

副溶血性弧菌分子生物学检测技术研究进展

周 梅

宁明县疾病预防控制中心 广西崇左 532500

【关键词】副溶血性弧菌；分子生物学；检测

【中图分类号】R378

【文献标识码】A

【文章编号】2095-9753 (2020) 03-194-03

副溶血性弧菌是一种革兰氏阴性、嗜盐的杆状细菌，广泛分布于河口和沿海水域，与鱼、虾、蟹、贝类和海藻等海产品关系密切，带有毒力基因的菌株常污染水产品^[1]，生吃或未煮熟的水产品，吞服量超过10万个副溶血性弧菌的活菌即可发病，引起腹痛、腹泻、头痛和呕吐等症状，低免疫人群严重时可发生副溶血性败血症。近年来，副溶血性弧菌感染暴发增多，已成为许多国家的重大公共卫生问题^[2]。因此，预防和控制副溶血性弧菌感染暴发具有重要意义。分子生物学检测技术具有特异、敏感、简单、快速等特点，近年来发展迅速。本文将副溶血性弧菌的分子生物学检测技术研究进展综述如下。

环境中，大多数副溶血性弧菌对人类不致病，仅有少数携带毒力基因的菌株才引起人类疾病。随着基因组学研究的不断深入，副溶血性弧菌的毒力基因和特异性基因基本明朗，副溶血性弧菌的毒力基因包括毒力调控基因（toxR）、耐热直接溶血毒素基因（tdh）、耐热直接溶血毒素相关溶血毒素基因（trh），针对副溶血性弧菌的种特异性基因包括不耐热溶血毒素基因（tlh）、促旋酶的B亚单位基因（gyrB基因）、从染色体DNA克隆的DNA片段（PR72H基因）、伴侣蛋白和热休克蛋白基因（groEL）、铁调控的毒力调节蛋白基因（irgB）、编码热休克蛋白40的管家基因（dnaJ）、金属蛋白酶基因（vpm）等等^[3]。分子生物学检测常用以上述基因作为检测副溶血性弧菌的特异性基因。

1 核酸扩增技术

基于核酸扩增的分子生物学检测技术分为聚合酶链式反应（PCR）核酸扩增技术和核酸恒温扩增技术等两大类。

1.1 聚合酶链式反应技术

聚合酶链式反应（PCR）是一种生物体外的DNA复制，用于放大扩增特定的DNA片段的分子生物学技术，PCR的最大特点是能将微量的DNA大幅增加。常用的PCR包括常规PCR、多重PCR、实时荧光定量PCR，如今发展到了数字PCR。

常规PCR即早期应用的PCR，检测副溶血性弧菌时只需要设计一对相应的引物，在反应管中扩增后用凝胶电泳鉴定。多重PCR是在同一反应管中同时加上两对或两对以上的特异性引物进行扩增，扩增后仍需用凝胶电泳鉴定。刘月华，等^[4]针对副溶血性弧菌种属特异的tlh基因以及trh毒性基因设计引物进行双重PCR检测，采用双重PCR与DNA染料叠氮溴化乙锭（EMA）结合，在鉴定副溶血性弧菌活细胞的同时检测trh毒性。结果，该检测方法对海产品中的副溶血性弧菌及trh相关毒性活菌细胞的检测具有特异性，且灵敏度较高。在浓度为 2.0×10^8 CFU/mL，EMA浓度为1.0-8.0 μg/mL的副溶血性弧菌悬液中，EMA激活光解20min时，可抑制死菌细胞DNA的双重PCR扩增而不能抑制活菌细胞DNA的双重PCR扩

增，从而实现副溶血性弧菌活细胞及trh基因相关毒性的鉴别。该方法可以特异、高效的针对副溶血性弧菌及trh相关毒性活菌细胞进行检测，为食品检测提供了参考依据。林佳琪等^[5]分别以副溶血性弧菌的toxR、tdh、trh、tlh等4个基因为靶基因，设计4对特异性引物，对4对引物浓度和退火温度进行优化，获得最佳引物比例和扩增条件，建立快速检测致病性副溶血性弧菌的四重PCR。通过特异性验证、灵敏度验证以及模拟样品检测进行方法确认。结果，四重PCR扩增条带与预期相符；用74株副溶血性弧菌和37株非目标菌的测试结果表明，所建立的方法有良好的特异性。该方法对模板DNA的检测灵敏度为50 μg/L，纯培养物的检测灵敏度为 6.7×10^3 CFU/mL；副溶血性弧菌含量为1.36 CFU/g的人工模拟样品增菌6h后，toxR、tlh、tdh、trh 4个基因可同时被检出。该方法可实现同时检测携带toxR、tdh、trh、tlh 4种基因的副溶血性弧菌，对开展致病性副溶血性弧菌的检测研究具有一定现实意义。上述常规PCR和多重PCR扩增后需用凝胶电泳鉴定，而且不能作定量分析，操作繁琐、耗时，同时扩增产物极易受到污染造成假阳性。

实时荧光定量PCR（Quantitative Real-time PCR，qPCR）是第二代PCR技术，是指在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。常用于检测副溶血性弧菌的荧光物质包括荧光探针和荧光染料，由于荧光探针的特异性比荧光染料更强，临床上常采用荧光探针法。侯兵兵，等^[6]采用荧光探针（Taqma-探针）作荧光基团，以副溶血性弧菌的toxR基因设计引物，建立Taqma-实时荧光定量PCR，该方法检测灵敏度为0.1 mg/L，特异度为100%，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。Xu等^[7]利用副溶血性弧菌的groEL基因、tdh基因和trh基因设计了三套引物和探针，建立了多重实时荧光定量PCR，对35株弧菌和11株其他菌株进行特异性检测，并鉴别出副溶血性弧菌。该方法可以检测和区分毒性和非毒性菌株，在检测的细菌中没有观察到交叉反应。这种新建立的多重实时PCR检测方法可以快速、特异、可靠地检测出全部致病性副溶血性弧菌株，在由副溶血性弧菌感染引起的暴发和散发病例中非常有用。

数字PCR（Digital PCR，dPCR），dPCR是最新一代的核酸分子定量技术。与qPCR相比，dPCR能够直接数出DNA分子的个数，是对起始样品的绝对定量。当前核酸分子的定量方法有光度法、qPCR和dPCR等三种方法，光度法是基于核酸分子的吸光度来定量；qPCR基于Ct值，Ct值就是指可以检测到荧光值对应的循环数；dPCR是基于单分子PCR方法来进行计数的核酸定量。主要采用当前分析化学热门研究领域的微流

控或微滴化方法,将大量稀释后的核酸溶液分散至芯片的微反应器或微滴中,每个反应器的核酸模板数少于或者等于1个。经过PCR循环之后,有一个核酸分子模板的反应器就会给出荧光信号,没有模板的反应器就没有荧光信号。根据相对比例和反应器的体积,推算出原始溶液的核酸浓度。Li等^[8]设计并实施了针对由副溶血性弧菌引起疫情的数字PCR检测方法,结合下一代测序和传统的细菌培养方法,对从该疫情采集的样本进行检测,结果证实该疫情由副溶血性弧菌引起暴发流行,经过三种方法检测结果的对比分析,他们认为若只用传统的培养法检测,可能得出错误的结论。dPCR主要优点是精度高、定量可靠、不需要标准的曲线,并具有良好的再现性其主要缺点成本仍然高于标准qPCR,缺乏标准化的方法等等^[9]。

1.2 核酸恒温扩增技术

核酸恒温扩增技术是在扩增过程中均在同一温度下进行,不像PCR反应那样需要经历几十个温度变化的循环过程。这一特点使得核酸恒温扩增技术对扩增所需仪器的要求不高,反应时间大大缩短,因而具有巨大的应用价值,成为分子诊断行业发展中的热点。

1.2.1 交叉引物恒温扩增技术

交叉引物扩增技术(CPA)是在相同的温度条件下进行扩增,扩增产物利用全封闭式核酸检测装置进行检测,降低了扩增产物的交叉污染,且结果判定简单。虞艳等^[10]选取tdh基因设计多对合成交叉恒温扩增引物。优化CPA反应条件,建立副溶血性弧菌CPA检测方法,检测方法的敏感性和特异性,并和荧光定量PCR方法进行比较。同时利用该法对采集的水产品中的副溶血性弧菌进行监测。结果该法60℃,40min即可完成反应,敏感性和特异性高,最低检测限为14CFU/mL,与qPCR结果一致。CPA简单、快速,适用于现场检测或实验资源较少的基层医院和经济不发达地区;同时也可以满足大医院特定情况下的需求,如急诊或床边的核酸快速诊断。

1.2.2 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术(LAMP)是针对目标DNA链上的6个区段设计4个不同的引物,利用链置换型DNA合成酶,在一定温度下进行反应。反应只需要把基因模板、引物、链置换型DNA合成酶、基质等共同置于一定温度下(60-65℃),经一个步骤即可完成。其扩增效率极高,可在15-60min内实现 10^9 - 10^{10} 倍的扩增。而且由于有着高度的特异性,只需根据扩增产物的有无即可对靶基因序列的存在与否做出判断。Siddique等^[11]针对副溶血性弧菌的groEL基因设计引物,建立完整的LAMP检测系统,用于检测海产品和水中的副溶血性弧菌。该方法检出限为100fg/反应,高于传统PCR100倍。基于groEL基因的LAMP检测方法快速、特异、灵敏、可靠,可用于副溶血性弧菌的现场检测。

1.2.3 重组酶聚合酶扩增技术

重组酶聚合酶扩增(RPA)是重组酶与引物结合形成的蛋白-DNA复合物,能在双链DNA中寻找同源序列,当引物定位同源序列后,链交换反应形成并启动DNA合成,对模板上的目标区域进行指数式扩增,被替换的DNA链与单链DNA结合蛋白结合,防止进一步替换。在这个体系中,由两个相对的引物起始一个合成事件。整个过程10分钟之内获得可检出水平的扩增产物。Yang等^[12]根据副溶血性弧菌toxR基因设计特异性引物。RPA反应在37℃恒温条件下进行20min。对63株弧菌和10种非弧菌进行特异性检测。该方法的灵敏度为 3×10^3 CFU/mL,明显高于PCR方法。用这种方法检测从当地

市场收集的海鲜样品。在53种不同的生海产品中,有7种检出副溶血性弧菌阳性,这与传统培养方法和生化测定结果一致。该方法为副溶血性弧菌的检测提供了一种快速、特异、灵敏、简便的方法。Geng等^[13]采用副溶血性弧菌gyrB基因设计特异性引物和exo探针,建立实时RPA。反应在38℃条件下进行,反应时间为20min。该方法仅检测出副溶血性弧菌,与其他细菌无交叉反应,特异性高。实时RPA的检出限为 1.02×10^2 拷贝/反应。与LAMP技术相比,RPA只需设计一对引物而LAMP需设计两对引物,RPA常温下20min左右即可完成检测,不需要任何仪器。但RPA终端检测相对复杂,价格高。

2 分子生物传感器技术

生物传感器是一种对生物物质敏感并将其浓度转换为电信号进行检测的仪器。是由固定化的生物敏感材料如酶、抗体、抗原、微生物、细胞、组织、核酸等生物活性物质作识别元件、适当的理化换能器如氧电极、光敏管、场效应管、压电晶体等等及信号放大装置构成的分析工具或系统。生物传感器具有接受器与转换器的功能。Hash等^[14]开发了一套基于核磁共振的生物传感器检测系统,他们使用铁纳米粒子涂层,纳米颗粒表面涂有能够与目标微生物的DNA结合的目标特异性生物标记物。核磁共振系统通过测量核磁共振的自旋弛豫时间来产生一个信号,该时间与微生物DNA的数量有关。应用核磁共振生物传感器快速检测副溶血性弧菌,与传统的微生物学技术如实时荧光PCR相比,核磁共振生物传感器在不同浓度(10^5 - 10^8 CFU/mL)下的检测限相似。此外,核磁共振生物传感器系统可以在短时间内检测到不同基质中的多种微生物DNA。

3 分子生物芯片技术

生物芯片(biochip)是指采用光导原位合成或微量点样等方法,将大量生物大分子比如核酸片段、多肽分子甚至组织切片、细胞等等生物样品有序地固化于支持物的表面,组成密集二维分子排列,然后与已标记的待测生物样品中的靶分子杂交,通过特定的仪器对杂交信号的强度进行快速、并行、高效地检测分析,从而判断样品中靶分子的数量。Pang等^[15]建立一种结合环介导等温扩增(LAMP)和自驱动微流控芯片技术检测副溶血性弧菌的方法。通过比对选取副溶血性弧菌的不耐溶血素基因(tlh)作为目的基因,设计LAMP引物,通过实时LAMP筛选合格引物。设计微流控芯片,将引物冻干后固化到芯片上,制成LAMP微流控芯片。选择合适的LAMP反应体系,添加显色剂,加入芯片中,反应结果通过肉眼或仪器判读。使用标准菌株检验芯片的特异性与敏感性,并使用人工污染样品进一步检验其在实际样品检测时的敏感性。结果表明:制成的LAMP自驱动微流控芯片具有较好的特异性,对副溶血性弧菌的检测检测限降至 1×10^3 cfu/mL,可用于食品副溶血性弧菌的快速检测。

目前人们普遍认为是生物芯片如基因芯片、蛋白质芯片等只是微流量为零的点阵列型杂交芯片,功能非常有限,属于微流控芯片的特殊类型,微流控芯片具有更广泛的类型、功能与用途,可以开发出生物计算机、基因与蛋白质测序、质谱和色谱等分析系统,成为系统生物学尤其系统遗传学的极为重要的技术基础^[16]。

4 分子生物纳米技术

分子生物纳米技术在副溶血性弧菌检测的应用中主要开发以诊断和筛查为目的的纳米粒子或者使用纳米通道进行DNA测序等技术。Fu等^[17]以纳米金颗粒(直径18.1nm)为显色底物,用多克隆IgG抗体包被二氧化锰纳米颗粒(直径

7.8nm),用于识别靶标,建立新型的比色免疫法快速检测副溶血性弧菌,该方法特异性强,检出限为10cfu/mL,已成功应用于未经预富集的牡蛎样品中副溶血性弧菌的检测。

免疫生物磁珠是直径为1-100纳米的磁性微球,其表面包被有待测物质的特异性抗体,能与样品中的靶物质(具有相应的表面抗原)发生免疫反应,形成免疫生物磁珠即靶物质复合物。在外加磁场中,免疫生物磁珠即靶物质复合物被吸附并滞留在磁场中,而无相应表面抗原的物质由于不能与免疫生物磁珠表面的特异抗体结合,没有磁性,不能在磁场中停留,从而富集到靶物质。刘涛等^[18]选取ToxR多克隆抗体包被磁珠,用于富集样品中的细菌,建立免疫磁珠-一环介导等温扩增联用技术快速检测副溶血性弧菌的方法。该方法有效富集菌体,缩短检测时间,大幅度提高检测限,适合菌体含量较低的样本检测,降低样本中病原菌的漏检率。

5 展望

分子生物学检测副溶血性弧菌具有灵敏度高、特异性强,检测时间短等优点,克服了传统方法中出现的费时、假阳性和假阴性等问题^[19]。特别是分子生物传感器、生物芯片、分子生物纳米等技术与核酸扩增技术的结合,大大地提高了方法的灵敏度,使含菌浓度低的样品也得到诊断。

众多分子生物学检测方法中,最为引人注目的是数字PCR和重组酶聚合酶扩增技术,他们走在核酸扩增技术的前列,但由于数字PCR设备投入大,而重组酶聚合酶扩增在最后检测时耗费成本高,同时,在分子生物学检测技术上,尽管欧洲共同体已于2017年发布了分子生物学检测致病性副溶血弧菌的国际标准^[20],但我国还没有制订出统一的国家标准,制约了核酸扩增技术在基层实验室的广泛开展。随着分子生物学检测技术的不断完善,核酸扩增技术在副溶血性弧菌诊断上将具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1]Faja OM, Sharad AA, Younis KM, et al. Isolation, detection of virulence genes, antibiotic resistance genes, plasmid profile, and molecular typing among *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Malaysian seawater from recreational beaches and fish[J]. *Vet World*, 2019,12(7):1140-1149.
- [2]Guin S, Saravanan M, Anjay, et al. Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in diarrhoeal patients, fish and aquatic environments and their potential for inter-source transmission[J]. *Heliyon*, 2019,5(5):e01743.
- [3]Federici S, Serrazanetti DI, Guerzoni ME, et al. Development of a rapid PCR protocol to detect *Vibrio parahaemolyticus* in clams[J]. *J Food Sci Technol*, 2018,55(2):749-759.
- [4]刘月苹, 吕淑霞, 李雪彤, 等. 双重PCR结合EMA检测副溶血性弧菌及携带trh相关毒性的活双菌细胞[J]. *核农学报*, 2018, 32(8):1580-1587.
- [5]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.
- [6]侯兵兵, 陈昌国, 李娜, 等. Taqman-探针荧光定量PCR鉴定副溶血弧菌方法的建立[J]. *现代检验医学杂志*, 2018, 33(1):40-43.
- [7]Xu D, Ji L, Wu X, et al. Detection and differentiation of

Vibrio parahaemolyticus by multiplexed real-time PCR[J]. *Can J Microbiol*, 2018,64(11):809-815.

[8]Li Y, Zhang S, Li J, et al. Application of digital PCR and next generation sequencing in the etiology investigation of a foodborne disease outbreak caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Food Microbiol*, 2019,84:103233. [9019-10-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. doi: 10.1016/j.fm.2019.05.017.

[9]Cilloni D, Petiti J, Rosso V, et al. Digital PCR in Myeloid Malignancies: Ready to Replace Quantitative PCR? [J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(9):pii:E2249.

[10]袁艳, 翁永夫, 周缀琴, 等. 水产品中副溶血性弧菌交叉引物恒温扩增检测技术的建立与应用[J]. *海峡预防医学杂志* 201925(2):52-54.

[11]Siddique MP, Jang WJ, Lee JM, et al. groEL is a suitable genetic marker for detecting *Vibrio parahaemolyticus* by loop-mediated isothermal amplification assay [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2017,65(2):106-113.

[12]Yang HL, Wei S, Gooneratne R, et al. Development of a recombinase polymerase amplification assay for *Vibrio parahaemolyticus* detection with an internal amplification control [J]. *Can J Microbiol*, 2018, 64(4):223-230.

[13]Geng Y, Tan K, Liu L, et al. Development and evaluation of a rapid and sensitive RPA assay for specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. *BMCMicrobiol*, 2019,19(1):186-191.

[14]Hash S, Martínez-Viedma MP, Fung F, et al. Nuclear magnetic resonance biosensor for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Biomed J*, 2019,42(3):187-192.

[15]Pang B, Ding X, Wang G, et al. Rapid and Quantitative Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by the Mixed-Dye-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay on a Self-Priming Compartmentalization Microfluidic Chip [J]. *J Agric Food Chem*, 2017,65(51):11312-11319.

[16]Fernandes AC, Gernaey KV, Krühne U. "Connecting worlds-a view on microfluidics for a wider application" [J]. *Biotechnol Adv*, 2018,36(4):1341-1366.

[17]Fu K, Zheng Y, Li J, et al. Colorimetric Immunoassay for Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus* Based on Mn²⁺ Mediates the Assembly of Gold Nanoparticles [J]. *J Agric Food Chem*, 2018,66(36):9516-9521.

[18]刘涛, 俞骅, 张蔚, 等. 免疫磁珠-一环介导等温扩增联用技术快速检测副溶血性弧菌方法的建立 [J]. *中国预防医学杂志*, 2017, 18(4):266-271.

[19]Federici S, Serrazanetti DI, Guerzoni ME, et al. Development of a rapid PCR protocol to detect *Vibrio parahaemolyticus* in clams [J]. *J Food Sci Technol*, 2018,55(2):749-759.

[20]Hartnell RE, Stockley L, Keay W, et al. A pan-European ring trial to validate an International Standard for detection of *vibrio Cholerae*, *vibrio parahaemolyticus* and *vibrio vulnificus* in seafoods [J]. *Int J Food Microbiol*, 2019,288:58-65. [9019-10-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.008.