

# 产耐热直接相关溶血素的副溶血性弧菌 PCR 检测及其表型分析

刘代新,宁喜斌

(上海海洋大学 食品学院 上海 200090)

**摘要:**运用 PCR 技术成功建立了检测产耐热直接相关溶血素(TRH)的副溶血性弧菌的方法,并应用该方法从 1 株标准株和其他 3 种不同来源的 37 株副溶血性弧菌中的 13 株扩增出 0.5 kb 的 *trh* 基因特异性扩增带;产 TRH 的副溶血性弧菌中 1 株标准株,12 株分离自腹泻病人排泄物或呕吐物,1 株分离自水产动物养殖用水;并且产 TRH 与尿素酶阳性的副溶血性弧菌菌株之间的具有一一对应的关系,结果认定尿素酶阳性是产 TRH 的副溶血性弧菌菌株的表现型。

**关键词:**副溶血性弧菌;耐热直接相关溶血素;PCR;尿素酶

**中图分类号:**TS201.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)增刊-0001-04

## The TRH production Strain of *Vibrio parahaemolyticus*: Its Detected Method Via the PCR Technology and the Phaenotype

LIU Dai-xin, NING Xi-bin

(College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** In this study, the PCR technology was used to detect the *Vibrio parahaemolyticus* which could product the TRH, which was one of the major causative agents of *Vibrio parahaemolyticus*. We found that there were fourteen strains from the 37 *Vibrio parahaemolyticus* strains can product TRH. In the fourteen strains, one was the type strain, one was isolated from the cultural water, and the other twelve were the clinic strain. The result showed that the strains which produced the TRH can also produced the urase, and the TRH negative ones also the urase negative. So we can judge the *Vibrio parahaemolyticus* strain which can produce TRH according to the urase test.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; TRH; PCR; Urase

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是革兰氏阴性嗜盐性细菌, 隶属弧菌科中的弧菌属, 它主要存在于近海岸的海水、海底沉积物、盐湖和鱼类、虾类、贝类、牡蛎等海产品中, 是引起食源性疾病的主要病原之一。人类会由于食用污染大量该菌的水产品而引起突发性食物中毒, 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<sup>[1]</sup>。副溶血性弧菌的主要致病性在于它可以产生 3 种溶血性毒素, 它们是不耐热溶血毒素(ILH)、耐热直接溶血毒素(IDH) 和耐热直接相关溶血素(TRH), 分别由 *tlh*、*tdh* 及 *trh* 基因编码。其中 TRH 的致病性主要表现在具有直接溶血活性和肠毒素作用, 研究表明, 并非所有的副溶血性弧菌携带毒力基因 *trh*, 只有部分水产品中分离的该菌产 TRH<sup>[2-4]</sup>。

快速准确的检测出产 TRH 的副溶血性弧菌, 可以有效地预防和控制由该菌引起的食源性疾病。其中 PCR 技术具有特异性强、灵敏度高、快速准确及自动化程度高等特点, 正在逐渐应用于食品中病原微生物的检测<sup>[5]</sup>。有研究表明, 产 TRH 的副溶血性弧菌与尿素酶阳性的副溶血性弧菌有一定的关系<sup>[6,7]</sup>。本研究利用 PCR 技术检测产 TRH 的副溶血性弧菌, 并分析产 TRH 与尿素酶阳性的副溶血性弧菌菌株之间的对应关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 标准菌株 BJ1.1997 (VP BJ1.1997), 此菌株 *trh* 阳性且尿素酶阳性。其余菌株见表 1。

收稿日期:2008-08-06

基金项目:上海市科学技术委员会资助(06dz05129)

作者简介:刘代新(1983-), 男, 山东济宁人, 硕士, 主要从事食品安全的研究。

通讯作者:宁喜斌(1964-), 男, 黑龙江鹤岗人, 教授, 博士, 主要从事食品安全、微生物的研究。

1.1.2 主要试剂 营养琼脂、TCBS 琼脂、尿素琼脂基础培养基、40 % 尿素溶液购于上海市疾病预防控制中心试剂中心;胰酪胨大豆琼脂(TSA)、胰酪胨大豆琼脂(TSB) 购于上海康润生物科技有限公司;科玛嘉弧菌显色培养基购于上海科玛嘉微生物技术有限公司;RNA 酶、柱式基因组 DNA 提取试剂盒及其他 PCR 反应及产物检测所需试剂均购于上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.1.3 主要仪器 隔水式培养箱、恒温培养摇床(上海-恒仪器有限公司);微波炉(格兰仕公司);电泳槽和电泳仪(北京六一仪器厂);高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);恒温水浴箱(上海安谱科学仪器有限公司);吉尔森可调移液器(法国吉尔森公司);PCR 仪(PTC-100,美国 MJ 公司);凝胶成像系统(Tanon-4100,上海天能科技有限公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 菌株的活化和观察 所有副溶血性弧菌菌株接种于 3 % NaCl 营养琼脂,转接活化 2 ~ 3 次;活化的菌株然后接种于 TCBS 琼脂和科玛嘉弧菌显色培养基,观察是否符合在这两种培养基上生长的菌落形态。

1.2.2 引物的序列与合成 *trh* 基因扩增所用引物的序列参照文献[8],扩增出的 *trh* 基因长度为 0.5 kb。

上游引物序列:5'-TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT-3'

下游引物序列:5'-CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G-3'

引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。

1.2.3 菌悬液的制备 副溶血性弧菌接种于 3 % NaCl TSA,过夜培养后,取单菌落转接于 3 % NaCl TSB,37 °C、120 r/min 摇床培养 24 h。

1.2.4 基因组 DNA 的提取 用柱式基因组 DNA 提取试剂盒,按照说明书提取副溶血性弧菌的基因组 DNA。

1.2.5 PCR 反应条件的优化 *trh* 基因扩增所需的 PCR 反应体系及反应温度条件的优化参照文献[8,9]。

1.2.6 PCR 产物的检测 取扩增产物 5  $\mu$ L 和 2  $\mu$ L loading buffer 混匀点样后,100 V 电压下电泳 30 ~ 40 min,EB 染色后,凝胶成像系统观察并拍照,记录结果并分析。

1.2.7 尿素酶试验 培养基的制备参照产品说明书。培养至对数生长期的 TCBS 琼脂上副溶血性弧菌接种于 3 % 氯化钠尿素培养基,30 °C 培养 18 ~ 24

h,观察结果。

## 2 结果与分析

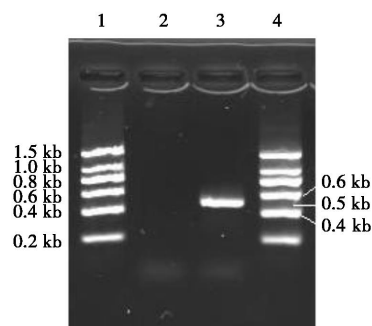
### 2.1 两种选择性培养基上副溶血性弧菌的菌落特征

2.1.1 TCBS 琼脂上副溶血性弧菌的菌落特征 圆形,边缘整齐,湿润,稍混浊,半透明,多数具尖心,斗笠状,蓝绿色菌落,直径 2 ~ 4 mm。

2.1.2 科玛嘉弧菌显色培养基上副溶血性弧菌的菌落特征 圆形,边缘整齐,湿润,混浊,不透明,紫红色菌落,直径 3 ~ 5 mm。

### 2.2 产 TRH 的副溶血性弧菌 PCR 检测的优化条件

优化的总体积为 30  $\mu$ L,反应体系中,模板 DNA 1  $\mu$ L,30  $\mu$ mol/L 的上下游引物各 0.5  $\mu$ L,2 mmol/L 的 dNTP 3  $\mu$ L,5 U/ $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L,25 mmol/L 的  $MgCl_2$  1.8  $\mu$ L,10  $\times$ PCR Buffer 3  $\mu$ L,其余量用灭菌双蒸水补足。优化的 PCR 反应温度为:94 °C 预变性 5 min;30 个循环的反应为:94 °C 变性 60 s,58 °C 复性 60 s,72 °C 延伸 60 s;最后 72 °C 延伸 7 min。从图 1 可以看出,以副溶血性弧菌标准株 BJ1.1997 的基因组 DNA 为模板,能扩增出 0.5 kb 的特异扩增带,与预期结果相符,表明本试验建立的产 TRH 的副溶血性弧菌 PCR 检测方法是成功的。



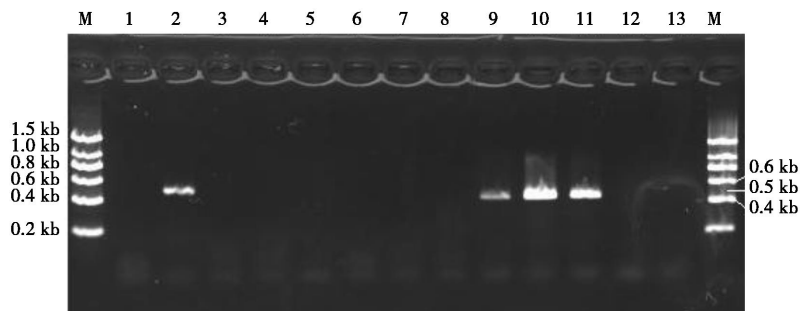
1,4. Marker (从下至上:0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.5 kb);  
2. 空白对照;3. 阳性对照,副溶血性弧菌标准株 BJ1.1997。  
1,4. Marker (from the bottom up:0.2,0.4,0.6,0.8,  
1.0,1.5 kb);2. Negative control;3. VP BJ1.1997.

图 1 副溶血性弧菌标准株 BJ1.1997 *trh* 基因扩增图谱

Fig.1 PCR products of *trh* gene of VP BJ1.1997

### 2.3 PCR 检测方法的应用

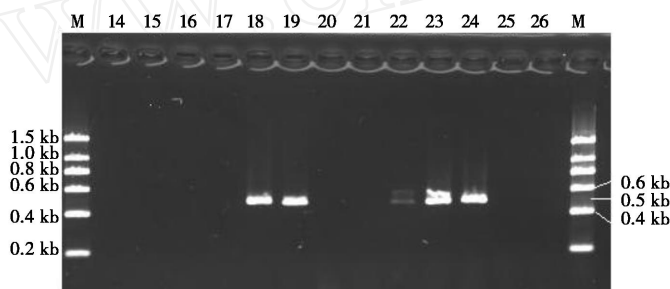
运用本研究建立的产 TRH 的副溶血性弧菌 PCR 检测方法对分离自食品、腹泻病人排泄物或呕吐物及水产动物养殖水的 37 株副溶血性弧菌的 *trh* 基因进行了扩增,由图 2 ~ 4 可以看出,有 13 株副溶血性弧菌扩增出了 0.5 kb 的 *trh* 基因,而其他 24 株不产 TRH。



M. Marker (从下至上: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 kb); 1. 空白对照; 2. 阳性对照, 副溶血性弧菌标准株 BJ1. 1997; 3. VPF1; 4. VPF2; 5. VPI1; 6. VP2; 7. VPI11; 8. VPI12; 9. VP29; 10. VP33; 11. VP47; 12. VPW1; 13. VPW2。  
M. Marker (from the bottom up: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 kb); 1. Negative control; 2. VP BJ1. 1997; 3. VPF1; 4. VPF2; 5. VPI1; 6. VP2; 7. VPI11; 8. VPI12; 9. VP29; 10. VP33; 11. VP47; 12. VPW1; 13. VPW2.

图2 副溶血性弧菌标准株 BJ1. 1997 和其他 11 株副溶血性弧菌 *trh* 基因扩增图谱

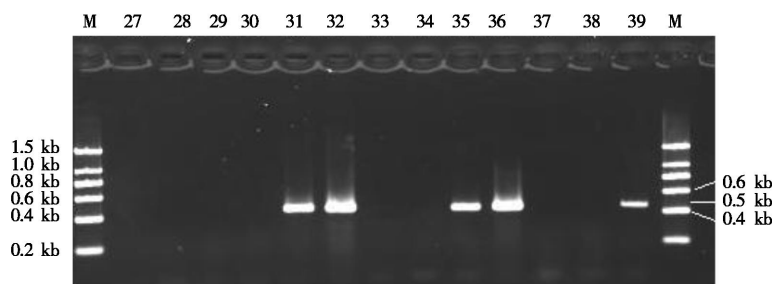
Fig. 2 PCR products of *trh* gene of VP BJ1. 1997 and other *V. parahaemolyticus* strains



M. Marker (从下至上: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 kb); 14. VPF7; 15. VPF8; 16. VPF9; 17. VP4; 18. VP49; 19. VP74; 20. VPI3; 21. VPI4; 22. VP70; 23. VPI02; 24. VPI03; 25. VPW11; 26. VPW12。  
M. Marker (from the bottom up: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 kb); 14. VPF7; 15. VPF8; 16. VPF9; 17. VP4; 18. VP49; 19. VP74; 20. VPI3; 21. VPI4; 22. VP70; 23. VPI02; 24. VPI03; 25. VPW11; 26. VPW12.

图3 13 株副溶血性弧菌 *trh* 基因扩增图谱

Fig. 3 PCR products of *trh* gene of 13 strains *V. parahaemolyticus*



M. Marker (从下至上: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 kb); 27. VPF10; 28. VPF50; 29. VPF51; 30. VP3; 31. VPI08; 32. VPI21; 33. VPI5; 34. VP20; 35. VPI04; 36. VPI28; 37. VPW13; 38. VPW14; 39. VPW3。  
M. Marker (from the bottom up: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 kb); 27. VPF10; 28. VPF50; 29. VPF51; 30. VP3; 31. VPI08; 32. VPI21; 33. VPI5; 34. VP20; 35. VPI04; 36. VPI28; 37. VPW13; 38. VPW14; 39. VPW3.

图4 13 株副溶血性弧菌 *trh* 基因扩增图谱

Fig. 4 PCR products of *trh* gene of 13 strains *V. parahaemolyticus*

## 2.4 产 TRH 与尿素酶阳性的副溶血性弧菌菌株之间的对应关系

38 株副溶血性弧菌的来源、产 TRH 和尿素酶的特性及对应关系见表 1, 14 株 *trh* 阳性的副溶血性弧菌, 尿素酶也是阳性, 而其他 24 株副溶血性弧菌 *trh* 和尿素酶均为阴性, 由此可见, 产 TRH 与尿素酶阳性的副溶血性弧菌菌株之间的关系是正相关的。除标准株, 其他 13 株产 TRH 的副溶血性弧菌, 12 株分离自腹泻病人排泄物或呕吐物, 1 株分离自水产

动物养殖用水。

## 3 讨论与结论

本研究成功运用 PCR 技术扩增出副溶血性弧菌的 *trh* 基因, 进而区分菌株是否产 TRH。副溶血性弧菌的主要致病性在于它可以产生 3 种溶血性毒素, 分别由 *tlh*、*tdh* 及 *trh* 基因编码。其中 *tlh* 基因具有种的特异性, 常用于判定副溶血性弧菌, *TDH* 是最主要的致病因子, 常用于判定副溶血性弧菌菌

表 1 副溶血性弧菌菌株 trh 和尿素酶关系

Tab.1 The relation of trh and Urase of V. parahaemolyticus							
菌株	trh	尿素酶	来源	菌株	trh	尿素酶	来源
Strain		Urase	Source	Strain		Urase	Source
BJ1. 1997	+	+	S	VP102	+	+	C
VPF1	-	-	F	VP103	+	+	C
VPF2	-	-	F	VP104	+	+	C
VPF7	-	-	F	VP108	+	+	C
VPF8	-	-	F	VP121	+	+	C
VPF9	-	-	F	VP128	+	+	C
VPF10	-	-	F	VPW1	-	-	W
VPF50	-	-	F	VPW2	-	-	W
VPF51	-	-	F	VPW3	+	+	W
VP1	-	-	C	VPW11	-	-	W
VP2	-	-	C	VPW12	-	-	W
VP3	-	-	C	VPW13	-	-	W
VP4	-	-	C	VPW14	-	-	W
VP29	+	+	C	VP11	-	-	C
VP33	+	+	C	VP12	-	-	C
VP47	+	+	C	VP13	-	-	C
VP49	+	+	C	VP14	-	-	C
VP70	+	+	C	VP15	-	-	C
VP74	+	+	C	VP20	-	-	C

注. +. 阳性; -. 阴性; S. 标准菌株; F. 食品; C. 临床; W. 水。  
Note. +. Positive; -. Negative; S. Reference strain; F. Food; C. Clinical; W. Water.

株的致病性,所以对这 2 类溶血性毒素的 PCR 检测方法已经有了大量的研究<sup>[8-12]</sup>;水产品中分离的副溶血性弧菌只有很少部分产 TRH,对该毒素的 PCR 检测方法研究很少,但是该毒素也是副溶血性弧菌的主要致病因子,所以有必要建立检测该毒素的快速检测方法。

本研究运用建立的 PCR 技术对 1 株标准株和其他 37 株不同来源的副溶血性弧菌的 trh 基因进行了扩增,其中 14 株副溶血性弧菌 trh 阳性。除标准株,其他 13 株产 TRH 的副溶血性弧菌,12 株分离自腹泻病人排泄物或呕吐物,1 株分离自水产动物养殖用水。本研究同时研究了这些菌株的产尿素酶情况,发现 trh 阳性的菌株,尿素酶也是阳性, trh 阴性的菌株,尿素酶则是阴性,由此可见,产 TRH 与尿素酶阳性的副溶血性弧菌菌株之间的具有一一对应的关系。虽然本研究菌株数有限,不能说明所有产 TRH 与尿素酶阳性的副溶血性弧菌菌株之间的关系,至少我们可以用尿素酶阳性这个生化指标初步筛选产 TRH 的菌株,通过简单的表现型来快速筛选

所需的菌株。

参考文献:

[1] 杨正时,房海.人与动病原细菌学[M].石家庄:河北科学技术出版社,2003:609-622.

[2] Taniguchi H,Ohta H,Ogawa M, et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes[J].J Bacteriol,1985,162(2):510-515.

[3] Honda T,Iida. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins[J]. Reviews in Medical Microbiology,1993,4:106-113.

[4] Nishibuchi M, Kaper J. B. Thermostable Direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium[J]. Infect Immun,1995,63(6):2093-2099.

[5] 何小维,刘玉. PCR 技术在食品检测中的应用[J]. 食品研究与开发,2006,27(5):107-109.

[6] Kaysner C A,Abeyta C Jr, et al. Incidence of Urease-Hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* in Willapa Bay, Washington[J]. Appl and Env Microbiol,1990,56(4):904-907.

[7] Park K S,Iida T, Yarnaei Y, et al. Genetic characterization of DNA region containing the trh and ure genes of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Infect Immun,2000,68(10):5742-5748.

[8] Asim K Bej,Donald P,Patterson, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex-PCR amplification of tlh,tdh and trh[J].J of Microbiol Methods,1999,36:215-225.

[9] J. 萨姆布鲁克,D. W. 拉塞尔,著.分子克隆实验指南[M].第3版(上册).黄培堂译.北京:科学出版社,2002:597-610.

[10] 吴彩云,蔡俊鹏,杨汝德,等.双重 PCR 检测携带有 tlh 和 tdh 基因的副溶血弧菌毒力菌株[J].水产科学,2004,23(5):5-9.

[11] Blackstone G M,Noalsmxn J L,Viekery M C, et al. Detection of pathogenic in oyster enrichments by real time PCR.J Microbiol Methods [J].J Microbiol Methods,2003,53:149-155.

[12] 钟凯,田静,李业鹏.食品中副溶血性弧菌 PCR 快速检测方法的研究[J].中国食品卫生杂志,2004,16(4):317-320.