菌株的分离和鉴定: 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以及产毒性大肠杆菌的肠毒素试验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。

模板提取: (1) DNA 提取: 菌株经 LB 增菌培养过夜后, 菌体用 500 μ l TE buffer 悬浮, 加入终浓度为 50 μ g/ml 溶菌酶, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h, 然后再加入终浓度为 1% SDS 和 0.2 μ g/ml 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 作用 1 h 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 μ l 即可用于实时 PCR 反应。

单一霍乱弧菌改良分子信标检测体系的建立

(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'-TCCGGAGCATAGA GCTTGA-3', ctxA-R: 5'-TCGATGATCTGGAGCATTCC-3', ctxA-Probe: HEX-5'-CCGTGGATTCATCATGCACCG CCACGG-3' Dabeyl, 扩增片段为 80bp。引物和探针均由上海 Sangon 公司合成。

(2) PCR 反应条件: 反应总体积为 25 μ l, 内含 5 μ l 模板, 2.5 μ l 10 \times PCR 缓冲液, 1.5mmol MgCl₂,

0.25mmol/L dNTP, 1U Taq 酶, 25 μ mol 引物, 25 μ mol 探针。实时 PCR 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 40 个循环中 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。采用 iCycler 实时 PCR 扩增仪(Bio-Rad 公司) 退火阶段检测荧光。

(3) 特异性检测: 以沙门菌、志贺菌、产毒性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌、蜡样芽孢杆菌、李斯特菌、溶藻弧菌、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 ctxA 改良分子信标实时 PCR 扩增。

(4) 灵敏度分析: 选 1 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 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 μ l 用于实时 PCR 反应。菌液灵敏度分析: 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。

(5) 应用: 对 50 株 O1 群和 O139 霍乱弧菌进行 ctxA 改良分子信标-实时 PCR 检测。

单一副溶血弧菌改良分子信标检测体系的建立

(1) 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'-AAACATCTGCITTTGAGCTTCCA-3', TDH-L: 5'-CTCGAACAAACAATATCTCATCAG-3', DH 探针: FAM-5'-CCGGGTGFCCTTTTCTGCCCCCGG-Dabeyl, 扩增片段为 75bp。引物和探针均由上海 Sangon 公司合成。

(2) PCR 反应条件: 反应总体积为 25 μ l, 内含 5 μ l 模板, 2.5 μ l 10 \times PCR 缓冲液, 1.5mmol MgCl₂, 0.25mmol/L dNTP, 1U Taq 酶, 25 μ mol 引物, 25 μ mol 探针: 实时 PCR 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 40 个循环中 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。检测方法同上述(2)。

(3) 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。

(4) 灵敏度分析: 选 1 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。其分析方法与霍乱弧菌的

灵敏度分析方法相同。

(5) 应用: 对 40 株副溶血弧菌进行 TDH 改良分子信标-实时 PCR 检测。

改良分子信标-双重实时 PCR 反应体系的建立和应用: 在上述建立的单一检测体系的基础上, 优化反应条件, 建立起双色二重实时 PCR, 反应总体积为 25 μ l, 内含 5 μ l 模板, 2.5 μ l 10 \times PCR 缓冲液, 1.5mmol MgCl₂, 0.5mmol/L dNTP, 1U Taq 酶, 25 μ mol 引物, 25 μ mol 探针; 实时 PCR 扩增和检测条件同上, 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。

结 果

1. 样品模板 DNA 提取: (1) 粪便、呕吐物标本: 根据粪便和呕吐物量的多少, 用 100~200 μ l 生理盐水悬浮, 煮沸, 10 000r/min 离心 2 min, 取 5 μ l 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 h 后, 取 1ml 菌液富集, 煮沸, 再取 5 μ l 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. 霍乱弧菌改良分子信标体系检测结果

(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, 4 株肠毒素实验阳性的产毒性大肠杆菌(非霍乱弧菌)和 5 株从外环境分离的肠毒素实验阴性的霍乱弧菌均无荧光信号, 其他细菌也无荧光信号, 进一步证明了 *ctxA* 基因的特异性(表 1)。

表 1 霍乱弧菌和副溶血弧菌实时 PCR 特异性分析

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

Bacteria	No. tested	Enterotoxin	Number testing positive by <i>ctxA</i> real-time PCR	Number testing positive by TDH real-time PCR
Enterotoxin <i>E. coli</i>	1	-	0	0
Enterotoxin <i>E. coli</i>	4	+	0	0
<i>B. cereus</i>	1	-	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	1	-	0	0
<i>Shigella</i>	1	-	0	0
<i>Salmonella</i>	1	-	0	0
<i>S. aureus</i>	1	-	0	0
<i>Proteus</i>	1	-	0	0
<i>V. fluvialis</i>	1	-	0	0
<i>V. vulnificus</i>	1	-	0	0
<i>V. alginolyticus</i>	1	-	0	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	40	-	0	40
<i>V. cholera</i>	5	-	0	0
<i>V. cholera</i>	45	+	45	0

(2) 灵敏度结果: DNA 灵敏度为 102.4fg, 菌液灵敏度为 3CFU/PCR 反应体系, 对原始样品而言, 菌液灵敏度为 32CFU/ml。

(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。该检测体系灵敏度高, 特异性强, 检测时间仅需 2 h。

3. 副溶血弧菌改良分子信标体系的检测结果

(1) 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(表 1)。

(2) 灵敏度分析: DNA 灵敏度为 166.4fg/ μ l, 菌液灵敏度为 6CFU/PCR 反应体系, 对原始样品而言, 菌液灵敏度为 69CFU/ml。

(3) 应用: 40 株副溶血弧菌改良分子信标实时 PCR 都为阳性。

4. 改良分子信标-双重实时 PCR 检测体系的建立和应用: 改良分子信标-双重实时 PCR 反应体系稳定, 灵敏度高, 特异性强, 两种细菌的检测互不干扰, 无交叉反应(图 1)。48 份食物中毒样品 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。

讨 论

我们在改良分子信标技术的基础上, 建立了双重实时 PCR 同时检测两种细菌的方法。研究表明: (1) 此方法灵敏度高, 每毫克或每毫升样品含 32~69CFU 细菌, 即可检出。(2) 特异性强, 与对照组 10 种细菌无交叉反应, 尤其与霍乱弧菌毒力因子相似的产毒性大肠杆菌也无交叉反应, 即本研究中所采用的 4 株肠毒素实验阳性的菌株也无荧光信号产生。(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。检测大便和呕吐物标本仅需 2 h 检测时间, 检测食品标本仅需 1 d 时间(包括样品的前期处理)。在双重实时 PCR 研究的基础上, 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,

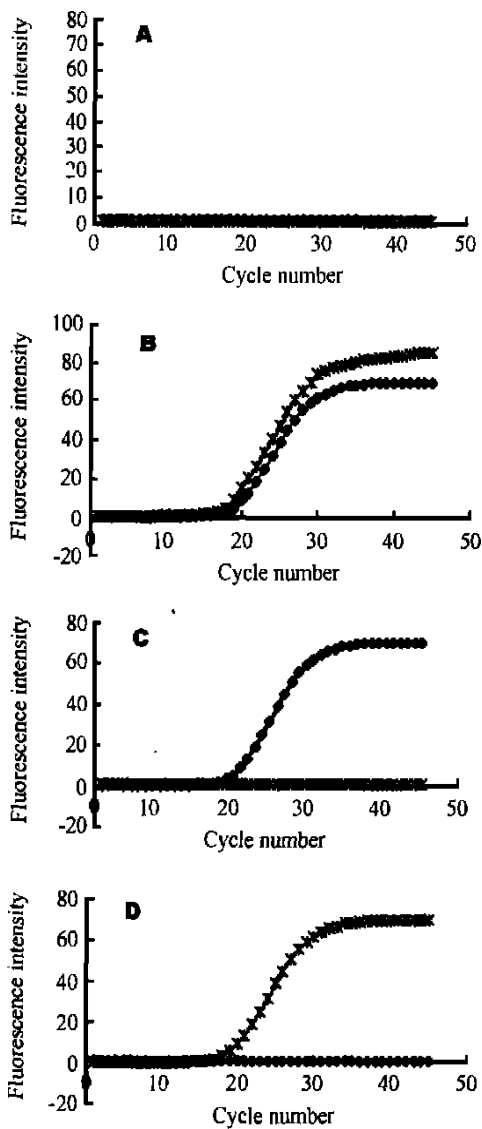


图 1 分子信标-双重实时 PCR 检测霍乱弧菌和副溶血弧菌

Fig 1. Dual real-time PCR detection of *V. cholera* and *V. parahaemolyticus*

The *ctxA* probe was labeled by HEX, the TDH probe was labeled by FAM. A is for blank, B is for both *V. cholera* and *V. parahaemolyticus* positive sample, C is for *V. cholera* positive but *V. parahaemolyticus* negative, and D is for *V. cholera* negative but *V. parahaemolyticus* positive

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,因此对于多个靶序列的同时检测,改良分子信标

的优势更加明显。我们采用改良分子信标的设计思路^[5],在分别建立霍乱弧菌和副溶血弧菌实时 PCR 检测基础上,直接将两体系合并,保留了原来的实验条件,即建立起二者同时检测反应体系,且灵敏度并不比单个检测更低,进一步说明了改良分子信标的优势。

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(病人标本分离的)都含有这一致病基因。*ctxA* 已被公认为是诊断霍乱最主要的生物标志物之一。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 TDH-实时 PCR 技术快速检测副溶血弧菌^[5],国内也有采用 TaqMan 技术检测霍乱弧菌的文献报道,但主要为单一荧光体系检测一种细菌,未见多重实时 PCR 检测多种细菌的文献报道。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: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, Vickery M. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *J Microbiol Meth*, 2003, 53: 149-155.
- 2 Chen S, Yee A, Griffiths M. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, 35: 239-250.
- 3 Palmares C, Torres MJ, Torres A. Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003, 45: 183-189.
- 4 Fortin NY, Mulchandani A, Chen W. Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157 H7. *Analytical Biochemistry*, 2001, 289: 281-288.
- 5 Li Q, Lang J, Luan G, et al. Molecular beacon-based homogeneous fluorescence PCR assay for the diagnosis of infectious diseases. *Anal Sci*, 2000, 16(2): 245-248.

(收稿日期: 2004-03-01)