

# 四种食源性致病弧菌多重实时荧光定量 PCR 快速检测体系的建立

马梦洁<sup>1,2,3</sup>, 曹钰佳<sup>1</sup>, 刘平平<sup>1</sup>, 许剑锋<sup>1,3</sup>, 喻勇新<sup>1,3</sup>, 马晨晨<sup>\*1,2</sup>

1 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306

2 上海市食品研究所, 上海 200235

3 上海海洋大学 农业农村部水产品质量安全贮藏保鲜风险评估实验室, 上海 201306

马梦洁, 曹钰佳, 刘平平, 许剑锋, 喻勇新, 马晨晨. 四种食源性致病弧菌多重实时荧光定量 PCR 快速检测体系的建立[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3179-3188.

MA Mengjie, CAO Yujia, LIU Pingping, XU Jianfeng, YU Yongxin, MA Chenchen. A multiplex real time fluorescence quantitative PCR method for rapid detection of four foodborne pathogenic species of *Vibrio*[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3179-3188.

**摘要:**【背景】弧菌在全球范围内严重威胁人类健康, 副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)和创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)与食用生的或未煮熟的海鲜所引起的胃肠道感染和败血症有关, 因而备受关注。【目的】建立一种实时荧光定量 PCR 方法, 用于检测副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌, 以提高检测效率和准确性。【方法】基于副溶血性弧菌和拟态弧菌的 *toxR* 基因、霍乱弧菌的 *ompW* 基因、创伤弧菌的 *vvhA* 基因设计特异性引物和探针, 通过优化反应体系和条件建立四重实时荧光定量 PCR 体系。【结果】该实时荧光定量 PCR 方法检测限均为 10 copies/ $\mu$ L, 扩增效率均在 100%左右; 在特异性试验中, 分别运用多重实时荧光定量 PCR 和常规 PCR 对目的菌基因组、非目的菌基因组和空白对照进行扩增, 结果均只有目的弧菌扩增明显, 表明本方法有良好的特异性; 在抗干扰实验中, 高浓度弧菌不干扰低浓度弧菌检测; 每个浓度梯度进行 3 次重复实验, 每组变异系数均小于 1.5%, 表明本方法重复性好。【结论】建立的多重实时荧光定量 PCR 方法可快速、特异地实现对副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌的检测。

**关键词:** 副溶血性弧菌; 霍乱弧菌; 拟态弧菌; 创伤弧菌; 四重实时荧光定量 PCR

资助项目: 上海海洋大学青年教师科研启动基金(A2-2006-22-200315); 上海市科学技术委员会 2022 年度“创新行动计划”农业领域项目(22N31900700)

This work was supported by the Shanghai Ocean University Young Teachers Research Initiation Fund (A2-2006-22-200315), and the 2022 Annual Plan of Action for Scientific and Technological Innovation of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (22N31900700).

\*Corresponding author. E-mail: ccma@shou.edu.cn

Received: 2023-11-10; Accepted: 2024-01-17; Published online: 2024-03-28

# A multiplex real time fluorescence quantitative PCR method for rapid detection of four foodborne pathogenic species of *Vibrio*

MA Mengjie<sup>1,2,3</sup>, CAO Yujia<sup>1</sup>, LIU Pingping<sup>1</sup>, XU Jianfeng<sup>1,3</sup>, YU Yongxin<sup>1,3</sup>, MA Chenchen<sup>\*1,2</sup>

1 College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Shanghai Food Research Institute, Shanghai 200235, China

3 Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China

**Abstract:** **[Background]** *Vibrio* species pose a serious threat to human health worldwide. *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus* and *V. vulnificus* capable of causing gastrointestinal infections and sepsis associated with consumption of raw or undercooked seafood are of particular concern. **[Objective]** To develop a real time fluorescence quantitative PCR method with improved efficiency and accuracy for the detection of *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, and *V. vulnificus*. **[Methods]** The specific primers and probes were designed based on *toxR* of *V. parahaemolyticus* and *V. mimicus*, *ompW* of *V. cholerae*, and *vvhA* of *V. vulnificus*. A quadruplex real time fluorescence quantitative PCR method was established by optimizing the reaction system and conditions. **[Results]** The minimum detection limit of the real time fluorescence quantitative PCR method was 10 copies/ $\mu$ L, and the amplification efficiency was about 100%. In the specificity test, multiplex real time fluorescence quantitative PCR and conventional PCR were used to amplify the target bacteria genome, non-target bacteria genome and blank control strain genome, respectively. The results showed that only the target vibrio genome was amplified significantly, indicating that the method had good specificity. In the anti-interference experiment, high concentration *Vibrio* did not interfere with the detection of low concentration *Vibrio*. Three repeated experiments were performed for each concentration gradient, and the coefficient of variation of each group was less than 1.5%, indicating that the method was reproducible in this experiment. **[Conclusion]** The multiplex real time fluorescence quantitative PCR method was established, which could detect *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, and *V. vulnificus* specifically and rapidly.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*; *Vibrio cholerae*; *Vibrio mimicus*; *Vibrio vulnificus*; quadruplex real time fluorescence quantitative PCR

食品和环境中的致病菌严重威胁着人类健康, 其中弧菌感染愈发普遍。弧菌属是一类革兰氏阴性、嗜盐细菌<sup>[1-2]</sup>, 弧菌属种类繁多, 其中至少有 12 种与人类感染相关<sup>[3-4]</sup>, 副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*, VC)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*, VV)和拟态弧菌(*Vibrio mimicus*, VM)是较常见的致病性弧菌。副溶血性弧菌、霍乱弧菌和拟态弧菌的感染通常是由于人们食用了受污染的海产

品, 或者是接触感染源后细菌进入人体肠道繁殖并产生毒素, 引起急性胃肠炎; 而创伤弧菌的感染主要是因伤口暴露于海水或食用受污染的海产品, 从而引起皮肤感染、关节炎和败血症等<sup>[5-7]</sup>。弧菌广泛分布在海水和海产品中, 对人类的健康存在严重威胁<sup>[8-10]</sup>, 随着弧菌感染在全球范围内的不断增加, 建立一种快速检测 4 种弧菌的方法, 对于及时发现和控制这些病原菌的感染具有重要意义。

传统检测弧菌的方法包括分离培养、生化试验和血清检测,但这些方法存在一定的局限性,如流程复杂、耗时较长,并且容易受到环境、培养条件等因素的干扰,无法满足快速、高通量检测的需求,并且一些弧菌属可在寡营养条件下经低温诱导进入活的非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态<sup>[11-12]</sup>,需要使用一些特定的技术手段来检测。Senachai 等<sup>[13]</sup>利用 PCR 技术检测 4 种弧菌的 DNA,其缺点是容易受到外源性污染、非特异性扩增和无法定量。使用免疫学方法检测细菌的蛋白质或其他生物标志物,其缺点是操作复杂,而且结果易受其他微生物的干扰,不是检测弧菌的首选方法<sup>[14]</sup>。王海波等<sup>[15]</sup>建立的多重实时荧光定量 PCR 的检测限为  $10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ 。鉴于实时荧光定量 PCR 技术的优点是操作简便快速、高灵敏性和高特异性<sup>[16-18]</sup>,并且无须对 PCR 产物进行处理。因此,本实验选取弧菌种特异性基因设计引物和探针,以期建立具有更低检测限度的四重实时荧光定量 PCR 检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli*) O157:H7 (P224)、副溶血性弧菌、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*) (VA345)、沙门氏菌(*Salmonella*) (SL112)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) (5345)、创伤弧菌、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) (Bt1129)、志贺氏菌(*Shigella*) (533)、拟态弧菌、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) (734)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (SA-1508)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*) (PV32)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) (LM-1519)、霍乱弧菌和产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) (632)均为本实验室保存。76 份鱼虾和生蚝样品

来自上海某海鲜市场。

### 1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 培养基,生工生物工程(上海)股份有限公司。细菌基因组 DNA 提取试剂盒、高纯度质粒小提中量试剂盒与海洋动物组织基因 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;TE 缓冲溶液,生工生物工程(上海)股份有限公司;荧光定量 PCR 试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;荧光定量 PCR 仪,上海宏石医疗科技有限公司。

### 1.3 引物及探针的设计与合成

根据 GenBank 上收录的副溶血性弧菌的 *toxR* 基因(GenBank ID 为 MH047287.1)、霍乱弧菌的 *ompW* 基因(GenBank ID 为 MF100046.1)、拟态弧菌的 *toxR* 基因(GenBank ID 为 EF693743)和创伤弧菌的 *vvhA* 基因(GenBank ID 为 KC821520.1),利用 BLAST 工具中的 BLASTn 分别对目的序列进行比对,下载与目的序列相似或者一致的序列,使用 Geneious Prime 和 Oligo 7 软件分析特异性和保守性区域,分别选取保守性区域合成 PUC57-VP、PUC57-VC、PUC57-VM 和 PUC57-VV 质粒标准品,设计实时荧光定量 PCR 特异性引物及探针(表 1),5'端分别标记 TAMRA、FAM、Texas Red、CY5 荧光报告基团,3'端标记对应的 BHQ1、BHQ2 荧光淬灭基团。

### 1.4 反应体系和条件的优化

在进行多重实时荧光定量 PCR 之前,先进行单重实时荧光定量 PCR 扩增,以最低循环阈值(cycle threshold,  $C_t$ )和最高荧光强度增加值(delta relative fluorescence unit,  $\Delta R_n$ )为指标进行优化,上、下游引物终浓度梯度为 0.10、0.20、0.30 和 0.40  $\mu\text{mol/L}$ ,探针终浓度梯度为 0.05、0.10、0.15 和 0.20  $\mu\text{mol/L}$ ,退火温度优化范围为 58–61  $^{\circ}\text{C}$ ,反应总体积优化范围为 20–30  $\mu\text{L}$ 。在上述单重实时荧光定量 PCR 反应条件及体系的基础上,继而确定四重实时荧光定量 PCR 反应体系和条件。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物和探针

Table 1 The primers and probes used in real-time fluorescent quantitative PCR

| Primer/Probe | Sequence (5'→3')                            | Product size (bp) |
|--------------|---|-------------------|
| VP-F         | AAACCCAGCGGAATCTCAG                         | 99                |
| VP-R         | GAAGGCAGCCAGTTGTTGAT                        |                   |
| VP-P         | TAMRA-TCCGTCAGATTGGTGAGTATCAGAACG-BHQ2      |                   |
| VC-F         | TGCCACCTACCTTTATGGTCC                       | 83                |
| VC-R         | GTAATTCAAACCCGCACCAAC                       |                   |
| VC-P         | FAM-ATGGACGGAAAGTCGAATTAGCTTCACC-BHQ1       |                   |
| VM-F         | ACCGTACCTAAACGTGGTTATC                      | 84                |
| VM-R         | AGTTACCTCATCCATGTCGTTTTG                    |                   |
| VM-P         | Texas Red-CACCCGAGTTGAAACGGTAGAAGAAGAG-BHQ2 |                   |
| VV-F         | CGCCGCACTTACATTGGTC                         | 107               |
| VV-R         | TTGTTCTCATTCTGCGGTAGG                       |                   |
| VV-P         | CY5-ATTCGCCAGCAGTTACGACCTTT-BHQ2            |                   |

### 1.5 标准曲线与检测限

将重组质粒 PUC57-VP、PUC57-VC、PUC57-VM、PUC57-VV 标准品用 TE 缓冲溶液稀释, 进行 RT-qPCR 检测。

### 1.6 特异性试验

以副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌的质粒标准品(浓度为  $10^7$  copies/ $\mu$ L)作为模板进行四重 RT-qPCR 和常规 PCR 扩增。以非目的菌溶藻弧菌、表皮葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌、志贺氏菌、屎肠球菌、普通变形杆菌、产气肠杆菌等用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取的 DNA 作为模板进行四重 RT-qPCR 和常规 PCR 扩增, 以 ddH<sub>2</sub>O 为空白对照, 验证引物特异性。

### 1.7 抗干扰性试验

选取副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌的重组质粒(标准品高浓度为  $10^6$  copies/ $\mu$ L 和  $10^5$  copies/ $\mu$ L、低浓度为  $10^2$  copies/ $\mu$ L)作为模板, 随机组合质粒浓度, 进行四重实时荧光定量 PCR 检测, 每个实验做 3 个平行样, 观察扩增曲线阈值的变化, 以此判断高浓度对低浓度的扩增是否有影响。

### 1.8 重复性试验

以副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌和

创伤弧菌的重组质粒(浓度为  $10^5$ – $10^3$  copies/ $\mu$ L)作为模板进行四重实时荧光定量 PCR 检测, 计算  $C_t$  值标准偏差和变异系数。

### 1.9 鱼虾和生蚝样品检测

采用海洋动物组织基因 DNA 提取试剂盒提取 76 份鱼虾和生蚝样品的 DNA, 以提取的 DNA 作为模板进行四重 RT-qPCR 检测, 进而验证四重 RT-qPCR 方法的实用性。

## 2 结果与分析

### 2.1 反应体系及条件的确定

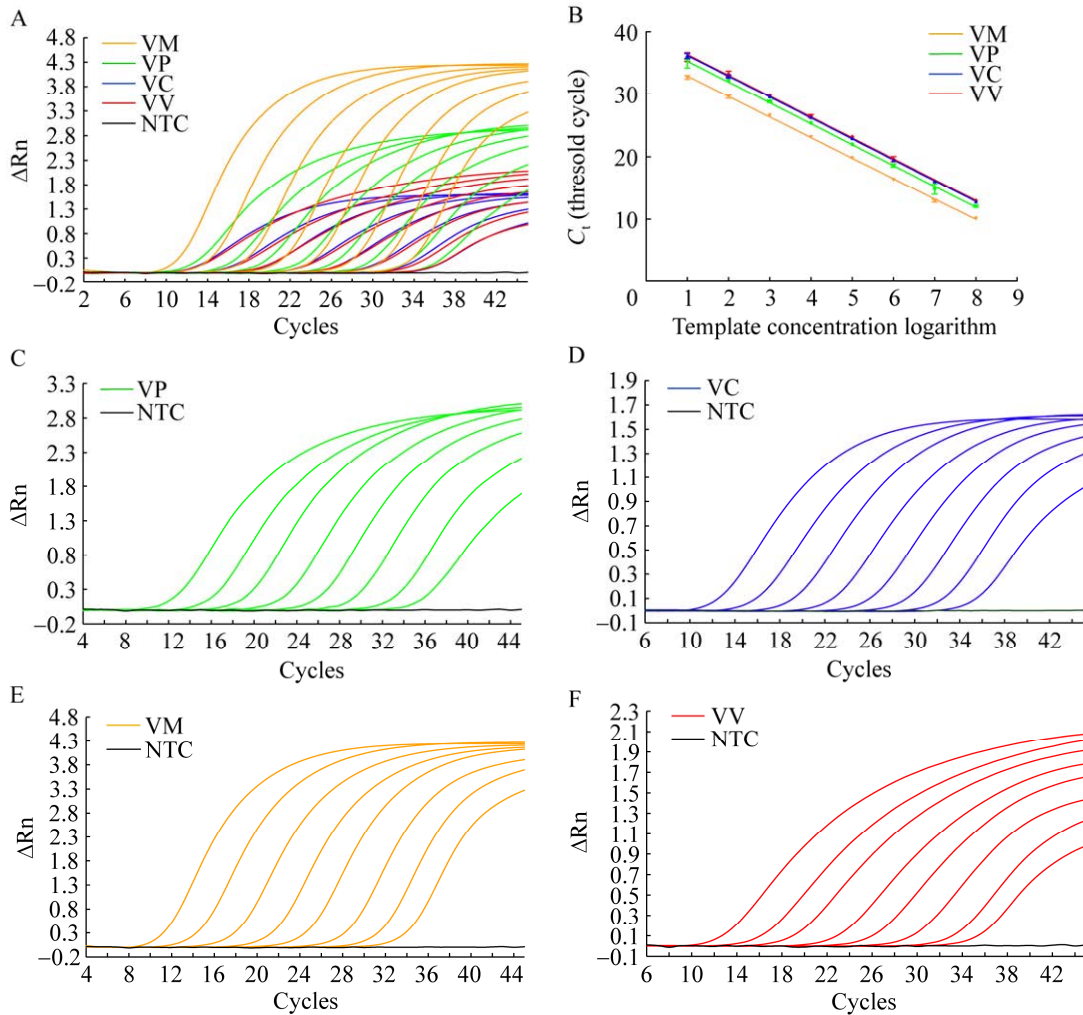
通过对单重实时荧光定量 PCR 的引物浓度、探针浓度、退火温度和反应总体积进行优化, 确定了当引物和探针终浓度分别为 0.20  $\mu$ mol/L 和 0.10  $\mu$ mol/L 时, 扩增曲线的  $C_t$  值最小, 最适退火温度为 60  $^{\circ}$ C, 最佳反应体积为 30  $\mu$ L, 其最低检测达到了 10 copies/ $\mu$ L, 继而确定四重实时荧光定量 PCR。反应体系(30  $\mu$ L): Premix *Ex Taq* (2 $\times$ ) 15  $\mu$ L, VP-toxR、VC-ompW、VM-toxR 和 VV-vvhA 上、下游引物终浓度为 0.2  $\mu$ mol/L, 探针终浓度为 0.1  $\mu$ mol/L, 模板各 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 30  $\mu$ L。反应条件: 污染消化 37  $^{\circ}$ C 2 min; 预变性 95  $^{\circ}$ C 30 s; 变性 95  $^{\circ}$ C 10 s, 退火延伸

60 °C 30 s, 45 个循环。

## 2.2 标准曲线与检测限的建立

以含副溶血性弧菌和拟态弧菌 *toxR* 基因、

霍乱弧菌 *ompW* 基因和创伤弧菌 *vvhA* 基因的质粒标准品(浓度为  $10^8$ – $10^1$  copies/ $\mu$ L)作为模板,结果如图 1 所示, 每个浓度梯度的 3 个平行样都



**图 1** 四重实时荧光定量 PCR 的扩增曲线、标准曲线和检测限 A 和 B: 副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌在四重 RT-qPCR 反应中的扩增曲线和标准曲线. C–F: 副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌在四重 RT-qPCR 中的最低检测限均为 10 copies/ $\mu$ L (图 C–F 中重组质粒浓度从左到右依次为  $10^8$ – $10^1$  copies/ $\mu$ L). VM: 拟态弧菌; VP: 副溶血性弧菌; VC: 霍乱弧菌; VV: 创伤弧菌; NTC: 阴性对照. 下同

Figure 1 Amplification curve, standard curve, and detection limit of quadruple real time fluorescence quantitative PCR. A and B: Amplification curves and standard curves of *Vibrio. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus* and *V. vulnificus* in quadruplex real time fluorescence quantitative PCR reaction. C–F: The detection limits of *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus* and *V. vulnificus* in quadruplex real time fluorescence quantitative PCR was 10 copies/ $\mu$ L (figure C–F recombinant plasmid concentration from left to right in accordance with the  $10^8$ – $10^1$  copies/ $\mu$ L). VM: *V. mimicus*; VP: *V. parahaemolyticus*; VC: *V. cholerae*; VV: *V. vulnificus*; NTC: Negative control. The same below.

能检测出荧光信号,以起始模板数的对数为横坐标,  $C_t$  值为纵坐标, 绘制 4 条标准曲线, 扩增效率分别为 100.432%、98.489%、100.017%、100.006%, 斜率均接近理论值-3.32, 4 种弧菌的最低检测限均为 10 copies/ $\mu$ L。

### 2.3 特异性试验结果

由图 2 可知, RT-qPCR 中非目的菌扩增曲线的  $C_t$  值均大于 41。由图 3 可以看出, 常规 PCR 时副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌扩增出对应的目的条带, 而非目的菌均未扩增出目的条带。结果表明本实验设计的特异性引物和探针只能特异性地检测目的基因。

### 2.4 抗干扰性试验结果

通过观察扩增曲线阈值的变化, 结果表明任意 1 种高浓度弧菌对其他 3 种低浓度弧菌和任意 3 种高浓度弧菌对低浓度弧菌的扩增并无抑制作用(图 4)。

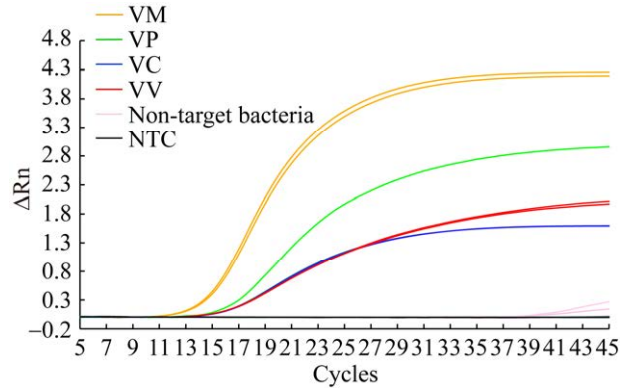


图 2 实时荧光定量 PCR 的特异性 非目的菌包括溶藻弧菌、表皮葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌、志贺氏菌、屎肠球菌、普通变形杆菌、产气肠杆菌等细菌

Figure 2 Specificity of real time fluorescence quantitative PCR. Non-target bacteria included *Vibrio alginolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus thuringiensis*, *Shigella*, *Enterococcus faecium*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes* and other bacteria.

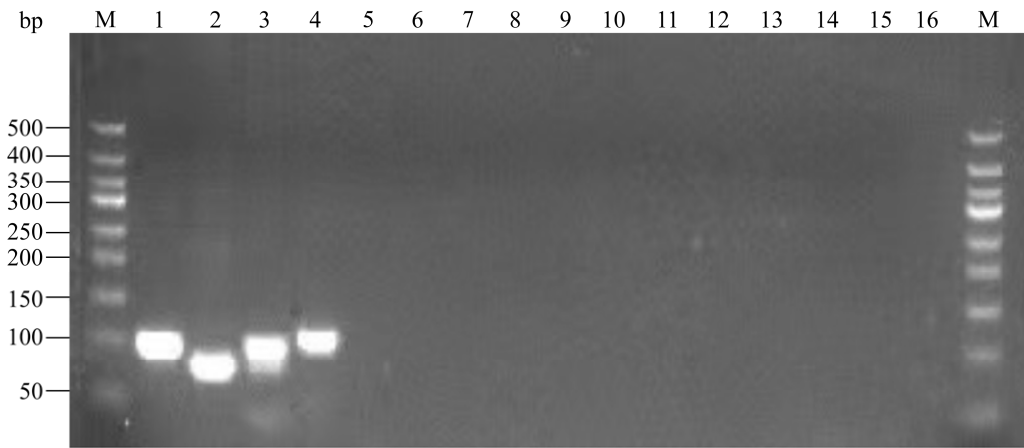
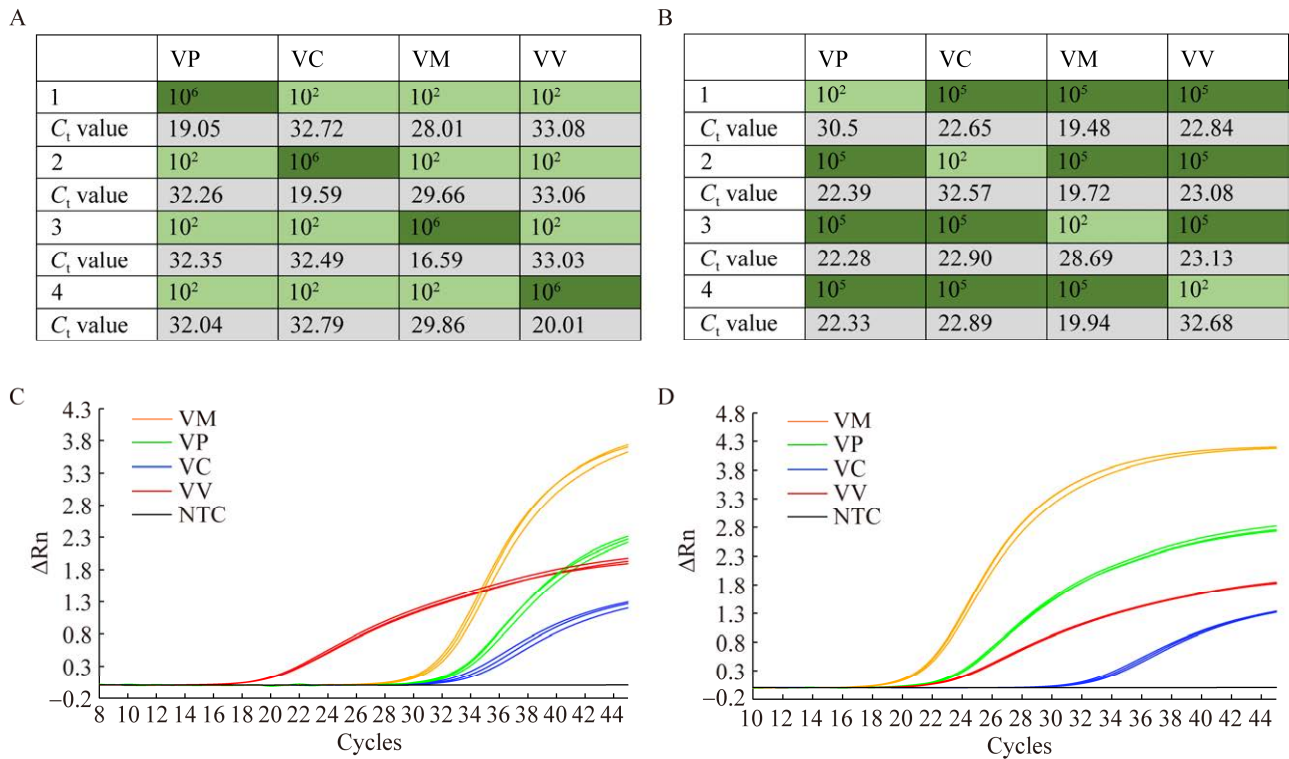


图 3 常规 PCR 的特异性 M: 50 bp DNA Marker; 1: 副溶血性弧菌; 2: 霍乱弧菌; 3: 拟态弧菌; 4: 创伤弧菌; 5-15: 分别为溶藻弧菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7、沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌、表皮葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌、志贺氏菌、屎肠球菌、普通变形杆菌、产气肠杆菌; 16: 空白对照

Figure 3 Specificity of conventional PCR. M: 50 bp DNA Marker; 1: *V. parahaemolyticus*; 2: *V. cholerae*; 3: *V. mimicus*; 4: *V. vulnificus*; 5-15: *V. alginolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus thuringiensis*, *Shigella*, *Enterococcus faecium*, *Proteus vulgaris* and *Enterobacter aerogenes*; 16: Blank control.





**图 4 四重实时荧光定量 PCR 的抗干扰实验** A:任意 1 种高浓度(深颜色)对其他 3 种低浓度(浅颜色)的四重荧光定量 PCR 扩增曲线. B: 任意 3 种高浓度弧菌(深颜色)对低浓度弧菌(浅颜色)的四重实时荧光定量 PCR 扩增曲线. C: 以创伤弧菌的质粒标准品浓度作为高浓度 10<sup>6</sup> copies/μL 和副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌的质粒标准品浓度作为低浓度 10<sup>2</sup> copies/μL 进行四重实时荧光定量 PCR 扩增, 做 3 次重复, 结果表明高浓度的创伤弧菌对其他 3 个低浓度弧菌的检测没有干扰. D: 以霍乱弧菌的质粒标准品浓度作为低浓度 10<sup>2</sup> copies/μL 和副溶血性弧菌、拟态弧菌、创伤弧菌的质粒标准品浓度作为高浓度 10<sup>5</sup> copies/μL 进行四重实时荧光定量 PCR 扩增, 做 3 次重复, 结果表明低浓度霍乱弧菌的检测不被其他 3 种高浓度弧菌干扰

Figure 4 Anti-interference test of quadruplex real time fluorescence quantitative PCR. A: Quadruplex real time fluorescence quantitative PCR amplification curves of any one high concentration (dark color) against the other three low concentrations (light color). B: Quadruplex real time fluorescence quantitative PCR amplification curves of any three high concentration *Vibrios* (dark color) against low concentration *Vibrios* (light color). C: The concentration of plasmid standard of *Vibrio vulnificus* was used as a high concentration of 10<sup>6</sup> copies/μL and the concentration of plasmid standard of *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* and *V. mimicus* was used as a low concentration of 10<sup>2</sup> copies/μL for quadruple real time fluorescence quantitative PCR amplification, and three replicates were performed. The results showed that high concentration of *V. vulnificus* did not interfere with the detection of other three low concentration *Vibrios*. D: Fourfold real time fluorescence quantitative PCR amplification was performed with the plasmid standard concentration of *V. cholerae* as a low concentration of 10<sup>2</sup> copies/μL and the plasmid standard concentration of *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* and *V. vulnificus* as a high concentration of 10<sup>5</sup> copies/μL. The results showed that the detection of low concentration *V. cholerae* was not interfered by the other three high concentration *Vibrios*.

## 2.5 重复性试验结果

通过对四重实时荧光定量 PCR 扩增曲线的  $C_t$  值进行统计学分析, 结果表明副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌  $C_t$  值的变异系数均小于 1.5% (表 2), 表明本实验的重复性好。

## 2.6 鱼虾和生蚝样品检测结果

在 76 份鱼虾和生蚝样品中, 应用四重 RT-qPCR 方法对副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌检测, 结果表明副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌的检出率分别为 22.4% (17/76)、11.8% (9/76)、14.5% (11/76)、2.6% (2/76)。结果表明所建立的 RT-qPCR 方法可特异性检测海产品中的拟态弧菌、霍乱弧菌、副溶血性弧菌和创伤弧菌。

## 3 讨论与结论

本实验建立的在单反应管中检测和鉴定 4 种致病性弧菌的实时荧光定量 PCR 方法, 其中靶基因的选择至关重要。有研究发现 *toxR* 是一种对毒力基因进行表达调控的基因, 在弧菌等细菌中具有重要作用, 弧菌种间同源性低, 副溶血性弧菌和拟态弧菌的 *toxR* 基因的相似性只有

45%<sup>[19-21]</sup>。革兰氏阴性菌的外膜蛋白 W (outer membrane protein W, OmpW) 是外膜的重要组成部分, 在多种病原体中具有重要的生物学功能, 可作为屏障发挥保护细胞和宿主免疫系统等作用, 主要参与调控细菌外膜的结构和功能, 如维持细菌外膜的稳定性、调节细胞渗透压、参与信号传导等<sup>[22]</sup>。Nandi 等<sup>[23]</sup>根据 *ompW* 基因设计特异性探针来检测大量细菌, 结果表明 *ompW* 基因是霍乱弧菌的种特异性基因。*vvhA* 基因是创伤弧菌的溶血素基因<sup>[24]</sup>, 已被用于创伤弧菌的 PCR 检测, 而且种属特异性高<sup>[25-26]</sup>。因此, 本实验根据副溶血性弧菌和拟态弧菌 *toxR* 基因、霍乱弧菌 *ompW* 基因, 以及创伤弧菌 *vvhA* 基因设计引物和探针, 建立了四重 RT-qPCR 检测方法。

在优化四重实时荧光定量 PCR 反应体系和条件后, 副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌的扩增效率基本一致。此外, 单核细胞增生李斯特菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌等也是常见的食源性致病菌<sup>[27]</sup>。因此, 本实验选取上述细菌的 DNA 作为非目的基因进行实时荧光定量 PCR 扩增, 结果表明设计

表 2 四重实时荧光定量 PCR 重复实验结果

Table 2 Repeatability test for quadruplex real time fluorescence quantitative PCR

| Name                           | Plasmid concentration<br>(copies/ $\mu$ L) | $C_t$ value |       |       | Average | Standard deviation | Coefficient of variation (%) |
|--------------------------------|--|-------------|-------|-------|---------|--------------------|------------------------------|
|                                |  | 1           | 2     | 3     |         |                    |                              |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | $1.0 \times 10^5$                          | 21.91       | 21.96 | 22.22 | 22.03   | 0.135 9            | 0.62                         |
|                                | $1.0 \times 10^4$                          | 25.38       | 25.27 | 25.56 | 25.40   | 0.119 5            | 0.47                         |
|                                | $1.0 \times 10^3$                          | 29.10       | 28.70 | 28.73 | 28.84   | 0.181 9            | 0.63                         |
| <i>Vibrio cholerae</i>         | $1.0 \times 10^5$                          | 22.84       | 22.98 | 23.00 | 22.94   | 0.071 2            | 0.31                         |
|                                | $1.0 \times 10^4$                          | 26.19       | 26.24 | 26.43 | 26.29   | 0.103 4            | 0.39                         |
|                                | $1.0 \times 10^3$                          | 29.53       | 29.51 | 29.63 | 29.56   | 0.052 4            | 0.18                         |
| <i>Vibrio mimicus</i>          | $1.0 \times 10^5$                          | 19.73       | 19.86 | 19.97 | 19.85   | 0.098 1            | 0.49                         |
|                                | $1.0 \times 10^4$                          | 23.19       | 23.04 | 23.27 | 23.17   | 0.095 3            | 0.41                         |
|                                | $1.0 \times 10^3$                          | 26.53       | 26.65 | 26.70 | 26.63   | 0.071 3            | 0.27                         |
| <i>Vibrio vulnificus</i>       | $1.0 \times 10^5$                          | 23.09       | 23.17 | 23.32 | 23.19   | 0.095 3            | 0.41                         |
|                                | $1.0 \times 10^4$                          | 26.33       | 26.28 | 26.77 | 26.46   | 0.220 2            | 0.83                         |
|                                | $1.0 \times 10^3$                          | 29.70       | 29.81 | 29.99 | 29.83   | 0.119 5            | 0.40                         |



的引物和探针能特异性地扩增出目的基因,与非目的基因无交叉反应。本实验所建立的实时荧光定量 PCR 标准品的检测限可达 10 copies/ $\mu$ L。王海波等<sup>[15]</sup>建立的单重实时荧光定量 PCR 检测溶藻弧菌胶原酶基因 *colH* 的最低检测限为 10<sup>2</sup> copies/ $\mu$ L。鞠明霞<sup>[28]</sup>分别根据副溶血性弧菌和霍乱弧菌的毒力基因、种特异性基因建立的三重 RT-qPCR,检测创伤弧菌、拟态弧菌和溶藻弧菌的最低检测限均为 10<sup>2</sup> copies/ $\mu$ L。目前实时荧光定量 PCR 的检测限最低为 10<sup>2</sup> copies/ $\mu$ L,本实验的最低检测限比其他实时荧光定量 PCR 的检测限高出 10 倍,比常规 PCR 高出 1 000 倍。本实验进行了抗干扰实验,实验结果表明高浓度弧菌对低浓度弧菌扩增曲线无干扰。重复性试验中,4 种弧菌相应 C<sub>t</sub> 值的变异系数均小于 1.5%,表明本实验的可重复性高。

近年来,越来越多的研究机构和实验室采用实时荧光定量 PCR 方法进行基因表达研究,但是也存在不足之处,如合成探针成本高、周期长、荧光定量 PCR 仪昂贵且操作复杂等。随着科研技术和仪器的不断发展,实时荧光定量 PCR 技术也在不断优化和改进,其不足之处也在逐渐得到克服。总之,本实验开发了一种四重实时荧光定量 PCR 检测,用于在一次反应中同时检测副溶血性弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌,建立的四重 RT-qPCR 为检测环境和临床样本中的 4 种弧菌提供了一种快速、敏感、高度特异性的方法,对于食品安全和弧菌感染的诊断具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] BLACKWELL KD, OLIVER JD. The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina estuaries[J]. Journal of Microbiology, 2008, 46(2): 146-153.
- [2] BAKER-AUSTIN C, TRINANES J, GONZALEZ-ESCALONA N, MARTINEZ-URTAZA J. Non-cholera vibrios: the microbial barometer of climate change[J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(1): 76-84.
- [3] BAKER-AUSTIN C, OLIVER JD, ALAM M, ALI A, WALDOR MK, QADRI F, MARTINEZ-URTAZA J. *Vibrio* spp. infections[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2018, 4(1): 1-19.
- [4] ROBERT-PILLOT A, COPIN S, HIMBER C, GAY M, QUILICI ML. Occurrence of the three major *Vibrio* species pathogenic for human in seafood products consumed in France using real-time PCR[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 189: 75-81.
- [5] McLAUGHLIN JB, DePAOLA A, BOPP CA, MARTINEK KA, NAPOLILLI NP, ALLISON CG, MURRAY SL, THOMPSON EC, BIRD MM, MIDDAUGH JP. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters[J]. The New England Journal of Medicine, 2005, 353(14): 1463-1470.
- [6] MORRIS JG, ACHESON D. Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell[J]. Clinical Infectious Diseases, 2003, 37(2): 272-280.
- [7] POWELL JL. *Vibrio* species[J]. Clinics in Laboratory Medicine, 1999, 19(3): 537-552.
- [8] AHMED HA, EL BAYOMI RM, HUSSEIN MA, KHEDR MHE, ABO REMELA EM, EL-ASHRAM AMM. Molecular characterization, antibiotic resistance pattern and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. cholerae* isolated from crustaceans and humans[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 274: 31-37.
- [9] 任燕, 王庆, 王英英, 李莹莹, 曾伟伟, 高彩霞, 石存斌. 黄金鲫源霍乱弧菌的分离鉴定及毒力检测[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(11): 891-896.  
REN Y, WANG Q, WANG YY, LI YY, ZENG WW, GAO CX, SHI CB. Isolation, identification and virulence factors detection of pathogenic *Vibrio cholerae* isolated from *Carassius auratus auratus*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017, 39(11): 891-896 (in Chinese).
- [10] EMCH M, FELDAKER C, ISLAM MS, ALI M. Seasonality of cholera from 1974 to 2005: a review of global patterns[J]. International Journal of Health Geographics, 2008, 7: 31.
- [11] BINSZTEIN N, COSTAGLIOLA MC, PICHEL M, JURQUIZA V, RAMÍREZ FC, AKSELMAN R, VACCHINO M, HUQ A, COLWELL R. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(12): 7481-7486.

- [12] TREVORS JT. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: gene expression in planktonic and biofilm cells[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 86(2): 266-273.
- [13] SENACHAI P, CHOMVARIN C, NAMWAT W, WONGBOOT W, WONGWAJANA S, TANGKANAKUL W. Application of tetraplex PCR for detection of *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. mimicus* in cockle[J]. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2013, 44(2): 249-258.
- [14] MANGAL M, BANSAL S, SHARMA SK, GUPTA RK. Molecular detection of foodborne pathogens: a rapid and accurate answer to food safety[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(9): 1568-1584.
- [15] 王海波, 张京云, 王多春, 阚颀. 溶藻弧菌 TaqMan 实时 PCR 快速检测体系的建立[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(5): 1150-1152.
- WANG HB, ZHANG JY, WANG DC, KAN B. Establishment of TaqMan real-time PCR assay for the rapid detection of *Vibrio alginolyticus*[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2011, 21(5): 1150-1152 (in Chinese).
- [16] AKKAYA O, GUVENC HI, YUKSEKKAYA S, OPUS A, GUZELANT A, KAYA M, KURTOGLU MG, KAYA N. Real-time PCR detection of the most common bacteria and viruses causing meningitis[J]. *Clinical Laboratory*, 2017, 63(4): 827-832.
- [17] PARK JY, JEON S, KIM JY, PARK M, KIM S. Multiplex real-time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*[J]. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 2013, 4(3): 133-139.
- [18] YAN Y, ZHAN L, ZHU GY, ZHANG JY, LI P, CHEN LX, HE PY, LUO JY, CHEN ZW. Direct and rapid identification of *Vibrio cholerae* serogroup and toxigenicity by a novel multiplex real-time assay[J]. *Pathogens*, 2022, 11(8): 865.
- [19] ROSEC JP, SIMON M, CAUSSE V, BOUDJEMAA M. Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish: comparison of PCR protocols using pR72H or *toxR* targets with a culture method[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 129(2): 136-145.
- [20] NAKAGUCHI Y. Contamination by *Vibrio parahaemolyticus* and its virulent strains in seafood marketed in Thailand, Vietnam, Malaysia, and Indonesia[J]. *Tropical Medicine and Health*, 2013, 41(3): 95-102.
- [21] 王青柏, 胡超群, 罗鹏, 任春华. 拟态弧菌全长 *toxR* 基因的克隆和序列分析[J]. *热带海洋学报*, 2008, 27(3): 50-54.
- WANG QB, HU CQ, LUO P, REN CH. Molecular cloning and sequence analysis of full-length *toxR* gene of *Vibrio mimicus*[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2008, 27(3): 50-54 (in Chinese).
- [22] 万莹, 陈永军, 任亚玲, 王亚磊, 王权, 蒋蔚. 霍乱弧菌三重荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(9): 1143-1151.
- WAN Y, CHEN YJ, REN YL, WANG YL, WANG Q, JIANG (W/Y). Establishment and application of triple real-time PCR for the detection of *Vibrio cholerae*[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(9): 1143-1151 (in Chinese).
- [23] NANDI B, NANDY RK, MUKHOPADHYAY S, NAIR GB, SHIMADA T, GHOSE AC. Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein *OmpW*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(11): 4145-4151.
- [24] 王琪, 滕勇勇, 何仕雯, 杨泽, 吴雷, 莫秋华. 多重 PCR 快速检测 5 种重要致病性弧菌[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(24): 3497-3500, 3504.
- WANG Q, TENG YY, HE SW, YANG Z, WU L, MO QH. Multiplex PCR assay for rapid detection of five important pathogenic vibrios[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2014, 24(24): 3497-3500, 3504 (in Chinese).
- [25] PANICKER G, BEJ AK. Real-time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: comparison of oligonucleotide primers and probes targeting *vvhA*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(10): 5702-5709.
- [26] PANICKER G, MYERS ML, BEJ AK. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 498-507.
- [27] 高兴, 辛文文, 高姗, 康琳, 王景林. 11 种(株)食源性细菌基因芯片检测方法的建立[J]. *生物技术通报*, 2013(12): 123-128.
- GAO X, XIN WW, GAO S, KANG L, WANG JL. Development of a DNA microarray for detection of 11 food-borne pathogens[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(12): 123-128 (in Chinese).
- [28] 鞠明霞. 五种弧菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2015.
- JU MX. Real-time PCR for detection of five species of *Vibrio*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese).