

凌莉,席静,王莹,等. 重组酶聚合酶扩增技术(RPA)检测创伤弧菌[J]. 江苏农业科学,2020,48(4):73-76.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.011

重组酶聚合酶扩增技术(RPA)检测创伤弧菌

凌莉^{1,2}, 席静^{1,2}, 王莹¹, 周广彪³, 刘婧文^{1,2}, 魏霜¹, 李志勇^{1,2}

(1. 广东检验检疫技术中心, 广东广州 510623; 2. 广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室, 广东广州 510623;
3. 汕头海关, 广东汕头 515031)

摘要:为建立创伤弧菌的重组酶聚合酶扩增技术(RPA)检测方法,根据编码创伤弧菌 DNA 促旋酶的 B 亚单位蛋白(Gyrase Beta Subunit, *gryB*)的基因保守序列,设计 RPA 特异性引物,建立创伤弧菌 *gryB* 基因的 RPA 检测方法并测试其特异性、灵敏度和应用效果。结果发现,建立的 RPA 检测方法特异性好,能够从创伤弧菌中检测到 234 bp 的特异性条带,仅需在 37 °C 下恒温反应 40 min,不需要特殊的仪器设备;该方法的灵敏度与 PCR 相当,可达到 0.1 ng/μL,应用检测结果也表明该方法与传统培养方法相当。因此,本研究建立的 RPA 方法检测 *gryB* 特异性强、灵敏度高,无需特殊的仪器设备,适合实验室快速检测。

关键词:创伤弧菌;*gryB* 基因;RPA;检测

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)04-0073-04

创伤弧菌是一种带有荚膜的革兰氏阴性嗜盐弧菌,在海水养殖的牡蛎、虾和蟹等贝类、甲壳类水生动物中分布广泛,是流行程度、危害程度最高的食源性致病菌之一^[1-2]。人食用生的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,半数以上患者可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]。当下世界上大部分沿海国家均有创伤弧菌的致病报道,我国江浙、闽粤沿海及台湾地区亦有较多的感染报道,更有数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的案例,是公众饮食健康的重大威胁之一,所以对创伤弧菌的检测在公共卫生上具有十分重要的意义^[4]。

目前,对创伤弧菌的检测仍主要依靠传统方法,即首先利用选择性培养基增菌,进而结合生化

及血清学方法进行鉴定。传统方法检测结果准确,但是存在检测效率低、检测目标单一、灵敏度低且耗时长、操作繁琐等不足。为满足致病菌快速检测的要求,技术人员发展了酶联荧光免疫检测法(VIDAS-CHL)、酶免疫法(EIA)、聚合酶链式反应(PCR)、胶体金试纸条法、API 生化鉴定试纸条法、环介导恒温扩增(LAMP)技术和实时荧光 PCR 等方法。其中,实时荧光 PCR 及 PCR 相关的其他改良技术以操作简便快捷、灵敏度高、显著优势,近年来在致病菌检测中的应用越来越广泛^[5],但荧光检测设备普遍售价偏高、产物片段偏小、引物探针设计要求较高等不可回避的缺陷,在一定程度上限制了其推广应用,尤其是不利于非实验室环境下现场检测以及基层实验室的推广应用。

RPA(recombinase polymerase amplification)是继 LAMP 之后的另一种等温核酸扩增技术^[6],该技术扩增利用单链 DNA 结合蛋白(single-stranded DNA binding protein,SSB)将双链模板 DNA 解链,在 DNA 聚合酶的作用下,引物与特定模板正确配对形成复合体,然后由 DNA 聚合酶延伸引物生成新的 DNA 互补链。该方法主要具备以下优点:(1)恒温 37 °C 下即可反应,不需要高低温度循环实现核酸解链和退火;(2)只需要 1 对引物,反应时间短,仅需 40 min;(3)结果易辨识,RPA 扩增产物具有特定大小的条带^[7],而且还可进行进一步的测序确认。

目前,国内尚未见到利用 RPA 技术检测创伤弧

收稿日期:2018-12-06

基金项目:广东省基金团队项目(编号:S2012030006235);广东省科技计划(编号:2016A050503031);广东出入境检验检疫局科技计划(编号:2017GDK48);广东省汕头市科技计划(编号:油府科[2017]166号-38)。

作者简介:凌莉(1978—),女,广东人,硕士,高级工程师,主要从事食品安全研究。E-mail:joiceling@163.com。

通信作者:李志勇,博士,研究员,主要从事食品安全研究。E-mail:lizy@iqtc.cn。

菌的报道,本研究拟根据编码创伤弧菌 DNA 促旋酶的 B 亚单位蛋白(Gyrase Beta Subunit)的 *gryB* 基因,设计 RPA 检测引物,构建创伤弧菌的 RPA 检测方法,并验证其特异性和灵敏度,建立一种快速检测创伤弧菌 *gryB* 的简便高效、特异性强、灵敏度高、适于现场应用检测的技术方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

创伤弧菌(ATCC27562)、拟态弧菌(ATCC33653)、副溶血弧菌(ATCC17802)、河流弧菌(ATCC33809)、溶藻弧菌(ATCC17749)、霍乱弧菌(ATCC39315)、哈维氏弧菌(ATCC33842)、沙门氏菌(ATCC14028)、大肠埃希菌(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)和单增李斯特菌(ATCC19114)均为本机构购买的标准菌株,其购买来源为中国科学院水生生物研究所、广东食品微生物安全工程技术研究开发中心和美国 MBL 公司。应用检测的样品均为本机构 2016 年法定和委托检验中的留样,所用细菌基因组 DNA 提取试剂盒为天根生化科技有限公司产(货号 DP302),引物由上海生物工程技术有限公司安排合成,电泳级琼脂糖、DNA Marker 及显色剂购自宝生物大连生物技术有限公司, RPA 扩增试剂盒为 TwistDX 公司产 TwistAmp Basic kits。

1.2 主要仪器与设备

PCR 扩增仪(Veriti, ABI 公司)、核酸蛋白分析仪(ND-1000, Thermo 公司)、电泳仪(DYY-6C, 北京六一)、凝胶成像系统(Tanon-1600, 天能公司)。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取 先将上述标准菌株按照国家标准 GB4789 进行复壮增菌及生化鉴定,再参照试剂盒说明书,提取上述增菌液的基因组 DNA,使用核酸蛋白分析仪检测 DNA 浓度及纯度并统一稀释为 100 ng/ μ L 备用。

1.3.2 引物设计 参考 RPA 引物设计的要求,根据 *gryB* 基因的保守序列,使用 Oligo V6.22 软件进行引物的设计和筛选,入选序列再利用 Primer Blast 工具(NCBI 官方网站提供)进行特异性确认,最终交由上海生物工程技术有限公司安排合成。最终设计检测创伤弧菌的 RPA 检测引物,扩增条带 234 bp,序列具体如下:上游引物:5'-GCTTGAATACCACCTTCATACATGAAGTGATC-3';下游引物:

5'-TCATGGTGTGCCTGATGCACCGCTTGCTAT-3'。

1.3.3 RPA 检测方法建立 以“1.3.1”节中制备的 DNA 为模板,采用上述引物进行 RPA 扩增,同时设置超纯水为阴性对照,测试恒温 37 °C 反应时长分别为 30、40、50、60 min 时的扩增效果。RPA 扩增体系的配制方法如下:向含有冻干酶粉的 0.2 mL Twist Amp 反应管(Twist Amp Basic kits, Twist)中加入再水化缓冲液(Rehydration Buffer)29.5 μ L,去离子水 12.5 μ L,上、下游引物各 2 μ L(终浓度为 0.4 μ mol/L),模板 DNA 1.0 μ L,最后再加入醋酸镁溶液 2.5 μ L(280 mmol/L)。RPA 反应结束后,向 RPA 扩增产物中加入 50.0 μ L 苯酚/氯仿溶液,充分混匀后 12 000 r/min 离心 2 min,取上清液 5 μ L 点样于 1.5% 琼脂糖凝胶,使用 1 \times TBE 缓冲液进行电泳,电泳条件为 5 V/cm,恒压电泳 40 ~ 60 min,最终在凝胶成像系统上观察结果。

1.3.4 RPA 检测方法特异性评价 按照“1.3.3”节的 RPA 检测反应体系及适用扩增时长,对前述 11 种标准菌株的基因组 DNA 进行检测,对所建立的 RPA 检测方法特异性进行评价。

1.3.5 RPA 检测方法灵敏度评价 将创伤弧菌基因组 DNA 进行 10 倍梯度稀释,共 5 个稀释度,以梯度稀释的 DNA 为模板,按照“1.3.3”节所示 RPA 检测反应体系进行 RPA 灵敏度试验,并与蒋蔚等报道的 PCR 检测方法的灵敏度^[8]进行比较,评价 RPA 检测方法的灵敏度。

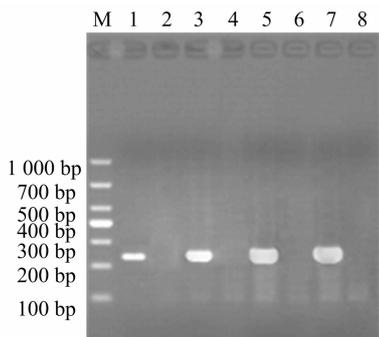
1.3.6 RPA 检测方法应用效果评价 选取本机构 2016 年检测留样样品 50 份,包括 20 份阳性样品,其中创伤弧菌确认阳性检出 2 份。样品主要为冻虾仁、冻凤尾对虾、冻牡蛎、活青蟹、金鲳鱼以及水质监控样本,参考食品卫生微生物学检验国家标准进行样品处理,使用碱性蛋白胨水增菌培养 10 h,取 2 mL 增菌液离心富集,使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,货号 DP302)提取 DNA,使用建立的 RPA 方法进行创伤弧菌检验,以结果的一致性来评价方法的应用效果。

2 结果与分析

2.1 RPA 检测方法的构建

以创伤弧菌标准菌株基因组 DNA 为模板,并以超纯水为阴性对照,测试了不同扩增时长的 RPA 检测效果,由图 1 可知,在 40 min 时便可达到较为理

想的扩增效果, *gryB* 扩增条带与预期目的条带大小一致, 约 234 bp, 阴性对照没有条带, 建立的 RPA 检测体系能够准确检测到 *gryB* 基因。

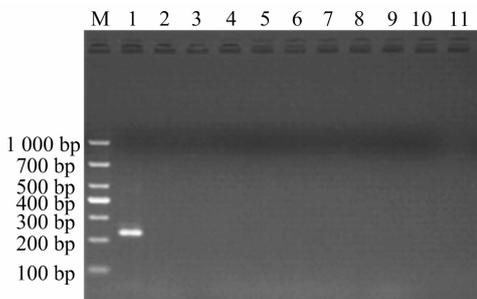


M—Marker DL 1000; 1、3、5、7—创伤弧菌; 2、4、6、8—阴性对照; 1~2 为 30 min、3~4 为 40 min、5~6 为 50 min、7~8 为 60 min

图1 RPA 技术检测 *gryB* 基因的扩增时长结果

2.2 RPA 检测方法的特异性评价

由图 2 可知, *gryB* 的 RPA 特异性评价结果显示, 创伤弧菌能够检测到 234 bp 的特异性条带, 其他 10 株标准菌株: 拟态弧菌、副溶血弧菌、河流弧菌、溶藻弧菌、霍乱弧菌、哈维氏弧菌、沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌均未检测到条带, 说明该方法具有较强的特异性。



M—Marker DL 1000; 1—创伤弧菌; 2—拟态弧菌; 3—副溶血弧菌; 4—河流弧菌; 5—溶藻弧菌; 6—霍乱弧菌; 7—哈维氏弧菌; 8—沙门氏菌; 9—大肠杆菌; 10—金黄色葡萄球菌; 11—单增李斯特菌

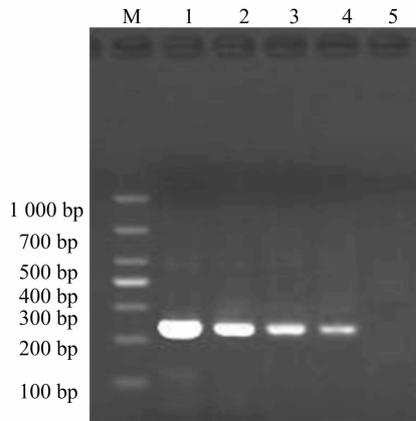
图2 *gryB* 基因的 RPA 特异性检测结果

2.3 RPA 检测方法的灵敏度评价

灵敏度测试结果(图 3)显示, 当 RPA 检测方法反应时间为 40 min, DNA 含量为 0.1 ng 时, 可检测 234 bp 大小目的条带, 该灵敏度结果与蒋蔚等建立的检测创伤弧菌 *groEL* 基因的 PCR 方法一致; 当 DNA 含量为 0.01 ng 时, 2 种方法均未能扩增到目的条带, 说明 RPA 方法与 PCR 方法的灵敏度相当。

2.4 RPA 检测方法的应用效果

应用建立的 RPA 检测方法, 对本机构 2016 年检测的 20 份阳性检出留样(其中创伤弧菌确认阳性检出 2 份)和 30 份阴性留样进行了复检, 结果共



M—Marker DL 1000; 1~5—模板 DNA 的用量依次为 100、10、1、0.1、0.01 ng

图3 *gryB* 基因的 RPA 检测灵敏度

有 2 份样本检出创伤弧菌, 该留样检测结果与之前传统培养及生化鉴定的结果完全一致, 表明该方法具有较好的应用效果。

3 讨论

RPA 技术是近些年兴起的常温扩增技术, 目前在病毒、病原菌及转基因的检测中均有成功应用的先例^[8-14], 但尚未见创伤弧菌的相关研究报道。本研究建立了针对创伤弧菌特异性 *gryB* 基因的 RPA 检测方法, 并对该方法进行了应用测试, 结果显示该方法特异性强, 灵敏度与普通 PCR 相当, 可较好应用于水生动物及其加工产品的检测, 且反应耗时短、对设备依赖程度低, 适合基层单位和现场检测使用, 为创伤弧菌的疫情监控、污染监测等提供了更为简便高效的解决手段。

研究表明, *gryB* 基因与 DNA 复制、限制、修饰和修复相关, 在细菌 DNA 的转录和复制中发挥重要作用, 近年来常被选用于细菌系统发育分析及细菌鉴定^[15-16]。本研究亦是基于 *gryB* 基因保守序列建立了 RPA 检测方法, 在特异性、灵敏度及应用检测方面上也均达到了预期效果。

RPA 技术最大的优点在于在 37 °C 恒温反应, 不需要进行复杂的反应参数优化, 本研究也只是对比测试不同反应时长的扩增效果, 发现在 40 min 时扩增产物基本可满足检测需求, 考虑时效性及污染防控, 未选用扩增更长但可能更灵敏的反应参数。此外, RPA 技术反应温度接近人体温, 可不依赖 PCR 扩增仪, 有学者利用该特性建立了一种仅仅利用人体温度即能完成 DNA 扩增的 RPA 检测方法^[17], 显著拓展了该技术的应用条件。

灵敏度是评价检测方法优劣的一个关键参数,本研究建立的 RPA 技术用于检测 *gryB* 方法,其灵敏度和普通 PCR 方法相当,也与已报道的 LAMP 检测方法^[18-20]相当。但 RPA 技术相比普通 PCR,反应更为快速(仅需 30~40 min),且不依赖 PCR 仪;同时相比 LAMP、RPA 技术引物设计难度小,产物片段单一,便于后续进行测序确证,具有更高的实用价值。

同 PCR 方法一样,RPA 技术也是扩增检测特定基因序列,该序列与目标菌的性状及行为表现并无必然的对应关系,当目标菌数量较少、活力较弱时,使用传统微生物检验方法不一定能检出为阳性,故在应用检测中可能存在假阴性问题^[21]。本研究建立的 RPA 检测方法,对本机构的 50 例留样的应用检测并未发现假阴性问题,可能与研究的样本数量偏小有关。

当然,RPA 技术作为一种后起的检测手段,也有不足之处需要完善。首先,RPA 体系对于蛋白活性要求比较高,需要保证体系中的各种酶触反应准确进行,其技术的提升依赖现代酶学的发展应用;其次,RPA 扩增体系中存在大量蛋白酶,故直接电泳无法分辨出目的核酸片段,必须经过纯化去除蛋白质^[7];再次,RPA 的关键技术有知识产权的保护,试剂成本相对较高。但 RPA 技术作为一种新的核酸扩增技术,具有特异性强、灵敏度高、操作快速便捷等优点,被誉为“一种可替代 PCR 的技术”,在病原体检测及食品安全等众多领域已经有了越来越多的推广应用,技术发展及应用前景均较为广阔。

参考文献:

- [1] 王一梅,熊燕,梁建生,等. 洪涝渍水中检出 1 株创伤弧菌[J]. 中国卫生检验杂志,2016,26(24):3643-3644.
- [2] 陈佳璇,邓志爱,和鹏,等. 2014 年广州市生吃水产品中创伤弧菌污染状况调查分析[J]. 医学动物防制,2017,33(6):664-666.
- [3] 张晶,张欣强,周勇,等. 广州地区海产品中创伤弧菌病原学特征分型[J]. 中国食品卫生杂志,2016,28(4):422-425.
- [4] 陈乐川,朱红军,周泽妍,等. 汕头地区 4 例散发创伤弧菌感染的实验室诊断[J]. 中国感染控制杂志,2016,15(4):272-276.
- [5] 李丹丹,徐义刚,邱索平,等. 基于 *vvhA* 基因检测创伤弧菌实时荧光 PCR 方法的建立[J]. 食品与机械,2016,32(9):31-33,70.
- [6] Lutz S, Weber P, Focke M, et al. Microfluidic lab-on-a-foil for nucleic acid analysis based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA) Lab chip [J]. Lab on a Chip, 2010, 10(7): 887-893.
- [7] 张娜,乾义柯,魏霜,等. 基于重组酶聚合酶扩增技术(RPA)的葡萄卷叶伴随病毒 3 号检测方法[J]. 新疆农业科学, 2016, 53(2):302-308.
- [8] 蒋蔚,易力,陈永军,等. 水产品中霍乱弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国动物传染病学报, 2016, 24(1):44-51.
- [9] Milena E, Yongjie W, Peter O, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of francisella tularensis [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(2):232-234.
- [10] Boyle D S, Lehman D A, Lillis L, et al. Rapid detection of HIV-1 proviral DNA for early infant diagnosis using recombinase polymerase amplification [J]. mBio, 2013, 4(2):49-52.
- [11] 刘冬虹,王德莲,郭燕华,等. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展[J]. 检验检疫学刊, 2016(5):65-68.
- [12] 王建昌,王金凤,刘立兵,等. 非洲猪瘟病毒 RPA 等温检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2016(7):78-81, 94.
- [13] 魏梅生,田茜,赵文军,等. 番茄细菌性叶斑病菌 RPA 检测技术[J]. 植物保护, 2016(1):150-153.
- [14] 邓婷婷,黄文胜,程奇,等. 重组酶聚合酶扩增技术检测转基因水稻中的 *CryIAb/c* 基因[J]. 中国食品学报, 2015(3):187-193.
- [15] 张新中,张世秀,李海平,等. 多重 PCR 在创伤弧菌快速检测中的应用[J]. 水产科学, 2007, 26(12):668-670.
- [16] 郝云婕,韩素贞. *gryB* 基因在细菌系统发育分析中的应用[J]. 生物技术通报, 2008, 2(2):39-41.
- [17] Crannell Z A, Rohman B, Richards-Kortum R. Equipment-Free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat [J]. PLoS One, 2014, 9(11):146.
- [18] Kiddle G, Hardinge P, Buttigieg N, et al. GMO detection using a bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use [J]. BMC Biotechnology, 2012, 12(1):15.
- [19] 周顺,高志鑫,张敏. 创伤弧菌和副溶血弧菌双重 LAMP 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(11):1875-1881.
- [20] 张丽娜,王明义,杨小蕾,等. 海洋创伤弧菌 LAMP 快速诊断方法的建立与评价[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(5):577-579, 582.
- [21] 谢朝梅,肖慧芳,刘保湘,等. 水产品中霍乱弧菌 4 种检测方法的效果比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(8):1119-1121.