

# EMA 结合 PCR 技术有效鉴别副溶血弧菌死活细胞

李青, 钟青萍, 王丽

(广东省高等学校食品质量安全重点开放实验室, 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

**摘要:**将 EMA (Ethidium monoazide) 选择渗透性和 PCR 技术相结合, 建立检验副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 死活细胞的 EMA-PCR 新方法. 研究表明, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  或更高质量浓度的 EMA 可以抑制  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 的副溶血弧菌死细胞 DNA 的扩增, 未经 EMA 处理的对应样品 PCR 反应呈阳性; 而用相同浓度 EMA 处理  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 的活细胞菌悬液能扩增出目的产物. 同时, 对 EMA 处理中卤素灯的曝光时间进行优化, 确定 EMA 处理的最佳曝光时间为 5 ~ 10 min. 结果证明, 该方法是一种快速有效的检测死活细胞的新方法, 能有效避免 PCR 检测假阳性结果的出现.

**关键词:**EMA; PCR; 副溶血弧菌; 死活细胞

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)01-0108-04

## Use of Ethidium Monoazide-Polymerase Chain Reaction for Differentiation of the Viable and Dead Cells of *Vibrio parahaemolyticus*

LI Qing, ZHONG Qing-ping, WANG Li

(The Higher Education Key Lab of Guangdong Province-Food Quality and Safety, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** A new method with the viable/dead stain ethidium monoazide (EMA) in combination with PCR (EMA-PCR) was developed. The results showed that the use of 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  or more of EMA completely inhibit the PCR amplification of DNA derived from dead *Vibrio parahaemolyticus* cells containing  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL, but the samples without EMA treatment were PCR positive. The use of the same concentration of EMA did not inhibit the PCR amplification of DNA derived from viable bacteria. Meanwhile, the light exposure time to active and photolyze EMA was optimized, and the optimal light exposure time was 5 - 10 min. It is concluded that the EMA-PCR technique may provide an efficient new approach for distinction between the viable and dead cells and efficiently avoid false positive results.

**Key words:** EMA; PCR; *Vibrio parahaemolyticus*; viable and dead bacteria

副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 是一种嗜盐性细菌, 主要分布于沿岸海水、海河交界处及海产品中, 并能以水和水生生物等为媒介, 引起人类肠胃炎或食物中毒. 轻症患者会出现腹泻、肠痉挛、恶心、呕吐等症状<sup>[1]</sup>, 重症患者还会脱水、休克昏迷, 甚至死亡. 近年来, 副溶血性弧菌引起的食物中毒次数略高于沙门氏菌 *Salmonella* sp. 引起的食物中毒次数, 成为微生物食源性疾病的首要病因, 特别是在一些沿海城市, 由该菌引起的食物中毒占细菌性食物中毒

总数的 61% 以上<sup>[2-3]</sup>, 严重威胁人们的身体健康, 越来越受到水产养殖和公共卫生机构的重视. 目前, 该病原菌的检测方法主要采用选择性培养、生理生化鉴定、传统 PCR、实时定量荧光 PCR 等分子生物学方法以及血清学反应等技术<sup>[4]</sup>. 但基于 DNA 的 PCR 检测方法因其都能从活细胞和死细胞中扩增出目的基因<sup>[5-6]</sup>, 从而无法有效地区分活细胞和死细胞, 易出现假阳性结果, 具有较低的准确性. 因而研究一种有效区分活细胞和死细胞的方法在食品卫生检验

收稿日期: 2010-01-21

作者简介: 李青 (1985—), 女, 硕士研究生; 通信作者: 钟青萍 (1967—), 女, 副教授, 博士, E-mail: zhongqp@scau.edu.cn

基金项目: 广东省农业攻关重点专项 (2009A020101004)

及进出口商品检疫工作中十分重要. EMA (Ethidium monoazide) 是一种 DNA 结合染料, 能渗透到细胞壁或细胞膜不完整的死细胞内, 在光激活的作用下, 易形成氮宾化合物进而与 DNA 或其他分子共价结合<sup>[7-8]</sup>, 从而抑制死细胞 DNA 的扩增, 此方法已在国内外医学及食品安全检测中应用<sup>[9-11]</sup>. 本研究将 EMA 选择渗透性和 PCR 检测技术相结合, 旨在建立一种有效、快速检测鉴别副溶血弧菌的死活细胞的新方法.

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株

副溶血弧菌购自中国普通微生物菌种保藏中心, 菌株在 15~20 °C 条件下保存于  $\rho(\text{NaCl})$  为 30 g/L 的营养琼脂斜面.

### 1.2 主要试剂与仪器设备

EMA 购自美国 Biotium 公司; TaqDNA 聚合酶、10 × PCR Buffer (含 15 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ )、dNTPs、DNA Maker、6 × Loading Buffer、EB 核酸染料、琼脂糖均购自广州东盛生物科技公司. 所有试剂均为分析纯. 650 W 卤素灯购自德国 Osram 公司; PCR 仪、凝胶成像系统购自德国 Biometra 公司.

### 1.3 增菌培养

将副溶血弧菌标准菌株接种于  $\rho(\text{NaCl})$  为 30 g/L 的 LB 液体培养基中, 30 °C 摇床 (120 r/min) 过夜培养.

### 1.4 胁迫条件

2 种致使细胞死亡的条件: 取 1 mL 上述菌悬液于 1.5 mL 离心管中, 95 °C 水浴加热处理 5 min, 取 100  $\mu\text{L}$  涂于营养琼脂平板, 30 °C 培养 24 h 后观察计数.

取 1 mL 上述菌悬液于 1.5 mL 的离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重悬于异丙醇 ( $\varphi_{\text{终}}$  为 70%) 中 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用生理盐水洗涤, 重悬于 1 mL LB 培养液中. 取 100  $\mu\text{L}$  涂于营养琼脂平板, 30 °C 培养 24 h 后观察计数<sup>[12]</sup>.

### 1.5 PCR 反应

引物合成: 根据文献<sup>[13]</sup>报道的 *tlh* 基因序列设计引物, 委托上海英骏生物技术公司合成引物, 引物序列: 上游引物 5'-AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG-3'; 下游引物 5'-GCTACTTCTAGCATTTTCTCTGC-3', 扩增片段长度约为 450 bp.

PCR 反应体系: 10 × Buffer (含 20 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ ) 5  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTP 2  $\mu\text{L}$ , 0.6  $\mu\text{mol/L}$  引物 2  $\mu\text{L}$ , TaqDNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$  (5 U/ $\mu\text{L}$ ), DNA 模板 4  $\mu\text{L}$ , 加水补足到 50  $\mu\text{L}$ .

PCR 反应的循环参数: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 终延伸 72 °C 7 min. 产物于 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分析.

## 1.6 EMA-PCR 反应及条件优化

1.6.1 不同浓度 EMA 处理不同浓度的副溶血弧菌活/死细胞 取不同浓度的副溶血弧菌活/死细胞菌悬液 ( $2.0 \times 10^7$ 、 $2.0 \times 10^8$  和  $2.0 \times 10^9$  CFU/mL) 各 1 mL 置无菌离心管中, 分别加入不同浓度的 EMA 并置于黑暗中 5 min, 将离心管置于冰上且打开管盖, 用 650 W 卤素灯曝光 10 min<sup>[9]</sup>, 对菌液提取 DNA, 进行 PCR 扩增和电泳分析.

1.6.2 优化曝光时间 取  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 的副溶血弧菌活/死细胞菌悬液各 1 mL, 置无菌离心管中, 加入终质量浓度为 25  $\mu\text{g/mL}$  的 EMA, 并置于黑暗中 5 min, 将离心管置于冰上且打开管盖, 用 650 W 卤素灯曝光, 选取曝光时间分别为 1、5、10 和 15 min, 再对菌液提取 DNA, 进行 PCR 扩增和电泳分析.

1.6.3 EMA 溶液处理不同活细胞比例的副溶血弧菌混合菌悬液 用副溶血弧菌活细胞菌悬液和死细胞菌悬液 (均为  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL) 配制成含有 100%、75%、50%、25%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1% 和 0 的活细胞菌悬液混合体系, 分别加入 25  $\mu\text{g/mL}$  的 EMA 并置于黑暗处 5 min, 将离心管置于冰上且打开管盖, 曝光处理 10 min 后, 进行 PCR 扩增和电泳分析.

## 2 结果与分析

### 2.1 胁迫条件对副溶血弧菌生长的影响

分别用热处理和异丙醇处理副溶血弧菌, 结果表明, 95 °C 热处理 5 min, 或用异丙醇处理后, 该菌已完全失活, 平板菌落数为 0. 因此, 确定副溶血弧菌的死亡条件, 由此处理获得的副溶血弧菌死菌用于后续试验.

### 2.2 不同浓度 EMA 对不同浓度副溶血弧菌活细胞的影响

将浓度为  $2.0 \times 10^7$ 、 $2.0 \times 10^8$  和  $2.0 \times 10^9$  CFU/mL 的活细胞菌悬液经过不同浓度 EMA 渗透和曝光处理后, 提取 DNA 进行 PCR 扩增, 产物于 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分析. 结果表明,  $2.0 \times 10^7$ 、 $2.0 \times 10^8$  和  $2.0 \times 10^9$  CFU/mL 的副溶血弧菌活细胞菌悬液经过不同浓度 EMA 处理后, 均能扩增出 450 bp 目的基因, 当 EMA 浓度高达 100  $\mu\text{g/mL}$  时, 仍能扩增出 450 bp 目的基因 (图 1).

### 2.3 不同浓度 EMA 对不同浓度副溶血弧菌的死细胞的影响

将浓度为  $2.0 \times 10^7$ 、 $2.0 \times 10^8$  和  $2.0 \times 10^9$  CFU/mL 的热处理菌悬液 (95 °C, 5 min) 经过不同浓

度 EMA 渗透和 10 min 曝光处理后,提取 DNA 进行 PCR 扩增,产物于 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分析. 结果表明,  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 的热处理菌悬液能扩增出 450 bp 目的基因,但随着 EMA 浓度的增加,其扩增产物的亮度逐渐减弱,当 EMA 质量浓度为 25  $\mu\text{g/mL}$  或更高时,曝光 10 min 后,无扩增产物,表明 25  $\mu\text{g/mL}$

的 EMA 可以抑制  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 的死细胞菌悬液 DNA 扩增(图 2a). 40  $\mu\text{g/mL}$  的 EMA 可以抑制  $2.0 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液死细胞 DNA 扩增(图 2b). 45  $\mu\text{g/mL}$  的 EMA 可以抑制  $2.5 \times 10^9$  CFU/mL 的死细胞菌悬液 DNA 扩增(图 2c). 异丙醇处理后的死细胞菌悬液经上述同样处理后得到相同的结果(图略).

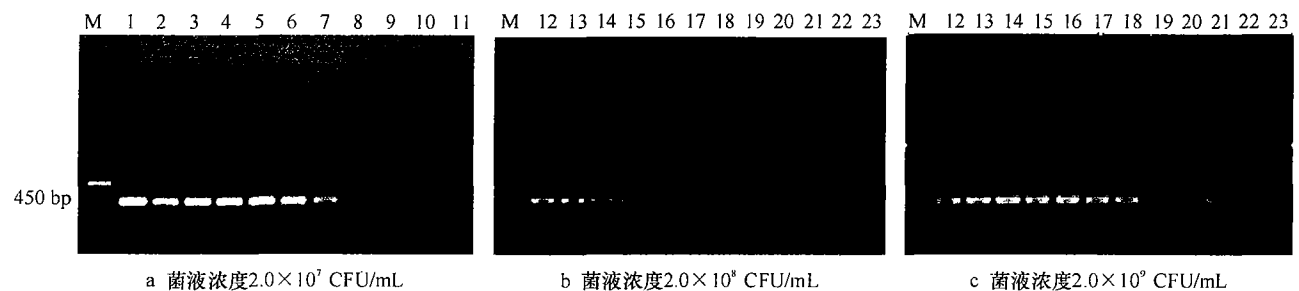


Fig. 1 Effects of different concentrations of EMA on PCR of different concentrations of viable cells of *Vibrio parahaemolyticus*

图 1 不同浓度 EMA 对不同浓度副溶血弧菌活细胞 PCR 的影响

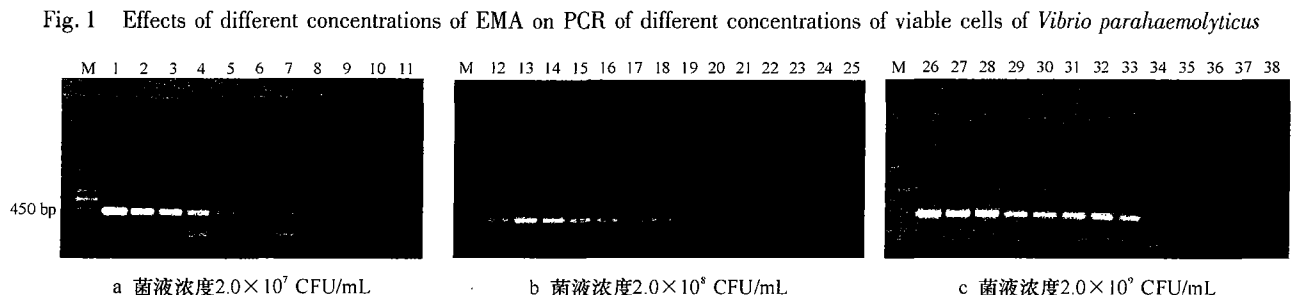


Fig. 2 Effects of different concentrations of EMA on PCR of different concentrations of dead cells of *Vibrio parahaemolyticus*

图 2 不同浓度 EMA 对不同浓度副溶血弧菌死细胞 PCR 的影响

#### 2.4 曝光时间优化

将浓度为  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 的活细胞菌悬液经过 25  $\mu\text{g/mL}$  的 EMA 渗透,分别曝光 1、5、10 和 15 min 处理后,均能扩增出 450 bp 目的基因. 浓度为  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 的死细胞菌悬液经过 25  $\mu\text{g/mL}$  的 EMA 渗透,分别曝光 1、5、10 和 15 min 处理后,经 PCR 扩增,电泳结果表明均无扩增产物(图 3).

结果表明,经 25  $\mu\text{g/mL}$  的 EMA 渗透、曝光 1 min 处理后,可抑制  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 的死细胞 DNA 的扩增. 此结果与其他文献报道<sup>[7,9]</sup>相一致. 本试验选择 5~10 min 为最佳的曝光时间,以保证多余的 EMA 全部被光分解,从而不影响 PCR 扩增结果.

#### 2.5 EMA 溶液处理不同活细胞比例的副溶血弧菌混合菌悬液

利用 25  $\mu\text{g/mL}$  的 EMA 处理  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 活细胞和死细胞菌悬液配制的 100%、75%、50%、25%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1% 和 0 的活细胞混合体系,PCR 扩增结果表明,  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL

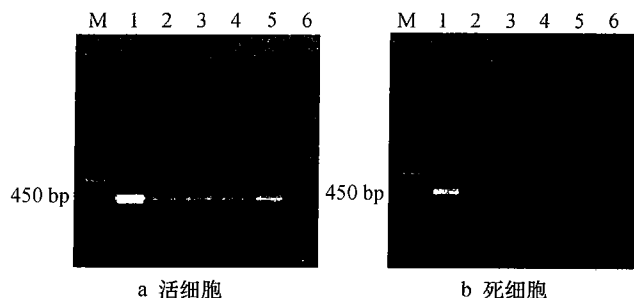
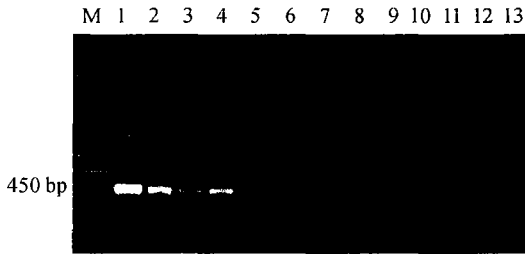


Fig. 3 Effects of different light exposure times on EMA-PCR of viable or dead cells of *Vibrio parahaemolyticus*

图 3 不同曝光时间对副溶血弧菌活/死细胞 EMA-PCR 反应的影响

图 3 Effects of different light exposure times on EMA-PCR of viable or dead cells of *Vibrio parahaemolyticus*

的菌悬液配制的混合体系,经过 25  $\mu\text{g/mL}$  的 EMA 处理后,随着活细胞数的减少,其扩增产物的亮度逐渐减弱,当活菌比例低于 3% 时,则不能扩增(图 4). 由此可见,当活菌比例低于 3% 时,混合体系中细胞 DNA 就能被 EMA 抑制扩增.



M: DL2000 DNA Marker; 1~12:  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 菌悬液中活菌比例分别为 100%、75%、50%、25%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1% 和 0; 13: 阴性。

图4 EMA处理不同活细胞比例的副溶血弧菌混合菌悬液的PCR扩增结果

Fig. 4 The PCR results of viable and dead cell mixtures treated with EMA

### 3 讨论与结论

目前,以DNA为基础的PCR检测方法能从活细胞和死细胞中扩增出目的基因,从而无法有效地区分细胞的死活,死细胞或自由状态的DNA已经没有危害性却仍然被检测出来,导致假阳性结果,具有较低的准确性。而利用EMA选择渗透性和PCR技术(EMA-PCR)相结合的方法,能够有效地检测鉴别细菌的死活细胞,能够有效地为食源性疾病的预防和控制提供可靠证据。EMA染料能渗透到细胞壁或细胞膜不完整的死细胞内,与DNA共价结合,而这种结合是不可逆的结合<sup>[14]</sup>,从而抑制死细胞DNA的扩增,而活细胞完整的细胞壁或细胞膜能阻止EMA渗透到活细胞内,从而对活细胞的DNA不起作用。

冯建军等<sup>[8]</sup>发现用  $2.0 \mu\text{g/mL}$  或更高浓度的EMA渗透处理含有  $10^6$  CFU/mL 西瓜细菌性果斑病菌死细胞,曝光处理 10 min 后,其PCR结果呈阴性。 $2.0 \text{ mg/L}$  的EMA在一定程度上能鉴别种子混合体系中该病原菌死活细胞。Cawthorn等<sup>[15]</sup>研究表明当用  $50 \mu\text{g/mL}$  或更高质量浓度的EMA渗透处理一种肠杆菌 *Enterobacter sakazakii* 死细胞时,能够完全有效地抑制其死细胞DNA的扩增。本研究结果表明,  $25 \mu\text{g/mL}$  或更高质量浓度的EMA可以抑制  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 的副溶血弧菌死细胞DNA的扩增,而同浓度EMA对活细胞DNA扩增没有影响。

本研究建立的EMA-PCR检测方法是一种有效、快速检测鉴别副溶血弧菌的死活细胞的新方法,可避免在实际样品检测中产生假阳性的结果,为食品卫生检验及进出口商品检疫工作提供科学方法和理论基础。

#### 参考文献:

[1] LEE K, LIU Ping-chung, HUANG Chi-yang. *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk ab-

alone[J]. *Microbes and Infection*, 2003, 5(6): 481-485.

- [2] 刘弘, 科家, 杨召萍, 等. 上海市集体性食物中毒分析[J]. *上海预防医学杂志*, 2003, 15(11): 454-456.
- [3] 陈瑞英, 鲁建章, 苏意诚, 等. 食品中副溶血性弧菌的危害分析、检测与预防控制[J]. *食品科学*, 2007, 28(1): 341-345.
- [4] 谭翰清, 万成松. 副溶血性弧菌快速检测研究进展[J]. *华南预防医学*, 2004, 30(1): 21-23.
- [5] JOSEPHSON K L, GERBA C P, PEPPER I L. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 3513-3515.
- [6] MASTERS C I, SHALLCROSS J A, MACKEY B M J. Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction[J]. *Applied Bacteriology*, 1994, 77: 73-79.
- [7] BOLTON P H, KEARNS D R. Spectroscopic properties of ethidium monoazide: A fluorescent photoaffinity label for nucleic acids[J]. *Nucleic Acids Research*, 1978, 5: 4891-4903.
- [8] 冯建军, 金志娟, 刘西莉, 等. 一种DNA染料结合聚合酶链反应检测鉴别植物病原细菌死活细胞[J]. *高等学校化学学报*, 2008, 29: 944-948.
- [9] NOGVA H K, DROMTORP S M, NISSEN H, et al. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR[J]. *BioTechniques*, 2003, 34: 804-813.
- [10] WANG Shi-shan, LEVIN R E. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR[J]. *Microbiol Methods*, 2006, 64: 1-8.
- [11] RUDI K, MOEN B, DROMTORP S M, et al. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 1018-1024.
- [12] NOCKER A, CAMPER A K. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 1997-2004.
- [13] ASIM K B, DONALD P P, CYNTHIA W, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiples PCR amplification of *tl. tdh* and *trh* [J]. *Journal of Microbiology Methods*, 1999, 36: 215-225.
- [14] JOLA M, PISZ, JOHN R L. Differentiation of genes extracted from non-viable versus viable micro-organisms in environmental samples using ethidium monoazide bromide[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 71: 312-318.
- [15] CAWTHORN D M, WITTHUHN R C. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105: 1178-1185.

【责任编辑 李晓卉】