

复合探针实时荧光 PCR 技术快速检测海产品中副溶血性弧菌方法的建立

闻洁¹, 陆利霞^{1,2*}, 熊晓辉^{1,2}

(1. 南京工业大学食品与轻工学院, 南京 210009; 2. 江苏省食品安全快速检测公共技术服务中心, 南京 210009)

摘要: 副溶血性弧菌是一种食源性致病菌, 海产品及其制品海鲜酱油等最容易被副溶血性弧菌污染, 而副溶血性弧菌寄生于鲜虾、海鲜酱油等复杂的食品基质中有时却很难被检测出。以快速检测食品中的副溶血性弧菌为目的, 针对副溶血性弧菌的 *tlh* 基因, 设计引物和复合探针, 采用实时荧光 PCR 方法检测鲜虾和海鲜酱油中的副溶血性弧菌, 得出以下结论, 该方法检测副溶血性弧菌具有较强的特异性和灵敏度, 当鲜虾(固体)中的样品菌含量为 $10^3 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 或海鲜酱油中的样品菌含量为 $10^3 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 无需增菌培养, 即可快速检出。增菌 6~8 h 即可检出鲜虾(固体)或海鲜酱油(液体)的 1cfu 的副溶血性弧菌。

关键词: 副溶血性弧菌; 聚合酶链式反应; 复合探针; 荧光

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2016)06-0866-05

Establishment of rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood by real-time fluorescent PCR with complex probe

WEN Jie¹, LU Lixia^{1,2}, XIONG Xiaohui^{1,2}

(1. College of Food Science and Light Industry, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009;

2. Jiangsu Public Technical Service Center for Rapid Detection of Food Safety, Nanjing 210009)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* is a kind of food-borne pathogens, which is easily caught in seafood. Shrimp is rich in protein and fat, carbohydrates, calcium, phosphorus, iron and other ingredients. The ingredients of seafood sauce is complex, containing scallops, scallop powder, spices, rice wine besides salt and monosodium glutamate. It is difficult to be detected in such complex food matrix. In this paper, primers and complex probe are designed, based on the *tlh* gene, to detect *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp and seafood sauce by real-time PCR. The results are as follows: It can be quickly checked out without culture under the bacteria content of 10^3cfu whether in shrimp samples (solid) or in seafood soy sauce samples. It can be detected by fluorescent PCR with the enrichment of 6-8 h in the shrimp (solid) or seafood sauce (liquid).

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; PCR(polymerase chain reaction); complex probe; fluorescence

在沿海一些养殖三文鱼^[1]、对虾^[2]、贝类^[3]等海产品的地区, 最容易爆发副溶血性弧菌污染。2015年, 在墨西哥^[4]和中国广东^[5]沿海地区都因爆发了大规模的副溶血性弧菌引起食物中毒。轻者呕吐腹泻, 严重者食物中毒死亡。

传统检测方法检测副溶血性弧菌耗时长且步骤繁琐, 无法实现实时监控^[6]。PCR 技术根据特异性基因设计引物进行检测, 是现阶段检测副溶血性弧

菌最快速准确的方法。近年来, 发展成熟的 PCR 技术主要有常规 PCR、荧光定量 PCR 和多重 PCR。复合探针技术作为一种新的荧光 PCR 技术, 综合了分子信标和双探针的优点, 它由一条 5'端标记供体基团的荧光探针和一条 3'端标记猝灭基团的猝灭探针构成(如图 1)。

3'端能与荧光探针的 5'端杂交, 此时荧光探针与猝灭探针靠近, 荧光信号被猝灭, 当有靶基因存

收稿日期: 2016-04-30

基金项目: 江苏省科技厅社会发展项目(BE2016803)资助。

作者简介: 闻洁, 硕士研究生。E-mail: m17751188355@163.com

* 通信作者: 陆利霞, 副教授。E-mail: llxhn66@126.com

在时, 荧光探针优先与靶基因结合, 两条探针分离, 荧光探针信号释放^[7]。

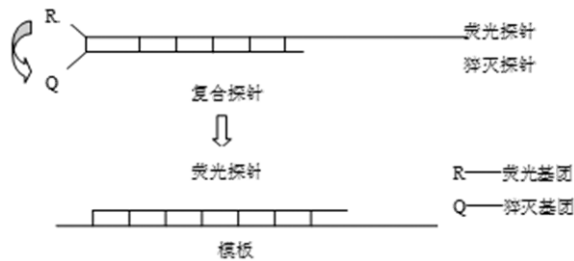


图 1 复合探针原理

Figure 1 Theory of complex probes

PCR 技术的应用, 选择靶点是关键。副溶血性弧菌的检测靶点主要有 *toxR*、*tlh*、*tdh*、*trh*、*gyrB*、*16SrRNA* 和 *pR72H* 等。研究表明在临床和环境分离的副溶血性弧菌都含有 *tlh* 基因, 说明 *tlh* 具有种属特异性^[8], 所以, 以 *tlh* 基因作为靶点可以筛选出所有的副溶血性弧菌。

检测技术只有最终运用于实际样品的检测才具有方法学意义。本研究对用副溶血性弧菌感染鲜虾(固体)和海鲜酱油(液体), 应用复合探针实时荧光 PCR 技术实时检测副溶血性弧菌的 *tlh* 基因。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

副溶血性弧菌 *CICC21617*、溶藻弧菌 *CGMCC1.1833*、河流弧菌 *CGMCC1.1608*、弗氏弧菌 *CGMCC1.1613*、金黄色葡萄球菌 *ATCC25923*、大肠杆菌 *ATCC25922*、乙型副伤寒沙门氏菌 *CMCC50094*、单增李斯特菌 *CICC19115*、马红球菌 *NBRC101255* 和枯草芽孢杆菌 *ACCC11060* 由本实验保存, 海鲜酱油和鲜虾均购自超市。LC96 荧光 PCR 仪购自罗氏, PCR 引物和探针如表 1, 委托上海生物技术公司合成。

表 1 引物和探针

Table 1 Primers and probes

引物和探针 Primer and probe	序列 (5'-3') Sequence
上游引物 Sense primer	CGAGAACGCAGACATTACGTTTC
下游引物 Reverse primer	GCTCCAGATCGTGTGGTTG
荧光探针 Fluorescence probe	FAM-CGCCGCTGACAATCGCTTCTCAT
猝灭探针 Quenching probe	GCGATTGTCACGGCG-BHQ1

1.2 水煮法提取 DNA

取 1 mL 隔夜培养的副溶血性弧菌纯培养物,

12000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 用 500 μL 的无菌双蒸水重悬沉淀, 4℃、12000 r·min⁻¹ 离心 2 min 弃上清, 重复该步骤 1~2 次, 将所得沉淀重悬于 500 μL 无菌双蒸水中, 在 70℃ 水浴锅中加热 15 min, 12000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清即细菌基因组提取液。

1.3 实时荧光 PCR 反应条件和结果判定

1.3.1 实时荧光 PCR 反应体系 20 μL 反应体系: Premix Ex *Taq* 10 μL, 上、下游引物各 0.4 μL, 探针 0.8 μL, 模板 DNA 2 μL, 超纯水 6.4 μL。

扩增条件: 第 1 阶段, 预变性 93℃, 2 min; 第 2 阶段, 93℃45 s, 55℃60 s, 10 个循环; 第 3 阶段, 93℃30 s, 55℃45 s, 30 个循环。

荧光收集设置在第 3 阶段每次循环的退火延伸时进行。荧光通道选择 FAM 通道。

1.3.2 荧光扩增结果判定 采用 LC96 配套的分析软件进行数据分析与处理。当扩增曲线呈 S 型曲线, 表示样品中存在副溶血性弧菌; 当扩增曲线不呈 S 型曲线且检测不到 Cq 值, 表示样品中无副溶血性弧菌, 或者样品中副溶血性弧菌低于检测限。

1.4 特异性实验

对 1.1 中的所有菌株培养后提 DNA, 取 2 μL 进行实时荧光 PCR 扩增实验。

1.5 灵敏度实验

1.5.1 副溶血性弧菌基因组灵敏度检测实验 提取的副溶血性弧菌 DNA 经测定含量后用无菌水做 10 倍梯度稀释, 以 10⁻¹~10⁻⁹ 倍稀释度的 DNA 为模板, 分别取 2 μL 进行实时荧光 PCR 扩增, 用无菌水做阴性对照。

1.5.2 副溶血性弧菌纯培养物的灵敏度检测实验 取过夜培养的副溶血性弧菌菌液进行平板计数, 同时取各稀释度 1 mL 于 1.5 mL 的离心管中, 用水煮法提取 DNA, 分别取 2 μL 进行实时荧光 PCR 扩增, 用无菌水做阴性对照。

1.6 鲜虾和海鲜酱油中副溶血性弧菌实时荧光 PCR 快速检测

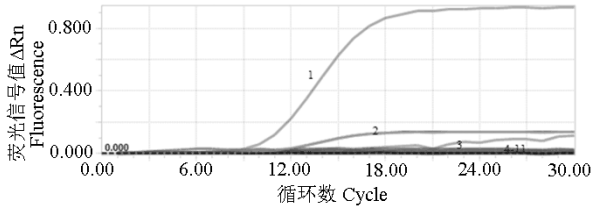
1.6.1 人工染菌样品制备 取用营养肉汤过夜培养的副溶血性弧菌菌体培养物 1 mL, 用无菌生理盐水作 10 倍系列梯度稀释, 并在每个稀释度取 0.2 mL 平板计数, 计算副溶血性弧菌的原始菌落数。取食品样品鲜虾(固体) 5 g, 海鲜酱油(液体) 5 mL 分别接入不同量的副溶血性弧菌, 使食品样品中的菌初始接种量浓度为 1~100 cfu·g⁻¹ 和 1~100 cfu·mL⁻¹。将接种后的食品样品转入 45 mL 营养肉汤培养基, 并置于 37℃, 180 r·min⁻¹ 增菌培养。

分别培养不同时间(0、2、4、6、8和10 h)时各取1 mL, 水煮法提取DNA。

1.6.2 实时PCR检测人工染菌的样品 取2 μL 1.6.1提取的DNA, 进行实时荧光PCR反应。

2 结果与分析

2.1 复合荧光探针用于荧光PCR反应特异性评价 用实时荧光PCR体系扩增1株副溶血性弧菌, 9株其他菌株, 所得结果见图2。



1. 副溶血性弧菌 *CICC21617*; 2. 溶藻弧菌 *CGMCC1.1833*; 3. 河流弧菌 *CGMCC1.1608*; 4. 弗氏弧菌 *CGMCC1.1613*; 5. 金黄色葡萄球菌 *ATCC25923*; 6. 大肠杆菌 *ATCC25922*; 7. 乙型副伤寒沙门氏菌 *CMCC50094*; 8. 单增李斯特菌 *CICC19115*; 9. 马红球菌 *NBRC101255*; 10. 枯草芽孢杆菌 *ATCC11060*; 11. 无菌水阴性对照 Negative control

图2 实时荧光PCR的特异性扩增结果

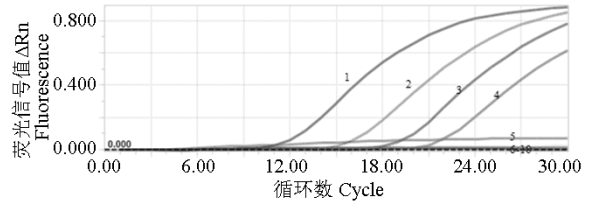
Figure 2 Results of real-time PCR amplification

由图2可以看出, 只有副溶血性弧菌能扩增出S形曲线(C_q=11.2), 另外3种相近的弧菌和其他种属菌株均无法扩增出S形曲线(无C_q值), 证明该探针用于实时荧光PCR具有较强的特异性, 可以用于副溶血性弧菌的快速筛选。

2.2 复合探针用于荧光PCR反应的灵敏度评价

2.2.1 复合探针检测副溶血性弧菌基因组DNA的灵

敏度 提取的副溶血性弧菌基因组微量核酸蛋白测定仪测得浓度为236.4 ng·μL⁻¹。将测得的基因组用无菌水做10倍梯度稀释, 每个PCR反应体系(20 μL)含DNA的浓度为23.64 ng·μL⁻¹至2.364 fg·μL⁻¹, 图3是各稀释浓度下的扩增曲线。



1. 23.64 ng·μL⁻¹; 2. 2.364 ng·μL⁻¹; 3. 236.4 pg·μL⁻¹; 4. 23.64 pg·μL⁻¹; 5. 2.364 pg·μL⁻¹; 6. 236.4 fg·μL⁻¹; 7. 23.64 fg·μL⁻¹; 8. 2.364 fg·μL⁻¹; 9. 0.2364 fg·μL⁻¹; 10. 阴性无菌水对照 Negative control

图3 基因组DNA的灵敏度扩增曲线

Figure 3 Sensitivity amplification curve of genomic DNA

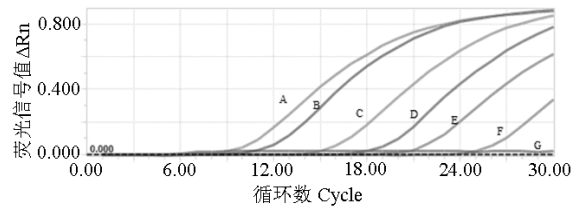


图4 纯培养灵敏度扩增曲线

Figure 4 Sensitivity of amplification curve in pure culture

由图3可以看出, 当反应体系中DNA的浓度含量低于23.64 pg·μL⁻¹时, 就没有S形扩增曲线, 而高于此浓度均有S形扩增曲线。因此, 复合探针用于实时荧光PCR反应体系检测副溶血性弧菌基因组的灵敏度为23.64 pg·μL⁻¹。

表2 纯培养检测灵敏度

Table 2 Detection sensitivity in pure culture

项目 Item	A	B	C	D	E	F	G
菌液浓度/cfu·mL ⁻¹ Bacteria concentration	2.4×10 ⁷	2.4×10 ⁶	2.4×10 ⁵	2.4×10 ⁴	2.4×10 ³	2.4×10 ²	2.4×10 ¹
Cq 值 Cq value	10.10	11.72	15.95	19.05	21.62	26.02	-

“-”表示未检测到Cq值。下同。“-” means no detected Cq value. The same below.

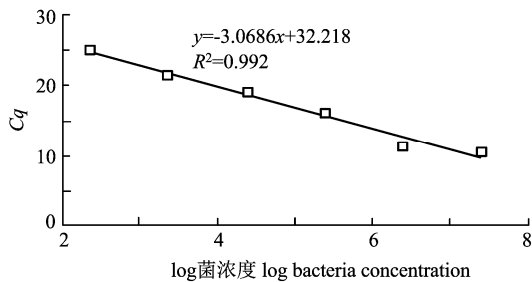


图5 纯培养灵敏度标准曲线

Figure 5 Standard curve of sensitivity in pure culture

如表2和图4所示, 当菌液浓度为24 cfu·mL⁻¹时, 没出现S形曲线, 且无Cq值, 而其他较高浓度的菌液均能扩增S形曲线, 因此, 本实验荧光PCR体系对副溶血性弧菌纯培养物检测浓度为240 cfu·mL⁻¹。当菌浓度处于10²~10⁷ cfu·mL⁻¹范围内时(图5), 菌浓度的对数值与Cq值之间呈良好的线性关系, 线性相关系数约为0.992。

2.2.2 复合探针检测副溶血性弧菌纯培养物的灵敏度 平板菌落计数得出副溶血性弧菌纯培养物的起

始菌浓度为 $2.4 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。同时取各稀释度的菌液 1 mL, 用水煮法提取 DNA, 取上清液 2 μL , 进行 PCR 扩增, 图 4 是各稀释度浓度下纯培养物的扩

增曲线图, 表 2 是相对应浓度下测得的扩增曲线的 Cq 值, 图 5 是根据 Cq 值与不同稀释浓度下纯培养物的对数值作的标准曲线。

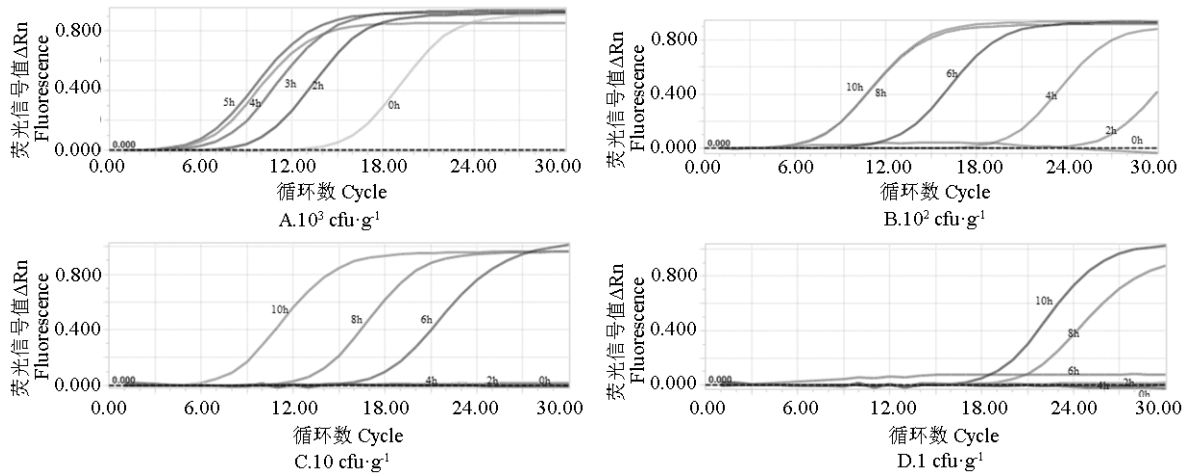


图 6 鲜虾中副溶血性弧菌在不同污染量下的荧光 PCR 检测结果

Figure 6 Results of *Vibrio parahaemolyticus* in fresh shrimp under different concentrations by fluorescence PCR

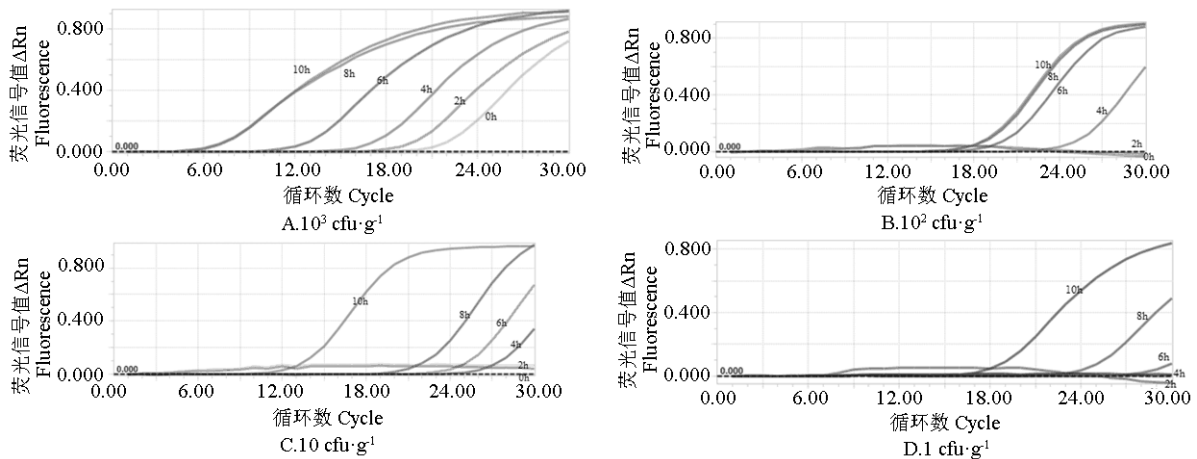


图 7 海鲜酱油中副溶血性弧菌在不同污染量下的荧光 PCR 检测结果

Figure 7 Results of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood sauce under different concentrations by fluorescence PCR

表 3 荧光 PCR 对人工模拟染菌鲜虾检测灵敏度

Table 3 Sensitivity of detecting fresh shrimp with artificial simulation

污染量/ $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ Contamination level	不同前增菌时间下的 Cq 值 Cq values under different before enrichment culture time					
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
10^3	1.5	9.3	6.75	5.8	5.7	5.4
10^2	-	24.6	19.2	11.6	6.9	6.8
10	-	-	-	17.0	12.8	9.7
1	-	-	-	-	20.2	14.6

2.3 鲜虾和海鲜酱油中副溶血性弧菌实时荧光 PCR 快速检测

图 6A~D 分别是当鲜虾 (固体) 中的样品菌含量为 $10^3 \sim 1 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 浓度时的荧光 PCR 熔解曲线, 表

3 是不同浓度、不同时间下相对应的 Cq 值。图 7A~D 分别是海鲜酱油 (液体) 中的样品菌含量为 $10^3 \sim 1 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时的荧光 PCR 熔解曲线, 表 4 是不同浓度、不同时间下相对应的 Cq 值。

表 4 荧光 PCR 对人工模拟染菌海鲜酱油检测灵敏度
Table 4 Sensitivity of detecting seafood sauce with artificial simulation

污染量/cfu·g ⁻¹ Contamination level	不同前增菌时间下的 Cq 值 Cq values under different before enrichment culture time					
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
10 ³	21.7	19.4	16.9	12.5	7.1	7.1
10 ²	-	-	24.5	21.5	18.1	18.0
10	-	-	26.6	24.3	21.3	12.7
1	-	-	-	-	24.5	18.2

由图 6~图 7、表 3 和表 4 可以看出,运用建立的复合探针实时荧光 PCR 方法,当鲜虾(固体)中的样品菌含量为 10³ cfu·g⁻¹ 或海鲜酱油中的样品菌含量为 10³ cfu·mL⁻¹ 时,无需增菌培养,即可快速检出。当鲜虾(固体)中的样品菌含量为 1 cfu·g⁻¹ 时,增菌 8 h 即可检出;样品菌含量为 10 cfu·g⁻¹ 时,增菌 6 h 即可检出。当海鲜酱油(液体)中的样品菌含量为 1 cfu·mL⁻¹ 时,增菌 8 h 即可检出;样品菌含量为 10 cfu·g⁻¹ 时,增菌 4 h 即可检出。

3 讨论

快速检测副溶血性弧菌对预防副溶血性弧菌引起的食物中毒有重要意义,而针对副溶血性弧菌的 *tlh* 基因设计的引物和探针则可以快速识别所有副溶血性弧菌菌株。

本研究建立的复合探针实时荧光 PCR 方法用于副溶血性弧菌的检测具有良好的特异性。检测副溶血性弧菌基因组的灵敏度为 23.64 pg·μL⁻¹。纯培养物检测灵敏度为 240 cfu·mL⁻¹,且当菌浓度处于 10²~10⁷ 范围内时,菌浓度的对数值与 Cq 值之间呈良好的线性关系,线性相关系数约为 0.992。

通过对染菌样品的检测,得到如下结果:当鲜虾(固体)中的样品菌含量为 10³ cfu·g⁻¹ 或海鲜酱油中的样品菌含量为 10³ cfu·mL⁻¹ 时,无需增菌培养,即可快速检出。增菌 6~8 h 即可检出当鲜虾(固体)或海鲜酱油(液体)的 1 cfu 的副溶血性弧菌。比起国标方法的 7~14 d 大大缩短了检测时间,与文献[9]建立的针对副溶血性 *toxR* 基因设计的 LUX 荧光探针法时间缩短了 2 h,与文献[10]建立的针对副溶血性弧菌 *tdh* 基因的 Taqman 探针法的检测限基本一致,但大大缩短了时间。

本研究采用复合探针荧光 PCR 方法检测副溶血性弧菌的特异性 *tlh* 基因,具有快速、准确、灵敏的特点,大大节约了时间,在食品中致病微生物的检测方面具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 刘弘,罗宝章,秦璐昕,等.生食三文鱼片副溶血性弧菌污染的定量风险评估研究[J].中国食品卫生杂志,2012,24(1):18-22.
- [2] 姬华.对虾中食源性弧菌预测模型建立及风险评估[D].无锡:江南大学,2012.
- [3] 曹慧慧.国内主要沿海城市售贝类中副溶血性弧菌的定量风险评估[D].青岛:中国海洋大学,2010.
- [4] LÓPEZ-HERNÁNDEZ K M, PARDÍO-SEDAS V T, LIZÁRRAGA-PARTIDA L, et al. Environmental parameters influence on the dynamics of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* densities in *Crassostrea virginica* harvested from Mexico's Gulf coast[J]. Mar Pollut Bull, 2015, 91(1): 317-329.
- [5] LI B, LUO J, TAN H, et al. Phenotypic and phylogenetic analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolates recovered from diarrhea cases in Guangdong Province, China[J]. Int J Food Microbiol, 2015, 200: 13-17.
- [6] 宁喜斌,刘代新,张继伦.海产品中副溶血性弧菌的分离、鉴定及与临床分离株的生化性状比较[J].微生物学通报,2008,35(6):918-922.
- [7] 曹泽虹,李勇.用 PCR 法快速测定食物中毒病原菌[J].微生物学通报,2001,28(4):73-76.
- [8] 黄弦.副溶血性弧菌检测方法评价与环境分离株携带基因特征研究[D].广州:南方医科大学,2011.
- [9] 许如苏,陈茹,林彩华,等.副溶血性弧菌 LUXTM 荧光 PCR 快速检测方法的建立[J].中国兽医科学,2008,38(12):1075-1079.
- [10] 李丹丹,徐义刚,王昱,等.副溶血弧菌实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立[J].中国畜牧兽医,2016,43(1):58-62.