

基于 *vvhA* 基因检测创伤弧菌实时荧光
PCR 方法的建立

Establishment of a quantitative real-time PCR for detecting
vvhA gene in *Vibrio vulnificus*

李丹丹¹ 徐义刚² 邱索平³ 王 昱⁴ 高会江⁵ 高慎阳⁶

LI Dan-dan¹ XU Yi-gang² QIU Suo-ping³ WANG Yu⁴ GAO Hui-jiang⁵ GAO Shen-yang⁶
(1.海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心,海南 海口 570311;2. 东北农业大学动医学院,黑龙江 哈尔滨 150001;
3. 从化出入境检验检疫局,广东 从化 510900;4. 重庆出入境检验检疫局检验检疫技术中心,重庆 404100;
5. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所牛遗传育种研究室,北京 100193;6. 辽宁医学院畜牧兽医学院,辽宁 锦州 121001)
(1. Animal Quarantine Lab, Inspection & Quarantine Technology Center of Hainan Entry-Exit Inspection & Quarantine
Bureau, Haikou, Hainan 570311, China; 2. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin,
Heilongjinag 150001, China; 3. Conghua Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Conghua, Guangdong 510900,
China; 4. Animal Quarantine Lab, Inspection & Quarantine Technology Center of Chongqing Entry-Exit
Inspection & Quarantine Bureau, Chongqing 404100, China; 5. Laboratory of Bovine Genetics and Breeding,
Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 6. Department
of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

摘要:为建立创伤弧菌(VV)的快速检测方法,根据 *vvhA* 基因
序列设计合成引物和探针,建立实时荧光 PCR 方法。结果显
示:所建立的方法能特异扩增出 VV 标准阳性菌株,而对其它
14 种菌株没有扩增;该方法的灵敏度为 15 CFU/mL;稳定性
和重复性试验结果表明,同一样品重复检测 4 次 Ct 值(循环
阈值)的变异系数均小于 2%;利用该检测方法对采集的
156 份样品进行检测,共计检出 2 份 VV 阳性样品,与行标法
(SN/T 1870—2007)检测结果一致。该检测方法灵敏度高、
特异性强,具有良好的实用性。

关键词:创伤弧菌;*vvhA* 基因;实时荧光定量 PCR

Abstract: To establish a rapid assay for *Vibrio vulnificus* (*V. vulnificus*) detection, a quantitative real-time PCR (qRT-PCR) method was developed targeting *vvhA* gene of *V. vulnificus*. The

results showed that the tests for 15 strains of different bacteria by using this method, only the ones of *V. vulnificus* were positive, indicating high specificity of qRT-PCR. Moreover, the sensitivity of this specific method was 15 CFU/mL. Further stability and reproducibility test results showed that the coefficient of variation of Ct values of four duplicates were less than 2%. In addition, a total 2 positive samples for *V. vulnificus* were detected from 156 clinical samples by this method, and the results were in accordance with those by SN/T 1870-2007 standard detections. Therefore, the qRT-PCR method provides a novel rapid and sensitive detection method for *V. vulnificus* infection.

Keywords: *vvhA* gene; quantitative real-time PCR

基金项目:海南省社会发展科技专项(编号:2015SF29);国家质检总局科技项目(编号:2013IK031,2013IK051,2015IK089);重庆市科技计划项目(编号:cstc2014yykfA80017);海南省应用技术与开发专项项目(编号:ZDXM20130025);广东检验检疫局科技计划项目(编号:2013GDK04,2015GDK53)

作者简介:李丹丹,女,海南出入境检验检疫局高级兽医师,博士。

通讯作者:徐义刚(1978—),男,东北农业大学教授,博士。

E-mail: 108074182@qq.com

收稿日期:2016-01-06

创伤弧菌(*vibrio vulnificus*, VV)是一种有荚膜的革兰氏阴性菌,广泛分布于蟹、虾、牡蛎等水生动物中,如果人类食用 VV 污染的食品会引发胃肠炎,严重时还会引发败血症^[1-2],病死率高达 50% 以上^[3-4],是对人类身体健康危害很严重的一种食源性致病菌。近几年来,中国沿海地区由 VV 感染引起的人类食物中毒事件频繁发生^[5-7]。所以,建立一种能够快速、准确检测 VV 的方法刻不容缓。

实时荧光 PCR 方法由于灵敏度、特异性和精准度都比较高,现今已成为病原体检测的重要方法,并且发展迅速,在生命科学研究的各个领域都得到了广泛应用^{[8]9-11}。针对检

测靶基因的选择,溶细胞素被认为是 VV 感染的主要致病因子之一^[9],是由结构基因 *vvhA* 编码的一种细胞外蛋白质,*vvhA* 基因具有良好的种特异性和保守性^[10-11],因此本研究选择 *vvhA* 基因作为检测的靶基因,建立检测 VV 的实时荧光 PCR 检测方法,并确定反应的最佳条件。为了提高 VV 的检测效率和检测的准确度,本研究根据 VV 的 *vvhA* 基因设计合成探针和引物,建立了检测 VV 的实时荧光 PCR 方法,并对反应体系进行优化,对方法的特异性、敏感性、稳定性以及重复性进行验证实验,最终建立一种行之有效的检测方法,旨在为快速准确检测 VV 提供有力的技术支持。与已有的相关报道对比,本研究有针对性的注重了引物和探针的设计,使检测方法的特异性在整体上有所提高。

1 材料与方法

1.1 菌种及临床样品

创伤弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、空肠弯曲菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌等 14 种常见的致病菌的标准菌株;美国典型菌种保藏中心(ATCC);

沙门氏菌:中国医学微生物菌种保藏管理中心(CM-CC);

156 份水产品(包括海鱼、鲍鱼、泥螺、虾、蟹、海水、蛭子、蛤蜊等);来自于水产品养殖场和水产品流通市场。

1.2 试剂和仪器

增菌培养基 BPW 和细菌培养基:北京中科质检生物技术有限公司;

核酸提取试剂盒:北京天根生化科技有限公司;
Taq 酶、MgCl₂ 和 dNTP:北京合生基因科技有限公司;
实时荧光 PCR 仪:7500 型,美国 ABI 公司。

1.3 方法

1.3.1 引物和探针设计 根据 GenBank 中已经发表的 VV *vvhA* 基因序列(KC821520.1) 进行引物和探针的设计并且参考吴增辉^[8]^[11-15] 的研究进行设计。

引物:F: TGTTTATGGTGAGAACGGTGACA
R: TTCTTTATCTAGGCCCAAACCTTG
探针:Fam- CCGTTAACCGAACCACCGCAA -TAMRA

1.3.2 实时荧光 PCR 反应模板的制备 将 15 种标准菌株分别接种到 5 mL 的增菌培养基中进行增菌,在 37 ℃ 下培养 12 h,各取 1 mL 菌液提取细菌基因组 DNA,根据试剂盒说明书的步骤进行,核酸提取后放入 -20 ℃ 冰箱保存备用。临床样品的细菌核酸的提取采用煮沸法进行。

1.3.3 反应体系中基本参数的优化 对 rTaq 酶、Mg²⁺、dNTPs、引物、探针浓度进行优化。在 Mg²⁺ (25 mmol/μL) 用量范围 2~5 μL,以每 0.5 μL 递增;在 rTaq 酶(5 U/μL) 用量范围 0.25~1.00 μL,以每 0.25 μL 递增;在 dNTP (2.5 mmol /μL) 用量范围 1.0~3.0 μL,以每 0.50 μL 递增;探针(20 μmol/μL)用量范围 0.1~0.5 μL,以每 0.1 μL 递增;引物(10 pmol/μL)用量范围 0.5~1.0 μL,以每 0.1 μL 递增;每个参数的用量重复 3 次,最后计算出 Ct 平均值,确定这 5 个反应参数的最佳用量。

1.3.4 特异性检测试验 采用试剂盒法提取 1.1.1 节中菌株的核酸作为模板,进行实时荧光 PCR 扩增,评价试验检测的特异性。

1.3.5 敏感性检测试验 10 倍梯度稀释菌液并且按核酸提取试剂盒要求分别提取每级稀释度细菌 DNA,各取 2.00 μL 作为模板按优化好的体系条件进行实时荧光 PCR 检测。

1.3.6 稳定性和重复性试验 取 3 个不同浓度的样品作为模板进行重复性试验,每个浓度做 3 个平行,重复 4 次。收集数据,计算组内、组间变异系数,评价试验的稳定性和重复性。

1.3.7 样品检测 将采集来的水海产品 156 份,经过匀浆机研磨处理后,用营养肉汤在 37 ℃ 培养箱内培养 6 h,利用煮沸法提取核酸,然后利用实时荧光 PCR 方法进行检测,检测结果用行标法(SN/T 1870—2007)进行再一次的检验,验证所建立的实时荧光 PCR 方法检测的实用性和准确性。

2 结果与分析

2.1 VV 实时荧光 PCR 检测方法的建立

rTaq 酶、Mg²⁺、dNTPs、引物、探针浓度直接影响实时荧光 PCR 反应的扩增效果,尤其是 Mg²⁺ 的浓度是影响 Taq 酶活性发挥的主要因素,浓度过高会增加实时荧光 PCR 反应的非特异性扩增,浓度过低会影响 Taq 酶活性发挥。所以,PCR 反应体系中每种物质浓度的选择都是非常重要的。经过反应体系的优化建立如下反应体系:rTaq 酶(5 U/μL)0.50 μL, Mg²⁺ (25 mmol) 2.50 μL, dNTP (2.5 mmol) 2.00 μL, 探针 (20 μmol/μL)0.30 μL, VVF/VVR(10 pmol/μL)1.00 μL, DNA 模板 2.00 μL, DEPC 水补充至 25 μL。具体的反应过程:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 3 s,60 ℃ 退火 40 s(此步骤收集荧光信号),72 ℃ 延伸 30 s,进行 40 个循环。

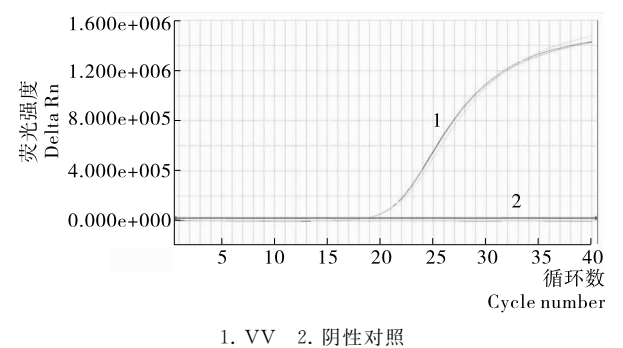


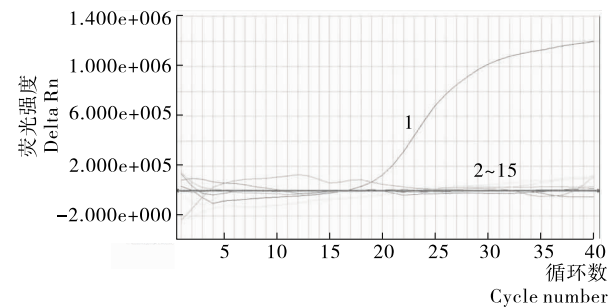
图 1 VV 实时荧光 PCR 反应体系和反应条件的确定
Figure 1 Determine the reaction system and the reaction conditions of a dual real-time PCR

2.2 特异性检测试验

应用建立的实时荧光 PCR 检测方法对 15 株标准菌株进行扩增试验显示,只有 VV 出现了特异性的扩增曲线,其他菌株和空白对照都没有出现特异性荧光信号。说明本研究所建立的检测方法具有很好的特异性(见图 2)。

2.3 敏感性检测试验

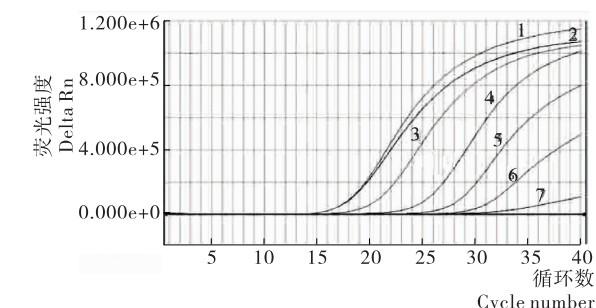
10 倍梯度稀释菌液并且按核酸提取试剂盒要求分别提取每级稀释度细菌 DNA,各取 2.00 μL 作为模板按优化好的



1. VV 2~15. 肠侵袭性大肠杆菌、霍乱弧菌、空肠弯曲菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、变形杆菌、阪崎肠杆菌、单增李斯特氏菌、志贺菌、副溶血弧菌、产肠毒素大肠杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、肠出血性大肠埃希菌 O157:H7、粘质沙雷菌

图 2 VV 实时荧光 PCR 特异性试验扩增曲线
Figure 2 Specificity test curve of a dual real-time PCR

体系条件进行实时荧光 PCR 检测。检测结果显示, 菌体浓度在 1.50×10^1 CFU/mL 时依然可以出现扩增曲线, 在其浓度以下都没有出现特异性荧光信号(图 3), 因此, 本研究所建立的检测方法的灵敏度为 15 CFU/mL, 表明该方法具有很高的灵敏度; 本研究 VV 检测的灵敏度与金玉娟等^[12]和张晶等^[13]建立的实时荧光定量 PCR 方法检测的灵敏度进行比



1~7. 菌体浓度分别为 $1.5 \times 10^6, 1.5 \times 10^5, 1.5 \times 10^4, 1.5 \times 10^3, 1.5 \times 10^2, 1.5 \times 10^1, 1.5 \times 10^0$ CFU/mL
图 3 VV 菌液稀释法实时荧光 PCR 灵敏度试验扩增曲线
Figure 3 Sensitivity test curve of a dual real-time PCR

较, 这 3 种实时荧光 PCR 检测方法的灵敏度相当, 都具有较高的灵敏度。

2.4 稳定性和重复性试验

选取 $1.50 \times 10^7, 1.50 \times 10^5, 1.50 \times 10^3$ CFU/mL 3 个浓度的阳性模板进行组内和组间重复性试验, 计算出组内和组间 CT 值的变异系数分别为 0.34%~1.05%, 0.38%~0.76% (表 1), 均小于 2%, 表明所建立的方法具有比较好的稳定性和重复性。

表 1 稳定性和重复性试验

Table 1 The stability and reproducibility test of real-time PCR

模板浓度/ (CFU · mL ⁻¹)	组内		组间	
	平均值(<i>n</i> =3)/ (CFU · mL ⁻¹)	变异系 数 CV/%	平均值(<i>n</i> =4)/ (CFU · mL ⁻¹)	变异系 数 CV/%
1.50×10^7	18.97±0.045	0.34	18.65±0.050	0.38
1.50×10^5	20.15±0.30	1.05	19.98±0.062	0.43
1.50×10^3	25.25±0.12	0.55	28.12±0.23	0.76

2.5 临床样品的检测试验

分别对 156 份采集来的样本用本研究建立的实时荧光 PCR 检测方法和行标法(SN/T 1870—2007)进行检测, 检出 2 份阳性样本, 两种方法所得的检测结果的一致(图 4、5), 表明该方法具有很强的应用性。

3 结论

本研究所建立的基于 *vvhA* 基因特异性检测 VV 实时荧

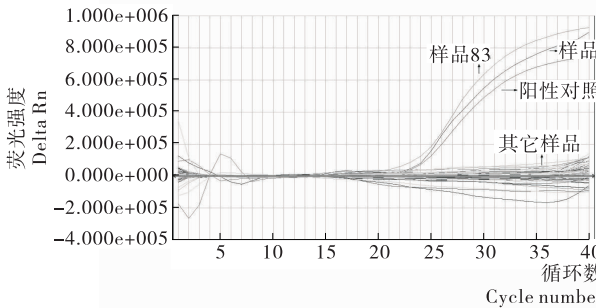


图 5 VV 行标法对样品检测试验扩增曲线
Figure 5 Test result curve of SN/T 1870-2007 for sample testing

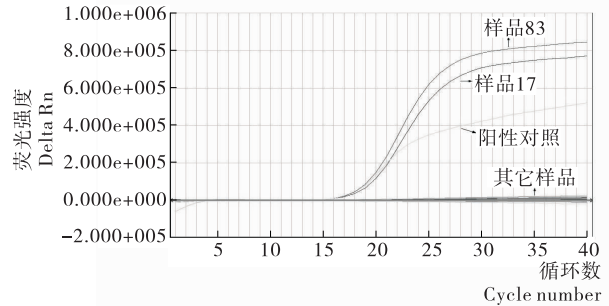


图 4 VV 实时荧光 PCR 对样品检测试验扩增曲线
Figure 4 Test result curve of a dual real-time PCR for sample testing

光 PCR 方法, 灵敏度高、特异性强、重复性好, 具有良好的实用性, 适合在食品微生物检测部门推广应用。该方法与普通 PCR 方法相比, 提高了检测的灵敏度和特异性, 并且不需要对 PCR 扩增产物进行后处理, 有效地解决了 PCR 产物易污染造成的假阳性和不能准确定量的问题。该方法的建立为 VV 的快速检测提供了新的技术手段。

(下转第 70 页)

分析仪表的灵敏度。

3.2 测试结果分析

采用本设计的含水率测量装置测得稻谷的含水率和采用烘干法测得稻谷的实际含水率的对比结果见图 7。采用自制设备测量的含水率相对于谷物实测含水率的坐标点比较均匀地分散在直线 $y=x$ 的两侧,拟合度为 0.988 4,说明设备测量的含水率准确度较高。绝对误差平均值为 0.96%,响应时间不大于 2 s。试验结果表明,本文所设计的谷物含水率测量装置能满足谷物干燥过程中对含水率测量的要求。

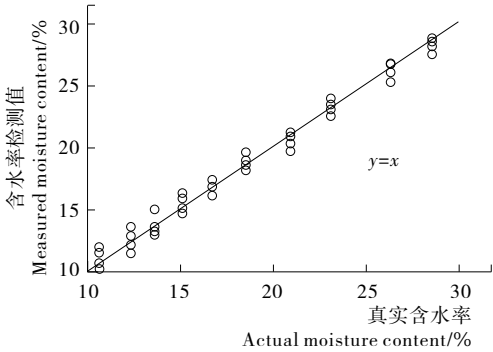


图 7 稻谷含水率测量值与实际值的比较

Figure 7 Comparison of measured moisture content with actual value

4 结论

(1) 本研究基于谷物含水率与阻抗的相关性设计了以 STM32F215 为控制器,具有温度补偿机制的针刺式谷物含水率在线检测仪。以水稻“两优 6188”籽粒为试验对象,研究了含水率(12.3%~25.5%)和温度(0~70 ℃)对水稻籽粒阻抗的影响,建立了以阻抗值和温度值为自变量,以谷物的含水率为因变量的三元四次方程,并验证了其准确性、合理性以及依据电阻值和温度值计算得出稻谷含水率的精确度。

试验表明,在 0~70 ℃下,对于含水率在 10%~28% 的稻谷,其绝对误差为 0.96%,小于 1%,灵敏度为 0.3%,响应时间小于 2 s;证明了此谷物含水率检测装置的准确性和可靠性。

(2) 本试验以水稻为试验样本,但是此项技术同样也可方便地应用于其它种类谷物的含水率测量,如大豆、玉米等。

(3) 接下来将通过更为合理结构设计,以提高谷物含水率检测的速度和自动化程度,以期更好地实现实时在线检测。

参考文献

[1] 郭伟,乔丽娟,刘海,等. 基于 CAV424 的粮食含水率检测仪表设计[J]. 传感器与微系统, 2013, 32(9): 111-114.

[2] 魏忠彩,孙传祝,张丽丽,等. 红外干燥技术在果蔬和粮食加工中的应用[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 217-220.

[3] 李长友. 稻谷干燥含水率在线检测装置设计与试验[J]. 农业机械学报, 2008, 39(3): 56-59.

[4] 胡平欣. 电容式粮食水分在线检测系统的研究[D]. 沈阳: 东北大学, 2012: 1-5.

[5] 李洪莉. 基于容重的玉米水分在线检测装置的研制[D]. 长春: 吉林大学, 2014: 2-6.

[6] 李业德. 基于介质损耗因数的粮食水分测量方法[J]. 农业工程学报, 2006, 22(2): 14-17.

[7] 付海东. 压力式粮食水分在线检测系统的设计与研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2012: 7-10.

[8] 杨兆选,鹿凯宁,刘承玺. 智能粮食湿度测试仪设计[J]. 电子测量与仪器学报, 1996, 10(3): 64-67.

[9] 张永林. 基于电阻原理的油料含水率在线测量技术[J]. 中国油脂, 2004, 29(8): 38-40.

[10] 崔传金,郭志强,赵楠,等. 用 AD5933 实现电导率测量的研究[J]. 机电工程技术, 2008, 37(4): 44-47.

[11] 郭文川,杨军,刘驰,等. 基于交流阻抗法的小麦秸秆含水率检测仪设计[J]. 农业工程学报, 2013, 29(23): 46-52.

(上接第 33 页)

参考文献

[1] 毛晶晶,余锐萍,曹杰,等. 某规模化奶牛场 STEC 和创伤弧菌流行情况调查[J]. 中国奶牛, 2013, 3(1): 1-3.

[2] BISHARAT N, COHEN D I, HARDING R M, et al. Hybrid *Vibrio vulnificus* [J]. Emerging Infectious Diseases, 2005, 11(1): 30-35.

[3] 潘军航,梅玲玲,朱敏,等. 舟山市售牡蛎中创伤弧菌污染的定量分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(12): 2 760-2 761.

[4] 李萌立,李忠海,李节,等. 量子点荧光探针技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 241-244.

[5] 姜英辉,房保海,雷质文,等. 细菌活的非可培养状态的分子生物学检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(15): 308-311.

[6] 杨文鸽,孙翠玲,潘云娣,等. 水产品中致病微生物的快速检测方法[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 402-406.

[7] 徐义刚,李苏龙,杨君宏,等. 水产品中创伤弧菌 DNA 环介导恒温扩增快速检测方法的建立及初步应用[J]. 中国生物工程杂

志, 2010, 30(6): 96-102.

[8] 吴增辉. 基于 vvhA 基因 TaqMan 实时荧光定量 PCR 快速检测创伤弧菌的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.

[9] 张慧,郑晓东,蒋侃,等. 实时荧光 PCR 法快速检测耐热霉菌费氏新萨托菌[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 79-82.

[10] CHUNG P H, CHUSNG S K, TSANG T, et al. Cutaneous injury and *Vibrio vulnificus* infection [J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(8): 1 302-1 303.

[11] PANICKER G, BEJ A K. Real-time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: comparison of oligonucleotide primers and probes targeting *vvhA* [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(10): 5 702-5 709.

[12] 金玉娟,甘莉萍,杨慧,等. 双重实时荧光 PCR 检测副溶血性弧菌和创伤弧菌方法的建立[J]. 热带医学杂志, 2014, 14(10): 1 296-1 302.

[13] 张晶,周勇,陶霞,等. 创伤弧菌 PMA RTi-PCR 检测技术的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(1): 54-58.