

论著

PCR 法制备地高辛标记 DNA 探针斑点杂交检测副溶血性弧菌 *tlh* 基因曹小红¹ 朱雪兰¹ 陈 艳² 刘秀梅²

(1. 天津科技大学食品营养与安全重点实验室, 天津 300457;

2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021)

摘 要:目的 建立检测副溶血性弧菌种特异性 *tlh* 基因的斑点杂交方法。方法 采用 PCR 法制备地高辛标记 DNA 探针, 建立斑点杂交条件。杂交反应条件优化如下: 杂交温度 65℃, 杂交时间 9~12 h, 探针使用浓度 100~125 pg/ml。结果 地高辛标记 *tlh* 基因探针长度为 450 bp, 标记产量为 50 µg/ml。探针具有较高的灵敏度和特异性, 可重复使用 4 次。结论 本方法具有快速、简便、高效的特点, 适用于副溶血性弧菌菌株的鉴定。

关键词:弧菌, 副溶血性; DNA 探针; *tlh* 基因; 斑点杂交

Detection of the *tlh* Gene of *Vibrio Parahaemolyticus* by
Dot-blot Hybridization

CAO Xiao-hong, ZHU Xue-lan, CHEN Yan, LIU Xiu-mei

(Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science
and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: **Objective** To establish a dot-blot hybridization method to detect the species-specific *tlh* gene of *Vibrio parahaemolyticus*. **Method** PCR was carried out to prepare the digoxigenin (DIG)-labeled DNA probe, and the dot-blot technique was established subsequently. The dot-blot reaction conditions were optimized as follows: the hybridization was allowed at 65℃ for 9 to 12 h, and the concentration of probe in the final hybridization reaction were from 100 to 125 pg/ml. **Results** The DIG-labeled DNA fragment was 450 bp in length at a concentration of 50 µg/ml. The DNA probe gave high sensitivity, specificity and repeatability. **Conclusion** This method was rapid, simple and effective for the detection of the isolated strains of *V. parahaemolyticus*.

Key words: *Vibrio Parahaemolyticus*; DNA Probe; *tlh*; Dot-Blot Hybridization

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是革兰阴性嗜盐菌, 广泛存在于世界各地近海岸的海水、海底沉积物和海产品中, 是一种重要的食源性致病菌。副溶血性弧菌可引起急性胃肠炎, 甚至原发性败血症, 疾病的发生与生食海产品或交叉污染的食物有关^[1]。国家食源性疾病预防网发现, 沿海省份零售市场海产品的污染较为严重, 副溶血性弧菌食源性感染已成为我国的重要公共卫生问题之一^[2,3]。建立高效的食品中副溶血性弧菌分析方法, 有助于提高病原菌的检出率, 降低食源性副溶血性弧菌感染的发病率, 保障食品安全。目前, 我国国家标准 GB/T 4789.7—2003 仍采用传统的微生物增菌、培养的生化试验方法。已有研究表明, *tlh* 基因存在于所有的副溶血性弧菌中, 可以作为副溶血性弧菌的种特

异性标志物^[4]。为此, 本研究采用 PCR 法制备地高辛 (DIG) 标记 DNA 探针, 在国内率先建立并优化针对副溶血性弧菌 *tlh* 基因的斑点杂交方法, 可以有效地缩短样品检验周期, 减少工作量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC 17802 和 ATCC 33847, 拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*) ATCC 33653, 购自中国科学院微生物研究所。铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 15442, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538, 蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) ATCC 63301, 溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) VA1, 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) O157 H7, 麦氏弧菌 (*Vibrio metschnikovii*), 肠球菌 (*Enterococcus*) 由福建省疾病预防控制中心赠送; 溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) VA2 由本室分离。本研

基金项目: 国家科技部“十一五”攻关项目 (2006BAK02A15)

作者简介: 曹小红 女 教授

通讯作者: 刘秀梅 女 研究员

究从海产品中分离出 42 株可疑菌株,其中副溶血性弧菌 39 株,美人鱼弧菌 (*Vibrio damsela*) 2 株,溶藻弧菌 1 株。

1.1.2 培养基和试剂

胰酪大豆肉汤 (TSB) 为北京陆桥技术有限责任公司产品。PCR DIG 探针合成试剂盒、DIG 核酸检测试剂盒、杂交液、尼龙膜为罗氏公司产品。细菌 DNA 提取试剂盒为 Omega 生物技术公司产品。API 20E 生化鉴定试剂盒为法国生物梅里埃公司产品。

1.1.3 仪器

Biometra PCR 仪,国产电泳仪,Biorad 凝胶成像系统,Toshiba 冷冻离心机,Shellab 杂交箱。

1.2 方法

1.2.1 PCR 法制备 DIG 标记探针

1.2.1.1 DNA 模板的提取 将副溶血性弧菌 ATCC 33847 接种 3 % NaCl TSB,37 °C 培养过夜,细菌 DNA 模板的提取参照试剂盒说明书。

1.2.1.2 DIG 标记探针的制备 扩增 *tlh* 基因的引物设计参照文献,上游 5' AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG 3',下游 5' GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC 3',扩增片段长 450 bp^[3]。PCR 反应体系:含 MgCl₂ 的 PCR 缓冲液 5 μl,dNTP 1 μl,引物各 1 μl,酶混合物 0.75 μl,DNA 模板 2 μl,加无菌三蒸水使总体积为 50 μl。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 60 s,58 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 60 s,循环 30 次;72 °C 再延伸 5 min。PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析:取 5 μl PCR 产物与 2 μl 6 × 上样胶混合,电泳槽中放入含 1 μg/ml EB 的 1.5 % ~ 1.8 % 琼脂糖凝胶,浸入 1 × TBE。常压 5 ~ 10 V/cm,约 45 min。紫外灯下观察结果,并照相。

1.2.2 探针标记效率的检测

参照 DIG 核酸检测试剂盒说明书。

1.2.3 探针灵敏度的鉴定

将 DNA 模板稀释至不同浓度,煮沸 10 min,立即冰浴,点于尼龙膜上。模板量依次为 64 ng、12.8 ng、1.6 ng、320 pg、64 pg、13 pg、2.6 pg、0.5 pg、0.01 pg。参照 DIG 核酸检测试剂盒说明书进行杂交、显色。

1.2.4 探针特异性的鉴定

将副溶血性弧菌 ATCC 17802 和 ATCC 33847 接种于 3 % NaCl TSB;拟态弧菌、溶藻弧菌、麦氏弧菌、大肠埃希菌 O157 H7、铜绿假单胞菌、肠球菌、蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌分别接种 TSB;37 °C 培养过夜,取 1 ml 菌液,10 000 r/min 离心 5 min,菌沉淀用生理盐水洗 2 次,加入 100 μl 变性液 (0.4 mol/L NaOH,10 mmol/L EDTA),室温放置 10 min。取 2 μl

溶菌液,点于尼龙膜上,微波加热干燥,254 nm 紫外交联 5 min。参照 DIG 核酸检测试剂盒说明书进行杂交、显色。

1.2.5 探针杂交条件的优化

1.2.5.1 变性液体积的选择 菌沉淀中分别加入变性液 100、150、200、400、600、800、1 000 μl。

1.2.5.2 杂交温度选择 杂交温度分别为 37、40、45、50、55、60 和 65 °C。

1.2.5.3 杂交时间选择 杂交时间分别选用 1、2、3、6、9 h 和过夜。

1.2.5.4 探针浓度 在杂交液 10 ml 中分别加入探针 5、10、15、20 和 25 μl。

1.2.6 探针重复利用的测试

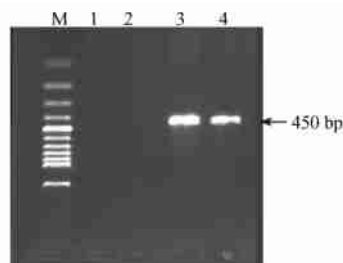
探针重复利用前煮沸 10 min,立即冰浴,重复利用 5 次。

1.2.7 分离菌株的鉴定

对于从海产品中分离的 42 株副溶血性弧菌可疑菌株,同时采用 API 20E 试剂条和斑点杂交法进行鉴定。

2 结果

2.1 探针的扩增产物 对探针的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,可以看到清晰、亮度较高的条带。探针长度略大于 450 bp,见图 1。



M 为分子量标记;1、2 为空白对照;3 为 *tlh* 基因探针扩增产物;4 为 *tlh* 基因 PCR 扩增产物。

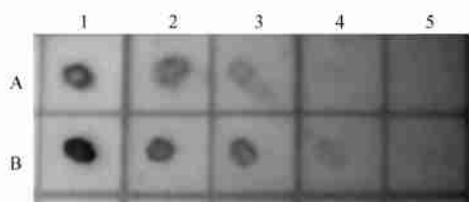
图 1 PCR 法制备 DIG 标记探针的电泳图

2.2 探针标记效率的检测

探针和对照 DNA (5 μg/ml) 分别进行梯度稀释,直接点膜交联显色,比较探针与对照 DNA 的显色结果,找出颜色相似的稀释度,推算出探针浓度大约为 50 μg/ml,见图 2。

2.3 探针的灵敏度及特异性

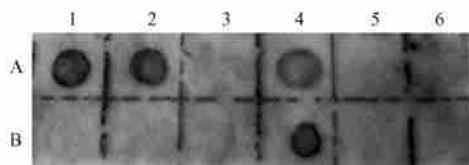
提取副溶血性弧菌标准株 ATCC 33847 的 DNA,将 DNA 稀释至不同浓度,点于尼龙膜上。杂交结果显示,本法制备的 DIG 标记探针可清晰检出 DNA 的量为 32 ~ 3.2 μg/ml。使用待测菌株制备的溶菌液进行斑点杂交,结果提示该方法特异性较强。副溶血性弧菌标准株均为阳性,2 株溶藻弧菌也为阳性,其



A1~A5: DIG 标记对照 DNA 梯度 $5, 5 \times 10^{-1}, 5 \times 10^{-2}, 5 \times 10^{-3}, 5 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$; B1~B5: DIG 标记 *thh* 基因探针 $10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 2 \times 10^{-3}, 10^{-3}, 5 \times 10^{-4}$ 稀释度。

图2 PCR 法制备 DIG 标记 *thh* 基因 DNA 探针产量的测定结果

他菌株检测结果均为阴性,见图3。



A1: 副溶血性弧菌 ATCC 17802; A2: 副溶血性弧菌 ATCC 33847; A3: 拟态弧菌; A4: 溶藻弧菌 VA1; A5: 大肠埃希菌 O157 H7; A6: 空白对照; B1: 麦氏弧菌; B2: 铜绿假单胞菌; B3: 蜡样芽孢杆菌; B4: 溶藻弧菌 VA2; B5: 金黄色葡萄球菌; B6: 肠球菌。

图3 *thh* 基因探针斑点杂交检测副溶血性弧菌方法的特异性

2.4 杂交条件的优化结果

2.4.1 变性液体积

随变性液体积的增加,杂交信号逐渐变弱。由于变性液量体积过少则不能完全溶解菌沉淀,因此本试验推荐变性液用量为 200~400 μl 。

2.4.2 杂交温度的选择

杂交温度为 37 时不出现杂交信号,40 出现模糊的杂交信号,随杂交温度的增加,杂交信号逐渐加强,其中 55~65 出现较为清晰的杂交斑点。由于本研究使用的杂交液不含甲酰胺,因此杂交温度应适当提高。推荐杂交温度为 65。

2.4.3 杂交时间的选择

杂交时间为 1 h 时不出现杂交斑点,2 h 可见模糊的杂交斑点,随杂交时间的延长,斑点颜色逐渐加深,12 h 的颜色最深。若继续延长杂交时间,背景也明显加深,不利于判定结果。推荐杂交反应时间为 9~12 h。

2.4.4 探针浓度

标记探针浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 。若每 10 ml 杂交液的探针使用量为 5 μl ,不出现杂交斑点;10 μl 出现弱杂交斑点;15、20、25 μl 出现清晰可见斑点,且斑点颜色依次变深。为保证结果的正确判定,推荐探针的使用浓度为 100~125 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.5 探针的重复性

探针在重复利用 3 次的情况下,杂交结果依旧

十分理想,但第 4 次重复利用时杂交信号不很明显。推荐探针的重复利用次数为 4 次。

2.6 斑点杂交与 API 20E 鉴定结果的比较

对于从海产品中分离的 42 株菌,杂交法鉴定结果和 API 20E 鉴定结果基本一致。API 20E 鉴定结果显示,其中的 39 株为副溶血性弧菌,2 株为美人鱼弧菌,1 株溶藻弧菌。杂交法鉴定结果显示,39 株生化鉴定为副溶血性弧菌的菌株都出现杂交信号,但其中 10 株的杂交信号较弱,2 株美人鱼弧菌不出现杂交信号,溶藻弧菌出现较弱的杂交信号。

3 讨论

我国副溶血性弧菌检验国家标准 GB/T 4789.7—2003 中采用生化试验鉴定菌株,然而近年来其他国家正陆续将 PCR 和 DNA 克隆杂交等分子方法引入标准。美国食品药品监督管理局 (FDA) 的细菌学分析手册 (BAM) 推荐复合 PCR 法及碱性磷酸酶 (AP) 和 DIG 标记 DNA 探针杂交检测 *thh*、*tdh* 和 *trh* 基因;加拿大食品检验署 (CFIA) 推荐复合 PCR 法检测 R72H DNA 序列、*tdh* 和 *trh* 基因;日本标准推荐常规和复合 PCR 法检测 *tdh* 和 *trh* 基因^[5-7]。美国 FDA 规定,如果软体贝类副溶血性弧菌 $\geq 10\,000$ MPN/g 将考虑采取强制措施加以限制;日本规定生食海产贝类及鱼片副溶血性弧菌限量为 100 CFU/g,我国目前对食品副溶血性弧菌的要求是 25 g 不得检出(相当于限量为 0.04 CFU/g)^[8,9]。不难想象,如果我国在修订食品微生物标准时对副溶血性弧菌规定限量值,势必对检测方法的快速、简便等提出更高的要求。

基因探针技术自发明以来,在致病因子的检测中,发挥出优于常规方法的作用。利用基因探针杂交方法替代传统的生化试验,可减少样品分析的时间和物力。目前, DIG 标记探针的使用较为普遍,其灵敏度与同位素标记探针相当,且不存在同位素探针的半衰期短、易扩散和放射性污染等问题,同时又克服了生物素探针本底高、灵敏度差的缺点。MCCARTHY 等^[10]评价了检测副溶血性弧菌 *thh* 基因的 AP 和 DIG 标记探针,结果显示 AP 标记探针特异性很高,与 API 20E 鉴定系统的符合率达 97%;AP 标记探针和 DIG 标记探针检测可疑副溶血性弧菌株的符合率达 98%。

副溶血性弧菌不同菌株的致病性有很大差异,环境分离株多数为无毒株, *tdh* 和 *trh* 基因与副溶血性弧菌的毒力有关。如果采用分子生物学方法鉴定菌株是否为副溶血性弧菌,有必要选择一个具有种特异性的基因。有研究人员提出采用 *gyrB* 基因检

测副溶血性弧菌,但后来有研究发现该基因也存在于溶藻弧菌中;*toxR* 基因也被用于副溶血性弧菌的检测,但某些创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)和溶藻弧菌会产生非特异性扩增产物^[11]。Bej 等的研究结果显示,*tlh* 基因具有种特异性,可以作为种特异性标志物^[4]。该研究中的引物序列被后来的多个研究采用,并且也出现在 FDA - BAM 中。为此,本次研究以 *tlh* 基因作为目标基因。

本研究是国内首次采用 PCR 法制备检测副溶血性弧菌 *tlh* 基因的 DIG 标记 DNA 探针,用于鉴定副溶血性弧菌的可疑菌落。研究结果显示,PCR 标记 *tlh* 基因探针具有较高的灵敏度和特异度,可反复多次使用。尽管本研究未对探针的稳定性进行研究,但已有资料显示合成的探针可以存放一年。本试验对仪器设备的要求不高,可以作为实验室的常规检测工具。本研究显示,有 12 株副溶血性弧菌的杂交信号较弱。斑点杂交方法非常敏感,为保证结果的正确判读,建议每次试验都设立阴性和阳性对照。

已有研究发现,溶藻弧菌和副溶血性弧菌关系非常密切,二者的同源性达 60%~70%,靶定 *tlh* 基因的引物不能用于区分副溶血性弧菌和溶藻弧菌^[11]。本研究中的 3 株溶藻弧菌都呈现杂交信号。由于溶藻弧菌与副溶血性弧菌在 TCBS 和科玛嘉弧菌显色平板上呈现不同的颜色,本文所阐述的方法有利于对分离平板获得的可疑菌株进行准确的鉴定,避免了溶藻弧菌导致的假阳性结果。

参考文献

- [1] HLADY WG, KLONTZ KC. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida 1981 - 1993 [J]. J Infect Dis, 1996, 173(5): 1176-1183.
- [2] 刘秀梅,程苏云,陈艳,等. 中国 2003 年沿海地区零售海产品中副溶血性弧菌污染状况的主动监测 [J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 97-99.
- [3] 刘秀梅,陈艳,王晓英,等. 1992~2001 年食源性疾病暴发资料分析—国家食源性疾病预防网 [J]. 卫生研究, 2004, 33(6): 725-727.
- [4] BEJ AK, PATTERSON DP, BRASHER CW, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh* [J]. J Microbiol Methods, 1999, 36: 215-225.
- [5] DEPAOLA A, KAYSNER CA. *Vibrio*. In U. S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual online. 2006 [DB/OL]. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bamr-9.html>.
- [6] 日本厚生劳动省. 食品卫生检查指针微生物篇[M]. 2004, 201-224.
- [7] GREEN M, BUENAVENTURA E, WONG C, et al. Liu Specific Detection of *Vibrio parahaemolyticus* strains using a multiplex polymerase chain reaction (PCR) based on the R72H taxonomic marker and the hemolysin and the hemolysin genes *tdh* and *trh*, 2006 [DB/OL]. http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume3/mflp-23_e.html.
- [8] U. S. Food and Drug Administration. National shellfish sanitation program guide for the control of molluscan shellfish. 2003 [DB/OL]. <http://www.cfsan.fda.gov/~ear/nss2-toc.html>.
- [9] HARA-KUDO Y, NISHINA T, NAKAGAWA H, et al. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(12): 5819-5823.
- [10] MCCARTHY SA, DEPAOLA A, COOK DW, et al. Evaluation of alkaline phosphatase- and digoxigenin-labelled probes for detection of the thermolabile hemolysin (*tlh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Lett Appl Microbiol, 1999, 28: 66-70.
- [11] ROBERT-PILLOT A, GUENOLE A, FOURNIER JM. Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species: validation by DNA-DNA hybridization [J]. FEMS Microbiol Lett, 2002, 215(1): 1-6.

[收稿日期:2009-03-07]

中图分类号:R378.3; R392.11; R394-33; Q93-331 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2009)04-0340-04

卫生部关于不得在面制品中使用焦亚硫酸钠的批复

卫监督函〔2009〕136号

甘肃省卫生厅:

你厅《关于甘肃省地方标准拉面剂中焦亚硫酸钠使用问题的请示》(甘卫法监发〔2009〕45号)收悉。经研究,现批复如下:

《食品添加剂使用卫生标准》(GB2760)中焦亚硫酸钠的使用范围不包括面制品,在面制品中使用焦亚硫酸钠属于违法行为,应当依法严肃查处。

此复。

中华人民共和国卫生部

二〇〇九年四月十三日