

## 添加有扩增内标的副溶血弧菌 PCR 检测方法

何晓华<sup>1</sup>, 余水静<sup>1</sup>, 陈万义<sup>1</sup>, 施春雷<sup>1</sup>, 孟江洪<sup>2</sup>, 史贤明<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 上海交通大学农业与生物学院, 陆伯勋食品安全研究中心, 中美食品安全联合研究中心, 上海 200240)

(<sup>2</sup> 马里兰大学食品安全与应用营养学联合研究院 (JIFSAN) 和营养与食品科学系, 马里兰 20742, 美国)

**摘要:**【目的】发掘副溶血弧菌特异性更强的检测靶点, 并人工构建扩增内标, 建立可以有效避免假阴性的新 PCR 检测体系。【方法】利用生物信息学方法, 从副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 基因组 DNA 中发掘特异性很高的序列, 并设计相应的特异性引物, 人工构建扩增内标, 建立 PCR 检测体系。【结果】本研究发掘得到的序列 vp1332 特异性很强, 经检索, 该序列是编码 ABC 转运子接合蛋白组分的基因片段, 根据此序列设计一对特异检测引物 (vp1332L/vp1332R), 同时, 构建了扩增内标, 并建立了 PCR 检测体系。利用该体系对 296 株副溶血弧菌和 33 株非副溶血弧菌进行检测, 结果显示, 所有以副溶血弧菌为模板的 PCR 反应均可扩增到一条 343 bp 的特异片段, 而模板来源于非副溶血弧菌的则只能扩增到一条 499 bp 的扩增内标片段。灵敏度实验表明, 该 PCR 反应体系的检测灵敏度为  $1.6 \times 10^2$  cfu/mL。人工污染实验表明, 起始染菌量为 1.24 cfu/25 g 样品时经 8 h 增菌, 即可检测到副溶血弧菌。实际样品检测结果也证实该方法的有效性。【结论】本研究建立的 PCR 反应体系能特异地检测副溶血弧菌, 并可有效地排除假阴性, 提高检测准确率。

**关键词:** 副溶血弧菌; PCR 检测; 扩增内标; 假阴性

**中图分类号:** TS207.7    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0387-08

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是水产品中引起食物中毒的重要病原菌之一<sup>[1]</sup>, 在海产品中的携带率高达 45.7%<sup>[2]</sup>。在我国沿海地区, 由副溶血弧菌引起的食物中毒占细菌性食物中毒事件首位<sup>[3]</sup>, 其中也包括台湾省<sup>[4]</sup>; 在日本, 由该菌引起的食物中毒占第二位<sup>[5-6]</sup>。所以, 副溶血弧菌是食品安全检测中的一项重要指标。但目前法定的副溶血弧菌检测方法仍然是传统培养方法, 操作繁琐、费时、费力, 常常需要 5-6 d 才能完成, 而且鉴定副溶血弧菌的生化指标非常不稳定, 常常需要重复实验才能最终确定是否为副溶血弧菌<sup>[7-8]</sup>, 此类方法已不能满足目前对大量食品样品快速检测的需求, 急切需要建立一种快速、有效的检测方法。基于聚合酶链式反应 (PCR) 的检测方法具有灵敏、特异、快速等优点, 因此, 日益受到重视, 并逐渐开始应用于副

溶血弧菌的检测。检测靶点是分子检测方法的关键, 目前, 用于副溶血弧菌 PCR 检测的靶点主要是 *tdh*、*toxR*、*gyrB*、*tl* 等基因<sup>[9-14]</sup>。然而, 这些基因在其他弧菌中也普遍存在, 且同源性非常高, 极易产生假阳性结果<sup>[15]</sup>。此外, PCR 检测还易出现假阴性结果, 这主要是由于抑制剂的存在等因素造成的<sup>[16-17]</sup>。PCR 技术虽然在不断地得到发展与改进, 但目前仍然没有找到消除抑制剂的有效方法, 极大程度上限制了该技术在实际检测工作中的应用。

针对 PCR 反应中存在假阳性和假阴性而影响其检测准确率的问题, 本研究利用生物信息学方法发掘出一条副溶血弧菌高度特异的新检测靶点 (vp1332), 并在此基础上, 将一条人工构建的扩增内标 (internal amplification control, IAC) 引入 PCR 检测体系, 以克服上述假阳性和假阴性的问题。

**基金项目:** 上海市科委项目 (09DZ0503300, 091422021200, 08DZ0504200); 国家科技支撑计划世博科技专项 (2009BAK43B31)

\* 通信作者。Tel: +86-21-34206616; E-mail: xmshi@sju.edu.cn

**作者简介:** 何晓华 (1984-), 女, 浙江人, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全。E-mail: hexiehua123456@sju.edu.cn

**收稿日期:** 2009-10-24; **修回日期:** 2009-12-28

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 菌株:以 296 株副溶血弧菌为阳性菌株、33

株非副溶血弧菌为阴性菌株,用于 PCR 体系的评价,标准菌株购于中国科学院微生物研究所或由上海出入境检验检疫局馈赠,其余为上海交通大学食品安全与微生物研究室保存菌株,见表 1。

表 1 菌株及 PCR 检测结果

Table 1 Bacterial strains used in this study and the detective results

Bacterial species	No. of strains	PCR results		
		vp1332	tl <sup>[18]</sup>	toxR <sup>[19]</sup>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC17802	1	+	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC33846	1	+	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	294	+	+	+
<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC27562	1	-	-	-
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC33842	1	-	-	- <sup>a</sup>
<i>Vibrio mimicus</i> ATCC33653	1	-	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
<i>Vibrio fluvialis</i> ATCC33810	1	-	- <sup>a</sup>	-
<i>Vibrio anguillarum</i>	1	-	-	- <sup>a</sup>
<i>Vibrio damsela</i>	1	-	-	-
<i>Vibrio campbelli</i> ATCC33863	1	-	- <sup>a</sup>	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	-	+	-
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC25871	1	-	+	+
SGL*	1	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> O114	1	-	ND	ND
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	1	-	ND	ND
<i>Hemoclastic Escherichia coli</i>	1	-	ND	ND
<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC29544	1	-	ND	ND
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC12453	1	-	ND	ND
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC33420	1	-	ND	ND
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC27336	1	-	ND	ND
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC700323	1	-	ND	ND
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047	1	-	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC43889	1	-	ND	ND
<i>Shigella flexneri</i> CMCC51311	1	-	ND	ND
<i>Enterococcus avium</i> ATCC14025	1	-	ND	ND
<i>Shigella dysenteriae</i> CMCC51335	1	-	ND	ND
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC8090	1	-	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CDC B32116	1	-	ND	ND
<i>Serratia marcescens</i> ATCC27592	1	-	ND	ND
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	1	-	ND	ND
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	1	-	ND	ND
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC27270	1	-	ND	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC49452	1	-	ND	ND
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644	1	-	ND	ND
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC15313	1	-	ND	ND
<i>Listeria monocytogenes</i> 50002	1	-	ND	ND

Results of PCR positive (+) & negative (-) indicate the presence and absence of 343 bp product respectively;<sup>a</sup> Present non-specific amplification bands; \* *Vibrio* group I. freshwater subgroup; ND: Not detected

**1.1.2 主要试剂和仪器:** *Taq* 酶、10 × PCR buffer、dNTPs 均购自天根生化科技(北京)有限公司;载体 pMD 19-T 购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;PTC-200 PCR 扩增仪为美国 MJ 公司产品;紫外核酸与蛋白质分析仪 DU800 型为美国贝克曼库尔特有限公司(Beckman Coulter)产品。

## 1.2 副溶血弧菌基因组 DNA 的提取及纯度测定

参照 Panicker 等<sup>[20]</sup>的方法提取副溶血弧菌基因组 DNA,并将所提取的基因组 DNA 放置 -20℃ 保存。

**DNA 纯度测定:**将所提基因组 DNA 用无菌水稀释 100 倍,用 DU-800 紫外分光光度计(Beckman Coulter 公司,美国)在波长 260 nm 和 280 nm 下测

定基因组 DNA 的纯度与浓度。

### 1.3 引物设计及特异性验证

利用生物信息学方法, 比较副溶血弧菌与非副溶血弧菌的全基因组序列, 从中发掘出 61 条特异靶序列, 比对分析后找出其保守区段, 利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International 公司, 美国) 进行引物设计, 再进行 PCR 反应验证 (所用菌株如表 1 所示)。最终筛选出一对性能优良的副溶血弧菌特异检测引物 vp1332L 和 vp1332R (表 2), 可扩增到一条 343 bp 的特异片段。经检索, 此片段来至于一条可能编码 ABC 转运子接合蛋白组分 (probable binding protein component of ABC

transporter) 的基因。

### 1.4 扩增内标的构建

采用复合引物法<sup>[21]</sup>构建扩增内标, 构建过程如图 1 所示。选择一段来源于副溶血弧菌的 DNA 片段 (461 bp) (根据扩增内标与目的片段之间的同源序列长度不超过 20 bp 的原则来选择扩增内标), 在扩增内标引物 VPA0739L 和 VPA0739R (表 2) 的 5' 末端连接上目标检测引物形成一对约 40 bp 的长引物 NBL 和 NBR (表 2), 经长引物 PCR 扩增后得到 499 bp 的扩增内标<sup>[22]</sup>。扩增内标插入到载体 pMD 19-T (宝生物工程有限公司, 大连) 中, 再转入大肠杆菌, 于甘油管在  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。

表 2 引物序列

Table 2 Sequences of all the primers utilized in this study

Names	Sequences (5'→3')	Length/bp
VPA0739L	GGTTTATTTCCAAGGTGAGC	20
VPA0739R	TGATTCGCTTGATCCTGTC	19
vp1332L	CGTTAGCGGAACAAGGTGT	19
vp1332R	TAGCCTCGCTCAGCTTGTA	19
NBL	CGTTAGCGGAACAAGGTGT GGTTTATTTCCAAGGTGAGC	39
NBR	TAGCCTCGCTCAGCTTGTA TGATTCGCTTGATCCTGTC	38

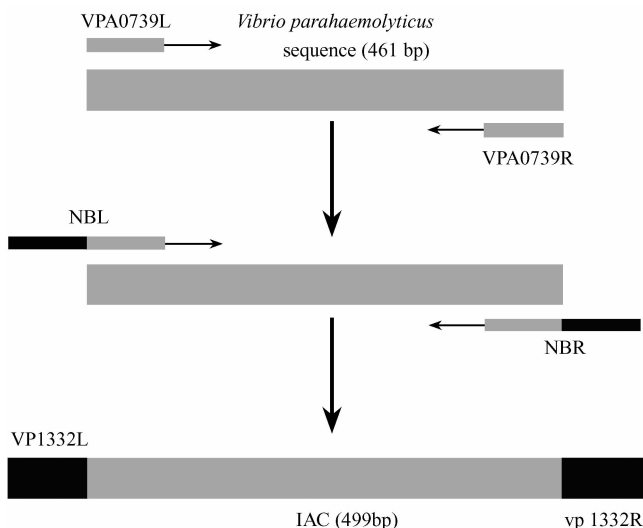


图 1 IAC 构建示意图

Fig. 1 Scheme of IAC construction by the compound primers technology.

### 1.5 PCR 扩增

PCR 反应体系的最终体积控制在  $20\ \mu\text{L}$ , 其中含  $10 \times$  PCR 缓冲液  $2.0\ \mu\text{L}$ ,  $25\ \text{mmol/L}$  的  $\text{MgCl}_2$   $1.5\ \mu\text{L}$ ,  $2.5\ \text{mmol/L}$  的 dNTP  $1\ \mu\text{L}$ ,  $10\ \mu\text{mol/L}$  的引物各  $0.5\ \mu\text{L}$ , 模板  $2-5\ \mu\text{L}$ , 扩增内标溶液  $1\ \mu\text{L}$ ,  $2.5\ \text{U}/\mu\text{L}$  的 TaqDNA 聚合酶 (天根生化科技有限公司, 北京)  $0.4\ \mu\text{L}$ 。PCR 循环参数: 在  $94^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\ \text{min}$ , 接着 35 个循环, 每个循环的程序包括  $94^{\circ}\text{C}$  变

性  $30\ \text{s}$ ,  $58^{\circ}\text{C}$  退火  $30\ \text{s}$ ,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $30\ \text{s}$ , 循环结束后在  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $10\ \text{min}$ 。用  $1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳观察结果, 以无菌水为模板作空白对照。

### 1.6 样品的采集

所有样品均购于上海的农贸市场和超市, 明细见表 3。

### 1.7 人工污染样品的制备

副溶血弧菌标准菌株 (ATCC33846) 经过 6 h 的

纯培养之后,用生理盐水作 10 倍梯度稀释,并分别取稀释度为  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  的菌液作平板计数,计算副溶血弧菌纯培养物的起始浓度。取 10 份无菌虾肉(每 3 份为一实验组,另一份作为空白对照组),每份 25 g,空白对照组加入 1 mL 生理盐水,3 组实验组分别加入  $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$  3 个稀释度的副溶血弧菌菌悬液各 1 mL,根据副溶血弧菌的起始浓度计算每份样品的起始接菌量,每组设 3 个平行重复。

### 1.8 人工污染样品的增菌及样品中副溶血弧菌基因组 DNA 的提取

将上述 9 份人工污染及空白对照组的样品(25 g)添加到 225 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水(APW, 3% NaCl) 增菌培养基中。37°C, 摇床培养(150 r/min), 每隔 2 h 取样 1 次。每份样品取 1 mL, 放入 1.5 mL 离心管中,并用煮沸法<sup>[23]</sup>提取基因组 DNA,最后,取 5  $\mu$ L DNA 溶液为 PCR 模板,进行添加有扩增内标的 PCR 检测,同时,以副溶血弧菌基因组 DNA 为模板作阳性对照,以无菌水作阴性对照。

## 2 结果

### 2.1 副溶血弧菌纯培养基因组 DNA 及扩增内标的定量测定

副溶血弧菌标准菌株(ATCC33846)基因组 DNA 和从大肠杆菌中提取携带扩增内标的质粒(pMD-VPA0739),经 DU-800 紫外分光光度计测量,其含量分别为  $1.2 \times 10^3$  ng/ $\mu$ L 和 15.0 ng/ $\mu$ L。根据文献<sup>[24]</sup>中的计算公式可以得到 1  $\mu$ L 扩增内标的拷贝数为  $4.29 \times 10^9$ 。

### 2.2 特异性评价

采用本研究建立的 PCR 反应体系对表 1 所列的 296 株副溶血弧菌以及 33 株非副溶血弧菌分别进行检测,发现以副溶血弧菌基因组 DNA 为模板皆能扩增出 343 bp 大小的目的产物,而以非副溶血弧菌基因组 DNA 为模板时只能扩增出 499 bp 的扩增内标(表 1)。同时,将本研究设计的种特异检测引物与已发表的两对比较公认的种特异检测引物进行了平行对比实验,结果这两对引物的特异性与本研究所用引物的特异性大部分是一致的,但引物 t1 则能扩增出 3 株假阳性,引物 toxR 也能扩增出 2 株假阳性,同时,两对引物若以非副溶血弧菌的 DNA 为

模板则部分还能扩增出一些非特异条带(表 1)。

### 2.3 纯培养物的检测灵敏度

将副溶血弧菌标准菌株(ATCC33846)纯培养物用无菌生理盐水作 10 倍梯度稀释,并分别取稀释度为  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  的菌液作平板计数,平板计数结果:纯培养物起始菌液浓度为  $1.6 \times 10^9$  cfu/mL。同时,取各稀释度的菌液 1 mL,用煮沸法提取 DNA,取 2  $\mu$ L 进行 PCR 扩增反应,扩增结果如图 2,当菌液浓度为  $1.6 \times 10^1$  cfu/mL 时未出现目标扩增带,其他较高浓度的菌液均能扩增出目的片段,因此,判定本研究建立的副溶血弧菌 PCR 体系的检测灵敏度为  $1.6 \times 10^2$  cfu/mL。

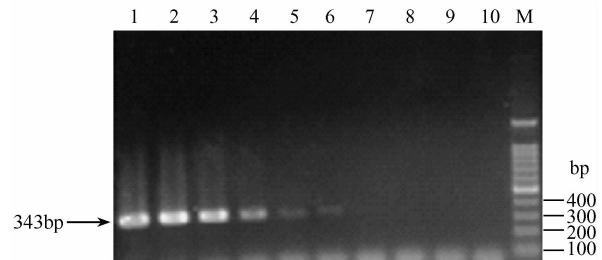


图 2 副溶血弧菌纯培养物检测灵敏度的评价

Fig. 2 Sensitivity of detection for *V. parahaemolyticus* bacteria. Lane 1-10 Concentrations of *Vibrio parahaemolyticus* bacteria:  $1.6 \times 10^7$  cfu/mL,  $1.6 \times 10^6$  cfu/mL,  $1.6 \times 10^5$  cfu/mL,  $1.6 \times 10^4$  cfu/mL,  $1.6 \times 10^3$  cfu/mL,  $1.6 \times 10^2$  cfu/mL,  $1.6 \times 10^1$  cfu/mL, 1.6 cfu/mL,  $1.6 \times 10^{-1}$  cfu/mL, negative control; M: 100bp ladder marker.

将含扩增内标的质粒用无菌水作 10 倍梯度稀释,然后在上述的 PCR 检测体系中分别加入不同浓度的扩增内标,研究扩增内标对检测灵敏度的影响,结果如图 3。

未添加扩增内标时,PCR 反应体系的检测灵敏度为 30.0 fg/ $\mu$ L,当 PCR 反应体系添加扩增内标的量为  $4.29 \times 10^3$  拷贝/PCR 时,其灵敏度仍然为 30.0 fg/ $\mu$ L(图 3-B),即添加  $4.29 \times 10^3$  拷贝/PCR 的扩增内标对上述 PCR 检测体系的灵敏度几乎没有影响;当 PCR 反应体系添加扩增内标的量为  $4.29 \times 10^2$  拷贝/PCR 时,由于其扩增产物的浓度较低,在琼脂糖凝胶电泳图上不能显示条带,达不到指示假阴性结果的目的;当 PCR 反应体系添加扩增内标的量为  $4.29 \times 10^4$  拷贝/PCR 时,检测灵敏度为 300.0 fg/ $\mu$ L(图 3-A),因此,在本研究建立的 PCR 检测体系中扩增内标的添加量则采用  $4.29 \times 10^3$  拷贝/PCR。

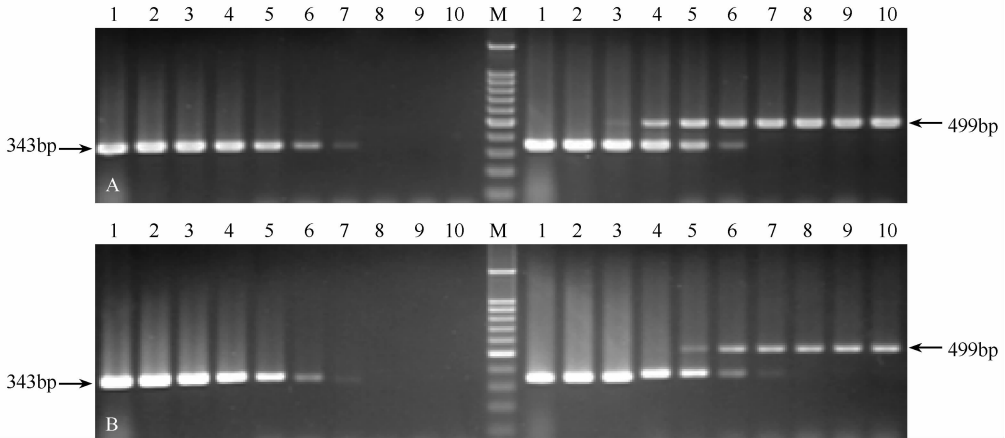


图3 添加了 IAC 的副溶血弧菌检测灵敏度评价

Fig. 3 Sensitivity of detection for *V. parahaemolyticus* purified genomic DNA with IAC. A: Concentrations of IAC:  $4.29 \times 10^4$  copies/PCR; B: Concentrations of IAC:  $4.29 \times 10^3$  copies/PCR; 1-10 Concentrations of purified genomic DNA: 30 ng/ $\mu$ L, 3.0 ng/ $\mu$ L, 300.0 pg/ $\mu$ L, 30.0 pg/ $\mu$ L, 3.0 pg/ $\mu$ L, 300.0 fg/ $\mu$ L, 30.0 fg/ $\mu$ L, 3.0 fg/ $\mu$ L, 0.3 fg/ $\mu$ L, negative control; M: 100 bp ladder marker.

## 2.4 人工污染食品样品的检测

在无茵虾肉中人工接入副溶血弧菌(起始菌液

浓度为  $1.24 \times 10^9$  cfu/mL), 每组每 25 g 样品的接入量分别为 1.24 cfu、12.4 cfu 和 124 cfu。按照方法

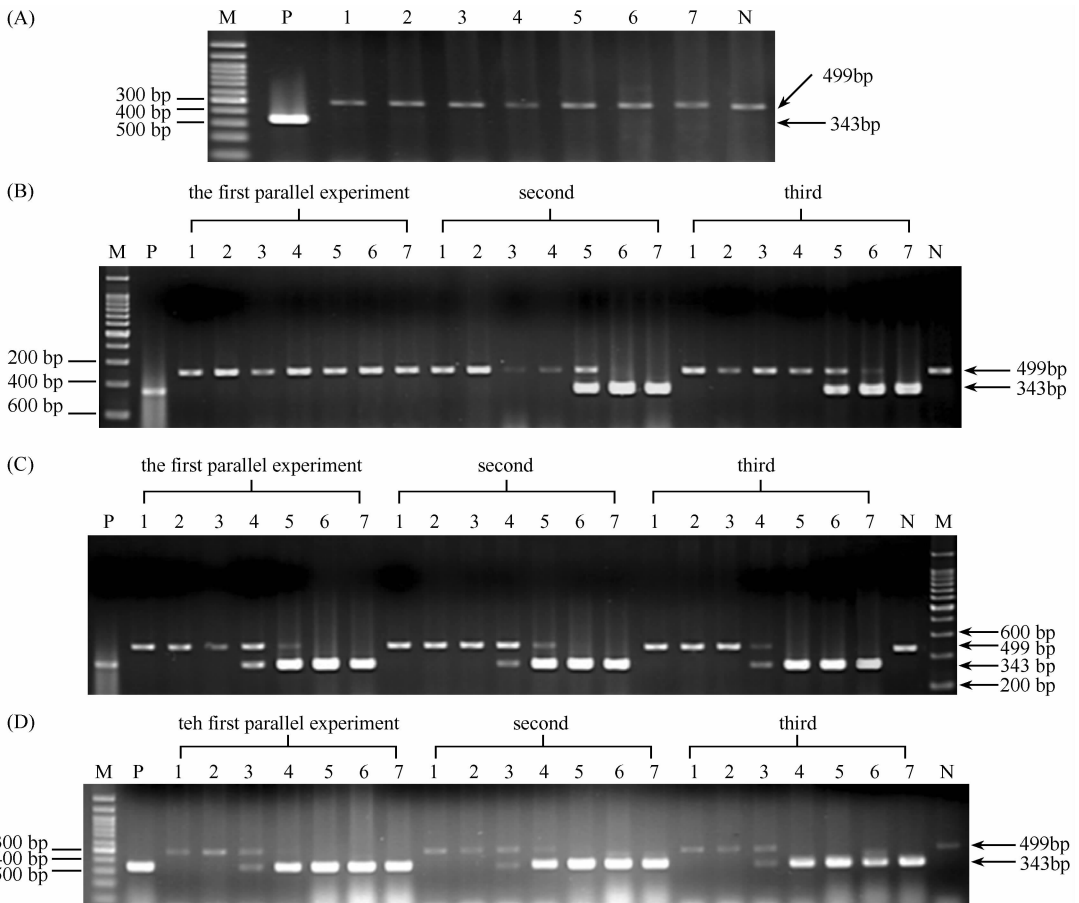


图4 人工污染副溶血弧菌的虾肉样品 PCR 检测结果

Fig. 4 Detection for *V. parahaemolyticus* in artificially contaminated samples. A: Negative control group; B: Input concentrations of *V. parahaemolyticus* in 25g samples: 1.24 cfu/25g; C: Input concentrations of *V. parahaemolyticus* in 25g samples: 12.4 cfu/25g; D: Input concentrations of *V. parahaemolyticus* in 25g samples: 124 cfu/25g. 1-7 Enrichment times: 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h; N: negative control; M: 100 or 200 bp ladder marker.

1.7 增菌后进行添加有扩增内标的 PCR 检测。由图 4 可以看出,起始接入量为 1.24 cfu 时,增菌培养 8 h 及以上,污染的虾肉样品均可扩增到特异目标条带;而空白对照组没有扩增到特异目标条带,只扩增到扩增内标条带。说明建立的检测体系,经 8 h 增菌,就可以从起始染菌量为 1.24 cfu/25 g 样品中检测到副溶血弧菌。

## 2.5 食品样品的检测

采集 102 份水产品样品,所有样品的处理均依照 ISO/PDTS 21872-1 以及国标 GB/T 4789.7-2008。每份取 25 g,移入 225 mL 的 APW(3% NaCl)增菌培

养基中,37℃,摇床培养(150 r/min)增菌 10 h。按照方法 1.7 提取副溶血弧菌基因组 DNA 进行添加扩增内标的 PCR 检测,结果如表 3 所示,52 份为阳性,42 份阴性,8 份 PCR 反应受到抑制(既未扩增到目的条带,也未扩增到扩增内标条带)。出现 PCR 反应受到抑制现象的样品经过模板 DNA 稀释处理,再次进行检测,2 份为阳性,6 份为阴性。这说明从这 2 份假阴性样品中提取的模板 DNA 溶液中存在着抑制因子。本研究建立的检测体系在进行大量样品检测时确实能够指示假阴性,有助于提高检测的准确率。

表 3 用于副溶血弧菌检测的食品及其检测结果

Table 3 Detective results of all the natural seafood samples

Food samples	No.	National standard method (P/N)	Positive results (No.)	Negative results (No.)	False-negative results (No.)	Positive rates /%	Negative rates/%	False-negative rates/%
shrimp	37	18/19	22	15	0	59.46	40.54	0
fish	34	2/32	4	24	6	11.76	70.59	17.65
crab	21	13/8	20	1	0	95.24	4.76	0
mussels	10	6/4	6	2	2	60	20	20
total	102	39/63	52	42	8	50.98	41.18	7.84

## 3 讨论

目前,常用于 PCR 检测副溶血弧菌的靶基因有 *tl*, *tdh*, *trh*, *toxR* 等<sup>[1,9-14]</sup>,将这些基因的序列在 GenBank 数据库中做 BLAST 分析,发现它们与其他弧菌都具有较高的同源性<sup>[15]</sup>,如 *tl* 和 *toxR* 基因分别与哈维氏弧菌有 78% 和 88% 的同源性,*tdh* 基因与最小弧菌有 96% 的同源性,*trh* 基因与溶藻弧菌的同源为 91%。用这些基因为靶点设计引物进行 PCR 检测容易出现假阳性结果(表 1)。因此,寻找特异性高的检测靶点用于检测副溶血弧菌是十分必要的。本研究发掘出的特异检测靶点,与其他弧菌及非弧菌致病菌同源性非常低,降低了假阳性出现的机率。此外,本研究对已发表的引物 *tl*<sup>[18]</sup> 和 *toxR*<sup>[19]</sup> 也同时进行了对比灵敏度实验,发现两对引物的灵敏度均低于本研究所发掘引物的灵敏度(*tl* 的检测灵敏度为  $1.6 \times 10^3$  cfu/mL,; *toxR* 为  $1.6 \times 10^4$  cfu/mL)。同时,以本研究发掘的靶点并结合新构建的扩增内标来建立副溶血弧菌 PCR 检测体系,既起到指示假阴性的作用,又进一步避免了假阳性结果的出现,从而提高该检测方法的可信度。

本研究构建的扩增内标与目的基因之间的同源性非常低,两者不会通过互补链的结合而交联在一起,从而不会影响检测灵敏度。如图 3 所示,由于扩增内标的两端分别连接有目标检测引物 vp1332L 和 vp1332R,扩增内标与目的片段可利用同一对引物在同一 PCR 反应中同时进行扩增,二者之间会存在

竞争,所以,选择适宜的扩增内标添加浓度至关重要。在本研究建立的 PCR 检测体系中,当含有扩增内标的质粒拷贝数为  $4.29 \times 10^3$  拷贝/PCR 时,几乎不会降低检测的灵敏度(30.0 fg/ $\mu$ L)。

由图 4 可知,只需增菌 8 h 即可达到 1.24 cfu/25 g 的检测灵敏度。此外,从图 4 中也可以看出,设置平行实验有助于提高实验结果的可靠性。当起始染菌量为 1.24 cfu/25g 时,第一组平行实验中没有出现目的扩增条带,但由于设置了三组平行实验,所以从后两组平行实验结果可评估第一组平行实验出现错误结果的可能性,这可能是由于实验操作误差引起的,而设置平行实验即可排除这种实验误差。

食品中的副溶血弧菌存在量较少,且部分可能以“亚致死”状态存在,增菌培养是必要的,并且,增菌时间的长短也十分重要。一般来说,不宜过短。本研究对 15 份水产品样品进行不同增菌时间对检测结果的影响实验,增菌时间以国标法中的下限为依据来设计实验,当增菌时间为 4 h 时,15 份食品样品检测结果出现 1 份假阴性;若将增菌时间延长至 10 h 时,此份样品的假阴性检测结果转为阳性,所以本研究结合国标 GB/T 4789.7-2008 的要求,将所有样品的增菌时间均设定为 10 h。同时,本研究的实验结果也显示,从增菌培养到确定检测结果可以在 14 h 内完成。此外,食品样品检测实验也说明,本研究所建立的检测体系可以借助扩增内标指示假阴性,并通过校正措施来得到正确的实验结果。本研究中对 102 份食品样品进行检测,在 PCR 检测体

系未添加扩增内标前,其阳性检出率为 50.98% (52/102),而添加扩增内标,阳性检出率为 52.94% (54/102),说明本研究所建立的添加有扩增内标的 PCR 检测体系能提高检测的准确率。

在本研究中,传统检测方法的阳性率比 PCR 方法低。通过国标检测方法对样品进行重复检测时,我们发现,重复之间结果本身就有误差(误差为 4/39),这是因为在 TCBS 选择性培养基上挑选阳性菌落时,靠肉眼很难将副溶血弧菌和形态特征相近的杂菌区分开来<sup>[25]</sup>,这一现象在我们实验室和一些法定检测部门实验室都存在。其次,由于本研究所检测的食品样品均为冷冻食品,而副溶血弧菌是不耐低温的,在冰冻条件下会大量死亡,幸存的细胞则可能处于亚致死的状态,成为存活的非可培养状态<sup>[26]</sup>,用国标方法检测时呈阴性结果,但这些亚致死状态的细胞用 PCR 方法检测时为阳性结果,从这一角度来说 PCR 方法的灵敏度较国标方法高,无论副溶血弧菌是亚致死状态还是活菌状态均能检测出来,从而呈现“阳性”结果。在本研究的样品调查实验中,只要国标检测方法鉴定是阳性的样品,经 PCR 方法都证实其为阳性,说明本研究建立的 PCR 方法未出现漏检现象。如果样品中存在亚致死状态的细胞,则 PCR 方法对这一样品的检测结果是“真阳性”,因为这些亚致死状态细胞进入人体后很容易修复、大量生长繁殖,对人体产生危害。因此,从这一意义上讲,国标方法并不是“金标准”,这正是国标方法也需要不断完善或修订的理由。最后,这 13 份 PCR 检测呈阳性而国标法复检仍为阴性的样品,我们对 PCR 产物进行了测序验证,所有产物序列与目的基因序列的同源性均在 99% 以上,这意味着测序结果验证了 PCR 检测的阳性结果。

综上所述,本研究的结果表明:(1)新发掘的靶点特异性及灵敏度均较高,可以有效排除假阳性;(2)新建立的 PCR 检测体系中添加了一条人工构建的扩增内标,能有效地排除假阴性,两者均有助于提高 PCR 检测的可信度;(3)设置平行实验可排除一些实验误差造成的错误结果。本研究建立的新的 PCR 检测体系,当扩增内标浓度添加适宜时既不降低检测灵敏度又可有效地排除假阴性,并能应用于多类食品的检测,为检测副溶血弧菌提供了一种更为方便、准确、有效的方法。

## 参考文献

[1] Zhu DS, Zhou M, Fan YL, et al. Identification of New Target Sequences for PCR Detection of *Vibrio Parahaemolyticus* by Genome Comparison. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 2009, 17 (1): 67-79.

[2] 孟昭赫. 中国副溶血性弧菌的研究. 中国腹泻病控制讨论会论文集, 1996, 91 - 94.

[3] 张淑红, 申志新, 王英豪. 副溶血性弧菌污染现状及其研究进展. *中华医学研究杂志 (Journal of Chinese Medicine Research)*, 2006, 6: 408-409.

[4] 欧剑鸣. 台湾地区副溶血性弧菌食中毒. *海峡预防医学杂志 (Strait Journal of Preventive Medicine)*, 1999, 5: 74-75.

[5] 河端俊治, 编著. 实用食品卫生学. 张洪祥, 等译. 北京: 北京大学出版社, 1992.

[6] 曹严华. 日本 1996—1998 年的副溶血弧菌感染. *疾病监测 (Disease Surveillance)*, 2000, 15: 396-397.

[7] 王小玉, 冯家望, 吴小伦, 等. 实时荧光 PCR 方法检测副溶血性弧菌的研究. *食品研究与开发 (Food Research and Development)*, 2007, 28: 135-138.

[8] Thompson F, Iida T, Swings J. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68 (3): 403-431.

[9] 徐晓可, 吴清平, 张菊梅, 等. 水产品中副溶血性弧菌特异性二重 PCR 检测方法的研究. *食品与机械 (Food and Machinery)*, 2008: 90-93.

[10] Chakraborty R, Surendran P, Joseph T. Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from seafoods along the southwest coast of India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008; 24 (10): 2045-2054.

[11] Alam M, Chowdhury WB, Bhuiyan NA, et al. Serogroup, Virulence, and Genetic Traits of *Vibrio parahaemolyticus* in the Estuarine Ecosystem of Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (19): 6268-6274.

[12] Croci L, Suffredini E, Cozzi L, et al. Evaluation of different polymerase chain reaction methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated by cultural methods. *Journal of AOAC International*, 2007, 90 (6): 1588-1597.

[13] 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*. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36 (3): 215-225.

[14] Croci L, Suffredini E, Cozzi L, et al. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102 (1): 229-237.

[15] Luan XY, Chen JX, Zhang XH, et al. Comparison of different primers for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* using the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 44 (3): 242-247.

[16] 李莉, 蒋作明. PCR 技术在食品沙门氏菌检测中的应用. *食品科技 (Food Science and Technology)*, 2002, 60-62.

[17] 卢强, 陈贵连. PCR 扩增 *invA* 基因特异性检测沙门氏菌. *中国兽医学报 (Chinese Journal of Veterinary Science)*, 1994, 14: 251-256.

[18] Rosec JP, Simon M, Causse V, et al. Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish: Comparison of PCR protocols using *pR72H* or *toxR* targets with a culture method. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 129 (2): 136-145.

- [19] Terzi G, Buyuktanir O, Yurdusev N. Detection of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates in fish and mussels from Middle Black Sea Coast of Turkey. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 49: 757 - 763.
- [20] Panicker G, Call DR, Krug MJ, et al. Detection of pathogenic *Vibrio spp.* in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (12): 7436-7444.
- [21] Siebert P, Larrick J. PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques*, 1993, 14 (2): 244.
- [22] 刘斌, 史贤明. 扩增内标在沙门氏菌 PCR 检测方法中的应用. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2006, 33 (2): 156-161.
- [23] Bilung LM, Radu S, Bahaman AR, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadara granosa*) by PCR. *Fems Microbiology Letters*, 2005, 252 (1): 85-88.
- [24] Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, et al. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (1): 290-296.
- [25] 高旗利, 罗茂凰, 张海滨, 等. 改良方法检验冷冻海产品中副溶血性弧菌. *中国国境卫生检疫杂志 (Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine)*, 2004, 27: 47-49.
- [26] 邱波, 姚斐, 姚怡, 等. 低温对常见致病弧菌菌种保存的影响. *职业与健康 (Occupation and Health)*, 2003, 19: 53-54.

## Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR method with internal amplification control

Xiaohua He<sup>1</sup>, Shuijing Yu<sup>1</sup>, Wanyi Chen<sup>1</sup>, Chunlei Shi<sup>1</sup>, Jianghong Meng<sup>2</sup>,  
Xianming Shi<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Joint Sino-US Food Safety Research Center and Bor Luh Food Safety Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(<sup>2</sup>Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition (JIFSAN) and Department of Nutrition and Food Science, University of Maryland, College Park, Maryland 20742, USA)

**Abstract:** [ **Objective** ] The aim of the study was to explore a new detective target in *Vibrio parahaemolyticus*, which was more specific than others at present, to construct an internal amplification control (IAC), and finally to develop a new PCR system which could effectively eliminate false-negative results. [ **Methods** ] Genomic comparison analysis was used to explore *V. parahaemolyticus* specific targets, which were then evaluated and used to design specific primers. An IAC was constructed by the compound primer technology. PCR parameters were optimized, and its reaction system was developed. [ **Results** ] A *V. parahaemolyticus* species-specific sequence (*vp1332*) which encodes probable binding protein component of ABC transporter was mined and selected as a detection target. A pair of specific primers (*vp1332L/vp1332R*) was designed based on this sequence for the development of a PCR assay. An internal amplification control was constructed and added into the PCR detection system, which was co-amplified with the target sequence so as to indicate the existence of inhibitors. Specificity of this PCR system was tested with 296 *V. parahaemolyticus* strains and 33 non-*V. parahaemolyticus* strains, and the results showed that there was a 343-bp amplicon resulted from all *V. parahaemolyticus* strains, while there was no this amplicon but only a 499-bp IAC amplicon appeared for all non-*V. parahaemolyticus* strains. The detection limit of this assay for purified *V. parahaemolyticus* genomic DNA was  $1.6 \times 10^2$  cfu/mL. Artificial contamination assays showed that *V. parahaemolyticus* could be detected after eight hours enrichment when the original concentration of this bacterium was 1.24 cfu/25 g. The PCR method developed in this study was also evaluated with Seafood samples, and the results demonstrated that it worked effectively. [ **Conclusion** ] A novel PCR method was successfully developed in this study, which could effectively detect *V. parahaemolyticus* with high accuracy and could especially eliminate false-negative results.

**Keywords:** *V. parahaemolyticus*; PCR; internal amplification control; false-negative

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Grants 09DZ0503300, 091422021200, 08DZ0504200 from the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality and the Special Grant 2009BAK43B31 for Expo from the Ministry of Science and Technology of China

\* Corresponding author. Tel: +86-21-34206616; E-mail: xmshi@sjtu.edu.cn

Received: 26 October 2009 / Revised: 28 December 2009