

副溶血弧菌 PCR 检测方法研究进展

张德福, 付绪磊, 樊晓琳, 刘雪飞, 汤轶伟, 高 雪, 孙嘉营, 励建荣*

(渤海大学化学化工与食品安全学院, 渤海大学食品科学研究院, 辽宁省食品安全重点实验室, “食品贮藏加工及质量安全控制工程技术研究中心”辽宁省高校重大科技平台, 锦州 121013)

摘 要: 副溶血弧菌是引起包括我国在内的世界各地沿海地区食物中毒的重要食源性致病菌, 患者有典型的肠胃炎症状。及时准确地对食品中的副溶血弧菌进行检测是预防该菌引起的食物中毒的关键。分子生物学检测方法在副溶血弧菌检测中具有许多优势, 现已得到广泛的应用。本文对 PCR 检测方法中的多重 PCR、有扩增内标的 PCR、实时荧光 PCR(包括荧光染料法和荧光探针法)、基于 DNA 染料叠氮溴化乙锭和叠氮溴化丙锭的 PCR、纳米粒子 PCR、免疫捕获 PCR、PCR-变性高效液相色谱、PCR-酶联免疫吸附等方法的国内外研究情况进行了综述, 并对其检测效率、灵敏度、优点和缺点等进行了分析比较, 环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)——包括常规 LAMP 和原位 LAMP 因与 PCR 方法有相似之处, 故一并进行了综述, 为副溶血弧菌 PCR 检测方法的应用与开发提供参考。

关键词: 副溶血弧菌; 聚合酶链式反应; 检测方法; 研究进展; 食品安全

Research progress on polymerase chain reaction detection method for *Vibrio parahaemolyticus*

ZHANG De-Fu, FU Xu-Lei, FAN Xiao-Lin, LIU Xue-Fei, TANG Yi-Wei, GAO Xue,
SUN Jia-Ying, LI Jian-Rong*

(Engineering and Technology Research Center of Food Preservation, Processing and Safety Control of Liaoning Province, Liaoning Provincial Key Laboratory of Food Quality Safety and Functional Food, College of Chemistry, Chemical Engineering and Food Safety, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

ABSTRACT: *Vibrio parahaemolyticus* is a leading cause of foodborne disease in the littoral areas worldwide, including China. The key to prevent foodborne disease caused by *V. parahaemolyticus* is rapid and accurate detection of this bacterium. The molecular biology method is commonly used now for its abundant advantages. The recent research progress both domestic and overseas was summarized in this paper and the detecting efficiency, sensitivity and the relative merits among multiplex PCR, internal amplification control PCR, real-time PCR, ethidium monoazide bromide PCR or propidium monoazide PCR, nanoparticle-based assisted PCR, immunocapture PCR, PCR-denaturing high performance liquid chromatography and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay were also compared and analyzed for the purpose of providing reference for the further re-

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD29B06)、辽宁省食品安全重点实验室开放课题项目(LNSAKF2013018, LNSAKF2011040)、渤海大学博士科研启动项目(BSQD022)

Fund: Supported by National Key Technologies Research and Development Program of China during the “12th Five-Year Plan” (2012BAD29B06), Open Project of Food Safety Key Lab of Liaoning Province (LNSAKF2013018, LNSAKF2011040) and Bohai University Startup Project of Doctor Scientific Research (BSQD022)

*通讯作者: 励建荣, 教授, 博士, 博导, 主要研究方向为水产品 and 果蔬贮藏加工, 食品安全。E-mail: lijr6491@163.com

*Corresponding author: LI Jian-Rong, Professor, Ph. D, Research Institute of Food Science, Bohai University, Jinzhou 121013, China. E-mail: lijr6491@163.com

searches and development. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), including conventional LAMP and *in situ* LAMP, similar to PCR, also is summarized.

KEY WORDS: *Vibrio parahaemolyticus*; polymerase chain reaction (PCR); detection method; research progress; food safety

1 引言

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是弧菌科弧菌属的一种革兰氏阴性菌, 俗称嗜盐菌, 1951 年日本学者 Tsunesaburo Fujino^[1]在食物中毒患者食用的青鱼干中首次分离得到, 此后在世界各地陆续有该菌引起的食物中毒的报道。VP 广泛存在于海洋环境和海产品中, 是一种重要的食源性致病菌。人类食用了 VP 污染的食物会引起恶心、呕吐、腹泻、肠痉挛等典型胃肠炎症状。据我国食源性疾病预防网的数据显示, 在中国由 VP 引发的食物中毒已经高居微生物食源性疾病爆发的首位^[2], 在日本、欧洲和北美地区也多次爆发过 VP 食物中毒事件^[3,4]。因此, 快速而准确的检测方法是预防 VP 感染和保障食品安全的重要手段。

VP 的常规检测方法操作比较繁琐, 包括细菌分离培养、革兰氏染色镜检、生化鉴定、动力试验、血清学分型、溶血及毒力实验等步骤, 完成鉴定工作一般需要 7~10 d, 严重影响了检测鉴定周期。相对于常规方法, PCR 检测方法因操作较简便、结果可靠性好等优点而成为研究的热点。目前研究较多的 PCR 法主要包括多重 PCR(multiplex PCR)、有扩增内标(internal amplification control, IAC)的 PCR、实时荧光 PCR(Real-time PCR)、基于 DNA 染料叠氮溴化乙锭(ethidium monoazide bromide, EMA)和叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)的 PCR、纳米粒子 PCR、免疫捕获 PCR、PCR-变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)、PCR-酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等, 下面对逐一对研究进展情况进行简要综述。因环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)——包括常规 LAMP 和原位 LAMP, 因与 PCR 法有相近之处, 故一并进行综述。

2 LAMP

2.1 常规 LAMP

LAMP 是由 Notomi 等^[5]在 2000 年发明的一种新颖的快速检测方法, 因其具有可定量分析、快速灵敏、操作简便、对实验设备要求较低等优点, 已在流行细菌和病毒的定性定量检测中得到广泛的应用^[6-9]。徐芊等^[10]针对 VP 不耐热溶血毒素基因(*tlh*)设计了 4 条特异的引物, 首次建立

了 VP 的 LAMP 检测方法。实验表明, 该方法对基因组 DNA、纯培养物和模拟食品的检测最低限分别为 90 fg、24 cfu/mL、89 cfu/g, 敏感性明显高于传统培养方法。自此之后, 研究人员分别针对 VP 的 *tdh*、*trh1*、*trh2*、*gyrB*、*rpoD*、*toxR* 等基因建立了 LAMP 检测方法, 结果表明 LAMP 检测方法的灵敏度远高于普通 PCR 检测方法^[11-16]。

2.2 原位 LAMP

原位 LAMP 是由 Maruyama 等^[17]建立的一种将原位 PCR 和普通 LAMP 技术结合起来的一种检测方法。相对于原位 PCR 和普通 LAMP, 原位 LAMP 具有特异性好、敏感度高、不需对细胞进行破碎提取 DNA 或 RNA、能对细胞中的基因进行定位、只使用恒定且较低的温度(63 °C)等优点^[18]。Wang 等^[19]建立了原位 LAMP 方法对食源性 VP 进行快速检测, 敏感性可达到每反应管 10 cfu, 对 48 株阳性菌分别用原位 LAMP、常规 LAMP 和 PCR 进行检测, 检出率分别为 100%、93.8%和 70.8%, 原位 LAMP 方法敏感性高于常规 LAMP 和 PCR。王丽等^[20]针对 *tlh* 的保守区设计引物建立了高特异性和灵敏度的原位荧光恒温核酸扩增方法, 检测限可达到单个细胞的水平, 不仅能够准确地识别混合菌中的 VP, 而且可以利用荧光显微镜观察到单个细胞, 这对研究处于非可培养状态的 VP 具有重要意义。

3 多重 PCR

多重 PCR 是在常规 PCR 基础上加以改进而来的一种 PCR 技术, 是在一个反应体系中加入多对特异引物, 针对单个或多个模板扩增多个目的片段的方法。采用这一技术不仅可以避免检测过程中的假阳性现象, 还可以同时检验多种病原微生物。多重 PCR 这一技术的应用是由 Chamberian^[21]于 1988 年率先提出的, 因其能同时扩增多个目的片段^[22], 具有节省时间、节约样品、降低成本、提高效率等优点, 目前已成为一种成熟而重要的微生物检测手段。Yu^[23]和 No 等^[24]分别根据 *irgB*、*H-NS* 结合 *tdh* 和 *trh* 建立了可以检测总的 VP 及毒力株 VP 的多重 PCR 方法。Wang 等^[25]以 *tlh*、*tdh* 和 *fla* 为靶基因建立了 VP 快速精确的多重 PCR 检测方法, 并把引物固定于基因芯片上, 使生物素标记的 PCR 产物与之杂交, 然后用亲和素标记的碱性磷酸酶与之反应, 检测化学发光。用已知的 VP 毒力株和无毒力株及其他相关弧菌检测结果表明, 该方法能够检测到 VP, 且无非特异性杂交和交叉杂交。Hossain^[26]、

Vinothkumar^[27]和 Bhattacharyya^[28]等建立了多重 PCR 方法,可以同时检测弧菌属的副溶血弧菌、霍乱弧菌、创伤弧菌、河流弧菌等多种弧菌,有的能够区分毒力株和非毒力株。

4 有扩增内标的 PCR

PCR 反应过程中如果出现仪器故障、DNA 聚合酶失活或 PCR 体系中含有 DNA 聚合酶抑制剂等因素就容易导致 PCR 结果出现假阴性。为了防止这种假阴性现象,提高检测结果的准确性,可以向 PCR 反应体系中添加扩增内标。在 PCR 体系中扩增内标与目的序列共同扩增,如果反应体系中存在抑制因素,则目的序列和扩增内标序列的扩增反应都将受到抑制,从而可以达到指示反应假阴性的目的。何晓华等^[29]构建了有扩增内标的 PCR 检测体系,对 296 株 VP 和 33 株非 VP 的检测结果表明,所有以 VP 的 DNA 为模板的扩增产物均有一条 343 bp 的特异片段,而以非 VP 为模板的则只能扩增到一条 499 bp 的扩增内标片段,其检测限可达 1.6×10^2 cfu/mL,能有效地排除假阴性结果。吕淑霞等^[30]以细菌 16S rDNA 片段为扩增内标,以 *tlh* 和 *trh* 为检测基因建立了具有极好特异性的副溶血弧菌多重 PCR 检测体系,该法对纯培养物时 *tlh* 和 *trh* 基因的灵敏度分别为 1.3×10^2 cfu/mL 和 1.3×10^3 cfu/mL,对人工污染样品经 6 h 富集培养后的检测限均能达到 2.6×10^2 cfu/mL。

最大可能数法(Most Probable Number, MPN)是国家标准中推荐的一种定量方法,可以对不可培养的微生物进行计数,但是其耗时比较长,DNA 提取和 PCR 过程中存在的偏差会对结果产生影响。Copin 等^[31]在利用 MPN 法富集培养菌液的基础上根据 *R72H*、*tdh* 和 *trh* 设计引物和扩增内标,建立了冻虾中总 VP 和致病性 VP 的有扩增内标的 MPN-PCR 定量检测方法,该方法的检测最低限可达每克样品 1 个细菌,耗时减少到 2 d。

5 Real-time PCR

Real-time PCR 是在常规 PCR 的反应体系中加入荧光基团,通过荧光信号积累实现对 PCR 反应的实时监控。Kang 等^[32]建立了两步法超快实时 PCR 结合微芯片的 VP 快速检测方法,该方法反应体系为 6 μ L,每个循环不多于 10 s,经过 35 个循环,不到 6 min 即可完成检测,检测最低限为 100 fg,相当于 18 拷贝的基因组 DNA。Liu 等^[33]根据新的特异性靶基因设计引物和竞争性扩增内标建立了 VP 的实时荧光 PCR 检测方法。通过对 390 株细菌的检测发现该方法的灵敏度达到每反应管 4.8 fg 纯化的基因组 DNA,即使有大量的其他细菌干扰也不会影响检测结果,而且扩增内标还可以显示假阳性的扩增结果。根据实时荧光 PCR 所使用的荧光发光方法可分为两种:荧光染料和荧光探针。

5.1 荧光染料法 real-time PCR

在 PCR 反应体系中加入过量的荧光染料,荧光染料非特异性地掺入 DNA 双链后,能发射荧光信号,而不掺入链中的染料分子不会发射荧光信号,从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。张晓君等^[34,35]分别根据 VP 的 *gyrB* 基因和 *toxR* 基因保守序列设计特异性引物,建立了 2 种 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测 VP 的方法。该法从核酸抽提到结果分析仅需 4~5 h,具有较好的特异性,比传统方法更加敏感且操作更加简单快捷,可用于对 VP 的检测和定量分析。卢昕等^[36]根据 VP 的 *tlh*、*trh* 和 *tdh* 基因设计引物,建立了检测 VP 及其毒力基因的单重和双重 SYBR Green I 荧光 PCR 检测方法。结果表明,根据 *tlh* 基因建立的方法可以检出全部 VP,最低检测限为 50 拷贝/ μ L,而根据毒力基因 *trh* 和 *tdh* 建立的单重和双重荧光定量 PCR 方法均能特异性地检出两个毒力基因,其检测下限分别为 50、500 拷贝/ μ L。

5.2 荧光探针法 Real-time PCR

分子信标探针、TaqMan 探针和 MGB 探针是 Real-time PCR 常用的三种探针。扈庆华^[37]根据 GenBank 公布的 VP 的 *tdh* 基因的保守序列设计了 1 对引物并用 FAM 荧光剂标记了 5'端的改良分子信标探针,建立了检测 VP 的改良分子信标实时 PCR 反应体系,应用该体系对 12 种细菌检测表明,只有 VP 有荧光信号并表现出较好的灵敏性,但无法进行定量检测。Robert-Pillot 等^[38]根据 VP 的 *R72H*、*tdh*、*trh* 设计荧光水解探针,探针的 5'端和 3'端分别用报告染料 6-羧基荧光素(FAM)和淬灭染料 6-羧基四甲基罗丹明(TAMRA)标记,建立了 VP 的荧光定量 PCR 方法,经过对多株细菌的检测及与 MPN-PCR 方法的比较表明,该法最低检测限为 $10^3 \sim 10^4$ cfu/g,而且特异性良好,不仅可以定量样品中的总 VP,而且还可以定量致病性的 VP。林强等^[39]根据 VP 毒素调控基因 *toxR* 作为目的基因设计了特异性的引物及 TaqMan 探针,建立了 VP 的荧光定量 PCR 检测方法,并应用于牡蛎中 VP 的检测。结果发现,对纯培养的 VP 和添加 VP 的牡蛎的检测灵敏度分别为 18 cfu/mL 和 180 cfu/mL,重复性好,可用于水产品中 VP 的定量检测。麻丽丹等^[40]根据 GenBank 公布的 VP 的 *ToxR* 基因的保守序列,设计了一对引物和 Taqman MGB 探针的 Real-time PCR 的 VP 快速检测方法。通过对 20 种细菌进行扩增,结果有 6 株 VP 可产生特异性扩增,且与其他细菌无交叉反应。对纯菌检测得到菌液灵敏度为 13 cfu/mL, DNA 浓度为 130 pg。

6 基于 DNA 染料 EMA 和 PMA 的 PCR

传统的 PCR 技术无法区分样品中的死细菌与活细菌,死细菌不会导致食源性疾病的发生,但其基因组 DNA 残

留于样品中也能获得特异性的扩增结果,从而使检测结果出现较高的假阳性。EMA 和 PMA 是两种对 DNA 具有高度亲和力的光敏染料,这两种染料均不能透过完整的细胞膜,只能选择性地修饰细胞死亡后暴露出来的 DNA 分子。当用 EMA 和 PMA 处理后的样品暴露于强光下时,EMA 和 PMA 通过一定的生化反应会导致 DNA 分子的永久修饰,这种修饰会阻断 DNA 分子的 PCR 扩增^[41]。祝儒刚等^[42]将 EMA 选择渗透性与传统的 PCR 技术相结合,建立了一种能有效检测纯培养条件下 VP 死活菌细胞的新方法(EMA-PCR)。结果表明,将 EMA 渗透处理的 VP 死细胞菌悬液经曝光处理后,其 PCR 结果呈阴性,而不经 EMA 处理的对照组,其 PCR 结果呈阳性;而且经 EMA 处理后,混合液中活的 VP 能够通过 PCR 被选择性地定量。由于 EMA 具有一定的细胞毒性^[42],其应用受到较大限制。Zhu 等^[43]利用 PMA 与 PCR 技术结合,同样能达到检测样品中 VP 死活细胞的目的,并对细胞表现出较低的毒性。

7 纳米粒子 PCR

纳米粒子 PCR 是通过把引物连接在纳米粒子表面,把 PCR 反应体系从均相反应体系扩展到纳米粒子表面的一项新技术,能显著提高常规 PCR 的灵敏度和特异性,尤其是可以提高低拷贝基因的扩增灵敏度^[44]。刘阳等^[45]根据 VP 的 *toxR* 基因序列设计特异性引物建立了纳米金 PCR 方法,该方法与溶藻弧菌、霍乱弧菌、麦氏弧菌、沙门氏菌、枸橼酸杆菌均没有交叉反应,纯培养细菌检测灵敏度为 3 cfu/反应体系,灵敏度高于常规 PCR 方法。

8 免疫捕获 PCR

免疫捕获 PCR 就是将免疫捕获和 PCR 扩增结合起来的一种检测方法,该方法首先是要制备目的病原菌的特异性抗体,然后将其固化到 Eppendorf 管、微量滴定板、琼脂糖凝胶颗粒或磁珠等固相载体上,再将样品与固化抗体进行孵育,利用抗原-抗体的特异性结合而捕获特定的微生物,再利用其基因组序列特异的引物进行 PCR 扩增并分析,这样不仅提高了特异性,而且检测样本的体积也可增大,从而提高了检测的灵敏度。王报贵等^[46]制备并纯化了 VP 的多克隆抗体,将其偶联于羧基化修饰的纳米磁珠表面,建立了 VP 的磁珠捕获 PCR 检测方法,制备的免疫磁珠捕获率在 55%~70%之间,且稳定性较好,盐离子浓度对捕获率的影响不大。该方法具有很高的灵敏度和特异性,对纯培养物和鱼肉糜样本的最低检测限分别为 10^2 cfu/mL 和 10^3 cfu/mL,且样品中高浓度杂菌的存在不影响检测灵敏度,具有较好的应用前景。为了在临床诊断及食品卫生监管中能够快速检测 VP 等 4 种感染性腹泻病原菌,何长龙等^[47]利用 VP 的 *tlh* 等基因设计特异性引物,利用商品化的

抗体包被磁珠,通过优化免疫磁珠分离过程及多重 PCR 扩增中的各个环节,建立了 4 种病原菌的免疫磁珠-多重 PCR 同步快速检测体系。该体系特异性及敏感性高,操作过程简单,结果稳定,对四种病原菌的检测最低限为 27~76 cfu/mL。

9 PCR-变性高效液相色谱

变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)是上个世纪 90 年中期发展起来的一种新的核酸片段分析技术,现在已广泛应用于微生物鉴定和分型等研究。王玉平等^[48]针对 VP 等 5 种食源性致病菌的特异毒力基因设计引物,进行多重 PCR 扩增,扩增产物用高效变性液相色谱仪检测,5 种致病菌 PCR 扩增产物可充分分离,并分别呈现特异 DHPLC 色谱图,该法检测灵敏度小于 5 cfu/mL,对目标分离株的正确检出率大于 98%。廖亮等^[49]设计针对 VP 的特异性引物,PCR 扩增产物进行变性高效液相色谱分析,发现该法具有良好的特异性,检测的弧菌中只有 VP 具有特征峰型图谱,其他弧菌在相应位置均无任何峰存在。

10 PCR-ELISA

PCR-ELISA 技术是利用了 PCR 技术的高敏感性和特异性、探针的特异性、酶标仪直接读取结果的客观性等优点创建的一项技术^[50]。常规 PCR 技术主要是利用凝胶电泳荧光显色法和放射性同位素标记法对扩增产物进行分析。其中,凝胶电泳荧光显色法可定性地检测 PCR 扩增产物,但极易产生假阴性和假阳性结果。放射性同位素标记法可以定量检测 PCR 产物,但在实际操作中由于需要特殊的设备和安全防护,限制了它在实际过程中的应用。PCR-ELISA 技术能弥补上述检测技术的不足。Di Pinto 等^[51]发明了一种 PCR-ELISA 方法检测贝类中的 VP,其过程是根据 VP 的特异性序列设计引物进行扩增,然后用生物素标记的寡核苷酸探针捕获地高辛标记的 PCR 产物并杂交,转入链霉亲和素包被的微孔板中,通过生物素和亲和素的结合使探针固化,再加入酶标抗体和底物,显色后测 OD 值,该方法的优点是敏感性高,比基于凝胶的方法敏感性高 100 倍。

11 总结与展望

与传统 VP 的检测方法相比,这些新的分子生物学检测技术具有明显的优势,且不同的检测技术具有不同的适用范围,可以满足差异化的检测需求。但是部分分子生物学检测技术还存在不少问题:①有些方法需要价格昂贵的仪器设备,成本太高;②有些方法引物设计复杂;③部分探针、染料价格较高,不适宜于大量样品检测的应用;④实验

操作过程中容易因样品交叉污染、试剂污染、电泳检测结果时 PCR 扩增产物形成气溶胶污染样品、试剂等原因而造成假阳性结果。当然,随着研究的深入,各种检测技术正在得到不断发展与完善,预期今后分子生物学检测技术研究的主要内容有:①添加新的技术元素提高和拓宽分子生物学检测技术的效能;②将不同的分子生物学检测技术进行融合,取长补短,以更有利于 VP 的检测。总之,具有高效、高灵敏度、可操作性强等特点的分子生物学检测方法将成为未来 VP 检测的总体发展趋势与需求,也必将成为今后的研究热点。

参考文献

- [1] Shinoda S. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections[J]. *Biocontr Sci Technol*, 2011, 16(4): 129–137.
- [2] 刘秀梅, 陈艳, 王晓英, 等. 1992~2001 年食源性疾病暴发资料分析——国家食源性疾病监测[J]. *卫生研究*, 2004, 33(6): 725–727.
Liu X, Chen Y, Wang X, *et al.* Foodborne disease outbreaks in china from 1992 to 2001 national foodborne disease surveillance system[J]. *J Hyg Res*, 2004, 33(6): 725–727.
- [3] Alam MJ, Tomochika KI, Miyoshi SI, *et al.* Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 208(1): 83–87.
- [4] McLaughlin JB, DePaola A, Bopp CA, *et al.* Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters[J]. *New England J Med*, 2005, 353(14): 1463–1470.
- [5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.
- [6] Yeh HY, Shoemaker CA, Klesius PH. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri*[J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 63(1): 36–44.
- [7] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, *et al.* Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection[J]. *Vaccine*, 2006, 24(44–46): 6679–6682.
- [8] Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases[J]. *J Infect Chemother*, 2009, 15(2): 62–69.
- [9] Niessen L, Luo J, Denschlag C, *et al.* The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants[J]. *Food Microbiol*, 2013, 36(2): 191–206.
- [10] 徐芊, 孙晓红, 赵勇, 等. 副溶血弧菌 LAMP 检测方法的建立[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(12): 66–72.
Xu Q, Sun XH, Zhao Y, *et al.* Development of loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *China Biotechnol*, 2007, 27(12): 66–72.
- [11] Chen S, Ge B. Development of a *toxR*-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10(1): 41.
- [12] 卢京光, 裴琳, 李欣荣, 等. 快速 LAMP 法检测海产品中副溶血弧菌的方法研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 120(12): 3283–3285.
Lu JG, Pei L, Li XR, *et al.* Study on rapid LAMP method for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products[J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2010, 120(12): 3283–3285.
- [13] Nemoto J, Ikeda M, Kojima T, *et al.* Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *J Food Prot*, 2011, 74(9): 1462–1467.
- [14] 彭帅, 石磊. 环介导恒温扩增法快速检测海产品中的副溶血弧菌[J]. *生物技术通报*, 2011, (2): 184–191.
Peng S, Shi L. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Biotechnol Bull*, 2011, (2): 184–191.
- [15] Yamazaki M, Aoki H, Iwade Y, *et al.* An Enrichment Medium for Increasing a Very Small Number of *Vibrio parahaemolyticus* Cells to the detection limit of the loop-mediated isothermal amplification(LAMP) assay[J]. *JPN J Infect Dis*, 2012, 65(2): 111–116.
- [16] 程晓艳, 刘庆慧, 黄健. 副溶血弧菌 *tdh* 基因 LAMP 检测技术的建立[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(8): 156–162.
Cheng X, Liu Q, Huang J. Establishment of loop-mediated isothermal amplification for detecting *Vibrio parahaemolyticus* *tdh* gene[J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2012, 12(8): 156–162.
- [17] Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, *et al.* Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(8): 5023–5028.
- [18] 叶宇鑫, 李琳, 山崎伸二, 等. 原位荧光 LAMP 技术检测食源性沙门氏菌[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(3): 137–142.
Ye Y, Li L, Shinji Y, *et al.* In situ loop-mediated isothermal amplification technology for rapid detection of food-borne *Salmonella*[J]. *Food Ferment Ind*, 2009, 35(3): 137–142.
- [19] Wang L, Shi L, Su JY. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food samples using in situ loop-mediated isothermal amplification method[J]. *Gene*, 2013, 515(2): 421–425.
- [20] 王丽, 钟青萍, 丘海强, 等. 原位荧光恒温核酸扩增方法的建立及其在副溶血弧菌检测中的应用[C]. 2010 年第一届细胞、分子生物学、生物物理学和生物工程国际大会论文集, 2010.
Wang L, Zhong Q, Qiu H, *et al.* Development and application of in situ loop mediated isothermal amplification method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in foods[C]. *Proceedings of 2010 First International Conference on Cellular, Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering*, 2010.
- [21] Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(23): 11141–11156.
- [22] 龚玉姣, 贺征, 陈建东, 等. PCR 检测冷冻食品中“活的非可培养状态”的副溶血弧菌[J]. *中国预防医学杂志*, 2010, 11(10): 988–990.
Gong YJ, He Z, Chen JD, *et al.* Detection of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in frozen food by reverse transcription PCR[J]. *Chin Prev Med*, 2010, 11(10): 988–990.
- [23] Yu S, Chen W, Wang D, *et al.* Species-specific PCR detection of the food-borne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* using the *irgB* gene identified by comparative genomic analysis[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 307(1): 65–71.
- [24] No AR, Okada K, Kogure K, *et al.* Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR targeted to the histone-like nucleoid structure (H-NS) gene

- and its genetic characterization[J]. Lett Appl Microbiol, 2011, 53(2): 127–133.
- [25] Wang R, Huang J, Zhang W, *et al.* Detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus* by multiplex PCR and DNA-DNA hybridization on a microarray[J]. J Genet Genomics, 2011, 38(3): 129–135.
- [26] Hossain MT, Kim EY, Kim YR, *et al.* Development of a *groEL* gene-based species-specific multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*[J]. J Appl Microbiol, 2013, 114(2): 448–456.
- [27] Vinothkumar K, Bhardwaj AK, Ramamurthy T, *et al.* Triplex PCR assay for the rapid identification of 3 major *Vibrio* species, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio fluvialis*[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 76(4): 526–528.
- [28] Bhattacharyya N, Hou A. A pentaplex PCR assay for detection and characterization of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolates[J]. Lett Appl Microbiol, 2013, 57(3): 233–240.
- [29] 何晓华, 余水静, 陈万义, 等. 添加有扩增内标的副溶血弧菌 PCR 检测方法[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 387–394.
- He X, Yu S, Chen W, *et al.* Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR method with internal amplification control[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(3): 387–394.
- [30] 吕淑霞, 祝儒刚, 刘月萍, 等. 扩增内标在副溶血弧菌多重 PCR 检测方法中的应用[J]. 沈阳农业大学学报, 2010, 41(6): 701–705.
- Lü SX, Zhu RG, Liu YP, *et al.* Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in the presence of internal amplification control[J]. J Shenyang Agric Univ, 2010, 41(6): 701–705.
- [31] Copin S, Robert-Pillot A, Malle P, *et al.* Evaluation of most-probable-number-PCR method with internal amplification control for the counting of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in frozen shrimps[J]. J Food Prot, 2012, 75(1): 150–153.
- [32] Kang MH, Kim IW, Lee DW, *et al.* Development of a rapid detection method to detect *tdh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* using 2-step ultrarapid real-time polymerase chain reaction[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 69(1): 21–29.
- [33] Liu B, He X, Chen W, *et al.* Development of a real time PCR assay for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood[J]. Protein Cell, 2012, 3(3): 204–212.
- [34] 张晓君, 梁利国, 阎斌伦, 等. 基于 *toxR* 基因的 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测病原副溶血弧菌方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(4): 543–547.
- Zhang XJ, Liang LG, Yan BL, *et al.* Development of a SYBR green I real-time PCR for detection of *Vibrio parahaemolyticus* based on *toxR* Gene[J]. Chin J Vet Sci, 2012, 32(4): 543–547.
- [35] 张晓君, 陈丽, 毕可然, 等. 副溶血弧菌的 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法建立[J]. 食品科学, 2012, 33(8): 203–206.
- Zhang XJ, Chen L, Bi KR, *et al.* Development of SYBR green I-based real-time quantitative PCR for detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Sci, 2012, 33(8): 203–206.
- [36] 卢昕, 徐嘉良, 阚枫, 等. 应用 SYBR Green I 荧光 PCR 快速检测副溶血弧菌及其毒力基因[J]. 中国预防医学杂志, 2012, 13(4): 241–245.
- Lu X, Xu JL, Kan B, *et al.* Development of *Vibrio parahaemolyticus* by multiplexed SYBR green I-based real-time PCR assay[J]. Chin Prev Med, 2012, 13(4): 241–245.
- [37] 唐庆华, 郑薇薇, 石晓路, 等. 改良分子信标-实时 PCR 快速检测副溶血弧菌[J]. 现代预防医学, 2004, 31(3): 441–443.
- Hu QH, Zheng WW, Shi XL, *et al.* Rapid detection of *V. parahaemolyticus* using modified molecular beacons and real-time PCR[J]. Mod Prev Med, 2004, 31(3): 441–443.
- [38] Robert-Pillot A, Copin S, Gay M, *et al.* Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: fast and reliable quantification by real-time PCR[J]. Int J Food Microbiol, 2010, 143(3): 190–197.
- [39] 林强, 李宁求, 付小哲, 等. 牡蛎中副溶血弧菌荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1): 96–102.
- Lin Q, Li N, Fu X, *et al.* Development and application of a real-time PCR assay for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster[J]. J Fishery Sci China, 2011, 18(1): 96–102.
- [40] 麻丽丹, 巴中华, 郝陶光, 等. Taqman MGB 探针实时 PCR 快速检测副溶血性弧菌[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2009, 32(1): 39–42.
- Ma L, Ba Z, Hao T, *et al.* Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by real-time PCR with Taqman MGB probe[J]. Chin Frontier Health Quarantine, 2009, 32(1): 39–42.
- [41] Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells[J]. J Microbiol Methods, 2006, 67(2): 310–320.
- [42] 祝儒刚, 吕淑霞, 刘月萍, 等. 基于 DNA 染料 EMA 的 PCR 技术检测鉴别副溶血性弧菌死活细胞[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(7): 144–149.
- Zhu RG, Lv SX, Liu YP, *et al.* Discrimination of viable and dead cell of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR based on DNA binding dye of EMA[J]. Food Ferment Ind, 2010, 36(7): 144–149.
- [43] Zhu RG, Li TP, Jia YF, *et al.* Quantitative study of viable *Vibrio parahaemolyticus* cells in raw seafood using propidium monoazide in combination with quantitative PCR[J]. J Microbiol Methods, 2012, 90(3): 262–266.
- [44] 刘清岱, 王金菊, 王勇. 纳米粒子 PCR 研究进展[J]. 生物学通报, 2010, 45(2): 1–3.
- Liu Q, Wang J, Wang Y. Nanoparticle PCR Research Progress[J]. Bull Biol, 2010, 45(2): 1–3.
- [45] 刘阳, 孔繁德, 彭小莉, 等. 纳米金 PCR 技术检测副溶血弧菌方法的建立与初步应用[J]. 福建畜牧兽医, 2012, 34(1): 9–12.
- Liu Y, Kong F, Peng X, *et al.* Establishment and primary application of nanoparticle-based assisted PCR for detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Fujian J Animal Husbandry Vet Med, 2012, 34(1): 9–12.
- [46] 王报贵, 武晓丽, 董素琴, 等. 副溶血弧菌的磁珠捕获及检测[J]. 食品工业科技, 2013, 34(13): 147–152.
- Wang BG, Wu XL, Dong SQ. Bead capture and detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(13): 147–152.
- [47] 何长龙, 吴力克, 兰林, 等. 4 种感染性腹泻病原菌免疫磁珠-多重 PCR 快速检测体系的建立[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(15): 1505–1508.
- He C, Wu L, Lan L, *et al.* Rapid detection for 4 infectious diarrhea pathogens by immunomagnetic bead-multiplex PCR[J]. Acta Academiae Med Militaris Tertiae, 2012, 34(15): 1505–1508.
- [48] 王玉平. 变性高效液相色谱法同时检测 5 种食源性致病菌[J]. 现代预防医学, 2009, 36(18): 3520–3523.
- Wang YP. Simultaneous detection of five foodborne bacterial pathogens using denaturing high-performance liquid chromatography[J]. Mod Prev

Med, 2009, 36(18): 3520–3523.

- [49] 廖亮, 刘宏生. 海产品中副溶血弧菌变性高效液相色谱检测技术研究[J]. 中国卫生工程学, 2010, 9(3): 220–222.

Liao L, Liu HS. Determination of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood by denaturing high performance liquid chromatography[J]. Chin J Public Health Eng, 2010, 9(3): 220–222.

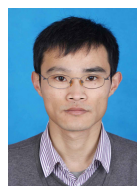
- [50] 贾丽艳, 张映. PCR-ELISA 技术及应用[J]. 山西农业大学学报, 2007, 6(6): 214–215.

Jia LY, Zhang Y. Advance and application on PCR-ELISA technique[J]. J Shanxi Agric Univ, 2007, 6(6): 214–215.

- [51] Di Pinto A, Terio V, Di Pinto P, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Lett Appl Microbiol, 2012, 54(6): 494–498.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



张德福, 讲师, 博士, 硕导, 主要研究方向为食源性病原微生物的检测、控制及致病机理。

E-mail: zhangdf@bhu.edu.cn



励建荣, 教授, 博士, 博导。主要研究方向为水产品 and 果蔬贮藏加工, 食品安全。

E-mail: lijr6491@163.com

“粮油产品质量安全”专题征稿

小麦、水稻、大豆等粮油产品是我国人民广泛食用的主要农产品, 在人们日常饮食中占据着非常重要的主导地位, 具有无可替代的作用。因此, 粮油产品质量安全关系到每个人的日常生活, 具有十分重要的意义。

鉴于此, 本刊特别策划了“**粮油产品质量安全**”专题, 由中国农业科学院油料作物研究所李培武研究员担任专题主编。李培武研究员现任农业部生物毒素检测重点实验室和农业部油料产品质量安全风险评估实验室(武汉)主任, 农业部油料及制品质量监督检验测试中心常务副主任, 兼任农业部农产品质量安全生物毒素专家组组长、食品安全国家标准审评委员会污染物分委员会副主任、中国仪器仪表学会农业仪器应用技术分会副理事长、GCIRC、FAO/WHO 食品添加剂与污染物联合专家委员会委员。长期从事粮油食品质量安全检测研究与风险评估工作。本专题主要围绕粮油产品质量安全, 紧紧**围绕粮油产品质量安全关键安全因子与质量指标检测, 快速检测与设备研制, 食用油保真与掺伪技术, 质量安全风险评估, 粮油食品管理法律法规、监管现状及问题**等或本领域其它有意义的问题进行论述, 计划在 2014 年 8 月出版。

本刊编辑部及李教授诚邀各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2014 年 7 月 30 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑部