

用基于 TaqMan 探针的 Real-time PCR 技术 定量检测副溶血弧菌

蔡潭溪¹ 蒋鲁岩² 黄克和^{1*}

(¹南京农业大学动物医学院 南京 210095)

(²江苏省出入境检验检疫局 南京 210001)

摘 要 副溶血弧菌是一种引起食源性疾病的重要病原菌,传统的鉴定方法费时费力且容易出现假阴性,建立一种定量检测副溶血弧菌基因的方法尤为重要。根据 GenBank 公布的副溶血弧菌的 *gyrB* 基因序列设计一对引物和 TaqMan 探针,建立了基于 TaqMan 探针的 Real-time PCR 方法。通过对 9 种细菌(12 株菌株)的 DNA 进行扩增,结果所有 4 株副溶血弧菌均可产生扩增曲线,其他 8 株非副溶血弧菌均不产生扩增曲线,证明了引物和探针具有很高的特异性。细菌纯培养物品和人工布菌的检测灵敏度分别为 1 CFU/PCR 反应体系和 10 CFU/PCR 反应体系,相关系数均为 0.99($r^2 = 0.99$)。整个试验可在 1h 内完成。建立的方法可用于海产品中副溶血弧菌的快速定量检测。

关键词 TaqMan 探针, Real-time PCR, 副溶血弧菌 *gyrB* 基因, 定量检测

中图分类号: Q81 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)04-0638-05

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种引起食源性疾病的重要病原^[1],可导致患者出现腹泻、肠痉挛、恶心、呕吐、发烧等典型胃肠炎反应。研究数据表明,50%~70%因食用海产品引发的腹泻病例是由副溶血弧菌引起的^[2-4]。传统的培养鉴定方法需要较长时间的培养和选择性增菌,且容易出现假阴性,因为在营养不足或应激的情况下,副溶血弧菌很容易进入活的不可培养状态(Viable but non-culturable state, VBNC)。目前已有许多 PCR 和 DNA 探针技术检测副溶血弧菌的报道,Tada 等^[5]建立了一种分别检测副溶血弧菌 *tdh* 和 *trh* 基因的 PCR 方法, Kim 等^[6]建立一种检测 *toxR* 基因的 PCR 方法,可在种的水平上检测副溶血弧菌。这些方法虽然敏感性和特异性比较高,但需要进行 PCR 后处理,增加了交叉污染的可能性,而且不能对细菌进行定量检测。TaqMan 试验具有定量准确、快速、简便、直观的优点,已广泛应用于其他细菌的检测^[7-9]。Blackstone 等^[10]建立了一种针对 *tdh* 基因的 TaqMan 检测方法,但仅能检测携带有 *tdh* 基因的副溶血弧菌,而且还需要一个前增菌的过程。国内扈庆华等^[11]建立了一种快速检测副溶血弧菌的改良分子信标-实时 PCR 方法,虽然敏感性高,但事实上仍是一种非定量的方法。Venkateswaran 等^[12]报道,*gyrB* 基因是副溶血弧菌 DNA 复制所必需的,具有副溶血弧菌种特异性,而且为单拷贝基因,具有设计 PCR 引物的保守区域。本试验旨在以 LightCycler 为平台,建立一种针对 *gyrB* 基因的 Real-time PCR 方法,用于定量检测海产品中的副溶血弧菌。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus* 20562, *V. parahaemolyticus* 20568, *V. parahaemolyticus* 20570, *V. parahaemolyticus* 20572)购于上海市疾病预防控制中心;创伤弧菌(*V. vulnificus* 91-4)溶藻弧菌(*V. alginolyticus* 91-1)和拟态弧菌(*V. mimicus* 91-8)购于北京药检所;非 O1 群霍乱弧菌(*Vibrio cholerae non-O1*)大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC25922)沙门氏菌(*Salmonellae* ATCC14028)金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC12598)和单增李斯特杆菌(*Listeria monocytogenes* ATCC7644)购于江苏省疾病预防控制中心。

1.1.2 培养基:致病性弧菌增菌培养基(碱性蛋白胨水, APW)致病性弧菌的选择性分离培养基(胆盐琼脂、硫代硫酸盐-枸橼酸盐-胆盐-蔗糖培养基, TCBS)其他细菌的增菌培养基(LB)均购于北京陆桥公司;柯玛嘉弧菌显色培养基购于德国默克公司。

1.1.3 主要试剂和仪器:TaKaRa TaqTM PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司;细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购于上海舜公公司;溴化乙锭(EB)购于 Promega 公司。柯达数码凝胶成像系统购于美国 KODAK 公司;LightCycler 定量 PCR 仪购于瑞士 Roche 公司;VITEK32 细菌鉴定仪购于生物梅里埃公司。

1.2 引物和 TaqMan 探针的设计和合成

根据 GenBank 公布的副溶血弧菌 *gyrB* 基因序列(Accession number: AY527390)中的保守区域用软件 Oligo 6.0

基金项目 国家自然科学基金项目(30371060)

* 通讯作者。Tel 86-25-84395507 Fax 86-25-84398669 E-mail khhuang@njau.edu.cn

作者简介 蔡潭溪(1980-)男,福建安溪人,硕士研究生,主要从事兽医临床病理与分子诊断研究。E-mail: coolguy80@sohu.com

收稿日期 2005-01-05, 修回日期 2005-04-30

设计一对引物, 针对引物之间的基因片段利用 Primer Express (1.0, PE Applied Biosystem) 设计 TaqMan 探针, 均交由上海生

工公司合成。探针的 5' 端标记 FAM, 3' 端标记 TAMRA。表 1 为引物和探针序列。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Sequences of primers and probe for Real-time PCR

| Name | Sequence | Length/bp | GC content/% | T_m value |
|-------------|----------------------------------|-----------|--------------|-------------|
| Primer VP-1 | 5'-TGAAGGTTGACTGCCGTTGT-3' | 20 | 47.9 | 58.9 |
| Primer VP-2 | 5'-TGGGTTTTTCGACCAAGAACTCA-3' | 21 | 45.5 | 58.6 |
| Probe | 5'-TTCTCACCCATCGCCGATTCAACCGC-3' | 25 | 60 | 68.6 |

1.3 细菌记数方法和分离鉴定

取每个稀释度的细菌纯培养液或样品匀浆均匀涂布于 3 个 TCBS 平板(200 μ L/板), 37 $^{\circ}$ C 培养 24h 后进行菌落记数, 取平均值。挑取可疑的绿色菌落划线接种柯玛嘉平板, 培养后挑取粉红色的单个菌落, 利用生物梅里埃公司 VITEK32 细菌鉴定系统进行副溶血弧菌鉴定。

1.4 Real-time PCR

1.4.1 模板 DNA 的提取: 取 1mL 细菌纯培养液或样品匀浆, 用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒进行抽提, 通过蛋白核酸分析仪测定 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值来确定 DNA 的纯度。

1.4.2 PCR 扩增: PCR 扩增反应在 LightCycler (Roche) 上进行, 反应体系(20 μ L): 不同浓度的模板 DNA 2 μ L, 10 \times TaqMan 缓冲液 2 μ L, 5 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 25mmol/L dNTP Mixture 2 μ L, 0.2 μ mol/L TaqMan 探针 1 μ L, 0.5 μ mol/L 引物各 1 μ L, 0.55U UNG 酶 2.5U/ μ L Taq 聚合酶, 超纯水 6.4 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10min, 95 $^{\circ}$ C 3s, 60 $^{\circ}$ C 20s, 72 $^{\circ}$ C 10s, 40 个循环。温度转换率为 20 $^{\circ}$ C/s, 在每个循环的延伸阶段收集荧光信号, 荧光收集模式设为 F₁/F₂。PCR 结束后, PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.5 制作标准曲线

取 1mL 副溶血弧菌纯培养液, 10 倍梯度稀释至终浓度 1.0×10^2 CFU/mL 到 1.0×10^6 CFU/mL, 按上述步骤提取 DNA 作为模板, 然后分别取 1.0CFU, 1.0×10^1 CFU, 1.0×10^2 CFU, 1.0×10^3 CFU, 1.0×10^4 CFU 副溶血弧菌的基因组 DNA 进行定量扩增, 制作标准曲线。

称取 25g 牡蛎肉加入到 225mL 的 APW 培养液, 放入匀浆机中均匀搅拌 90s, 制成牡蛎匀浆。将已知浓度的副溶血弧菌接种到 10mL 的牡蛎匀浆中, 以牡蛎匀浆作为稀释液, 10 倍稀释至终浓度 1.0×10^3 CFU/mL 到 1.0×10^7 CFU/mL。每个稀释度各取 1mL, 按上述步骤提取 DNA, 然后分别取 10 CFU, 1.0×10^2 CFU, 1.0×10^3 CFU, 1.0×10^4 CFU, 1.0×10^5 CFU 副溶血弧菌的基因组 DNA 进行定量扩增, 制作标准曲线。

1.6 海产品中副溶血弧菌的定量检测

从南京市场抽取 270 份海产品, 其中牡蛎、龙虾、海带鱼、海瓜子、文蛤、罗非鱼、小黄鱼、对虾、鲳鱼各 30 份。样品以生产的原始包装放在塑料袋中, 保持温度 3 $^{\circ}$ C ~ 5 $^{\circ}$ C 左右, 于 2h 内送达实验室。无菌称取 25g 样品加入到 225mL 的 APW 培养液中, 匀浆机搅拌 90s, 取 1mL 匀浆提取 DNA, 作 Real-time PCR 检测。

2 结果

2.1 Real-time PCR 的特异性

定量 PCR 的结果显示, 所有 4 株副溶血弧菌均能产生 S 型扩增曲线, 而其他 8 株非副溶血弧菌均不能产生 S 型扩增曲线(图 1)。扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析与 Real-time PCR 一致, 进一步证实了本试验的特异性。

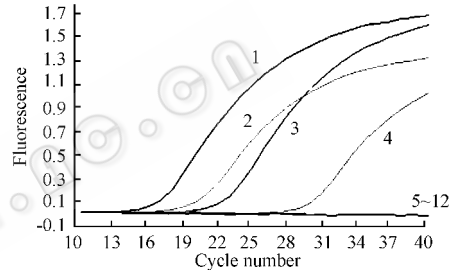


图 1 Real-time PCR 的特异性扩增曲线

Fig. 1 Specific amplification curve of *V. parahaemolyticus*

1. *V. parahaemolyticus* 20562; 2. *V. parahaemolyticus* 20568; 3. *V. parahaemolyticus* 20570; 4. *V. parahaemolyticus* 20572; 5. *V. vulnificus*; 6. *V. alginolyticus*; 7. *V. mimicus*; 8. *V. cholerae non-01*; 9. *E. coli*; 10. *Salmonellae*; 11. *Staphylococcus aureus*; 12. *Listeria monocytogenes*.

2.2 Real-time PCR 的敏感性

2.2.1 纯培养的副溶血弧菌 DNA 检测: 取 1.0CFU, 1.0×10^1 CFU, 1.0×10^2 CFU, 1.0×10^3 CFU, 1.0×10^4 CFU 纯培养的副溶血弧菌基因组 DNA 进行定量扩增。反应结束后用 LightCycler software (version 3.5) 进行数据分析。扩增曲线见图 2-A, 标准曲线见图 2-B。从标准曲线可看出, 本试验敏感性高, 对细菌的定量检测可达到 1CFU/PCR 反应体系。循环阈值 (C_t 值) 和初始细胞数的对数相关性好, 相关系数为 0.99, 初始细胞数与 C_t 值之间的线性关系表达式: $C_t = -3.430 \times \text{Log}(\text{number of cells}) + 33.13$, 则 $\text{CFU} = 10^{(C_t - 33.13) / -3.430}$ 。Real-time PCR 定量结果和平板计数结果具有良好的相关性 ($r^2 = 0.98$)。

2.2.2 人工布菌的牡蛎匀浆中副溶血弧菌 DNA 的检测: 取 10CFU, 1.0×10^2 CFU, 1.0×10^3 CFU, 1.0×10^4 CFU, 1.0×10^5 CFU 人工布菌的副溶血弧菌基因组 DNA 进行定量扩增。图 3-A 为扩增曲线, 图 3-B 为标准曲线。循环阈值 (C_t 值) 和初始细胞数的对数相关性好, 相关系数为 0.99, 初始细胞数与 C_t 值之间线性关系表达式为 $C_t = -3.630 \times \text{Log}(\text{number of cells}) + 28.06$ 。试验的敏感度为 10 CFU/PCR 反应。Real-time

PCR 定量结果和平板计数具有良好的相关性 ($r^2 = 0.96$)

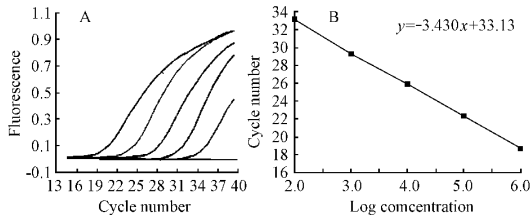


图2 10倍梯度稀释的纯培养副溶血弧菌 DNA 的 Real-time PCR 扩增结果

Fig.2 Real-time PCR amplification curve of serial 10-fold dilutions of *V. parahaemolyticus* DNA

A :DNA extracted from 1.0×10^4 CFU , 1.0×10^3 CFU , 1.0×10^2 CFU , 10CFU and 1.0CFU *V. parahaemolyticus* in pure cultures , respectively .

B : The standard curve was plotted on the basis of cell number of bacteria from pure cultures versus the number of cycles required to reach Ct. Equation of lines for pure culture is $Ct = -3.430 \times \text{Log}(\text{number of cell}) + 33.13$.

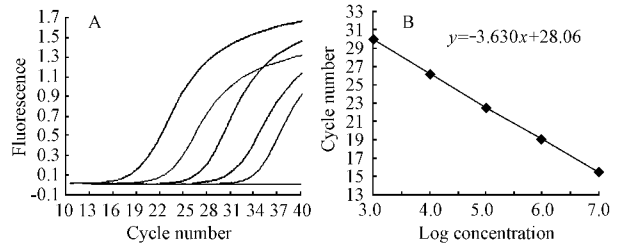


图3 10倍梯度稀释的人工布菌的牡蛎匀浆中副溶血弧菌 DNA 的 Real-time PCR 扩增结果

Fig.3 Real-time PCR amplification curve of serial 10-fold dilutions of *V. parahaemolyticus* DNA

A :DNA extracted from 1.0×10^5 CFU , 1.0×10^4 CFU , 1.0×10^3 CFU , 1.0×10^2 CFU and 10 CFU *V. parahaemolyticus* in oyster homogenates , respectively .

B :Standard curve was plotted on the basis of cell number of bacteria from the homogenates versus the number of cycles required to reach Ct. Equation of lines for homegenates is $Ct = -3.630 \times \text{Log}(\text{number of cell}) + 28.06$.

2.3 海产品中副溶血弧菌的定量检测结果

在用 Real-time PCR 检测 270 份样品中 ,有 75 份样品呈阳

性 选择性增菌后细菌计数检出 52 份样品呈阳性。两种方法的定量检测结果见表 2。

表 2 用不同方法定量检测海产品中的副溶血弧菌

Table 2 Results of quantitative detection of *V. parahaemolyticus* in seafood

| Sample type | Positive rate/% | | No. of cells(CFU/mL) ^a | |
|----------------------|-----------------|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | Real-time PCR | Cultivation | Real-time PCR | Cultivation |
| Oyester | 46.7(14/30) | 36.6(11/30) | $4.7 \times 10^6 \pm 3.0 \times 10^3$ | $3.3 \times 10^4 \pm 3.0 \times 10^2$ |
| Spiny Lobster | 40(12/30) | 30(9/30) | $3.6 \times 10^5 \pm 2.9 \times 10^3$ | $5.1 \times 10^3 \pm 3.0 \times 10^1$ |
| Belt fish | 26.7(8/30) | 20(6/30) | $4.3 \times 10^3 \pm 3.1 \times 10^2$ | $2.9 \times 10^2 \pm 3.0 \times 10^1$ |
| Clam | 13.3(4/30) | 13.3(4/30) | $2.6 \times 10^5 \pm 4.0 \times 10^3$ | $2.3 \times 10^4 \pm 3.0 \times 10^3$ |
| Ruditapes variegates | 16.7(5/30) | 6.7(2/30) | $1.9 \times 10^4 \pm 3.6 \times 10^2$ | $1.6 \times 10^3 \pm 3.0 \times 10^1$ |
| Small yellow croaker | 36.7(11/30) | 26.7(7/30) | $1.5 \times 10^5 \pm 3.0 \times 10^4$ | $3.8 \times 10^4 \pm 3.0 \times 10^2$ |
| Chinese shrimp | 30(9/30) | 16.7(5/30) | $4.9 \times 10^4 \pm 3.0 \times 10^2$ | $4.1 \times 10^2 \pm 3.0 \times 10^1$ |
| Tilapia | 13.3(4/30) | 6.7(2/30) | $2.8 \times 10^5 \pm 3.0 \times 10^2$ | $3.2 \times 10^3 \pm 3.0 \times 10^1$ |
| Slivery pomfret | 23.3(7/30) | 20(6/30) | $3.1 \times 10^4 \pm 3.0 \times 10^2$ | $1.3 \times 10^2 \pm 3.0 \times 10^2$ |

^amean + standard deviation.

3 讨论

副溶血弧菌是引起人类食源性疾病的重要病原之一。1998 年以来的数据显示 ,副溶血弧菌性食物中毒的发生规模及人群暴露规模呈明显上升趋势 ,已超过沙门氏菌食物 ,跃居细菌性中毒的首位^[13]。因此 ,加强对副溶血弧菌的检测力度 ,特别是进行定量检测 ,对预防和控制该菌引发的食物中毒有重要的意义。荧光定量 PCR 技术根据荧光能量传递原理 ,融合了 PCR 技术的高效扩增、探针技术的高特异性、光谱技术的高敏感性和高精度性等优点 ,可直接探测 PCR 过程中荧光信号的变化获得定量结果。本研究建立了一种基于 TaqMan 探针的快速定量检测副溶血弧菌的 Real-time PCR 方法。TaqMan 探针的 5'端和 3'端分别标记一个荧光基

团(FAM)和荧光淬灭基团(TAMRA) ,当探针完整时 ,由于两个基团之间靠得很近 ,发生能量传递 ,荧光基团不产生荧光。PCR 反应过程 ,探针与 PCR 产物退火 ,当引物也结合到模板时 ,激活了 Taq 聚合酶的 5'端外切酶活性 ,荧光基团和淬灭基团分离 ,两个基团之间的能量传递作用遭到破坏 ,从而发出荧光。荧光量和 PCR 产物的数量成正比。因此 ,通过 PCR 反应液的荧光强度可推算出初始模板的数量 ,达到定量的目的。整个反应过程是由 LightCycler PCR 定量仪自动控制并进行结果分析 ,与常规 PCR 相比 ,避免了 PCR 后续步骤 ,减少了产物污染的机会。试验快速、准确 ,整个反应 1h 内就可完成。

一般认为 ,副溶血弧菌的主要致病因素是其产生的耐热性溶血毒素(TDH)和耐热性溶血毒素相关的溶血毒素

(TRH) 然而由于副溶血弧菌具有多种表型^[14]、血清型^[15]和产毒型菌株^[16, 17], 因此针对溶血素设计的引物和探针不能同时检测所有的致病性菌株^[18, 19]。Venkateswaran 等^[12]通过试验表明, 副溶血弧菌携带的 *gyrB* 基因具有很高的种特异性, 利用 *gyrB* 基因序列作为目标检测基因, 可严格与其他细菌区分开来。本试验根据 GenBank 公布的 *gyrB* 基因序列设计和合成一对引物和一个 TaqMan 探针, 建立了一种基于 LightCycler 平台的快速、定量检测海产品中副溶血弧菌的方法。通过与 GenBank 中的核苷酸序列进行同源性比对, 证明本试验设计的引物和探针具有很高的特异性。利用设计的引物和探针针对 4 株副溶血弧菌和其他 8 种细菌的 DNA 进行 PCR 扩增, 所有副溶血弧菌均产生扩增曲线, 而其他 8 种细菌则均不产生扩增曲线, 证实了本试验具有高的特异性, 可用于副溶血弧菌的检测。

通过 Real-time PCR 方法和选择性增菌后细菌计数对 APW 纯培养液和人工布菌的牡蛎匀浆进行副溶血弧菌定量扩增, 并分别制作标准曲线, PCR 结束后用 LightCycler software (Version 3.5) 进行数据分析, 得出 CFU 与 Ct 值之间的线性关系表达式。待测样品的 Ct 值可从仪器上读取, 把待测样品的 Ct 值代入表达式就可以算出它的初始拷贝值。结果表明, 本试验建立的 Real-time PCR 方法定量是准确、可靠的, 两个标准曲线的斜率分别为 -3.430 和 -3.630, 循环阈值 (Ct 值) 和初始细胞数的对数相关性好, 相关系数均为 -0.99, 且敏感性高。对 APW 纯培养液和人工布菌的牡蛎匀浆副溶血弧菌定量检测敏感性分别达到 1 CFU/PCR 反应体系和 10 CFU/PCR 反应体系。虽然牡蛎体组织对 DNA 的抽提存在一定的影响, 但从本实验看, 这种影响是比较小的。

通过海产品的实际检测发现, 细菌培养计数与 Real-time PCR 定量结果的差异较大, 可能是由于很大一部分细菌是死细菌或进入 VBNC 状态, 也可能是因为 TCBS 平板对副溶血弧菌具有部分抑制作用。研究数据表明, 由于夏季温度较高, 每克牡蛎组织可携带 $10^3 \sim 10^5$ CFU 的细菌^[20], 其中 10% ~ 50% 为副溶血弧菌, 因此通过选择性增菌后, 容易进行细菌计数。但是在寒冷的环境中, 副溶血弧菌的数量显著下降, 且在营养不足或受到应激时, 副溶血弧菌容易进入活的不可培养状态 (Viable but non-culturable state, VBNC), 但这种细菌在温度升高后又可恢复可培养性。因此, 传统的培养方法容易出现假阴性, 造成检测结果的差异。

综上所述, 本试验建立的基于 TaqMan 探针的 Real-time PCR 方法, 可定量检测副溶血弧菌, 与传统的细菌培养方法和生化鉴定相比, 具有更加省时、操作简便和定量准确等优点, 对海产品中副溶血弧菌的监控检测有着重要的价值。

参 考 文 献

- [1] Joseph S W, Colwell R R, Kaper J B, et al. *Vibrio parahaemolyticus* and related *Hallophilic vibrios*. *Crit Rev Microbiol*, 1983, **10**: 77 - 123.
- [2] Ministry of Health and Welfare, Environmental Health Bureau, Food Sanitation Division. The epidemiological data of food poisoning in 1994. *Food Sanit Res*, 1995, **45**: 79 - 141.
- [3] Nakashima S, Takimoto K. The epidemiological data of food poisoning in 1986. *Food Sanit Res*, 1987, **37**: 50 - 76.
- [4] Venkateswaran K, Nakano H, Okabe T, et al. Occurrence and distribution of *Vibrio* spp., *Listonella* spp., and *Clostridium botulinum* in the Seto Inland Sea of Japan. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 559 - 567.
- [5] Okuda J, Ishibashi M, Abbott S L, et al. Analysis of the thermostable direct hemolysin (tdh) gene and the tdh-related hemolysin (trh) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the west coast of the United States. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**: 1965 - 1971.
- [6] Kim Y, Okuda B, Matsumoto J, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the targeted to the *toxR* gene. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**: 1173 - 1177.
- [7] Bassler H A, Flood S J A, Livak K J, et al. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 3724 - 3728.
- [8] Chen S, Yee A, Griffiths M, et al. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *Int Food Microbiol*, 1997, **35**: 239 - 250.
- [9] Lyon W J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 4685 - 4693.
- [10] Blackstone G M, Nordstrom J L, Vickery M C L, et al. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *J Microbiol Methods*, 2003, **53**: 149 - 155.
- [11] 庾庆华, 郑薇薇, 石晓路, 等. 改良分子信标—实时 PCR 快速检测副溶血弧菌. *现代预防医学*, 2004, **31**(3): 441 - 443.
- [12] Venkateswaran K, Dohmoto N, Harayama S. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 681 - 687.
- [13] 刘秀梅. 食源性疾病预防技术的研究. *中国食品卫生杂志*, 2004, **16**(1): 3 - 9.
- [14] Baumann P, Schubert R H W. Family II. *Vibrionaceae* veron. In: Krieg N R, Holt J G. ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (vol. 1). Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1984, 516 - 550.
- [15] Venkateswaran K, Kurusu T, Satake M, et al. Comparison of a fluorogenic assay with a conventional method for rapid detection of *Vibri parahaemolyticus* in seafoods. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 3516 - 3520.
- [16] Baba K, Shirai H, Terai A, et al. Analysis of the tdh gene cloned from a tdh gene- and trh gene-positive strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Immunol*, 1991, **35**: 253 - 258.
- [17] Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct hemolysin and related hemolysins. *Rev Med Microbiol*, 1993, **4**: 106 - 113.
- [18] Nishibuchi M, Doke S, Toizumi S, et al. Isolation from a coastal fish of *Vibrio hollisae* capable of producing a hemolysin similar to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 2144 - 2146.

- [19] Nishibuchi M, Khaemomane V I, Honda T, *et al.* 1990. Comparative analysis of the hemolysin genes *Vibrio cholerae non-O1*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio hollisae* are similar to the *tdh* gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett*, 1990, **55**: 251 - 256.
- [20] Wright A C, Hill R T, Johnson J A, *et al.* Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 717 - 724.

Quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* by real-time TaqMan PCR

CAI Tan-xi¹ JIANG Lu-yan² HUANG Ke-he¹

(¹ College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(² Jiangsu Entry/Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* is one of important human food pathogens. Traditional diagnostic tests for *V. parahaemolyticus* are laborious and always present false negative results. Therefore, it is important to develop a nucleic acid-based test for quantitative detection of *V. parahaemolyticus*. A TaqMan PCR assay was presented for quantitative detection of *V. parahaemolyticus* in pure cultures and oysters. The primers and probe were designed according to the gyrase B gene (*gyrB*) sequence of *V. parahaemolyticus* strains. Amplification of DNAs from 12 bacterial strains comprising 9 genera showed that all of the strains of *V. parahaemolyticus* tested (n = 4) were positive and all other species of strains tested (n = 8) were negative. The results of the TaqMan PCR with raw oysters inoculated with *V. parahaemolyticus* were comparable to those of pure cultures. The sensitivity of the assay was 1 CFU PCR Mixture⁻¹ and 10 CFU PCR Mixture⁻¹ in pure culture and inoculated raw oyster, respectively. The correlation rate was 0.99 ($\gamma^2 = 0.99$). The assay could be completed within 1h. The Real-time PCR can be used as a rapid screening tool for the presence of *V. parahaemolyticus* in seafood without prior isolation and characterization of the bacteria by traditional microbiological methods.

Key words: TaqMan, Real-time PCR, *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus*, Quantitative detection

Foundation item: Programs of Chinese National Natural Science Foundation (30371060)

* Corresponding author. Tel 86-25-84395507; Fax 86-25-84398669; E-mail khhuang@njau.edu.cn

Received date: 01-05-2004

分子生物学基础实验培训班

(北京天为时代科技有限公司举办)

培训宗旨: 适应科学发展需要, 培养分子生物学方面初级技术人员。

培训时间: 周六周日全天 (上午: 8:00 - 11:30, 下午: 12:30 - 17:30)

培训地点: 北京海淀区成府路 35 号北陆楼 4 层 邮编: 100083

(北京天为时代科技有限公司)

联系方式: 电话: 010-62521767 62526072 传真: 010-62551779

E-mail: people@tw-biotech.com

培训内容: 分子生物学基本实验技术的原理和操作

1. PCR (聚合酶链反应) 技术 (PCR 的原理, 引物的设计、模板的制备、体系的建立和 PCR 反应)。
2. DNA 片段的凝胶回收。
3. 质粒的提取 (菌体的收集、裂解及质粒的纯化、鉴定)。
4. DNA 片段的 TA 克隆 (DNA 片段与 T 载体的连接、连接产物转化感受态大肠杆菌)。
5. 重组菌的鉴定 (蓝白斑法鉴定重组菌、PCR 法鉴定目的片段)。