

副溶血弧菌 TDH 毒素及其检测方法研究进展

窦勇¹, 胡佩红², 顾鹏程¹

(1. 江苏财经职业技术学院, 江苏淮安 223003) (2. 淮安正昌饲料有限公司, 江苏淮安 223005)

摘要: 副溶血弧菌是引起我国沿海地区细菌性食物中毒的主要食源性致病菌, 引起致病的主要原因是其产生的溶血毒素, TDH 是其最主要的致病因子, 针对 TDH 毒素的理化性质、基因、致病机理及其检测方法的研究进展进行综述, 为今后对 TDH 毒素研究的试验方法和思路提供参考, 并对将来的研究方向提出展望。

关键词: 副溶血弧菌; TDH; 检测方法; 研究进展

文章编号: 1673-9078(2013)1-215-218

Research Progress in *Vibrio parahaemolyticus*

TDH Toxin and Detection Methods

DOU Yong¹, HU Pei-hong², GU Peng-cheng¹

(1. Grain Engineering and Management Department, Jiangsu Vocational and Technical College of Finance & Economics, Huai'an 223003, China) (2. Huai'an Zhengchang Feed Co., Ltd, Huai'an 223005, China)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* is a major food-borne pathogens cause of bacterial food poisoning of our coastal areas, the main reason is the hemolytic toxin secreted by *Vibrio parahaemolyticus*, TDH is the principal pathogenic factor. The progress of physicochemical properties, genetics, pathogenic mechanism and detection methods of the TDH toxin was summarized, which will provide a reference for the research methods and ideas of the TDH toxin in the future, and put forward the prospects for the future research directions.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; TDH; detection methods; research progress

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, 简称 V.p) 是一种革兰氏阴性嗜盐细菌, 海产品中如鱼、虾、蟹贝类和海藻常有带此菌, 是引起食源性疾病的主要病原之一, 也是造成我国沿海地区食物中毒的重要病原。有研究表明, 并非所有 V.p 均具致病性, 而具有致病性的 V.p 是因含有一些致病因子, 主要有溶血素、脲酶、粘附因子等^[1,2]。溶血素是 V.p 致病的最主要原因, 包括耐热直接溶血素 (Thermostable Direct Hemolysin, TDH)、耐热直接溶血素相关溶血素 (TDH-related hemolysin, TRH) 和不耐热溶血素 (Thermolabile Hemolysin, TLH), 流行病学调查研究表明 TDH 是 V.p 最主要致病因子, 临床上分离出的 V.p 几乎 95% 以上都会在特殊的我妻氏血平板上产生溶血环, 被称作神奈川现象 (Kangawa Phenomenon, KP)^[3-5]。目前, 国内外针对 V.p TDH 的检测研究, 大多数采用的是分子生物学技术, 如: 多重 PCR、荧光实时定量 PCR 的运用研究较多, 而利用免疫学技术

的研究极为少见, 对于 TDH 毒素的提取、纯化及抗原抗体的制备, 文献报道也很罕见。本文就 V.p TDH 毒素理化性质、基因结构、TDH 重组蛋白的基因表达与纯化、致病机制及其检测方法研究进展进行综述。

1 TDH 毒素

1.1 理化性质

TDH 是一种细胞外毒素, 该毒素是不含糖或脂质的蛋白质, 是由 2 条含 165 个氨基酸残基肽链构成, 富含天冬氨酸(占 12.1%)和缬氨酸(占 12.0%), 其次是谷氨酸(占 9.4%)和色氨酸(占 8.9%), 经 Sephadex G-100 分析 TDH 是分子量约为 46 kDa 的二聚体蛋白, 等电点约为 4.2。TDH 经 100 °C 处理 10 min, 仍能保持溶血活性, 故称为耐热直接溶血毒素, 其也具有肠毒素活性、细胞毒性和溶血活性。临床上分离得到的大多是 TDH⁺株, 而环境中分离的 V.p 只有 2% 左右是 TDH⁺株, 由于常规 KP 实验容易出现假阳性结果, 因此 TDH⁺常替代 KP⁺成为判定 V.p 是否具有致病力的新的依据。

1.2 TDH 基因

1.2.1 基因序列

收稿日期: 2012-08-31

基金项目: 淮安市科技局科技支撑计划社会发展项目 (HAS2011009)

作者简介: 窦勇 (1979-), 男, 讲师, 硕士研究生, 研究方向: 主要从事食品工艺及安全检测

Nishibuchi M 和 Kaper J B^[6]利用 pCVD503 载体克隆了 V.p TDH 基因并进行了核苷酸序列的测定,发现 TDH 毒素由位于染色体上的 TDH 基因编码,它存在于一个包括 1275 bp 的 HindIII 核酸片段中,其结构基因的起点在第 321 bp 位,该阅读框架的第一个终止密码子位置为 816~818 bp 位,表明编码成熟 TDH 结构基因总长为 495 bp,翻译为 165 个氨基酸残基,在该序列的前面有一序列,可能编码信号肽,这个信号肽与其他已知的信号肽相似。TDH⁺株含有 2 种 TDH 基因,分别为 TDH1 和 TDH2。TDH1 和 TDH2 编码的氨基酸序列只有 7 个不同,典型的 KP⁺株的 2 种基因拷贝有 97.2%同源,其溶血活性相同,经 Edman 降解法得到的蛋白质序列比较发现 KP⁺株 TDH2 具有表达优势^[7,8]。

1.2.2 TDH 重组蛋白的基因表达与纯化

2011 年, Zhao Y G 等^[3]利用 PCR 技术针对 V.p TDH 基因进行扩增,并将扩增后基因克隆到大肠杆菌原核表达载体 pET-28a(+)上,构建了重组表达质粒;经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 电泳表明该重组基因产生了蛋白表达,产物是 Mr 约为 27 kDa 的重组蛋白。通过 Western blotting 鉴定, V.p 抗体能与纯化的重组蛋白发生特异反应,经溶血活性检测重组蛋白 TDH 具有溶血活性,利用络合 NiZ⁺的树脂颗粒通过亲和层析法来纯化重组蛋白,其基因表达与纯化方法可参考文献 3。2008 年, Nakano M 等^[4]在研究 V.p 的 hfq 基因与其致病性的关系中,采用 hfq 基因缺失突变的方法,研究了 hfq 基因与 TDH 基因表达的联系,结果发现在 hfq 基因缺失情况下, TDH 的产量明显高于含 hfq 的正常菌株,在 hfq 基因缺失突变株中,出现了较高的 TDH 启动子活性和较多量的 mRNA,说明 TDH 基因转录水平在升高,进而获得 TDH 的高表达。这一研究表明, hfq 基因的存在从某种程度上说不利于 TDH 基因表达。

1.3 致病机理

由于不同环境因素的影响,部分致病性 V.p 逐步变异成非致病性 V.p,人类如食入 10⁶ 个活的致病性 V.p 即可发病,个别可呈败血症表现。与 TDH 相关的致病性主要有两种活性:一是溶血活性,TDH 在 60 °C 加热会失去溶血活性,但是在 100 °C 煮沸 10 min 后却仍有溶血活性;TDH 可使人类及其他多种红细胞发生溶血现象,其过程一般为:先是溶血素与宿主的红细胞膜结合,然后在红细胞膜表面成孔并最终导致红细胞胶样渗透溶解。二是细胞毒性,TDH 在细胞内和外均可引起细胞毒性,可使细胞膜上形成小孔通道,引起细胞外 Ca²⁺浓度升高,促使 Ca²⁺激活的 CF 分泌增

加,当细胞渗透压的改变超过细胞自身调节的能力时,将使细胞发生病理和形态学改变,导致细胞膨胀甚至死亡^[9]。

2 检测方法研究进展

2.1 免疫学检测法

2.1.1 TDH 抗原的提取与纯化

TDH 抗原的提取与纯化方法,一般可通过两条途径进行。一条途径是,直接从菌体培养液中经离心、盐析、柱层析等方法,分离提取 TDH 毒素蛋白;另一条途径为,将 TDH 基因插入质粒载体并植入感受态大肠杆菌细胞内,再经 IPTG 诱导表达,表达产物蛋白经 SDS-PAGE 鉴定后再经层析纯化获得 TDH 毒素。采用 Honda T^[10]等采用摇床扩大培养, (NH₄)₂SO₄ 盐析,然后依次经过 DEAE-纤维素、羟基磷灰石柱层析(HAP)、Sephadex G-200 层析纯化 TDH; (NH₄)₂SO₄ 盐析:按 0.35 g/mL 的量向滤液中加入固体(NH₄)₂SO₄,产生沉淀溶解在少量 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0),用此缓冲液透析过夜,制得粗毒素;DEAE-纤维素层析:准备粗毒素培养滤液约 10 L,用于 DEAE-纤维素(2.2×50 cm)柱层析。用约 1 L 含有 0.2 mol/L NaCl 同一磷酸盐缓冲液洗脱柱子,再用 1 L 的 0.2~1.0 mol/L 的 NaCl 在同一缓冲区的线性梯度洗脱。加入固体(NH₄)₂SO₄ (0.40 g/mL)收集和浓缩有毒活性组分,沉淀用少量的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.0)溶解后并透析。HAP 柱层析:将毒素浓缩后, HAP (2.2×35 cm)进行柱层析。柱子用约 500 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.0)洗脱,再用 800 mL 的 0.1~0.3 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)线性梯度洗脱。使用火棉胶包,收集和浓缩有毒活性组分到一个小体积。Sephadex G-200 层析:将经 HAP 柱层析的产物过 Sephadex G-200 柱(用 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH 7.0 平衡)。用同样的缓冲溶液洗脱柱子,使用火棉胶包,收集和浓缩有毒活性组分到一个小体积,制备的产物作为本研究纯化的毒素。可冷冻干燥纯化后的 TDH,准确称量,溶解于少量 pH 7.4 0.01 mol/L 的 PBS 中,4 °C 冷藏备用。

2.1.2 TDH 抗体的制备

TDH 抗体的制备,目前主要采用直接提取的 TDH 毒素和基因表达产物 TDH 毒素蛋白,免疫动物获得相应的单、多克隆抗体。2011 年,赵永刚等^[11]利用 TDH 基因表达产物经纯化的 TDH 毒素,免疫新西兰大白兔制备了 TDH 多克隆抗体,方法:取 200 μg 纯化的重组蛋白 TDH 加入 1 mL 弗氏完全佐剂、1 mL PBS 混匀制成油乳剂对新西兰白兔后腿肌肉分多点

(4~6 点)注射, 进行第一次免疫; 在一次免疫后 15 d 进行二次加强免疫, 取 100 μg 纯化的重组蛋白, 同样方法进行二次免疫; 二次免疫后 10 d 进行三次免疫; 三次免疫后第 10 d 经心脏采血, 按常规方法制备抗血清。2012 年, 杨靖亚等^[12]用纯化的 TDH 毒素蛋白作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 制备了 TDH 单克隆抗体, 方法: 取免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合, 用间接 ELISA 方法进行阳性细胞筛选, 有限稀释法进行亚克隆; 并对该单克隆抗体进行了分子量大小、效价、亚类、特异性和亲和力分析。结果: 筛选出一株能够稳定分泌 TDH 单克隆抗体的杂交瘤细胞株命名为 T9H4, 其免疫球蛋白亚型鉴定为 IgG1, 亲和力常数可达 2.19×10^9 L/mol, 并表现出较强的特异性。SDS-PAGE 电泳结果显示单抗蛋白重链分子量约为 50 kDa 和轻链 23 kDa。该研究成功获得一株能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞, 为开发免疫学快速检测方法提供重要实验基础。

2.1.3 ELISA 检测法建立

运用 ELISA 检测 TDH 毒素的研究国内外比十分罕见, 国内在 1997 年蒋燕群等人以国外赠送的 TDH 抗体, 建立了斑点 ELISA 检测 V_p TDH 毒素, 但本研究不够深入; 在此基础上, 2011 年, 刘秀萍等^[13]建立了弧菌融合蛋白 TDH-VVC-VMHA 双抗体夹心 ELISA 检测方法, 该法以融合蛋白 TDH-VVC-VMHA 包涵体为抗原免疫豚鼠, 采用豚鼠抗融合蛋白免疫血清为包被抗体, HRP 标记羊抗豚鼠 IgG 为标记抗体, 应用棋盘滴定法确定 ELISA 的最适条件。结果表明, 所建立的方法与 V_p、创伤弧菌、拟态弧菌的培养物上清有较明显的阳性反应, 与绿脓杆菌等 5 种非弧菌属食物中毒菌培养物上清未见交叉反应, 与溶藻弧菌等 3 种弧菌培养物上清也未见交叉反应。近几年, 国内外已有利用 ELISA 检测 TDH 毒素和检测 V_p 的 IgY 的报道, 2011 年, Ballamoole K K 等^[14]建立了双抗体夹心 ELISA 法检测 V_p TRH 毒素; 2012 年, Zhong Q P 等^[15]建立了双抗体夹心 ELISA 法检测 V_p 的 IgY 抗体。

2.2 分子生物学检测

2.2.1 PCR 法

检测副溶血弧菌 TDH 毒素的 PCR 方法主要有常规 PCR、多重 PCR、实时荧光定量 PCR 等方法。

2.2.1.1 常规 PCR

就 V_pTDH 基因检测的常规 PCR 法研究较多, 通常是先对样品进行增菌, 然后对增菌液离心弃上清, 通常可采用煮沸法或酚/氯仿抽提法, 制备 DNA 模板。针对 TDH 基因设计 PCR 引物, 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后

进入扩增循环, 每个循环条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 20~30 循环结束, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5~10 min 终止反应。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳 (100 V, 1 h)、经 EB 染色后, 再在紫外光或激光的激发下荧光成像后与 DNA Marker 比对结果, 进而对 TDH 进行定性分析^[16,17]。

2.2.1.2 多重 PCR

2006 年, Hayashi S 等开发了一种新型多重 PCR 法, 该法分两个步骤: 一是利用软琼脂涂层过滤器筛选出活的 V_p 进行富集培养, 二是 DNA 酶预处理后富集培养物, 以消除任何可能已由死细胞释放的 TDH 和 TRH 并透过琼脂涂层过滤器的附带的 DNA, 利用多重 PCR 技术检测海产品中的 TDH 和 TRH; 本研究中试验 I 的样品中含有 TDH⁺和 TRH⁺的大量的死细胞和不含 TDH⁺和 TRH⁺的活细胞进行多重 PCR 检测, 不产生任何阳性结果, 表明含 TDH⁺和 TRH⁺的死细胞不能通过软琼脂涂层过滤器; 相反的试验 II 结果表明, 含有少量活的致病性细胞和大量的活的无致病性细胞的多重 PCR 检测结果呈阳性, 这也表明含有大量的非致病性的活细胞不能阻止少量致病性细胞通过软琼脂涂层过滤器。

2.2.1.3 RT-PCR

实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR, 简称 RT-PCR), 是一种在 PCR 反应体系中加入荧光物质, 荧光信号强度随着扩增产物量的增加而升高, 通过对荧光信号进行实时监测, 获得荧光扩增曲线图, 根据 Ct 值及与标准曲线的比对, 实现对未知模板的定性与定量分析的方法。荧光定量 PCR 使用的荧光化学可分为两种: 荧光探针和荧光染料, 如 Taqman 荧光探针、SYBR 荧光染料、分子信标、LUX Primers、FRET 探针法等。2010 年, Amy V 等^[18]建立了采用 SYBR GreenTM I 结合染料法检测墨西哥湾水、人工种植和天然牡蛎中 TDH 等三个溶血素基因的多重实时荧光定量 PCR 检测法, 该法同时对 TDH, TLH 和 TRH 基因进行扩增, 放大后的熔融温度分析证实了所有三个目标基因具有高度特异性的扩增, 检测结果表明 58% 的牡蛎中 TLH 阳性, 21% 的牡蛎中 TDH 阳性, 0.7% TRH 阳性。Ct 值表明, 牡蛎组织基质有一定程度抑制, 而海湾水 PCR 扩增的影响可以忽略不计, 该法在 8 h 内完成。该法相比以前只能检测 2 种基因, 创新点在于可同时检测三种基因。

2.2.2 TRC 法

转录反转录协同 (Transcription-reverse transcription concerted, 简写 TRC) 是用于检测 mRNA 的一种新研制的方法, 它是将目标 RNA 序列反转录

成 cDNA, 经过 dsDNA 转录成 RNA 后插入活性荧光 DNA 探针, 通过实时荧光检测器在一恒定的温度下定量检测 TRC 反应中的荧光强度, 然后根据反应时间和荧光强度比率作图^[19]。Masuda N 等^[20]建立了定量检测 V.p 中 TDH 和 TRH 基因的 mRNA 转录的 TRC 法。针对提取来自 24 株 V.p, 31 株其他弧菌属, 8 株非弧菌属的 RNA 进行检测, 结果发现用 TRC 方法分别检测 TDH 和 TRH 的 mRNA 的结果与用 DNA 克隆技术检测结果一致, 检测下限达 100 CFU。

2.2.3 基因探针技术

利用核苷酸碱基顺序互补的原理, 用特异的基因探针即识别特异碱基序列的有标记的一段单 DNA(或 RNA)分子, 与被测定的靶序列互补, 以检测被测靶序列的技术。基因探针技术在 V.p TDH 检测中应用, 研究的并不多见, Lee 等^[21]根据 TDH 基因的 DNA 序列, 合成特异性的 V.p 寡核苷酸探针, 该探针可特异地与 89 株 V.p 分离株的 DNA 杂交, 与其他 48 株弧菌或其他肠道、非肠道菌不反应, 检测灵敏度约为 1×10^6 CFU。

3 前景与展望

对于 V.p 的 TDH 毒素检测研究方面, 其基因水平的研究已经比较深入, 大都针对 V.p TDH 基因检测, TDH 和 V.p 致病性相关, 但并非所有 V.p 都携带 TDH 基因, 且少数海洋弧菌也会产生 TDH, 因此, 要更准确的检测致病性的 V.p 的 TDH, 最好是能针对致病性 V.p 属特异性基因进行检测。现阶段, 利用分子生物学方法检测 TDH 毒素工作中, 检测硬件条件和操作技术要求比较高, 在实践工作中的推广难度较大。而针对 TDH 检测的免疫学检测法如 ELISA 法研究十分罕见, ELISA 相比 PCR 等分子生物学方法, 具有检测成本低, 操作简单快捷等优点, 如能进行深入研究, 并开发相应的检测试剂盒, 在将来的致病性 V.p 检测中将会很快得到推广使用。因此, 作者认为将来针对 TDH 检测可从以下两个研究方向进行, 一是针对致病性 V.p 属特异性基因进行检测, 二是开展 ELISA 快速检测研究, 研究相应试剂盒并推广应用。

参考文献

- [1] Garrido A, Chapela M, Ferreira M, et al. Development of a multiplex real-time PCR method for pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* detection (tdh^+ and trh^+) [J]. Food Control, 2012, 24: 128-135
- [2] 窦勇, 胡佩红. ELISA 法快速检测水产品中副溶血性弧菌[J]. 现代食品科技, 2008, 24(6): 598-602
- [3] Zhao Y G, Tang X Q, Zhan W B. Cloning, expressing, and hemolysis of tdh , trh and tlh genes of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Oceanic and Coastal Sea Research, 2011, 10 (3): 275-279
- [4] Kadhim H M, Miah A, Munn C B, et al. Development of a polymerase chain reaction (PCR) test for the detection of virulent forms of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31: 431-439
- [5] Nakano M, Takahashi A, Su Z H, et al. Hfq regulates the expression of the thermostable direct hemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. BMC Microbiology, 2008, 8: 155-163
- [6] Nishibuchi M, Kaper J B. Nucleotide sequence of thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Bacteriology, 1985, 162(2): 558-564
- [7] Johnson C N, Flowers A R, Young V C, et al. Genetic relatedness among tdh^+ and trh^+ *Vibrio parahaemolyticus* cultured from gulf of Mexico Oysters (*Crassostrea virginica*) and surrounding water and sediment [J]. Microb Ecol, 2009, 57: 437-443
- [8] Okuda J, Nishibuchi M. Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct haemolysin gene [J]. Molecular Microbiology, 1998, 30(3): 499-511
- [9] 夏凡, 杨丽君, 王静, 等. 病原性海洋弧菌致病机理及其快速检测方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(1): 366-376
- [10] Honda T, Taga S, Takeda T, et al. Identification of lethal toxin with the thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus*, and some physicochemical properties of the purified toxin [J]. Infection and Immunity, 1976, 13(1): 133-139
- [11] 赵永刚. 副溶血弧菌 tdh 、 trh 和 tlh 基因的克隆、表达及基因敲除对其溶血活性的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010
- [12] 杨靖亚, 陆晓帆, 张建, 等. 副溶血弧菌 TDH 单克隆抗体的研制与性质鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(3): 235-239
- [13] 刘秀萍, 王铁良, 唐峰. 弧菌融合蛋白 TDH-VVC-VMHA 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国农学通报, 2011, 27(32): 34-37
- [14] Ballamoole K K, Pendru R, Devananda D, et al. Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145: 244-249

- [15] Zhong Q P, Dong Y Q, Wang L, et al. Development of IgY based sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Information Tech and Agricultural Eng, 2012, 134: 517-524
- [16] 祝孺刚.海产品中致病性副溶血弧菌 PCR 快速检测体系建立及定量研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2011
- [17] 邱杨,肖性龙,吴晖.五种致病菌流式液相芯片检测方法的建立[J].现代食品科技,2010,26(8):889-909
- [18] Amy V Rizvi, Asim K Bej. Multiplexed real-time PCR amplification of tlh, tdh and trh genes in *Vibrio parahaemolyticus* and its rapid detection in shellfish and Gulf of Mexico water [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2010, 98: 279-290
- [19] 杨芳,李秀娟,徐保红.副溶血弧菌的快速鉴定检测方法研究进展[J].河北医药,2010,32(7):862-865
- [20] Masuda N, Yasukawa K, Isawa Y, et al. Rapid Detection of tdh and trh mRNAs of *Vibrio parahaemolyticus* by the Transcription-Reverse Transcription Concerted (TRC) method [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, 98: 236-243
- [21] Lee C, Chen L H, Liu M L, et al. Use of an oligonucleotide probe to detect *Vibrio parahaemolyticus* in artificially contaminated oysters [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 3419-3422