

恒温实时荧光法检测副溶血性弧菌

易敏英^{1,3}, 凌莉¹, 刘助红², 叶蕾^{2,4}, 唐大运², 石磊⁴

(1.广东检验检疫技术中心, 广东广州 5106232) (2.广州迪澳生物科技有限公司, 广东广州 510663)

(3.华南农业大学, 广东广州 510642) (4.华南理工大学轻工与食品加工学院, 广东广州 510641)

摘要: 为了更加准确、快速地检测进出口食品中的副溶血性弧菌, 针对副溶血性弧菌的*tlh*基因设计环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)引物, 结合ESEQuant tube scanner来对扩增结果进行实时检测。结果显示: 该引物扩增效率高、特异性强、灵敏度高(1~10 CFU/反应, 约为荧光PCR的100倍)。126株副溶血性弧菌, 恒温荧光法检测出126株, 荧光PCR的方法检测出121株。恒温实时荧光检测仪与荧光PCR仪类似, 均可以对检测结果进行实时监测和熔解曲线分析, 表明该恒温实时荧光检测仪可广泛应用于基础实验室的科学研究或经济发展相对落后区域的临床初步诊断。

关键词: 副溶血性弧菌; 实时检测; 环介导等温扩增

文章编号: 1673-9078(2013)5-1131-1135

Real-time Isothermal Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by ESEQuant Tube Scanner

YI Min-ying^{1,3}, LING Li¹, LIU Zhu-hong², YE Lei^{2,4}, TANG Da-yun², SHI Lei⁴

(1. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou, 510623) (2. Guangzhou deaoubio-technology CO., LTD, Guangzhou 510663, China) (3. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (4. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou, 510641)

Abstract: In order to detect the *Vibrio parahaemolyticus* in the import and export foods more accurately and quickly, the study designed the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primer sets targeted the *tlh* gene of *V. parahaemolyticus*, and detected the LAMP results real-time by the ESEQuant tube scanner. The results showed that the reaction characterized with high efficiency, high specificity and high sensitivity (1~10 CFU/reaction, about 100 times than the real-time PCR). One hundred and twenty-six out of 126 *V. parahaemolyticus* strains were detected as *Vibrio parahaemolyticus* by the LAMP assay with the ESEQuant tube scanner, while 121 strains were detected as *V. parahaemolyticus* by the real-time PCR. The ESEQuant tube scanner is comparable to the real-time PCR machine in the sense that both are capable of detecting samples in real-time resulting and both are capable of conducting melting curve analysis, which means the ESEQuant tube scanner system can both served as research application in basic laboratory or offering pre-treatment diagnosis in primary health care settings in developing areas.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; real-time detection; loop mediated isothermal amplification (LAMP)

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 为革兰氏阴性的嗜盐性细菌, 常见于海洋水产品 and 盐腌渍品中^[1-3], 是一种重要的食源性病原细菌。人一旦食用被该菌污染的食物, 便会引起人类腹泻、肠痉挛、呕吐等症状, 甚至会导致脱水、休克昏迷、死亡等。如今, 副溶血性弧菌已成为进出口食品等的重要检测卫生指标之一, 世界各国的食品卫生微生物学检验中均包括

收稿日期: 2012-12-27

基金项目: 广东省科技计划项目 (2011B031500012); 广东检验检疫局科技计划项目 (2010GDK30)

作者简介: 易敏英 (1969-), 女, 高级工程师, 食品微生物检测

通讯作者: 石磊 (1961-), 男, 博士, 教授, 食品微生物

了这种细菌的检验。我国的各种食品卫生标准中均明确规定了这种细菌的检测方法^[4]。

目前, 我国常规检测方法大多要经过前增菌、选择性增菌、选择性培养、生化鉴定、神奈川现象和血清学反应等过程^[5-6]。这些实验操作繁琐, 需耗时 5~6 天, 检出率低, 给海产品生产、出入境检验检疫、食品卫生监督等带来困难, 严重制约了经济的发展及外贸出口。另外, 在行业标准中采用荧光 PCR 的方式对副溶血性弧菌进行检测, 其周期短, 但需要昂贵的仪器设备, 使其不能广泛使用。因此使用一种简单、快速、经济的检测方法以便快速得到检测结果已成为当前研究的热点问题。

2000年, Notomi^[7]等人发明环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术,该方法依赖于能够识别靶DNA上6个特定区域的4条引物和一种具有链置换活性的DNA聚合酶,在恒温条件下高效扩增核酸,1h左右即可完成,扩增产物是由多重重复靶序列的茎环状DNA和花椰菜状DNA所组成的混合物。LAMP技术因具有高特异性、高灵敏度、高扩增效率、操作简便等特点而广泛应用于临床疾病的诊断^[8-9]、流行性细菌或病毒的定性或定量检测^[10-11]、转基因的检测^[12-13]以及动物胚胎性别鉴定^[14-15]等。

副溶血性弧菌作为一种食源性致病菌,其主要的毒力因子为耐热溶血毒素(thermostable direct hemolysin, TDH)和耐热相关溶血毒素(thermostable related hemolysin, TRH),而环境中的副溶血性弧菌大部分都不含有这两个基因,因此选择该基因作为检测靶标无法检测出样品中所有的副溶血性弧菌^[16-18]。而不耐热溶血毒素(thermoliable hemolysin, TLH)基因是存在于所有的副溶血性弧菌中的一个特异性的基因,以其作为环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测的目标基因,能很好的开展对副溶血性弧菌的检测^[1-2, 19-20]。

本研究结合ESEQuant tube scanner仪器将LAMP技术应用于进出口食品中副溶血性弧菌的检测,避免由于电泳检测的繁琐操作和肉眼观察造成的错检和漏检,为进出口食品中副溶血性弧菌的检测提供一种快速、准确、简单、经济的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

标准菌株:副溶血性弧菌 ATCC17802,副溶血性弧菌 VPL4-91,创伤弧菌 ATCC27562,溶藻弧菌 CMCC1833,拟态弧菌 CMCC1969,大肠杆菌 ATCC25922,大肠杆菌 O157:H7 ATCC43889,单核增生李斯特氏菌 ATCC19115/413,沙门氏菌 ATCC14028,宋氏志贺氏菌 CMCC51334,金黄色葡萄球菌 CMCC26003,阪崎肠杆菌 ATCC12868,绿脓杆菌 ATCC9027。

野生菌株:来自广东出入境检验检疫局进出口食品(鱼、虾等)中分离的副溶血性弧菌。上述菌株用脑心血(BHI)琼脂培养基培养后,采用甘油冷冻法于-70℃保存,使用前先做复苏及鉴定实验。

1.1.2 主要试剂

脑心血(BHI)琼脂培养基;反应液,广州迪澳

生物科技有限公司;荧光染料,广州迪澳生物科技有限公司;超纯水;Bst DNA聚合酶大片段,New England BioLabs公司;LATaq酶,TakaRa公司;氯化钠,分析纯,广州化学试剂公司。

1.2 仪器与设备

离心机(Thermo scientific),ESEQuant Tube Scanner(QIAGEN公司),实时荧光PCR仪器(Applied Biosystems 7900),三角瓶,金属浴,移液器,恒温摇床,超净工作台等。

1.3 方法

1.3.1 DNA模板的制备

将弧菌类细菌接种入含有3% NaCl的BHI液体培养基后放入35℃培养箱培养14至16h;非弧菌类细菌接种入BHI液体培养基箱后放入35℃培养箱培养14至16h。

取培养后的细菌纯培养物1 mL,1,200 r/min离心5 min,加入1 mL生理盐水,洗涤沉淀,1,200 r/min离心5 min,加入100 μL超纯水,充分悬浮菌液,于100℃煮沸10 min,于1,200 r/min离心5 min,立即冰浴2 min,取上清储存于-20℃作为DNA模板备用。

1.3.2 引物设计与合成

表1 扩增tlh基因的LAMP引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	位点*
F3	GACAGCTTGCTGATACAGG	173~192
B3	GTTCTTCGCCAGTTTTGC	401~418
FIP(F1c+F2)	GCGGAAGGTTCTTCGCTTTGGCT GGTTCTTAGGTCACTTC	-
BIP(B1c+B2)	TCTACAACCTGGGCAGTTG GCCTTGATCACCAACCCCTG	-
LoopF	GTCCACACAAAACCGTTGG	276~375
LoopB	GGCTGGTGAGAACCAATACA	315~334
F2	GCTGGTTCTTAGGTCACTTC	237~256
F1c	GCGGAAGGTTCTTCGCTTTG	308~327
B2	CTTGATCACCAACCCCTG	363~380
B1c	TCTACAACCTGGGCAGTTGGC	290~309

注: *引物序列的位点为副溶血性弧菌 ATCC17802 基因组中的位点, Accession Number: FJ457034。

针对副溶血性弧菌种的特异性基因tlh,应用PrimerExplorer V4 software (Eiken Chemical; <http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>)软件设计LAMP引物,设计好的引物序列利用NCBI网站进行序列特异性的比对(Blast),引物序列如表1,引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3.3 LAMP 反应

按照表 2 配制 LAMP 反应体系。

表 2 LAMP 的反应体系

Table 2 Reaction system of LAMP

反应液(2×)*	12.5 μL
Bst DNA 聚合酶大片段(8U/μL)	1.0 μL
外引物 F3	0.2 μmol/L (终浓度)
外引物 B3	0.2 μmol/L (终浓度)
内引物 FIP	1.6 μmol/L (终浓度)
内引物 BIP	1.6 μmol/L (终浓度)
环引物 LoopF	0.8 μmol/L (终浓度)
环引物 LoopB	0.8 μmol/L (终浓度)
染料	0.5 μL
DNA	2.0 μL
超纯水	8.0 μL
总计	25.0 μL

注：*反应液中含有酶，缓冲液，dNTP，Mg²⁺，甜菜碱等。

配置好反应体系后，在 ESEQuant Tube Scanner 中进行检测，AU 值设为 30，反应温度为 63 °C，反应时间为 60 min。

1.3.4 特异性实验

选取食品中常见的病原菌的标准株为对照品(包括 3 株弧菌和 8 株非弧菌，分别为创伤弧菌 ATCC27562，溶藻弧菌 CMCC1833，拟态弧菌 CMCC1969，大肠杆菌 ATCC25922，O157：H7 ATCC43889，单核增生李斯特氏菌 ATCC19115/413，沙门氏菌 ATCC14028，宋氏志贺氏菌 CMCC51334，金黄色葡萄球菌 CMCC26003，阪崎肠杆菌 ATCC12868，绿脓杆菌 ATCC9027，验证该引物的特异性。

1.3.5 灵敏度实验

取培养 14 至 16 h 的细菌菌悬液 2 mL，用生理盐水进行 10 倍的梯度稀释，直至 10⁻⁸，取最后 3 个梯度的菌液 100 μL 涂布 3% NaCl-BHI 平板，平板放入 35 °C 培养箱培养 24~48 h 后进行菌落计数，同时取每个梯度的菌液 1 mL 按 1.3.1 中方法提取 DNA，取 2 μL 作为模板，分别进行 LAMP 实验和荧光 PCR 实验。

1.3.6 样品检测

为了验证恒温荧光法对副溶血性弧菌检测的可靠性，对在广东出入境检验检疫局从进出口水产品中分离到的 126 株野生型副溶血性弧菌进行检测，同时进行 LAMP 和荧光 PCR 实验。荧光 PCR 实验方法按照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准“进出口食品中副溶血性弧菌快速及鉴定检测方法 实时荧光

PCR 方法”进行检测(SN/T 2424-2010)。

2 结果与讨论

2.1 引物反应效率的检测

通过 ESEQuant tube scanner 仪器检测，已增菌培养的副溶血性弧菌培养物可在 18min 左右出现扩增峰(图 1)，说明该引物对目标基因有很高的扩增效率，且在 60 min 未出现假阳性。

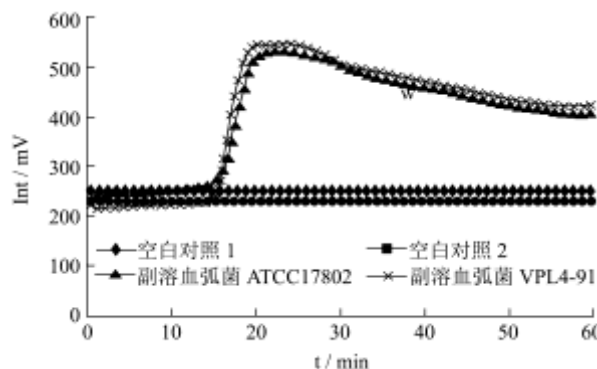


图 1 LAMP 引物的扩增图谱

Fig.1 The pattern of amplificaton with LAMP primers

2.2 特异性实验

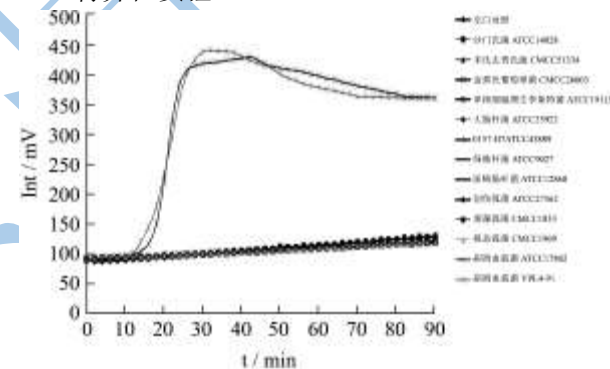


图 2 实时荧光法检测副溶血性弧菌的特异性

Fig.2 Specificity test for detection of *V. parahaemolyticus* in pure cultures by ESEQuant tube scanner

从图 2 的结果来看，对照的 6 株常见的食源性病原菌均未出现扩增，而两株副溶血性弧菌均在 20min 内被特异性地检测出来，表明该引物对副溶血性弧菌检测的特异性较好。

2.3 灵敏度实验

图 3 显示恒温实时荧光法对副溶血性弧菌 ATCC17802 检测的灵敏度为 1~10 CFU/反应，图 4 显示荧光 PCR 的方法的检测灵敏度约为 1000 CFU/反应。两者相比较，恒温实时荧光法比荧光 PCR 法要高出约 100 倍，可见恒温荧光法的检测灵敏度要更高。

2.4 食品中分离副溶血性弧菌的验证

从广东出入境检验检疫局取分离于鱼、虾等食品中的副溶血性弧菌 126 株，恒温荧光法检测 126 株均

为阳性,其检出率为 100%;实时荧光 PCR 法检测 121 株为阳性,其检出率为 96.0%。

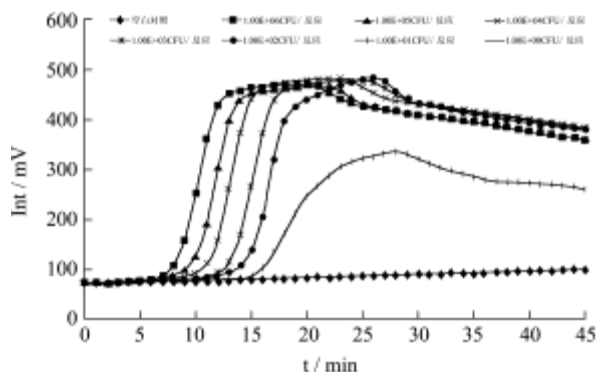


图 3 恒温实时荧光法检测副溶血性弧菌的灵敏度

Fig.3 Sensitivity test for detection of *V. parahaemolyticus* in pure cultures by ESEQuant tube scanner

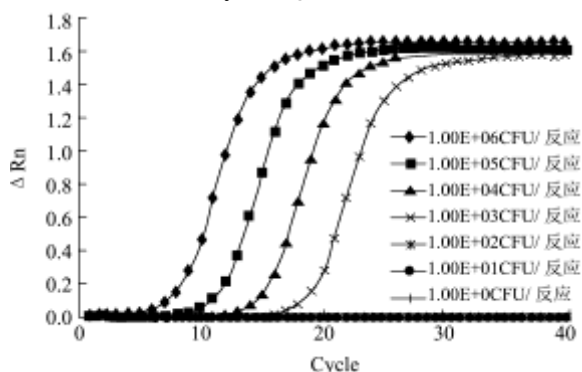


图 4 荧光 PCR 法检测副溶血性弧菌的灵敏度

Fig.4 Sensitivity test for detection of *V. parahaemolyticus* in pure cultures by Real-time PCR (TaqMan probe)

表 4 恒温荧光法和实时荧光 PCR 法对野生副溶血性弧菌的检测
Table 4 Detection of wild *V. parahaemolyticus* with ESEQuant tube scanner and Real-time PCR

		恒温荧光法		总计
		阳性	阴性	
实时荧光	阳性	121	0	121
PCR 法	阴性	5	0	5
总计		126	0	126

3 结论

3.1 食源性致病菌的检验技术目前主要根据国标 GB/T4789-2010 进行,需要增菌、转种、分离培养、生化鉴定等试验,耗时长,实验结果也常受到多种因素的影响,因此建立食源性病原微生物的快速诊断方法对实现食源性传染病的预警与预测,提高预防和控制食源性疾病的应急能力至关重要。

3.2 本研究针对副溶血性弧菌的 *tlh* 基因设计特异性的 LAMP 引物,该引物对副溶血性弧菌的靶标基因具有较好的扩增效率,最低检出限在 ESEQuant tube

scanner 仪器上的检出时间为 18 min 左右。对与副溶血性弧菌有同源性的创伤弧菌等细菌和金黄色葡萄球菌等非弧菌进行 LAMP 的扩增,均未出现非特异性的扩增,说明该引物对副溶血性弧菌有较好的特异性扩增能力。该引物对纯培养物中的副溶血性弧菌的检测极限可以达到 1~10 CFU/反应,该法的检测限也明显高于已有文献报道的 PCR 法检测副溶血性弧菌的检测限细菌纯培养物、Real-time PCR 法检测副溶血性弧菌的检测限度^[21-22],LAMP 方法灵敏度更高。在完成实验室的筛选、优化工作后,在广东出入境检验检疫局进行稳定性试验,实验结果显示表明对副溶血性弧菌的检出率可达到 100%。最重要的是,本研究将 LAMP 技术和 ESEQuant tube scanner 仪器有效结合起来,使该技术操作更加简单,不需要经过电泳等复杂的步骤,省去了购买昂贵检测仪器的费用,更容易在普通实验室进行广泛推广使用。

3.3 本研究建立的副溶血性弧菌的恒温荧光检测的方法具有特异性强、灵敏度高、操作简单、成本低等特点,为食品中副溶血性弧菌的检测提供了新的发展方向,这对我国的食品卫生、进出口食品安全具有重要的意义。

参考文献

- [1] 徐芊,孙晓红,赵勇.副溶血弧菌 LAMP 检测方法的建立[J].中国生物工程杂志,2007,27(12):66-72
- [2] Yamazaki W, Ishibashi M, Kawahara R, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. BMC microbiology, 2008, 8(1): 163-169
- [3] Joseph S W, Colwell R R, Kaper J B. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios [J]. Critical reviews in microbiology. 1982, 10(1):77-124
- [4] GB/T 4789.7-2008 食品卫生微生物学检验 副溶血性弧菌检验[S].SN/T 2424-2010 进出口食品中副溶血性弧菌快速及鉴定检测方法 实时荧光 PCR 方法[S]
- [5] 许斌福,董传甫.大黄鱼副溶血弧菌的分离,鉴定及致病力分析[J].福建农业学报.2002,17(3):174-177
- [6] 朱雪兰,陈艳,刘秀梅,等.副溶血性弧菌溶血素基因及其检测的研究进展[J].国外医学:卫生学分册,2007,34(4): 33-236
- [7] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research. 2000, 28(12): e63-e63
- [8] Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in

- sputum samples [J]. Journal of Clinical Microbiology. 2003, 41(6): 2616-2622
- [9] Pandey B D, Poudel A, Yoda T, et al. Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation in sputum samples of Nepalese patients [J]. Journal of medical microbiology. 2008, 57(4): 439-443
- [10] Yeh H Y, Shoemaker C A, Klesius P H. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri* [J]. Journal of microbiological methods. 2005, 63(1):36-44
- [11] Parida M, Posadas G, Inoue S, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus[J]. Journal of Clinical Microbiology. 2004,42(1): 257-263
- [12] Lee D, La Mura M, Allnut T R, et al. Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequences [J]. BMC biotechnology. 2009, 9(1): 1-7
- [13] Guan X, Guo J, Shen P, et al. Visual and rapid detection of two genetically modified soybean events using loop-mediated isothermal amplification method [J]. Food Analytical Methods. 2010, 3(4): 313-320
- [14] Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, et al. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification[J]. Theriogenology. 2004, 62(5): 887-896
- [15] Hirayama H, Kageyama S, Takahashi Y, et al. Rapid sexing of water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos using loop-mediated isothermal amplification[J]. Theriogenology. 2006, 66(5): 1249-1256
- [16] Chen S, Ge B. Development of a toxR-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Vibrio parahaemolyticus* [J]. BMC microbiology. 2010, 10(1): 41-46
- [17] Yamazaki W, Kumeda Y, Misawa N, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the *tdh* and *trh* genes of *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species [J]. Applied and environmental microbiology. 2010, 76(3): 820-828
- [18] Nishibuchi M, Kaper J B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium [J]. Infection and immunity. 1995, 63(6): 2093-2098
- [19] 陈星,潘迎捷,孙晓红,等.荧光定量 PCR 法检测副溶血弧菌 *tlh* 和 *tdh* 基因的表达差异[J].微生物学通报,2011,38(7): 1077-1083
- [20] 曾转萍,廖日房,李红玉,等.副溶血弧菌 *tlh* 基因检测[J].中国卫生检验杂志,2009,6:1338-1339
- [21] Jessica L. N. M C L V, George M. B. Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay with an Internal Amplification Control for the Detection of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteria in Oysters [J]. Applied and Environment Microbiology. 2007, 73 (18):5840-5847
- [22] Gitika P, Douglas R C, Melissa J K. Detection of Pathogenic *Vibrio* spp. in Shellfish by Using Multiplex PCR and DNA Microarrays [J]. Applied and Environment Microbiology. 2004, 70(12):7436-7444