

副溶血性弧菌的检测研究

刘小青, 李日升, 黄静敏, 陈晶, 兰全学* (深圳市计量质量检测研究院, 广东深圳 518131)

摘要 [目的]对 *toxR* 进行副溶血性弧菌特异性检测, 探讨 *toxR* 靶基因能否准确检测副溶血性弧菌, 从而消除其他研究者对该基因特异性的疑虑。[方法]采用 SN/T1870—2016 中副溶血性弧菌 *toxR* 的引物探针对副溶血性弧菌和其亲缘关系接近的弧菌标准菌株进行检测。[结果]采用实时荧光 PCR 方法证实该引物探针只能扩增出副溶血性弧菌, 其他弧菌诸如溶藻弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌等未得到扩增。[结论]证实 SN/T1870—2016 中 *toxR* 的引物探针特异性高。该研究可为各检测机构提供数据支持, 为副溶血性弧菌的检测与研究奠定更为坚实的基础。

关键词 副溶血性弧菌; SN/T1870—2016; *toxR*; 弧菌

中图分类号 TS201.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)32-0079-02

Detection Research of *Vibrio parahaemolyticus*

LIU Xiao-qing, LI Ri-sheng, HUANG Jing-min, LAN Quan-xue* et al (Shenzhen Institute of Measurement Quality Inspection, Shenzhen, Guangdong 518131)

Abstract [Objective] The specific detection of *toxR* in *Vibrio parahaemolyticus* was used to investigate whether the *toxR* target gene can detect *Vibrio parahaemolyticus* accurately, thus it eliminates doubts among other researchers about the specificity of the gene. [Method] The primer and probe of *toxR* in SN/T 1870—2016 was used to detect *Vibrio parahaemolyticus* and its *Vibrio* related standard strain. [Result] The real-time fluorescent PCR method proved that the primer and probe could only amplify *Vibrio parahaemolyticus*, and other *Vibrio* species such as *Vibrio vulnificus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* were not amplified. [Conclusion] The specificity of *toxR* primers and probe in SN/T1870—2016 was confirmed high. This study can provide data support for the testing organization, and lay a more solid foundation for the detection and research of *V. Parahaemolyticus*.

Key words *Vibrio parahaemolyticus*; SN/T1870—2016; *toxR*; *Vibrio* spp

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种革兰阴性细菌^[1], 具有嗜盐性, 属于弧菌科弧菌属的食源性致病菌, 主要分布在海水和鱼、贝类、虾、海蜇等海产品中, 其次为盐腌渍品中, 另外畜禽肉、咸蛋、淡水鱼等也会由于交叉污染而传播该菌。由副溶血性弧菌引起的食品安全事故逐年增加, 已成为导致食源性疾病的主要致病菌, 其对人类的危害已经超过沙门氏菌, 因此检测副溶血性弧菌极为重要^[2]。

随着分子生物学技术的飞速发展, 研究人员和学者们逐渐意识到, 对病原微生物的鉴定不能仅局限于对它的外部形态结构及生理特征等一般检验上, 而要从分子生物学水平上研究其核酸结构和组成成分。为此, 国内外众多的研究人员开始建立起多种以分子生物学技术为手段的食源性致病菌检测技术, 这些技术包括常规 PCR 技术、实时荧光定量 PCR 技术、基因芯片技术和以环介导等温扩增技术 (LAMP)、重组酶聚合酶扩增 (RPA) 为代表的等温扩增技术。在我国, 一些从实时荧光 PCR 技术上对致病菌进行快速检测的方法也逐渐被研究应用, 其中《出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法》SN/T1870—2016 是各检测机构最为常用的一个检测方法^[3], 该标准涵盖了副溶血性弧菌等 12 种致病菌的检测。由于副溶血性弧菌与弧菌属其他弧菌的亲缘关系近, 有研究者质疑副溶血性靶基因的选择, 笔者以 SN/T1870—2016 为基础, 就 SN/T1870—2016 中副溶血性弧菌的引物探针的特异性进行鉴别, 深入研究探讨该标准在副溶血性弧菌的实际应用中的检测效果, 以期各检测机构提

供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料 标准菌株购自各菌种保藏中心等; 培养基购自北京陆桥技术有限责任公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 Promega 公司; 实时荧光 PCR 反应试剂 Pre-mix 酶等购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 引物、探针由上海生物工程有限公司合成; Mx3005P 实时荧光 PCR 仪, 美国安捷伦公司; 试验中所用引物见表 1^[3], 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 试验中所用引物和探针

Table 1 Primers and probe used in the experiment

编号 No.	引物 Primers	探针序列 (5'→3') The sequence of primers and probe
1	F	5' - GCGACCTTCTCTGAAATATTAATTGT - 3'
2	R	5' - CATTCCGCTGGCAAACATC - 3'
3	Probe	5' - FAM - CGCACAAAGGCTCGACGGCTGA - BHQ2 - 3'

1.2 方法

1.2.1 细菌的培养。副溶血性弧菌标准菌株在 3% 氯化钠碱性蛋白胨水 37 °C 振荡培养 18 h 复活, 其他弧菌在营养肉汤中 37 °C 振荡培养 18 h 复活。

1.2.2 菌株 DNA 模板的制备。取 1.0 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 去除上清液, 收集菌体。加入 100 μL 灭菌超纯水悬浮, 100 °C 沸水中水浴 10 min。12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液作为 PCR 反应 DNA 模板。

1.2.3 样品 DNA 模板的制备。取 1.0 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。

1.2.4 特异性试验。将副溶血性弧菌和其他弧菌的标准菌株采用增菌液增菌后, 按“1.2.3”方法制备 DNA 模板, 采用

作者简介 刘小青 (1983—), 女, 江西万载人, 工程师, 硕士, 从事微生物研究。* 通讯作者, 高级工程师, 硕士, 从事食品微生物学研究。

收稿日期 2017-08-28

25 μL 体系进行特异性试验,体系为 $2 \times \text{premix}$ 12.5 μL ,上下游引物各 1.0 μL ,探针 0.5 μL , ddH₂O 8.0 μL , DNA 模板 2.0 μL 。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s 并收集 FAM 荧光,进行 40 个循环。

2 结果与分析

扩增结果见图 1 和表 2。SN/T1870—2016 中的副溶血性弧菌 PCR 体系特异地检出了副溶血性弧菌,而其他与其亲缘关系邻近种属的弧菌未见非特异扩增现象,这表明该引物探针的特异性高。

采用分子方法尤其是 SN/T1870—2016 对其进行快速检测已是常规检测手段。但由于副溶血性弧菌与弧菌属其他

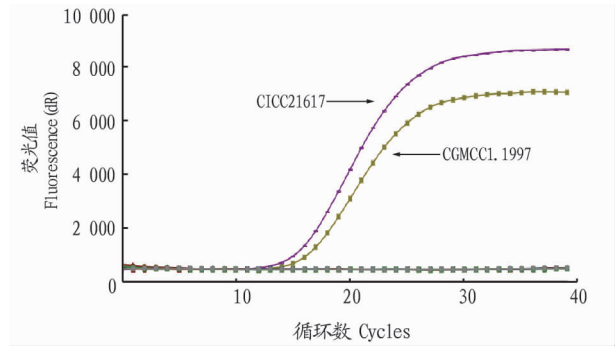


图 1 特异性试验扩增图

Fig.1 Specific experimental amplification

表 2 特异性试验结果

Table 2 Specific experiment results

序号 Serial number	菌种名称 Strain name	菌种编号 Strain number	菌种来源 Strain source	结果 Result
1	副溶血性弧菌	CICC21617	中国工业微生物菌种保藏管理中心	检出
2	副溶血性弧菌	CGMCC1.1997	中国普通微生物菌种保藏管理中心	检出
3	溶藻弧菌	CGMCC1.1607	中国普通微生物菌种保藏管理中心	未检出
4	创伤弧菌	CGMCC1.1758	中国普通微生物菌种保藏管理中心	未检出
5	拟态弧菌	CICC21613	中国工业微生物菌种保藏管理中心	未检出
6	霍乱弧菌	CICC23794	中国工业微生物菌种保藏管理中心	未检出
7	费舍尔弧菌	CGMCC1.1612	中国普通微生物菌种保藏管理中心	未检出
8	需纳弧菌	CICC10908	中国工业微生物菌种保藏管理中心	未检出
9	哈氏弧菌	GIM1.376	广东省微生物菌种保藏中心	未检出
10	坎氏弧菌	CGMCC1.1597	中国普通微生物菌种保藏管理中心	未检出
11	美人鱼发光杆菌美人鱼亚种	NBRC15633	日本技术评价研究所生物资源中心	未检出
12	魔鬼弧菌	CGMCC1.8014	中国普通微生物菌种保藏管理中心	未检出
13	气单胞菌属	ACC11625	中国农业微生物菌种保藏管理中心	未检出

弧菌的亲缘关系极为相近,有研究者质疑副溶血性 *toxR* 靶基因的选择,认为 *toxR* 基因无法区分副溶血性弧菌与非副溶血性弧菌,而该研究所选用菌株均为与副溶血性弧菌亲缘关系极为相近的菌株,结果证实 SN/T1870—2016 中 *toxR* 的引物探针特异性高,从而使上述质疑得到释疑。

3 讨论

该研究结果证实,SN/T1870—2016 中 *toxR* 的引物探针特异性高,可以有效地将副溶血性弧菌从亲缘关系相近弧菌中区别开。然而,近些年以来,随着分子生物学的发展,研究人员逐渐采用荧光 PCR 等分子生物学手段对副溶血性弧菌进行快速检测,SN/T1870—2016 采用 *toxR* 基因作为副溶血性弧菌的靶基因,它是弧菌中广泛分布的基因,为霍乱毒素的调控子及其他基因的调控子,该基因主要与 *toxS* 构成两成分系统 (*toxRS*) 对毒力基因进行表达调控,已有很多文献报道利用 *toxR* 鉴定副溶血性弧菌,并表现出很高的特异性和灵敏度^[4-6],但依然也有很多外国学者对该靶基因提出了质疑。Kim 对 373 株副溶血性弧菌和 290 株非副溶血弧菌属采用 *toxR* 基因进行了菌落 PCR,发现 373 株副溶血性弧菌全部阳性,但是弧菌属的其他 4 个种(溶藻弧菌、坎氏弧菌、鲨鱼弧菌、哈氏弧菌)有弱阳性出现。由于副溶血性弧菌与弧菌属的其他弧菌如霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌等亲缘关系

极为密切,16sRNAR 分析发现,其与溶藻弧菌的同源性高达 99%^[7]。也有文献报道,副溶血性弧菌与气单胞菌属和发光杆菌属毒素基因也有交叉反应^[8]。因此在该研究中,笔者选取了 2 株副溶血性弧菌标准菌株、9 株弧菌属的其他弧菌、气单胞菌属和发光杆菌共 12 株菌作为非副溶血性弧菌的代表,对所选引物探针进行特异性试验,着重探讨其对临近种属的特异性。结果表明,SN/T1870—2016 中副溶血性弧菌的特异性很高,仅扩增副溶血性弧菌,其他临近种属的菌未得到扩增。通过 NCBI 将引物和探针序列进行 blast 发现,比对结果中只有副溶血性弧菌出现,进一步证实该引物探针特异性高,与笔者的试验结果一致。该研究解除了利用 SN/T1870—2016 中的副溶血性弧菌引物探针特异性不高的疑虑,可为各检测机构提供数据支持,为副溶血性弧菌的检测与研究奠定更为坚实的基础。

参考文献

- [1] FUJINO T, OKUNO Y, NAKADA D, et al. On the bacteriological examination of shirasu-food poisoning[J]. Med J Osaka Univ, 1953, 4(2/3): 299-304.
- [2] 陈晶, 黄建飞, 刘丛丛. 食品来源副溶血性弧菌毒力基因分布及分子分型研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(6): 239-249.
- [3] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法: SN/T 1870—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

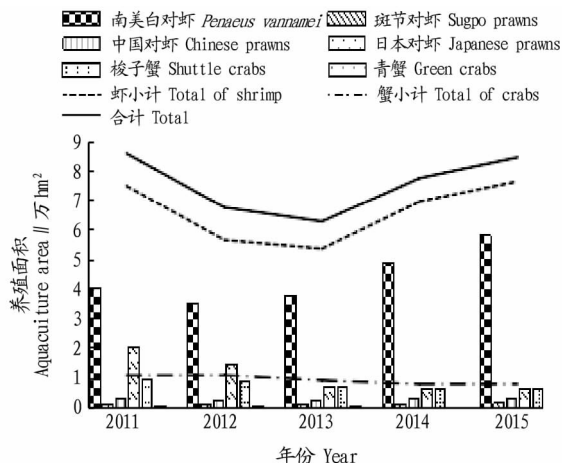


图4 “十二五”期间山东省主要海水虾蟹类养殖面积

Fig. 4 Aquaculture areas of shrimp and crab breeding in the sea in “12th Five-Year” of Shandong Province

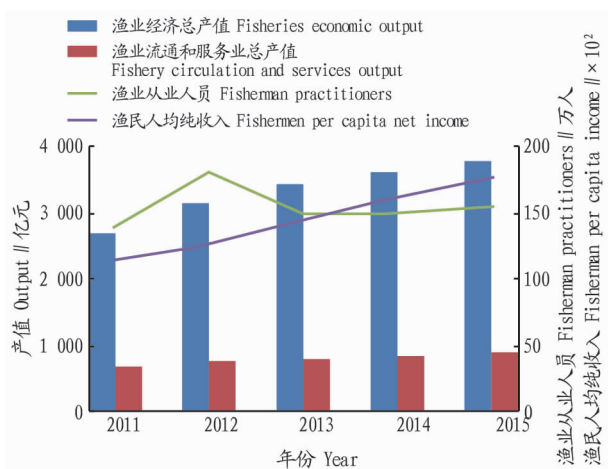


图5 “十二五”期间山东省渔业产业情况

Fig. 5 Fishery industry in “12th Five-Year” of Shandong Province

济利益损失。

山东省虾蟹类主导品种南美白对虾无论是海水养殖还是淡水养殖,均表现出较好的发展态势,养殖面积进一步增

(上接第80页)

- [4] 马立芝,郭李平,邱业峰. 副溶血弧菌的致病机制[J]. 生物技术通讯, 2013, 24(6): 871-876.
- [5] 苏清华,章红红,傅慧琴,等. 副溶血性弧菌 160 株血清群型分布和耐药性分析[J]. 上海预防医学, 2012, 24(3): 135-138.
- [6] 林佳琪,苏国成,黄建伟,等. 四重 PCR 检测副溶血性弧菌及其毒力基因方法的建立[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2521-2529.

大,养殖积极性得到提高,总产量也稳步提升,供应相对饱和。蟹类养殖情况复杂,海水蟹类养殖情况良好,养殖产量、面积趋于稳定,淡水蟹类即河蟹产量下降趋势明显,2014年因干旱等天气因素河蟹年产量同期下降35.1%,养殖模式较为粗放,河蟹养殖量质齐下,与江苏省、湖北省、安徽省等河蟹主产区存在较大差距。

4.2 展望 总结“十二五”期间山东省虾蟹类养殖的经验,“十三五”时期山东省虾蟹类养殖产业发展应注重以下几个方面:渔业发展继续坚持稳中求进的总基调,坚持稳增长、防风险的原则,努力推动产业提质增效、持续健康向好发展;积极学习滨州市等养殖高产区的成功经验,结合各地区养殖实际,改良养殖设施和模式,努力恢复增产,促进省内多种水产品种增质增效;继续加大良种选育工作投入,选育具有生长速度快、适合高密度养殖、抗病能力强等优良性状的虾蟹类新品种,面向全省进行示范推广,使优良种质资源在山东省得到良好的保存与开发利用;积极学习外省养殖河蟹的成功经验,深入分析河蟹养殖过程中存在的问题,改善养殖技术和措施,争取量质齐发展,改善河蟹养殖落后现状;遵循“预防大于治疗”原则,推广绿色生态养殖技术,选用微生态制剂或免疫新技术有效预防疾病,减少药残药害。改良养殖模式,提高机械化、自动化程度,实现工业化养殖,增产增效,形成科学化、规范化和标准化生产。

参考文献

- [1] 张高静,韩丽萍,孙剑锋,等. 南美白对虾营养成分分析与评价[J]. 中国食品学报, 2013, 13(8): 254-260.
- [2] 何杰,吴旭干,龙晓文,等. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)野生和养殖蟹种对池塘养殖成蟹可食率和营养品质的影响研究[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(1): 140-150.
- [3] 周刚,周军. 我国河蟹产业现状及可持续发展对策[J]. 中国水产, 2011(2): 11-12.
- [4] 虞为,李卓佳,朱长波,等. 我国对虾生态养殖的发展现状、存在问题与对策[J]. 广东农业科学, 2011, 38(17): 168-171.
- [5] 张培玉,孙淑斌. 山东省沿海蟹类的习性及其分布[J]. 国土与自然资源研究, 2001(1): 57-58.
- [6] 山东省海洋与渔业厅. 山东渔业统计年鉴 2011-2015[M]. 济南:海洋与渔业厅, 2012-2016.
- [7] 许振国,杨月伟. 山东省虾类资源与养殖现状研究[J]. 资源开发与市场, 2007, 23(10): 930-932.
- [7] KIM Y B, OKUDA J, MATSUMOTO C, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene [J]. Journal of clinical microbiology, 1999, 37(4): 1173-1177.
- [8] KLEIN S L, GUTIERREZ WEST C K, MEJIA D M, et al. Genes similar to the *Vibrio parahaemolyticus* virulence-related genes *tdh*, *tlh* and *vsc2C* occur in other *Vibrionaceae* species isolated from a pristine estuary[J]. Applied and environmental microbiology, 2014, 80(2): 595-602.

科技论文写作规范——题名

以最恰当、最简明的词句反映论文、报告中的最重要的特定内容,题名应避免使用不常见的缩略语、首字母缩写词、字符、代号和公式等。一般字数不超过20字。英文与中文应相吻合。英文题名词首字母大写,连词及冠词除外。