

· 实验室研究 ·

实时聚合酶链反应检测 O1 群和 O139 群霍乱弧菌方法的建立及应用

王晓梅 王多春 谭海玲 钟豪杰 陈经雕 李柏生 柯昌文 闫梅英 张静 阚飙

【摘要】 目的 建立检测 O1 群和 O139 群霍乱弧菌的实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)方法并进行水体标本的检测评价。**方法** 根据 O1 群和 O139 群霍乱弧菌 O 抗原编码基因 *rfb* 序列设计引物,利用 SYBR Green 染料,建立同时检测霍乱弧菌 O1 群和 O139 群的 RT-PCR 方法,对所建立的方法分别进行实验室内的灵敏度、特异性及重复性评价。采集河口水标本增菌后进行 RT-PCR 检测,与分离培养方法比较评价实际应用价值。**结果** 建立了检测 O1 群和 O139 群霍乱弧菌的双重 RT-PCR 方法,根据扩增产物的溶解温度能有效区分 O1 群和 O139 群霍乱弧菌两种目标片段的扩增;对其他 10 种弧菌染色体 DNA 没有扩增;RT-PCR 检测 524 份河口水体标本的增菌液,与常规分离方法相比显示了明显的灵敏性,并且所有常规分离方法阳性标本其荧光 PCR 检测亦为阳性。**结论** 以 O1 群和 O139 群 *rfb* 基因为目标检测片段建立的霍乱弧菌 RT-PCR 方法可用于环境水体样本中霍乱弧菌常规分离前的快速筛查。

【关键词】 霍乱弧菌;实时聚合酶链反应

Development and application of real-time polymerase chain reaction to detect *Vibrio cholerae* O1 and O139 in river water WANG Xiao-mei*, WANG Duo-chun, TAN Hai-ling, ZHONG Hao-jie, CHEN Jing-diao, LI Bai-sheng, KE Chang-wen, YAN Mei-ying, ZHANG Jing, KAN Biao. *State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute of Communicable Disease Control & Prevention, Chinese Center of Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: KAN Biao, Email: kanbiao@icdc.cn

【Abstract】 Objective To develop a real-time SYBR Green polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139, and to evaluate its reliability through detection of estuary water samples. **Methods** O antigen *rfb* genes specific for O1 and O139 were used for the design of PCR primers. The real-time SYBR Green PCR system in detecting O1 and O139 specific *rfb* genes in one tube was developed, and its sensitivity, specificity and reproducibility were evaluated. The ability of the real-time PCR in detection of estuary water samples was compared with the routine PCR and bacteria isolation. **Results** The amplification of O1 or O139 specific target gene could be detected according to the melt curve temperature of amplicons. No amplification was observed in the templates of other 10 non-cholerae vibrios. When comparing to the real-time PCR to bacteria isolation in detection of 524 estuary water samples, it showed high sensitivity, plus also positive in real-time PCR detection among all the samples in which bacteria of O1 or O139 were isolated. **Conclusion** The real-time SYBR Green PCR could be used as the first step of rapid environment screen of *V. cholerae* in water samples thus might enhance the efficiency of isolation in screening of large amount of water samples.

【Key words】 *Vibrio cholerae*; Real-time polymerase chain reaction

对霍乱疫区的环境标本进行监测是霍乱防治工

作的重要组成部分^[1,2];但在霍乱的非流行期,霍乱弧菌在环境中自然生存状态下菌数量较少,由于环境中存在大量其他杂菌,会对霍乱弧菌的分离鉴定造成干扰,致使霍乱弧菌不易检出。为了提高环境中霍乱弧菌的检出率,在确保标本采集和增菌的技术质量前提下,将 SYBR Green 实时聚合酶链反应(real time, RT-PCR)运用于对霍乱弧菌的分离和检测;具有快速、特异、敏感的特点。本研究以霍乱弧

基金项目:国家“863”高新技术研究发展计划课题资助项目(2006AA02Z425)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室(王晓梅、王多春、闫梅英、阚飙);广东省疾病预防控制中心(谭海玲、钟豪杰、陈经雕、李柏生、柯昌文);中国疾病预防控制中心(张静)

王晓梅与王多春同为第一作者

第一作者现工作单位:476000 河南省商丘市疾病预防控制中心
通讯作者:阚飙, Email: kanbiao@icdc.cn

菌(O1 群和 O139 群)O 抗原编码基因(*rfb*)为靶序列,建立双重 RT-PCR 定性分析与单一 RT-PCR 检测相结合的实验方法,为水体标本霍乱弧菌的初筛与检测提供了一条可行的途径。

材料与方 法

1. 实验菌株:霍乱弧菌全基因组测序菌株 N16961(O1 群)、MO45(O139 群)、O1 群 El Tor 型霍乱弧菌 50 株(1964-2005 年分离),O139 群霍乱弧菌 50 株(1994-2005 年分离),非 O1/非 O139 群的 2 株菌 O22 和 N53,以及拟态弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、麦氏弧菌、河弧菌、创伤弧菌、弗尼斯弧菌、麦氏弧菌等 10 种环境水体中能分离到的弧菌。实验菌株均经过血清或生化鉴定,本实验室保存。

2. 引物的设计:根据 O1 群和 O139 群霍乱弧菌 O 抗原编码基因 *rfb* 序列,使用 Oligo 6.0 软件设计并合成针对 O1 群和 O139 群特异性 *rfb* 的 RT-PCR 的引物(表 1)。

表 1 标准 DNA 制备与 RT-PCR 所用引物

引物	引物序列(5'~3')	产物长度 (bp)
标准 DNA 制备		
BO1F	TAG CTG TGG ATC CTG CAT ATT T	376
BO1R	TAG ATA CTG TTG TGG CGT GCT T	
BO139F	AGT TCA TTG TGG GAT TTA GGT G	380
BO139R	ACC AAA GTC ATC ATC AAC CCA T	
RT-PCR		
O1-P2F	GCG TAA ATA TCT AAA CGA TTG CAT TG	83
O1-P2R	AAA CTC AGT TTC GAA GCG ATC AA	
O139-P1F	GCG GTG TAG CGG GTT TTA TTA G	76
O139-P1R	TGC ATA ATA CTT TCG ACC ATG GA	

3. 标准模板 DNA 的制备和拷贝数定量:分别以霍乱弧菌 O 抗原编码基因 O1-*rfb* 和 O139-*rfb* 特异性基因序列,设计并合成普通 PCR 引物(表 1, BO1F/BO1R 和 BO139F/BO139R)。以 N16961 和 MO45 的纯培养液 DNA 为模板,分别扩增 O1-*rfb* 和 O139-*rfb* 片段,扩增条件相同:94℃ 预变性 10 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,共循环 30 次;最后 72℃ 延伸 5 min。将扩增产物连接到 T 载体(TaKaRa 公司 pMD18 载体)上,构建重组质粒。对重组质粒中的 *rfb* 片段测序,确定序列无误后提取重组质粒。将提取的质粒进行 DNA 定量(Nano Drop ND-1000 核酸定量仪),折算为拷贝数(拷贝数=DNA 质量/分子量×阿伏加德罗常数)。将 10 倍系列稀释质粒作为本次实验绝对定量的标准

DNA。

4. PCR 反应条件:RT-PCR 采用 20 μl 反应体系,每个反应中含 10 μl 通用 PCR 反应混合物(SYBR premix, TaKaRa 产品);P2F、P2R、P1F、P1R 引物(10 μmol/L)各 0.4 μl,去离子水 5.4 μl,DNA 模板 3 μl。反应条件为 95℃ 10 s,95℃ 5 s 和 60℃ 20 s,循环 40 次;溶解曲线分析:95℃ 0 s,62℃ 15 s,95℃ 0 s;40℃ 20 s。普通 PCR 扩增条件与 O1-*rfb* 和 O139-*rfb* 片段扩增条件相同。将 4 次系列稀释质粒的 RT-PCR 试验结果用于标准曲线的制备。

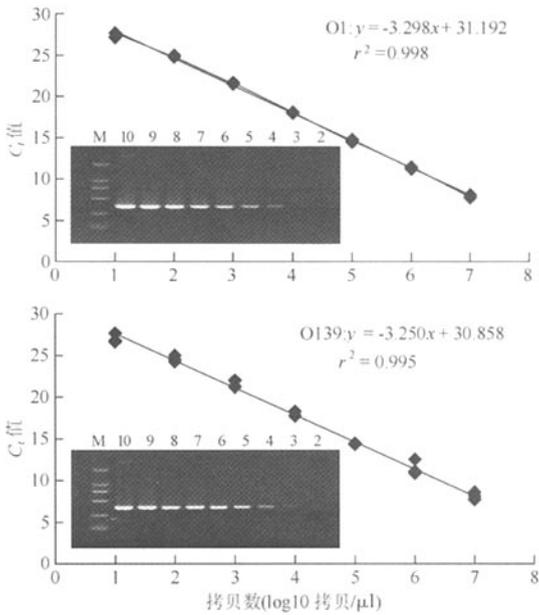
5. 河口水标本的检测和霍乱弧菌的分离:2006 年 3-12 月,对广州市区的珠江河段及其入海口处,采集水体标本共计 524 份。每份采集 450 ml,回实验室后加入 50 ml 10 倍浓缩的碱性蛋白胨增菌液,置 37℃ 增菌 6 h,取其中 1 ml 提取细菌 DNA(Tiagen 公司)做模板,按 RT-PCR 反应条件检测 O1/O139 群霍乱弧菌,另分别接种涂庆大霉素和 TCBS 平板分离霍乱弧菌,对生长的可疑菌落进行 O1 群及 O139 群霍乱诊断血清玻片凝集试验,阳性的菌株继续相关的系统鉴定。

结 果

1. 灵敏度分析:利用克隆有待扩增片段的重组质粒 pUT-O1rfb 和 pUT-O139rfb、对荧光 PCR 和普通 PCR 的灵敏度进行评价。制备的质粒模板定量检测, pUT-O1rfb 为 210.9 ng/μl, pUT-O139rfb 为 208.0 ng/μl,计算模板拷贝数分别为 6.7×10^{10} 个/μl 和 6.6×10^{10} 个/μl。系列稀释质粒至每微升含 6.6 个拷贝。实时 PCR 各系列稀释的模板 DNA 拷贝数对应的循环阈值(C_t)具有良好的线性关系(图 1)。在每微升为 6.6×10^1 个拷贝时检测 O1 群和 O139 群目标片段的 C_t 值分别为 27.89 和 27.61,因此该方法检测霍乱弧菌的灵敏度为每微升 10^1 数量级拷贝数的模板 DNA,而普通 PCR 能检出每微升 10^4 拷贝数模板 DNA(图 1),由此推算 RT-PCR 法的检测灵敏度较高。

2. 特异性分析:用建立的 RT-PCR 分别检测不同年代分离、不同型别的霍乱弧菌 DNA(20 株古典型、50 株 O1 群和 50 株 O139 群)。分别单独检测 O1 群和 O139 群霍乱弧菌,溶解温度为 77.8℃ (O1 群)和 78.9℃ (O139 群);当模板中同时存在 O1 群和 O139 群 DNA 时,两种目的片段均获得扩增,各扩增产物溶解温度均保持不变(图 2),而结果互不

干扰,能够与其他弧菌和细菌相区别。说明 O1 群和 O139 群特异性 *rfb* 基因有共同检测的特异性。



注:M:DNA 分子量标准; 10~2:霍乱弧菌 DNA 模板量分别为 $10^{10} \sim 10^2$ 拷贝/ μ l

图1 检测 O1 群/O139 群霍乱弧菌 *rfb* 的 RT-PCR 标准曲线及普通 PCR 相对定量的电泳

3. 重复性分析:将同一批次和不同批次的 10 倍稀释标准品 $10^7 \sim 10^1$ 拷贝检测后,根据 C_t 值的变异系数(CV)对重复性进行了评价。批内重复 3 次 CV 为 0.10%~0.92% (O1 群)和 0.22%~1.09% (O139 群),批间重复 4 次 CV 为 0.03%~2.82% (O1 群)和 0.15%~0.56% (O139 群)。说明建立的 RT-PCR 具有良好的重复性。

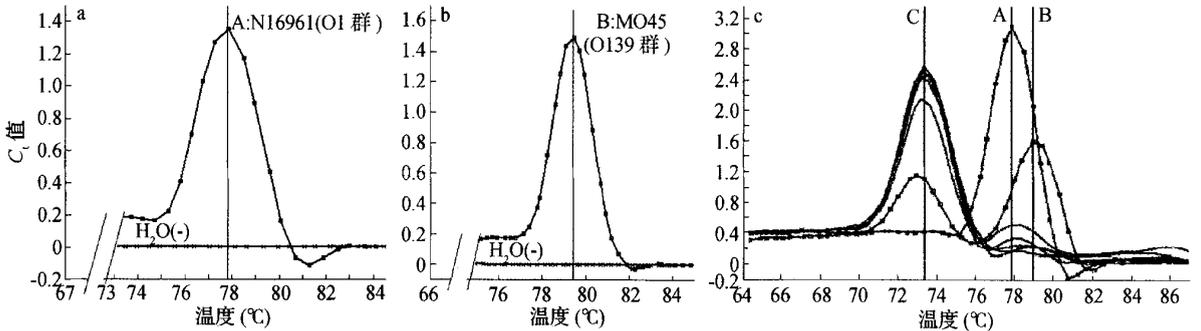
4. 水体标本的检测:广州市珠江区河段以及入海口处采集了水体样本进行霍乱弧菌的检测,对

524 份水体样本进行霍乱弧菌的增菌后分离,同时用建立的 O1 群和 O139 群霍乱弧菌 RT-PCR 检测增菌液 DNA。按照 RT-PCR 检测增菌液 DNA 的灵敏度,其阳性结果的判定为 $C_t^{O1} < 27.89$, $C_t^{O139} < 27.61$,同时具有 O1 群和 O139 群霍乱弧菌的特异溶解温度。常规分离菌株份数为 31 份(O1 群)和 11 份(O139 群),而利用 RT-PCR 检测,阳性份数为 98 份(O1 群)和 74 份(O139 群)。其中,所有常规分离方法阳性的标本、其 RT-PCR 检测也均为阳性,同时血清群检测结果也一致。

讨论

本研究建立了基于 SYBR Green 的 RT-PCR 自水体增菌标本中快速检测 O1 和 O139 群霍乱弧菌的方法,检测的目标基因是 O1 群和 O139 群霍乱弧菌的 O 抗原特异的 *rfb* 基因片段。在培养菌的提取 DNA 模板检测体系内,RT-PCR 检测灵敏度高于普通 PCR。

荧光定量 PCR 已被应用于检测水体环境中的霍乱弧菌等病原菌^[3-6], Lyon^[7] 采用溶血素基因(*hlyA*)做探针,使用 TaqMan PCR 法检测 O1 群和 O139 群,获得较高的灵敏度,但该 *hlyA* 探针同时检测到非 O1 群和非 O139 群霍乱弧菌。本研究中建立的 RT-PCR 中扩增的 *rfb* 序列,经 Blast 对 GenBank 中有关序列进行搜索比较后,仅与 O1 群和非 O139 群霍乱弧菌 *rfb* 基因序列具有良好的同源性。实际检测结果也显示,建立的 *rfb* 基因 RT-PCR 仅对 O1 群和 O139 群霍乱弧菌 DNA 有阳性检测结果,对拟态弧菌、副溶血弧菌等其他 10 种弧菌 DNA 检测结果均为阴性;并且,本研究使用的 SYBR Green 能够与体系中所有的双链 DNA 相结



注:a:检测 N16961(O1 群),温度 77.8°C; b:检测 MO45(O139 群),温度 78.9°C; c:同时检测 N16961(O1 群)和 MO45(O139 群),温度 77.8°C ,温度 78.9°C ,其他弧菌温度 73.3°C

图2 RT-PCR 检测霍乱弧菌特异性溶解曲线图

合,无需为不同的模板特殊定制,价格相对较低,并且通过对扩增产物的溶解曲线分析增强了荧光信号的真实性的。

本研究在对水体标本的增菌液进行霍乱弧菌的 RT-PCR 检测,阳性数显著高于常规方法分离的阳性数,在常规分离方法中,当增菌液中霍乱弧菌量 $< 10^4$ cfu/ml 时,常规方法有可能分离不到,而 RT-PCR 检测仍是阳性,另外水体环境中霍乱弧菌的非可培养状态 (VBNC) 和死菌体的存在,也可能导致 RT-PCR 检测阳性而常规方法不能分离获得。

在霍乱的环境监测中,常需要对大量标本进行两次增菌和分离鉴定。在分离鉴定时,一般需要使用两种平皿(庆大霉素和 TCBS 培养基平皿)进行选择性的筛选霍乱弧菌,而且在使用 TCBS 作选择性培养基时,由于杂菌的干扰,常需要先选择 TCBS 培养基上的可疑菌落,复种庆大霉素培养基或碱性平板后再使用血清凝集鉴定,此操作工作量大、环节多、时间延长、成本加大。本研究显示,对标本第一次增菌液使用商品化试剂盒提取 DNA 标本,对于一份样品,从 DNA 提取到 RT-PCR 检测时间在 2 h 以内(使用快速提取试剂盒以及快速的荧光 PCR 仪器时可缩短至 1 h 内),由于不需要对扩增产物的凝胶电泳分离,因此缩短了对样本的检测周期。另外实时荧光 PCR 比分离培养有明显的高灵敏性,因此在处理标本时,可以先进行实时荧光 PCR 检测,然后仅对阳性标本的增菌液进行后续分离鉴定,这样能够明显增加监测工作中处理的标本量,从而明显提高监测工作的灵敏性和工作效率。需注意的是水体中

常能检测到 O1 群或 O139 群的霍乱弧菌,但在非流行期,环境中常能检测到非产毒的霍乱弧菌,这类菌株目前发现不致病或有个别报道仅引起轻微的腹泻,因此,在后续的工作中,我们将考虑将检测霍乱毒素基因 *ctxAB* 的引物也加入到检测体系中,判断标本中是否具有产毒的 O1 群或 O139 群霍乱弧菌,会具有更大的流行病学价值。

参 考 文 献

- [1] Lipp EK, Rivera IN, Gil AI, et al. Direct detection of *Vibrio cholerae* and *ctxA* in Peruvian coastal water and plankton by PCR. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69:3676-3680.
- [2] Theron JJ, Cilliers M, Du Preez, et al. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* from environmental water samples by an enrichment broth cultivation-pit-stop seminested PCR procedure. *J Appl Microbiol*, 2000, 89:539-546.
- [3] Gubala AJ. Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*. *J Microbiol Methods*, 2005, 65:278-293.
- [4] Blackstone GM, Nordstrom JL, Vickery MCL, et al. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *J Microbiol Methods*, 2003, 53:149-155.
- [5] Rivera IN, Lipp EK, Gil A, et al. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environ Microbiol*, 2003, 5:599-606.
- [6] Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R. Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. *J Clin Microbiol*, 2003, 41:5134-5146.
- [7] Lyon WJ. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67:4685-4693.

(收稿日期:2007-03-08)

(本文编辑:尹廉)

· 阅 读 信 息 ·

本刊现已连载“流行病学与计算机应用”系列讲座

近年来知识和信息已经达到每 4-5 年更新一次的速度。流行病学虽然隶属自然科学,但许多内容介于自然科学与社会科学、信息科学与生物科学、电子与分子之间。流行病学学科的进步依赖于边缘学科的发展,同理,相辅相成,流行病学的发展也促进其他学科的进步。我国政府提出“以信息化带动工业化,以信息化推动现代化”的决策,使信息化的步伐大大加速。我国各地的信息化,电子政务、商务,远程教育、医疗,家庭网络等都在蓬勃兴起。在流行病学方面,急性传染病网络直报已经形成,生命统计系列软件也在编制。上海地区已在应用健康档案的贮存和分析及恶性肿瘤、糖尿病的报告、管理软件。浙江省已开发出细菌学检索和致癌剂结构分析的软件。随着硬、软件的不断开发,计算机在流行病学上的应用将会愈来愈广泛和深入。为了适应时代的发展,复旦大学预防医学研究所组织了海内外流行病学专家编写了《流行病学与计算机应用》一书。为了便于更多的读者阅读,本刊为先睹为快,从中有目的选择了部分内容,由复旦大学预防医学研究所俞顺章教授编写,本刊将在 2007 年第 7 期起以“系列讲座”形式逢单月刊出。敬请读者关注。