

# 以 16S 和 16S—23S rDNA 间区为靶区建立 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) PCR 快速检测技术\*

邓先余<sup>1,2</sup> 王智学<sup>2</sup> 陈晓艳<sup>3</sup> 何建国<sup>2</sup>

(1. 湖南科技大学 生命科学学院 湘潭 411201;

2. 中山大学生命科学学院 广州 510275; 3. 暨南大学生物工程系 广州 510352)

**提要** 应用 BLAST 程序和 DNASTAR 软件, 比较分析了 5 株副溶血弧菌和其他细菌的 16S—23S rDNA 间区序列, 选取 IGS<sup>IA</sup> 作为扩增靶区, 结合相邻的 16S rDNA 序列, 设计合成了一对特异性引物, 通过优化扩增条件, 建立了快速检测副溶血弧菌的 PCR 方法, 对其特异性和敏感性进行了探讨, 并初步进行了应用研究。结果表明, 新建的 PCR 方法能特异性地扩增出大小为 306bp 和 552bp 的 2 条带, 分别对应于副溶血弧菌的 IGS<sup>0</sup> 和 IGS<sup>IA</sup>, 检测灵敏度为  $5.6 \times 10^2$  CFU/ml, 半个工作日即可得到准确的结果, 能有效检测出在杂色鲍、凡纳滨对虾和各种水质中的副溶血弧菌, 适用于海洋水产动物副溶血弧菌病的早期快速诊断、水产品的检疫及水质环境的监测。

**关键词** 副溶血弧菌, 16S rDNA, 16S—23S rDNA, PCR 检测, 应用

**中图分类号** Q346

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种广布于世界各地的海湾、海岸线区域和盐湖以及海产品中的嗜盐菌。此菌为全球重要的海洋致病细菌, 与霍乱弧菌、创伤弧菌并列为造成人类感染疾病之三大弧菌之一(Jackson *et al*, 1997)。此菌在一定的环境因子作用下可引起鱼、虾、贝类等海产品发病或大面积死亡, 同时可通过受污染的海产品感染人类, 引发肠道急性传染病。近年来, 世界各国的沿海地区常有副溶血性弧菌引起海产品发病或大面积死亡以及人类食物中毒的报道(DePaola *et al*, 1990; 王军等, 1999; Antonio *et al*, 2003; Lee *et al*, 2003)。鉴于副溶血弧菌对人类健康的潜在危害, 许多国家把它作为海洋水产品检疫的重要项目之一。

细菌的 16S—23S rDNA 间区(Intergenic Spacer, IGS)大多数包含编码不同的 tRNA 基因, 大小不一, 进化速率比 16S rDNA 快 10 多倍, 近 10 年来成为细菌系统分类, 特别是相近种和菌株的区分和鉴定方面的新热点(Gürtler *et al*, 1996; 焦振泉等, 2001)。近年来, 学者们相继报道了霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、拟态弧菌(*V. mimicus*) (Chun *et al*, 1999)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*) (Maeda *et al*, 2000; 邓先余等, 2004)及河口弧菌(*V. aestuarianus*) (Lee *et al*, 2002)等弧菌的 16S—23S rDNA IGS。作者在前文(邓先余, 2003<sup>1)</sup>; 邓先余等, 2004)也相继报道过副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌和河流弧菌等 4 种主要的人类与水产动物病原弧菌的 16S—23S rDNA IGS。这些弧菌的

\* 国家“863”计划资助项目, 2001AA622020 号; 广东省科技厅专项资助项目, 2KB05301N 号; 湖南省教育厅资助项目, B30512 号。邓先余, 博士, 副教授, E-mail: dengxy1008@yahoo.com.cn

1) 邓先余, 2003. 6 种水产病原菌 16S—23S rDNA 间区序列分析及检测技术. 中山大学博士学位论文

收稿日期: 2006-03-12, 收修改稿日期: 2006-05-21

16S—23S rDNA IGS 共计有 IGS<sup>GLAV</sup>、IGS<sup>GLV</sup>、IGS<sup>IA</sup>、IGS<sup>G</sup>、IGS<sup>A</sup>和 IGS<sup>0</sup>等7种类型(以其内包含的 tRNA 基因的种类不同而分类),在上述这些弧菌的 IGS 中,作者发现 IGS<sup>IA</sup>和 IGS<sup>G</sup>2种 IGS 类型最为常见,在众多弧菌菌株中出现,并且大部分 IGS 序列前后两端(即 tRNA 基因两翼)大约分别有 40bp 和 200bp 左右的序列大体一致,这些非编码 tRNA 的区域可能为种内比较保守的区域,可以成为设计针对上述弧菌的特异性引物和探针的靶区。

作者根据已报道的副溶血弧菌的 16S—23S rDNA IGS 序列设计引物,以 IGS<sup>IA</sup>及其邻区 16S rDNA 为靶区,建立了快速检测副溶血弧菌的 PCR 方法,探讨了其特异性和敏感性,并进行了初步应用研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、杂色鲍 用于 PCR 方法特异性

检测的菌株共 24 株(表 1),试验用杂色鲍稚鲍来自广东潮州新月鲍养殖场。

**1.1.2 试剂** Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DL2000 分子量标准购自 Takara 公司,基因组 DNA 抽提试剂盒购自上海生工公司。

**1.1.3 自动微生物鉴定系统** 革兰氏阴性杆菌鉴定条 ID32 GN 和 ATB 微生物自动鉴定系统,均为法国生物-梅里埃公司(bioMérieux)产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 序列比较分析及特异性引物设计** 用 DNASTAR 软件包中的 MegAlign 程序对本实验室所测 3 株副溶血弧菌、2 株创伤弧菌、2 株河流弧菌和 5 株溶藻弧菌最常见的 16S—23S rDNA IGS<sup>IA</sup> 序列(邓先余, 2003<sup>1)</sup>; 邓先余等, 2006)以及 GenBank 核酸数据库中已有的某些弧菌的 IGS<sup>IA</sup> 序列,注册号如下: *V. parahaemolyticus* O3: K6 (AP005083)和 IF012711 (AB041851)、*V. fluvialis* ATCC 33089 (AF413008)、*V. vulnificus* ATCC

表 1 PCR 方法特异性的检测实验所用的菌株

Tab.1 The strains used for the test on speciality with new PCR method

菌种	菌株代号	来源
<i>V. parahaemolyticus</i>	ZSU008	患病杂色鲍
<i>V. parahaemolyticus</i>	ZSU009	死亡杂色鲍
<i>V. parahaemolyticus</i>	ZSU010	汕尾红海湾海水
<i>V. parahaemolyticus</i>	Vp-4	中山大学
<i>V. parahaemolyticus</i>	Vp985006	广东省微生物研究所
<i>V. parahaemolyticus</i>	Vp1.1614	北京微生物制品研究所
<i>V. parahaemolyticus</i>	Vp1.1615	北京微生物制品研究所
<i>V. parahaemolyticus</i>	Vp1.1616	北京微生物制品研究所
<i>V. alginolyticus</i>	GMGCC1.1833	中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
<i>V. fluvialis</i>	CGMCC1.1608	中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
<i>V. vulnificus</i>	CG021	台湾成功大学微生物系何涟漪博士,分离自患病牡蛎
鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	Vang03	中国水产科学院珠江水产所
霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	Vch01	中山大学
美人鱼弧菌 <i>V. damsela</i>	NG-6	中山大学
哈氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	不详	中山大学
闪光弧菌 <i>V. splendidus</i>	Vsp-9	中山大学
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	Ah961004	中山大学
温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	NG-7	中山大学
荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	ZSU029	中山大学
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	TG1	中山大学
产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>	EA-1	中山大学
多杀巴斯德杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>	PM-5	中山大学
粪链球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	不详	中山大学
家畜葡萄球菌 <i>Staphylococcus hyicus</i>	不详	中山大学

27562(AB073877)和 CMCP6 (AE016800)、*V. aestuarianus* ATCC 35048 (AF412991)、*V. campbellii* ATCC 25920 (AF412996)、*V. cholerae* N16961 (AE004119)和 RC2 (AF114723)、*V. costicola* ATCC 33508 (AF413000)、*V. diazotrophicus* ATCC 33466 (AF413004)、*V. mimicus* RC5 (AF114744)、*V. nigripulchritudo* ATCC 27043 (AF413015)、*V. proteolyticus* ATCC 15338 (AF413018)和 *V. tubiashii* ATCC 19105 (AF413025)的 IGS<sup>IA</sup> 序列进行比较,选择保守程度较高的一段序列,用 Premier 软件设计合适的引物。设计出的引物用 BLASTN 在 GenBank 中做序列相似性寻找,以判定引物的特异性,选取特异性最高的为引物。

**1.2.2 细菌总 DNA 提取** 煮沸法: 根据邓先余(2003)<sup>1)</sup>的方法从动物组织或增菌液中提取细菌的总 DNA; 试剂盒法: 用基因组 DNA 抽提试剂盒提取细菌的总 DNA, 参照上海生工公司提供的使用说明书。

**1.2.3 PCR 方法特异性的检测** 分别以 5 株副溶血弧菌和不同种属的共 24 株菌株(表 1)的总 DNA 为模板, 利用新设计的引物进行 PCR 扩增, 反应完毕取 6 $\mu$ l 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 拍照, 分析。

**1.2.4 PCR 方法灵敏度的检测** 灵敏度检测按寇运同等(2002)的方法进行。

**1.2.5 PCR 检测方法的应用** 为了评价 PCR 检测方法是否适用于水产养殖的副溶血弧菌病预防, 参照邓先余(2003)<sup>1)</sup>的方法, 随机挑选 1 株副溶血弧菌 ZSU008, 对杂色鲍进行了创伤感染和浸泡感染, 同时设立对照组。再于感染 3h、6h、12h、24h、48h、72h 后取各组的杂色鲍, 用无菌剪刀分别剪取适量(约 0.1g)外套膜、消化道、腹足、肝脏、腮等部位组织, 分别置入无菌匀浆器, 加 PBS 液研磨, 分别用煮沸法和基因组 DNA 抽提试剂盒抽提总 DNA, 以新引物进行 PCR 扩增, 取 6 $\mu$ l 反应产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 分析结果。同时, 取适量来自海南莺歌海对虾养殖场的对虾胃肠道组织, 按同法提取总 DNA, 进行 PCR 扩增, 检测是否含有副溶血弧菌, 若检测结果为阳性, 则将对虾样品用 TCBS 固体培养基做细菌培养, 分离纯化, 用自动微生物鉴定系统鉴定确认。

另外, 为了评价某些环境水体样品是否受副溶血弧菌污染, 作者选取自来水(取自实验室)、珠江水(取自中大码头)、海水(取自汕尾红海湾、潮阳海门湾)及对虾养殖池水(取自海南莺歌海对虾养殖场、湛江恒兴对虾养殖场)和杂色鲍养殖池水(取自汕尾粤顺鲍养殖场、潮阳新月鲍养殖场)等水样作检测样品。各样品的模板 DNA 制备过程如下: 取各水样 50ml, 1000r/min 离心 5min, 取上清; 10000r/min 离心 10min, 弃上清, 用 0.5ml 无菌水振荡悬浮沉淀, 转入 2ml 离心管中, 煮沸法制备模板 DNA, PCR 检测。若检出为阳性, 则对该样品进行培养分离、纯化, 用自动微生物鉴定系统鉴定确认。

## 2 结果

### 2.1 序列相似性比较

IGS<sup>IA</sup> 序列相似性比较结果表明, 5 株副溶血弧菌的 IGS<sup>IA</sup> 种内序列同源性很高, 为 97.6%—99.4%; 而与弧菌属其他弧菌的 IGS<sup>IA</sup> 序列同源性较低, 为 34.3%—84.8%, 其中副溶血弧菌与河流弧菌的 IGS<sup>IA</sup> 序列同源性最高, 达 84.8%; 而与溶藻弧菌的 IGS<sup>IA</sup> 序列同源性最低, 仅为 34.3%。弧菌的 IGS<sup>IA</sup> 序列存在几个序列高变区(Highly variable regions), 这些序列高变区主要集中在 IGS 的非编码区内, 可以作为设计种特异性 PCR 引物的靶位点。

### 2.2 特异性 PCR 引物的设计

结合 Premier 软件和 BLAST 程序, 设计出一条副溶血弧菌的特异性 PCR 反向引物 VP-R(即 5'-GTCACCAAAGTTGTCTGC-3'), 另一条正向引物 VP-F 根据多数细菌高度保守的 16S rDNA 上的一区域设计而成, 序列为 5'-TGGGG TGAAGTCGTAACAAGG-3', 即对应于 *E. coli* 16S rRNA 上位置为 1485—1505 的共 21 个碱基。

### 2.3 PCR 方法特异性的检测

用 PCR 方法对副溶血弧菌及其某些近缘菌、远缘菌进行了检测, 结果见图 1。从图 1 中可知, 用引物对 VP-F、VP-R 扩增所有待检菌时, 5 株副溶血弧菌的结果为阳性, 而其他菌种均为阴性, 表明此对新引物对副溶血弧菌是特异的。有趣的是, 5 株副溶血弧菌经扩增后均得到 2 条带, 大小

1) 邓先余, 2003. 6 种水产病原菌 16S—23S rDNA 间区序列分析及检测技术. 中山大学博士学位论文

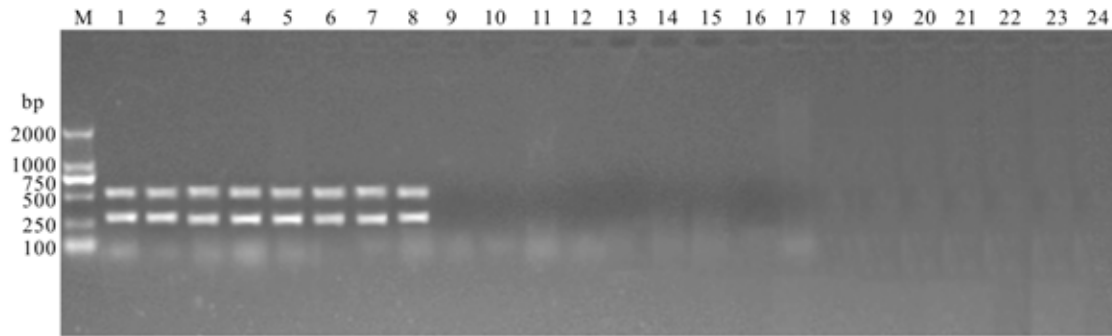


图1 新建的PCR方法对副溶血弧菌菌株的特异性检测

Fig.1 The detection on speciality for *V. parahaemolyticus* with new PCR method

注: M 为分子量标准, 1 至 8 分别为副溶血弧菌 zsu008、zsu009、zsu010、Vp-4、Vp985006、Vp1.1614、Vp1.1615、Vp1.1616 的扩增结果, 9 至 16 分别为对溶藻弧菌、河流弧菌、创伤弧菌、鳗弧菌、霍乱弧菌、美人鱼弧菌、哈氏弧菌、闪光弧菌的扩增结果; 17 至 24 分别为对嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、荧光假单胞菌、大肠杆菌、产气肠杆菌、多杀巴斯德杆菌、粪链球菌和家畜葡萄球菌的扩增结果

分别为 306bp 和 552bp, 经测序核查, 这 2 条带分别对应于副溶血弧菌的 IGS<sup>0</sup> 和 IGS<sup>1A</sup>。

#### 2.4 PCR 方法灵敏度的检测

灵敏度检测结果见图 2, 可以看出 PCR 方法对副溶血弧菌菌液的检测低限分别为  $5.6 \times 10^2$  CFU/ml。按每次处理样品 500 $\mu$ l 菌液, PCR 反应模板量占 DNA 总量的 2%(1 $\mu$ l/50 $\mu$ l), 而占反应总体积的 4% 计算, 对副溶血弧菌而言, 每 25 $\mu$ l PCR 反应体系的检测低限分别为 5.6 个细菌。

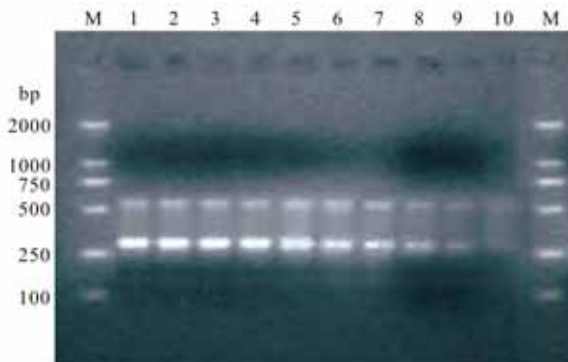


图2 新建的PCR方法对副溶血弧菌的灵敏度检测

Fig.2 The sensitivity of the new PCR method for detection for *V. parahaemolyticus*

注: M 为分子量标准, 1 至 10 分别为对副溶血弧菌 ZSU008 从  $5.6 \times 10^{10}$  CFU/ml 经 10 倍梯度稀释到  $5.6 \times 10^1$  CFU/ml 的扩增结果

#### 2.5 PCR 检测方法的应用

**2.5.1 2 种提取弧菌模板 DNA 方法的比较** 为了评价 2 种模板 DNA 提取方法对 PCR 扩增效果的影响, 取创伤感染 48h 后的杂色鲍肝脏组织, 分别按煮沸法和试剂盒法提取模板总 DNA, 进行副溶血弧菌的检测, 结果如图 3。从图 3 可以看出, 用试剂盒法和煮沸法从杂色鲍肝组织提取模

板 DNA, PCR 扩增副溶血弧菌的结果均为阳性, 重复 3 次, 结果也相同, 表明 2 种提取模板 DNA 方法的 PCR 扩增效果几乎没有差异, 且结果稳定, 可以用于 4 种弧菌的特异性检测。因煮沸法既经济又简捷, 可以广泛推广。

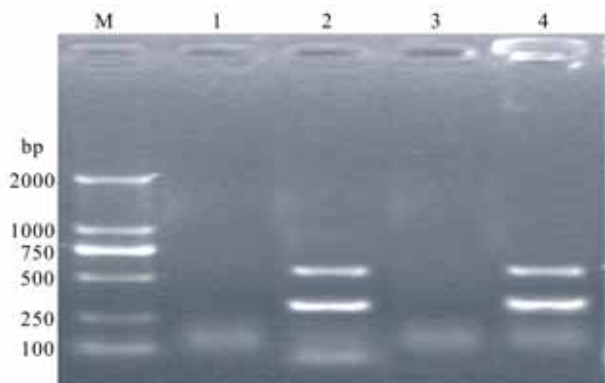


图3 用 2 种方法从杂色鲍肝组织中提取模板 DNA 特异性扩增副溶血弧菌的电泳图

Fig.3 Electrophoresis of the PCR-amplified total DNA extracted from the liver tissue of abalone by two DNA extraction methods for *V. parahaemolyticus* with new PCR method

注: M 为 DNA 分子量标准, 1、2 分别为对用基因组 DNA 试剂盒制备健康鲍和副溶血弧菌感染鲍肝脏总 DNA 的扩增结果, 3、4 分别为对用直接煮沸法制备健康鲍和副溶血弧菌感染鲍肝脏总 DNA 的扩增结果

**2.5.2 对杂色鲍体内副溶血弧菌的检测** 在副溶血弧菌人工感染杂色鲍后的第 3h、6h、12h、24h、48h、72h 共 6 个时间段分别取各组杂色鲍的外套膜、消化道、腹足、肝脏、腮、闭壳肌共 6 种组织, 用煮沸法提取模板 DNA, 对副溶血弧菌进行检测, 结果见表 2。从表中可知, 在创伤感染后的第 3h, 就可在杂色鲍的肝脏和腹足中检出副溶血弧菌; 在第 6h, 仍只在这二处组织中可检

表2 杂色鲍感染副溶血弧菌后不同时间内各组织检测病菌的结果

Tab.2 Detection results of *V. parahaemolyticus* in tissues of *Haliotis diversicolor* by PCR at different time post-infection

感染时间 (h)	感染方式 及对照组	被检组织					
		腮	消化道	肝脏	腹足	外套膜	闭壳肌
3	创伤感染	-	-	+	+	-	-
	对照组	-	-	-	-	-	-
6	浸泡感染	+	+	-	-	-	-
	对照组	-	-	-	-	-	-
12	创伤感染	-	+	+	+	-	-
	对照组	-	-	-	-	-	-
24	浸泡感染	+	+	+	-	-	-
	对照组	-	-	-	-	-	-
48	创伤感染	+	+	+	+	+	+
	对照组	-	-	-	-	-	-
72	浸泡感染	+	+	+	+	+	+
	对照组	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示阴性,“+”表示阳性,每个反应重复一遍

出副溶血弧菌;在第12h,除腹足和肝脏外,还可在杂色鲍的消化道中检出副溶血弧菌;在第24h,副溶血弧菌可在除闭壳肌外的其余5种组织中检出;在第48h后,在所有组织中均可检出副溶血弧菌。

另外,从表2可知,在浸泡感染后的第3h,就可在杂色鲍的腮和消化道中检测出副溶血弧菌;在第6h,除了在腮和消化道外,还可在肝脏中检出副溶血弧菌;在第12h,仍然只在腮、消化道和肝脏中检测出副溶血弧菌;在第24h,除了上述结果外,还可在腹足上检出副溶血弧菌;在48h后,在所有的组织中均可检出副溶血弧菌。

### 2.5.3 PCR方法对凡纳滨对虾体内弧菌的检测

为了检验PCR方法对其他水产动物体内弧菌的检测是否有效,作者对来自海南莺歌海对虾养殖场的一批(共23尾)凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)进行了检测,结果见图4。其中有4只

(No.8、No.11、No.13和No.15)对虾检测为副溶血弧菌阳性,阳性率为17.4%。为了证实检测结果是否准确,又对这4只阳性对虾样品进行了细菌的分离纯化培养,用自动微生物鉴定系统(VITEK-AMS-60)进行鉴定。结果表明,这4只对虾样品,经细菌纯化培养后,鉴定为副溶血弧菌的可能性达到99.5%—100%,与用PCR方法检测结果一致,表明用PCR方法检测这种弧菌的结果是可信的。

### 2.5.4 用PCR方法对不同水体中弧菌的检测

为了检测某些环境水体样品是否受副溶血弧菌污染,作者用PCR方法对自来水、珠江水、海水及对虾养殖池水和杂色鲍养殖池水等共15种水样进行了检测,结果发现汕尾粤顺成鲍养殖池水、潮阳海门湾海水、莺歌海1号养殖池水、莺歌海3号养殖池水共4份水样为副溶血弧菌阳性,阳性率达26.7%。对这4份阳性水样又进行了细

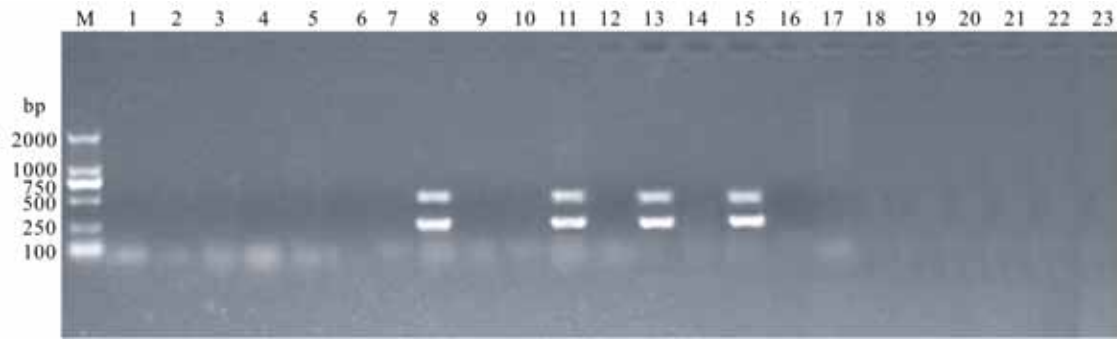


图4 用新建 PCR 方法检测 23 尾凡纳滨对虾胃肠道组织内的副溶血弧菌

Fig.4 Detection to *V. parahaemolyticus* in the tissues of 23 penaeid shrimps with new PCR method

注: M 为 DNA 分子量标准, 1—23 分别为对 1 至 23 号凡纳滨对虾样品胃肠道组织的扩增结果

菌培养分离、纯化,用自动微生物鉴定系统鉴定得出的结果为副溶血弧菌的可能性均超过 99.0%,与 PCR 的鉴定结果一致,表明 PCR 方法可以应用于水体样品中的副溶血弧菌检测。

### 3 讨论

近年来,细菌的 16S—23S rDNA IGS 因大多数包含编码不同的 tRNA 基因,大小不一和进化速率比 16S rDNA 快 10 多倍,在细菌系统分类,特别是相近种和菌株的区分和鉴定方面备受关注。副溶血弧菌是海洋中最常见的细菌类群之一,由于此菌引起的弧菌病频繁暴发给人类和渔业生产带来了巨大损失,因此针对此种弧菌,建立特异、快速、灵敏、简捷的检测方法技术,在临床诊断、环境监测及水产养殖等方面均有重大意义。自 1999 年以来,有学者开始对某些弧菌的 16S—23S rDNA IGS 进行了研究,并据之建立了霍乱弧菌、拟态弧菌(Chun *et al.*, 1999)和河口弧菌、河流弧菌(Lee *et al.*, 2002)等弧菌的分子鉴定手段。然而,在上述的弧菌 16S—23S rDNA IGS 研究中,除霍乱弧菌和拟态弧菌各有多个菌株被研究外,其他的弧菌均只有一株标准菌株被研究,缺乏种内比较。本文作者根据 5 株副溶血弧菌与弧菌属其他菌的 IGS<sup>IA</sup> 及其近/远缘属种的 IGS<sup>IA</sup> 的比较结果,设计出针对副溶血弧菌的特异性引物,建立了可以特异性检测此种弧菌的新 PCR 技术,并进行了特异性和敏感性的探讨以及初步的应用研究。

选用 IGS<sup>IA</sup> 序列作为设计弧菌特异性 PCR 引物的靶序列,是因为 IGS<sup>IA</sup> 是迄今在细菌中出现频率最高的 IGS 类型,有关它的序列数据也最为丰富,具有代表性。当然,另一 IGS 类型,即 IGS<sup>G</sup> 也较普遍,但根据 Maeda 等(2000)的报道,某些弧菌染色体上含 IGS<sup>G</sup> 的 *rrn* 操纵元的拷贝数比含

IGS<sup>IA</sup> 的 *rrn* 操纵元拷贝数少得多,用 IGS<sup>G</sup> 作为靶区的 PCR 扩增效果可能比以 IGS<sup>IA</sup> 为靶区的效果要差。

用新建立的 PCR 技术扩增多株副溶血弧菌后,均得到大小分别为 306bp 和 552bp 的 2 条带,对应于副溶血弧菌的 IGS<sup>0</sup> 和 IGS<sup>IA</sup>,这一现象在 Lee 等(2002)以 16S—23S rDNA IGS<sup>0</sup> 序列为靶区扩增闪光弧菌(*Vibrio splendidus*)时也曾出现过,可能是由于这些弧菌不同 16S—23S rDNA IGS 类型存在着某种程度的种内保守性的缘故。

近年来,有关副溶血弧菌的 PCR 检测技术报道较多,大多数学者主要依据副溶血弧菌的致病基因之一,即耐溶解血素(TDH)基因建立相应的检测手段(Lee *et al.*, 1993; Blackstone *et al.*, 2003; 扈庆华等, 2004)。然而 Lee 等(1995)认为 TDH 基因并不是存在于所有的副溶血弧菌中,也并不和副溶血弧菌的致病性一一对应。因此选择 TDH 基因作为检测副溶血弧菌的靶区,有一定的局限性。而 16S—23S rDNA IGS 是细菌 *rrn* 操纵元的组成单元之一,存在于所有的副溶血弧菌中,而且具有显著的种内特异性,因此可以作为副溶血弧菌的特异性检测靶区。经检索发现,以 16S 和 16S—23S rDNA IGS 为靶区建立的副溶血弧菌 PCR 检测方法,在国际上本文属首次报道。

本文作者建立的 PCR 方法可以检出副溶血弧菌的低限达到  $5.6 \times 10^2$  CFU/ml, 或 5.6 CFU/25 $\mu$ l 反应体系,远高于寇运同等(2002)报道的以 TDH 基因为靶区,用 PCR 方法检测副溶血弧菌的灵敏度,后者可检出副溶血弧菌的低限为  $7.6 \times 10^3$  CFU/ml 或 86—132 CFU/反应体系。作者所建的 PCR 方法具有如此高的敏感度可能与细菌的 IGS<sup>IA</sup> 为多拷贝的特点有关。另外,如此高的灵敏度,也使得即使目的

菌含量很低的样品,都可以被检出。从另一个角度来讲,实验也极易因污染出现假阳性结果。因此,在操作中,从取样到加样、上机的任何环节上,都要注意避免人为的污染。

用 PCR 方法检测水产动物组织或水体样品中的副溶血弧菌的优越性很多,主要表现在以下几个方面: (1) 操作简便,检验周期短,模板制备时间大约 20min, 每一批样品从准备到检出只需要约 3—4h, 在半个工作日就可完成, 如果将增菌的时间算在内,也只需要 24h 左右, 而传统生理生化法需要 7 天以上; (2) 灵敏度高, 结果准确; (3) 检测成本低。由于用 PCR 方法检测不同样品中的副溶血弧菌有着快速、简便的特点, 可以大大缩短检验周期, 适应了环境监测和水产品质量检疫迅速发展的需要, 对海洋水产养殖业中弧菌病的预防及人体健康等方面意义重大, 具有较强的实用价值和推广价值。

由于条件所限, 作者在本文中用新建的 PCR 方法仅对杂色鲍组织、对虾组织和水样品中的副溶血弧菌进行了检测。若对不同来源的样品采取适宜的总 DNA 抽提技术, 此法可更广泛地应用于人和动物被副溶血弧菌感染的临床诊断、水产养殖的病害预防及水产品质量检疫等方面, 具有广阔的应用前景。

致谢 广东省人民医院老干部休养所的何其勇先生帮助用自动微生物鉴定系统鉴定部分细菌, 谨致谢忱。

### 参 考 文 献

王 军, 苏永全, 张蕉南等, 1999. 1999 年春季东山九孔鲍暴发性病害研究. 厦门大学学报(自然科学版), 38(5): 641—644

邓先余, 王智学, 何建国, 2004. 3 株杂色鲍致病菌——副溶血弧菌的 16S—23S rDNA 间区序列的分析. 微生物学报, 44(3): 304—308

邓先余, 王智学, 孙成波等, 2006. 3 种水产病原弧菌(*Vibrio*)的 16S—23S rDNA 间区(IGSs)的克隆、测序与分析. 海洋与湖沼, 37(2): 162—169

寇运同, 马洪明, 刘晨光, 2002. 用 PCR 方法快速检测水

产品中的副溶血弧菌. 海洋科学, 26(9): 66—69

扈庆华, 郑薇薇, 石晓路等, 2004. 改良分子信标——实时 PCR 快速检测副溶血弧菌. 现代预防医学, 31(3): 441—443

焦振泉, 刘秀梅, 2001. 细菌分类与鉴定的新热点: 16S—23S rDNA 间区. 微生物学通报, 28(1): 85—89

Antonio L L, Torres J, Osorio C R *et al*, 2003. Identification of tdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. FEMS Microbiology Letters, 226: 281—284

Blackstone G M, Nordstrom J L, Michael C L *et al*, 2003. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. Journal of Microbiological Methods, 53: 149—155

Chun J, Hu Q A, Colwell R, 1999. Analysis of 16S—23S rRNA Intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Appl Envir Microbiol, 65(5): 2202—2208

DePaola A, Hopkins L H, Peeler J T *et al*, 1990. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US coastal waters and oysters. Appl Environ Microbiol, 56: 2299—2302

G ürtler V, Stanisich V A, 1996. New approached to typing and identification of bacteria using the 16S—23S rDNA spacer region. Microbiology, 142: 3—16

Jackson J K, Murphree R L, Tamplin M L, 1997. Evidence that mortality from *Vibrio vulnificus* infection results from single strains among heterogeneous populations in shellfish. J Clin Microbiol, 35(8): 2098—2101

Lee C Y, Pan S F, Chen C H, 1995. Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. Appl Environ Microbiol, 61: 1311—1317

Lee K K, Liu P C, Huang C Y, 2003. *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone. Microbes and Infection, 5: 481—485

Lee S K Y, Wang H Z, Law S H W *et al*, 2002. Analysis of the 16S—23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences. Marine Pollut Bullit, 44: 412—420

Lee T, Pan S F, 1993. Rapid and specific detection of the thermostable direct hemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. J Gen Microbiol, 139: 3225—3231

Maeda T, Takada N, Furushita M *et al*, 2000. Structural variation in the 16S—23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. FEMS Microbiol Lett, 192: 73—77

## RAPID PCR DETECTION FOR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* USING 16S AND 16S—23S rDNA AS TARGET

DENG Xian-Yu<sup>1,2</sup>, WANG Zhi-Xue<sup>2</sup>, CHEN Xiao-Yan<sup>3</sup>, HE Jian-Guo<sup>2</sup>

(1. School of Life Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan, 411201; 2. School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou, 510275; 3. Department of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou, 510352)

**Abstract** Using software BLAST and DNASTAR, the 16S—23S rDNA intergenic spacer (IGS) sequences of 5 strains of *Vibrio parahaemolyticus* were analyzed with those of other bacteria available in GenBank. Based on the results from multiple sequence alignment of representative IGS<sup>IA</sup> type and its flanking 16S rDNA, a pair of specific PCR primers for *V. parahaemolyticus* was successfully designed and synthesized. A new PCR technique was developed by optimizing the amplification condition. The species-specificity and sensitivity of this new method were tested and used to detect *V. parahaemolyticus* in experimentally infected abalone, tissue of cultured shrimps, and water samples. The results show that two PCR products (316 and 552bp, corresponding to the IGS<sup>0</sup> and IGS<sup>IA</sup>, respectively) were co-amplified in all tested *V. parahaemolyticus* strains. Detection limit of this method was  $5.6 \times 10^2$  CFU/ml, and the detection could be finished within a half day. This new PCR method may have a potential use in the development of diagnosis methods for mariculture maintenance, seafood quarantine, and the water quality monitoring.

**Key words** *Vibrio parahaemolyticus*, 16S rDNA, 16S—23S rDNA, PCR detection, Application