

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2011.11.13

依赖于核酸序列恒温扩增技术快速检测 副溶血性弧菌方法的建立

倪鑫^{1,2}, 王志聪¹, 雷质文^{2*}, 梁成珠², 汪东风¹, 姜英辉², 王建广³, 祝素贞²

(1. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003; 2. 山东检验检疫局, 山东 青岛 266002; 3. 青岛科技大学, 山东 青岛 266042)

摘要: 为建立副溶血性弧菌的快速检测方法, 本研究采用依赖于核酸序列恒温扩增(NASBA)技术, 以副溶血性弧菌的 *tlh* 基因为扩增的靶基因设计特异性引物和探针, 建立可快速扩增副溶血性弧菌的 NASBA 方法。特异性和灵敏度试验结果表明: 该 NASBA 方法对副溶血性弧菌的最小检出量为 5.1×10^2 cfu/mL, 高于普通 PCR 方法, 而且与其他种属的菌无任何交叉反应。此外, 本研究将副溶血弧菌扩增产物采用通用型核酸扩增物快速检测板进行检测, 实现了特异性强的快速副溶血弧菌的检测。该方法对仪器要求低, 具有良好的应用前景。

关键词: 副溶血性弧菌; 检测; 依赖于核酸序列恒温扩增

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2011)11-0882-05

Establishment of the nucleic acid sequence-based amplification method of detecting *Vibrio parahaemolyticus*

NI Xin^{1,2}, WANG Zhi-cong¹, LEI Zhi-wen^{2*}, LIANG Cheng-zhu², WANG Dong-feng¹,
JIANG Ying-hui², WANG Jian-guang³, ZHU Su-zhen²

(1. Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China;
3. Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract: In this study, we adopted a technology based on nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), to establish a rapid test method of *Vibrio parahaemolyticus*. Specific primers and probes were designed for the *tlh* target gene of *V. parahaemolyticus* and the detection method of NASBA was established. Its specificity and sensitivity were tested. The results showed that the sensitivity of the NASBA was 5.1×10^2 cfu/mL which was higher than that of PCR method and this method had no cross reaction with other species of bacteria. The amplification products of *V. parahaemolyticus* were rapidly detected by using the universal rapid detection board of nucleic acid amplification product. In conclusion, detecting *V. parahaemolyticus* with NASBA method was more specific and sensitive than PCR method and has lower instrumental requirement and a broad application.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; detection; nucleic acid sequence-based amplification

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种常见的食物中毒病原菌, 发病呈世界性分布^[1]。由该菌引起的食物中毒一般表现为急发病, 主要表现为急性腹泻, 其危害程度仅次于沙门氏菌、大肠杆

菌、葡萄球菌和肉毒梭菌^[2]。葛菲菲等人建立了副溶血性弧菌 PCR 检测方法^[3], 而在采用 NASBA 技术快速地对副溶血性弧菌引起的食物中毒突发事件作出病原检测方面还鲜有涉及。

*Corresponding author

收稿日期: 2011-05-16

基金项目: 国家质检总局科研项目(2011HK225)

作者简介: 倪鑫(1988-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要从事食品工程与安全检测。

* 通信作者: E-mail: leizhw@sohu.com

NASBA 技术是由两个引物介导的、连续均一的特异性体外恒温扩增核苷酸序列的酶促反应过程^[4]。整个反应在恒温(41 °C)条件下进行, 1.5 h~2 h 即可得到结果, 不需特殊仪器, 是一种快速、简便、特异的扩增手段。NASBA 方法扩增的主要产物为单链 RNA, 并且 NASBA 最适合于单链 RNA 的扩增、检测及测序^[5]。这就为使用探针检测提供了便利, 本实验首次尝试将核酸薄膜层析检测技术^[6]与 NASBA 技术进行结合对副溶血性弧菌进行检测。选取副溶血性弧菌的 *tlh* 基因作为检测靶基因^[7], 设计特异性引物, 建立检测副溶血性弧菌的 NASBA 检测方法。

1 材料和方法

1.1 实验菌株 本研究所用的 20 株实验菌株(表 1) 中标准菌株分别购自美国典型菌种保藏中心(ATCC) 和中国医学细菌保藏管理中心(CMCC), 分离菌株来自本实验室或其他检验检疫局实验室。

表 1 实验用菌株

Table 1 Reference strains used in experiments

菌株名称 Strains	菌株号 Strain NO	菌株数量 Strain amount
副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	1
副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	分离菌株	2
福氏志贺氏菌 <i>S. flexneri</i>	CMCC (B) 51572	1
宋氏志贺氏菌 <i>S. sonnei</i>	CMCC (B) 51592	1
肠炎沙门氏菌 <i>S. enteritidis</i>	ATCC 13067	1
猪霍乱沙门氏菌 <i>S. cholerae</i>	分离菌株	2
鼠伤寒沙门氏菌 <i>S. typhimurium</i>	分离菌株	3
单核细胞增生李斯特氏菌 <i>L. monocytogenes</i>	ATCC 7644	1
单核细胞增生李斯特氏菌 <i>L. monocytogenes</i>	分离菌株	1
英诺克李斯特氏菌 <i>L. innocua</i>	ATCC 33090	1
小肠结肠炎耶尔森氏菌 <i>Y. enterocolitica</i>	CMCC (B) 52207	1
大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>	ATCC 25922	1
弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>	ATCC 43864	1
无柄二酸柠檬酸杆菌 <i>C. amalonaticus</i>	CGMCC 1.2020	1
产酸克雷伯氏菌 <i>K. oxytoca</i>	ATCC 43165	1
阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	ATCC 700323	1
产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	ATCC 13048	1
气味沙雷氏菌 <i>S. odorifera</i>	ATCC 33077	1
粘质沙雷氏菌 <i>S. marcescens</i>	CGMCC 1.2818	1
普通变形杆菌 <i>P. vulgaris</i>	ATCC 49132	1

1.2 主要试剂 AMV 反转录酶、T7 RNA 聚合酶、RNase 抑制剂、RNaseH 购自 NEB; RNAMaid 购自 维格拉斯生物技术(北京)有限公司; 柱式细菌 RNAout 购自北京天恩泽基因科技有限公司。

1.3 引物设计与合成 本研究根据 NCBI 中登录的副溶血性弧菌的 *tlh* 基因序列(AY578147), 采用

Primer Premier5.0 引物设计软件, 并通过 Blast 软件 比对, 设计一对特异性扩增引物和一条探针为: F: 5'-GCAGTCTTTTCGCTGTTGCT-3' 5 端标记生物素; R: 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGCACAACGCTGACGGATAACG-3' (下划线部分表示 T7 DNA 依赖的 RNA 聚合酶启动子序列); T: 5'-CGTCAGC GTTGTGCCCT-3' 3 端标记 FITC。引物和探针由宝 生物工程(大连)有限公司合成。

1.4 细菌模板 RNA 提取 按传统培养方法分别增 菌培养表 1 中的 20 株实验菌株。取实验菌株培养液 各 1 mL, 用柱式细菌 RNAout 提取 RNA, 加入适量 RNase 抑制剂, -20 °C 保存备用。

1.5 NASBA 反应条件优化

1.5.1 NASBA 反应体系及其反应程序 反应体系 为 25 μL。

反应液 : 10× buffer 2.0 μL, DMSO 2.5 μL, 模板 DNA 5 μL, 引物 F、R (10 μmol/L) 各 1 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 0.5 μL, NTPs (2.5 mmol/L) 1.0 μL, 用 RNase-free H₂O 补至 20 μL。

反应液 : 10× buffer 0.5 μL, BSA (10 mg/mL) 0.25 μL, T7 RNA 聚合酶 (50 000 U/mL) 0.8 μL, AMV 反转录酶 (10 000 U/mL) 0.8 μL, RNase 抑制剂 (40 000 U/mL) 0.5 μL, RNaseH (500 U/mL) 0.4 μL, 用 RNase-free H₂O 补至 5 μL。

反应程序: 反应液 在 65 °C 水浴 5 min, 41 °C 水 浴 5 min, 然后将反应液 迅速加入反应液 , 混 匀, 置于 41 °C 水浴中孵育 90 min。

反应结束后, 加入 RNA 保护剂 RNAMaid 1.5 μL, 探针 T (10 μmol/L) 1 μL, 混匀, 94 °C 3 min, 56 °C 1 min, 用通用型核酸扩增物快速检测 板检测产物^[6]。

1.5.2 NASBA 检测方法的改良

1.5.2.1 DMSO 浓度优化: 将 DMSO 的浓度以 2 % 递增, 分别从 4 %~14 %, 进行 NASBA 反应, 确 定其最佳浓度。

1.5.2.2 反应时间优化: 反应时间 30 min~120 min, 确定最佳反应时间。

1.5.3 NASBA 检测方法验证 按照优化的反应体 系和反应条件对 3 株副溶血性弧菌阳性菌株进行检 测, 以验证所建方法的可行性。

1.6 产物检测 扩增产物利用通用型核酸扩增物快 速检测板检测^[6]。具体操作过程参照文献[6] (图 1)。



注：通用型核酸扩增物快速检测板的 C 为质控线，T 为检测线，S 为样品孔。检测板 1 为未使用检测板；仅 C 为红色为阴性(检测板 2)；C 和 T 均显示为红色，结果为阳性(检测板 3)，C 线和 T 线均不显色，说明检测板失效。

Note: The C of detection device represents the Quality Control Line, T is the Detection Line, S is the Sample well. The Detection Board 1 is blank control; The result is negative when only C line show red (Detection Board 2); The result will be positive when both C and T show the red color (Detection board 3); The detection board will not work if both C and T line can not show color

图 1 通用型核酸扩增物快速检测板应用示意图
Fig.1 The instruction of Universal Detection Device of Nucleic Acid Amplification Product

1.7 特异性试验 用已建立的 NASBA 方法对表 1 所列的 20 株实验菌株模板 RNA 进行 NASBA 扩增，利用通用型核酸扩增物快速检测板检测产物，确定特异性。

1.8 灵敏度试验 将经过增菌培养的副溶血性弧菌 ATCC 17802 菌株，用生理盐水做成菌悬液。对菌悬液进行平板计数并取 1 mL 菌悬液提取 RNA，提取的 RNA 进行 10 倍梯度稀释，取各梯度 RNA 进行 NASBA 扩增，利用通用型核酸扩增物快速检测板检测产物，确定灵敏度。

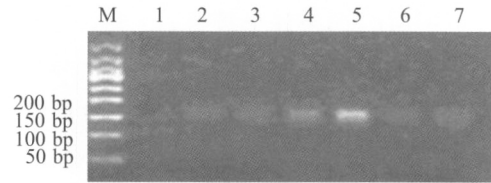
1.9 NASBA 方法与普通 PCR 方法灵敏度的比较 本实验采用的 PCR 方法严格参照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SNT1869-2007 执行。取 1.8 中副溶血性弧菌 ATCC 17802 菌株的 RNA 各稀释度进行 PCR 扩增，电泳观察其结果。普通 PCR 为对照，普通 PCR 的引物与 NASBA 方法引物相同。

2 结果

2.1 NASBA 反应条件优化

2.1.1 DMSO 浓度优化 试验结果显示同等反应条件下，DMSO 浓度为 10 % 时，扩增条带最明显，本

实验中 NASBA 反应体系的 DMSO 浓度选择为 10 % (图 2)。



M: DNA 标识物; 1: 阴性对照; 2: 4 %; 3: 6 %; 4: 8 %; 5: 10 %; 6: 12 %; 7: 14 %
M: DNA Marker; 1: Negative control; 2: 4 %; 3: 6 %; 4: 8 %; 5: 10 %; 6: 12 %; 7: 14 %

图 2 DMSO 浓度对 NASBA 反应的影响

Fig.2 Effect of DMSO concentration on the NASBA reaction

2.1.2 反应时间优化 试验结果显示同等反应条件下，反应时间为 90 min 时，扩增条带随时间明显变化，选择 90 min 作为 NASBA 反应的时间(图 3)。

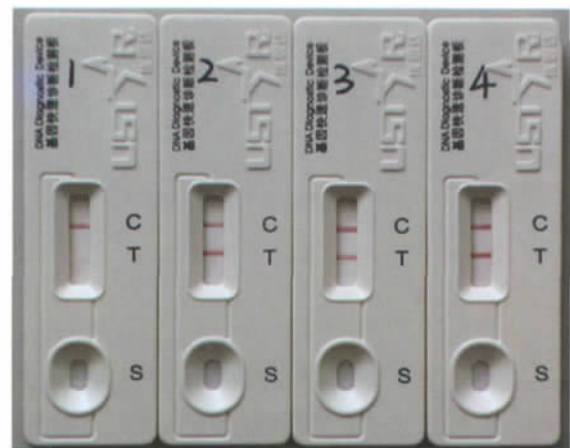
2.1.3 NASBA 方法验证 试验结果显示，3 株阳性副溶血性弧菌菌株均呈现阳性，初步表明该 NASBA 方法可用于副溶血性弧菌的检测(图 4)。



M: DNA 标识物; 1: 阴性对照; 2: 30 min; 3: 45 min; 4: 60 min; 5: 90 min; 6: 120 min;
Note: M: DNA Marker; 1: Negative control; 2: 30 min; 3: 45 min; 4: 60 min; 5: 90 min; 6: 120 min

图 3 反应时间对 NASBA 反应的影响

Fig.3 Effect of reaction time on the NEMA reaction



1: 阴性对照; 2: 副溶血性弧菌 ATCC 17802; 3~4: 副溶血性弧菌分离菌株.

Note: 1: Negative control; 2: *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; 3-4: *V. parahaemolyticus* isolates

图 4 副溶血性弧菌的 NASBA 检测结果

Fig.4 NASBA detection for *V. parahaemolyticus*

2.2 特异性试验 检测结果显示, 3 株副溶血性弧菌阳性菌株都呈阳性, 其余菌株均呈阴性。检测结

果表明该 NASBA 方法对于副溶血性弧菌有较好的特异性(图 5)。



1: 阴性对照; 2: 副溶血性弧菌 ATCC 17802; 3-4: 副溶血性弧菌 分离菌株; 5: 宋氏志贺氏菌 CMCC (B) 51592; 6: 肠炎沙门氏菌 ATCC 13067; 7: 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC 7644; 8: 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52207; 9: 大肠埃希氏菌 ATCC 25922; 10: 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC 43864; 11: 产酸克雷伯氏菌 ATCC 43165; 12: 阴沟肠杆菌 ATCC 700323
 Note: 1: Negative control; 2: *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; 3-4: *V. parahaemolyticus* isolates; 5: *S. sonnei* CMCC (B) 51592; 6: *S. enteritidis* ATCC 13067; 7: *L. monocytogenes* ATCC 7644; 8: *Y. enterocolitica* CMCC (B) 52207; 9: *E. coli* ATCC 25922; 10: *C. freundii* ATCC 43864; 11: *K. oxytoca* ATCC 43165; 12: *E. cloacae* ATCC 700323

图 5 NASBA 检测副溶血性弧菌的特异性
 Fig.5 The specificity of NASBA detection system in detection of *Vibrio parahaemolyticus*

2.3 灵敏度试验 由细菌计数确定副溶血性弧菌的初始量, 并将其倍比稀释, 各梯度菌悬液含菌量范围为: 5.1×10^7 cfu/mL \sim 5.1×10^0 cfu/mL。检测结果显示, 至稀释度 5.1×10^1 cfu/mL 时没有扩增产物, 可以得出, NASBA 方法的最低检测限为 5.1×10^2 cfu/mL (图 6)。

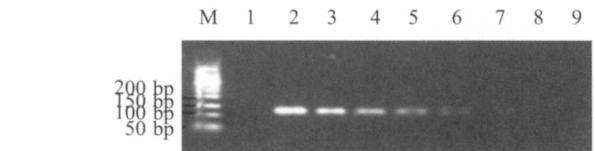
NASBA 方法比普通 PCR 方法的灵敏度高 10 倍。



1: 阴性对照; 2: 5.1×10^7 cfu/mL; 3: 5.1×10^6 cfu/mL; 4: 5.1×10^5 cfu/mL; 5: 5.1×10^4 cfu/mL; 6: 5.1×10^3 cfu/mL; 7: 5.1×10^2 cfu/mL; 8: 5.1×10^1 cfu/mL; 9: 5.1×10^0 cfu/mL
 1: Negative control; 2: 5.1×10^7 cfu/mL; 3: 5.1×10^6 cfu/mL; 4: 5.1×10^5 cfu/mL; 5: 5.1×10^4 cfu/mL; 6: 5.1×10^3 cfu/mL; 7: 5.1×10^2 cfu/mL; 8: 5.1×10^1 cfu/mL; 9: 5.1×10^0 cfu/mL

图 6 NASBA 方法检测不同稀释度副溶血性弧菌 ATCC 17802 DNA 的结果
 Fig.6 The sensitivity test of NASBA for *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802

2.4 NASBA 方法与普通 PCR 方法灵敏度的比较 用 SNT1869-2007 行业标准中的 PCR 方法扩增 1.8 中不同稀释度的副溶血性弧菌 ATCC 17802 菌株的 RNA。电泳结果表明, 普通 PCR 方法的检测限为 5.1×10^3 cfu/mL (图 7)。由此表明, 本研究建立的



1: 阴性对照; 2: 5.1×10^7 cfu/mL; 3: 5.1×10^6 cfu/mL; 4: 5.1×10^5 cfu/mL; 5: 5.1×10^4 cfu/mL; 6: 5.1×10^3 cfu/mL; 7: 5.1×10^2 cfu/mL; 8: 5.1×10^1 cfu/mL; 9: 5.1×10^0 cfu/mL
 1: Negative control; 2: 5.1×10^7 cfu/mL; 3: 5.1×10^6 cfu/mL; 4: 5.1×10^5 cfu/mL; 5: 5.1×10^4 cfu/mL; 6: 5.1×10^3 cfu/mL; 7: 5.1×10^2 cfu/mL; 8: 5.1×10^1 cfu/mL; 9: 5.1×10^0 cfu/mL

图 7 PCR 方法检测不同稀释度 ATCC 17802 RNA 的扩增结果
 Fig.7 The amplification result of different dilution ATCC 17802 RNA by PCR

3 讨论

本实验所建立的副溶血性弧菌的 NASBA 检测方法具有较好的特异性和较高的检测灵敏度, 灵敏度为 5.1×10^2 cfu/mL, 刘琦等人建立了副溶血性弧菌的 PCR- 凝胶电泳检测法, 灵敏度均为 1.0×10^3 cfu/mL^[8], 葛菲菲等人也建立了副溶血性弧菌的 PCR 检测方法, 灵敏度为 5.7×10^3 cfu/mL^[3]。而且 NASBA 比传统的 PCR- 琼脂糖凝胶电泳检测方法高一个数量级。

NASBA 产物主要有酶联凝胶技术、电化学发光技术、分子信标技术等检测方法^[9]，上述方法存在操作复杂、需要昂贵仪器等问题，使 NASBA 检测方法的应用受到了限制。本实验把 NASBA 技术与核酸薄膜层析检测技术进行结合，与琼脂糖凝胶电泳检测法相比，检测所用的时间能节约 0.5 h~1 h，同时也避免操作人员接触 EB 等有毒有害物质和凝胶电泳的辐射环境，保护了操作人员的人身安全。

NASBA 反应在恒定温度下进行，无需温度循环，因此不会受到双链 DNA 的污染。同时，由于外来双链 DNA 无 T7 启动子序列，不可能被扩增，所以 NASBA 检测方法的特异性得到了提高^[10]。以上特点均显示出所建立的 NASBA 检测方法适合快速检测副溶血性弧菌，有望开发为现场快速诊断产品。

参考文献：

[1] Raghunath P, Acharya S, Bhanumathi A, et al. Detection and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the southwest coast of India [J]. *Food Microbiol.* 2008, 25(6): 824-830.

[2] 马光刚, 郭福生, 王娟, 等. 海产品中 VP 的分离和鉴定 [J]. *中国动物检疫*, 2002, 19(9): 25-28.

[3] 葛菲菲, 徐峰, 沈莉萍, 等. 副溶血性弧菌 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(3): 229-232.

[4] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification [J]. *Nature*, 1991, 350(6313): 91-92.

[5] Deiman B, van Aarle P, Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) [J]. *Mol Biotechnol.* 2002, 20(2): 163-179.

[6] 尤其敏, 胡林, 林源吉, 等. 核酸薄膜层析快速检测方法及其试纸条及其用途 [P]. 中国, 发明专利, 200610003429.1, 2006.

[7] 中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局, 中华人民共和国汕头出入境检验检疫局, 中华人民共和国深圳出入境检验检疫局, 等. SN/T 1869-2007, 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.

[8] 刘琦, 周德庆, 柳淑芳, 等. PCR 快速检测水产品中副溶血性弧菌的方法研究 [J]. *食品科学*, 2008, 29(11): 490-491.

[9] 彭涛. 核酸等温扩增技术及其应用 [M]. 1 版. 北京: 科学出版社, 2009: 22-34.

[10] 颜进. NASBA (依赖核酸序列的扩增)及其在医学上的应用 [J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 1997, 1(2): 66-69.

(本文编辑: 彭永刚)

(上接第 861 页)

而导致表达量等性质发生改变。由于本实验室条件有限，不能进行更细致的研究，是否与氨基酸本身性质或者 Cecropin D 蛋白构象发生改变有关，有待进一步研究。

参考文献：

[1] 谭显胜, 李巍巍, 王志明, 等. 抗菌肽的研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(16): 3153-3156.

[2] Boman H G, Nissson I, Rasmuson B. Inducible antibacterial defense system in *Drasophial* [J]. *Nature*, 1972, 237(5): 232-235.

[3] 尹娜, 李鸿钧, 彭梅, 等. 抗菌肽 Cecropin D 在毕赤酵母中的表达、纯化及活性鉴定 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(3): 185-189.

[4] 姚春阳, 沈旭, 庄金秋. 巴斯德毕赤酵母表达系统的研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2008, (2): 26-28.

[5] Ho S, Horton R, Hunt H. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction [J]. *Gene*, 1989,

77: 51-59.

[6] 剧海, 梁东春, 郭刚, 等. 用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较 [J]. *天津医药*, 2003, 31(5): 270-272.

[7] Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa [J]. *Anal Biochem*, 1987, 166(2): 368-379.

[8] Singh M B, Bhalla P L. Recombinant expression systems for allergen vaccines [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2006, 5: 53-59.

[9] Najakshin A M, Mechetina L V, Alabyev B Y, et al. Identification of an IL-8 homolog in lamprey (*Lampet rafluvialis*): early evolutionary divergence of chemokines [J]. *Immunology*, 1999, 29: 375-382.

[10] 赵翔, 霍克克, 李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16(3): 308-311.

(本文编辑: 张朝霞)