

· 论 著 ·

副溶血性弧菌实时重组酶聚合酶扩增检测技术研究

占利, 徐昌平, 张云怡, 陈鸿鹤, 张政, 陈建才, 张俊彦, 梅玲玲

浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051

摘要: **目的** 建立快速检测副溶血性弧菌的实时重组酶聚合酶扩增技术 (RPA)。**方法** 根据副溶血性弧菌 *tlh* 基因保守序列设计筛选引物及探针, 建立检测副溶血性弧菌的实时 RPA 方法。通过检测不同浓度副溶血性弧菌标准株 DNA 模板评价方法灵敏度, 通过检测不同种属弧菌及其他细菌标准株评价方法特异性, 通过重复试验评价方法稳定性, 通过实样检测评价方法应用效果。**结果** 建立的实时 RPA 方法在 39 °C 恒温下 20 min 内完成副溶血性弧菌扩增, 最低检测限为 5 pg/ 反应, 与其他致病菌无交叉反应, 不同浓度的副溶血性弧菌 DNA 模板和大肠杆菌 DNA 模板隔日 3 次实时 RPA 检测结果一致, 实时 RPA 对 51 份鲜活 / 冰鲜鱼、虾、贝、蟹类样品的检测结果与 GB 4789.7—2013 《食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》检测结果一致。**结论** 建立的实时 RPA 方法可定性检测副溶血性弧菌, 且实验操作及结果判读简单, 适用于突发公共卫生事件、食品安全监管中的副溶血性弧菌快速检测。

关键词: 副溶血性弧菌; 重组酶聚合酶扩增技术; 检测; *tlh* 基因

中图分类号: R155.3 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087 (2019) 07-0653-05

Real-time recombinase polymerase amplification for detection of *Vibrio parahaemolyticus*

ZHAN Li, XU Chang-ping, ZHANG Yun-yi, CHEN Hong-hu, ZHANG Zheng, CHEN Jian-cai,
ZHANG Jun-yan, MEI Ling-ling

Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: Objective To establish real-time recombinase polymerase amplification (RPA) for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* (VP). **Methods** An exo probe and primers were designed according to the conserved sequence of thermolabile hemolysin (*tlh*) gene of VP and then RPA for detection of VP was established. The sensitivity of the assay was evaluated by detecting different concentration of VP; the specificity was evaluated by detecting different bacteria; the stability was evaluated by repeat trials; the application effect was evaluated by detecting food samples which were simultaneously tested with traditional culture method according to GB 4798.7-2013 *Detection of VP*. **Results** A real-time RPA was established to complete VP amplification within 20 min at a constant temperature of 39 °C. The analytical sensitivity of the assay was five pg per reaction and no cross-reactivity with other pathogenic bacteria observed. The RPA detection results with different concentration of VP and *E. coli* DNA templates at three time points were consistent. The detection results of 51 food samples by RPA were the same as those by traditional culture method. **Conclusion** The established real-time RPA can qualitatively detect VP, with simple operation and interpretation of results, which is suitable for rapid detection of VP in public health emergencies and food safety supervision.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; Recombinase polymerase amplification; Detection; Thermolabile hemolysin

副溶血性弧菌是一种革兰阴性嗜盐性致病菌, 主要分布在海洋环境中, 是引起我国沿海地区居民食源

性疾病的首要致病菌^[1-2], 位居浙江省近年来食源性疾病事件监测报告致病菌首位^[3-5]。因此, 副溶血性弧菌检测对于海产品的安全评估和质量监管以及副溶血性弧菌疾病防控具有重要作用。目前, 副溶血性弧菌实验室检测主要采用分离培养法, 但耗时长, 至少需要 4~5 天^[6]; 副溶血性弧菌快速检测方法主要有实时荧光定量 PCR 方法、环介导等温扩增技术和酶

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2019.07.002

基金项目: 浙江省分析测试科技计划项目 (2018C37017); 国家科技重大专项 (2018ZX10714002)

作者简介: 占利, 博士, 副主任技师, 主要从事微生物检验工作

通信作者: 梅玲玲, E-mail: llmei@cdc.zj.cn

联免疫吸附试验,但这些方法通常需要昂贵的设备仪器,对检测人员的能力也有较高要求。重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)是一种以T4噬菌体核酸复制机制为原理,依赖重组酶、单链结合蛋白和链置换DNA聚合酶的即时检验技术(point-of-care testing, POCT),可在25~43℃恒温下实现特定核酸序列扩增,对设备要求低,5~20 min即可观察结果^[7-12],且操作简便,反应迅速,不需要昂贵的精密仪器,适用于DNA、RNA模板检测,可用于血液、粪便、食品和尿液等多种生物样本检测,已成为目前最有潜力的病原菌即时分子诊断方法^[13-15]。本研究基于副溶血性弧菌种属特异性的不耐热溶血毒素*tlh*基因保守区域^[16],建立检测副溶血性弧菌的实时RPA方法,并检验其特异度、灵敏度、稳定性和应用效果,为实现副溶血性弧菌现场快速检测提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及海产样品 副溶血性弧菌(ATCC 17802)、拟态弧菌(ATCC 33653)、溶藻弧菌(分离株)、霍乱弧菌(分离株)、大肠杆菌(ATCC 25922)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、金黄色葡萄

球菌(ATCC 25923)、单核细胞增生李斯特菌(CMCC 54006)、创伤弧菌(ATCC 27526)、肠炎沙门菌(CMCC 50041)、鼠伤寒沙门菌(ATCC 14028)、福氏志贺菌(ATCC 12022)、蜡样芽孢杆菌(ATCC 11778)为浙江省疾病预防控制中心菌种室保存菌株。51份鲜活/冰鲜鱼、虾、贝、蟹类样品采自杭州市的农贸市场。

1.1.2 主要仪器与试剂 仪器: NanoDrop 1000超微量分光光度计(美国Thermo公司); ABI quantstudio 12K Flex实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司); Vitek 2 Compact全自动生化鉴定系统(法国梅里埃公司)。试剂: TwistAmp™Mexo核酸检测试剂盒(货号: TAEXO02KIT, 英国TwistDx公司); E.Z.N.A.® Bacterial DNA提取试剂盒(货号: D3350-01, 美国Omega公司); RPA探针和上下游引物由生工生物工程上海(股份)有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 实时RPA探针和引物优化 根据RPA引物设计要求,以副溶血性弧菌*tlh*基因(GenBank登录号: AY289609)的保守区域为模板,设计一条RPA探针和多套上下游候选引物,固定采用一条下游引物,分别与所有上游引物组合,结合探针FR-P筛选出最佳上游引物,用同样方法筛选出最佳下游引物。见表1。

表1 实时荧光RPA体系引物与探针序列

引物	序列(5'-3')	位置(bp)
FR-F1	TGGTATCGCACCAGCTACTCGAAAGATGATCC	148~179
FR-F2	CGAAAGATGATCCGGCGACCGATTGGGAATGGCC	167~200
FR-F3	AGCTACTCGAAAGATGATCCGGCGACCGATTGGG	160~193
FR-R1	GTGTTGTATGAGAAGCGATTGTCAGCGGCC	360~390
FR-R2	GCGACGTGTTGCTGTAGAACATGTTTTAAATG	289~257
FR-R3	CTTCACAACGCTGACGGATAACGTTTTGCGACG	284~316
FR-P	AACGAAGATGCTAGCTACTTCACCATGACGGC[FAM-dT][THF][BHQ1-dT]GCTGGAGCTCCGTT-C3 Spacer	205~255

注: FR-F(1~3)/FR-R(1~3)为RPA正/反向引物; FAM-dT为替代胸腺嘧啶核苷酸的荧光基团; THF为四氢呋喃; BHQ1-dT为替代胸腺嘧啶核苷酸的淬灭基团; C3 Spacer为3'封闭基团。

1.2.2 DNA模板的制备及浓度测定 挑取1~2个隔夜纯培养菌落,按照E.Z.N.A.® Bacterial DNA提取试剂盒说明书提取细菌基因组DNA,采用NanoDrop 1000超微量分光光度计测定其DNA浓度后,-20℃冻存储备用。

1.2.3 实时RPA反应体系和条件 按照TwistAmp™exo试剂盒说明书,配制50 μL RPA反应体系。取正向引物FR-F(10 μM)、反向引物FR-R(10 μM)

各2.1 μL,探针FR-P(10 μM)0.6 μL, Rehydration Buffer 29.5 μL, ddH₂O 12.2 μL预混后,转入含有冻干酶制剂的0.2 mL反应管中,充分混匀,取1 μL DNA模板加入反应管中。取2.5 μL 280 mM MgAc加在反应管盖中,盖紧后瞬时离心并涡旋。同时设置灭菌水为阴性对照,阳性对照由试剂盒自带。根据试剂盒说明书,于ABI quantstudio 12K Flex实时荧光定量PCR仪中39℃恒温反应30 min(每20 s 1个循

环,共90个循环),整个反应过程实时检测荧光信号,出现扩增曲线为阳性结果。

1.2.4 实时 RPA 方法灵敏度试验 取副溶血性弧菌(ATCC 17802)过夜纯培养物,提取 DNA 模板,测定其浓度为 5.0×10^3 pg/ μ L,使用灭菌水按 10 倍梯度稀释,设计 7 个稀释度,分别取 1 μ L 各稀释浓度的 DNA 为模板进行 RPA 灵敏度试验,并以 ddH₂O 为阴性对照,确定实时 RPA 方法的最低检测限。

1.2.5 实时 RPA 方法特异度试验 以副溶血性弧菌(ATCC 17802)和 1.1.1 中其他所有菌株的 DNA 为模板,并以 ddH₂O 为阴性对照,采用实时 RPA 方法进行扩增,检测实时 RPA 方法的特异度。

1.2.6 实时 RPA 方法稳定性试验 分别选取 20、10、5、2.5 pg/ μ L 的副溶血性弧菌(ATCC 17802) DNA 模板和大肠杆菌(ATCC 25922) DNA 模板,采用实时 RPA 进行检测,隔日做 3 次重复检测,通过是否出现扩增曲线、出现扩增曲线的时间和扩增峰峰值高低评价实时 RPA 方法的稳定性。

1.2.7 实时 RPA 方法的应用 按照食品安全国家标准 GB 4789.7—2013《食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[6],取 25 g 鲜活/冰鲜鱼、虾、贝、蟹类样品至 225 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水均质后, (36 ± 1) °C 增菌 10 h,用接种环沾取一环增菌液,于弧菌显色平板上进行划线分离, (36 ± 1) °C 培养 24 h,挑取可疑菌落纯化培养后,取单个菌落采用 Vitek 2 Compact 全自动生化鉴定系统进行生化鉴定,判断样

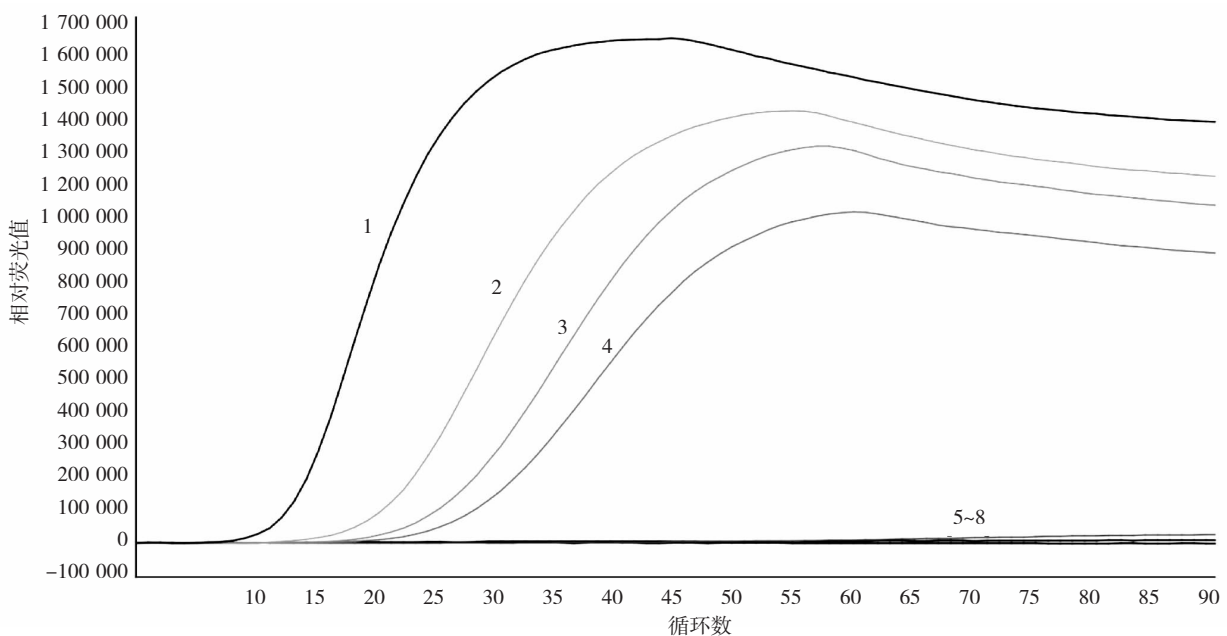
品中是否检出副溶血性弧菌。同时取 1 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水增菌液使用细菌基因组提取试剂盒提取 DNA 模板,用实时 RPA 方法检测,通过分析 2 种方法检测结果的一致性来评价实时 RPA 的应用效果。

2 结果

2.1 建立检测副溶血性弧菌实时 RPA 方法 以副溶血性弧菌(ATCC 17802)基因组 DNA 为模板,分别对不同上下游引物组合进行实时 RPA 测试,根据是否出现扩增曲线、出现扩增曲线的时间和扩增峰峰值高低确定效果最优的引物/探针组合为引物 FR-F1/FR-R1 和探针 FR-P,扩增片段长度为 243 bp。

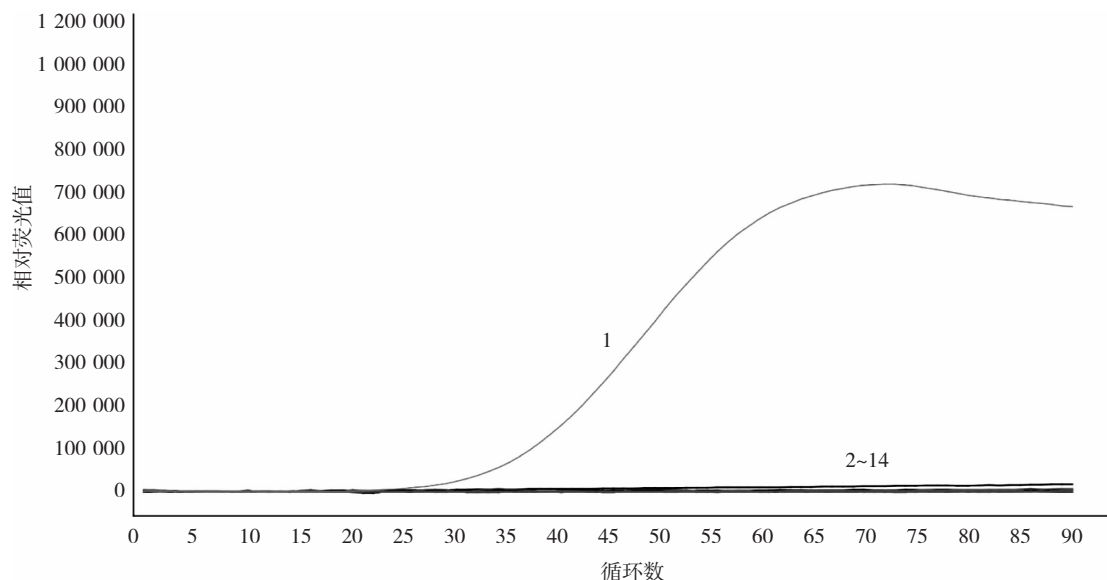
2.2 实时 RPA 方法的灵敏度 以 7 个稀释度的副溶血性弧菌(ATCC 17802) DNA 作为模板进行灵敏度检测,当 DNA 浓度为 $5 \times 10^3 \sim 5$ pg/ μ L 时,实时 RPA 均出现明显扩增曲线,随着细菌 DNA 浓度的降低,扩增起峰时间逐渐延后,相对荧光值也逐渐降低。当 DNA 浓度在 5 pg/ μ L 以下时,扩增曲线呈一条直线,所建立的实时 RPA 方法的基因组 DNA 最低检出限为 5 pg/反应。见图 1。

2.3 实时 RPA 方法的特异度 应用所建立的实时 RPA 方法对副溶血性弧菌及其他细菌标准菌株基因组 DNA 进行扩增,结果在 15 min 内,仅副溶血性弧菌出现明显的荧光扩增曲线,其他菌株均未出现扩增曲线,说明本方法具有良好的特异度。见图 2。



注: 1~7 表示副溶血性弧菌(ATCC 17802) DNA 模板浓度为 $5 \times 10^3 \sim 5$ pg/ μ L; 8 表示阴性对照。

图 1 副溶血性弧菌实时 RPA 方法的灵敏度分析



注: 1 表示副溶血性弧菌 (ATCC 17802), 2 表示拟态弧菌 (ATCC 33653), 3 表示溶藻弧菌 (分离株), 4 表示霍乱弧菌 (分离株), 5 表示大肠杆菌 (ATCC 25922), 6 表示铜绿假单胞菌 (ATCC 27853), 7 表示金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923), 8 表示单核细胞增生李斯特菌 (CMCC 54006), 9 表示创伤弧菌 (ATCC 27526), 10 表示肠炎沙门菌 (CMCC 50041), 11 表示鼠伤寒沙门菌 (ATCC 14028), 12 表示福氏志贺菌 (ATCC 12022), 13 表示蜡样芽孢杆菌 (ATCC 11778), 14 表示阴性对照。

图2 副溶血性弧菌实时 RPA 方法的特异度分析

2.4 实时 RPA 方法的稳定性 使用实时 RPA 方法隔日 3 次检测 4 种浓度的副溶血性弧菌 (ATCC 17802) DNA 模板和大肠杆菌 (ATCC 25922) DNA 模板, 结果显示, 20 pg/ μ L、10 pg/ μ L 和 5 pg/ μ L 的副溶血性弧菌 (ATCC 17802) DNA 模板 3 次检测均在 20 min 内出现明显扩增峰, 且同一浓度 3 次检测出现扩增峰的时间接近, 扩增峰峰值也基本一致; 2.5 pg/ μ L 副溶血性弧菌 (ATCC 17802) DNA 模板和大肠杆菌 (ATCC 25922) DNA 模板 3 次检测扩增均呈一条直线, 未出现扩增峰, 说明本方法具有良好的稳定性。

2.5 实时 RPA 方法的应用 采用实时 RPA 方法和 GB 4789.7—2013 《食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[6] 方法分别对 51 份鲜活 / 冰鲜鱼、虾、贝、蟹类样品进行检测, 2 种方法均在 18 个样品中检出副溶血性弧菌, 检测结果完全一致, 说明本方法具有良好的实际应用效果。

3 讨论

RPA 是近几年迅速发展起来的一项常温扩增技术, 在病毒、病原菌及转基因的检测中均有成功应用^[10-12], 与其他检测技术相比, 实时 RPA 具有检测时间短、操作简便、特异度高、灵敏度高、假阳性率低等优势, 而且该方法对核酸要求质量不高, 可应用于大量样本检测及现场筛查, 是一种具有广阔应用前景的 POCT 技术^[14]。本研究建立的基于副溶血性弧

菌 *tlh* 基因的实时 RPA, 可在 39 °C 恒温反应 20 min 实现对副溶血性弧菌的有效扩增, 方法特异度好, 灵敏度可达 5 pg/ 反应 DNA, 与已有文献报道的实时荧光 PCR 等方法^[17-18] 一致, 但耗时远少于实时荧光 PCR, 且实时 RPA 实验设计相对简单, 仅需 2 条引物和 1 条探针, RPA 试剂为冻干粉形式, 便于运输, 在常温下 (25 ~ 43 °C) 即可完成扩增, 为副溶血性弧菌的现场快速检测提供了有参考价值的方法。

本研究所建立的副溶血性弧菌实时 RPA, 需使用荧光 PCR 仪或其他等温扩增荧光检测系统进行体系扩增及检测, 并不能体现 RPA 不依赖昂贵仪器的优势, 未来将继续探索使用恒温金属浴等简单的替代加热方式, 结合横向流动试纸条等便捷的可视化检测手段进行改进, 提升在现场检测工作中的实用性。RPA 因反应原理和过程的特殊性, 导致其探针引物长度和标记方法与一般的分子生物学方法不同, 目前也无设计软件可用, 只有熟练掌握 RPA 引物探针设计原则, 并且结合大量实际试验筛选, 才能获得扩增效率最高的引物探针组合。此外, 研究使用的 RPA 试剂售价较高, 单个检测成本达 52 元 / 反应, 但目前国内已有公司成功开发类似替代产品, 且也有通过缩小反应体积等方式减少检测成本成功案例^[19], 相信随着国内技术的进步, 该方法的检测成本将会下降。

LILLIS 等^[20] 发现, 因 RPA 反应的水化缓冲液中含聚乙二醇, 在 37 ~ 42 °C 的环境中, 反应液局部

会形成黏稠区, 整个反应体系缺乏热对流, 故需在初始扩增 4 min 后, 取出反应管涡旋混匀后再继续反应, 否则将会影响 RPA 扩增效率。本研究因使用封闭式实时荧光扩增仪进行体系反应, 反应中期未进行混匀, 推测建立的实时 RPA 方法的灵敏度可能被低估, 如果对试剂盒提供的体系进行优化, 方法的灵敏度会得到进一步提高, 同时也会减少单个试验的成本支出。下一步研究拟将该方法与 MPN 定量方法结合, 建立快速灵敏的副溶血性弧菌 RPA-MPN 定量方法, 进一步提升现场检测结果的可靠性。

综上所述, 实时 RPA 方法作为副溶血性弧菌快速检测手段具有很大潜力和实用价值, 特别是对于低污染水平副溶血性弧菌的现场检测具有较大的优势。

参考文献

- [1] 陈洪友, 陈敏, 盛跃颖. 副溶血性弧菌食源性疾病暴发分离株的血清型、核糖型及毒力基因研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23 (2): 114-118.
- [2] 毛雪丹. 2003—2008 年我国细菌性食源性疾病流行病学特征及疾病负担研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2010.
- [3] 吕鹏, 章荣华, 齐小娟, 等. 浙江省食源性疾病监测现状分析 [J]. 浙江预防医学, 2015, 27 (8): 828-837.
- [4] 陈江, 章荣华, 张荷香, 等. 2010—2012 年浙江省食源性疾病事件流行病学特征分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27 (2): 120-123.
- [5] 朱大方, 周标, 陈江, 等. 2015 年浙江省食源性疾病暴发流行病学特征分析 [J]. 预防医学, 2016, 28 (10): 1005-1009.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品微生物学检验副溶血性弧菌检验: GB 4789.7—2013 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [7] MAFFERT P, REVERCHON S, NASSER W, et al. New nucleic acid testing devices to diagnose infectious diseases in resource-limited settings [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017, 36 (10): 1717-1731.
- [8] 景志刚, 董浩, 狄栋栋, 等. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展 [J]. 生物技术通报, 2016, 32 (6): 47-53.
- [9] 高威芳, 朱鹏, 黄海龙. 重组酶聚合酶扩增技术: 一种新的核酸扩增策略 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32 (6): 627-634.
- [10] YAN L, ZHOU J, ZHENG Y, et al. Isothermal amplified detection of DNA and RNA [J]. Mol Biosyst, 2014, 10 (5): 970-1003.
- [11] JAMES A, MACDONALD J. Recombinase polymerase amplification: emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2015, 15 (11): 1475-1489.
- [12] DAHER R K, STEWART G, BOISSINOT M, et al. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. Clin Chem, 2016, 62 (7): 947-958.
- [13] LILLIS L, LEHMAN D, SINGHAL M C, et al. Non-instrumented incubation of a recombinase polymerase amplification assay for the rapid and sensitive detection of proviral HIV-1 DNA [J]. PLoS One, 2014, 9 (9): e108189.
- [14] 彭志, 陈刚毅, 刘雪飞, 等等. 温核酸扩增技术在病原体检测中的应用 [J]. 生物技术进展, 2018, 8 (4): 284-292.
- [15] ZHANG C, XING D. Single-molecule DNA amplification and analysis using microfluidics [J]. Chem Rev, 2010, 110 (8): 4910-4947.
- [16] TANIGUCHI H, HIRANO H, KUBOMURA S, et al. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microb Pathog, 1986, 1 (5): 425-432.
- [17] RIZVI A V, BEJ A K. Multiplexed real-time PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* and its rapid detection in shellfish and Gulf of Mexico water [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2010, 98 (3): 279-290.
- [18] LETCHUMANAN V, CHAN K G, LEE L H. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques [J]. Front Microbiol, 2014 (5): 705.
- [19] 金晓君, 龚雅利, 杨莉, 等. 重组酶聚合酶扩增在铜绿假单胞菌检测中的应用 [J]. 中华烧伤杂志, 2018, 34 (4): 233-239.
- [20] LILLIS L, SIVERSON J, LEE A, et al. Factors influencing recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care [J]. Mol Cell Probes, 2016, 30 (2): 74-78.

收稿日期: 2019-02-14 修回日期: 2019-03-15 本文编辑: 徐文璐