

霍乱弧菌 O1 群与 O139 群产毒株多酶恒温快速扩增检测方法的建立

丁卫平¹, 张士财¹, 伊廷存², 刘凤莲¹, 刘晓鹏¹, 赵志强¹, 霍胜楠², 钟棋宝³, 蔡磊³

1. 滨州市检验检测中心, 山东 滨州 256603; 2. 山东省食品药品检验研究院; 3. 浙江工商大学食品与生物工程学院

摘要:目的 建立一种霍乱弧菌 O1 群与 O139 群产毒株快速准确的检测方法。方法 基于多酶恒温快速扩增技术, 根据霍乱弧菌溶血素编码基因、霍乱毒素编码基因、O1 群与 O139 群 O 抗原编码基因设计引物与探针, 初步建立检测方法。以不同血清型霍乱弧菌及其它细菌 DNA 为模板, 验证检测方法的特异性与灵敏度。结果 配制反应体系时, 按试剂盒说明书推荐加入量 0.6 μL 加入探针时可成功扩增溶血素编码基因、霍乱毒素编码基因及 O1 群与 O139 群 O 抗原编码基因 4 个目的基因, 针对上述 4 个基因分别优化探针加入量为 1.0 μL 、1.0 μL 、1.0 μL 、0.8 μL 时扩增效率更高。对优化探针加入量的检测方法进行方法特异性验证时, 各引物探针组合不与非目标菌 DNA 产生交叉反应。进行检测方法的灵敏度分析时, 不同目的基因的基因组检测灵敏度为 70 fg 或 290 fg。上述实验结果证明检测方法的灵敏度及特异性满足设计要求。结论 建立了一种霍乱弧菌 O1 群与 O139 群产毒株检测的新方法, 该方法特异性强、灵敏度高、检测时间短, 可适用于霍乱弧菌的常规检测及快检, 对霍乱的预防具有一定的积极作用。

关键词:多酶恒温快速扩增; 霍乱弧菌; 产毒株; 检测

中图分类号: R117 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2024)04-705-08

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202308063

Establishment of multienzyme isothermal rapid amplification method for detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 toxigenic strains

DING Wei-ping*, ZHANG Shi-cai, YI Ting-cun, LIU Feng-lian, LIU Xiao-peng,

ZHAO Zhi-qiang, HUO Sheng-nan, ZHONG Qi-bao, CAI Lei

* Binzhou Testing Center, Binzhou, Shandong 256603, China

Abstract: Objective To establish a rapid and accurate method for the detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 toxigenic strains. **Methods** On the basis of multienzyme isothermal rapid amplification technology, primers and probes were designed according to the hemolysin coding gene, cholera toxin coding gene and O antigen coding genes of *Vibrio cholerae* O1 and O139, and the detection method was preliminarily established. With DNA of different Serotypes of *Vibrio cholerae* and other bacteria used as templates, the specificity and sensitivity of the detection method was verified. **Results** When the probe addition amount of the reaction system was 0.6 μL as recommended by kit instructions, it could successfully amplify four target genes including hemolysin coding gene, cholera toxin coding gene, and O antigen coding genes of *Vibrio cholerae* O1 and O139. When the probe addition amount was respectively optimized to 1.0 μL , 1.0 μL , 1.0 μL , 0.8 μL of the above-mentioned four genes, the amplification efficiency was higher. After optimizing probe addition, the specificity of the detection method was verified and each primer probe combination did not cross react with non target bacterial DNA. When conducting sensitivity analysis of the detection method, the genomic detection sensitivity of different target genes was 70fg or 290fg. The above results showed that the sensitivity and specificity of the detection method meet the design requirements. **Conclusion** A new method for the detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 toxigenic strains has been established. This method has characteristics of strong specificity, high sensitivity, and short detection time. It can be applied to the routine detection and rapid detection of *Vibrio cholerae*, and has a positive role in the prevention of cholera.

Keywords: Multienzyme isothermal rapid amplification; *Vibrio cholerae*; Toxigenic strain; Detection

基金项目: 山东省市场监督管理局科研项目(202108); 浙江省基础公益研究计划项目(LY23C010002)

作者简介: 丁卫平(1983-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品药品检测

通信作者: 蔡磊, E-mail: cailei@zjgsu.edu.cn

霍乱是一种由霍乱弧菌感染所引起的强烈肠道传染病^[1], 主要由食入霍乱弧菌污染的食物或饮用污染的水源引发^[2-4], 传播性极强, 危害性极大^[5], 已经肆虐人类几个世纪, 使很多人因此而丧失生命, 是《中

华人民共和国传染病防治法》规定的两种甲类传染病之一,也是《中华人民共和国国境卫生检疫法》规定需要检疫的三种传染病之一。随着科学技术的进步,口服补液疗法、抗生素/抗菌剂和疫苗^[6]等干预措施挽救了无数霍乱患者,显著降低了霍乱患者的死亡率,益生菌和噬菌体疗法等新的干预措施正在被开发出来,但即使到现在,在一些公共卫生条件较差的国家和地区比如非洲、印度、也门、海地,每年仍有很多人因霍乱而丧命^[7-11],从世界范围内来看,霍乱的整体防控形势仍然非常严峻。我国当前霍乱疫情形势相对较为平稳,但不时仍会有一些散发及聚餐暴发的病例被报道^[12-14]。我国霍乱防控良好形势的取得有赖于我国公共卫生条件的不断进步及多年来持续的严格防控,在当前形势下,必须更加重视,防止霍乱在我国大规模暴发流行。

并非所有的霍乱弧菌都可引发霍乱^[1]。根据菌体表面脂多糖^[15]抗原(O抗原)的不同,霍乱弧菌目前已鉴定到210余个血清群;根据能否产生霍乱肠毒素^[16],霍乱弧菌又可分为产毒株与非产毒株。根据目前的研究,仅霍乱弧菌O1群、O139群产毒株会导致霍乱持续流行,而O1群与O139群非产毒株以及其它血清群霍乱弧菌只引起偶然的散发病例或导致很小规模的暴发^[17]。因此,对霍乱弧菌O1群与O139群产毒株进行准确快速地检测就显得特别重要,已成为霍乱领域的研究热点之一^[18-19]。

霍乱发病急且传播快,控制霍乱救治霍乱患者的关键在于早预防、早发现、早治疗,而早发现的前提在于对霍乱弧菌O1群及O139群产毒株进行快速准确地检测。同时,与城市相比,农村地区水源及公共卫生整体状况仍相对较差,发生霍乱感染的几率也相对更大,因此开发一种成本低、检测速度快、可现场部署、适合中国及世界广大地区特别是农村地区的霍乱弧菌O1群及O139群产毒株检测方法就显得尤为重要了。对于霍乱弧菌的检测,我国目前尚未制定国家标准,仅原国家质量监督检验检疫总局及中华人民共和国海关总署颁布了一些霍乱弧菌检验的行业标准。权威的《霍乱防治手册》第6版规定对于霍乱弧菌检测时首先对标本进行增菌分离,然后采用诊断血清凝集、生化特征、形态学等方法进行鉴定。这些行业标准及《霍乱防治手册》第6版规定的鉴定方法或耗时较长、步骤繁琐,或对检测仪器、检测人员、检测环境要求较高,无法适用于霍乱弧菌的便携式快速鉴定。

恒温核酸快速扩增技术具有操作简单、灵敏度高、检测时间短、设备要求低、抗干扰能力强的特点,被视为致病菌较为理想的便携式快速检测方法^[20],但最早发明的恒温核酸快速扩增技术—重组酶聚合

酶扩增技术^[21](Recombinase Polymerase Amplification, RPA)知识产权被国外所垄断,试剂依赖进口、价格昂贵^[22],因此国内近年来致力于研发具有自主知识产权的恒温核酸快速扩增技术。多酶恒温快速扩增技术(Multi-enzyme Isothermal Rapid Amplification, MIRA,以下均用简称)是国内研发的一种具有完整的自主知识产权的新型恒温核酸快速扩增技术,这种技术依靠多种功能蛋白(解旋酶、重组酶、单链结合蛋白、DNA聚合酶等)协同作用,在常温下实现核酸快速扩增,扩增效果与RPA相当并已在致病菌检测领域实现了广泛的应用^[23-25]。

鉴于霍乱弧菌O1群与O139群产毒株快速检测的需求及MIRA技术知识产权的自主性,本研究拟采用MIRA技术,以霍乱弧菌为研究材料,探究其不同血清型及产毒株与非产毒株基因之间的差异,旨在建立一种对霍乱弧菌O1群与O139群产毒株进行快速鉴定的方法,为霍乱弧菌防治提供支持。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株及DNA来源 霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)O139群产毒株DNA由山东省疾病预防控制中心惠赠;霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)O1群产毒株DNA由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所惠赠;产气荚膜梭菌(*C. perfringens*)ATCC13124、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)ATCC14028、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC 6538、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)ATCC17802、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)ATCC19115、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)ATCC9027、霍乱弧菌VBO(*Vibrio cholerae* VBO),购自于广东环凯微生物科技有限公司;大肠埃希氏菌O157:H7/NM(*Escherichia coli* O157:H7)ATCC43888由山东省食品药品检验研究院惠赠。

1.1.2 试剂 DNA恒温快速扩增试剂盒(荧光型):潍坊安普未来生物科技有限公司;霍乱弧菌通用引物、探针,霍乱弧菌O1群与O139群特异性引物、探针,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0;宝日医生物技术(北京)有限公司;营养肉汤培养基;北京陆桥技术股份有限公司

1.2 仪器与设备 SpectraMax QuickDrop 超微量全波长分光光度计(美谷分子仪器(上海)有限公司);LightCycler © 480 II 实时荧光定量PCR仪(瑞士罗氏);Sorvall Legend Micro 21R 冷冻型微量台式离心机(美国赛默飞世尔);SPL-350 生化培养箱(天津市莱

玻特瑞仪器设备有限公司);BSC-1500IIA2-X 生物安全柜(博科控股集团有限公司);DK-98-II 智能电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 引物与探针设计 在研究霍乱弧菌相关检验标准与研究文献的基础上,遵循潍坊安普未来生物科技有限公司提供的 MIRA 技术引物与荧光探针设计原则,本研究选择霍乱弧菌的溶血素编码基因(hlyA)、霍乱毒素编码基因(ctxA)、O1 群与 O139 群 O 抗原编码基因(rfb)设计了四对引物与探针。

1.3.2 细菌培养与核酸提取 将本研究中所用菌株按照所购买菌株说明书要求或国家标准要求进行复苏增菌,增菌液按照宝日生物(北京)有限公司细菌 DNA 提取试剂盒(TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0)的产品说明书要求,提取 DNA。提取后的 DNA 采用超微量全波长分光光度计测定质量浓度与纯度。

1.3.3 MIRA 扩增体系及优化 按照潍坊安普未来生物科技有限公司 DNA 恒温快速扩增试剂盒(荧光型)说明书的规定,常用的 MIRA 扩增体系为 50 μL ,其中各组分的量如下:A buffer,29.4 μL ;上游引物(10 μM),2 μL ;下游引物(10 μM),2 μL ;探针(10 μM),0.6 μL ;ddH₂O 和 DNA 模板,13.5 μL ;B buffer,2.5 μL 。在本研究中,DNA 模板的加入量为 2 μL 。在对扩增体系进行优化时,根据王淑娟等人的研究^[26],只针对探针加入量(0.4、0.6、0.8、1.0、1.2

μL)进行优化,根据探针加入量调整 ddH₂O 的加入量,其余试剂加入量不变,扩增体系总体积仍保持 50 μL 。本研究所用扩增程序为:39 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;39 $^{\circ}\text{C}$ 20 min,每 30 s 采集一次荧光信号。

1.3.4 MIRA 体系的特异性 在 1.3.3 优化后的体系中加入 2 μL 目标菌 DNA 作为阳性对照,2 μL ddH₂O 替代 DNA 作为空白对照,加入常见非目标菌 DNA 进行扩增检测,对该方法的特异性进行验证。

1.3.5 MIRA 检测方法的灵敏度 对霍乱弧菌 O1 群与 O139 群产毒株 DNA 进行 10 倍梯度稀释。稀释完成后,分别取 2 μL 不同浓度的 DNA 稀释液作为模板,加入探针优化后的 MIRA 体系中,根据扩增结果判断霍乱弧菌的检测灵敏度。

1.3.6 结果判断 阳性结果有类似“S”形扩增曲线,且 Ct \leq 35;阴性结果为无扩增曲线,且 Ct > 40 或未检出;若 35 < Ct < 40,需复检一次。如再次扩增后 Ct 值仍为 < 40.0,则判定检验结果阳性;如再次扩增后 Ct 值 \geq 40.0,则判定检验结果阴性。

1.3.7 数据处理及图片绘制 导出荧光定量 PCR 仪运行数据,通过软件 OriginPro 2022 进行数据处理及绘制图像。

2 结果

2.1 MIRA 检测方法引物探针序列 本研究设计的 MIRA 引物与探针序列见表 1。

表 1 MIRA 引物和探针序列

Table 1 Sequences of MIRA primers and probes

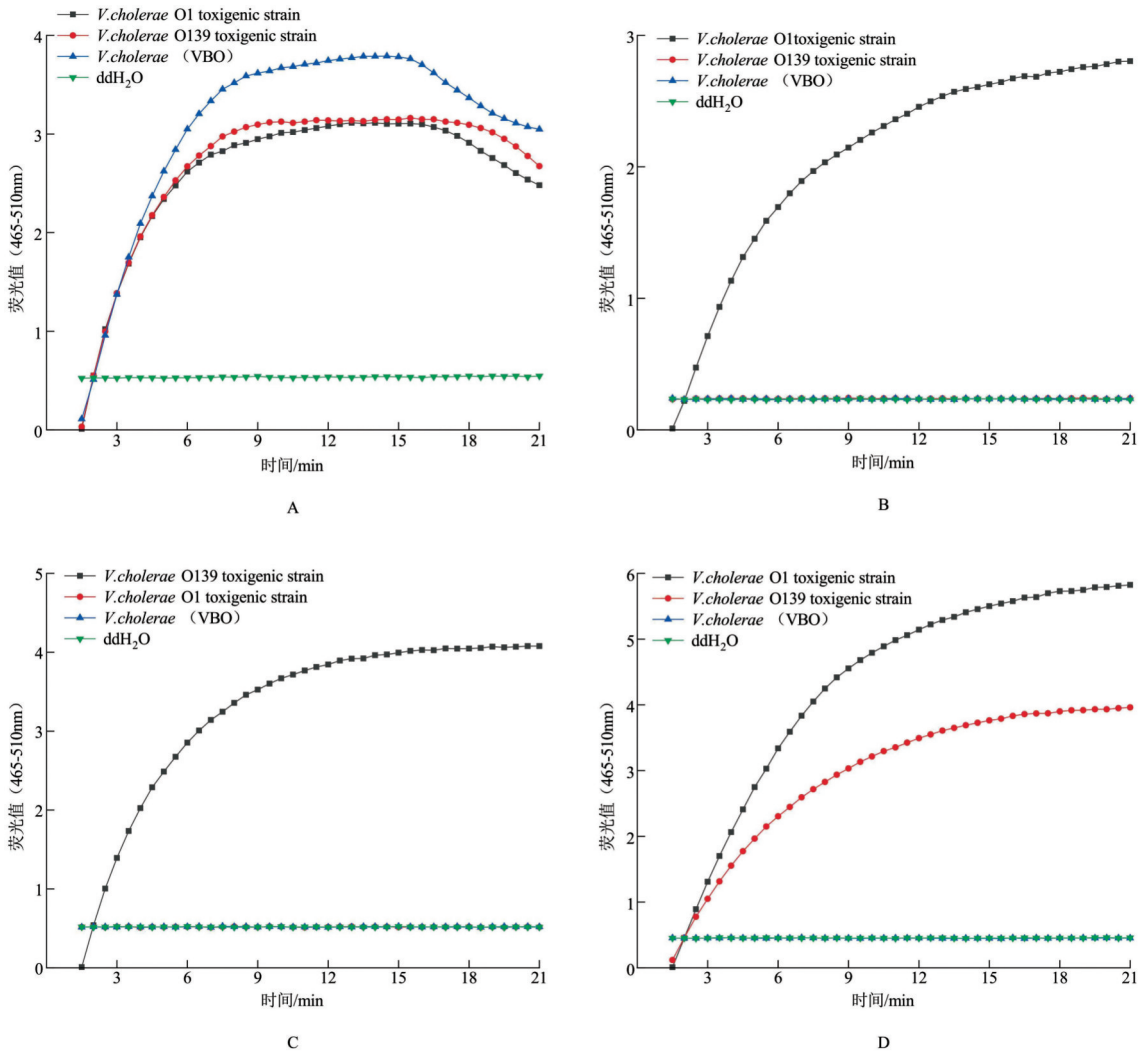
引物与探针名称	引物序列(5' - 3')
hlyA - F	5' - ATTTATCGAGTTAACCTAGAGCGTTCATTG - 3'
hlyA - R	5' - GTTAAACACGAAGCGATAATCTTGGGCAATC - 3'
hlyA - P	5' - TGATCAACTCGGTTATCGTCAGTTTGGAGCCAG [FAM - dT] T [THF] [BHQ1 - dT] ACGACGTTAGATGCC - 3' C3 - spacer
ctxA - F	5' - ACTCCCAAATATATGGATCGGATTCAGATTCA - 3'
ctxA - R	5' - TCGCAAGTATTACTCATCGATGATCTTGG - 3'
ctxA - P	5' - ACAATTACATCGTAATAGGGCTACAGAGA [FAM - dT] AG [THF] [BHQ1 - dT] ATTACAGTAACTTAGA - C3 - spacer
rfbO1 - F	5' - TGGATATCTATGGTTTCACTGAACAGATGGG - 3'
rfbO1 - R	5' - TCAATCACACCAAGGTCATCTGTAAGTACAAC - 3'
rfbO1 - P	5' - TGTGTGGGCCAGGTTAAAGTAGGCTTACTTGAGT [FAM - dT] [THF] G [BHQ1 - dT] AAGCCCACTACCGCAT - C3 - spacer
rfbO139 - F	5' - GATTTGGTGAGAAGCCTCTTTATTACGGGTGG - 3'
rfbO139 - R	5' - AGAGAAACAGCATGACTGGCATCCCAAAAT - 3'
rfbO139 - P	5' - ATGAAGGTATCTTCAAGTTAGAGCCGGGTGT [FAM - dT] A [THF] [BHQ1 - dT] GCTGTCTTTTCTACGA - 3' C3 - spacer

2.2 MIRA 检测方法中引物与探针的适用性 首先按照常规探针加入量 0.6 μL 配制 MIRA 扩增体系进行扩增,以探究设计的引物探针能否扩增目的基因。从扩增结果来看,以所有霍乱弧菌血清群中提取的

DNA 为模板,根据溶血素基因设计的引物探针都能成功扩增目的基因;以霍乱弧菌 O1 群与 O139 群产毒株 DNA 为模板时,根据霍乱弧菌肠毒素基因设计的引物探针能扩增目的基因,以霍乱弧菌非产毒株

DNA 为模板时,不能扩增目的基因;以霍乱弧菌 O1 群与 O139 群 O 抗原编码基因设计的引物探针进行扩增时,以对应血清型 DNA 为模板时能成功扩增,以

非对应血清型 DNA 为模板时,不能扩增。初步说明设计的引物探针能正常用于扩增,以不同血清型霍乱弧菌 DNA 为模板时特异性较好(见图 1)。



注:A 为 hlyA 基因引物探针初步验证; B 为 O1 群 rfb 基因引物探针初步验证; C 为 O139 群 rfb 基因引物探针初步验证; D 为 ctxA 基因引物探针初步验证。

图 1 MIRA 方法设计引物探针初步验证

Fig. 1 Preliminary validation of MIRA method for designed primer probes

2.3 MIRA 法检测霍乱弧菌时探针的量的优化 调整探针加入量,研究探针加入量与扩增效率之间的关系。对于 hlyA 基因,以霍乱弧菌 O1 群与 O139 群 DNA 为模板时,荧光强度与探针加入量的关系是 0.6 < 0.4 < 0.8 < 1.0 < 1.2;对于 ctxA 基因,以霍乱弧菌 O1 群与 O139 群 DNA 为模板时,荧光强度与探针加入量的关系是 0.6 < 0.4 < 0.8 < 1.2 < 1.0;对于 O1 群 rfb 基因,荧光强度与探针加入量的关系是 0.6 = 0.4 < 0.8 < 1.0 < 1.2;对于 O139 群 rfb 基因,荧光强度与探针加入量的关系是 0.4 < 0.6 = 1.0 < 0.8 = 1.2(见图 2)。基于保证检测灵敏度与节约试剂兼顾的原则,hlyA 基因、ctxA 基因、O1 群 rfb 基因 MIRA 扩增体

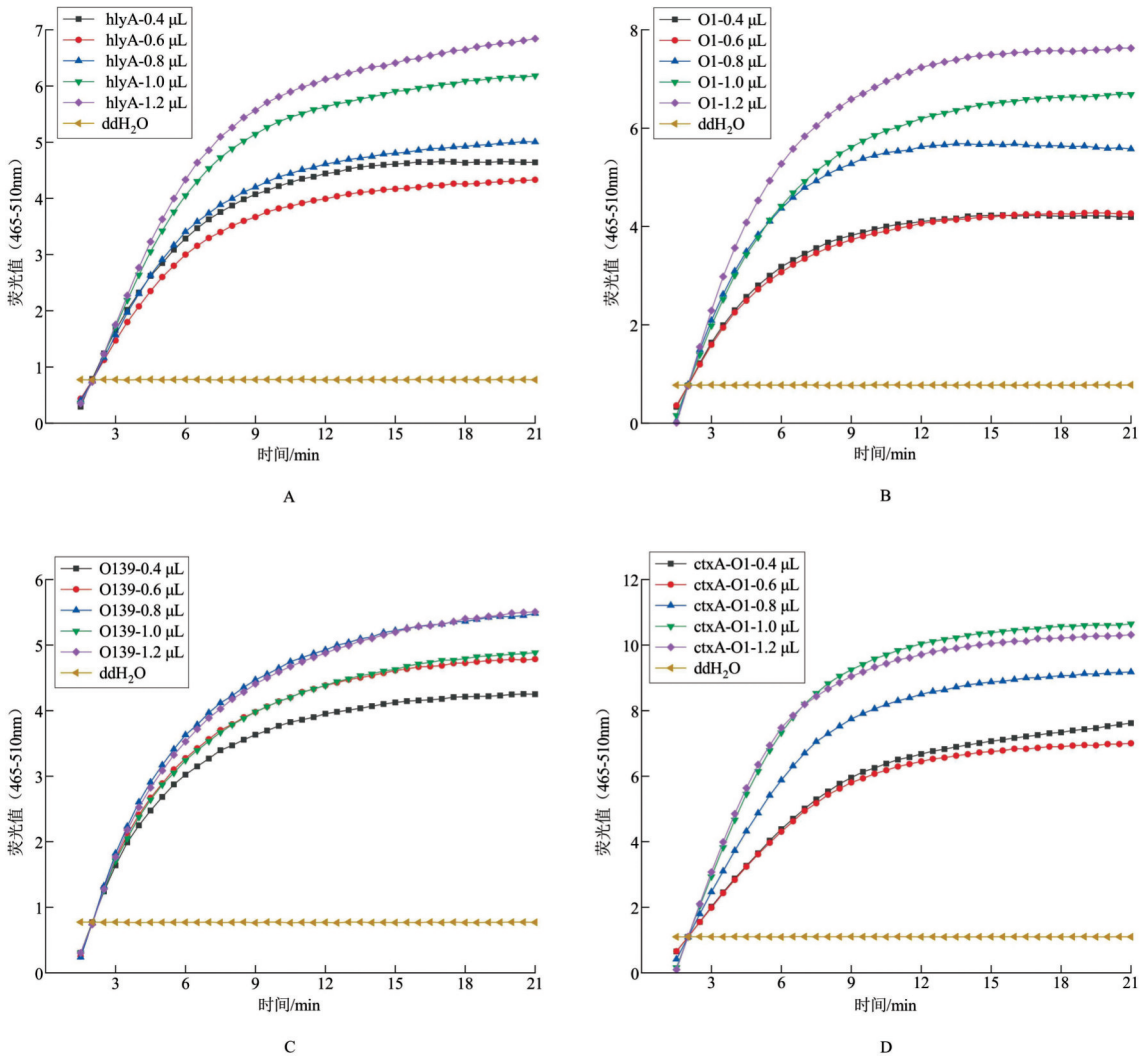
系探针加入量选择 1.0 μL,O139 群 rfb 基因 MIRA 扩增体系探针加入量选择 0.8 μL。

2.4 MIRA 体系的特异性 在对 MIRA 扩增体系进行优化后,分别提取多种常见菌的 DNA 与原先提取及获得的霍乱弧菌 DNA 进行检测特异性验证。结果显示,根据溶血素基因设计的引物探针,对所有种类的霍乱弧菌 DNA 都能成功扩增,对非霍乱弧菌不能进行扩增;根据霍乱弧菌肠毒素基因设计的引物探针,仅对霍乱弧菌产毒株 DNA 成功扩增,对霍乱弧菌非产毒株与非霍乱弧菌不能进行扩增;根据霍乱弧菌 O1 群与 O139 群 rfb 基因设计的引物探针,则仅能针对相应血清型霍乱弧菌 DNA 进行扩增,对其它血

清型的霍乱弧菌与非霍乱弧菌则不能扩增(见表 2)。

2.5 MIRA 体系的灵敏度 从检测霍乱弧菌的最低 DNA 质量浓度来考察该方法的灵敏度。经超微量全

波长分光光度计测定,提取的霍乱弧菌 O1 菌株 DNA 质量浓度为 7 ng/μL,O139 菌株 DNA 质量浓度为 29 ng/μL,将霍乱弧菌 O1 与 O139 菌株提取 DNA 经梯



注:A 为 hlyA 基因扩增效率与探针加入量关系; B 为 O1 群 rfb 基因扩增效率与探针加入量关系;C 为 O139 群 rfb 基因扩增效率与探针加入量关系;D 为 ctxA 基因扩增效率与探针加入量关系。

图 2 MIRA 方法检测霍乱弧菌 O1 群与 O139 群产毒株的探针量的优化

Fig. 2 Optimization of probe dosage for detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 toxigenic strains by MIRA method

表 2 MIRA 检测方法的特异性

Table 2 Specificity of MIRA detection method

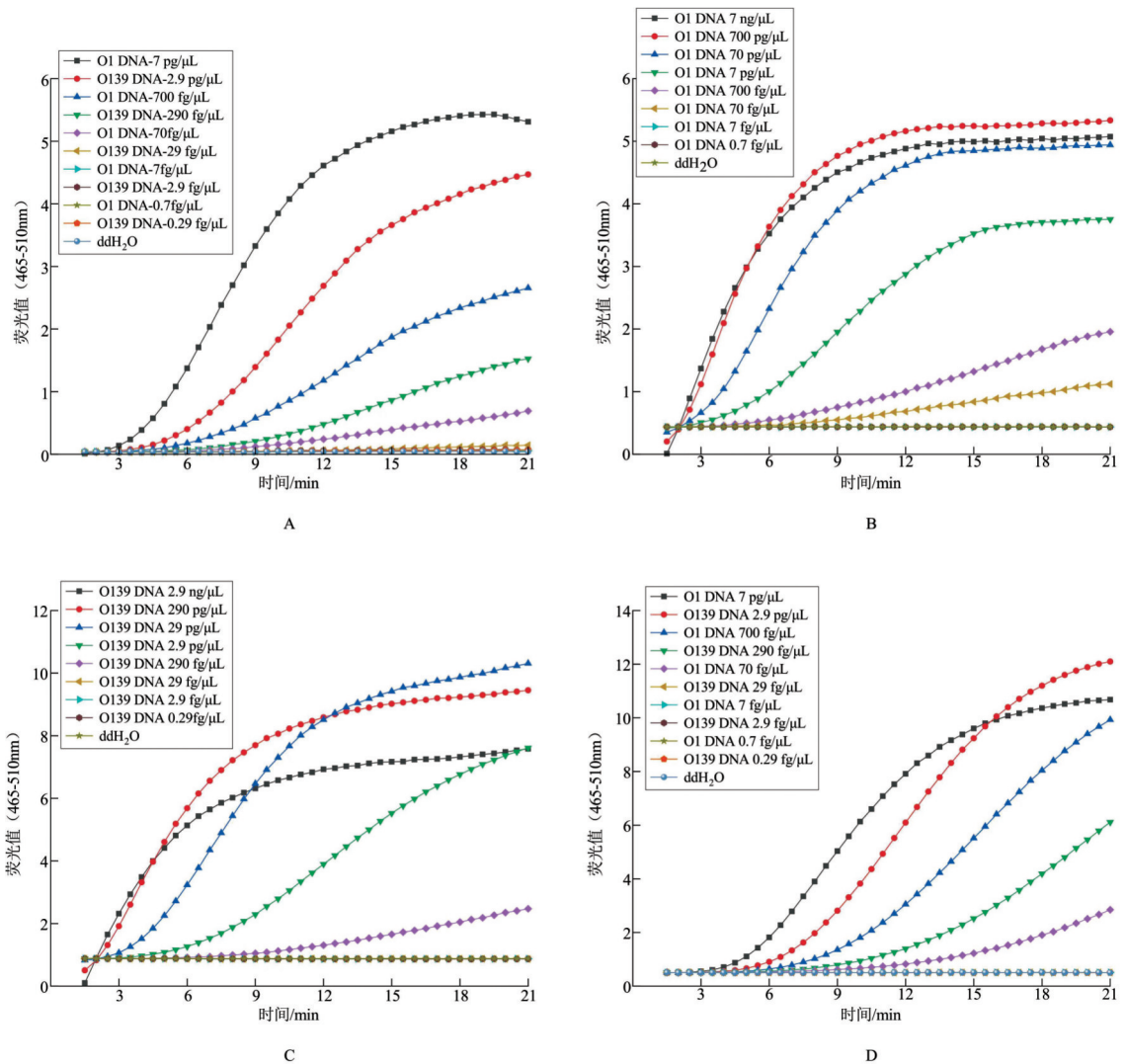
序号	菌种名称	hlyA 基因检测结果	O1 群 rfb 基因检测结果	O139 群 rfb 基因检测结果	ctxA 基因检测结果
1	霍乱弧菌 O1 群产毒株	+	+	-	+
2	霍乱弧菌 O139 群产毒株	+	-	+	+
3	霍乱弧菌 VBO	+	-	-	-
4	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028	-	-	-	-
5	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	-	-	-	-
6	副溶血性弧菌 ATCC 17802	-	-	-	-
7	单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115	-	-	-	-
8	铜绿假单胞菌 ATCC9027	-	-	-	-
9	产气荚膜梭菌 ATCC13124	-	-	-	-
10	大肠埃希氏菌 O157:H7/NM ATCC43888	-	-	-	-

注:“+”为检出;“-”为未检出。

度稀释后取 2 μL 作为模板加入 MIRA 检测体系中。在研究该方法的灵敏度时,扩增霍乱弧菌 O1 群 rfb 基因所采用的 O1 群 DNA 稀释梯度为 7 ng ~ 0.7 fg, 扩增霍乱弧菌 O139 群 rfb 基因所采用的 O139 群 DNA 稀释梯度为 2.9 ng ~ 0.29 fg; 扩增 hlyA 基因与 ctxA 基因时,先进行了预实验,在预实验中,发现 MIRA 检测这两种基因的灵敏度非常高,为了图形呈现的美观性,采用的霍乱弧菌 O1 用于扩增的 DNA 稀释梯度为 7 pg ~ 0.7 fg, 霍乱弧菌 O139 用于扩增的 DNA 梯度为 2.9 pg ~ 0.29 fg。以霍乱弧菌 O1 菌株提取 DNA

为模板,采用针对其 rfb 基因设计的引物探针扩增时,检出限为 70 fg; 以霍乱弧菌 O139 菌株提取 DNA 为模板,采用针对其 rfb 基因专门设计的引物探针扩增时,检出限为 290 fg; 以霍乱弧菌溶血素基因与肠毒素基因引物探针为模板,采用霍乱弧菌 O1 与 O139 菌株提取 DNA 为模板,检出限分别为 70 fg 与 290 fg (见图 3)。

2.6 MIRA 检测结果的判定 MIRA 检测结果的判定可按表 3 进行。



注:A 为核酸质量浓度与 hlyA 基因检测效率之间的关系;B 为核酸质量浓度与 O1 群 rfb 基因检测效率之间的关系;C 为核酸质量浓度与 O139 群 rfb 基因检测效率之间的关系;D 为核酸质量浓度与 ctxA 基因检测效率之间的关系。

图 3 MIRA 方法检测霍乱弧菌 O1 群与 O139 群产毒株基因组的灵敏度

Fig. 3 Detection sensitivity of the genome of *Vibrio cholerae* O1 and O139 toxigenic strains by MIRA method

3 讨论

选取合适的基因是采用多酶恒温快速扩增法鉴定霍乱弧菌 O1 群与 O139 群产毒株的基础与前提。

本研究确定的 4 种鉴定基因中,溶血素编码基因为霍乱弧菌所共有,针对溶血素编码基因设计的引物与探针可用于所有血清型霍乱弧菌的扩增;rfb 基因用于霍乱弧菌 O 抗原的编码,不同 O 血清型的霍乱弧菌

表 3 MIRA 检测结果的判定

Table 3 Judgment of MIRA detection results

序号	<i>hlyA</i> 检测结果	<i>O1-rfb</i> 检测结果	<i>O139-rfb</i> 检测结果	<i>ctxA</i> 检测结果	结果判定
1	-	-	-	-	非霍乱弧菌
2	+	-	-	-	不产毒非 O1 非 O139 群霍乱弧菌
3	+	+	-	-	不产毒 O1 群霍乱弧菌
4	+	+	-	+	产毒 O1 群霍乱弧菌
5	+	-	+	-	不产毒 O139 群霍乱弧菌
6	+	-	+	+	产毒 O139 群霍乱弧菌
7	+	-	-	+	产毒非 O1 群非 O139 群霍乱弧菌

注：“+”为检出；“-”为未检出。

此基因序列有所差异,这也是霍乱弧菌 O 血清型分型的分子生物学基础,针对霍乱弧菌 O1 群与 O139 群 *rfb* 基因设计的引物和探针具有特异性,仅可扩增对应血清型的霍乱弧菌;霍乱毒素是霍乱弧菌的主要毒力因子,为霍乱弧菌产毒株所共有,由一个 A 亚基及 5 个 B 亚基所构成,*ctxA* 基因是霍乱毒素 A 亚基的编码基因,因此 *ctxA* 基因可以作为区分霍乱弧菌产毒株与非产毒株的基因。从上述分析中可以看出,选取的 4 种基因从功能上可以满足霍乱弧菌 O1 群与 O139 群产毒株的鉴定需求。在进行实际检测时,可以先用扩增溶血素编码基因的引物与探针去进行检测,对初步检测结果为霍乱弧菌的再进行进一步检测,以确定霍乱弧菌类型。对于非霍乱弧菌,只需要 1 个反应管即能完成检测;对于初步检测结果为霍乱弧菌的菌株,总计需要 4 个反应管才能最终确定样品的血清型与产毒情况。用溶血素编码基因进行初步筛选的意义在于可以节约检验成本。

在对基因进行深入分析的基础上,本研究基于 MIRA 技术,建立了霍乱弧菌 O1 群与 O139 群产毒株快速准确的检测方法。该方法特异性强,总检测时长仅为 21 分钟左右,不同目的基因的基因组检测灵敏度为 70fg 或 290fg,且只需要价格低方便携带的恒温荧光检测仪即可完成扩增检测过程,能充分满足我国及世界广大地区特别是欠发达地区霍乱弧菌快速检测的需求。与近几年开发的霍乱弧菌检测方法相比,本研究建立的检测方法具有独特的优势。李涛等建立的检测方法^[27]与凌娇等建立的检测方法^[28]仅选取霍乱弧菌的 1 个基因进行检测,其检验结果仅能证明样品是否为霍乱弧菌。万莹等建立的检测方法^[29]选取了霍乱弧菌的 3 个基因,包括 1 个种特异性基因与 2 个毒力基因,但未包含血清型鉴定相关基因,不能对霍乱弧菌进行分型。李盛杰建立的霍乱弧菌检测方法^[30]使用了多酶恒温快速扩增技术,但仅选取了霍乱弧菌的 1 个基因进行检测,其检验结果也仅能证明样品是否为霍乱弧菌。传染病防控制国家重点实验室的 Lu 等人认识到了用快检技术对霍乱弧菌进行

分型检测的重要性,联用恒温扩增技术与基因编辑技术开发了霍乱弧菌 O1 群及 O139 群产毒株快速检测的方法^[19],此方法需要先进行扩增再对扩增产物进行进一步处理后才能观察到检测结果,步骤相对繁琐,检测成本也相对较高,且扩增完成后再打开反应管盖子进行检测易造成气溶胶污染从而影响检验结果。

综上所述,本研究成果为霍乱弧菌的快速检测提供了一条新的思路,研究成果的应用推广不仅会对霍乱弧菌防治及食品安全监管产生积极作用,对于人民生命健康的保护也具有重大意义。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Balasubramanian D, López - pérez M, Almagro - moreno S. Cholera dynamics and the emergence of pandemic *Vibrio cholerae* [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2023, 1404: 127 - 147.
- [2] Reidl J, Klose KE. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host[J]. *FEMS Microbiology Review*, 2002, 26(2): 125 - 139.
- [3] Rabbani GH, Greenough WB3. Food as a vehicle of transmission of cholera[J]. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, 1999, 17(1): 1 - 9.
- [4] Davis WW, Mohammed Y, Abdilahi I, et al. Food as a driver of a cholera epidemic in jijiga, Ethiopia - June 2017 [J]. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2023, 108(5): 963 - 967.
- [5] Kanungo S, Azman AS, Ramamurthy T, et al. Cholera [J]. *Lancet*, 2022, 399(10333): 1429 - 1440.
- [6] Montero DA, Vidal RM, Velasco J, et al. *Vibrio cholerae*, classification, pathogenesis, immune response, and trends in vaccine development [J]. *Frontiers in Medicine*, 2023, 10: 1155751.
- [7] Nakkazi E. Cholera outbreak in Africa [J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2023, 23(4): 411.
- [8] Muzembo BA, Kitahara K, Debnath A, et al. Cholera outbreaks in India, 2011 - 2020: A systematic review[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(9): 5738.

- [9] Rabaan AA. Cholera: an overview with reference to the Yemen epidemic[J]. *Frontiers of Medicine*, 2019, 13(2): 213–228.
- [10] Piarroux R, Moore S, Rebaudet S. Cholera in Haiti [J]. *Presse Medicale*, 2022, 51(3): 104136.
- [11] Rebaudet S, Sudre B, Faucher B, et al. Environmental determinants of cholera outbreaks in inland Africa: a systematic review of main transmission foci and propagation routes[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2013, 208 Suppl 1: S46–S54.
- [12] 吴晓玉.南通市通州区 1999—2020 年霍乱流行病学特征[J]. *江苏预防医学*, 2021, 32(4): 472–473.
- Wu XY. Epidemiological characteristics of cholera in Tongzhou District, Nantong City from 1999 to 2020 [J]. *Jiangsu Journal of Preventive Medicine*, 2021, 32(4): 472–473.
- [13] Luo Y, Octavia S, Jin DZ, et al. US gulf-like toxigenic *O1vibrio cholerae* causing sporadic cholera outbreaks in China[J]. *Journal of Infection*, 2016, 72(5): 564–572.
- [14] 肖文佳, 吴寰宇, 宫霄欢, 等. 上海市 2008–2017 年霍乱流行病学特征分析[J]. *中国公共卫生*, 2019, 35(6): 750–754.
- Xiao WJ, Wu HY, Gong XH, et al. Epidemiological characteristics of cholera in Shanghai city, 2008–2017 [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2019, 35(6): 750–754.
- [15] Chatterjee SN, Chaudhuri K. Lipopolysaccharides of vibrio cholerae. I. physical and chemical characterization [J]. *Biochimica et Biophysica acta*, 2003, 1639(2): 65–79.
- [16] Vanden broeck D, Horvath C, De wolf MJS. *Vibrio cholerae*: cholera toxin [J]. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2007, 39(10): 1771–1775.
- [17] 肖东楼. 霍乱防治手册[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- Xiao DL. *Cholera prevention and control manual* [M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013.
- [18] Ramamurthy T, Das B, Chakraborty S, et al. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139 [J]. *Vaccine*, 2020, 38, Supplement 1: A73–A82.
- [19] Lu P, Chen J, Li Z, et al. Visual identification and serotyping of toxigenic *vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 with CARID [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 863435.
- [20] 秦爱, 张明娟, 邓方进, 等. 等温核酸扩增技术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*, 2023, 14(5): 173–182.
- Qin A, Zhang MJ, Deng FJ, et al. Research progress of isothermal nucleic acid amplification techniques in the detection of foodborne pathogens [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(5): 173–182.
- [21] Lobato IM, O'sullivan CK. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances [J]. *Trends in Analytical Chemistry: TRAC*, 2018, 98: 19–35.
- [22] 安柏霖, 苏璇, 郭悦, 等. 重组酶介导的等温扩增技术联合 CRISPR–Cas13a 快速检测 4 种腹泻病原菌[J]. *中国食品卫生杂志*, 2023, 35(3): 381–389.
- An BL, Su X, Guo Y, et al. Rapid detection of four diarrheal bacteria by CRISPR–Cas13a combined with recombinase aided amplification [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2023, 35(3): 381–389.
- [23] Hu WW, He JW, Guo SL, et al. Development and evaluation of a rapid and sensitive multienzyme isothermal rapid amplification with a lateral flow dipstick assay for detection of *Acinetobacter baumannii* in spiked blood specimens [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 1010201.
- [24] Heng PF, Liu JK, Song Z, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* using a novel multienzyme isothermal rapid amplification technique [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1027785.
- [25] Wang Y, Niu J, Sun M, et al. Rapid and sensitive detection of *streptococcus iniae* in *trachinotus ovatus* based on multienzyme isothermal rapid amplification [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(9): 7733.
- [26] 王淑娟, 范一灵, 冯震, 等. 多酶恒温核酸快速扩增法检测大肠杆菌 O157: H7 [J]. *上海预防医学*, 2022, 34(6): 511–518.
- Wang SJ, Fan YL, Feng Z, et al. Multi-enzyme isothermal rapid amplification assay for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 2022, 34(6): 511–518.
- [27] 李涛, 王艳, 张继伦, 等. 海产品中霍乱弧菌、副溶血性弧菌和单增李斯特菌三重荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(4): 81–86.
- Li T, Wang Y, Zhang JL, et al. Establishment of triple real-time PCR detection method for *Vibrio cholera*, *Vibrio Parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* in Marine food products [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(4): 81–86.
- [28] 凌娇, 王权, 万莹, 等. 副溶血弧菌和霍乱弧菌双重荧光定量 PCR 快速检测方法的建立与应用 [J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(4): 93–99.
- Ling J, Wang Q, Wan Y, et al. Establishment and application of the duplex real-time PCR of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholera* [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 50(4): 93–99.
- [29] 万莹, 陈永军, 任亚玲, 等. 霍乱弧菌三重荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(9): 1143–1151.
- Wan Y, Chen YJ, Ren YL, et al. Establishment and application of triple real-time PCR for the detection of *Vibrio cholerae* [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(9): 1143–1151.
- [30] 李盛杰, 江海涛, 吴雨龙. 基于 MIRA 技术的霍乱弧菌胶体金试纸条快速检测方法的建立 [J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(24): 167–171.
- Li SJ, Jiang HT, Wu YL. Establishment of a rapid detection method of colloidal Gold test strips for *Vibrio cholerae* based on MIRA technology [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2021, 49(24): 167–171.