

# CPA-核酸试纸条快速检测副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)方法的建立及其在海产品检测中的应用\*

徐苗苗<sup>1,2</sup> 李健<sup>1,2</sup> 李桂玲<sup>1,2</sup> 苏国成<sup>1,2</sup> 陈吉刚<sup>3</sup> 刘静雯<sup>1,2</sup>

(1. 集美大学食品与生物工程学院 厦门 361021; 2. 福建省高校食品微生物与酶工程重点实验室 厦门 361021; 3. 浙江万里学院生物与环境学院 宁波 315100)

**摘要** 本研究将交叉引物恒温扩增技术(cross priming amplification, CPA)与核酸试纸条相结合建立一种副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)快速可视化检测方法。针对副溶血性弧菌特有的不耐热溶血素基因 *tlh* 的六个不同区域设计两对特异性引物和一对检测探针,通过优化反应条件确定了最佳反应体系。CPA-核酸试纸条方法对副溶血性弧菌的检测具有较强的特异性,对纯培养物的检测灵敏度达到 58 cfu/mL,对污染牡蛎中副溶血性弧菌的检测灵敏度为 5.2 cfu/g,比传统的 PCR 技术灵敏度提高了 10 倍,且具有较高的稳定性。交叉引物恒温扩增技术与核酸试纸条相结合的方法操作简便、特异性强、灵敏度高且能有效防止污染,可用于现场及基层单位副溶血性弧菌的快速检测。

**关键词** 副溶血性弧菌;交叉引物恒温扩增;核酸试纸条;快速检测

中图分类号 R155.5; TS201.3 doi: 10.11693/hyhz20160200036

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)隶属弧菌科的弧菌属。是一种嗜盐性海洋人鱼共患致病菌,于 1950 年由日本的藤原恒三郎教授从引起食物中毒的小沙丁鱼中初次分离得到(藤野恒三郎, 1951)。该菌广泛分布于世界各地的近岸海水、海底沉积物、海产品及腌制食品中(Su *et al*, 2007)。副溶血性弧菌食物中毒与进食含有该菌的食物有关,生食或食入未煮熟的受到污染的海产品或腌制食品是其主要传播途径(Chiou *et al*, 2000; McLaughlin *et al*, 2005; Hara-Kudo *et al*, 2012; Nelapati *et al*, 2012; Newton *et al*, 2012)。近年来由副溶血性弧菌引起的食源性食物中毒的比例高达 68.0%,居我国沿海地区细菌性食物中毒之首(毛雪丹等, 2013)。全球食源性腹泻疾病中有 50%—70%是由副溶血性弧菌引起(Wang *et al*, 2013; Xu *et al*, 2014)。因此,选择合适的检测靶点,建

立快速简便的检测方法是预防副溶血性弧菌食物中毒最有效的途径之一。

目前用于检测副溶血性弧菌的技术包括传统 PCR 法、荧光定量 PCR 法、多重 PCR 法、酶联免疫吸附法、免疫胶体金、核酸探针技术、基因芯片技术、变性高效液相色谱技术及 DNA 指纹图谱等(Parida *et al*, 2005; Ward *et al*, 2006; Bisha *et al*, 2012; Ceccarelli *et al*, 2013)。这些方法因所需设备昂贵、耗时,技术水平要求较高等弊端,实用性受到限制(徐苗苗等, 2014)。近年发展起来的环介导恒温扩增技术已被广泛应用于病原微生物的快速检测(Prompamorn *et al*, 2011; Xu *et al*, 2012),该方法在恒温条件下就能发生反应,对设备的要求比较低,操作简单,反应只需 60min,较传统的 PCR 技术具有高效、快速等优点,因此在某种程度上很好地解决了目前基因检测的弊

\* 国家海洋公益性行业专项经费资助项目, 201305027 号;福建省高校食品微生物与酶工程重点实验室开放基金项目, M20130910 号。徐苗苗, E-mail: miaomiaoxu6@163.com

通讯作者: 刘静雯, 博士, 教授, E-mail: ljwsbch@163.com

收稿日期: 2016-02-17, 收修改稿日期: 2016-03-13

端。交叉引物恒温扩增技术(Cross priming amplification, CPA)是基于环介导等温技术基础上的一种新型的恒温扩增技术,其原理与环介导等温技术不尽相同,该方法具有较高的特异性和灵敏度(Fang *et al*, 2009; Xu *et al*, 2012; Yang *et al*, 2014)。将CPA技术与核酸试纸条相结合,通过免疫杂交反应使对扩增产物的检测更为快速、便捷,尤其适用在现场和基层检测使用(Zhao *et al*, 2010)。目前针对副溶血性弧菌的CPA核酸试纸条快速检测方法尚未见报道。*tlh*基因是副溶血性弧菌三大毒力基因之一,同时也是种特异性基因,无论是环境分离株还是临床致病株均含有该基因(Yamazaki *et al*, 2008; Gutierrez West *et al*, 2013; He *et al*, 2014)。本研究以副溶血性弧菌*tlh*为靶标基因,建立副溶血性弧菌CPA-核酸试纸条快速检测技术,以用于现场和基层该病原微生物的快速检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌种与试剂** Bst DNA聚合酶、10×Thermopol 购自 New England Bio Labs 公司; MgSO<sub>4</sub>、dNTPs、10×PCR Buffer、10×loading Buffer、rTaq DNA、100bp DNA Ladder Marker 均购自 TaKaRa 公司; 甜菜碱购自 Sigma 公司; 核酸检测试纸条购自杭州优思达生物技术有限公司。FTA Filter 及 FTA 专用缓冲液均购自 Whatman 公司。副溶血性弧菌、霍乱弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均由本实验室保存。

**1.1.2 引物与探针的设计** 通过序列比对确定副溶血性弧菌*tlh*基因(GenBank: JX262976.1)的保守区域,选取该区域的六个不同位置利用 Primer 5.0 分别设计外围引物、交叉引物和检测探针(两条探针分别用 Fitc 和 Biotin 进行标记)用于 CPA 扩增反应。引物及探针序列如表 1。

表 1 CPA 引物及探针序列  
Tab.1 CPA primers and the sequences of probes

引物名称	引物及探针序列(5'—3')
VPOF	CAGAAGCACTGATTCGTTTG
VPOR	CGGTGAGTTGCTGTTGTTGG
VPIF	TGAGCGGTTGATGTCCAAACAATCGTGCGAA AGTGCTTGAGATG
VPIR	TCGTGCGAAAGTGCTTGAGATGTGAGCGGTT GATGTCCAAACAA
VPDF	Fitc-CAAAGCGCAAGGTTACAACATCA
VPDR	Biotin-GAACAAAGCGTGAGATCAAAACAAC

### 1.2 实验方法

**1.2.1 DNA 模板的制备** 采用 CTAB/NaCl 法和热裂解法提取基因组。CTAB/NaCl: 取过夜培养的副溶血性弧菌菌液 1 mL, 采用 CTAB/NaCl 法进行基因组的提取(Sambrook *et al*, 2001)。热裂解法: 取过夜培养的菌悬液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 12000 g 离心 3 min, 尽量吸去上清液, 向离心管中加入无菌水洗涤沉淀两次之后加入 100 μL 无菌水重悬菌体沉淀。将菌悬液置于水浴锅中 100°C 煮沸 10 min, 13000 g 离心 2.5 min, 取上清于一新的离心管中, -20°C 保存待用。

**1.2.2 副溶血性弧菌重组克隆质粒的构建** 以副溶血性弧菌基因组为模板, 用外围引物 VPOF/VPOR 进行 PCR 扩增, 电泳检测扩增产物。PCR 反应体系为 VPOF 0.8 μmol/L, VPOR 0.8 μmol/L, 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTPs 2.0 μL, rTaq 0.3 μL, 加水补足至 25 μL。反应程序: 94°C 5min; 94°C 30s, 59°C 30s, 72°C 30s; 72°C 5min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证, 电泳结果显示, PCR 产物条带与目的片段大小一致。对目的条带进行切胶回收。纯化后的扩增产物与 pMD19-T 载体在连接酶的作用下进行连接反应, 转化感受态细胞 TOP10, 挑取阳性菌落进行增菌培养后提取质粒。将重组克隆质粒送上海生工生物技术有限公司进行测序分析。测序结果表明该 PCR 扩增所得的片段即为特异性副溶血性弧菌核酸片段, 是反应的特异性目标序列。

**1.2.3 CPA 反应体系的建立与优化** 将两对扩增引物及探针按照通用的 CPA 扩增条件组成 20 μL 的反应体系(表 2)。置于 63°C 恒温金属浴中反应 60min, 对扩增产物进行检测。验证用于 CPA 扩增的引物及探针的可行性。结果显示扩增反应正常发生, 扩增效果理想。证明该引物及探针可以使用, 在此基础上对反应体系进一步优化。

首先对引物浓度进行优化, 通过比较不同浓度引物的扩增效果, 选出最佳引物浓度。在确定引物浓度后, 依次对扩增体系中的 MgSO<sub>4</sub>、dNTPs、甜菜碱、bst DNA 聚合酶、反应温度及反应时间进行优化。首先固定其它因素条件不变, 对要优化的因素进行浓度梯度的设置。Mg<sup>2+</sup>的浓度设置为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mmol/L 9 个浓度梯度; dNTPs 的浓度设置为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mmol/L 8 个浓度梯度; 甜菜碱浓度设置为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mol/L 8 个浓度梯度; Bst

表 2 CPA 通用反应体系  
Tab.2 Common reaction system of CPA

组分	浓度	体积( $\mu\text{L}$ )
VPOF	20 $\mu\text{mol/L}$	0.1
VPOR	20 $\mu\text{mol/L}$	0.1
VPIF	20 $\mu\text{mol/L}$	0.6
VPIR	20 $\mu\text{mol/L}$	0.6
VPDF	20 $\mu\text{mol/L}$	0.3
VPDR	20 $\mu\text{mol/L}$	0.3
甜菜碱	5 mol/L	2
MgSO <sub>4</sub>	25 mmol/L	0.8
dNTPs	2.5mmol/L	3.2
Bst DNA Polymerase	8 U/ $\mu\text{L}$	1
ThermoPol buffer	10 $\times$	2
Template	—	1
ddH <sub>2</sub> O	—	8
合计	—	20

DNA polymerase 设置为 0、1.6、3.2、4.8、6.4、8.0、9.6 U 7 个浓度梯度。反应温度设置为 57、59、61、63、65、67 $^{\circ}\text{C}$  6 个温度梯度。在确定了以上 5 个因素后,最后对反应时间进行优化,反应时间分别为 0、15、30、45、60、75、90 min,扩增结束后,将扩增产物冰浴并离心。用 2%琼脂糖电泳检测扩增产物,通过比较扩增效果从而确定最佳的反应条件。

**1.2.4 CPA-核酸试纸条法结果判定** CPA 扩增结束后,取 8—10 $\mu\text{L}$  扩增产物,滴加到样品垫上。将试纸条放入含有 100 $\mu\text{L}$  缓冲液的微孔板中,15—30 min 后判读结果。当试纸条上质控线和检测线均出现红色条带,表明样本中含有被检测的目标核酸产物,结果判为阳性。如果试纸条上只有质控线出现红色条带而检测线没有条带出现表明样本中未检测出目的核酸,结果呈阴性。若试纸条质控线和检测线均未有条带出现,说明试纸条可能已损坏、失效或使用操作不当。

**1.2.5 CPA 法检测副溶血性弧菌特异性验证** 用 CTAB/NaCl 法分别提取副溶血性弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、霍乱弧菌、沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的基因组。在相同条件下采用 CPA 法对不同的基因组模板进行扩增,2%琼脂糖电泳法和核酸试纸条法检测扩增产物。

**1.2.6 CPA 法与普通 PCR 法检测副溶血性弧菌灵敏度的比较** 取过夜培养的副溶血性弧菌菌液 1 mL 经梯度稀释后涂布于 LB 固体培养平板上进行菌落计数,每个梯度作三个平行。次日观察平板上菌落的生长情况并计数,根据统计的菌落数,计算出同一个稀

释度 3 个平板上的平均菌落数,通过稀释的倍数计算出每毫升样品中菌落形成单位数。将已知浓度的原菌液进行 10<sup>n</sup> 倍梯度稀释,进而采用普通热裂解法制备基因组模板,同时进行普通 PCR 和 CPA 扩增,电泳和试纸条检测扩增产物,比较两种方法检测纯培养物的灵敏度。CPA 扩增在最佳反应体系下进行,扩增引物采用外围扩增引物上游引物 VPOF: TGCGAA AGTGCTTGAGAT,下游引物 VPOR: GATGAGCGG TTGATGTCC。PCR 扩增采用引物为上游引物 VPOF: TGCGAAAGTGCTTGAGAT,下游引物 VPOR: GATGAGCGGTTGATGTCC。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  5min; 94 $^{\circ}\text{C}$  1min, 49 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  5min。

**1.2.7 CPA 法检测人工污染牡蛎样品中副溶血性弧菌灵敏度的确定** 实验用新鲜牡蛎样品购自厦门集美菜市场,在人工污染副溶血性弧菌前,该牡蛎样品经国标法检测证实不含有副溶血性弧菌。然后将增菌培养后的副溶血性弧菌菌液人工污染到牡蛎样品中:取 25g 样品加入 225mL APW 中,匀浆机搅拌 90s。然后添加不同浓度梯度的副溶血性弧菌菌液到匀浆液中,采用 FTA 基因组采集卡直接提取牡蛎样品中的副溶血性弧菌基因组进行 CPA 扩增。

DNA 提取:取 10mL 匀浆液以 500 $\times\text{g}$  离心 10min,转移上清液于另一灭菌后的离心管中 14000 $\times\text{g}$  离心 10min,沉淀用 500 $\mu\text{L}$  生理盐水悬浮,加入 0.25 倍体积的乙酸乙酯,振荡器混匀 2min,然后 17000 $\times\text{g}$  离心 10min。弃去上清液,沉淀用 20 $\mu\text{L}$  生理盐水悬浮,加入直径为 2.00mm FTA 滤膜片,然后 56 $^{\circ}\text{C}$  干燥,干燥后的 FTA 滤膜片,加入 10% SDS 200 $\mu\text{L}$  煮沸 10min,用 FTA 专用缓冲液洗涤 2 次,然后再用 TE 缓冲液洗涤 2 次,56 $^{\circ}\text{C}$  干燥后可直接作为 CPA 扩增模板 (Lampel *et al*, 2004)。

## 2 结果与分析

### 2.1 副溶血性弧菌 *tlh* 基因片段阳性克隆质粒的构建及验证

用引物 VPOF/VPOR 对副溶血性弧菌基因组 DNA 进行扩增,对扩增片段进行回收纯化,通过构建重组克隆质粒进行测序分析。结果表明,该扩增片段的大小约为 407 bp,与目的序列一致(图 1),是副溶血性弧菌 *tlh* 的特异性序列,可以用于后续实验。

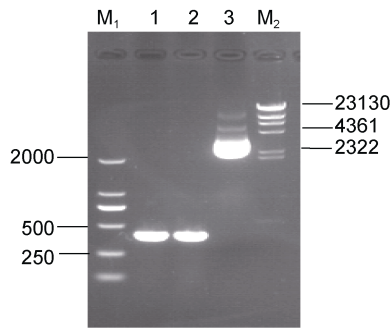


图1 重组质粒 pMD19-T-*tlh* 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of pMD19-T-*tlh* recombinant plasmid

M<sub>1</sub>: DL2000 DNA Ladder marker; 1: 菌落 PCR 扩增产物; 2: 质粒 PCR 扩增产物; 3: pMD19T-*tlh* 重组质粒; M<sub>2</sub>:  $\lambda$ -*Hind* III digest DNA Marker

## 2.2 CPA 扩增反应体系的优化结果

CPA 扩增受诸多因素的影响, 如  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、甜菜碱、Bst DNA polymerase、反应温度及反应时间等。为了实现该方法对副溶血性弧菌的高效检出, 本研究通过各个因素的优化, 得到最佳反应体系。

$Mg^{2+}$  是 Bst DNA polymerase 重要的活性因子, 其浓度对扩增产物的产量和扩增特异性有很大的影响。若  $Mg^{2+}$  浓度过低会直接影响 Bst DNA polymerase 的活性, 从而使 CPA 扩增产物的产量减少, 以致于出现假阴性。本实验通过比较不同  $Mg^{2+}$  添加浓度对扩增效果的影响, 确定最佳  $Mg^{2+}$  使用浓度, 结果如图 2 所示。当  $Mg^{2+}$  浓度为 1.0mmol/L 时, 未出现梯形电泳条带; 当  $Mg^{2+}$  浓度为 1.5mmol/L 时, 开始出现梯形电泳条带; 当  $Mg^{2+}$  浓度为 4.0mmol/L 时, 条带最亮; 当  $Mg^{2+}$  浓度为 4.5mmol/L 时, 条带开始变暗。所以得出最佳  $Mg^{2+}$  使用浓度为 4.0mmol/L。

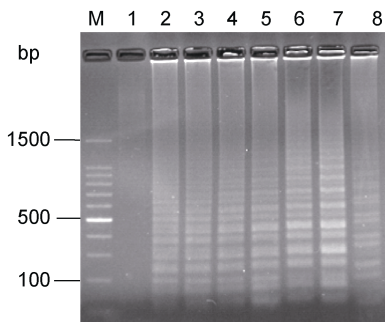


图2  $Mg^{2+}$  浓度的优化结果

Fig.2 Results of the optimal concentration of  $Mg^{2+}$

M: 100 bp DNA ladder marker; 1: 1.0mmol/L; 2: 1.5mmol/L; 3: 2.0mmol/L; 4: 2.5mmol/L; 5: 3.0mmol/L; 6: 3.5mmol/L; 7: 4.0mmol/L; 8: 4.5mmol/L

在确定最佳  $Mg^{2+}$  的反应体系中添加不同浓度的

dNTPs, 比较不同 dNTPs 浓度下产物的扩增效果。结果如图 3 所示, dNTPs 的使用浓度在 0.1—0.8mmol/L 范围内均能发生有效扩增, 当 dNTPs 的添加量为 0.4mmol/L 时, 梯形电泳条带最亮, 扩增产物最多, 为最佳使用浓度。

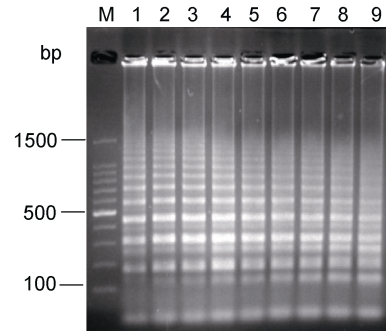


图3 dNTPs 浓度的优化结果图

Fig.3 Results of the optimal concentration of dNTPs  
M: 100 bp DNA ladder marker; 1: 0.1mmol/L; 2: 0.2mmol/L; 3: 0.3mmol/L; 4: 0.4mmol/L; 5: 0.5mmol/L; 6: 0.6mmol/L; 7: 0.7mmol/L; 8: 0.8mmol/L; 9: 0.9mmol/L

甜菜碱能使双链 DNA 处于不稳定状态, 从而有利于维持反应体系的平衡, 提高 CPA 反应的扩增效率。比较不同甜菜碱使用浓度对扩增效果的影响, 结果如图 4 所示, 在甜菜碱的使用浓度为 0.2—1.6mol/L 时均出现较为清晰的梯形电泳条带, 且随着甜菜碱浓度的增大, 条带亮度增大。当甜菜碱的使用浓度为 0.8mol/L 时条带最亮, 当超过这个使用浓度时条带逐渐变暗。即甜菜碱的最佳使用浓度为 0.8mol/L。

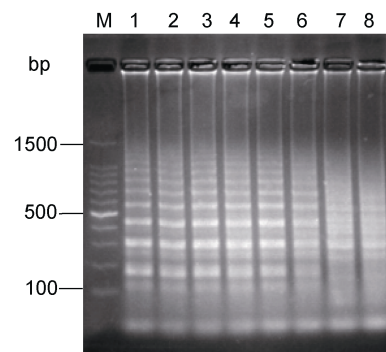


图4 甜菜碱浓度的优化结果图

Fig.4 Results of the optimal concentration of betaine  
M: 100 bp DNA ladder marker; 1: 0.2 mol/L; 2: 0.4 mol/L; 3: 0.6 mol/L; 4: 0.8 mol/L; 5: 1.0 mol/L; 6: 1.2 mol/L; 7: 1.4 mol/L; 8: 1.6 mol/L

Bst DNA polymerase 作为催化 CPA 扩增最重要的因素, 其使用浓度的高低对 CPA 反应有较显著的影响。比较不同 Bst DNA polymerase 使用浓度对扩增

效果的影响。结果如图 5 所示, 在 Bst DNA polymerase 的使用浓度为 3.2 U 时开始出现梯形电泳条带, 且随着 Bst DNA polymerase 浓度的增大, 条带亮度增大。当 Bst DNA polymerase 的使用浓度为 8.0 U 和 9.6 U 时最亮, 且两者亮度相当, 但是鉴于成本的考虑, 选取 Bst DNA polymerase 的最佳使用浓度为 8.0 U。

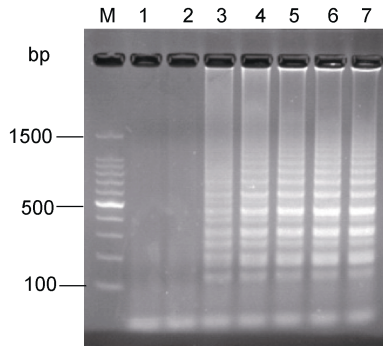


图 5 Bst DNA polymerase 浓度的优化结果图

Fig.5 Results of the optimal concentration of Bst DNA polymerase

M: 100 bp DNA ladder marker; 1: 0 U; 2: 1.6 U; 3: 3.2 U; 4: 4.8 U; 5: 6.4 U; 6: 8.0 U; 7: 9.6 U

反应温度也是影响 CPA 扩增反应能否成功的关键因素, 分别在 57、59、61、63、65、67°C 温度下进行 CPA 扩增, 扩增结果如图 6 所示: 当温度为 57°C 时, CPA 反应不能发生, 当温度为 59°C 时, 出现扩增条带但扩增条带不明显。当温度为 61°C 扩增反应出现较为明显的梯形电泳条带, 当温度达到 63°C 条带最亮, 而当温度高于 63°C 时, 扩增条带变暗, 说明适合 CPA 扩增的最佳反应温度为 63°C。

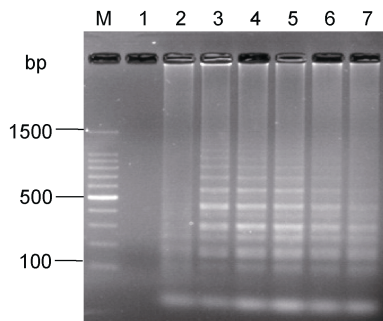


图 6 反应温度的优化结果图

Fig.6 Results of the optimal reaction temperature

M: 100 bp DNA ladder marker; 1: 55°C; 2: 57°C; 3: 59°C; 4: 61°C; 5: 63°C; 6: 65°C; 7: 67°C

分别在 15、30、45、60、75、90 min 不同时间段下进行 CPA 扩增, 扩增结果如图 7 所示: 当反应时

间为 15 min、30 min 时 CPA 反应均不能发生。当反应时间为 45 min, 出现扩增条带但扩增条带比较暗。当扩增时间为 60 min 时梯形电泳条带最亮, 当反应时间超过 60 min 后条带逐渐变暗, 说明 CPA 扩增的最佳反应时间为 60 min。

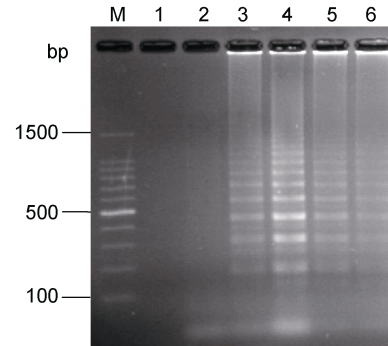


图 7 反应时间的优化结果图

Fig.7 Results of the optimal reaction time

M: 100 bp DNA ladder marker; 1: 15 min; 2: 30 min; 3: 45 min; 4: 60 min; 5: 75 min; 6: 90 min

### 2.3 副溶血性弧菌 CPA 法特异性验证

以霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、河流弧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等作为参照菌株, 分别提取参照菌和目标菌基因组。以无菌水代替基因组模板作为阴性对照, 用相同的反应体系(除模板不同)进行 CPA 扩增, 扩增结果用琼脂糖电泳法和试纸条法同时进行检测。结果如图 8 所示, 在上述条件下只有以副溶血性弧菌基因组 DNA 为模板的 CPA 反应发生了有效的扩增, 其它对照组和阴性组均未出现有效扩增。说明 CPA 扩增体系对于副溶血性弧菌进行扩增的特异性较强。

### 2.4 CPA 法与常规 PCR 法检测副溶血性弧菌灵敏度的比较结果

为了比较 CPA 法和 PCR 法检测副溶血性弧菌纯培养物的灵敏度, 将浓缩(经平板菌落计数)的副溶血性弧菌菌悬液稀释至不同浓度, 最终加入每反应管的浓度分为  $5.8 \times 10^6$ 、 $5.8 \times 10^5$ 、 $5.8 \times 10^4$ 、 $5.8 \times 10^3$ 、 $5.8 \times 10^2$ 、 $5.8 \times 10^1$  和 5.8 cfu/mL, 平行做 CPA 与 PCR 检测灵敏度实验。CPA 扩增产物同时采用电泳检测法和核酸试纸条检测法两种方法同时进行检测。实验结果如图 9 所示, 凝胶电泳法检测结果显示, 当反应管中模板浓度大于等于 5.8 cfu/mL 时均出现梯形电泳条带(图 9a)。CPA 产物核酸试纸条法检测结果显示, 当反应体系中模板浓度大于等于  $5.8 \times 10^1$  cfu/mL 时, 试纸条质控线和检测线均呈红色, 说明在此浓度范

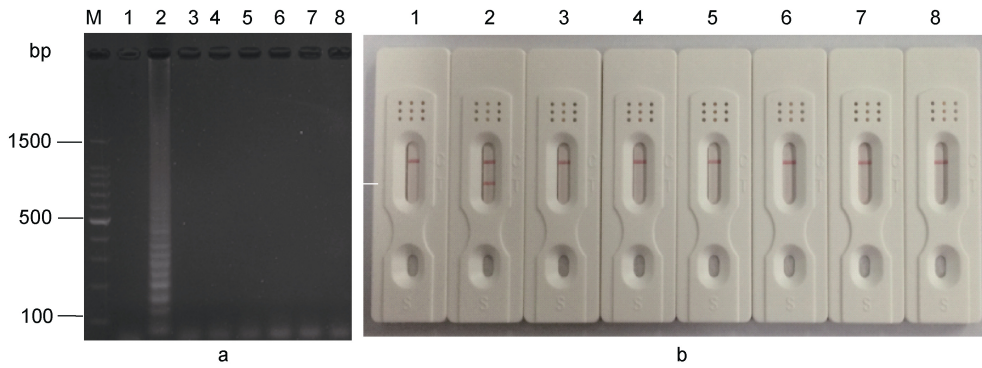


图 8 CPA 扩增反应特异性实验结果

Fig.8 The results of CPA specificity tests

a. CPA-琼脂糖凝胶电泳检测结果; b. CPA-核酸试纸条检测结果

M: 100 bp DNA ladder marker; 1: 阴性对照; 2: 副溶血性弧菌; 3: 霍乱弧菌; 4: 创伤弧菌; 5: 河流弧菌; 6: 溶藻弧菌; 7: 大肠杆菌; 8: 金黄色葡萄球菌

围内 CPA-核酸试纸条法能有效的将待检物进行有效的检出, 当模板浓度低于  $5.8 \times 10^1$  cfu/mL 时, 试纸条只有质控线出现红色条带, 即检测结果呈阴性(图 9b)。常规 PCR 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, 当反应体系中模板浓度大于等于  $5.8 \times 10^2$  cfu/mL 时, 均可

见特异性目的电泳条带, 而当检测浓度小于  $5.8 \times 10^2$  cfu/mL 时, 未能出现特异性电泳条带(图 9c)。说明 PCR 法检测副溶血性弧菌最低检测限为  $5.8 \times 10^2$  cfu/mL, 与 CPA 法相比, CPA 法的检测灵敏度为普通 PCR 法的 10 倍。

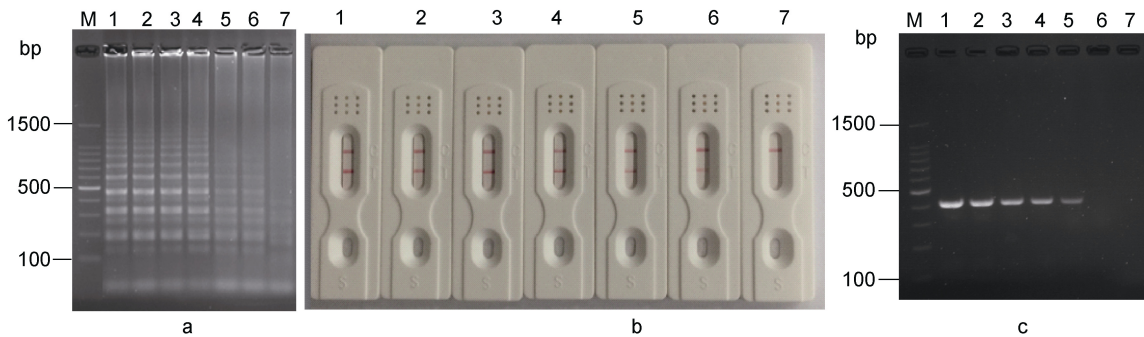


图 9 CPA 和 PCR 方法测副溶血性弧菌纯培养物的灵敏度结果

Fig.9 Detection limit of CPA and PCR for *V. parahaemolyticus* in pure cultures

a. CPA-琼脂糖凝胶电泳检测结果; b. CPA-核酸试纸条检测结果; c. 常规 PCR 检测结果

M: 100 bp DNA ladder marker; 1:  $5.8 \times 10^6$  cfu/mL; 2:  $5.8 \times 10^5$  cfu/mL; 3:  $5.8 \times 10^4$  cfu/mL; 4:  $5.8 \times 10^3$  cfu/mL; 5:  $5.8 \times 10^2$  cfu/mL; 6:  $5.8 \times 10^1$  cfu/mL; 7: 5.8 cfu/mL

## 2.5 CPA 法检测牡蛎样品中副溶血性弧菌灵敏度结果

如 1.2.7 所述方法直接利用 FTA 滤膜提取牡蛎样品中副溶血性弧菌的基因组, 采用 CPA 法对模板进行扩增, 最后结合核酸试纸条检测人工污染牡蛎样品中的副溶血性弧菌, 该方法的检测限达到  $1.3 \times 10^2$  cfu/25g ( $5.2$  cfu/g)(图 10)。

## 3 讨论

本研究针对副溶血性弧菌种特异性基因 *tlh* 保守区域设计一系列引物进行扩增, 副溶血性弧菌分为



图 10 CPA-核酸试纸条法检测污染牡蛎样品中副溶血性弧菌灵敏度

Fig.10 Detection limit of CPA-nucleic acid strip for *V. parahaemolyticus* in contaminated oysters samples

1:  $1.3 \times 10^5$  cfu/25g; 2:  $1.3 \times 10^4$  cfu/25g; 3:  $1.3 \times 10^3$  cfu/25g; 4:  $1.3 \times 10^2$  cfu/25g ( $5.2$  cfu/g); 5:  $1.3 \times 10^1$  cfu/25g

致病菌株和非致病菌株,致病株除了有 *tlh* 基因外一般还携带有 *tdh* 和/或 *trh* 基因,而非致病株一般不携带 *tdh* 和 *trh* 基因但拥有 *tlh* 基因,除此之外,其它菌包括其它弧菌均不拥有此基因,因此选取 *tlh* 基因作为副溶血性弧菌检测的靶基因特异性更强(Horisaka *et al*, 2004; Yang *et al*, 2014)。

在反应体系的建立过程中,通过对反应体系中多个因素和反应条件进行优化并对优化结果进行分析发现,较高检测灵敏度的实现不单单受一方面因素的影响,是多个因素共同作用的结果,只有在最佳反应体系下进行 CPA 扩增才能实现较高的检出率,即较高的灵敏度(Huang *et al*, 2014; Ou *et al*, 2014)。影响 CPA 扩增效果的因子有  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、甜菜碱、Bst DNA polymerase 浓度、反应温度及反应时间。其中  $Mg^{2+}$  是 Bst DNA polymerase 的重要活性因子,其浓度对 CPA 扩增结果影响较大,因此,首先对  $Mg^{2+}$  进行优化。与普通 PCR 相比,CPA 扩增需要更高浓度的 dNTPs, dNTPs 的浓度与 CPA 扩增产物的产量呈正相关。选择合适浓度的 dNTPs 浓度能实现大量的产物扩增效果,间接提高检测灵敏度。Bst DNA polymerase 作为催化 CPA 扩增最重要的因素,其使用浓度的高低对 CPA 反应有较显著的影响。Bst DNA polymerase 直接影响 CPA 产物的产量,当反应体系中 Bst DNA polymerase 浓度过低时,反应无法进行。增加 Bst DNA polymerase 的浓度,反应产物量也随之增加。本研究从提高实验效率并节约实验成本的角度出发,选择该酶的使用量即在保证高效扩增的前提下最小添加量。基于最佳反应体系,并结合一对特异性探针,本研究成功建立了副溶血性弧菌的 CPA-核酸试纸条法。该方法灵敏度高,对于细菌纯培养物和检测限为 58 cfu/mL,对污染牡蛎中副溶血性弧菌的检测灵敏度为 5.2 cfu/g,在检测灵敏度上是普通 PCR 的 10 倍。特异性实验证实,该方法仅对副溶血性弧菌实现特异性检测。此外,该方法操作简便,无需特殊仪器设备,实现了结果的可视化且存储方便,整个检测过程只需 75 min。实验过程中对操作人员的技术要求不高,稍加培训即可进行实验操作,且人为因素造成的误差和污染较小,因此易于普及,是一种特异、灵敏、简便、快速的副溶血性弧菌的检测方法。

### 参 考 文 献

毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅, 2013. 用文献综述法估计我国食源性副溶血性弧菌病发病率. 中华疾病控制杂志, 17(3):

- 265—267
- 徐苗苗, 刘静雯, 2014. 副溶血性弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 大流行克隆的溯源. 微生物学通报, 41(10): 2112—2121
- 藤野恒三郎, 1951. シテス中毒事件の細菌学検査報告. 日本传染病学会杂志, (25): 21
- Sambrook J, Russell D W, 2001. 黄培堂译, 2002. 分子克隆实验指南(第三版)(上、下册). 北京: 科学出版社, 1—96
- Bisha B, Simonson J, Janes M *et al*, 2012. A review of the current status of cultural and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. Int Food Sci Tech, 47(5): 855—899
- Ceccarelli D, Hasan N A, Hug A *et al*, 2013. Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors. Front Cell Infect Microbiol, 3: 97
- Chiou C S, Hus S Y, Chiu S I *et al*, 2000. *Vibrio parahaemolyticus* Serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. J Clin Microbiol, 38(12): 4621—4625
- Fang R D, Li X, Hu L *et al*, 2009. Cross-priming amplification for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens. J Clin Microbiol, 47(3): 845—847
- Gutierrez West C K, Klein S L, Lovell C R, 2013. High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary. Appl Environ Microbiol, 79(7): 2247—2252
- Hara-Kudo Y, Saito S, Ohtsuka K *et al*, 2012. Characteristics of a sharp decrease in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan. Int Food Microbiol, 157(1): 95—101
- He P Y, Chen Z W, Luo J Y *et al*, 2014. Multiplex real-time PCR assay for detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains. Mol Cell Probes, 28(5—6): 246—250
- Horisaka T, Fujita K, Iwata T *et al*, 2004. Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol, 42(11): 5349—5352
- Huang X, Zhai C C, You Q M *et al*, 2014. Potential of cross-priming amplification and DNA-based lateral-flow strip biosensor for rapid on-site GMO screening. Anal Bioanal Chem, 406(17): 4243—4249
- Lampel K A, Dyer D, Deanne D, 2004. Detection of *Bacillus* spores using PCR and FTA filters. J Food Prot, 67(5): 1036—1038
- McLaughlin J B, Angelo DePaola M P H, Bopp C A *et al*, 2005. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. N Engl J Med, 353(14): 1463—1470
- Nelapati S, Nelapati K, Chinnam B K, 2012. *Vibrio parahaemolyticus*—An emerging foodborne pathogen. Vet World, 5(1): 48—63
- Newton A, Kendall M, Vugia D J *et al*, 2012. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996—2010: review of surveillance data from 2 systems. Clin Infect Dis, 54(S5): S391—S395

- Ou X C, Song Y Y, Zhao B *et al*, 2014. A multicenter study of Cross-Priming Amplification for tuberculosis diagnosis at peripheral level in China. *Tuberculosis*, 94(4): 428—433
- Parida M, Horioka K, Ishida H *et al*, 2005. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol*, 43(6): 2895—2903
- Prompamorn P, Sithigorngul P, Rukpratanporn S *et al*, 2011. The development of loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Lett Appl Microbiol*, 52(4): 344—351
- Su Y C, Liu C C, 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol*, 24(6): 549—558
- Wang L, Shi L, Su J Y *et al*, 2013. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food samples using in situ loop-mediated isothermal amplification method. *Gene*, 515(2): 421—425
- Ward L N, Bej A K, 2006. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. *Appl Environ Microbiol*, 72(3): 2031—2042
- Xu G L, Hu L, Zhong H Y *et al*, 2012. Cross priming amplification: mechanism and optimization for isothermal DNA amplification. *Sci Rep*, 2: 246
- Xu X K, Wu Q P, Zhang J M *et al*, 2014. Prevalence, pathogenicity, and serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp from Chinese retail markets. *Food Control*, 46: 81—85
- Yamazaki W, Seto K, Taguchi M *et al*, 2008. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using a loop-mediated isothermal amplification. *BMC Microbiol*, 8(1): 94
- Yang H L, Huang J, Yang B *et al*, 2014. The establishment and application of isothermal cross-priming amplification techniques in detecting penaeid shrimp white spot syndrome virus. *Lett Appl Microbiol*, 59(2): 200—206
- Zhao Y L, Zhang X, Zhang H W *et al*, 2010. Rapid and sensitive detection of *Enterobacter sakazakii* by cross-priming amplification combined with immuno-blotting analysis. *Mol Cell Probes*, 24: 396—400

## DEVELOPMENT OF CROSS PRIMING AMPLIFICATION COMBINED WITH NUCLEIC ACID STRIP FOR DETECTION OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

XU Miao-Miao<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>1,2</sup>, LI Gui-Ling<sup>1,2</sup>, SU Guo-Cheng<sup>1,2</sup>, CHEN Ji-Gang<sup>3</sup>, LIU Jing-Wen<sup>1,2</sup>

(1. College of Food and Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China; 3. College of Biological and Environmental Science, Zhenjiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

**Abstract** We developed a new method that combines cross priming amplification (CPA) with nucleic acid test strip for detection of *Vibrio parahaemolyticus*, and evaluated the specificity and sensitivity of the method. Six primers, including two displacements, two crosses, and two detector primers were designed for recognizing six distinct regions on the sequence of the *tlh* gene. All bacteria strains including *V. parahaemolyticus* and other reference bacteria strains were amplified by using the primers and probes with *Bst* DNA polymerase at 63°C. Among all the bacteria stains, only *V. parahaemolyticus* stain yielded a positive result, indicating that the CPA primers and probes designed were highly specific for target bacteria. The sensitivity of CPA assay for *V. parahaemolyticus* reached to 58cfu/mL for the pure culture and 5.2cfu/g for the tested contaminated oysters. The test could be completed in 75min. Therefore, the CPA-nucleic acid test strip detection method is specific, sensitive, rapid, and easy for detecting *V. parahaemolyticus*.

**Key words** *Vibrio parahaemolyticus*; cross priming amplification; nucleic acid strip; rapid detection