

用 PCR 方法快速检测水产品中的副溶血弧菌 *

寇运同¹ 马洪明² 刘晨光²

(¹ 青岛出入境检验检疫局食品实验室 266002)

(² 青岛海洋大学 266003)

提要 建立了水产品中副溶血弧菌快速、敏感、特异的 PCR 检测方法。选择的引物具有良好的副溶血弧菌的种特异性。对人工污染在冷冻水产品中副溶血弧菌的检测低限是 12 ~ 21 CFU/10 g, 对其增菌液的检测低限是 7 600 ~ 9 100 CFU/ml, 每 PCR 反应体系的检测低限为 91 ~ 109 CFU。对 400 份自然污染样品的检测结果显示, PCR 方法的检测结果同常规培养法的结果完全相符。

关键词 水产品, 副溶血弧菌, PCR, 检测

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)是海洋和盐湖中分布广泛的一种嗜盐性病原菌,进出口水产品检验的重要项目。流行的副溶血弧菌检测方法——培养法操作繁杂、检验周期长,需 7d 以上才能报告结果,给副溶血弧菌的检测和研究带来不便,作者探索了用 PCR 技术快速检测水产品中副溶血弧菌的方法。已有类似报道多集中在实验室方法探索上^[1-5],真正从实用的角度对水产品中副溶血弧菌的 PCR 检测方法研究鲜有报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 标准菌株购于北京药品生物制品检定所或由青岛海洋大学徐怀恕教授惠赠。

1.1.2 试剂 Taq DNA 聚合酶, dNTPs, ϕ x 174/HaeIII Marker, TAKARA 公司; Tris base, SDS, Promega 公司; 100bp DNA Ladder, Loading Buffer, MBI 公司; EB, Sigma 公司。PCR 引物根据国外文献^[4,5]设计合成: Vp-1: 5' - CGGCGTGGGTGTTTCGGTAGT - 3' (21 mer); Vp-2: 5' - TCCGCTTCGCGCTCATCAATA - 3' (21 mer)。

1.1.3 仪器 PCR 仪, MJ 公司; 数码成像系统, KODAK 公司; 超纯水发生器, Millipore 公司。

1.1.4 样品 水产品由市场购得。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养 取经改进 APW (APW, 加 NaCl 至 2%, 葡萄糖至 1%) 活化的副溶血弧菌菌液 0.2 ml 污染副溶血弧菌阴性的鲑鱼, 冷冻 2 d, 均匀取 10g 加入到 SPB 中培养 18 h, 取上层液备用。其他弧菌增菌用改进 APW, 纯培养用 TCBS, 培养温度为 28 °C。其他菌种的前增菌和纯培养分别用营养肉汤和营养琼脂, 培养温度为 37 °C。

1.2.2 模板 DNA 制备 (1) CTAB-酚氯仿法: 参照 Fredrick. M. 方法^[2]。(2) 高盐法: 参照 Chartier F. 1992 年的方法进行。(3) 浓缩裂解法: 1.2 ml 增菌液 8 000 r/min, 2 min 离心得菌体, 弃净上清。用 100 μ l TE 重悬, 100 °C 水浴裂解 5 min, 8 000 r/min, 2 min 离

* 国家出入境检验检疫局科学研究与技术开发重点基金 K9514 号。

第一作者: 寇运同, 出生于 1969 年, 理学硕士, 工程师。在研课题: 国家出入境检验检疫行业标准“进出口食品中副溶血弧菌的检验方法”(B027-1999); 国家出入境检验检疫行业标准“进出口食品中耐热大肠菌群的检验方法”(B040-2000)。通信地址: 266002, 青岛市瞿塘峡路 70 号青岛出入境检验检疫局食品实验室 电话: (0532) 2679567-6137, E-mail: ksmart@public.qd.sd.cn

收稿日期: 2001-01-21; 修回日期: 2001-05-15

心取上清备用。(4)直接裂解法:1.2 ml 增菌液,100 ℃水浴裂解 5 min,8 000 r/min,2 min 离心取上清备用。

1.2.3 PCR 扩增反应 反应体系:模板 DNA 0.5 μl,引物各 0.2 μmol/L, dNTPs 各 0.2 mmol/L, Taq 酶 2 U, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, Tris-HCl (pH9.0) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, 总体积 50 μl。循环参数:94 ℃变性 3 min 后进入循环程序:94 ℃, 20 s; 52 ℃, 20 s; 72 ℃, 15 s; 35 循环; 72 ℃, 5 min 延伸补足。

1.2.4 电泳检测 用 0.5 × TBE 缓冲液配制 1.7 % 琼脂糖凝胶, EB 终浓度为 0.5 μg/ml。将 PCR 扩增产物与 Loading Buffer 混合, 各上样 3 μl, 5 V/cm 电泳 45 min。用紫外透射检测仪检测电泳结果, KODAK 数码成像系统拍摄、分析电泳结果。

1.2.5 新建 PCR 方法的特异性、灵敏度测定 将副溶血弧菌实验菌株污染于水产品中, 冷冻 5 d 后均质, 取 10g 增菌后做 PCR 检测。

1.2.6 常规生化法检测副溶血弧菌 参照 SNO173-92。

2 结果与分析

2.1 方法建立

2.1.1 成功扩增出特异性片段 选择 *gyrB* 基因作为靶基因, 用设计引物成功扩增出了特异电泳带, 该带大小介于 100 bp DNA Ladder 的 200 bp 与 300 bp 片段之间且靠近 300 bp 片段, 经 KODAK 数码成像系统计算, 其大小为 284.9 bp, 与文献报道其大小为 285 bp^[4]相符。

2.1.2 不同 DNA 制备方法比较 本研究比较了 4 种用于 PCR 扩增的 DNA 样品的制备方法, 扩增结果如图 1 所示。4 种方法制备的 DNA 均可用于 PCR 扩增, CTAB-酚氯仿法和高盐法的扩增结果无明显差别, 浓缩裂解法、直接裂解法的扩增量逐渐下降。以下实验均采用了简便高效的高盐法。

2.1.3 PCR 参数选择 根据算出的 T_a 设计验证试验, 结果如图 2 所示。副溶血弧菌的最佳退火温度为 55 ℃。为了减少非特异性产物和引物二聚体的出现, 选用了较低的 Mg^{2+} 浓度 (1.5 mmol/L)、dNTP 浓度 (0.2 mmol/L) 和引物浓度 (0.2 μmol/L)。

2.2 方法验证

2.2.1 特异性 用新建 PCR 方法对副溶血弧

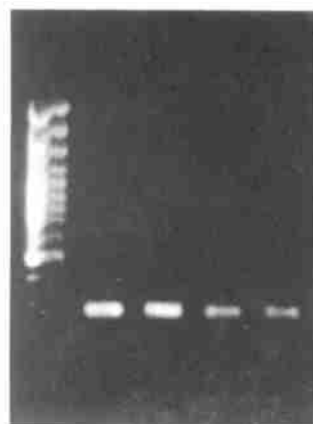


图 1 副溶血弧菌不同样品制备方法的扩增结果
左起: 100 bp DNA Ladder; CTAB-酚氯仿法; 高盐法; 浓缩裂解法; 直接裂解法。

Fig.1 PCR products of *Vibrio parahaemolyticus* from different methods of sample preparation



图 2 副溶血弧菌不同退火温度的扩增结果
左起: 100bp DNA Ladder; $T_a = 52\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_a = 53.5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_a = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_a = 57.5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_a = 59\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

Fig.2 PCR products of *Vibrio parahaemolyticus* from different annealing temperature

菌及其近源株、远源株进行了检测, 结果如表 1 所示, 电泳图谱如图 3、4 所示。新建方法对 19 株副溶血弧菌不论何种血清型都能检出, 电泳图谱上有特征性的 285 bp 片段出现, 而对非副溶血弧菌无论近源还是远源都不能检出, 电泳图谱上没有特征性的 285 bp 片段出现。

2.2.2 灵敏度 为了评价 PCR 方法对实际污染样品的检测灵敏度, 选取的两株副溶血弧菌分别经

表 1 样品中副溶血弧菌标准菌株,近源及远源标准菌株的扩增结果

Tab.1 PCR products of the standard strains of *Vibrio parahaemolyticus* and the standard kindred and distant strains in samples

菌名	菌号	扩增结果
副溶血性弧菌	ATCC33844	+
副溶血性弧菌	ATCC17802	+
副溶血性弧菌	ATCC17803	+
副溶血性弧菌	ATCC12093	+
副溶血性弧菌	ATCC12094	+
副溶血性弧菌	20553	+
副溶血性弧菌	20516	+
副溶血性弧菌	20571	+
副溶血性弧菌	20556	+
副溶血性弧菌	20556(s.1 k61)	+
副溶血性弧菌	1211(u)	+
副溶血性弧菌	20002	+
副溶血性弧菌	自备	+
副溶血性弧菌	自备	+
副溶血性弧菌	自备	+
副溶血性弧菌	自备	+
副溶血性弧菌	自备	+
副溶血性弧菌	自备	+
副溶血性弧菌	自备	+
河弧菌		-
辛辛那提弧菌		-
弗尼斯弧菌		-
费氏弧菌		-
霍利斯弧菌		-
少女鱼弧菌		-
梅式弧菌		-
霍乱弧菌非 O1		-
创伤弧菌		-
溶藻弧菌		-
鳗弧菌		-
梅氏弧菌		-
拟态弧菌		-
粪链球菌		-
大肠杆菌 O157		-
肠炎沙门氏菌		-
伤寒沙门氏菌		-
单增李斯特菌		-
嗜水气单胞菌		-
枸橼酸杆菌		-

注: +,PCR 扩增产物的电泳图谱上有特征性片段出现;- ,PCR 扩增产物的电泳图谱上没有特征性片段出现。

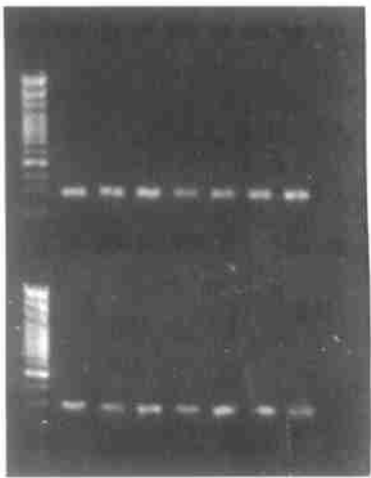


图 3 样品中副溶血弧菌标准菌株的扩增结果
上排左起: 100 bp DNA Ladder; *V. parahaemolyticus*; ATCC33844; ATCC17802; ATCC17803; LMG12093; LMG12094; 20553; 20516; 下排左起: 100bpDNA Ladder; *V. parahaemolyticus* 20571(s.1); 20556; 20556(s.1 k61); 1211(u); 20002; 自备株; 自备株。

Fig.3 PCR products of the standard strains of *Vibrio parahaemolyticus* in samples



图 4 样品中副溶血弧菌近源株及远源菌株的扩增结果
上排左起: 100bp DNA Ladder; *V. cholerae* nonLMG- O1; 自备株; *V. vulnificus*; *V. alginolyticus*; *V. anguillarum*; *V. mimicus*; *V. fluvialis*; *V. cincinnatiensis*; 阳性对照; 下排左起: 100bp DN *V. fischeri*; *V. holisae*; *V. metschnikovi*; *V. damsela*; *E. faecalis*; *E. coli*; *S. enteritidis*; 阳性对照。

Fig.4 PCR products of the standard strains of *Vibrio parahaemolyticus* and the standard kindred and distant strains in samples

APW,28 ℃培养 24 h,取 1 ml 至 10 ml APW 中 28 ℃

培养 2 h, 取 1 ml 培养液做 10 倍梯度稀释, 取适当稀释液用 TCBS 做菌落计数, 同时取 1 ml 稀释液污染样品, 冷冻 5 d 后增菌做 PCR 检测, 结果见表 2。样品增菌液做梯度稀释后做培养计数和 PCR 检测, 结果见表 3。新建方法对水产品中副溶血弧菌的检测低限是 12 ~ 21 CFU/ 10 g, 对其增菌液的检测低限是 7 600 ~ 9 100 CFU/ ml, 每 PCR 反应体系的检测低限为 91 ~ 109 CFU, 达到了国外文献报道水平^[3]。

表 2 PCR 方法检测不同样品中副溶血弧菌的灵敏度
Tab.2 Sensitivity of detection for *Vibrio parahaemolyticus* in different samples by PCR

样品	PCR 低限(CFU/ g)	
	副溶血弧菌	副溶血弧菌
	ATCC33844	L MGI 2093
鳕鱼片	1 .5	1 .3
马哈鱼片	1 .7	1 .2
蛤蜊肉	2 .1	1 .8

表 3 样品中副溶血弧菌增菌液的 PCR 检测低限
Tab.3 Limit to detection for the enrichment solution of *Vibrio parahaemolyticus* in samples by PCR

菌 种	菌液浓度低限	
	(CFU/ ml)	每反应体系中的菌数(CFU)
副溶血弧菌 ATCC33844	9 100	109
副溶血弧菌 L MGI 2093	7 600	91

2.2.3 新建方法与常规法比较: 分别用新建方法和常规培养法对 400 份水产品进行平行比对检测, 结果如表 4 所示。两者的检测结果完全一致, 说明新建方法用于食品中单增李氏菌的检测, 结果准确、可靠。

表 4 常规培养法与 PCR 法检测水产品中副溶血弧菌的比较试验

Tab.4 The comparison between PCR and the method of routine culture detecting *Vibrio parahaemolyticus*

样品名称	样品数	PCR 阳性数	常规法阳性数	符合率
				(%)
鳕鱼片	120	1	1	100
鲈鱼片	80	1	1	100
马哈鱼片	80	0	0	100
蛤蜊	80	2	2	100
文蛤	40	0	0	100

3 讨论

3.1 水产品中副溶血弧菌 PCR 检测方法的建立

选择合适的用于扩增检测的基因是保证 PCR 方法特异性的关键。检测副溶血弧菌采用的是 *gyrB* 基因, 扩增片段为 285 bp。扩增结果显示, 该片段具有较好的特异性。本文通过选择低引物浓度、高退火温度、低镁离子浓度、低 dNTP 浓度等措施, 保证了方法本身的高特异性和可靠性。由于新建 PCR 方法在方法设计上对特异性做了充分考虑, 在应用中出现假阳性的可能可不予考虑。

新建 PCR 方法可以检出菌液中 7 600 ~ 9 100 CFU/ ml 或 91 ~ 109 CFU/ 反应体系, 即使目的菌含量很低的样品经过增菌后, 都可以达到这一浓度, 保证了方法的高灵敏度。从另一个角度来讲, 要注意操作中的人为污染, 特别是增菌前的样品不能污染。

本文通过实验比较, 作者推荐用高盐法制备 DNA。该方法经济、快速, 结果稳定。

3.2 用 PCR 方法检测水产品副溶血弧菌的优越性

用建立的 PCR 方法检测水产品中的副溶血弧菌优越性很多, 最主要的是简便快捷。每一批样品从样品准备到检出只需约 6 h, 如将增菌的时间算在内, 也只需要 24 h, 而常规培养法需要 7 d 以上。

由于用 PCR 方法检测水产品中的副溶血弧菌有着快速、简便的特点, 可以大大缩短检验周期, 降低储存费用, 相对延长产品货架期, 适应了水产品工业和贸易迅速发展的需要, 具有较高的实用和推广价值。

参考文献

1 封幼玲等. 应用 PCR 技术快速检测食品中副溶血弧菌, 中国卫生检验杂志, 1997, 7(4) : 241 ~ 242

2 Fredetick M. Ausubel *et al.*. 颜子颖、王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998。

3 S. Ya ma moto. Cloning and sequencing of the *Vbrio parahaemolyticus* fur gene, *Microbiol Immunol*, 1997, 41(9) : 737 ~ 740

4 K. Venkates waran. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vbrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64(2) : 681 ~ 687

5 J. Okuda. Analysis of the thermostable direct hemolysin (tdh) gene and the tdh - related hemolysin(trh) gene in urease - positive strains of *Vbrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States, *J. Clin. Microbiol.*, 1997, 35 (8) : 1 965 ~ 1 971

(下转封三)

RAPLD DETECTION OF *Vibrio parahaemolyticus* BY PCR METHOD IN SEAFOOD

KOU Yuntong¹ MA Hongming² LIU Chenguang²

(¹ Qingdao Entry Exit Inspection and Quarantine Bureau of P.R.China , 266002)

(² Ocean University of Qingdao ,266003)

Received :Jan .,21 ,2001

Key Word : Seafood, *Vibrio parahaemolyticus* , PCR, Detection

Abstract

We established a rapid, sensitive and specific polymerase chain reaction(PCR) method for detection of *Vibrio parahaemolyticus*(VP) in seafood. The selected primer showing excellent features of VP could be amplified by PCR. Limit to detection for LM in artificially contaminated food was 12 - 21 colony forming units(CFU) per 10g of food ; Limit to the enrichment was 7600 ~ 9100 / ml ; Limit to a PCR reaction system was 91 ~ 109 CFU. 400 nature contaminated seafood samples were detected by both methods , with a completely coincident result. (本文编辑 :刘珊珊)