

# 高分辨率熔解曲线分析法检测食源性副溶血性弧菌

章丽<sup>1</sup>, 余以刚<sup>1</sup>, 赖富饶<sup>1</sup>, 吴晖<sup>1</sup>, 杨锡洪<sup>2</sup>, 肖性龙<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 广东温氏佳润食品有限公司, 广东云浮 527400)

**摘要:** 为建立一种快速鉴定副溶血性弧菌的 HRM (高分辨率熔解曲线) real-time PCR 法, 以 *toxR* 为靶基因, 结合特异性引物, 通过优化反应体系及条件, 进行特异性、敏感性及重复性评价, 并初步应用于 90 份送检的鲜活海产品样本的检测。特异性试验表明, 该方法能选择性检测副溶血弧菌,  $T_m$  值为  $76.64 \pm 0.57$  °C; 而与创伤弧菌、霍乱弧菌、金黄色葡萄球菌等多种海产品中常见的食源性病原菌没有交叉反应。灵敏度试验表明, 该方法最少可检测 *toxR* 重组质粒的浓度为  $3.50 \times 10^2$  copies/mL。重复性试验表明, 同一样品于试验内及试验间的平均  $T_m$  值分别为  $76.53 \pm 0.35$  °C 和  $76.74 \pm 0.52$  °C, 变异系数分别为  $0.56 \pm 0.42\%$  和  $1.11 \pm 0.73\%$ 。对 90 份鲜活海产品样本的检测证实该法可使阳性检出率从国标法的 14.44% 提高至 18.89%。本研究所建立的副溶血性弧菌 HRM real-time PCR 法具有特异性好、灵敏度高、重复性好的特点, 能应用于食品样本的检测, 具有很好的研究价值和前景。

**关键词:** 副溶血性弧菌; 高分辨率熔解曲线; 检测; 实时 PCR; 荧光

文章编号: 1673-9078(2013)9-2288-2293

## Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus*

### by Real-time PCR using High Resolution Melting Curve Analysis

ZHANG Li<sup>1</sup>, YU Yi-gang<sup>1</sup>, LAI Fu-rao<sup>1</sup>, WU Hui<sup>1</sup>, YANG Xi-hong<sup>2</sup>, XIAO Xing-long<sup>1</sup>

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangdong Wen's Caren Food Co., Ltd., Yunfu 527400, China)

**Abstract:** A rapid real-time PCR method for detecting *Vibrio parahaemolyticus* (VP) by high resolution melting curve analysis (HRM) was developed. A pair of specific primers targeting the *toxR* gene of *Vibrio parahaemolyticus* was used. After optimizing the reaction system and conditions, the specificity of the method was validated with 10 target strains and 10 non-target strains. Serial dilutions from  $3.50 \times 10^1$  to  $3.50 \times 10^7$  copies/mL purified constructed plasmids were analyzed to evaluate its sensitivity. Reproducibility assay was also conducted on purified constructed plasmids between  $1.50 \times 10^1$  and  $1.50 \times 10^7$  copies/mL. The method was applied to detect 90 live submitted seafood samples. The results showed that the developed HRM real-time PCR assay had a good specificity by detecting only VP with the  $T_m$  value of  $76.64 \pm 0.57$  °C and was not affected by other seafood pathogens such as *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* et al. The sensitivity of detection of the constructed plasmids were  $3.50 \times 10^2$  copies/mL. In addition, the assay had a high reproducibility and the average  $T_m$  values were  $76.53 \pm 0.35$  °C and  $76.74 \pm 0.52$  °C. The sample's variations (CVs) were  $0.56 \pm 0.42\%$  and  $1.11 \pm 0.73\%$ . A better detection rate of 18.89% than that of the traditional culture method (14.44%) was found in the detection of 90 live seafood samples. The established real-time PCR assay showed sufficient specificity, high sensitivity and good reproducibility. And it was rapid, simple and cheap for detection of VP.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; high resolution melting curve; detection; real-time PCR; fluorescence

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是一种嗜盐性细菌, 主要分布于近海、海河交界处及海

收稿日期: 2013-05-20

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (31101279); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助课题 (20110172120034); 广东省科技计划资助项目 (2011B020314004); 广东省省部产学研结合项目 (2012B091100113)

作者简介: 章丽 (1988-), 女, 研究生在读, 研究方向: 微生物检测

通讯作者: 肖性龙 (1977-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食品安全与检测

产品中, 是我国沿海地区引起食物中毒最常见病原菌, 在近年来沿海地区的食物中毒病例中, 该菌已成为首要病原, 而且我国是水产品出口大国, 副溶血性弧菌则是我国出口头足类水产品的必检项目, 因此在饮水、食品检测和食物中毒源调查、传染病源调查等工作中, 经常要检测副溶血弧菌。进食被副溶血弧菌污染的食物易导致腹泻、肠痉挛、呕吐等, 重症患者还会脱水、休克昏迷, 甚至死亡。

目前, 检测副溶血弧菌的标准方法为 GB 法, 此法需经直接增菌后分离、分纯、镜检和生化试验等步

骤,检测周期长,至少要72 h,敏感性、特异性差<sup>[1]</sup>,且对非可培养状态菌有可能造成漏检。近年来不断发展的分子检测技术包括实时荧光定量PCR检测、酶联免疫吸附法<sup>[2]</sup>、环介导等温扩增技术以及寡聚核苷酸微阵列和核酸杂交技术<sup>[3]</sup>都具有快速准确等优点,但酶联免疫吸附法灵敏度较差,寡聚核苷酸微阵列和核酸杂交技术因设备昂贵、检测费用高且对操作人员的技术要求高,很难在基层单位应用,实时荧光定量PCR检测具有快速、简便、直观、定量准确等优势,在病原菌检测中已得到广泛应用<sup>[4]</sup>,但该体系需要设计并合成探针。高分辨溶解曲线分析技术(High Resolution Melting,HRM)是实时荧光定量PCR的一种,通常与实时荧光PCR结合,由于此技术是通过实时监测升温过程中双链DNA饱和荧光染料与PCR扩增产物的结合情况,无需使用特异性探针即可实现核酸的溶解曲线变化分析,从而反映核酸性质的差异。饱和荧光染料与DNA双链结合时,发出荧光;从DNA双链上释放出来时,荧光信号急剧减弱,如果升高温度使DNA变性,以温度为横坐标对荧光信号作图,可得到溶解曲线,其中50% DNA分子发生变性的温度称为熔点温度(melting temperature,  $T_m$ 值)<sup>[5]</sup>。HRM分析技术具有操作简单、成本低廉、时间短、误差少、能够进行高通量检测的优点,现已广泛应用于基因分型、重复序列分析、突变扫描、甲基化检测、致病菌检测等领域。

本研究运用HRM分析技术,使用在前期研究中已验证过特异性的靶基因 $toxR$ 和引物对<sup>[4]</sup>,建立一种快速检测副溶血弧菌的HRM real-time PCR方法,以 $T_m$ 值为判定标准,进行特异性试验、敏感度试验、重复性试验及海产品样本检测的初步应用,为副溶血性弧菌食物中毒的快速检测提供方法学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与样品

10株副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)分离菌株由深圳出入境检验检疫局的实验室提供,创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、弗氏志贺菌(*Shigella flexneri*)、痢疾志贺菌(*shigella dysenteriae*)、绿脓假单胞菌(*Bacillus pyocyaneus*)、单增李斯特杆菌(*Listeria monocytogenes*)、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)10株阴性对照菌

株由广州疾病预防控制中心和深圳出入境检验检疫局提供。对检测的90份食品样本均为深圳检验检疫局2012年5~8月份送检的鲜活海产品样本。菌种列表详见表1。

#### 1.1.2 主要试剂

PMD18T载体、T4 DNA连接酶、凝胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒:(宝生物工程(大连)有限公司);细菌基因组DNA抽提试剂盒DNeasy Tissue kit(Qiagen公司);Taq酶和EvaGreen(MBI公司);BSA(Bovine serum albumin, Roche)。

#### 1.1.3 主要仪器

ABI 7500 Real Time PCR System(带HRM模块, Applied Biosystems); Biophotometer分光光度计(Eppendorf); Sigma低温微量超速离心机;水浴锅;涡旋振荡器等。

## 1.2 方法

### 1.2.1 DNA提取、引物设计及 $toxR$ 重组质粒的构建

副溶血性弧菌DNA的提取根据Dneasy Tissue kit的操作规范进行;基因特异性分析、引物的设计及特异性分析、标准质粒的构建基于本课题组之前的研究<sup>[4]</sup>,以 $toxR$ 为靶基因,设计上游引物vp1231,序列为5'-GCGACCTTCTCTGAAATATTAATTGT-3',  $T_m$ 值为61.6℃;下游引物vp1286序列为5'-CATTCGCGTGGCAAACATC-3',  $T_m$ 值为60.4℃。引物由上海生工生物工程有限公司合成。目的扩增片段长度为79 bp,理论 $T_m$ 值为77.8℃。

### 1.2.2 副溶血弧菌HRM real-time PCR的建立与优化

每25  $\mu$ L的PCR反应体系包含2.5  $\mu$ L 10 $\times$ 缓冲液,0.5  $\mu$ L Taq多聚酶(5 U/ $\mu$ L),2.5  $\mu$ L dNTP(10 mM),3  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>(25 mM),1.25  $\mu$ L EvaGreen,0.2  $\mu$ L BSA(20 mg/mL),2  $\mu$ L模板(0.5  $\mu$ M)、0.5  $\mu$ L PCR上游引物、0.5  $\mu$ L下游引物,用DEPC水补齐至25  $\mu$ L,于ABI 7500 Real Time PCR System进行实时荧光PCR扩增。反应程序:预变性95℃ 10 min;扩增95℃ 10 s,60℃ 45 s,共40个循环。选用0.2、0.4、0.6、0.8、1.0  $\mu$ mol/L的浓度对引物浓度进行优化,得出1.0  $\mu$ mol/L的浓度可获得最低的Ct值及较高的荧光强度增加值( $\Delta R_n$ ),为最优引物浓度。溶解程序为:95℃ 2 min,60℃ 2 min,60℃ 1 s,然后升温至95℃(0.1℃采集一次荧光),最后50℃冷却。对溶解速率进行优化,选用0.1、0.2、0.4、0.8℃/s的溶解速率,筛选出能获得最高溶解曲线分辨率的溶解速率(结果见图1)。每个样本设置3个复孔,设置1个阴性对照孔。

使用 ABI 7500 Real Time PCR System 自带的软件进行数据分析。

### 1.2.3 HRM real-time PCR 的特异性

用优化后的 HRM real-time PCR 反应条件与反应体系检测 10 株目标 VP 菌株,以创伤弧菌、霍乱弧菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、弗氏志贺菌、痢疾志贺菌、绿脓假单胞菌、单增李斯特杆菌、阪崎肠杆菌、阴沟肠杆菌 10 株海产品中常见的细菌作为阴性对照菌株,并以高纯水作为无模板空白对照 (No template control, NTC), 验证所建立方法检测 VP 的特异性。

### 1.2.4 HRM real-time PCR 的灵敏度

选择含有目的扩增片段的 PMD18-*tox R* 重组质粒做此方法的灵敏度检测,用双蒸水将初始拷贝数为  $3.50 \times 10^7$  copies/mL 的重组质粒按照 1:10 的比例梯度稀释,稀释成  $3.50 \times 10^1 \sim 3.50 \times 10^7$  copies/mL 七个梯度,取 1  $\mu$ L 各个稀释度作 HRM 分析,以反应能检测出的最低 DNA 量为该体系的检测灵敏度,每个样本设置 3 个复孔及 1 个阴性对照孔。

### 1.2.5 HRM real-time PCR 的重复性

选取  $1.50 \times 10^1 \sim 1.50 \times 10^7$  copies/mL 七个浓度重组质粒进行重复性试验。通过同时检测 20 份重组质粒样本试验内  $T_m$  值和对同一重组质粒样本进行 20 次重复检测的试验间  $T_m$  值的变异系数 (CVs) 来评估该方法的重复性。CV=标准偏差/重复值的平均数。

### 1.2.6 检测方法的初步应用

对 90 份送检的鲜活海产品样本进行检测。取 25 g 样品匀浆,置 225 mL TSB 肉汤混匀后,37  $^{\circ}$ C 培养 18 h,将增菌液进行 2500 r/min 离心 10 min,取上清液,按 1.2.1 进行细菌 DNA 提取后进行 HRM real-time PCR 法检测,并按国标法进行检测比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 副溶血性弧菌 HRM real-time PCR 反应条件的优化

溶解速率筛选试验结果表明,0.1  $^{\circ}$ C/s、0.2  $^{\circ}$ C/s、0.4  $^{\circ}$ C/s、0.8  $^{\circ}$ C/s 四种荧光采集的温度间隔中,采用 0.2  $^{\circ}$ C/s 的溶解速率进行检测,获得的溶解曲线分辨率最高 (图 1),从而确定最佳溶解速率为 0.2  $^{\circ}$ C/s。0.1  $^{\circ}$ C/s 和 0.2  $^{\circ}$ C/s 两个溶解速率都能得到特异性的溶解曲线和熔点峰,即溶解曲线呈陡直急剧下降,荧光信号值增量最大,熔点峰呈“犀牛角”状,峰基底较窄。但 0.2  $^{\circ}$ C/s 的曲线更平滑,弥补了 0.1  $^{\circ}$ C/s 时峰顶出现波动对结果判读带来干扰的不足。0.8  $^{\circ}$ C/s 的

分辨率太差,无法达到 HRM 的要求。实验结果还表明,提高 DNA 模板的浓度能适当增加溶解曲线的分辨率。此外,为提高反应的灵敏度,在反应体系中加入了 BSA,本研究选择了 0.16  $\mu$ g/ $\mu$ L 的终浓度,扩增结果要明显好于不加 BSA。

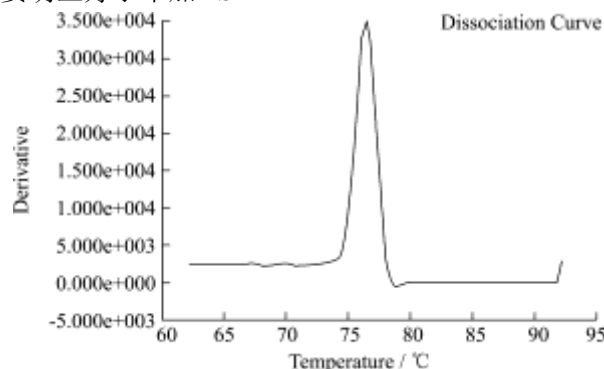


图 1 0.2  $^{\circ}$ C/s 溶解速率下 VP 的高分辨率溶解曲线图

Fig.1 High resolution melt curve of VP on melt rate of 0.2  $^{\circ}$ C/s

### 2.2 VP HRM real-time PCR 的特异性

表 1 副溶血性弧菌高分辨率溶解曲线法特异性实验结果

Table 1 Specificity of detection of VP by HRM real-time PCR

细菌	菌株号	$T_m$ 值	CT 值	检测结果
副溶血性弧菌	SZCIQ 4242	76.12	26.61	+
副溶血性弧菌	SZCIQ 4237	76.34	19.55	+
副溶血性弧菌	SZCIQ 4443	76.94	18.34	+
副溶血性弧菌	SZCIQ 6371	77.25	19.23	+
副溶血性弧菌	SZCIQ 7093	76.94	16.92	+
副溶血性弧菌	SZCIQ 8056	76.86	18.61	+
副溶血性弧菌	SZCIQ 7156	76.27	25.66	+
副溶血性弧菌	SZCIQ 62-1t	77.68	21.37	+
副溶血性弧菌	ATCC 33847	75.95	22.13	+
副溶血性弧菌	ATCC 17802	76.04	14.77	+
创伤弧菌	ATCC 27562		Undet.	-
霍乱弧菌	ATCC 51352		Undet.	-
金黄色葡萄球菌	GZCDC 108		Undet.	-
沙门氏菌	ATCC 9089		Undet.	-
弗氏志贺菌	GZCDC 719		Undet.	-
痢疾志贺菌	SZCIQ 4376		Undet.	-
绿脓假单胞菌	ATCC 10145		Undet.	-
单增李斯特杆菌	GZCDC 185		Undet.	-
阪崎肠杆菌	SZCIQ 0013		Undet.	-
阴沟肠杆菌	SZCIQ 45301		Undet.	-

注: SZCIQ, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine. GZCDC, Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, China. ATCC, American Type Culture Collection, Maryland, America.

特异性结果(表 1)显示,利用本研究建立的副溶血性弧菌 HRM real-time PCR 检测方法对 10 株 VP 目标菌株及另外 10 株阴性对照菌株进行检测,结果表明该法对 VP 检测具有高度特异性。10 株 VP 标准菌株都出现特异性溶解曲线和熔点峰,  $T_m$  值为  $76.64\text{ }^\circ\text{C}\pm 0.57$ , 且有典型的“S”形扩增曲线, CT 值在 14~27 个循环之间。非目标菌种的菌株均未出现非特异性扩增,无特异性的溶解曲线及  $T_m$  值。NTC 无扩增信号。故依据溶解曲线的典型性和菌种的特异性  $T_m$  值,能对未知样本做出鉴定。

### 2.3 VP HRM real-time PCR 的灵敏度

表 2 副溶血性弧菌高分辨率溶解曲线法灵敏度实验结果

Table 2 Sensitivity of detection of VP by HRM real-time PCR

稀释梯度	重组质粒浓度/(copies/mL)	Ct 值	$T_m$ 值
$10^{-1}$	$3.50\times 10^6$	$20.42\pm 0.53$	$77.93\pm 0.46$
$10^{-2}$	$3.50\times 10^5$	$23.81\pm 0.31$	$76.25\pm 0.29$
$10^{-3}$	$3.50\times 10^4$	$27.01\pm 0.42$	$77.87\pm 0.34$
$10^{-4}$	$3.50\times 10^3$	$30.33\pm 0.28$	$76.89\pm 0.48$
$10^{-5}$	$3.50\times 10^2$	$33.64\pm 0.51$	$77.58\pm 0.39$
$10^{-6}$	$3.50\times 10^1$	undet.	
$10^{-7}$	$3.50\times 10^0$	undet.	

灵敏度实验结果表明,该检测方法对 VP 检测的最低拷贝数为  $3.50\times 10^2$  copies/mL(表 2)。为提高反应的灵敏度,在反应体系中加入了 BSA,由于分离副溶血性弧菌的同时,也会携带有一定量 Taq DNA 聚合酶抑制因子<sup>[3]</sup>,加入适量的 BSA 这种 Taq DNA 聚合酶保护剂能保证聚合酶活性,提高 PCR 扩增产物的产量和反应的灵敏度。结果表明,加入 BSA 后灵敏度要明显高于不加 BSA(检出限为  $3.50\times 10^3$  copies/mL)。

### 2.4 VP HRM real-time PCR 的重复性

重复性结果(表 3)表明,同一次实验内 20 个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本上是重合的,该法对 VP 检测的  $T_m$  值范围( $\bar{x}\pm\text{SD}$ )为  $76.53\pm 0.35\text{ }^\circ\text{C}$ , CV 为  $0.56\pm 0.42\%$  (0.18~1.19%);同一样品在 20 次不同实验内所获的  $T_m$  值范围为  $76.74\pm 0.52\text{ }^\circ\text{C}$ , CV 为  $1.11\pm 0.73\%$  (0.49~2.47%)。提示本研究所建立的副溶血弧菌高分辨率实时荧光 PCR 法重复性好,可对副溶血弧菌进行稳定、可靠的检测。

### 2.5 HRM real-time PCR 法对鲜活海产品样本

中 VP 的检测结果

用两种方法对 90 份送检的鲜活海产品样本进行检测,HRM real-time PCR 法检出 17 份阳性,国标法检出 13 份阳性。进行两两配对比较,国标法阳性者 HRM real-time PCR 法均阳性,取结果不一致的 4 份样本进行测序,结果均为阳性。该检测差异可能是由于该法相比国标法具有更高的灵敏度,或者非可培养状态的 VP 存在导致的。检测结果证实 HRM real-time PCR 法可以使阳性检出率从国标法的 14.44% 提高至 18.89%,说明 HRM real-time PCR 法具有广泛而良好的适用性。

表 3 VP 荧光定量 PCR 重复性的结果

Table 3 Reproducibility of detection of VP by HRM real-time PCR

重组质粒浓度/(copies/mL)	组内 $T_m$ 值			组间 $T_m$ 值		
	Mean	S.D	CV/%	Mean	S.D	CV/%
$1.5\times 10^7$	76.81	0.32	0.42	77.25	0.45	1.59
$1.5\times 10^6$	76.32	0.10	1.13	78.21	0.52	0.67
$1.5\times 10^5$	77.14	0.14	0.18	77.97	0.49	0.63
$1.5\times 10^4$	75.95	0.16	0.21	75.16	0.21	1.28
$1.5\times 10^3$	76.83	0.35	0.45	77.91	0.38	0.49
$1.5\times 10^2$	77.27	0.29	0.37	75.41	0.46	0.61
$1.5\times 10^1$	75.38	0.15	1.19	75.26	0.37	2.47

## 3 讨论

HRM 技术多应用于突变扫描和基因分型,由于不同病原菌扩增产物长度不同、其 GC 比值不同,溶解曲线不同、 $T_m$  值不同,可根据特异性  $T_m$  值来鉴定不同细菌<sup>[5]</sup>。近年来,HRM 越来越多应用于各种病毒如 cryptosporidiosis<sup>[6]</sup>, Chikungunya, Dengue and West Nile<sup>[7]</sup>及食源性致病菌如金黄色葡萄球菌<sup>[8]</sup>、沙门氏菌<sup>[9]</sup>、单增李斯特菌<sup>[10]</sup>的鉴定及分型,具有快速、简便、成本低、特异性高等优点。但还未见有利用 HRM 技术对副溶血性弧菌进行检测的报道。本研究拟建立一种根据特异性  $T_m$  值来鉴定副溶血性弧菌的 HRM real-time PCR 检测方法。多数研究报告显示对 VP 进行检测时,与致病性相关的 *tdh* 和 *trh* 基因、*gyrB* 基因、*toxR* 基因、*tl* 基因等均可作为检测靶基因<sup>[13]</sup>, CROCI 等<sup>[11]</sup>评估了不同靶基因的 VP 的 PCR 鉴定方法,指出 *toxR* 作为靶基因的 PCR 具有最高的准确性,可作为 VP 分子鉴别的参考方法,本文以 *toxR* 为靶基因,利用高特异性引物对 VP 样本进行 HRM 分析,获得特异性的溶解曲线和  $T_m$  值,以  $T_m$  值作为鉴定标准,建立了一种以 HRM 分析结合 real-time PCR 检测副溶血性弧菌的方法,并对 PCR 反应体系如引物浓

度、BSA的添加等及熔解条件进行优化,以获得更高的特异性、灵敏度及重复性。

由于本研究建立的 HRM real-time PCR 法是以特异性  $T_m$  值来鉴定 VP 的,目标 DNA 扩增产物长度、GC 比值、基因突变、仪器分辨率、程序设置如熔解速率等因素都会影响  $T_m$  值,如何保证以  $T_m$  值为结果判读标准的准确性,是本研究的需要解决的一个关键问题。为减小基因突变对  $T_m$  值造成的影响,本研究选取高准确性的 *toxR* 基因为靶基因,确定在副溶血弧菌菌株内保守、其他菌株间特异的片段,引物通过 BLAST 同源性比较分析以保证对 VP 具有高度特异性,避免了陈弟等<sup>[5]</sup>利用熔解曲线分析检测临床常见 4 种革兰阳性菌时的非目标菌株出现扩展曲线的问题。其次,本研究选用带有 HRM 模块的 ABI 7500 Real Time PCR System 仪器进行 HRM real-time PCR 检测,避免了 Donald 等<sup>[12]</sup>使用一般的熔解曲线分析方法鉴定 Plum pox 病毒导致的染料迁移的问题。虽然 Aniko Varga 等<sup>[13]</sup>的研究与本课题组的前期研究均显示,  $T_m$  值的大小与熔解速率在一定范围内成正比,但我们发现,熔解速率越小,对  $T_m$  值的影响就越小,且在熔解速率固定(选取能获得最佳分辨率的熔解速率)后,熔解速率对  $T_m$  值的大小不造成显著性改变。

通过对 HRM real-time PCR、普通 PCR 和常规培养法的比较可知,常规检测病原菌的方法是以细菌培养为主,从增菌开始、选择性分离培养到生化鉴定等需 3~4 d 时间;普通 PCR 从核酸提取、基因扩增到电泳观察结果需 4~5 h;而 HRM real-time PCR 方法因为无需电泳,且在监测荧光强度的同时可以随时对样本进行结果判断,从核酸提取至完成检测最快能在 2~3 h 内完成,明显缩短检测周期,大大提高了检测效率。本研究建立的 HRM real-time PCR 法对副溶血性弧菌的检测有高度特异性;灵敏性高达  $3.50 \times 10^2$  copies/mL,高于冯江波等<sup>[14]</sup>建立的 PCR 快速检测方法(经前增菌纯培养菌液的检出限为  $4.00 \times 10^3$  CFU/mL)、黄亚琴等<sup>[1]</sup>建立的荧光定量 PCR 法(能检出低至  $1.00 \times 10^3$  copies/mL 细菌 DNA)和 EMA-PCR 法<sup>[3]</sup> ( $1.00 \times 10^5$  CFU/mL);重复性高,同一样品于试验内及试验间的  $T_m$  值变异系数分别为  $0.56 \pm 0.42\%$  和  $1.11 \pm 0.73\%$ ;对食品样本的阳性检出率(18.89%)更高于国标法(14.44%)。此外,HRM real-time PCR 法实验操作相对方便,不需制作标准曲线,仅用  $T_m$  值即可进行结果判读;引物设计简便,可人工设计检测片段  $T_m$  值,从而使结果判读更简易;自动化程度高,整个过程均在封闭的环境中进行,PCR 后直接进行 HRM 分析,避免了实验室的污染;成本低,不需探

针;由于在 PCR 反应体系中加入特定的即便是在饱和浓度(荧光最大)下也不会抑制 PCR 反应的饱和染料,这种饱和染料可以插入 DNA 双链,饱和了 DNA 双螺旋结构中的小沟,在 DNA 解链过程中就不会发生重排,于是熔解过程中发出的荧光信号有更高的分辨率<sup>[5]</sup>。因此,与常规培养法和实时荧光定量 PCR 法相比,HRM 检测的准确性、灵敏度、操作和结果判读的简便性将大大提高常规食品样本检测的效率。

#### 4 结论

本研究所构建的 HRM real-time PCR 方法具有操作简单、价格低廉、快速、特异性强、灵敏性高、稳定性好等优点,为副溶血性弧菌的检测提供了新的检测手段,尤其适用于基层检验检疫机构,亦可尝试作为突发公共卫生事件时的现场检测,有望发展成为简易的常规快速检测副溶血性弧菌的有效手段。该方法已实现对经初步增菌后的海产样本直接提取核酸进行副溶血性弧菌的检测评价,可进一步推广到其他食源性致病菌的检测应用上;更可利用该检测体系以各菌种目的扩增片段的特异性  $T_m$  值为鉴定标准的优势,免除昂贵而设计复杂的探针的加入,直接在保守基因片段中,通过调整引物长度以增大各菌种间  $T_m$  值的差异,而达到海产品中食源性致病菌如沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌等的多重检测。

#### 参考文献

- [1] 黄亚琴,徐奋奋,蔡颖,等.实时荧光定量 PCR 技术在副溶血性弧菌快速检测中的应用[J].中国卫生检验杂志,2012,22(4):772-775  
Huang Y Q, Xu F F, Cai Y, et al. Application of real-time quantitative PCR in the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food and food poisoning samples [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2012, 22(4): 772-775
- [2] 夏楚才,陈水波,苏华,等.副溶血性弧菌分子检测与分型研究进展[J].食品科学,2012,22:277-280  
Xia C C, Chen S B, Su H, et al. Research Progress of Detection and Typing of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2012, 22: 277-280
- [3] 金雪花,吕淑霞,张超,等.EMA-LAMP 方法快速检测鉴别副溶血性弧菌[J].微生物学杂志,2012,32(4):6-12  
Jin X H, Lv S X, Zhang C, et al. EMA-LAMP Method Rapidly to Detect and Discriminate *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Microbiology, 2012, 32(4): 6-12

- [4] 覃倚莹,吴晖,肖性龙,等. *toxR* 基因作为荧光定量 PCR 靶基因设计 TaqMan 探针快速检测副溶血弧菌[J]. 生物工程学报, 2008, 24(10): 1837-1842
- Qin Y Y, Wu H, Xiao X L, et al. Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by TaqMan-based Real-time PCR Assay Targeting the *toxR* Gene [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(10): 1837-1842
- [5] 陈弟,邵剑春,刘德华,等. 熔解曲线分析检测临床常见 4 种革兰阳性菌的方法建立[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(6): 449-459
- Chen D, Shao J C, Liu D H, et al. Development the methods for detecting 4 species of clinical common Gram-positive pathogens by melting curve analysis [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2011, 36(6): 449-459
- [6] Aradhana Pangasa, Aaron R Jex, et al. High resolution melting-curve (HRM) analysis for the diagnosis of cryptosporidiosis in humans [J]. Molecular and Cellular Probes, 2009, 23: 10-15
- [7] F Naze, K LeRoux, I Schuffenecker, et al. Simultaneous detection and quantitation of Chikungunya, Dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays and Dengue virus typing using High Resolution Melting [J]. Journal of Virological Methods, 2009, 162: 1-7
- [8] Lilliebridge R A, S Y Tong, et al. The utility of high-resolution melting analysis of SNP nucleated PCR amplicons-an MLST based *Staphylococcus aureus* typing scheme [J]. PloS one, 2011, 6(6): e19749
- [9] K Jeng, S Yang, H Won, et al. Application of a 16S rRNA PCR-High-Resolution Melt Analysis Assay for Rapid Detection of Salmonella Bacteremia [J]. Journal of clinical microbiology, 2012, 50(3): 1122-1124
- [10] Pietzka A T, A Stöger, et al. Gene Scanning of an Internalin B Gene Fragment Using High-Resolution Melting Curve Analysis as a Tool for Rapid Typing of *Listeria monocytogenes* [J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2011, 13(1): 57-63
- [11] CROCI L, SUFFREDINI E, COZZI L, et al. Evaluation of different polymerase chain reaction methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated by cultural methods [J]. JAOAC Int, 2007, 90: 1588-1597
- [12] 冯江波,吕淑霞,胡英. 提高贝类海鲜中副溶血性弧菌 PCR 快速检测方法灵敏度的研究[J]. 现代预防医学, 2008, 35(24): 4842-4844
- Feng J B, LV S X, HU Y, et al. Study on the enhancement on the sensitivity of PCR detection for vibrio parahaemolyticus from shellfish [J]. Modern Preventive Medicine, 2008, 35 (24): 4842-4844
- [13] Aniko Varga, Delano James. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of *Plum pox* virus strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation [J]. Journal of Virological Methods, 2006, 132: 146-153