

自动微流控膜芯片法检测副溶血性弧菌

田卓¹, 刘洪伟², 麻丽丹^{2*}

(1. 大连海关, 大连 116000; 2. 丹东海关, 丹东 118000)

摘要: **目的** 建立自动微流控膜芯片检测法副溶血性弧菌的方法。**方法** 利用自动微流控膜芯片对副溶血性弧菌进行检测, 并采用行业标准 SN/T 2424-2010 实时荧光 PCR 方法进行比对验证。**结果** 该技术具备副溶血性弧菌的检测能力, 验证实际样品的检测结果与行业标准荧光 PCR 法一致。**结论** 该方法快速、准确、直观, 适合测定副溶血性弧菌。

关键词: 副溶血性弧菌; 自动微流控; 膜芯片

Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by auto-microfluidic thin-film chip method

TIAN Zhuo¹, LIU Hong-Wei², MA Li-Dan^{2*}

(1. Dalian Customs, Dalian 116000, China; 2. Dandong Customs, Dandong 118000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* by auto-microfluidic thin-film chip technology. **Methods** *Vibrio parahaemolyticus* were detected by auto-microfluidic thin-film chip, and the real-time fluorescent PCR method SN/T 2424-2010 required by industry standard was used to verify the results. **Results** The technology had the ability to identify *Vibrio parahaemolyticus*. The results of comparison and verification of actual samples were consistent with those of industry standard fluorescent PCR. **Conclusion** The technology is rapid, accurate and intuitive, which is suitable for detecting *Vibrio parahaemolyticus*.

KEY WORDS: *Vibrio parahaemolyticus*; auto-microfluidic; thin-film chip

0 引言

副溶血性弧菌是一种嗜盐性革兰氏阴性菌, 广泛存在于水体、水底沉积物和水生动物体内。副溶血性弧菌感染暴发在全球很多国家和地区常有报道, 也是亚洲一些国家和地区细菌性食源性疾病的主要致病菌^[1-4]。常规的致病菌检测方法为平板培养法, 但该方法具有培养时间长、操作工作量大、检测灵敏度低等缺点^[5-6]。随着遗传学、分子生物学技术不断发展, 病原菌的检测逐渐由生化水平向基因水平改变^[7]。膜芯片法是一种新型的分子生

物学检测技术, 膜芯片是将人工合成的碱基序列作为探针固定在硝酸纤维素膜或尼龙膜等固相载体膜上, 当 PCR 产物中含有与探针碱基互补的序列时, 特定序列会被探针特异结合, 通过酶-底物显色, 产生肉眼可辨的信号^[8]。该方法通过基因序列的检测完成细菌的鉴定, 提高感染性疾病的临床诊断准确率和灵敏度^[9]。其原理主要是基于细菌的 16S rRNA 基因的高度保守性, 根据保守区域设计通用引物, 扩增 16S rRNA 基因的可变区序列, 从而对细菌进行分析鉴定^[10]。膜芯片技术是一种全新的病原菌检测方法, 具有高通量、高敏感性、检测速度快等优点^[11-12], 与

基金项目: 大连海关科研项目(2020DK17)

Fund: Supported by the Dalian Customs Research Project (2020DK17)

*通信作者: 麻丽丹, 正高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 2212097@163.com

*Corresponding author: MA Li-Dan, Professor, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Dandong 118000, China. E-mail: 2212097@163.com

传统的基因测序相比,膜芯片法的检测范围更广,检测速度明显提高,并且可同时检测多个样本,有助于更快速有效的检出病原菌^[13]。目前采用膜芯片法检测副溶血性弧菌研究相对较少。

本研究采用自动微流控膜芯片技术,基于反向斑点杂交原理,采用生物素标记的引物进行靶基因的扩增,将扩增产物同固定在尼龙膜上的探针进行杂交,经化学显色后可在杂交点上形成肉眼可见的杂交信号,以期对相关检测部门提供参考。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

MFS-24 膜芯片杂交仪(四川华汉三创生物科技有限公司); 7500 荧光定量 PCR 仪(美国 AB 公司); 3K15 高速冷冻离心机(SIGMA 公司); MFS-8 膜芯片扫描分仪(四川华汉三创生物科技有限公司)。

副溶血性弧菌(CICC 21617)、金黄色葡萄球菌(CICC10145)(中国工业菌种保藏中心 CICC)。

QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒(货号: 51304, 德国 QIAGEN 公司); 致泻微生物膜芯片检测试剂盒(货号: HT002B, 四川华汉三创生物科技有限公司); PCR 引物及探针[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.2 实验方法

1.2.1 样本的收集、制备和增菌

市售水产品样本 10 份。样品的制备、增菌培养和分离步骤按照 GB 4789.7—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[14]方法执行。

1.2.2 DNA 模板的制备

采用 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒提取样本 DNA。菌株和样品提取液中 DNA 的最终浓度为 25 ng/ μ L。

1.2.3 多重 PCR 扩增

样本核酸分 2 管扩增。第 1 管 PCR 反应体系: 2×Multiplex PCR Master Mix 10 μ L, 样品核酸 \geq 20 ng, 无核酸酶灭菌水补至 20 μ L。第 2 管 PCR 反应体系: 2×Multiplex PCR Master Mix 10 μ L, Hela cell total RNA 20 μ L, 样品核酸 \geq 20 ng, 无核酸酶灭菌水补至 20 μ L。

第 1 管扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 降至室温。

第 2 管扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 降至室温。

1.2.4 膜芯片杂交

将 PCR 产物 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后立即置于冰上备用。根据检测样品数准备杂交管向每个杂交管中加入 500 μ L Buffer R2。AP-Streptavidin 按 1:250 的比例加入到 Buffer R4

中,将已变性的第一管和第二管 PCR 产物加入杂交管中。将准备好的试剂、样品和膜芯片上机。

1.2.5 质量控制

实验中设置质控对照,质控设置见图 1。内参和外参检出,hipO 检出为阳性,其余靶标未检出为阴性。膜芯片杂交检测结果应符合相应要求,但出现非图 1 所述杂交结果,则判断实验不成功,需重复实验。

膜芯片上探针所对应的细菌或病毒名称:沙门氏菌: *invA*, *trr*; 志贺氏菌: *ipaH*; 霍乱弧菌: *ompw*, *ctxAB*; 副溶血性弧菌: *toxR*, *trh*, *tdh*; 空肠弯曲菌: *hipO*; 腺病毒 40/41 型: Adenovirus 40/41; 札如病毒: Sapovirus; 星状病毒 Astrovirus; 轮状病毒: Rotavirus A; 诺如病毒 GI 型: Novirus GI; 诺如病毒 GII 型: Novirus GII; 阳性质控 PC; 阴性质控: NC。

+					
	内参	<i>invA</i>	<i>trr</i>	<i>ipaH</i>	<i>ompW</i>
					
	<i>ctxAB</i>	<i>toxR</i>	<i>trh</i>	<i>tdh</i>	<i>hipO</i>
					
	外参	Adenovirus 40/41	Sapovirus	Astrovirus	Rotavirus A
					
	Novirus GI	Novirus GII	Blank	PC	NC

图 1 致泻微生物阳性质控示意图

Fig.1 Schematic diagram of positive quality control of cathartic microorganisms

1.2.6 结果判读

判读标准:杂交实验结束后对照膜芯片点阵进行判读,膜芯片探针分布模式如图 2 所示。判定标准:内参显色, *toxR* 阳性, *trh* 阳性或阴性, *tdh* 阳性或阴性。

1.2.7 方法验证

采用行业标准^[15]多重实时荧光 PCR 法对副溶血性弧菌标准菌株、样品进行方法验证。

引物和探针,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物及探针序列如下

靶基因 *tlh*, 正向引物 5'-CATTAGATTTGGCGAACG AGAAC-3'

反向引物 5'-CCAGATCGTGTGGTTGTATGAGA-3'

+	○ 内参	○ <i>invA</i>	○ <i>ttr</i>	○ <i>ipaH</i>	○ <i>ompW</i>
	○ <i>ctxAB</i>	○ <i>toxR</i>	○ <i>trh</i>	○ <i>tdh</i>	○ <i>hipO</i>
	○ 外参	○ Adenovirus 40/41	○ Sapovirus	○ Astrovirus	○ Rotavirus A
	○ Novirus GI	○ Novirus GII	○ Blank	○ PC	○ NC

图 2 膜芯片探针分布图

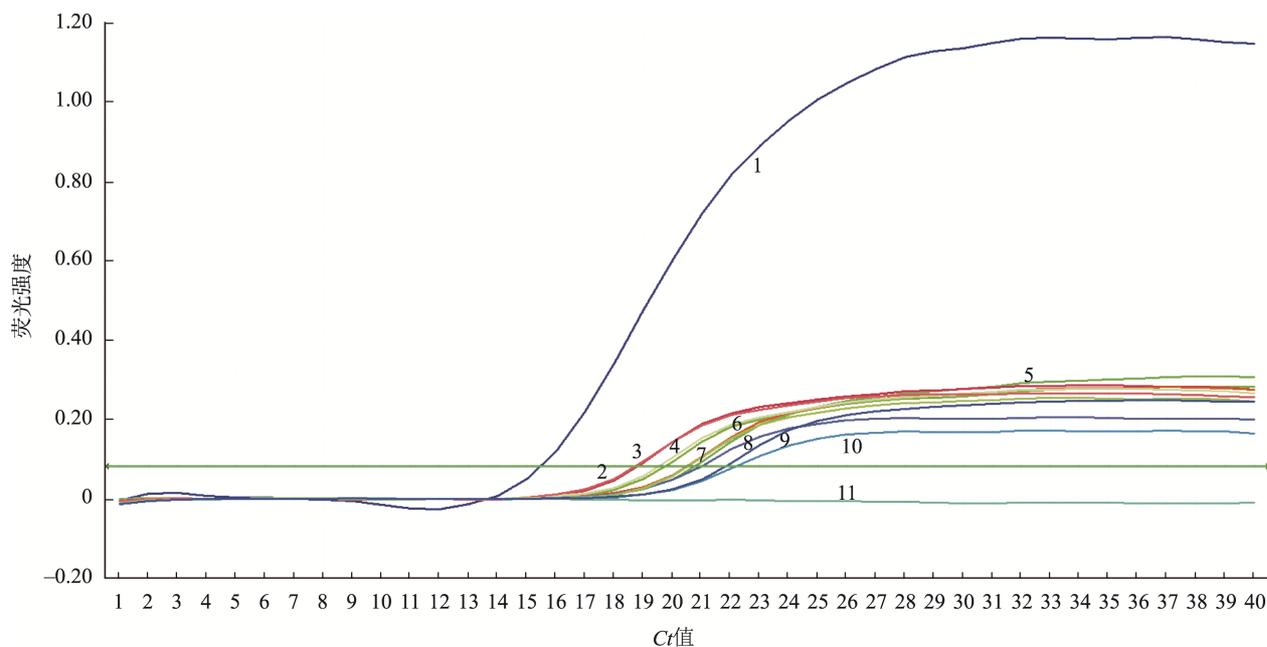
Fig.2 Probe distribution of auto-microfluidic thin-film chip

探针 5'-FAM-AGACATTACGTTCTTCGCCGCTGACA ATC-BHQ1-3'.

靶基因 *tdh* 正向引物 5'-TTTATTTATATCCATGT TGGCTGCAT-3'

反向引物 5'-GTATCTCGAACAAACAAATATCTCAT C-3'

探针 5'-JOE-TGAGCTTCCATCTGTCCCTTTTCCT GC-BHQ1-3'



注: 1: CICC 21617; 2~11: 水产品样品; 12: CICC10145。

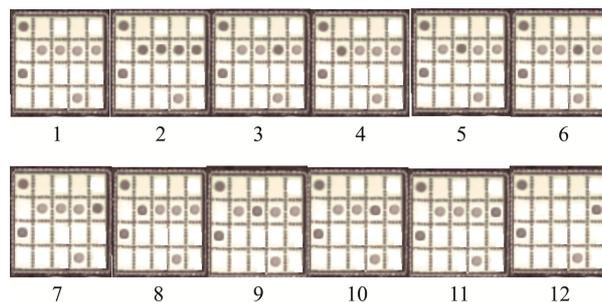
图 4 实时荧光 PCR 检测

Fig.4 Detection of real-time fluorescent PCR

2 结果与分析

2.1 膜芯片法检测结果

膜芯片法检测结果如图 3 所示, 灰色圆点表示该位点阳性, 无圆点表示该位点阴性, 由检测结果可知, CICC 21617 检出 *toxR* 基因、*trh* 基因和 *tdh* 基因, 样品中均检出 *toxR*、*trh* 基因和 *tdh* 基因, CICC10145 未检出 *toxR* 基因、*trh* 基因和 *tdh* 基因。



注: 1: CICC 21617; 2~11: 水产品样品; 12: CICC10145

图 3 膜芯片检测

Fig.3 Detection of auto-microfluidic thin-film chip

2.2 实时荧光 PCR 结果

实时荧光 PCR 检测结果如图 4 所示, CICC 21617 检出 *trh* 基因和 *tdh* 基因, 样品中均检出 *trh* 基因和 *tdh* 基因, CICC10145 未检出 *trh* 基因和 *tdh* 基因, 与膜芯片法检测结果一致。

3 结 论

本研究利用自动微流控膜芯片技术对水产品进行了副溶血性弧菌检测,同时采用行业标准方法进行了确认。结果表明,自动微流控膜芯片技术能够检测出副溶血性弧菌,完全满足实际工作需要。该技术不需要设计引物和探针,预配 PCR 反应体系(在一个 PCR 管中同时扩增多个基因),仅需加入模板 DNA 及 ddH₂O 即可开始反应;芯片本身有 8 个样本,每个样本中可同时检测大于 12 个目的基因片段得高通量能力,因此具有高频率和高通量的优点,便捷、直观、准确,提高了检测结果的重复性和稳定性。该技术研究并优化了原有多重 PCR 扩增技术,使之可以稳定地扩增多重靶标,解决了多对 PCR 引物在同一反应中环境中相互干扰、与靶标模板竞争性结合等多个问题,同时将多重 PCR 扩增技术与基因杂交技术相集成,为今后的科学研究提供了一种具有高通量、高准确率的检测技术方案,可用于副溶血性弧菌快速初筛与鉴定。

参考文献

- [1] HAENDIGES J, ROCK M, MYERS RA, *et al.* Pandemic *Vibrio parahaemolyticus*, Maryland, USA, 2012 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(4): 718–720.
- [2] ESTEVES K, HERVIO HD, MOSSER T, *et al.* Rapid proliferation of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* during freshwater flash floods in french mediterranean coastal lagoons [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(21): 7600–7609.
- [3] CRUZ CD, HEDDERLEY D, FLETCHER GC. Longterm study of *Vibrio parahaemolyticus* prevalence and distribution in New Zealand shellfish [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(7): 2320–2327.
- [4] LI YH, XIE X, SHI XL, *et al.* *Vibrio parahaemolyticus*, southern coastal region of China, 2007–2012 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(4): 685–688.
- [5] 孙晶. 核酸法在食源性致病菌检测中的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(9): 3409–3413.
SUN J. Research progress of nucleic acid method in detection of foodborne pathogenic bacteria [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(9): 3409–3413.
- [6] 王小强, 营思思, 韩锐郡, 等. 多重寡核苷酸连接-聚合酶链式反应-通用基因芯片检测食源性致病菌方法的建立[J]. *卫生研究*, 2017, 46(2): 225–231.
WANG XQ, YING SS, HAN RJ, *et al.* Establishment of a method for detection of food borne pathogens by multiple oligonucleotide ligation-polymerase chain reaction-generic gene chip [J]. *J Hyg Res*, 2017, 46(2): 225–231.
- [7] 郑辉. 病原微生物检测技术应用及展望分析[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(18): 25–26.
ZHENG H. Application and prospect analysis of pathogenic microorganism detection technology [J]. *World Latest Med Inf*, 2017, 17(18): 25–26.
- [8] DIEDERICHS T, QUOC HN, URBAN M. Transparent nanopore cavity

arrays enable highly parallelized optical studies of single membrane proteins on chip [J]. *Nano Lett*, 2018, 18(6): 3901–3910.

- [9] 徐晓丽, 林娟, 鄢仁祥. 基因芯片与高通量测序技术的原理与应用的比较[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(11): 36–44.
XU XL, LIN J, YAN RX. Comparison of principles and applications of gene chips and high-throughput sequencing technology [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2018, 34(11): 36.
- [10] 陈燕飞, 雷永良, 陈秀英, 等. 基因芯片法菌种鉴定技术在非结核诊断中的应用[J]. *中国卫生检验志*, 2017, 27(17): 2545–2547.
CHEN YF, LEI YL, CHEN XY, *et al.* Application of gene chip identification technology in non-tuberculosis diagnosis [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, 27(17): 2545–2547.
- [11] 姜文华. 分子生物学技术在微生物检验中的应用效果分析[J]. *中国医药指南*, 2017, 15(14): 290–291.
JIANG WH. Analysis of application effect of molecular biology technology in microbial testing [J]. *Guide Chin Med*, 2017, 15(14): 290–291.
- [12] 张妮. 分子生物学技术在病原菌快速检测中的应用进展[J]. *国际儿科学杂志*, 2017, 44(5): 332.
ZHANG N. Progress in the application of molecular biology techniques in rapid detection of pathogenic bacteria [J]. *Int J Pediatr*, 2017, (5): 332.
- [13] 许俊刚, 靳晓利, 张国强. 基因芯片法和培养法在细菌性痢疾中的应用对比[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(23): 4049–4050.
XU JG, JIN XL, ZHANG GQ. Comparison of gene chip method and culture method in bacterial dysentery [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2015, 25(23): 4049–4050.
- [14] GB 4789. 7—2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验[S].
GB 4789. 7—2013 National food safety standard, Food microbiology examination, *Vibrio parahaemolyticus* test [S].
- [15] SN/T 4603—2016 出口食品及水体中产毒副溶血性弧菌常见致病基因检测方法 多重 PCR 及多重实时荧光 PCR 法[S].
SN/T 4603—2016 Methods for detection of common pathogenic genes of *Vibrio parahaemolyticus* in exported food and water: Multiple PCR and multiple real-time PCR [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



田 卓, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: tianzhuo1113@163.com



麻丽丹, 正高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 2212097@163.com