

食品中拟态弧菌变性高效液相色谱 检测技术研究

郑秋月^{1,2}, 曹际娟¹, 蒋丹¹, 刘淑艳¹, 赵昕¹, 傅俊范²

(1. 辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连 116001; 2. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 应用 PCR 结合变性高效液相色谱(DHPLC)技术对食品中致病菌——拟态弧菌进行检测, 探讨其灵敏度特异性, 建立快速高通量检测食品中拟态弧菌的新方法。利用 DHPLC 在非变性温度下进行双链 DNA 分离的原理, 应用 DHPLC 技术分析拟态弧菌特异性 PCR 扩增产物。在优化的分析条件下, 对样品洗脱峰排列形成的聚类分析图进行分析, 得到拟态弧菌的特征峰型图谱。结果表明该方法有很好的特异性。与传统检测方法进行比较该方法准确率为 100%。本实验建立的食品中拟态弧菌 PCR-DHPLC 检测技术, 特异性灵敏, 准确度高, 操作快速、简便, 在食品安全检测中具有重要应用价值。

关键词: 拟态弧菌; 聚合酶链式反应; 变性高效液相色谱法

Study on Determination of *Vibrio mimicus* in Food by Polymerase Chain Reaction Coupled with Denaturing High Performance Liquid Chromatography (PCR-DHPLC)

ZHENG Qiu-yue^{1,2}, CAO Ji-juan¹, JIANG Dan¹, LIU Shu-yan¹, ZHAO Xin¹, FU Jun-fan²

(1. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China;

2. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: PCR-DHPLC was adopted as a sensitive, specific, rapid and high flux approach for the detection of food-borne pathogenic bacteria, *Vibrio mimicus* in this study. DHPLC was used for separating double-stranded DNA under non-degeneration temperature and for detecting the specific PCR products. Under the optimum conditions, the clustering analysis diagram of elution peaks of samples were analyzed, and the spectrum with characteristic peak of *Vibrio mimicus* was obtained. The results showed that PCR-DHPLC has excellent specificity and accuracy of 100% compared with the traditional technology, therefore it has extensive application value in food safety assessment.

Key words: *Vibrio mimicus*; PCR; DHPLC

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)06-0175-03

变性高效液相色谱法(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)是在高效液相色谱法的基础上发展起来的、在分子 DNA 水平上进行微生物检测的一种新方法^[1]。DHPLC 技术可以稳定、准确地从种属和菌株水平识别微生物, 弥补传统表型识别方法的缺陷^[2]。是检测混合微生物样本的全自动化操作分析平台, 不仅能鉴定常见的微生物, 还能鉴定不常见的、苛刻的、厌氧的细菌。DHPLC 根据特定样本中各种微生物的峰形对目标菌进行鉴定, 样本的峰形谱可用于定性和定量监测样本中各种微生物的动态变化。本实验拟建立 PCR-DHPLC^[3]技术在非变性条件下对食品中致病菌

——拟态弧菌进行快速检测的方法。样品仅需快速增菌培养几小时, 即可直接取样品增菌液检测拟态弧菌。与传统检测方法进行比较, 结果表明 PCR-DHPLC 方法准确率为 100%, 说明该 PCR-DHPLC 方法具有广泛而良好的适用性。

1 材料与方 法

1.1 菌株、试剂与引物

拟态弧菌(*Vibrio mimicus*, BJ050; ATCC33653、33654、33655、700326)及分离株, 霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*, VC33)、副溶血弧菌(*Vibrio*

收稿日期: 2008-04-17

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2006BAK02A13)

作者简介: 郑秋月(1972-), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为食品微生物检验。E-mail: zhengqyciq@163.com

parahaemolyticus, CMCC17802, BJ054)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*, BJ035)、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*, CC013)、霍利斯弧菌 (*Vibrio hollisae*)、弗尼斯弧菌 (*Vibrio furnissii*)、河流弧菌 (*Vibrio fluvialis*)、梅氏弧菌 (*Vibrio metschnikovii*)、美人鱼弧菌 (*Vibrio mermaid*)、鲨鱼弧菌 (*Vibrio carchariae*) 等由辽宁出入境检验检疫局生物实验室分离和保存。

细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒、Taq DNA 聚合酶、dNTPs TaKaRa 公司; TEAA (醋酸三乙胺) 缓冲液 Transgenomic 公司; DHPLC 缓冲液: 缓冲溶液 A 为 50ml TEAA, 250 μ l 乙腈, 定容至 1000ml; 缓冲溶液 B 为 50ml TEAA, 250ml 乙腈, 定容至 1000ml; 缓冲溶液 D 为 75% 乙腈。

PCR 引物: 正向引物: 5'-AAG GGA AAG TGA ATC AGC AGC CGA GTA-3', 反向引物 5'-CGA CCA TTT GTT GAC GCC CAT CT-3' (片段长度为 243bp) 宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 仪器

PE2400PCR 仪; DHPLC Wave Optimized System Transgenomic 公司。

1.3 样品 DNA 的提取

食品中拟态弧菌等各实验菌株样品的制备、增菌培养和分离步骤参照 NMKL No.156 方法^[3]和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[4]进行。

取培养的相应致病菌增菌液(需二次培养的则取二次增菌液)1ml, 用细菌 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA, 保存于 -20 备用, 以待检测。

1.4 PCR 反应体系和条件

以拟态弧菌浓度相同的 DNA 模板进行 PCR 反应, 微调引物量, 选出反应效果最佳的引物浓度。同时进行 Taq 酶、Mg²⁺、引物用量和循环条件优化, 直至得出最佳反应体系。

反应体系体积 25 μ l: 10 \times PCR 缓冲液 2 μ l、引物对(10 μ mol/l)各 1 μ l、dNTP(10mmol/l) 2 μ l、Taq DNA 聚合酶(5U/ μ l)0.2 μ l、模板 DNA 2 μ l、加灭菌超纯水使总体积为 25 μ l。

反应条件: 94 预变性 3min; 94 变性 60s, 60 退火 60s, 72 延伸 60s, 进行 35 个循环; 72 延伸 7min, 4 保存反应产物。

1.5 DHPLC 分析条件

检测温度: 50 ; 洗脱的 DNA 双链在波长 260nm 处进行紫外吸收检测; 流动相: 缓冲溶液 A 浓度为 50.2%, 缓冲溶液 B 浓度为 49.8%; 流速: 0.9ml/min; 上样量: PCR 产物 5 μ l; 质量控制: 验证实验和实际检测过程中, 分别设阳性对照、阴性对照和空白对照, 阳性对照为扩增片段的阳性克隆分子 DNA, 阴性对照为非目标致

病菌 DNA, 空白对照为无菌水。

1.6 特异性实验

提取拟态弧菌和 1.1 中的各种弧菌培养物的 DNA, 用拟态弧菌特异性引物进行 PCR-DHPLC 特异性实验。

1.7 灵敏度实验

拟态弧菌标准菌株液体培养物做倍数梯度稀释, 分别进行平板计数。每个梯度菌液制备模板 DNA, 进行 PCR-DHPLC 检测。将检测结果与平板计数结果比较, 确定反应体系的灵敏度。

1.8 实际样品检测

为验证本实验建立的检测方法的可靠性, 在实际检验工作中加以应用, 并与现有检测方法进行检出率的比较。

2 结果与分析

2.1 PCR-DHPLC 检测

琼脂凝胶电泳检测拟态弧菌 PCR 反应结果, 扩增出 243bp 特异性条带。对拟态弧菌特异性 PCR 产物进行 DHPLC 检测, 检测图谱如图 1 所示。本实验共检测了 30 株拟态弧菌, 其特异性 PCR 产物在 50 非变性条件下, 在目标产物处均出现一个单一的洗脱峰, 基线平整, 滞留时间一致, 具有高度同一性。

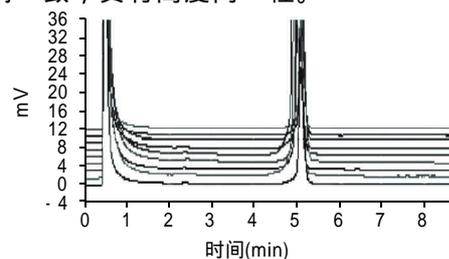
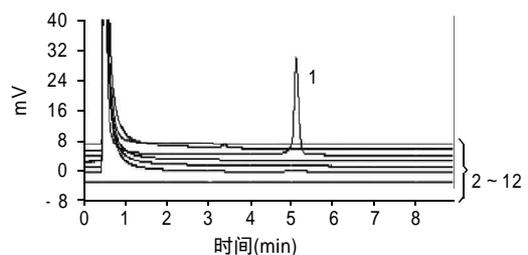


图1 拟态弧菌 PCR-DHPLC 聚类分析图

Fig.1 PCR-DHPLC clustering analysis diagram of *Vibrio mimicus*

2.2 特异性实验



1.拟态弧菌; 2~12.霍乱弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、霍利斯弧菌、弗尼斯弧菌、河流弧菌、梅氏弧菌、美人鱼弧菌、鲨鱼弧菌、水。

图2 拟态弧菌 PCR-DHPLC 特异性检测结果

Fig.2 Specificity of PCR-DHPLC determination to *Vibrio mimicus*

拟态弧菌特异性检测结果的 DHPLC 检测图谱如图 2 所示, 拟态弧菌出现特异性样品吸收峰, 结果为阳性。而霍乱弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、霍

利斯弧菌、弗尼斯弧菌、河流弧菌、梅氏弧菌、美人鱼弧菌、鲨鱼弧菌等非拟态弧菌菌株以及空白水对照均未出现样品吸收峰,检测结果均为阴性。上述结果表明、本实验建立的PCR-DHPLC技术可以特异性检测食品中拟态弧菌。

2.3 灵敏度实验

取拟态弧菌标准菌株进行灵敏度实验,提取制备模板DNA进行PCR-DHPLC检测。实验结果表明,本实验所建立的方法可检出56CFU/ml拟态弧菌。结果见表1。

表1 拟态弧菌标准菌株平板计数与PCR-DHPLC检测结果的比较
Table 1 Comparison of detection results of *Vibrio mimicus* between plate count and PCR-DHPLC methods

稀释梯度 ^a	1	2	3	4	5	6	7	8
平板计数结果(CFU/ml)					6300	590	56	4
PCR-DHPLC检测结果	+	+	+	+	+	+	+	-

注:8个梯度之间的稀释倍数为10倍;平板计数结果为两个平行平板计数结果的平均值。

2.4 实际样品检测

自2007年7月至2008年2月的8个月期间,将本实验建立的拟态弧菌PCR-DHPLC检测方法在实际工作中进行应用,检验了水样、鱼类、虾蟹、贝类等及其相关制品共3036份样品。同时采用NMKL No.156方法进行检测,两种方法进行比较。实验结果表明,用PCR-DHPLC方法检出的11份阳性样本,采用经典的NMKL No.156方法验证,均证实为阳性结果。PCR-DHPLC方法检测拟态弧菌的阴性结果也与NMKL No.156结果符合。检测结果见表2。

表2 拟态弧菌采用PCR-DHPLC和NMKL No.156方法检测结果的比较
Table 2 Comparison of detection results of *Vibrio mimicus* between PCR-DHPLC and NMKL No.156 methods

统计结果	PCR-DHPLC检测结果	NMKL No.156法检测结果
阳性结果	11	11
阴性结果	3025	3025
阳性率(%)	0.036	0.036
合计	3036	3036

3 讨论

拟态弧菌与副溶血弧菌、霍乱弧菌一样属正常海洋菌丛,广泛存在于自然界河水、海水和海产品中,是鱼、虾、蟹等食品中携带的比较常见的肠道致病菌。拟态弧菌病在美国、北美、新西兰、孟加拉及非洲国家均有病例报道。我国福建、北京、上海、江浙地区也有发病。目前食品中拟态弧菌检测主要是生化鉴定法,此方法虽然经典,但费时费力;而且一些样品中的分离株生化反应不典型,实际工作中,其检测鉴别存在一定困难,不适合作为拟态弧菌快速筛查的方法。

李槿年等^[5]用API/ATB半自动化鉴定和PCR技术,从中华绒螯蟹体内分离到一株病原菌。赵俊华等^[6]采用增菌分离后生化实验及VITEK全自动生化分析仪,调查出口澳门的水产养殖场的鲜活淡水鱼和塘水中致病性弧菌的分布情况。丁茂文等^[7]在研究中发现,API 20E和20NE生化鉴定方法对拟态弧菌、非O1群霍乱弧菌、副溶血弧菌属某些细菌的鉴定易产生错误结果。

目前国内外主要应用部分变性DHPLC以及完全变性DHPLC技术进行医学遗传和肿瘤学基因变异等方面的基础和应用研究^[8]。国外有关DHPLC检测细菌的研究刚处于起步阶段,采用非变性DHPLC技术检测致病微生物的相关研究很少。有文献报道基于部分变性DHPLC利用细菌保守的16S rRNA基因进行细菌检测^[9]。DHPLC在非变性温度(40~50℃)条件下可以对不同长度的双链DNA进行分离,用于定量反相PCR、长度多态性分析以及杂合性缺失分析等。DHPLC分析时主要观察是否有特异性洗脱峰的出现,及其形态特征,只要观察到其特异的洗脱峰,即表明样本中存在待检目标菌。而且可以用DHPLC核酸片段收集仪,收集特异性洗脱峰的样品DNA,进行DNA测序。

鉴于DHPLC的上述特点,本实验在非变性条件下,通过优化DHPLC洗脱梯度,利用PCR-DHPLC技术建立拟态弧菌特异性基因检测平台。研究结果表明,将PCR-DHPLC技术应用于食品中拟态弧菌检测,及其流行病学监测,PCR产物只要出现特异性的样品洗脱峰即可进行结果判断。不仅有效避免了PCR产物电泳检测的后污染,并使检测成本明显降低,具有简便快捷、高通量和自动化的特点,准确性和灵敏度高,重复性好,是一种较好的食源性病原菌检测及其流行病学监测手段。

参考文献:

- [1] LI J D, GERHARD D S, ZHANG Z Y. Denaturing high-performance liquid chromatography for detecting and typing genital human papillomavirus[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(12): 5563-5571.
- [2] 白桦. 变性高效液相色谱在分子生物学中的应用[J]. 国外医学: 分子生物学分册, 2003, 25(4): 303-305.
- [3] NMKL No.156 食品中致病性弧菌的检测和计数[S].
- [4] 布坎南 R E, 吉本期 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [5] 李槿年, 余为一, 江定丰, 等. 蟹源致病性拟态弧菌的编码鉴定及其特性分析[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(3): 231-233.
- [6] 赵俊华, 杨泽, 曾卫东, 等. 出口水产养殖场鲜活淡水鱼和塘水中致病性弧菌的调查研究[J]. 旅行医学科学, 2004, 10(2): 1-15.
- [7] 丁茂文, 赵志刚, 李国雄, 等. API 20E和20NE对弧菌属细菌的鉴定分析[J]. 临床检验杂志, 2003, 21(6): 384.
- [8] KOSAKI K, UDAKA T, OKUYAMA T. DHPLC in clinical molecular diagnostic services[J]. Molecular Genetics and Metabolism, 2005, 5(7): 1-7.
- [9] HURTLE W, BODE E, KAPLAN R S. Use of denaturing high-performance liquid chromatography to identify bacillus anthracis by analysis of the 16S-23S rRNA interspacer region and gyrA gene[J]. Journal of clinical microbiology, 2003, 41(10): 4758-4766.