

Taqman-探针荧光定量 PCR 鉴定副溶血弧菌方法的建立*

侯兵兵, 陈昌国, 李娜, 赵强元, 陈秋圆, 刘新萍, 董优优

(中国人民解放军海军总医院检验科, 北京 100048)

摘要:目的 建立一种 Taqman 荧光定量 PCR 鉴定副溶血弧菌的方法。方法 以副溶血弧菌标准株(ATCC-VPJS421)和其它常见致病菌标准株为研究对象,通过 Gene Bank 获取 toxR 基因的序列,采用生物信息学软件设计特异性 PCR 引物及 Taqman 探针,在 SLAN 96P 荧光定量 PCR 仪进行扩增检测,评价该检测方法的特异度和灵敏度。结果 ①设计的引物能够扩增出特异性条带;②扩增体系中 0.5 μ l 探针的扩增效果优于 1.0 μ l 探针;③Taqman-探针荧光定量 PCR 检测方法对副溶血弧菌 toxR 基因的检测灵敏度为 10^{-1} mg/L;④在检测粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、腐生葡萄球菌、霍氏肠杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、梅氏弧菌和弗尼斯弧菌等 10 种常见致病菌时未出现阳性扩增,特异度为 100%。结论 成功建立 Taqman 探针荧光定量 PCR 鉴定副溶血弧菌的方法,该方法特异度、灵敏度均较好,适用于副溶血弧菌的快速检测,具有良好的应用价值。

关键词: Taqman-探针;荧光定量 PCR;副溶血弧菌;toxR 基因

中图分类号:R503;R378.3 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)01-040-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.01.010

Establishment of a Method for the Identification of *Vibrio Parahaemolyticus* by Taqman-Probe Fluorescence Quantitative PCR Analysis

HOU Bing-bing, CHEN Chang-guo, LI Na,

ZHAO Qiang-yuan, CHEN Qiu-yuan, LIU Xin-ping, DONG You-you

(Department of Clinical Laboratory Navy General Hospital PLA, Beijing 100048, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for the identification of *Vibrio parahaemolyticus* based on Taqman-fluorescence probe quantitative PCR method targeting toxR gene. **Methods** Taking the standard strain of *Vibrio parahaemolyticus* (VPJS421) and other common pathogenic bacteria' standard strain as the research object, using the bio-software to design specific PCR primers and Taqman probe of *Vibrio parahaemolyticus* toxR gene and detected by fluorescence quantitative PCR instrument. **Results** ①The designed primers could amplify specific bands. ②The amplification efficiency of the 0.5 μ l probe in the amplification system was better than that of the 1.0 μ l probe. ③The detection sensitivity of toxR gene of *Vibrio parahaemolyticus* by Taqman fluorescence quantitative PCR was 10^{-1} mg/L. ④The detection method did not show positive amplification in detection of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Saprophytic staphylococcus*, *Enterobacter hormaechei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio metschnikovii* and *Vibrio furnissii* 10 other common pathogenic bacteria. The specificity was 100%. **Conclusion** The fluorescence quantitative PCR method for the identification of *Vibrio parahaemolyticus* was successfully established. The method was sensitivity and specificity, and it is suitable for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* and has a good application value.

Keywords: taqman fluorescence probe; fluorescence quantitative PCR; *vibrio parahaemolyticus*; toxR gene

副溶血弧菌(*vibrio parahaemolyticus*, VP)于 1953 年最早发现于日本并于 1963 年正式命名^[1],该菌具有较强的嗜盐性^[2],对人主要引起食物中毒、急性肠炎,少数情况下可引起败血症^[3~5]。与沙门菌和志贺菌类似,副溶血弧菌通过食源性途径引起的中毒事件受到广泛关注^[6,7]。在我国广东省,副溶血弧菌导致食源性疾病疫情发生率为 29.22%,是沿海地区主要的食源性致病菌之一^[8]。

副溶血弧菌根据其血清型可分为非致病性菌株和致病性菌株,其中高致病性血清型共有 14 种^[1]。耐热直接溶血素(thermostable direct he-

molysin, TDH)基因和 TDH 相关溶血素(TDH-related hemolysin, TRH)基因是检测副溶血弧菌的常见分子靶点^[9,10],但有报道指出副溶血弧菌分离株中 TDH 基因和 TRH 基因有缺失的现象,会造成假阴性结果。副溶血弧菌毒素调控基因(toxin regulations, toxR)是近年来在副溶血弧菌中新发现的毒素调控基因,与副溶血弧菌的致病性有着密切关系,且在弧菌中同源性较低。在本次研究中,我们针对 toxR 基因相对保守区设计荧光定量引物和 Taqman-荧光探针,建立 Taqman-探针荧光定量 PCR 检测副溶血弧菌的方法,结果报道如下。

* 作者简介:侯兵兵(1992-),男,大学本科,技师,主要从事病原微生物快速检测方法研究,E-mail:798557114@qq.com。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 本实验使用的菌株包括:副溶血弧菌 ATCC-VPJS421,溶藻弧菌 ATCC-17749,创伤弧菌 ATCC-CMCP6,梅氏弧菌 ATCC-Vm8,弗尼斯弧菌 ATCC-Vfns1,粪肠球菌 ATCC-29212,金黄色葡萄球菌 ATCC-25293,腐生葡萄球菌 ATCC-BAA750,霍氏肠杆菌 ATCC-700323,铜绿假单胞菌 ATCC-27853,大肠埃希氏菌 ATCC-25922,菌株均为本科室保存。

1.2 仪器与试剂 荧光定量 PCR 仪为上海宏石公司 SLAN-96P real time PCR System 生产,SYBR[®]Green QPCR Master Mix 购自天根生物科技有限公司;引物及 Taqman 探针由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成,按照引物合成单要求进行后期处理。

1.3 方法

1.3.1 细菌核酸粗提物制备:将菌种从-80℃冰箱取出后置 37℃ 水浴快速复温,复温后的菌种保存液接种在硫代硫酸盐柠檬酸盐蔗糖琼脂培养基(thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium, TCBS)和哥伦比亚血平板上,置 37℃ 孵箱培养 12 h。用无菌接种环取适量细菌至 1.5 ml 离心管中,加入 100 μl 核酸裂解液后室温裂解 15 min,100℃ 恒温金属浴加热 10 min,室温 13 000 r/min 离心 5 min(离心半径=9.5 cm),取上清作为模板。

1.3.2 引物及 Taqman-探针设计:在 NCBI 网站输入基因名称获取基因序列,运用生物软件 Beacon Designer 7 和 Primer Premier 5.0 进行荧光定量 PCR 引物及 Taqman 荧光探针设计,探针 5'端标记 ROX,3'端标记 BHQ2。上游引物:5'-CGCTTTCTTCAGACTCAA-3',下游引物:5'-CAAGGATTACAGCAGAA-3',荧光探针:ROX-CCTGCTTCTGATAACAATGACGCC-BHQ2。

1.3.3 PCR 反应体系及扩增条件:取 1 μl 提取液上清为模板,以 toxR 特异性引物及 Taqman-探针进行荧光定量 PCR 检测。PCR 反应体系为:2× Mix 10 μl,引物对 1 μl,Taqman-探针 0.5 μl,模板 1 μl,ddH₂O 7.5 μl。PCR 反应条件为:95℃ 5 min;94℃ 20 s~62℃ 30 s 收集荧光,40 个循环。

1.3.4 引物浓度的优化:上下游引物浓度分别配置成 20,15,10 nmol/L 工作液进行荧光定量 PCR 检测,扩增条件同前。

1.3.5 探针浓度的优化:合成的荧光探针按照合成单要求加入 ddH₂O 配成母液,然后取 5 μl 探针母液至 95 μl ddH₂O 中作为工作液。在 20 μl PCR

反应体系中分别加入 1,0.5 μl 荧光探针,扩增条件同前。

1.3.6 特异度评价:以优化后的反应体系检测副溶血弧菌标准菌株及其他 10 种细菌的标准株。

1.3.7 灵敏度评价:以副溶血弧菌标准菌株系列浓度梯度为模板($10^2 \sim 10^{-4}$ mg/L),每个浓度梯度取 1 μl 核酸为模板,以优化后的反应体系和反应条件进行荧光定量 PCR。以出现典型扩增曲线并在循环数内出现 Ct 值为阳性。

2 结果

2.1 实验参数的优化

2.1.1 引物浓度的优化:经过多次实验引物最佳浓度约为 10 nmol/L,经 2 g/dl 凝胶电泳显示引物二聚体较少且扩增效率能够满足实验要求,见图 1。

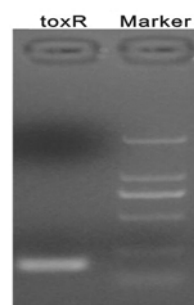


图1 PCR产物 2 mg/dl 凝胶电泳图

2.1.2 探针浓度的优化:实验结果显示,20 μl PCR 反应体系中加入 0.5 μl 荧光探针的反应曲线较体系中加入 1 μl 荧光探针的效果更好,这之前研究结果一致^[11],见图 2。因此,优化后的副溶血弧菌 Taqman-探针荧光定量 PCR 反应条件为:20 μl 体系(ddH₂O 7.5 μl,2× Mix 10 μl,模板 1 μl,引物对 1 μl,探针 0.5 μl)。95℃ 5 min;94℃ 20 s~62℃ 30 s 收集荧光,40 个循环。

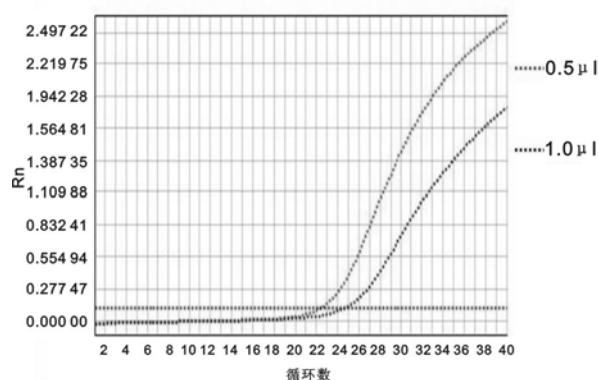


图2 不同浓度的探针 PCR 扩增曲线

2.2 Taqman-探针荧光定量 PCR 反应体系评价

2.2.1 特异度评价:用优化后的反应体系检测副溶血弧菌标准菌株及其他 10 种细菌的标准菌株,以副溶血弧菌的标准菌株为阳性对照。结果除副

溶血弧菌标准株阳性扩增外,其它10种细菌标准株均无阳性扩增。因此,该方法的特异度为100%。见图3~图4。

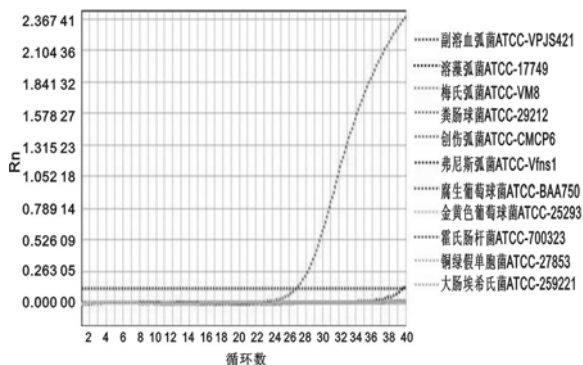
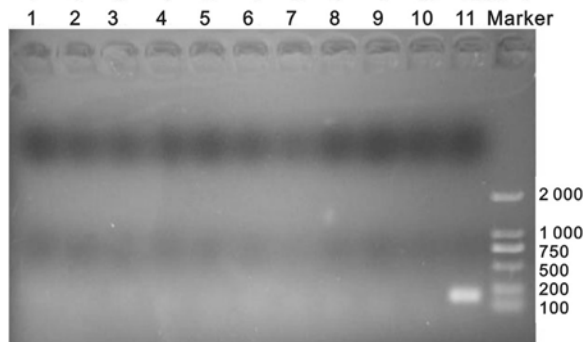


图3 副溶血弧菌标准株与其他10种细菌PCR扩增曲线



注:1. 溶藻弧菌 ATCC-17749;2. 创伤弧菌 ATCC-CMCP6;3. 梅氏弧菌 ATCC-Vm8;4. 弗尼斯弧菌 ATCC-Vfns1;5. 粪肠球菌 ATCC-29212;6. 金黄色葡萄球菌 ATCC-25293;7. 腐生葡萄球菌 ATCC-BAA750;8. 霍氏肠杆菌 ATCC-700323;9. 铜绿假单胞菌 ATCC-27853;10. 大肠埃希氏菌 ATCC-25922;11. 副溶血弧菌 ATCC-VPIJ5421。

图4 副溶血弧菌 Taqman-探针荧光定量PCR特异度检测

2.2.2 灵敏度评价:以副溶血弧菌标准株核酸系列稀释样本为模板进行荧光定量PCR,当模板浓度为 $10^2 \sim 10^{-1}$ mg/L时,每个浓度均有典型扩增曲线,当模板浓度为 $10^{-2} \sim 10^{-4}$ mg/L时,每个浓度未出现典型扩增曲线。所以,本研究建立的方法对副溶血弧菌 toxR 基因的检测灵敏度为 10^{-1} mg/L,有较好的检测灵敏度。见图5。

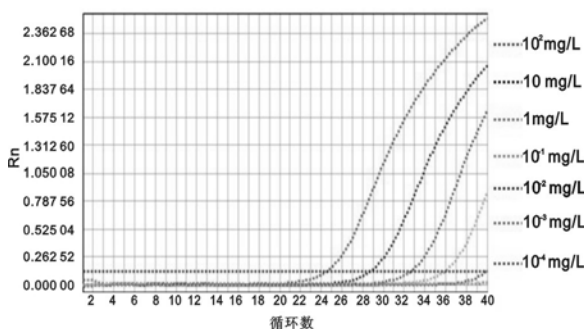


图5 副溶血弧菌(ATCC-VPIJ5421) Taqman-探针荧光定量PCR灵敏度检测

3 讨论 近年来,随着生物化学、免疫学、微生物

学、分子生物学技术的快速发展,目前已经有很多技术用于副溶血弧菌的检测,如细菌培养法、培养基显色法、血清学分型鉴定^[12]、酶联免疫吸附试验(ELISA)^[13]、电化学发光技术^[14]、免疫荧光技术^[15,16]、免疫印迹^[17]、常规PCR, RAPD-PCR, PCR-ELISA, SYBRGreen 荧光定量PCR和多重PCR等。然而,常规分离鉴定操作复杂、费时,不能做到早期诊断;免疫学方法其灵敏度和特异度受限且影响因素较多;常规PCR, RAPD-PCR, PCR-ELISA和多重PCR技术均不能进行定量分析,扩增完仍需凝胶电泳进行鉴定,操作繁琐,同时扩增产物易被污染造成假阳性^[12]。Taqman-探针荧光定量PCR技术是在普通荧光定量PCR基础上加入一条特异的荧光探针,具有更高的特异度^[11]。

副溶血弧菌 TDH 基因、TRH 基因、gyrB (DNA 回旋酶 B 亚单位) 基因以及 16S rRNA 等都曾被用做副溶血弧菌检测的分子靶点。其中 16S rRNA 基因保守性极强,其分化程度不够,在鉴定亲缘关系较近的物种间容易出现假阳性;而 TDH 基因和 TRH 基因在引起食物中毒的副溶血弧菌分离株中约 30.77% 副溶血弧菌为阴性^[18]。toxR 基因由国外学者近年来在副溶血性弧菌中新发现的致病基因,它在弧菌科内序列非常保守,可表达于所有副溶血弧菌中^[2],并且不同的弧菌种间 toxR 基因同源性较低^[19]。因此,采用副溶血弧菌 toxR 基因作为检测靶点比 tdh 基因、trh 基因和 gyrB 基因及 16S rRNA 具有明显的优势。

本研究针对副溶血弧菌 toxR 基因设计特异性引物与 Taqman-探针,建立和优化了实时荧光定量PCR反应体系,并对该体系检测特异度和灵敏度进行了评价,检测时间仅需要 50 min。2 mg/dl 凝胶电泳结果显示,我们设计的引物不但能够扩增出特异性的条带,并且反应完成后引物二聚体较少,能够满足后续添加 Taqman-探针的实验要求;在进行探针浓度优化时,20 μ l PCR 反应体系中添加 0.5 μ l 荧光探针的 Ct 值较添加 1.0 μ l 荧光探针的 Ct 值小且本底荧光较低,能满足实验要求。本研究建立的实时荧光定量PCR反应体系经过上述优化后为评价该检测系统的特异度和灵敏度,我们采用该反应体系对副溶血弧菌标准株及其它10种常见细菌标准株进行检测,仅副溶血弧菌产生阳性扩增,显示出良好的特异度。为进一步探求该反应体系的检测灵敏度,我们将副溶血弧菌标准株核酸定量后进行系列稀释(浓度范围为: $10^2 \sim 10^{-4}$ mg/L),发现在核酸浓度为 10^{-1} mg/L时能够产生稳定扩增,而 10^{-2} mg/L时无稳定扩增,提示该反应体系的检测灵敏度为 10^{-1} mg/L。

综上所述,本研究建立的 Taqman-探针荧光定量 PCR 技术与常规分离培养、常规 PCR 以及免疫学方法相比,特异度和灵敏度高、检测速度快(检测仅需要 50min),适用于副溶血弧菌的快速检测,在副溶血性弧菌诊断上将具有良好的应用前景和应用价值。

参考文献:

- [1] 韩艳青,侯凤伶,张淑红,等.基于多重 PCR 的副溶血弧菌大流行菌群及其毒力基因检测方法的建立与评价[J]. 疾病监测,2016,31(9):750-754.
Han YQ, Hou FL, Zhang SH, et al. Establishment and evaluation of a novel multiplex PCR assay in detection of pandemic group of *vibrio parahaemolyticus* and toxic genes[J]. Disease Surveillance, 2016, 31(9): 750-754.
- [2] Chen S, Ge B. Development of a toxR-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Vibrio parahaemolyticus* [J]. BMC Microbiology, 2010, 10(41):1-9.
- [3] Zhang L, Orth K. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. Curr Opin Microbiol, 2013, 16(1):70-77.
- [4] Whitaker WB, Parent MA, Boyd A, et al. The *Vibrio parahaemolyticus* ToxRS regulator is required for stress tolerance and colonization in a novel orogastric streptomycin-induced adult murine model[J]. Infect Immun, 2012, 80(5):1834-1845.
- [5] Pan J, Chen R, Li C, et al. Global analysis of protein lysine succinylation profiles and their overlap with lysine acetylation in the marine bacterium *vibrio parahaemolyticus*[J]. J Proteome Res, 2015, 14(10):4309-4318.
- [6] 周方满,谢红意,叶鸿雁,等.临床来源副溶血弧菌毒力基因及耐药性分析[J]. 现代实用医学,2016,28(7):949-950.
Zhou FM, Xie HY, Ye HY, et al. Virulence genes and resistance analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from clinical sample[J]. Modern Practical Medicine, 2016, 28(7):949-950.
- [7] Wu S, Wang Y, Duan N, et al. Colorimetric aptasensor based on enzyme for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(35):7849-7854.
- [8] 张冬生,王铁强,辜洁妮,等.广东省 2007~2011 年食物中毒事件流行病学特征分析[J]. 华南预防医学, 2013, 39(3):74-76.
Zhang DS, Wang TQ, Gu JN. Epidemiological analysis on food poisoning in Guangdong 2007~2011 [J]. South China J Prev Med, 2013, 39(3):74-76.
- [9] Gutierrez West CK, Klein SL, Lovell CR, et al. High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary [J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(7):2247-2225.
- [10] Li L, Wong HC, Nong W, et al. Comparative genomic analysis of clinical and environmental strains provides insight into the pathogenicity and evolution of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1):1135.
- [11] 陈昌国,侯兵兵,陈秋园,等. Taqman-探针荧光定量 PCR 鉴定溶藻弧菌方法的建立[J]. 实用检验医师杂志, 2017, 9(1):1-4.
Chen CG, Hou BB, Chen QY, et al. Establishment of a method for the identification of *Vibrio parahaemolyticus* by Taqman-Probe fluorescence quantitative PCR analysis[J]. Chin J Clin Pathol, 2017, 9(1):1-4.
- [12] 张倩华. 副溶血性弧菌实验室检测研究进展[J]. 吉林医学, 2014, 35(25):5720-5721.
Zhang QH. Research progress on the detection methods of the *vibrio parahaemolyticus* [J]. Jilin Medical Journal, 2014, 35(25):5720-5721.
- [13] Khawsuk W, Soonklang N, Grams R, et al. Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant glutathione S-transferase (GST) of *Fasciola gigantica*[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2002, 20(4):257-266.
- [14] Sun W, Zhang Y, Ju X, et al. Electrochemical deoxyribonucleic acid biosensor based on carboxyl functionalized graphene oxide and poly-L-lysine modified electrode for the detection of *tlh* gene sequence related to *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Anal Chim Acta, 2012, 752(21):39-44.
- [15] Wang L, Zhang J, Bai H, et al. Specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* by fluorescence quenching immunoassay based on quantum dots[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 173(5):1073-1082.
- [16] Yi MY, Ling L, Neogi SB, et al. Real time loop-mediated isothermal amplification using a portable fluorescence scanner for rapid and simple detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Control, 2014, 41(1):91-95.
- [17] Sakata J, Kawatsu K, Iwasaki T, et al. Production and characterization of a novel monoclonal antibody against *Vibrio parahaemolyticus* F0F1 ATP synthase's delta subunit and its application for rapid identification of the pathogen[J]. J Microbiol Methods, 2012, 88(1):77-82.
- [18] 骆艳婷,梁景涛,陈爱贞,等. 佛山市副溶血弧菌病原学与分子流行病学特征[J]. 热带医学杂志, 2016, 16(5):677-680.
Luo YT, Liang JT, Chen AZ, et al. Etiology and molecular epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* in Foshan [J]. Journal of Tropical Medicine, 2016, 16(5):677-680.
- [19] 黄晨阳,于龙,兰智杰,等. 基于 *toxR* 基因的 PCR 检测副溶血性弧菌的方法建立[J]. 河南预防医学杂志, 2013, 24(5):327-330.
Huang CY, Yu L, Lan ZJ, et al. Development of a toxR-based PCR assay for detecting *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Henan Journal of Preventive Medicine, 2013, 24(5):327-330.

收稿日期:2017-08-23

修回日期:2017-09-24