

# 双重 LAMP 技术快速检测水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌的方法学研究

相兴伟<sup>1</sup>, 郑斌<sup>1</sup>, 顾丽霞<sup>2</sup>, 周向阳<sup>3</sup>, 周秀锦<sup>3</sup>, 邵宏宏<sup>3</sup>, 胡兴娟<sup>3</sup>, 周宇芳<sup>1</sup>

(1. 浙江省海洋开发研究院, 浙江舟山 3160001) (2. 浙江海洋学院, 浙江舟山 316000)

(3. 舟山出入境检验检疫局, 浙江舟山 316000)

**摘要:** 建立环介导等温扩增技术(LAMP)同时快速检测水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌的方法。针对副溶血性弧菌 *toxR* 和霍乱弧菌 *ompW* 基因设计特异性引物, 优化反应条件, 建立水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌的检测方法, 并同时应用双重 LAMP 技术和 PCR 技术对实验菌株进行副溶血性弧菌和霍乱弧菌检测, 比较两种方法的特异性和灵敏度。LAMP 的最佳反应温度为 61 °C, 在此条件下, 双重 LAMP 检测技术检测副溶血性弧菌和霍乱弧菌 DNA 的敏感度可达 3.12 fg, 且与其他常见的细菌株无交叉反应, 特异性为 100%; 对模拟食品样品进行直接检测时检测限为 50 cfu/mL; 对 60 份水产样品进行检测时, 6 份样品出现 LAMP 及 PCR 阳性, 而传统培养方法检测出 4 份阳性。实验结果表明所建立的双重 LAMP 技术在检测水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌时灵敏度、特异性高, 时间成本低, 适合于水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌的快速检测。

**关键词:** 副溶血性弧菌; 霍乱弧菌; 同时检测

文章编号: 1673-9078(2017)1-253-260

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.039

## Study on Simultaneous Detection of *Vibrio Parahaemolyticus* and *Vibrio Cholerae* in Aquatic Products by Loop-Mediated Isothermal Amplification Method

XIANG Xing-wei<sup>1</sup>, ZHENG Bin<sup>1</sup>, GU Li-xia<sup>2</sup>, ZHOU Xiang-yang<sup>3</sup>, ZHOU Xiu-jin<sup>3</sup>, SHAO Hong-hong<sup>3</sup>, HU Xing-juan<sup>3</sup>, ZHOU Yu-fang<sup>1</sup>

(1.Zhejiang Marine Development Research Institute, Zhoushan 316001, China) (2.Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China) (3.Zhoushan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhoushan 316000, China)

**Abstract:** A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was developed for simultaneous and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in aquatic products. Based on the nucleic acid sequences of *toxR* of *V. parahaemolyticus* and *ompW* of *V. cholerae*, a pair of primers was designed for LAMP. After optimizing the reaction conditions, the levels of *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* in aquatic products were estimated using LAMP and PCR, and the detection rate and efficiency of the two methods were compared. The optimal reaction temperature was found to be 61 °C; at this temperature, the detection limit for the DNA templates of *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* was 3.1 fg, and no cross-reaction with other common bacteria was found, yielding a detection specificity of 100%. For direct detection of *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* in artificially contaminated food samples, the detection limit was found to be 50 cfu/mL. In addition, when 50 seafood samples were tested by LAMP and PCR, 6 of them were found to be positive, but only 4 were detected to be positive by conventional microbiological methods. Thus, the LAMP method had high specificity and sensitivity for detecting *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* in aquatic products, and would be suitable for rapidly detecting *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae*.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; *Vibrio cholerae*; simultaneous detection

收稿日期: 2015-12-24

基金项目: 浙江省公益技术研究农业项目 (2015C32101); 浙江省分析测试科技计划项目 (2014C37093); 国家科技支撑项目 (2012BAD29806); 浙江省公益技术研究农业项目 (2016C32081); 浙江省分析测试科技计划项目 (2014C37108)

作者简介: 相兴伟(1986-), 男, 博士, 工程师, 主要从事水产品加工与质量安全控制工作

通讯作者: 郑斌(1986-), 男, 研究员, 主要从事水产品质量安全控制和标准化研究

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)在世界范围内被公认是两种重要的肠道致病菌。前者广泛存在于海洋环境中,是威胁海水养殖业的主要病原菌之一,人类食用该菌污染的海产品后可引起食物中毒,会有腹泻、恶心、呕吐、发热甚至脱水和昏迷等症状,严重的可导致败血症甚至死亡,是日本、欧美和东南亚国家食物中毒和急性腹泻病的重要病原菌<sup>[1]</sup>。霍乱弧菌是环境水体自然菌群中的一种,霍乱弧菌中的 O1 群和 O139 群菌株可以引起很严重的人类腹泻病,主要表现为剧烈的呕吐、腹泻和失水若抢救不及时,病死率较高,属于国际检疫传染病,在我国被列为甲类传染病<sup>[2]</sup>。近年来,食用鲜活海产品的人群和地域在不断增多,由此两种病原菌引发的食品安全问题也显得越来越重要。

目前我国用于检测食品中这两种菌的国家标准和行业标准,皆属于传统的培养及生化鉴定方法,检测周期长、工作量大,不能满足水产品质量安全快速反应体系的需求<sup>[3]</sup>。2000年Notomi等<sup>[4]</sup>报道了环介导等温核酸扩增技术(LAMP),该技术具有简便,省时,灵敏度高和结果判定形象直观等优点,特别适合于现场快速诊断病原菌。为充分发挥LAMP技术优势,区别于常规LAMP技术,提高检测效率和可靠性,多重LAMP技术成为了近年的一大研究热点,科研工作者通过将LAMP技术与其它技术相耦联,产生了许多新型的广义多重LAMP技术,如基于芯片实验室的多重LAMP技术及结合毛细管特质的多重LAMP技术等,不同多重LAMP技术各具优缺点<sup>[5]</sup>。本研究将探索新型的双重LAMP技术在副溶血性弧菌和霍乱弧菌检测中的应用方法,并将建立适宜于进出口水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌快速检测的技术,以达成方便快速检测出水产品的副溶血性弧菌和霍乱弧菌的目的。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

本研究所所使用的实验菌株包括:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes* ATCC 19111)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi* ATCC 33866)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus* ATCC 27562)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum* ATCC 43305)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33847)和霍乱弧菌(*Vibrio cholerae* O139 ATCC 51394)为本实验室保存菌株,用于特异性实验。

#### 1.1.2 试剂

细菌 DNA 提取试剂盒购自艾德莱; PCR 试剂盒购自 Takara; DNA 扩增试剂盒购自迪奥等。

#### 1.1.3 主要仪器

Nanodrop 2000c 型超微量核酸蛋白分析仪(Thermo)、PTC-200 型 PCR 扩增仪(BIO-RAD)、LA-320C 实时浊度仪(日本荣研化学)、SORVALL Stratos 型冷冻离心机(Thermo)和 JS-380A 型自动凝胶图像分析仪(上海培清科技有限公司)等。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取

将上述所列的细菌株分别接种于各自适宜的培养基中,根据每种细菌的最适温度过夜培养。分别取 1 mL 培养菌液,使用细菌基因组提取试剂盒,提取细菌基因组 DNA, -20 °C 保存备用。

### 1.2.2 引物设计与合成

通过 Genbank 分析副溶血性弧菌 *toxR* 和霍乱弧菌 *ompW* 种特异性基因,根据基因序列中的保守序列,采用 Primer premier 5.0 软件针对靶基因的 6 个不同区域分别设计一套 LAMP 引物,然后通过预实验筛选出一套特异性的 LAMP 引物,引物包括外引物 F3、B3 和内引物 FIP、BIP 以及环引物 LF、LB。引物序列见表 1 和 2。引物委托上海生工生物技术有限公司合成。

### 1.2.3 LAMP 反应条件优化

经过预实验摸索,按如下反应体系对反应体系中的温度进行 LAMP 优化实验。LAMP 反应体系为 25  $\mu$ L: 反应缓冲液 12.5  $\mu$ L、内引物 FIP 2  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L)、内引物 BIP 2  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L)、外引物 F3 0.25  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L)、外引物 B3 0.25  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L)、环引物 LF 1  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L)、环引物 LB 1  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L)、Bst 聚合酶 1  $\mu$ L、霍乱弧菌 Vc (副溶血弧菌 V<sub>p</sub>) DNA 模板 2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu$ L, 混匀。阴性对照不含基因组 DNA。使用 DNA 扩增试剂盒在浊度仪 LA-320 上进行 LAMP 扩增试验,温度分别设为 61 °C、63 °C 和 65 °C,扩增时间为 60 min,实验结束后 72 °C 灭活 5 min。经琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,以确定适宜的反应温度。

### 1.2.4 双重 PCR 特异性实验

用试剂盒分别提取金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、哈维氏弧菌、创伤弧菌、鳃弧菌、霍乱弧菌和副溶血弧菌 DNA,按照下述 PCR 反应条件进行扩增,进行双重 PCR 特异性试验。

PCR 反应体系为 50  $\mu$ L: Premix Taq 缓冲液 25  $\mu$ L、引物 *toxR*-F3 1  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L)、引物 *ompw*-F3 1  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L)、引物 *toxR*-B3 1  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L)、引物 *ompw*-B3 1  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L)、DNA 模板 3  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 15  $\mu$ L, PCR

反应循环参数为 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 45 s, 后 72 °C 延伸 5 min。PCR 反应结束后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 以检测引物的双重 PCR 特异性。

表 1 副溶血性弧菌 *toxR* 基因的 LAMP 引物

Table 1 *Vibrio parahaemolyticus toxR* primers for LAMP assay

引物	类型	长度 (碱基数)	序列 (5' - 3')
<i>toxR</i> -F3	Forward-outer prime	24-mer	ACTACCGATTGCGTACTGCTGTT
<i>toxR</i> -B3	Backward-outer primer	22-mer	GCCAGTGGCAATCACTTCCACT
<i>toxR</i> -FIP	Forward-inner primer (F1c+F2)	40-mer	AGGTGTCATCACTGGTACGTTT-ACCCAGCGGAATCT CAGT
<i>toxR</i> -BIP	Backward-inner primer (B1c+B2)	43-mer	ACCCGCAAATCAACAACCTGGTT-GGTAACGAGTCTTC TGCATGG
<i>toxR</i> -LF	Loop-forward primer	22-mer	TGATACTACCAATCTGACGGA
<i>toxR</i> -LB	Loop-backward primer	21-mer	GCCTTCTATTGAGCAGTGCAT

表 2 霍乱弧菌 *ompW* 基因的 LAMP 引物

Table 2 *Vibrio cholerae ompW* primers for LAMP assay

引物	类型	长度 (碱基数)	序列 (5' - 3')
<i>ompW</i> -F3	Forward-outer prime	22-mer	CGCTTGGCTATATGTTTACCGA
<i>ompW</i> -B3	Backward-outer primer	20-mer	TGGTGTAAATTCAAAACCCGCA
<i>ompW</i> -FIP	Forward-inner primer (F1c+F2)	47-mer	TCACCTAAACCCAGCAAATCAGTCG-AACAT CAGCTTTGAAGTCTCG
<i>ompW</i> -BIP	Backward-inner primer (B1c+B2)	47-mer	TGCTGAAACTAAACATCTGCCACCT-CCAACA TATGGACGGAAAGTCG
<i>ompW</i> -LF	Loop-forward primer	22-mer	TTTGTGTGAAAATGGCGTAGCA
<i>ompW</i> -LB	Loop-backward primer	25-mer	TGGTTCAGTACTATTTTGGTGAAGC

### 1.2.5 双重 LAMP 特异性试验

用试剂盒分别提取金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、哈维氏弧菌、创伤弧菌、鳃弧菌、霍乱弧菌和副溶血弧菌 DNA, 使用 DNA 扩增试剂盒在浊度仪 LA-320 上进行双重 LAMP 特异性试验。

LAMP 反应体系为 25 μL: 反应缓冲液 12.5 μL、内引物 *ompw*-FIP 1 μL (20 μmol/L)、内引物 *toxR*-FIP 1 μL (20 μmol/L)、内引物 *ompw*-BIP 1 μL (20 μmol/L)、内引物 *toxR*-BIP 1 μL (20 μmol/L)、外引物 *ompw*-F3 0.125 μL (20 μmol/L)、外引物 *toxR*-F3 0.125 μL (20 μmol/L)、外引物 *ompw*-B3 0.125 μL (20 μmol/L)、外引物 *toxR*-B3 0.125 μL (20 μmol/L)、环引物 *ompw*-LF 0.5 μL (20 μmol/L)、环引物 *toxR*-LF 0.5 μL (20 μmol/L)、环引物 *ompw*-LB 0.5 μL (20 μmol/L)、环引物 *toxR*-LB 0.5 μL (20 μmol/L)、Bst 聚合酶 1 μL、霍乱弧菌 V<sub>C</sub> DNA 模板 1 μL、副溶血弧菌 V<sub>p</sub> DNA 模板 1 μL 和 ddH<sub>2</sub>O 3 μL, 混匀, 于 61 °C 扩增 60 min, 实验结束后 72 °C 灭活 5 min。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 并对浊度仪上的 LAMP 结果数据进行 EXCEL 作图, 以检测双重 LAMP 特异性。

### 1.2.6 双重 LAMP 灵敏度试验

将提取的霍乱弧菌、副溶血弧菌 DNA 模板测定浓度后, 分别用超纯水以 10 的倍数依次稀释至 10<sup>-8</sup>, 各菌株每个梯度各取 1 μL 加入 PCR 管中, 是反应体系中分别同时含两种菌 DNA 量为 3.12 ng、312 pg、31.2 pg、3.12 pg、312 fg、31.2 fg、3.12 fg 和 0.31 fg, 用霍乱弧菌引物, 副溶血弧菌引物按照下述 LAMP 反应条件, 使用 DNA 扩增试剂盒在浊度仪上进行 LAMP 扩增试验。

LAMP 反应体系为 25 μL: 反应缓冲液 12.5 μL、内引物 *ompw*-FIP 1 μL (20 μmol/L)、内引物 *toxR*-FIP 1 μL (20 μmol/L)、内引物 *ompw*-BIP 1 μL (20 μmol/L)、内引物 *toxR*-BIP 1 μL (20 μmol/L)、外引物 *ompw*-F3 0.125 μL (20 μmol/L)、外引物 *toxR*-F3 0.125 μL (20 μmol/L)、外引物 *ompw*-B3 0.125 μL (20 μmol/L)、外引物 *toxR*-B3 0.125 μL (20 μmol/L)、环引物 *ompw*-LF 0.5 μL (20 μmol/L)、环引物 *toxR*-LF 0.5 μL (20 μmol/L)、环引物 *ompw*-LB 0.5 μL (20 μmol/L)、环引物 *toxR*-LB 0.5 μL (20 μmol/L)、Bst 聚合酶 1 μL、霍乱弧菌 V<sub>C</sub> DNA 模板 1 μL、副溶血弧菌 V<sub>p</sub> DNA 模板 1 μL、ddH<sub>2</sub>O 3 μL, 混匀, 于 61 °C 扩增 60 min, 实验结束后 72 °C 灭活 5 min。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,

并对浊度仪上的 LAMP 结果数据进行 EXCEL 作图，以检测双重 LAMP 敏感度。

### 1.2.7 模拟食样检测灵敏度

取经传统方法和常规 PCR 方法预检霍乱弧菌、副溶血弧菌均为阴性的带鱼肉 20 g 加入到 180 mL 碱性蛋白胨水中，于组织捣碎机中匀浆约 80 s 制成带鱼肉匀浆。各取 8 mL 带鱼肉匀浆分别同时接入 1 mL 已知浓度的副溶血弧菌标准菌株和 1 mL 霍乱弧菌标准菌株，混匀后作为食品样品原样。接着分别取 1 mL 培养菌液，使用细菌基因组提取试剂盒提取 DNA，应用双重 LAMP 方法进行检测。

### 1.2.8 水产品中霍乱弧菌和副溶血弧菌的检测

从本辖区内各农贸市场采集样品，包括泥蚶、文蛤、剑鱼、明虾、青蛤和缢蛭各类海鲜共 60 份，通过无菌操作剪取鱼类表面组织、肠或是腮，贝类全部内容物（肉及体液）10 g 加入到 90 mL 碱性蛋白胨水中，用组织捣碎机打匀，后各取 1 mL 匀浆提取 DNA，应用双重 LAMP 和 PCR 方法进行检测。另外，参照行业标准 SN/T 0173-2010<sup>[6]</sup>和 SN/T 1022-2010<sup>[7]</sup>使用传统培养方法对样品进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌 DNA 提取

提取细菌基因组 DNA，进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，鉴定其纯度，经凝胶成像系统处理，结果显示均有明显条带。

利用微量核酸蛋白分析仪测定所提取 DNA 的浓度，发现其 OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> 的比值均在 1.8~2.0 之间，由此可知，所提取的基因组 DNA 纯度比较高，适合核酸扩增反应。

### 2.2 LAMP 反应条件确立

利用预实验筛选出两套特异性引物分别对霍乱弧菌、副溶血弧菌基因组 DNA 按照 1.2.3 所述方法进行扩增，根据 LAMP 数据结果作图 1 所示，引物及反应温度总结如下表 3 所示。将 LAMP 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测，电泳结果见图 2 和 3 所示，霍乱弧菌、副溶血弧菌基因组 DNA 泳道产生阶梯状条带，以灭菌水作为模板的阴性对照未出现明显的条带，表明两套 LAMP 引物均能够分别有效的扩增霍乱弧菌 *ompw* 和副溶血弧菌 *toxR* 基因；另外，霍乱弧菌引物、副溶血弧菌引物（未显示）均在 61 °C 条件下扩增值最高，因此选择引物 *ompw*，61 °C 作为霍乱弧菌 LAMP 扩增体系；引物 *toxR*，61 °C 作为副溶血弧菌

LAMP 扩增体系。

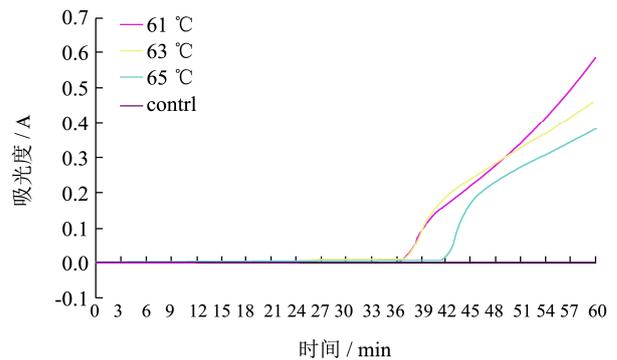


图 1 霍乱弧菌 *ompw* LAMP 数据结果

Fig.1 LAMP assay results with *Vibrio cholerae ompw* primers

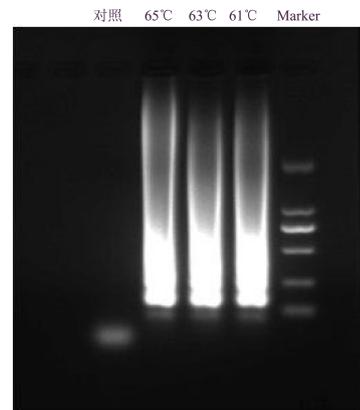


图 2 反应温度对霍乱弧菌引物 *ompw* LAMP 反应的影响

Fig.2 Effect of reaction temperature on the *ompw* LAMP

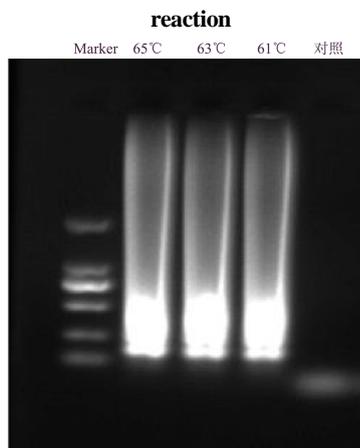


图 3 反应温度对副溶血弧菌引物 *toxR* LAMP 反应的影响

Fig.3 Effect of reaction temperature on the *toxR* LAMP

表 3 引物及不同反应温度的扩增值

Table 3 Amplification values of primers and different reaction

temperatures			
引物	温度	起峰时间	最高值
霍乱弧菌引物	61	38	0.58
	63	37	0.4
	65	43	0.38

转下页

接上页			
	61	15	1.2
副溶血弧菌引物	63	10	0.6
	65	12	0.6

### 2.3 双重引物特异性分析

#### 2.3.1 双重 PCR 特异性分析

分别对 7 株实验菌株及霍乱、副溶血弧菌混合物进行双重 PCR 扩增，产物采用 1%琼脂糖凝胶电泳进行分析，以验证双重 PCR 特异性。结果如图 4 所示，经双重 PCR 扩增后，霍乱弧菌、副溶血弧菌以及霍乱弧菌和副溶血弧菌的混合模板均有明显的目的条带，哈维氏弧菌出现微弱的非特异扩增，其余细菌均未出现扩增，因此，双重 PCR 特异性表明仅与哈维氏弧菌有微弱的交叉反应，与其余相关细菌特异性良好。

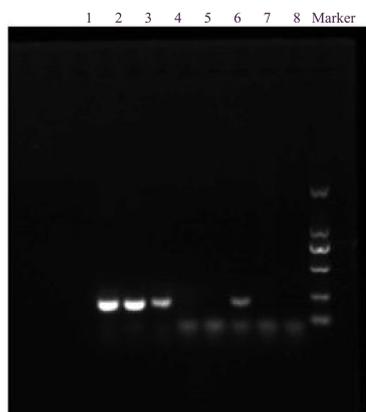


图 4 双重 PCR 特异性实验凝胶电泳图

Fig.4 Double-PCR agarose gel patternselectrophoresis using specific

注：Marker 表示 2000；1 表示霍乱弧菌和副溶血弧菌混合模板；2 表示副溶血弧菌；3 表示霍乱弧菌；4 表示鳃弧菌；5 表示创伤弧菌；6 表示哈维氏弧菌；7 表示单增李斯特菌；8 表示黄色葡萄球菌。

#### 2.3.2 双重 LAMP 特异性分析

在浊度仪上，使用 DNA 扩增试剂盒分别对 7 株实验菌株及霍乱、副溶血弧菌混合物进行双重 LAMP 扩增。扩增产物采用 1%琼脂糖凝胶电泳验证双重 LAMP 的特异性，并对浊度仪上的 LAMP 结果数据进行 EXCEL 作图。结果如图 5 所示，仅霍乱弧菌、副溶血弧菌和霍乱、副溶血弧菌混合物出现明显扩展；另外，从图 6 见仅霍乱弧菌、副溶血弧菌和霍乱、副溶血弧菌混合物出现特有的阶梯状扩增条带，其他致病菌株均未出现阶梯状条带，两者结果一致，表明双重 LAMP 反应特异性良好，且实验结果比 PCR 方法效果好。

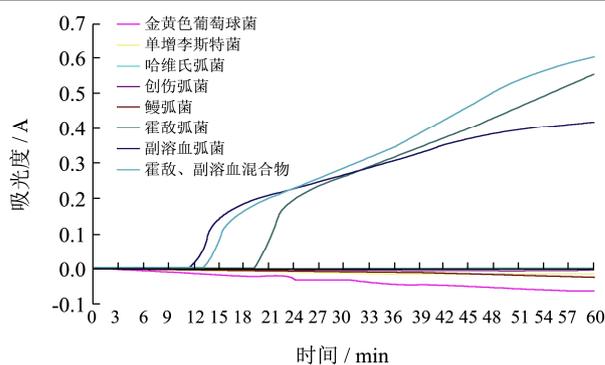


图 5 双重 LAMP 特异性实验数据结果

Fig.5 Results of double-LAMP assay using specific primers

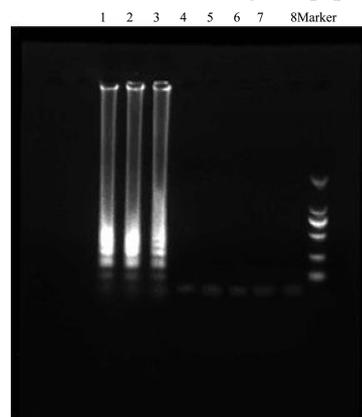


图 6 双重 LAMP 特异性实验凝胶电泳图

Fig.6 Double-LAMP agarose gel electrophoresis using specific primers

注：Marker 表示 2000；1 表示霍乱弧菌和副溶血弧菌混合模板；2 表示副溶血弧菌；3 表示霍乱弧菌；4 表示鳃弧菌；5 表示创伤弧菌；6 表示哈维氏弧菌；7 表示单增李斯特菌；8 表示黄色葡萄球菌。

### 2.4 双重引物灵敏度分析

#### 2.4.1 双重 LAMP 灵敏度分析

利用优化后的 LAMP 体系对霍乱弧菌和副溶血弧菌 DNA 混合模板进行双重 LAMP 灵敏度分析。经测定，原始混合菌液浓度为 31.20 ng/μL（其中霍乱弧菌、副溶血弧菌等浓度、等体积混合），DNA 模板用超纯水以 10 的倍数依次稀释至 10<sup>-8</sup>，按上述 LAMP 反应体系及条件分别进行扩增。结果如图 7 所示，浊度仪上 LAMP 数据结果显示，当霍乱弧菌、副溶血弧菌混合 DNA 模板经 10 的倍数梯度稀释后，10<sup>0</sup> 至 10<sup>-7</sup> 基本都在 25 min 前起峰，且均有明显的扩增峰，当模板 DNA 稀释至 10<sup>-8</sup> 时，扩增曲线在 50 min 后出现抬头峰，且电泳结果（图 9）显示，霍乱弧菌、副溶血弧菌模板混合物经 10 倍数稀释至 10<sup>-7</sup> 时，扩增明显，但当模板 DNA 稀释至 10<sup>-8</sup> 时，条带变淡，所以认为

这可能是非特异性扩增。为了验证双重 LAMP 的灵敏度，我们对  $10^{-8}$  进行重复性实验。LAMP 反应条件同上。实验结束后，对浊度仪上的 LAMP 结果数据进行 EXCEL 作图，结果如下图 8 所示。结果显示，经过多次重复发现，当模板 DNA 稀释至  $10^{-8}$ ，LAMP 扩增结果显示为阴性。电泳结果（图 10）所示结论与之一致。因此双重 LAMP 实验灵敏度为 3.12 fg。

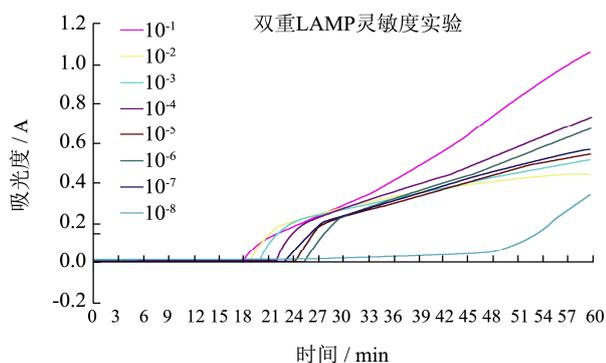


图 7 双重 LAMP 灵敏度实验数据结果

Fig.7 Sensitivity of double-LAMP assay using specific primers

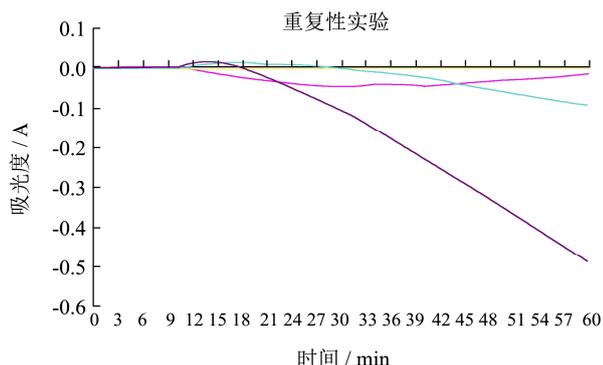


图 8 双重 LAMP 灵敏度重复性实验数据结果

Fig.8 Results of repeated experiments of sensitivity of double-LAMP assay using specific primers

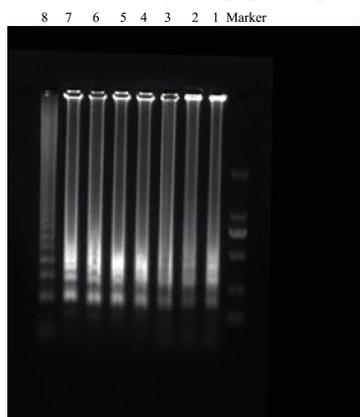


图 9 双重 LAMP 灵敏度实验凝胶电泳图

Fig.9 Agarose gel electrophoresis for sensitivity of double-LAMP assay

注：Marker 表示 DL 2000；1 表示 DNA 稀释液  $10^{-1}$ ；2 表示 DNA 稀释液  $10^{-2}$ ；3 表示 DNA 稀释液  $10^{-3}$ ；4 表示 DNA 稀

释液  $10^{-4}$ ；5 表示 DNA 稀释液  $10^{-5}$ ；6 表示 DNA 稀释液  $10^{-6}$ ；7 表示 DNA 稀释液  $10^{-7}$ ；8 表示 DNA 稀释液  $10^{-8}$ 。

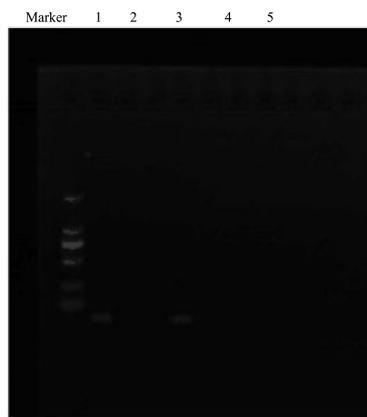


图 10 双重 LAMP 灵敏度重复性实验数据结果

Fig.10 Agarose gel electrophoretogram of repeated experiments of sensitivity of double-LAMP assay using specific primers

注：Marker 表示 DL 2000；1~5 表示 DNA 稀释液  $10^{-8}$ 。

### 2.4.2 人工污染食样的双重 LAMP 灵敏度分析

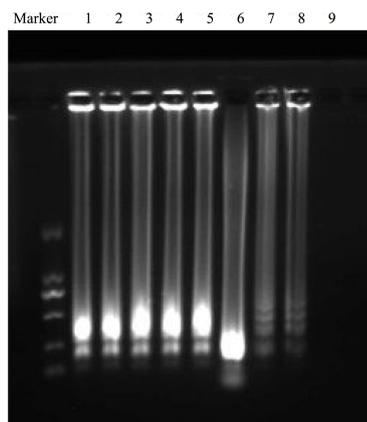


图 11 模拟食品双重 LAMP 灵敏度实验检测结果

Fig.11 Result of double-LAMP assay sensitivity in artificially contaminated food samples

注：Marker 表示 DL 2000；1 表示  $5 \times 10^7$  cfu/mL；2 表示  $5 \times 10^6$  cfu/mL；3 表示  $5 \times 10^5$  cfu/mL；4 表示  $5 \times 10^4$  cfu/mL；5 表示  $5 \times 10^3$  cfu/mL；6 表示  $5 \times 10^2$  cfu/mL；7 表示  $2.50 \times 10^2$  cfu/mL；8 表示  $5 \times 10^1$  cfu/mL；9 表示  $2.50 \times 10^1$  cfu/mL。

各 8 mL 带鱼匀浆液中，分别同时接种  $5 \times 10^7$  cfu/mL、 $5 \times 10^6$  cfu/mL、 $5 \times 10^5$  cfu/mL、 $5 \times 10^4$  cfu/mL、 $5 \times 10^3$  cfu/mL、 $5 \times 10^2$  cfu/mL、 $2.50 \times 10^2$  cfu/mL、 $5 \times 10^1$  cfu/mL 和  $2.50 \times 10^1$  cfu/mL 的霍乱弧菌和副溶血弧菌两种菌各 1 mL，食品样品 LAMP 检测结果如图 11 所示，染菌  $5 \times 10^7$  cfu/mL、 $5 \times 10^6$  cfu/mL、 $5 \times 10^5$  cfu/mL、 $5 \times 10^4$  cfu/mL、 $5 \times 10^3$  cfu/mL、 $5 \times 10^2$  cfu/mL、 $2.50 \times 10^2$  cfu/mL 和  $5 \times 10^1$  cfu/mL 的食品样品出现阶梯状条带，而染菌  $2.50 \times 10^1$  cfu/mL 的带鱼肉匀浆未出现梯度扩增，这表明 LAMP 法直接检测食品样品的检测限为

50 cfu/mL。

## 2.5 水产品中霍乱弧菌和副溶血弧菌的检测

用本研究所建立的双重 LAMP 法以及 PCR 法对 60 份水产样品进行霍乱弧菌和副溶血弧菌的检测,用

传统培养方法检出 4 份阳性;双重 LAMP 法以及 PCR 法检出 6 份阳性,两者结果相一致,结果见表 4。实验结果表明所建立的检测方法在实际应用中具有一定的可行性。

表 4 水产品中副溶血性弧菌及霍乱弧菌检测结果

Table 4 Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in seafood products

样品	LAMP	PCR	传统培养方法	
			SN/T 0173	SN/T 1022
泥蚶 <i>Tegillarca granosa</i>	0/8	0/8	0/8	0/8
文蛤 <i>Meretrix meretrix Linnaeus</i>	2/9	2/9	0/9	1/9
剑鱼 <i>Xiphias gladius</i>	1/12	1/12	0/12	0/12
明虾 <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	2/14	2/14	1/14	1/14
青蛤 <i>Cyclina sinensis</i>	0/8	0/8	0/8	0/8
缢蛏 <i>Sinonovacula constricta</i>	1/9	1/9	0/9	1/9

## 3 讨论

关于水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌的检测,我国目前优先选用的是国家强制标准《食品卫生微生物学检验-副溶血性弧菌检验》(GB/T 4789.7-2013)以及被广泛采用的行业标准《出口食品中副溶血性弧菌检验方法》(SN/T 0173-2010)和《出口食品中霍乱弧菌检验方法》(SN/T 1022-2010),两者均为传统的生化鉴定法,而且通过该法检测与鉴定也不能直接评估所截获菌株的致病力。除了传统的生化鉴定法,目前国内外弧菌的检测方法还有:PCR-凝胶电泳法、实时荧光PCR法<sup>[8]</sup>、基因指纹图谱分析法<sup>[9]</sup>、ELISA法<sup>[10]</sup>等。尽管检测方法众多,但是各种方法都存在其自身的优势和局限性。常规的细菌培养、生化鉴定普及度广,但是操作既耗时又繁琐,同时由于细菌的生化特征相对不稳定,给鉴定带来了很大的困难和不确定性,易发生漏检现象;PCR-凝胶电泳法快捷、成本低,但也繁琐,灵敏度相对较低,且电泳检测步骤是极大的污染源<sup>[11]</sup>;实时荧光PCR技术虽具有特异性强,灵敏度高优势,却也存在着检测成本较高及荧光探针保存时间较短等诸多不足<sup>[12]</sup>;基因指纹图谱分析法所使用的检测试剂盒非常昂贵。

由于传统方法和其他快速检测方法的局限性,微生物学检测工作者都不断地致力于建立简便、快捷和低廉的检测分析方法。LAMP<sup>[13]</sup>检测技术以其独特的优势,已被列为出口食品中致病菌检测的推荐方法(SNT2754-2011)。本实验针对副溶血性弧菌和霍乱弧菌建立的双重LAMP快速检测方法与传统方法相比,它能通过一次试验完成副溶血性弧菌和霍乱弧菌的同时检测,将检测时间缩短至5 h,检测限度可达3.12 fg,

模拟食样中双重LAMP检测限可达50 cfu/mL。但须指出的是,虽然LAMP技术具有很多的优点,但其也有自身的局限性<sup>[14]</sup>,如虽然LAMP法电泳条带是特异性的阶梯状,但此阶梯状条带并不能特异性指示产物来源,如经本实验方法检测的水产品显示阴性时,其能表明水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌均无,但如结果显示阳性,则无法确定反应体系中存在的到底是霍乱弧菌还是副溶血弧菌扩增产物,或者是两者皆有,因此对于双重以及多重LAMP实验来说,设计、改良引物,以及改进实验方法,创新结果检测方法,以达到可特异性指示双重以及多重LAMP反应扩增产物来源的目的是需要进一步深入研究的课题;另外LAMP法对引物要求高,且由于LAMP技术的敏感度极高,所以容易出现假阳性的结果,这时就需要与传统的生化培养方法结合以鉴定是否存在活菌,以使检测结果更具可靠性。

综上所述,有望将本实验所建立的双重LAMP检测体系作为传统国标检测方法的一个有力补充,在实际工作中应用双重LAMP技术对进出口水产品中副溶血弧菌和霍乱弧菌污染进行快速初筛,得到阳性样品后再用传统方法进行验证,这样就可以大大地减轻相关部门的工作量,加快通关速度,提高工作效率。

## 4 结论

综上所述,本实验建立的一套同时检测副溶血性弧菌和霍乱弧菌的双重LAMP方法,具有简便、快速和灵敏的优势,为进出口水产品中副溶血弧菌和霍乱弧菌污染的快速检测提供了简易有效的检测方法,尤其适用于从业人员对产品进行快速筛查,具有较好的推广应用前景。

## 参考文献

- [1] Su Y C, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety [J]. Food Microbiology, 2007, 6(6): 549-558
- [2] Deris Z Z, Leow V M, Wan H W, et al. Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia in splenectomised thalassaemic patient from Malaysia [J]. Tropical Biomedicine, 2009, 26(3): 320-325
- [3] 冯家望,王小玉,李丹琳,等.水产品中致病性弧菌 PCR 快速检测研究[J].中国国境卫生检疫杂志,2008,30(6):383-386  
FENG Jia-wang, WANG Xiao-yu, LI Dan-lin, et al. Study on rapid detection technique of polymerase chain reaction on *Pathogenic Vibrio spp.* in aquatic products [J]. Chinese Frontier Health Quarantine, 2008, 30(6): 383-386
- [4] T Notomi, H Okayama, H Masubuchi, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63-E63
- [5] Zhang Y, Zhang L, Sun J S, et al. Point-of-care multiplexed assays of nucleic acids using microcapillary-based loop-mediated isothermal amplification [J]. Anal. Chem., 2014, 86(14): 7057-7062
- [6] SN/T 0173-2010,进出口食品中副溶血性弧菌检验方法[S]  
SN/T 0173-2010, Determination of *Vibrio Parahaemolyticus* in food for import and export [S]
- [7] SN/T 1022-2010,进出口食品中霍乱弧菌检验方法[S]  
SN/T 1022-2010, Determination of *Vibrio Cholerae* in food for import and export [S]
- [8] Tebbs R S, Brzoska P M, Furtado M R, et al. Design and validation of a novel multiplex real-time PCR assay for *Vibrio pathogen* detection [J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(6):939-948(10)
- [9] 丁久法,潘迎捷,陈洪友,等.副溶血性弧菌 ERIC-PCR 分型及毒力基因检测研究[J].食品工业科技,2010,31(8):137-141  
DING Jiu-fa, PAN Ying-jie, CHEN Hong-you, et al. Genotyping of *Vibrio parahaemolyticus* by ERIC-PCR and virulence gene detection [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(8): 137-141
- [10] Ballamoole Krishna K, Pendru R, Devananda D, et al. Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 244-249
- [11] 江迎鸿,谭贵良,陈亚波,等.多重 PCR 方法检测食品中霍乱弧菌、副溶血性弧菌和单核细胞增生李斯特氏菌[J].广东农业科学,2011,38(10):135-137  
JIANG Ying-hong, TAN Gui-liang, CHEN Ya-bo, et al. Simultaneous detection of three food-borne bacterial pathogens by multiplex PCR [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(10): 135-137
- [12] 李宏,杨大伟,刘云国,等.多重荧光定量 PCR 同时检测霍乱弧菌、副溶血性弧菌和创伤弧菌的方法研究[J].中国卫生检验杂志,2011,5:1180-1182  
LI HONG, YANG Da-wei, LIU Yun-guo, et al. Establishment of multiplex real-time PCR assay for detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2011, 5: 1180-1182
- [13] Yamazaki W, Ishibashi M, Kawahara R, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Bmc Microbiology, 2008, 8(3): 820-828
- [14] 匡燕云,李思光,罗玉萍.环介导等温扩增核酸技术及其应用[J].微生物学通报,2007,34(3):557-560  
KUANG Yan-yun, LI Si-guang, LUO Yu-ping. Loop-mediated isothermal amplification method for detection of nucleic acids and its application [J]. Microbiology China, 2007, 34(3): 557-560
- [13] Ersoy B, Aksan E, Ozeren A. The effect of thawing methods on the quality of eels (*Anguilla anguilla*) [J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 377-380
- [14] SC 128-1984,鲜带鱼[S]  
SC 128-1984, Fresh Hairtail [S]
- [15] Ólafsdóttir G Ð, Li X, Lauzon H L, et al. Precision and application of electronic nose for freshness monitoring of whole redfish (*Sebastes marinus*) stored in ice and modified atmosphere bulk storage [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2002, 11(3-4): 229-249

---

(上接第 247 页)