

创伤弧菌物种特异性检测靶标基因的发掘及评价

冯立芳¹, 程兴斌¹, 何珊珊¹, 励建荣^{1,2*}

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310035;

2. 渤海大学辽宁省食品安全重点实验室, 辽宁 锦州 121013)

摘要: 实验根据 GenBank 公布的细菌全基因组数据, 采用比较基因组学分析创伤弧菌与其它细菌基因组间的差异, 筛选出 34 个潜在的创伤弧菌物种特异性检测靶标基因, 其中 VV1_2692、VV2_0075 和 VV2_0939 这 3 个基因已有功能注释。常规 PCR 扩增结果显示这 3 个基因均具有良好的特异性和灵敏度。进而以这 3 个基因和传统靶基因 *vvhA* 作为检测靶标, 采用常规 PCR 技术检测来自杭州市农贸市场的 137 份海产品中创伤弧菌, 发现 VV2_0075、VV2_0939 和 *vvhA* 基因的检测结果与传统生化鉴定方法一致, 表明新发掘的 VV2_0075 和 VV2_0939 基因在对海产品中创伤弧菌检测时具有很好的稳定性和很强的抗干扰能力。在 137 份海产品中创伤弧菌的检出率为 28.5%, 其中牡蛎的检出率最高(68%), 表明杭州市农贸市场售卖的海产品, 尤其是牡蛎中的创伤弧菌污染现状严重, 应加强对杭州市海产品中创伤弧菌污染状况的监测。

关键词: 创伤弧菌; 比较基因组; 检测靶标; 海产品

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

随着经济飞速发展, 人民生活水平不断提高, 饮食生活更加丰富多彩。作为日常饮食的重要组成部分, 水产品不仅味道鲜美, 而且由于富含优质的蛋白质和不饱和脂肪酸等成分而备受关注。但近年来, 随着生食海鲜人数的增加, 食源性疾病报道也逐渐上升, 其中细菌污染是首要危害因子, 尤其是致病弧菌, 常见的有创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*)^[1-2]。创伤弧菌是一种低度嗜盐性弧菌, 分布于近海或入海口水体、海底沉积物及贝类中; 人在生吃或未经充分加工的海产品, 以及通过皮肤创口接触海水入血均可感染, 并在短时间内出现败血症、蜂窝组织炎、出血性大疱, 70% 以上患者在几天内因多脏器功能衰竭而死亡, 因此创伤弧菌又被称为“海洋中的无声杀手”^[3]。美国在 1981—1992 年间共报道 72 人因生食牡蛎而感染创伤弧菌, 其中 36 人(50%)死亡^[4]; 台湾地区在 1995—2000 年间共有 84 人感染创伤弧菌, 且

感染人数连年呈上升趋势^[5]; 我国 1991 年 1 月—2002 年 10 月期间报道的 19 例感染创伤弧菌患者中死亡人数高达 14 人(73.7%)^[6], 2007 年 6 月报道的 2 例因创伤弧菌感染引起的败血症患者, 在 3~4 d 内均出现腹腔内广泛性坏死、多器官功能衰竭而死亡^[7]。因此, 严格检验水产品中的创伤弧菌, 对改善水产品的卫生状况、提高产品质量、保证消费者健康有着重要意义。

创伤弧菌检测方法主要有微生物学检验法、免疫学法和 PCR 法。微生物学检验需要较长的检测时间和繁琐复杂的操作步骤, 无法满足大量样本快速筛选的要求; 免疫学检验虽已具备成熟的操作步骤, 但当出现新的血清型时, 可能会出现漏检的现象; PCR 法能够快速、准确地检测出水产品中的致病菌, 已成为检验检疫部门最常用的检测方法之一^[1,8-9]。使用 PCR 技术检测创伤弧菌的过程中, 多数检测机构和研究者仍沿用早期

收稿日期: 2012-10-23 修回日期: 2013-01-04

资助项目: “十二五”国家支撑计划项目(2012BAD29B06); 浙江省自然科学基金(LQ12C20005); 浙江省教育厅科研项目(Y201119805); 浙江工商大学引进人才科研启动项目(1110XJ2010082)

通信作者: 励建荣, E-mail: lijr6491@yahoo.com.cn

发现的基因作为检测靶点,如 16S rDNA 和 *vvhA* 基因。但创伤弧菌 16S rDNA 序列高度保守,其核酸序列与 *V. navarrensis* 的一致性高达 96%,与 33 株其它弧菌的核酸相似性也达到 90% 以上^[10],因此不宜用 16S rDNA 基因作为创伤弧菌检测的靶标基因;由 *V. vulnificus* hemolysin A (*vvhA*) 基因编码产生一种细胞外蛋白——溶细胞素 (cytolysin), 这是创伤弧菌的重要致病因子之一,因此以 *vvhA* 为靶基因所检出的均为致病创伤弧菌^[11-12],但 Wright 等^[13]发现 *vvhA* 基因突变株仍具有与野生型相同的致病能力,这说明仅以 *vvhA* 基因作为创伤弧菌检测的靶点是不够的,并且以 *vvhA* 为靶点在检测中会受到其它弧菌的干

扰^[14]。所以,寻找一批具有特异性强、灵敏度高及抗干扰能力强的创伤弧菌检测靶标基因已迫在眉睫。研究旨在利用比较基因组学技术筛选出一批创伤弧菌物种特异性的检测靶标基因,进而使用 PCR 技术挑选出具有特异性强、灵敏度高及抗干扰能力好的检测靶标基因,为水产品中创伤弧菌检测及安全控制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验菌株 研究使用菌株共 15 株,其中 1 株为创伤弧菌,5 株为其它弧菌种,9 株为非弧菌种(表 1)。

表 1 实验菌株列表
Tab.1 List of bacterial strains

| 菌株名称 bacterial species | 株系 strains | 来源 source |
|---|---------------|---|
| 创伤弧菌 <i>Vibrio vulnificus</i> | MCCC 1H00066 | 中国海洋微生物菌种保藏管理中心 Marine Culture Collection of China |
| 副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> | ATCC 17802 | 中国普通微生物菌种保藏管理中心 China General Microbiological Culture Collection Center |
| 拟态弧菌 <i>V. mimicus</i> | isolate | 实验室分离株 ^[15] isolate from our lab |
| 河弧菌 <i>V. fluvialis</i> | isolate | 实验室分离株 ^[15] isolate from our lab |
| 溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i> | isolate | 实验室分离株 ^[15] isolate from our lab |
| 弗尼斯弧菌 <i>V. furnissii</i> | ATCC 33841 | 赵广英教授惠赠(浙江工商大学) obtained from professor Zhao G Y (Zhejiang Gongshang University) |
| 甲型副伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella paratyphi A</i> | CMCC 50093 | 中国医学细菌保藏管理中心 National Center for Medical Culture Collections |
| 鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i> | isolate | 实验室分离株 ^[15] isolate from our lab |
| 福氏志贺氏菌 <i>Shigella flexneri</i> | ATCC 12022 | 中国普通微生物菌种保藏管理中心 China General Microbiological Culture Collection Center |
| 痢疾志贺氏菌 <i>Shigella dysenteriae</i> | isolate | 实验室分离株 ^[15] isolate from our lab |
| 金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 | 中国普通微生物菌种保藏管理中心 China General Microbiological Culture Collection Center |
| 柠檬色葡萄球菌 <i>Staphylococcus citreus</i> | isolate | 实验室分离株 ^[15] isolate from our lab |
| 阪崎肠杆菌 <i>Enterobacter sakazakii</i> | isolate | 实验室分离株 ^[15] isolate from our lab |
| 肠侵袭性大肠埃氏杆菌 enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> | isolate | 实验室分离株 ^[15] isolate from our lab |
| 大肠杆菌 O157 <i>Escherichia coli</i> O157 | isolate | 实验室分离株 ^[15] isolate from our lab |

实验水产品 鱼类、贝类、甲壳类等水产品 在 2011 年 5 月至 2012 年 7 月购自浙江省杭州市多个农贸市场(翠苑农副产品市场、三墩第一农贸市场、拱宸桥农贸市场、西文农贸市场、半山综合市场、笕桥农副产品综合市场、西兴农副产品综合市场、近江水产农副产品综合市场、下沙农副产品综合市场、彭埠农副产品综合市场、闸弄口农

副产品综合市场、古荡农贸市场、东山农贸市场、骆家庄农贸市场、松木场农副产品综合市场、荷花苑农贸市场、文二街农副产品综合市场、文三路农贸市场、万寿亭农贸市场),同一时间同一摊位购买的同一种水产品计为 1 份样品数,共 137 份样品。

基因组数据 已完成全基因组测序的弧菌

<http://www.scxuebao.cn>

基因组数据从 GenBank 数据库的 FTP(ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria/) 下载,包括 3 株创伤弧菌 (*V. vulnificus* CMCP6、*V. vulnificus* MO6-24/O、*V. vulnificus* YJ016) 的基因组和 14 株其它弧菌 (*V. anguillarum* 775, *V. cholerae* M66, *V. cholerae* MJ-1236, *V. cholerae* O1 str. 2010EL-1786, *V. cholerae* O1 biovar El Tor str. N16961, *V. cholerae* O395, *V. EJY3*, *V. Ex25*, *V. fischeri* ES114, *V. fischeri* MJ11, *V. furnissii* NCTC 11218, *V. harveyi* ATCC BAA-1116, *V. parahaemolyticus* RIMD2210633, *V. splendidus* LGP32) 的基因组。

实验试剂 Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa Ex) 购于大连宝生物工程有限公司,所有培养基及生化鉴定管购于青岛高科园海博生物技术有限公司,琼脂糖、Biospin 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、Biospin PCR 产物纯化试剂盒、DNA Marker 购于杭州昊天生物科技有限公司;PCR 引物合成和 PCR 产物测序服务由金思特科技(南京)有限公司提供。

实验仪器 基因组比对分析由 ThinkPad 笔记本电脑完成 (Windows XP 中文家庭版, CPU: Intel 酷睿双核 1.66 GHz, 内存: 2 G, 硬盘: 320 G), 微量移液器、PCR 扩增仪购于 Eppendorf 公司, Milli-Q 超纯水仪购于 Millipore 公司, 凝胶成像系统购于 Bio-Rad 公司, E-spect 微量紫外可

见荧光分光光度计购于 Malcom 公司。

1.2 实验方法

创伤弧菌物种特异性基因的筛选 将 GenBank 数据库中下载的 17 株弧菌基因组进行组合, 建立本地 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 数据库, 并采用 Perl 语言建立一个批处理程序。将创伤弧菌的 3 个株系 (*V. vulnificus* CMCP6、*V. vulnificus* MO6-24/O、*V. vulnificus* YJ016) 的全基因组预测基因序列分别与 14 个其它弧菌的全基因组预测基因序列进行 Blastn 比对分析, 筛选条件: $E \geq 0.001$, 同时核酸序列长度 ≥ 300 nt。为进一步提高筛选出的核酸序列特异性, 将粗筛得到的核酸序列放到 GenBank 数据库中再次逐个进行 Blastn 比对分析, 筛选条件: $E \geq 0.001$ 。

靶标基因的特异性和灵敏度验证 所有弧菌接种于 3% 氯化钠碱性蛋白胨水 (APW) 中, 非弧菌接种于营养肉汤中, 在合适条件下振荡培养过夜, 然后提取细菌基因组 DNA, 荧光分光光度计测定其浓度。从筛选出来的创伤弧菌物种特异性靶标基因中选取 3 个基因 (VV1_2692、VV2_0075 和 VV2_0939), 采用 PCR 技术验证它们的特异性和灵敏度。利用 Primer premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计这 3 个基因的引物序列, 引物名称分别对应为 12692、20075 和 20939 (表 2)。

表 2 PCR 扩增所使用的引物

Tab. 2 Primer sequences used for PCR amplification

| 引物名称 primer name | 正向引物序列 (5'-3') forward primer sequence | 反向引物序列 (5'-3') reversed primer sequence | 退火温度/°C T_m | 产物大小/bp product size |
|---------------------|---|--|------------------|-------------------------|
| 12692 | AAACCAGGATGCGTGTAAGG | GCCAATGCCTTCTCCATAA | 56 | 151 |
| 20075 | GTTACAACGTAGCGCGTGAA | AGCGCATCTTCAATGTTGTG | 56 | 205 |
| 20939 | CTTGTAAGCTGCTCCAACC | TAACGCGATGAAGCTGCTGAC | 56 | 275 |

靶标基因特异性的验证如下: 以提取的 15 株细菌基因组 DNA 为模板, 用表 2 中的引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 25 μ L 10 \times buffer, 0.5 μ L 10 mmol/L dNTP, 0.32 μ mol/L 引物, 1 unit Taq 酶, 1 μ L 基因组 DNA, 最后添加超纯水至 25 μ L; PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 中间 35 个循环为 94 $^{\circ}$ C 20 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 最后在 72 $^{\circ}$ C 条件下延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 随后进行回收纯化并测序。

靶标基因灵敏度的验证与本实验室之前试验

方式一致^[15], 将创伤弧菌 MCCC 1H00066 用无菌生理盐水从 10^6 cfu/mL 到 10^0 cfu/mL 进行 10 倍浓度梯度稀释。各浓度菌液取 1 mL, 采用试剂盒提取基因组 DNA, 并以此为模板, 用表 2 中的引物进行 PCR 扩增, 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

水产品中创伤弧菌的分离和生化鉴定 水产品中创伤弧菌的分离和鉴定主要依据我国的国家标准 (GB/T 4789.7 - 2008)^[16]、陈艳等^[17]以及马爱敏等^[18]的研究方法。无菌条件下对 137 份水产品进行取样, 鱼类取表面组织和肠、腮, 贝

类取内容物,甲壳类取中心部分和肠、鳃,样品重量均为 25 g,随后加入 APW 225 mL,均质 2 min 后得到的悬浊液转移至灭菌锥形瓶内,37 °C 摇床内增菌 8 ~ 16 h,增菌液划线于改良纤维二糖-多粘菌素 B-多粘菌素 E(mCPC)琼脂,经 39 ~ 40 °C

培养 18 ~ 24 h 后,每块平板各挑取呈圆形、扁平、中心不透明、边缘透明、直径 1 ~ 2 mm 的黄色菌落 3 个,划线于 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆(TSA)琼脂平板上,经 37 °C 培养 20 ~ 4 h 后,进行多项生化试验鉴定创伤弧菌(表 3)。

表 3 创伤弧菌的生化鉴定条件
Tab. 3 Biochemical-identification of *V. vulnificus*

| | 溶藻 弧菌 <i>V.</i> <i>alginoliticus</i> | 霍乱 弧菌 <i>V.</i> <i>cholerae</i> | 河弧菌 <i>V.</i> <i>fluvialis</i> | 弗氏 弧菌 <i>V.</i> <i>furnissii</i> | 霍利斯 弧菌 <i>V.</i> <i>hollisae</i> | 梅氏 弧菌 <i>V.</i> <i>metschnikovii</i> | 拟态弧菌 <i>V.</i> <i>mimicus</i> | 副溶血 性弧菌 <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i> | 创伤 弧菌 <i>V.</i> <i>vulnificus</i> |
|---|---|--|--------------------------------------|---|---|---|-------------------------------------|--|--|
| 3% NaCl 氧化酶 3% NaCl oxidase | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| 3% NaCl 赖氨酸脱羧酶 3% NaCl lysine decarboxylase | + | + | - | - | - | + | + | + | + |
| 3% NaCl 精氨酸脱羧酶 3% NaCl arginine decarboxylase | - | - | + | + | - | + | - | - | - |
| 3% NaCl 鸟氨酸脱羧酶 3% NaCl ornithine decarboxylase | + | + | - | - | - | - | + | + | + |
| 嗜盐性实验 0% NaCl growth in 0% NaCl | - | + | - | - | - | - | + | - | - |
| 嗜盐性实验 3% NaCl growth in 3% NaCl | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 嗜盐性实验 6% NaCl growth in 6% NaCl | + | - | + | + | + | + | - | + | + |
| 嗜盐性实验 10% NaCl growth in 10% NaCl | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3% NaCl 蔗糖 3% NaCl sucrose | + | + | + | + | - | + | - | - | - |
| 3% NaCl 乳糖 3% NaCl lactose | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 3% NaCl 阿拉伯糖 3% NaCl arabinose | - | - | + | + | + | - | - | + | - |
| 3% NaCl ONPG | - | + | + | + | - | + | + | - | + |

水产品中创伤弧菌的 PCR 鉴定 137 份水产品产品在 APW 中增菌 8 ~ 16 h 后,取上清液 4 mL 提取细菌基因组 DNA。采用表 2 中的引物和 *vvhA* 基因的引物^[11] 分别进行 PCR 扩增,扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,随后进行回收纯化并测序。

2 结果

2.1 比较基因组学方法筛选出创伤弧菌内的物种特异性基因

3 个创伤弧菌株系各自拥有的物种特异性靶

标基因结果如图 1 所示。*V. vulnificus* CMCP6、*V. vulnificus* MO6-24/O、*V. vulnificus* YJ016 各自有 169,129,178 个物种特异性基因,这些基因在其它弧菌和非弧菌物种内是不存在的(来源于 GenBank 数据库,更新至 2011 年 10 月 17 日),可作为潜在的检测靶标基因。根据基因在不同株系之间的相似程度(核酸一致性 $\geq 90\%$),发现同源基因仅在 *V. vulnificus* CMCP6 和 *V. vulnificus* MO6-24/O 这两个株系间共有的为 18 个,仅在 *V. vulnificus* CMCP6 和 *V. vulnificus* YJ016 这两个株系间共有的为 8 个,仅在 *V. vulnificus* MO6-24/

O 和 *V. vulnificus* YJ016 这两个株系间共有的为 6 个,而在 *V. vulnificus* CMCP6、*V. vulnificus* MO6-24/O、*V. vulnificus* YJ016 这 3 个株系间共有的为 34 个(表 4 和图 1)。我们推测在 3 个株系间共有

的 34 个创伤弧菌物种特异性基因可能在其它的创伤弧菌株系中也有分布,因此,选取这 34 个基因作为创伤弧菌检测靶标的候选基因。

表 4 创伤弧菌 3 个株系 *V. vulnificus* CMCP6、*V. vulnificus* MO6-24/O、*V. vulnificus* YJ016 内共有的物种特异性基因

Tab. 4 The shared *V. vulnificus*-specific genes within *V. vulnificus* CMCP6, *V. vulnificus* MO6-24/O, and *V. vulnificus* YJ016 strains

| 基因名称 gene name | | | 注释结果 annotation |
|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|--|
| <i>V. vulnificus</i> CMCP6 | <i>V. vulnificus</i> MO6-24/O | <i>V. vulnificus</i> YJ016 | |
| VV1_2207 | VVM_02116 | VV2166 | hypothetical protein |
| VV1_2329 | VVM_02384 | VV2012 | hypothetical protein |
| VV1_2332 | VVM_02387 | VV2009 | hypothetical protein |
| VV1_2338 | VVM_02398 | VV2002 | hypothetical protein |
| VV1_2339 | VVM_02399 | VV2001 | hypothetical protein |
| VV1_2347 | VVM_02415 | VV1992 | hypothetical protein |
| VV1_2555 | VVM_02816 | VV1736 | hypothetical protein |
| VV1_2557 | VVM_02819 | VV1733 | hypothetical protein |
| VV1_2558 | VVM_02821 | VV1732 | hypothetical protein |
| VV1_2692 | VVM_03186 | VV1598 | DNA-binding HTH domain-containing protein |
| VV1_2891 | VVM_03418 | VV1378 | hypothetical protein |
| VV1_3242 | VVM_02645 | VV1791 | hypothetical protein |
| VV2_0026 | VVM_01022 | VVA0533 | hypothetical protein |
| VV2_0033 | VVM_01036 | VVA0540 | hypothetical protein |
| VV2_0075 | VVM_01105 | VVA0582 | anti-sigma regulatory factor |
| VV2_0244 | VVM_01537 | VVA0749 | hypothetical protein |
| VV2_0611 | VVM_02216 | VVA1164 | hypothetical protein |
| VV2_0822 | VVM_02456 | VVA1288 | hypothetical protein |
| VV2_0857 | VVM_02534 | VVA1328 | hypothetical protein |
| VV2_0897 | VVM_02675 | VVA1371 | hypothetical protein |
| VV2_0902 | VVM_02682 | VVA1375 | hypothetical protein |
| VV2_0939 | VVM_02814 | VVA1428 | ABC-type branched-chain amino acid transport system, periplasmic component |
| VV2_0951 | VVM_02833 | VVA1440 | hypothetical protein |
| VV2_0972 | VVM_02870 | VVA1463 | hypothetical protein |
| VV2_0988 | VVM_02906 | VVA1480 | hypothetical protein |
| VV2_1035 | VVM_02997 | VVA1531 | hypothetical protein |
| VV2_1298 | VVM_00271 | VVA0139 | hypothetical protein |
| VV2_1300 | VVM_00275 | VVA0140 | hypothetical protein |
| VV2_1312 | VVM_00294 | VVA0150 | hypothetical protein |
| VV2_1340 | VVM_00350 | VVA0179 | hypothetical protein |
| VV2_1371 | VVM_00397 | VVA0209 | hypothetical protein |
| VV2_1389 | VVM_00429 | VVA0225 | hypothetical protein |
| VV2_1626 | VVM_00847 | VVA0438 | hypothetical protein |
| VV2_1694 | VVM_02841 | VVA1443 | hypothetical protein |

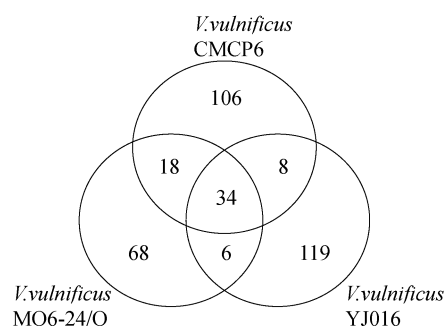


图 1 创伤弧菌物种特异性基因在 3 个株系内的分布

Fig. 1 Venn diagrams indicate the number of shared and unique *V. vulnificus*-specific genes within three strains

在这 34 个候选靶标基因中,有 3 个基因已有功能注释,它们在 *V. vulnificus* CMCP6 株系中的命名分别为 VV1_2692、VV2_0075 和 VV2_0939。VV1_2692 基因注释为编码含有螺旋-转角-螺旋结构域的 DNA 结合蛋白(DNA-binding HTH domain-containing protein),该蛋白在原核和真核生物中均有分布,在胞内经由激酶活化后,主要在基因转录过程中起调节作用^[19]; VV2_0075 基因注释为编码 anti-sigma regulatory factor 的蛋白,该蛋白广泛分布于真细菌内,参与细菌生长、孢子形成、压力响应、鞭毛发育、离子转运等一系列生命活动^[20]; VV2_0939 基因注释为编码腺苷三磷酸结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC),该蛋白从低等生物的细菌到高等生物的人体内都有分布,是一种非常重要的膜转运蛋白,它能利用水解 ATP 产生的能量将结合底物进行跨膜转运,包括蛋白质、多肽、氨基酸、糖、金属离子、细胞代谢产物、药物等^[21]。我们选取这 3 个已有注释的基因作为代表性的靶标基因,采用常规 PCR 来验证它们的特异性、灵敏度、以及海产品中创伤弧菌的检测。

2.2 创伤弧菌物种特异性基因具有良好的特异性和灵敏度

以 1 株创伤弧菌和 14 株非创伤弧菌(表 1)的基因组 DNA 为模板,采用 PCR 技术验证筛选出的候选基因的特异性。VV1_2692、VV2_0075 以及 VV2_0939 这 3 个基因作为 PCR 扩增的检测靶标时,仅创伤弧菌基因组 DNA 扩增出目的条带(图 2);对上述 3 个基因的 PCR 扩增产物进行回收纯化并测序,所得核酸序列在 GenBank 中进行 Blastn 比对分析显示为创伤弧菌,这表明本文

筛选出的 3 个创伤弧菌基因及其引物作为 PCR 检测时具有良好的特异性。

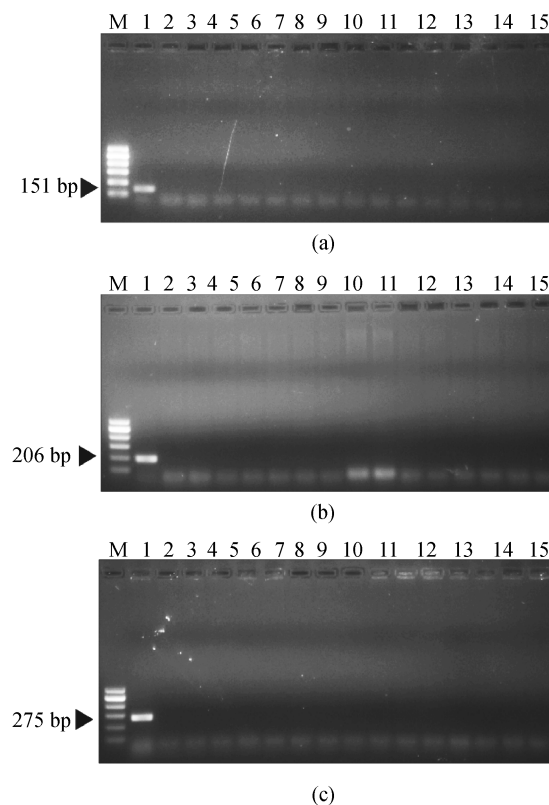


图 2 PCR 检测靶标基因的特异性电泳图

(a) VV1_2692 基因的特异性; (b) VV2_0075 基因的特异性; (c) VV2_0939 基因的特异性。

M. Bio Marker I; 1. 创伤弧菌; 2. 副溶血性弧菌; 3. 拟态弧菌; 4. 河弧菌; 5. 溶藻弧菌; 6. 弗尼斯弧菌; 7. 甲型副伤寒沙门氏菌; 8. 鼠伤寒沙门氏菌; 9. 福氏志贺氏菌; 10. 痢疾志贺氏菌; 11. 金黄色葡萄球菌; 12. 柠檬色葡萄球菌; 13. 阪崎肠杆菌; 14. 肠侵袭性大肠埃氏杆菌; 15. 大肠杆菌 O157。

Fig. 2 Evaluating the specificity of VV1_2692, VV2_0075, and VV2_0939

(a), (b), (c) show agarose gel electrophoresis of *V. vulnificus*-specific PCR products amplified using primers of VV1_2692, VV2_0075, and VV2_0939, respectively.

M. Bio Marker I; lane 1. *Vibrio vulnificus*; lane 2. *Vibrio parahaemolyticus*; lane 3. *Vibrio mimicus*; lane 4. *Vibrio fluvialis*; lane 5. *Vibrio alginolyticus*; lane 6. *Vibrio furnissii*; lane 7. *Salmonella paratyphi* A; lane 8. *Salmonella typhimurium*; lane 9. *Shigella flexneri*; lane 10. *Shigella dysenteriae*; lane 11. *Staphylococcus aureus*; lane 12. *Staphylococcus citreus*; lane 13. *Enterobacter sakazakii*; lane 14. enteroinvasive *Escherichia coli*; lane 15. *Escherichia coli* O157.

将一系列浓度梯度的创伤弧菌菌悬液提取基因组 DNA,并以此为模板进行常规 PCR 扩增,发

现 VV1_2692、VV2_0075 和 VV2_0939 基因所设计引物的最低检测限分别为 10^3 、 10^1 和 10^2 cfu/mL (图 3), 表明这 3 个创伤弧菌基因所设计引物用于 PCR 检测时具有较高的灵敏度。

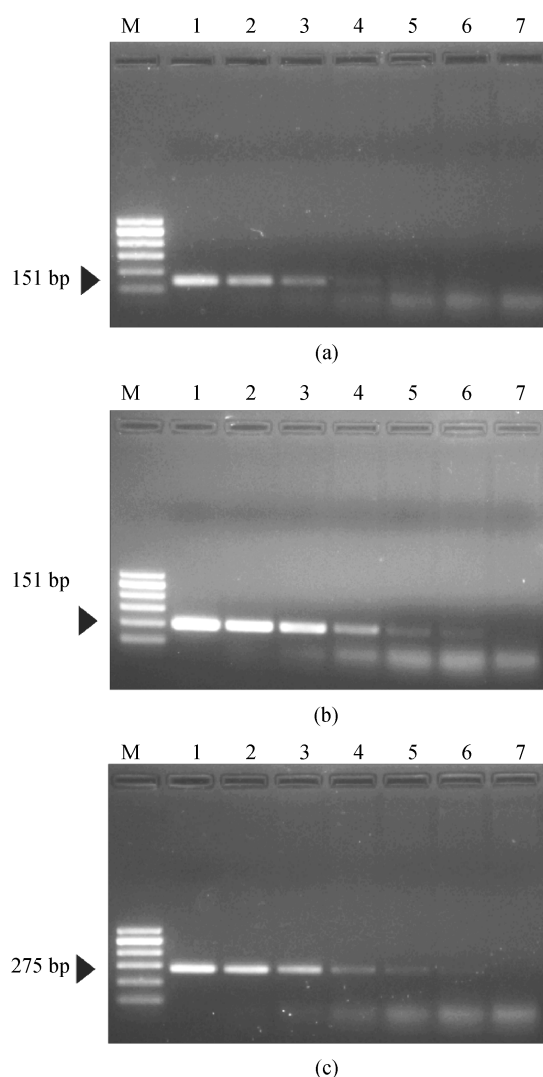


图 3 PCR 检测靶标基因的灵敏度电泳图

(a) VV1_2692 基因的灵敏度; (b) VV2_0075 基因的灵敏度; (c) VV2_0939 基因的灵敏度。

M. Bio Marker I; 1-7 表示创伤弧菌的菌液浓度从 10^6 cfu/mL 到 10^0 cfu/mL。

Fig. 3 Evaluating the sensitivity of VV1_2692, VV2_0075, and VV2_0939

(a), (b), (c) show agarose gel electrophoresis of PCR products amplified using primers of VV1_2692, VV2_0075, and VV2_0939, respectively.

M. Bio Marker I; lane 1 to lane 7 indicate the bacterial concentration of *V. vulnificus* from 10^6 cfu/mL to 10^0 cfu/mL.

2.3 水产品中创伤弧菌的检测

采用传统生化法和基于检测靶标基因的

PCR 法分别对杭州市多个农贸市场的 137 份海产品中创伤弧菌进行检测, 其中传统生化法分离并鉴定得到 39 株创伤弧菌, 而基于 VV1_2692、VV2_0075、VV2_0939 和 *vvhA* 这 4 个检测靶标基因的 PCR 检测法分别鉴定得到 38、39、39 和 39 株创伤弧菌(表 5)。

3 讨论

创伤弧菌是藉由海产品引起消费者死亡的重要原因, 因此快速灵敏的鉴定方法对于提高水产品质量和保障人类健康显得尤为重要。传统生化培养在鉴定过程中需要反复增菌、分离单菌落、多项生化指标检测等步骤, 在本研究中一个人一般要 7~10 d 才能完成一组样品(约 20 份海产品)的鉴定工作, 因此高昂的成本和冗长的周期限制了传统生化培养在大批量样品检测中的应用。已知 PCR 技术是检测许多致病菌的重要手段, 具有快速、高通量、高灵敏度、可重复性、稳定性等诸多优点^[8]。在本研究中, 一个人用常规 PCR 技术在 1~2 d 内即可完成一组样品的鉴定工作, 因此 PCR 技术在检测海产品中创伤弧菌时同样具有显著的快速鉴定优势。

但是, 目前 PCR 技术在检测创伤弧菌过程中通常选取细菌的保守序列(16S rDNA 和 *gyrB* 基因)^[22] 或与致病性相关的基因(*vvhA* 基因)^[11], 使用的靶标基因数量较少, 易影响检测结果的特异性和灵敏度, 降低了检测结果的可信度, 因此亟待发掘更多用于创伤弧菌检测的靶标基因。基因组学的研究拓展了生命科学的研究领域, 同时也为致病菌检测中靶标基因的发掘和筛选提供了新的思路和方法。随着基因组测序技术和生物信息学的发展, 许多细菌的全基因组测序工作已经完成, 截至 2011 年 6 月 7 日, 在 GenBank 数据库中共收录 1 379 种细菌的全基因组序列, 其中弧菌属有 13 种, 并且 3 个创伤弧菌的株系已有全基因组的注释, 这为创伤弧菌内新靶标基因的发掘提供了丰富的信息资源^[23]。最近, 基于比较基因组的分析和 PCR 验证来协同发掘细菌新靶标的工作在部分致病菌中已经展开, 如单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)^[24-26]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[27]、沙门氏菌属的 *Salmonella serovars*^[28] 和 *S. enterica*^[29-30] 以及副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus*)^[31-32] 等, 因

表 5 137 份海产品中创伤弧菌的传统生化鉴定法和 PCR 法结果
 Tab. 5 Comparison between biochemistry and PCR assay to identify *V. vulnificus* in 137 seafood samples

| 海产品类别 seafood samples | 样品数 no. of samples | 生化鉴定法阳性结果 positive results using biochemistry | PCR 法阳性结果 positive results using PCR assay | | | |
|---------------------------------------|-----------------------|---|---|----------|----------|------|
| | | | VV1_2692 | VV2_0075 | VV2_0939 | vvhA |
| 大黄鱼 <i>Pseudosciaena crocea</i> | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 小黄鱼 <i>Pseudosciaena polyactis</i> | 6 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 带鱼 <i>Trichiurus haumela</i> | 6 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 鲳鱼 <i>Trachinotus ovatus</i> | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i> | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i> | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 贻贝 <i>Mytilus edulis</i> | 11 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 文蛤 <i>Meretrix meretrix</i> | 11 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 缢蛏 <i>Sinonovaula constricta</i> | 25 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 毛蚶 <i>Scapharca subcrenata</i> | 25 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| 牡蛎 <i>Concha ostreae</i> | 25 | 17 | 16 | 17 | 17 | 17 |
| 合计 total | 137 | 39 | 38 | 39 | 39 | 39 |

此,从全基因组水平进行核酸序列的比对分析来发掘创伤弧菌内检测靶标基因的思路是可行的。

本文采用比较基因组的方法,将 3 个创伤弧菌株系的全基因组核酸序列分别与 GenBank 中已收集的核酸序列进行 Blastn 比对,阈值设为: $E \geq 0.001$,在该条件下筛选得到的序列几乎不可能在 GenBank 中找到同源序列^[33],因此我们认为筛选得到的核苷酸是创伤弧菌的物种特有序列。从 3 株创伤弧菌 *V. vulnificus* CMCP6、*V. vulnificus* MO6-24/O 和 *V. vulnificus* YJ016 中分别筛选出 169、129 和 178 个物种特异性基因,其中 34 个是这 3 个株系共有的(图 1,表 4),这可能是创伤弧菌内广泛分布的物种特异性靶标基因。常规 PCR 法对其中已有注释的 3 个潜在靶标基因(VV1_2692、VV2_0075 和 VV2_0939)的特异性进行验证,发现这 3 个基因均只对创伤弧菌特异(图 2),这表明本研究所发掘的物种特异性靶标基因在检测创伤弧菌时具有非常高的特异性。同时,发掘的靶标基因还具有优异的灵敏度,在用常规 PCR 技术检测创伤弧菌时它们的检测限达到 $10^1 \sim 10^3$ cfu/mL(图 3),其中 VV2_0075 基因具有最低的检测限,菌浓度为 10^1 cfu/mL 即能检测到(DNA 总量约为 7.3 pg),这低于目前已报道传统靶标基因的最低检测限,如 *vvhA* 基因(72 pg)^[34]、*rpoS* 基因(10 pg)^[35] 以及 *cth* 基因(40 cfu/mL)^[36] 等。此外,在实际样品检测过程中,VV2_0075 和 VV2_0939 基因的检出率与传统生化鉴定方法一致(表 5),表明 VV2_0075 和 VV2_

0939 基因在对海产品中创伤弧菌检测时具有很好的稳定性和很强的抗干扰能力。因此,本研究所发掘的物种特异性靶标基因在使用常规 PCR 技术检测海产品中的创伤弧菌时,它们不仅克服了传统生化培养鉴定过程耗时、费力的难点,同时其更佳的灵敏度提升了传统靶标基因的检测限,而且在实际样品检测中优异的稳定性和抗干扰能力为今后检验检疫部门检测方法的更新提供参考。

本研究中水产品创伤弧菌的检出率为 28.5% (39/137),其中牡蛎的检出率更是高达 68%。陈艳等^[17]对东南沿海地区的 101 份海产品进行检测,创伤弧菌的检出率为 19.8%,其中 55% 的牡蛎样品中创伤弧菌的污染菌量 ≥ 3 MPN(最可能数)/g,高于 FAO/WHO 推荐的风险指数;朱海明等^[37]发现广东省 69 份水产品中的创伤弧菌检出率为 53.62%,其中牡蛎中的检出率更是高达 80.95% (34/42)。这些研究结果表明我国沿海地区的海产品,尤其是牡蛎中的创伤弧菌污染现状严重,应加强对我国海产品中创伤弧菌污染状况的监测,这对预防食源性疾病的暴发和增强公共卫生部门应对公共卫生突发事件的能力具有重要意义。

参考文献:

- [1] Newell D G, Koopmans M, Verhoef L, et al. Foodborne diseases-the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011,

- 145(2-3):493.
- [2] 庞璐,张哲,徐进. 2006—2010年我国食源性疾病暴发简介[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 139(Suppl.):3-15.
- [3] Strom M S, Paranjpye R N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus* [J]. Microbes and Infection, 2000, 2(2):177-188.
- [4] Hlady W G, Mullen R C, Hopkin R S. *Vibrio vulnificus* from raw oysters. Leading cause of reported deaths from foodborne illness in Florida [J]. The Journal of the Florida Medical Association, 1993, 80(8):536-538.
- [5] Hsueh P R, Lin C Y, Tang H J, et al. *Vibrio vulnificus* in Taiwan [J]. Emerging Infectious Diseases, 2004, 10(8):1363-1368.
- [6] 高仲雷. 原发性创伤弧菌败血症 19 例分析[J]. 浙江临床医学, 2004, 6(2):135-136.
- [7] 吴晓燕,倪侃翔,毕平安,等. 创伤弧菌所致败血症的报道[J]. 检验医学, 2007, 22(4):424,428.
- [8] Fajardo V, González I, Rojas M, et al. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species [J]. Trends in Food Science & Technology, 2010, 21(8):408-421.
- [9] 陈艳,付萍. 创伤弧菌检测方法的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2008, 35(2):91-96.
- [10] Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Ohwada K. 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family Vibrionaceae [J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 152(1):125-132.
- [11] Hill W E, Keasler S P, Trucksess M W, et al. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(3):707-711.
- [12] 何闪闪,薛长湖,李兆杰,等. 水产品中创伤弧菌的快速检测与分离[J]. 中国食品学报, 2005, 5(3):86-90.
- [13] Wright A C, Morris Jr J G. The extracellular cytotoxin of *Vibrio vulnificus*: inactivation and relationship to virulence in mice [J]. Infection and Immunity, 1991, 59(1):192-197.
- [14] Panicker G, Bej A K. Real-time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: comparison of oligonucleotide primers and probes targeting *vwfA* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(10):5702-5709.
- [15] 翁思聪,朱军莉,励建荣. 水产品中四种常见致病菌多重 PCR 检测方法的建立及评价[J]. 水产学报, 2011, 35(2):127-136.
- [16] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 7-2008. 食品卫生微生物学检验——副溶血性弧菌检验[S]. 北京:中国标准出版社, 2008.
- [17] 陈艳,梅玲玲,李秀桂,等. 东南沿海地区零售海产品中创伤弧菌的监测[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(4):344-347.
- [18] 马爱敏,闫茂仓,常维山,等. 黄姑鱼创伤弧菌的分离和鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(10):960-964.
- [19] Aravind L, Koonin E V. DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(23):4658-4670.
- [20] Hughes K T, Mathee K. The anti-sigma factors [J]. Annual Review of Microbiology, 1998, 52:231-286.
- [21] Hollenstein K, Dawson R J, Locher K P. Structure and mechanism of ABC transporter proteins [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2007, 17(4):412-418.
- [22] Kumar H S, Parvathi A, Karunasagar I. A *gyrB*-based PCR for the detection of *Vibrio vulnificus* and its application for direct detection of this pathogen in oyster enrichment broths [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 111(3):216-220.
- [23] Chen C Y, Wu K M, Chang Y C, et al. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen [J]. Genome Research, 2003, 13(12):2577-2587.
- [24] Liu D, Ainsworth A J, Austin F W, et al. Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of *Listeria monocytogenes* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91(3):297-304.
- [25] Zhang D D, Zhang L D, Wang D P, et al. A PCR method for the detection of *Listeria monocytogenes* based on a novel target sequence identified by comparative genomic analysis [J]. Journal of Food Safety, 2010, 30(4):832-847.
- [26] 韩斌,刘战民,高海燕,等. 单核细胞增生李斯特菌分子检测标记的数据挖掘[J]. 食品科学, 2009, 30(4):197-200.
- [27] Liu Z M, Shi X M, Pan F. Species-specific diagnostic marker for rapid identification of *Staphylococcus aureus* [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious

- Disease, 2007, 59(4):379-382.
- [28] Kim H J, Park S H, Lee T H, *et al.* Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using specific PCR primers obtained by comparative genomics in *Salmonella* serovars [J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(7):1653-1661.
- [29] Nagarajan A G, Karnam G, Lahiri A, *et al.* Reliable means of diagnosis and serovar determination of blood-borne *Salmonella* strains: quick PCR amplification of unique genomic loci by novel primer sets [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(8):2435-2441.
- [30] Chen J, Zhang L, Paoli G C, *et al.* A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 137(2-3):168-174.
- [31] Zhu D S, Zhou M N, Fan Y L, *et al.* Identification of new target sequences for PCR detection of *Vibrio parahaemolyticus* by genome comparison [J]. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 2009, 17(1):67-79.
- [32] Yu S J, Chen W Y, Wang D P, *et al.* Species-specific PCR detection of the food-borne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* using the *irgB* gene identified by comparative genomic analysis [J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 307(1):65-71.
- [33] LaGier M J, Threadgill D S. Identification of novel genes in the oral pathogen *Campylobacter rectus* [J]. Oral Microbiology and Immunology, 2008, 23(5):406-412.
- [34] Brauns L A, Hudson M C, Oliver J D. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(9):2651-2655.
- [35] Kim D G, Ahn S H, Kim L H, *et al.* Application of the *rpoS* gene for species-specific detection of *Vibrio vulnificus* by real-time PCR [J]. Journal of Microbiology Biotechnology, 2008, 18(11):1841-1847.
- [36] Wang S S, Levin R E. Quantification of *Vibrio vulnificus* using the polymerase chain reaction [J]. Food Biotechnology, 2005, 19(1):27-35.
- [37] 朱海明, 严纪文, 宋曼丹, 等. 广东省部分海产品中创伤弧菌的污染监测 [J]. 华南预防医学, 2011, 37(4):78-80.

Identification and evaluation of *Vibrio vulnificus*-specific target genes

FENG Lifang¹, CHENG Xingbin¹, HE Shanshan¹, LI Jianrong^{1,2*}

(1. College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China;

2. Liaoning Key Laboratory of Food Safety, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

Abstract: *Vibrio vulnificus* is a marine seafood-borne pathogen that will cause death in susceptible individuals after consumption of raw or uncooked contaminated seafood around the world. So, early detection and identification of *V. vulnificus* strains in food and clinical samples is essential for diagnosis and reducing the incidence of food-borne disease. PCR assay has been one of the most important and extensive method to detect pathogenic bacteria. Previous study depended on *vvhA* as the target gene to detect this bacterium. In this study, we constructed a local BLAST database and identified 34 candidates as *V. vulnificus*-specific target genes distributed in 3 isolates (CMCP6, MO6-24/O, and YJ016) with published completed genome. Among these candidate-specific targets, *VV1_2692*, *VV2_0075*, and *VV2_0939* genes are known for their functions, while the rests encode hypothetical protein of unknown function. To evaluate the specificity of above 3 genes, PCR amplification of genomic DNA from a *V. vulnificus* strain resulted in a product with predicted length, whereas no products were detected from 14 non-*V. vulnificus* bacterial strains. The minimum detectable limits of *VV1_2692*, *VV2_0075*, and *VV2_0939* genes were 10^3 , 10^1 , and 10^2 cfu/mL, respectively. A total of 137 seafood samples (e. g., fish, prawn, crab, shell) from Hangzhou city were detected by both PCR assay and biochemical method. Among them, 39 *V. vulnificus* isolates were detected using biochemical method, while 38, 39, 39, and 39 *V. vulnificus* isolates were detected using PCR assay of *VV1_2692*, *VV2_0075*, *VV2_0939*, and *vvhA* genes, respectively. The negative result of *VV1_2692* probably resulted from its relative high detectable limit, and both *VV2_0075* and *VV2_0939* genes might be suitable species-specific targets to detect *V. vulnificus* in seafood. Moreover, 28.5% of 137 seafood samples contained *V. vulnificus*, and oyster had the highest ratio (68%), suggesting status of *V. vulnificus* pollution was extremely serious in coastal seafood of Hangzhou city, especially oyster.

Key words: *Vibrio vulnificus*; comparative genome; target gene; seafood

Corresponding author: LI Jianrong. E-mail: lijr6491@yahoo.com.cn