

# 副溶血性弧菌 PMA-LAMP 方法的建立

马磊<sup>1</sup>, 吴莹莹<sup>1</sup>, 戴明雁<sup>1</sup>, 方结红<sup>1</sup>, 张明洲<sup>1,2</sup>

(1. 中国计量学院生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 浙江杭州 310018)

(2. 浙江省海洋食品品质及危害物控制技术重点实验室, 浙江杭州 310018)

**摘要:** 副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种常见的食源性致病菌, 在海鲜等食物中检出率很高, 食用没有煮熟的带菌食物或者腌制品, 极易引起食物中毒。目前用以检测副溶血性弧菌的快速检测方法都不能区别死活菌, 容易出现假阳性结果。本研究基于 DNA 结合染料叠氮溴化丙锭 (propidium monoazide, PMA), 利用荧光染料钙黄绿素 (Calcein) 的特性, 建立了一种实时的可视化环介导等温扩增方法 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 并与 qPCR 方法进行比较。实时可视化 LAMP 方法的反应结果, 既可以肉眼直接观测, 也可以借助荧光分析设备实时监测, 并对半定量分析进行初探, 为之后向定量分析深入研究打下基础。实验结果表明, 实时可视化 PMA-LAMP 方法的灵敏度可达  $5.0 \times 10^2$  CFU/mL, 模拟食样灵敏度为  $1.9 \times 10^2$  CFU/mL, 与 PMA-qPCR 方法结果一致。除去前增菌时间, 整个检测过程只需 2 h, 且准确率高, 为副溶血性弧菌快速检测的开展提供了有效的技术支持。

**关键词:** 副溶血性弧菌; 可视化环介导等温扩增方法; 叠氮溴化丙锭; 实时荧光定量 PCR; 快速检测

文章编号: 1673-9078(2016)07-205-213

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.032

## Development of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay

### Based on Propidium Monoazide (PMA) for Detecting *Vibrio*

### *parahaemolyticus*

MA Biao<sup>1</sup>, WU Ying-ying<sup>1</sup>, DAI Ming-yan<sup>1</sup>, FANG Jie-hong<sup>1</sup>, ZHANG Ming-zhou<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science, China Jiliang University, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, Hangzhou 310018) (2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Marine Food Quality and Hazard Controlling Technology, Hangzhou 310018)

**Abstract:** *Vibrio parahaemolyticus* is a common foodborne pathogen frequently detected in seafood, and consumption of raw, pickled, or uncooked food contaminated with *V. parahaemolyticus* can cause food poisoning. Nearly all current methods for rapidly detecting *V. parahaemolyticus* can not distinguish live cells from dead cells, resulting in false-positive results. In this study, a real-time visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was developed based on the characteristics of the DNA binding dye propidium monoazide (PMA) and fluorescent dye calcein to detect viable *V. parahaemolyticus* strains. This method was compared to quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The results of real-time visual PMA-LAMP assay could be observed by the naked eye and monitored in real-time using fluorescence analysis instruments. A preliminary semi-quantitative analysis was conducted, providing a basis for in-depth quantitative analysis. The results indicated that the sensitivities of the real-time visual PMA-LAMP assay in the sensitivity experiment and artificial contamination experiment were  $5.0 \times 10^2$  CFU/mL and  $1.9 \times 10^2$  CFU/mL, respectively, which were consistent with the values from PMA-qPCR. The entire detection process required only 2 h, excluding the pre-enrichment step. Furthermore, the method showed high accuracy and may be an effective technical method for rapid detection of *V. parahaemolyticus*.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; visual loop mediated isothermal amplification; propidium monoazide; real-time quantitative polymerase chain reaction; rapid detection

收稿日期: 2015-08-29

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY13C200009); 浙江省重大科技专项重点项目 (2012C12013-3); 宁波市重大农业科技专项 (2013C11003)

作者简介: 马磊 (1990-), 男, 硕士研究生, 从事食源性微生物快速检测

通讯作者: 张明洲 (1970-), 男, 博士, 教授, 食品安全快速检测技术研究

副溶血性弧菌 (*Vibrio Parahaemolyticus*) 属于弧菌科弧菌属, 是一种嗜盐性的革兰氏阴性菌, 最早从一起发生在大阪的食物中毒事件中分离得到, 一般在近海或江河入海口之类的区域内广泛分布, 摄入没有煮熟的含有此菌的食物, 如海鱼、海虾、海蟹以及腌

制品极易导致副溶血性弧菌食物中毒<sup>[1]</sup>。随着各国间贸易往来的日益频繁,尤其是海鲜空运等运输手段的实现,人群感染副溶血性弧菌所致的食源性疾病发病率日趋上升,危害程度直逼沙门氏菌,已成为不少沿海国家细菌性食物中毒的首要致病菌<sup>[2~3]</sup>。在我国,该菌引起的食物中毒占比就高达50%~70%,且多发于夏秋季节的沿海城市,时常造成集体发病<sup>[4]</sup>。副溶血性弧菌会造成肠胃炎和败血症,病后影响免疫力,可反复感染,严重威胁人们健康和公共卫生安全<sup>[5]</sup>。

传统培养法高度依赖实验室,且繁琐费力,完成全套流程包括培养、分离和生化鉴定,需要4~7 d时间,不利于及时确定病原体,尽快消除安全隐患或对症治疗<sup>[6]</sup>。近年来,有关快速检测方法的研究探索进展迅猛,诸如酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>[7]</sup>、纳米免疫磁分离技术<sup>[8]</sup>、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)<sup>[9]</sup>、荧光定量PCR(realtime fluorescence quantitative PCR, qPCR)<sup>[10]</sup>等分析方法不断涌现,以特异性高、灵敏度高等优势,为副溶血性弧菌的快速筛查提供了多种途径。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种独特的核酸扩增技术,能够在60℃~65℃的恒定温度下,利用链置换循环快速扩增靶序列<sup>[11]</sup>,反应结果除了通过琼脂糖凝胶电泳和浊度检测等手段鉴定外,还能借助反应前添加染料如钙黄绿素,根据反应结束的颜色变化来判断<sup>[12]</sup>。该方法灵敏度和特异性高,操作简单,无需精密仪器,适合偏远地区或基层的现场

快速检测。然而,上述方法都不能区分死活菌,往往造成较高的假阳性结果,现有的研究多采用叠氮溴乙锭(ethidium bromide monoazide, EMA)、PMA等DNA结合染料来剔除死菌的干扰<sup>[13~14]</sup>,并且PMA毒性较EMA低,对死细胞的特异性也较高<sup>[15]</sup>。

本研究通过建立实时可视化PMA-LAMP方法来检测副溶血性弧菌活菌,因为钙黄绿素染料的最大荧光吸收(495 nm)/发射波长(515 nm)和SYBR Green I(最大吸收波长487 nm,最大发射波长520 nm)相近,可用qPCR仪来半定量分析LAMP反应结果。为了更好的优化建立实时可视化PMA-LAMP方法,本研究在肉眼观测结果的同时,也利用qPCR来实时监测反应,并与PMA-qPCR的结果进行分析对比。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

实验所用菌株包括副溶血性弧菌(ATCC17802)、霍乱弧菌(GIMCC1.449)、沙门氏菌(GIMCC1.345)、大肠杆菌O157:H7(GIMCC1.201)、阪崎肠杆菌(GIMCC1.296)、单增李斯特菌(ATCC19115)、志贺氏菌(GIMCC1.424)、金黄色葡萄球菌(GIMCC1.142)分别购自广东省微生物菌种保藏中心和美国典型培养物保藏中心,现保存于本实验室;另有1株副溶血性弧菌与5株非副溶血性弧菌由舟山市出入境检验检疫局赠送,详见表1。

表1 特异性试验所用菌株

Table 1 Information of bacterial strains used for specificity tests in the study

菌株编号	菌株名称	菌株信息	LAMP 结果	qPCR 结果
1	副溶血性弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	+	+
2	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	GIMCC 1.449	-	-
3	肠炎沙门氏菌 <i>Salmonella enteritidis</i>	GIMCC 1.345	-	-
4	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	GIMCC 1.142	-	-
5	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	GIMCC 1.201	-	-
6	阪崎肠杆菌 <i>Cronobacter Sakazakii</i>	GIMCC 1.296	-	-
7	单增李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	-	-
8	志贺氏菌 <i>Shigella</i>	GIMCC 1.424	-	-
9	副溶血性弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <sup>a</sup>	H4-3	+	+
10	表皮葡萄球菌 <i>staphylococcus epidermidis</i> <sup>a</sup>	/	-	-
11	霍氏弧菌 <i>Vibrio hollisae</i> <sup>a</sup>	/	-	-
12	拟态弧菌 <i>Vibrio mimicus</i> <sup>a</sup>	/	-	-
13	海鱼弧菌 <i>Vibrio damsela</i> <sup>a</sup>	/	-	-
14	创伤弧菌 <i>Vibrio vulnificus</i> <sup>a</sup>	/	-	-
15	河流弧菌 <i>Vibrio fluvialis</i> <sup>a</sup>	/	-	-

注: GIMCC.广东省微生物菌种保藏中心; ATCC.美国典型培养物保藏中心; <sup>a</sup> 由舟山出入境检验检疫局赠送提供(未经过血清型鉴定)。

### 1.1.2 主要试剂和仪器

试剂: qPCR 试剂 2×SensiFAST Probe Lo-ROX 反应液购自美国 Bioline, PMA 染料购自美国 Biotium(用 100 μL ddH<sub>2</sub>O 稀释到终浓度为 20 mM), 3%氯化钠的碱性蛋白胨水和 TCBS 琼脂培养基购自青岛海博生物技术有限公司, dNTPs 购自美国 Thermo Scientific 公司, 8U/μL *Bst* DNA 聚合酶购自英国 NEB 公司, LAMP 和 qPCR 的引物均委托英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

仪器: 美国 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪、美国 Biotium PMA-Lite LED 光解仪、数显恒温水浴

锅、西班牙 Telstar 二级生物安全柜、台式恒温振荡器、生化培养箱等。

### 1.1.3 引物设计

根据副溶血性弧菌的 *toxR* 基因(GenBank 登录号: GQ228073.1)上一段长为 254 bp 的高度保守的序列, 分别设计 LAMP 引物和 TaqMan 探针法 qPCR 引物探针。LAMP 引物利用 Primer Explorer version 4.0 在线软件设计, 包括一对内引物 FIP/BIP、一对外引物 F3/B3 和一条下游环引物 LB, qPCR 引物利用 Beacon Designer 7.9 引物设计软件设计, 详见表 2。

表 2 副溶血性弧菌 LAMP 引物和 qPCR 引物

Table 2 Primers of LAMP and qPCR designed for *Vibrio parahaemolyticus*

引物名称	引物序列 (5'-3')	产物大小/bp	
LAMP	VP-F3	GATGGCACAGATCACAGG	185
	VP-B3	CGTCAAATCATCCAAAGTGA	
	VP-FIP	CGCGCATCAATTCGAGTTGATTTTGGCGTATCACAAGATCG	
	VP-BIP	AGCTAAAACGTGAGCCATTCCTTTTCCCAAGTTTCCAAATCCTG	
	VP-LB	CGCCTCAGTTCATATCAATCC	
qPCR	VP-F	GTGCAGGTTTATGTGTTC	213
	VP-R	CCTGAATACGGGATTAGAC	
	VP-P	FAM-CGCTGATGGCACAGATCACAG-TAMRA	

注: VP-P 荧光基团 FAM, 猝灭基团 TAMRA。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌液制备和 DNA 模板提取

用于灵敏度的活菌制备: -80 °C 下保藏的副溶血性弧菌划线接种于 TCBS 固体培养基上, 37 °C 培养 18 h 后, 挑取单菌落于 3%氯化钠的碱性蛋白胨水中, 37 °C 过夜培养, 得到初始菌液 OD<sub>600</sub> 值接近 1, 约为 10<sup>9</sup> CFU/mL。将原菌液 10 倍梯度稀释, 一部分用于基因组 DNA 的提取或 PMA 处理, 一部分用于平板计数。菌落计数以菌落形成单位 (Colony-forming units, CFU) 表示。

死菌制备: 采用高温煮沸法制备死菌, 即将纯培养的副溶血性弧菌菌液 100 °C 加热 10 min。另取一部分死菌液, 10 倍梯度稀释后取 1 mL 与平板计数琼脂培养基混合(参照国标 GB 47892-2010), 待培养基凝固后置于 37 °C 培养 48 h, 观察有无菌落产生, 再培养 3~6 d 确定有无活菌存在, 以证明此方法可行。

为了满足快速检测的要求, 本研究采用煮沸法提取副溶血性弧菌基因组 DNA。取 1 mL 37 °C 过夜培养的菌液, 8000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液后加入 1

mL ddH<sub>2</sub>O 吸打混匀, 再 8000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 接着加入 50 μL ddH<sub>2</sub>O, -20 °C 下急冻 20 min 后, 100 °C 加热 10 min, 最速离心 2 min 获得 DNA 模板, 置于 -20 °C 下保存。当 PMA 处理后, 为了避免 DNA 损失造成非 PMA 影响而扩增信号减弱, 直接取 500 μL 菌液, 100 °C 加热 10 min, 最速离心 2 min 后用于后续试验。样品中提取细菌基因组 DNA 时, 在加热裂解前, 先分别加入 20 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL) 和 5 μL 溶菌酶 (10 mg/mL) 帮助去除基质中蛋白质的干扰和加速细胞壁裂解, 再进行煮沸提取的步骤。

### 1.2.2 实时可视化 LAMP 分析方法和 qPCR 分析方法的建立

通过优化, 最终确定 25 μL 的 LAMP 反应体系如下: 20 mM Tris-HCl(pH 8.8), 10 mM KCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Tween 20, 800 mM 甜菜碱, 4 种 dNTPs 各 1.4 mM, 外引物 0.4 μM, 内引物 3.2 μM, 下游环引物 1.6 μM, 300 mM 钙黄绿素, 500 mM MnCl<sub>2</sub>, 8U *Bst* DNA 聚合酶, 2.5 μL DNA 模板。反应在 65 °C 下进行 60 min, 反应结果由两种途径给出, 一是直接观察颜色变化, 阳性颜色为荧光绿,

阴性颜色为黄褐色，二是利用钙黄绿素的荧光特性和 SYBR Green I 相近的原理，借助美国 Bio-Rad CFX 荧光定量 PCR 仪的 SYBR 荧光通道，收集反应过程中的荧光变化，形成半定量荧光曲线。

TaqMan 探针法 qPCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ，反应组分包括 2 $\times$ SensiFAST Probe Lo-ROX，正向引物 0.4  $\mu\text{M}$ ，反向引物 0.4  $\mu\text{M}$ ，TaqMan 探针 0.1  $\mu\text{M}$  和 2.5  $\mu\text{L}$  DNA 模板。反应程序如下：95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min，95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 sec，60  $^{\circ}\text{C}$  退火延伸 26 sec，然后第二步到第三步反应 40 个循环，在退火延伸步骤进行荧光收集。当 Ct 值小于 35 时，判定为阳性结果，反之则为阴性。

### 1.2.3 实时可视化 LAMP 和 qPCR 特异性和灵敏度

**特异性：**利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒（购于北京百泰克）提取基因组 DNA，并采用上述建立的两种分析方法，分别对 8 株实验菌株的基因组 DNA 进行扩增，以评价方法的特异性。

**灵敏度：**平板计数法确定初始菌液为  $5.0 \times 10^8$  CFU/mL，然后将稀释好的 10 组菌液煮沸法提取基因组 DNA，用于实时可视化 LAMP 和 qPCR 反应。

### 1.2.4 PMA 工作浓度优化

不同细菌，所需的 PMA 浓度不同，为了获得适合副溶血性弧菌的处理浓度，分别设置 PMA 浓度为 5、10、15、20、25 和 30  $\mu\text{M}$ ，以  $5.0 \times 10^5$  CFU/mL 的死菌为实验对象，经过 5 min 暗室孵育和 30 min LED 光解仪光照后，煮沸法提取模板，再进行实时可视化 LAMP 和 qPCR 的扩增。

### 1.2.5 PMA 处理菌液浓度上限

基质中死菌的浓度会影响 PMA 处理的效率，浓度过高，不仅需要更多的 PMA，且会增加液体的浊度，妨碍光线穿透。为了获得较佳的死菌浓度，依次设定待处理的死菌拷贝数为  $5.0 \times 10^8$ 、 $5.0 \times 10^7$ 、 $5.0 \times 10^6$ 、 $5.0 \times 10^5$ 、 $5.0 \times 10^4$  CFU/mL，结果以死菌 DNA 的扩增能否被完全压制来判定。

### 1.2.6 实时可视化 PMA-LAMP 分析方法和 PMA-qPCR 分析方法的建立及灵敏度试验

保持总菌液数量级在  $10^5$  CFU/mL，且总体积为 500  $\mu\text{L}$  不变，然后将 10 倍梯度稀释的副溶血性弧菌活菌加入到  $5.0 \times 10^5$  CFU/mL 的死菌中，制备成死活菌混合液，随后经 PMA 处理并提取基因组 DNA，所得 DNA 模板用于后续的实时可视化 LAMP 和 qPCR 的反应。每个反应重复 3 个平行。

### 1.2.7 实时可视化 PMA-LAMP 方法和 PMA-qPCR 方法检测模拟食样

从市场上购得新鲜的鳕鱼块，参照国标方法确定

其为副溶血性弧菌阴性，然后称取 25 g 样本均质制成匀浆，加入 225 mL 3% 氯化钠的碱性蛋白胨水，充分混匀。将纯培养的副溶血性弧菌 10 倍梯度稀释，一部分经平板计数，获得原菌液浓度为  $1.9 \times 10^8$  CFU/mL。将另一部分活菌分别加到  $1.9 \times 10^5$  CFU/mL 的死菌菌液中，温和混匀，然后人为污染制备好的鳕鱼匀浆，PMA 处理后提取 DNA，再进行实时可视化 LAMP 和 qPCR 的反应，每个反应重复 3 个平行。

### 1.2.8 实际样品

从超市和农贸市场随机购得新鲜水产样品和经过加工的熟食，包括基围虾、带鱼、鱿鱼和鳗鱼干等（表 2），经过均质和前增菌等前处理步骤后，分别用实时可视化 PMA-LAMP 和 PMA-qPCR 进行检测，与传统培养法（国标 GB 4789.7-2013）结果进行对比。

## 2 结果与分析

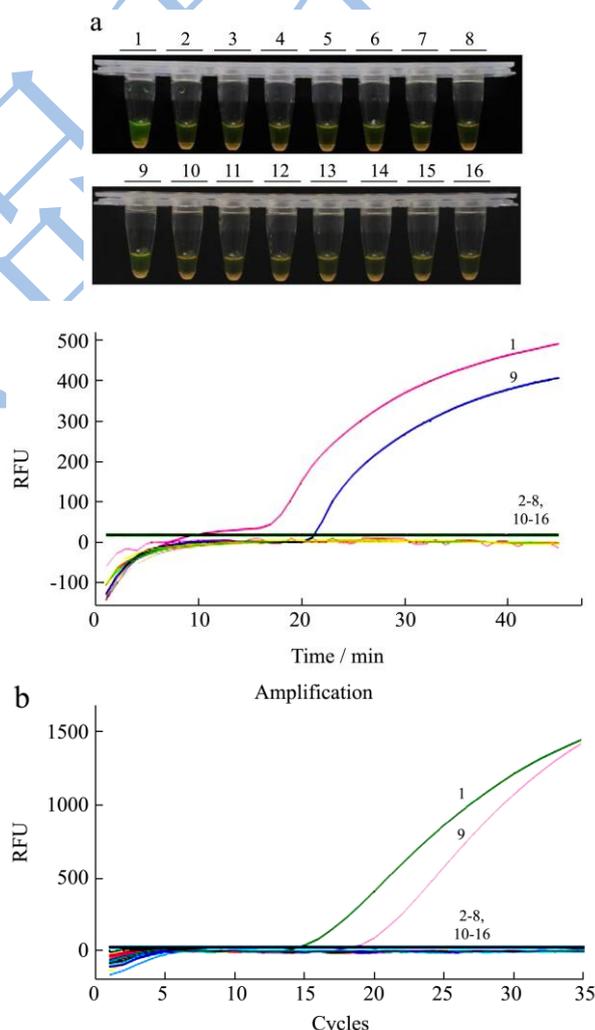


图 1 副溶血性弧菌 LAMP 和 qPCR 特异性

Fig.1 Specificity analysis of LAMP and qPCR assays for detecting *Vibrio parahaemolyticus*

注：a: LAMP 反应；b: qPCR 反应。1, 9: 副溶血性弧

菌; 2-8, 10-15: 非副溶血性弧菌菌株; 16: 阴性对照。

### 2.1 实时可视化 LAMP 和 qPCR 特异性和灵敏度

实时可视化 LAMP 检测方法结合了 LAMP 技术和钙黄绿素的特点, 利用副溶血性弧菌 *toxR* 基因相关序列设计的 LAMP 引物, 并对 LAMP 反应体系中关键组分进行了优化, 包括  $Mg^{2+}$  浓度、甜菜碱浓度、外引物与内引物浓度比、钙黄绿素浓度和  $Mn^{2+}$  浓度等。使用优化后的可视化 LAMP 反应体系和 qPCR 体系进行副溶血性弧菌的特异性试验, 从实时可视化 LAMP 方法和 qPCR 方法的反应结果可以看出(表 1 和图 1), 除了副溶血性弧菌有明显的特异性扩增外, 其余菌株都是阴性结果。

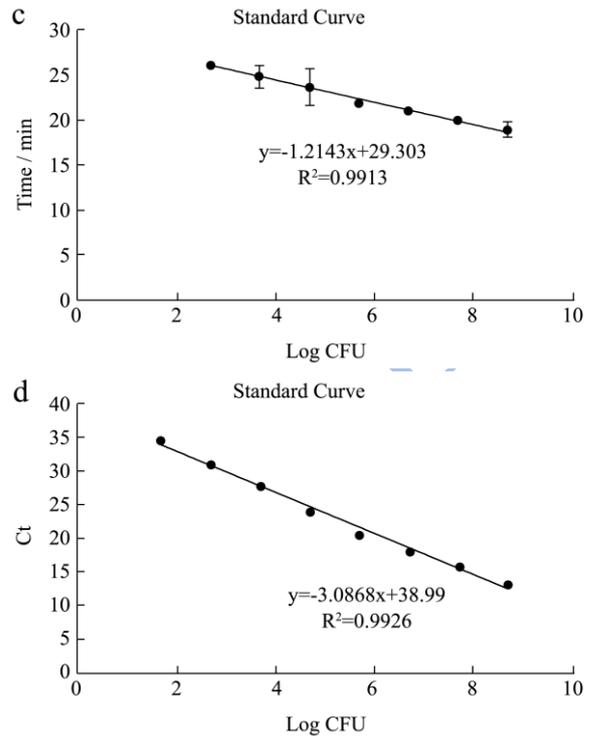
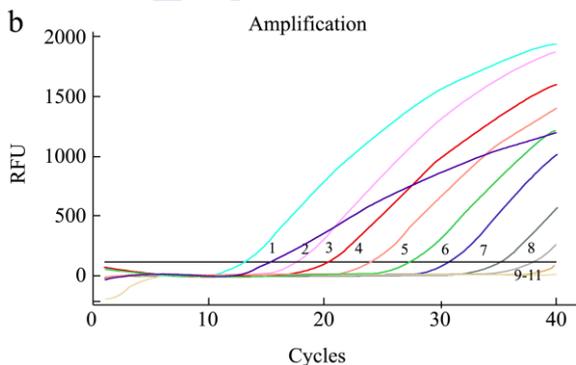
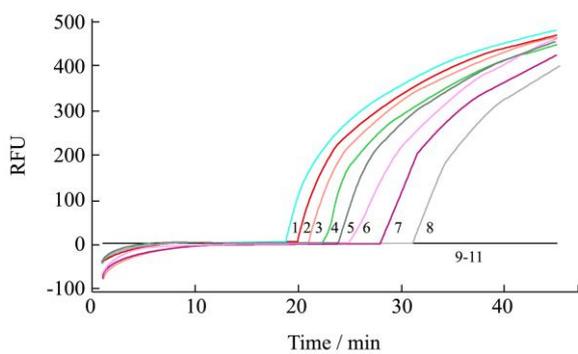
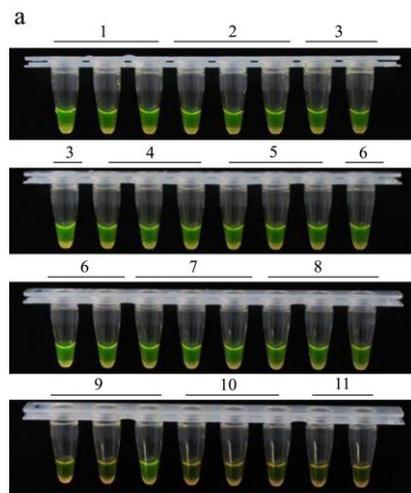


图 2 副溶血性弧菌实时可视化 LAMP 和 qPCR 检测灵敏度

Fig.2 Sensitivity of the visual LAMP assay and qPCR assay

注: a: LAMP 反应; b: qPCR 反应; c: LAMP 方法标准曲线; d: qPCR 方法标准曲线。1-11:  $5.0 \times 10^8$ ,  $5.0 \times 10^7$ ,  $5.0 \times 10^6$ ,  $5.0 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^4$ ,  $5.0 \times 10^3$ ,  $5.0 \times 10^2$ ,  $5.0 \times 10^1$ ,  $5.0 \times 10^0$ ,  $5.0 \times 10^{-1}$ , 空白对照。

由此表明, 两种方法的引物特异性良好, 均只能检出相应的致病菌, 与其他食源性微生物无交叉反应。灵敏度试验以 10 个浓度梯度的副溶血性弧菌基因组 DNA 为模板, 分别进行实时可视化 LAMP 检测和 qPCR 检测。从结果图上可知(图 2), 实时可视化 LAMP 的灵敏度达到  $5.0 \times 10^1$  CFU/mL,  $R^2$  为 0.9913, 与 qPCR ( $R^2=0.9926$ ) 一致。

### 2.2 PMA 工作浓度优化和处理上限

PMA 作为一种 DNA 结合染料, 能够特异性地通过死菌的破损细胞壁, 进入细胞内与 DNA 结合, 并在光照下改变 DNA 的构象, 使其无法正常扩增, 从而达到区分死活菌的目的。PMA 浓度过高, 会增加对活细胞的毒性, 反之则无法完全压制死细胞 DNA 的扩增。因此通过试验优化, 确定 PMA 的最佳浓度范围为 20-30  $\mu$ M (图 3), 如考虑经济成本, 则选 20  $\mu$ M 为宜。另一方面, 当死菌浓度为  $5.0 \times 10^5$  CFU/mL 及以下, 即死菌拷贝数的数量级不高于  $10^5$  时(图 4), 工作浓度为 20  $\mu$ M 的 PMA 染料能完全抑制死菌的扩增信号。试验过程中, 选定 PMA 暗室孵育时间为 5 min, 蓝色 LED 灯曝光为 30 min。

2.3 实时可视化 PMA-LAMP 和 PMA-qPCR 灵敏度

弧菌的实时可视化 PMA-LAMP 检出限为  $5.0 \times 10^2$  CFU/mL, 与 PMA-qPCR 结果吻合 (图 5)。

敏度

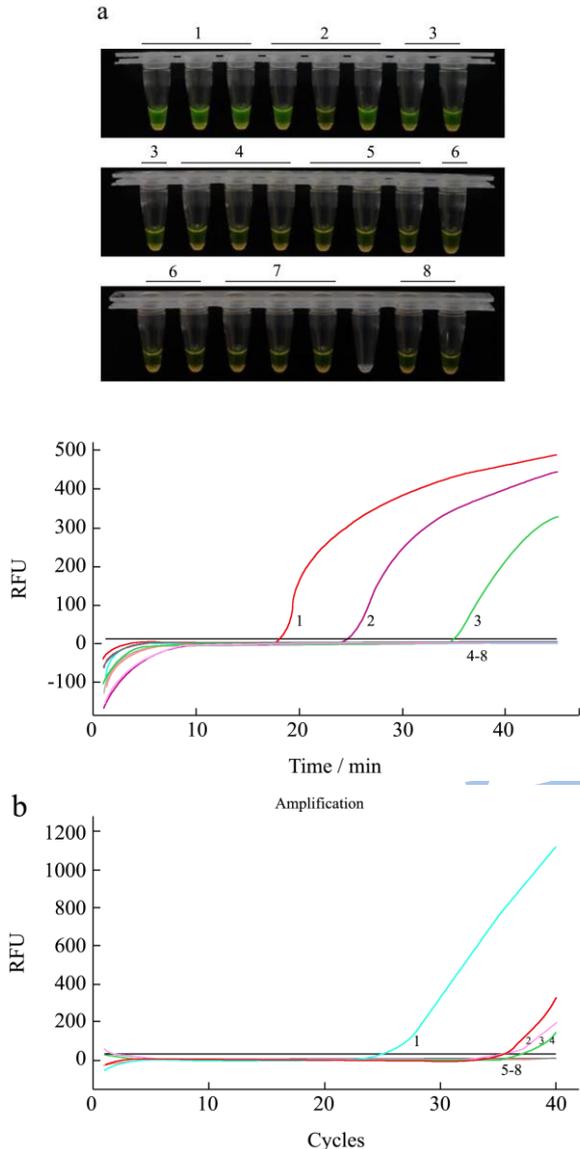


图 3 PMA 浓度优化

Fig.3 Optimization of PMA concentration

注: a: LAMP 反应; b: qPCR 反应。1: 0  $\mu$ M 处理的死菌; 2: 5  $\mu$ M 处理的死菌; 3: 10  $\mu$ M 处理的死菌; 4: 15  $\mu$ M 处理的死菌; 5: 20  $\mu$ M 处理的死菌; 6: 25  $\mu$ M 处理的死菌; 7: 30  $\mu$ M 处理的死菌; 8: 阴性对照。

基于 PMA 的处理, 本研究建立了副溶血性弧菌的实时可视化 PMA-LAMP 检测方法。在有  $5.0 \times 10^5$  CFU/mL 死菌的存在下, 分别添加  $5.0 \times 10^5$  至  $5.0 \times 10^1$  CFU/mL 7 个梯度的活菌, 制成死活菌混合液, 采用 PMA 处理, 用于灵敏度试验。同时设置 3 个对照, 分别是不受 PMA 处理的  $5.0 \times 10^5$  CFU/mL 的纯活菌、PMA 处理的纯死菌和阴性对照。结果表明, 副溶血性

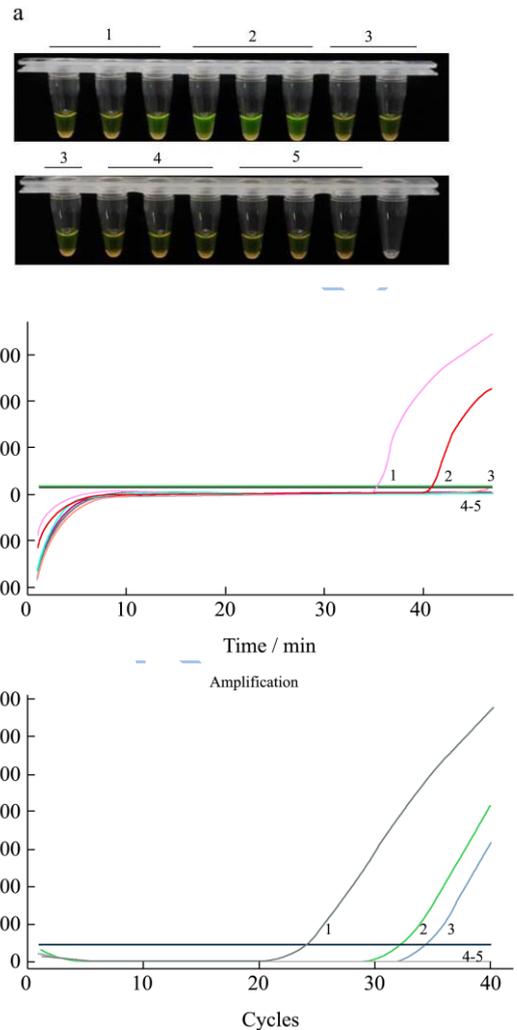
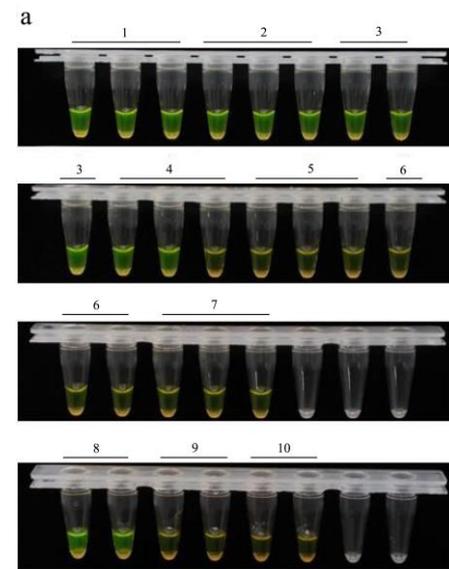


图 4 PMA 处理菌液上限

Fig.4 Upper limit of PMA treatment

注: a: LAMP 反应; b: qPCR 反应。1-5:  $5.0 \times 10^8$ ,  $5.0 \times 10^7$ ,  $5.0 \times 10^6$ ,  $5.0 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^4$  CFU/mL。



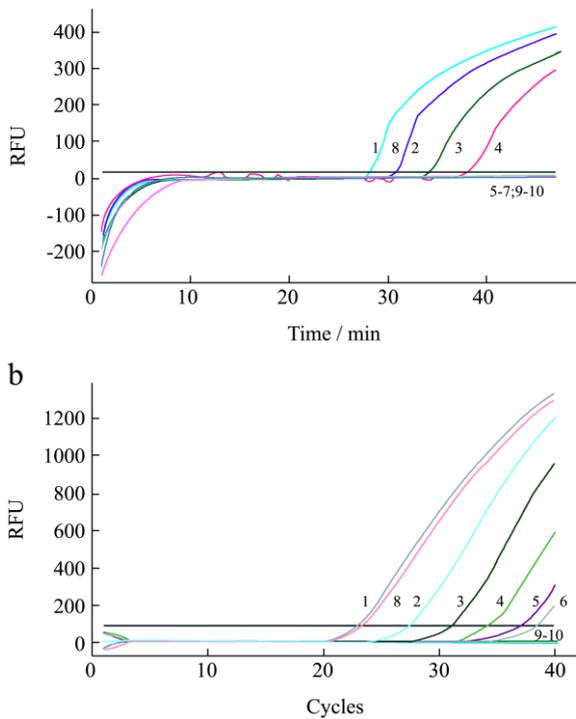


图5 副溶血性弧菌实时可视化 PMA-LAMP 和 PMA-qPCR 灵敏度

Fig.5 Sensitivity of visual PMA-LAMP and PMA-qPCR

注: a: LAMP 反应; b: qPCR 反应。1-7:  $5.0 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^4$ ,  $5.0 \times 10^3$ ,  $5.0 \times 10^2$ ,  $5.0 \times 10^1$ ,  $5.0 \times 10^0$ ,  $5.0 \times 10^{-1}$ CFU/mL; 8: PMA 处理的纯活菌; 9: PMA 处理的纯死菌; 10: 阴性对照。

## 2.4 实时可视化 PMA-LAMP 和 PMA-qPCR 检测模拟食样的灵敏度

### 测模拟食样的灵敏度

在模拟食样试验中,将 10 倍梯度稀释的活菌分别与  $10^5$  CFU/mL 的死菌相混合,然后分别污染干净的鳕鱼样本,用于实时可视化 PMA-LAMP 和 PMA-qPCR 反应。结果表明,副溶血性弧菌实时可视化 PMA-LAMP 检出限为  $1.9 \times 10^2$  CFU/mL (图 6),PMA-qPCR 检出限也为  $1.9 \times 10^2$ CFU/mL。

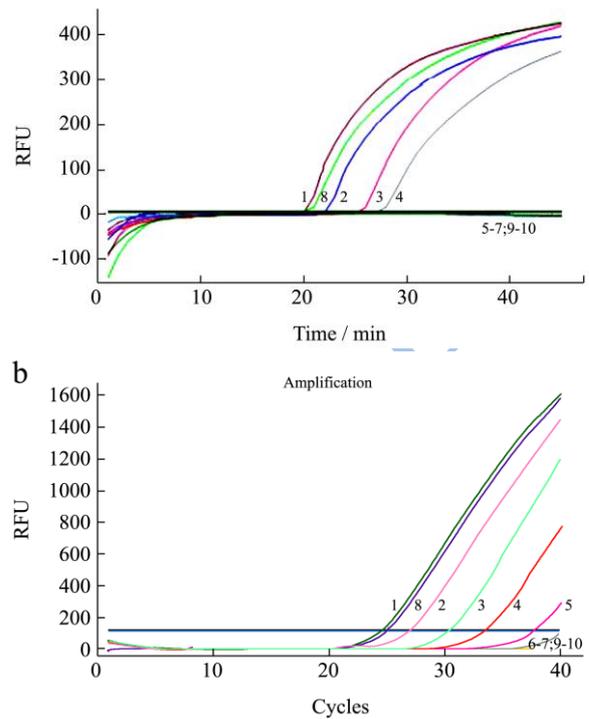
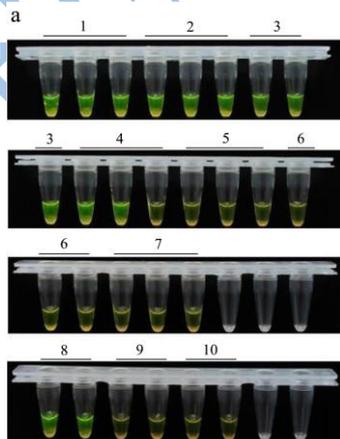


图6 副溶血性弧菌实时可视化 PMA-LAMP 模拟食样灵敏度

Fig.6 Sensitivity of visual PMA-LAMP and PMA-qPCR for detecting artificial contaminated food

注: a: LAMP 反应; b: qPCR 反应。1-7:  $1.9 \times 10^5$ ,  $1.9 \times 10^4$ ,  $1.9 \times 10^3$ ,  $1.9 \times 10^2$ ,  $1.9 \times 10^1$ ,  $1.9 \times 10^0$ ,  $1.9 \times 10^{-1}$ CFU/mL; 8: PMA 处理含纯活菌的样本; 9: PMA 处理含纯死菌的样本; 10: 阴性对照。

## 2.5 实际样品检测

表3 副溶血性弧菌实际样品检测

Table 3 Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in actual samples

样品	数量	实时可视化 PMA-	PMA-qPCR	传统培养法
		LAMP 阳性样品数	阳性样品数	阳性样品数
基围虾	33	8	7	7
鱿鱼	10	6	4	4
带鱼	5	2	3	3
鳕鱼	7	0	0	0
文蛤	4	1	1	1
烤鳗鱼	3	0	0	0
甜烤鱼干	2	0	0	0
黄鱼干	7	0	0	0
鱿鱼干	1	0	0	0
合计	72	17	15	15
检出率/%		23.61%	20.83%	20.83%

一般情况下,由于采集来的样品都曾处于不利于细菌繁殖的异常环境中,例如运输过程中的冷冻或是

烹饪加工过程中的高温煎炸,为了提高检出率,需用选择性培养基进行适当的前增菌步骤(6-8 h),以富集样品中含有的细菌。因此从样品前处理到观察反应结果,实时可视化 PMA-LAMP、PMA-qPCR 和传统培养法三种检测手段前后需要的时间至少为 8 h、8 h 和 3 d,检出率分别为 23.6%、20.8%和 20.8%(表 3)。与另外两种方法相比,可视化 PMA-LAMP 方法出现 2 份假阳性结果,假阳性率 2.8%;1 份样品未检出,假阴性率 1.4%。造成假阳性与假阴性的因素是 PMA? 还是样品基质问题? 这方面研究工作有待进一步深入研究。尽管试验结果表明,与培养法等两种方法相符率为 95.8%,但实时可视化 PMA-LAMP 方法操作简便,检测时间较短,不依赖精密仪器,且靠肉眼观察也能准确判定结果,在快速检测筛选中更具效率和优势。

### 3 结论

3.1 近年来,荧光定量 PCR 方法已被广泛应用于检测副溶血性弧菌,不仅特异性和灵敏度高,而且可以定量分析核酸样品,不容易出现因污染造成的假阳性现象。然而,荧光定量 PCR 的反应试剂和仪器相当昂贵,成本的限制致使其难以在基层或偏远地区推广。实时可视化 LAMP 方法则没有上述的两个缺点,且因为不再依靠电泳条带来鉴定结果,只需肉眼观察颜色变化以判断阴阳性,开盖造成的气溶胶污染的问题也得到了很好的解决。作为一种荧光指示剂,钙黄绿素染料反应前后出现鲜明的颜色变化,无须在特殊光源下观察。在本研究中,我们借助荧光数据收集仪器如荧光定量 PCR 仪,初步探索 LAMP 方法的半定量分析,为实时可视化 PMA-LAMP 的建立提供可靠依据,并为今后深入研究 LAMP 定量分析方法打下基础。

3.2 基质中影响 PMA 作用效率的因素有很多,如浊度、细胞浓度、盐浓度等。此外,目的片段的序列长度也会影响 PMA 的结合效率。据研究报道,普遍认为待扩增的片段越长,PMA 的抑制效果越好<sup>[16]</sup>,但同时也降低了 LAMP 和 qPCR 反应的特异性,因此在选取片段和设计引物时,需要仔细权衡。鉴于实际样品检测时基质环境十分复杂,在必要的前增菌步骤之后,应适当将样品稀释,再加入 PMA 处理。

3.3 本研究建立的副溶血性弧菌活菌实时可视化 PMA-LAMP 检测方法,反应温度为 65 °C,反应时间至多 60 min,其检出限能与荧光定量 PCR 基本持平,达到  $5.0 \times 10^2$  CFU/mL,并且与霍乱弧菌、沙门氏菌、单增李斯特菌等其他食源性致病微生物之间无交叉反应。其结果不仅能直接凭肉眼观测,也能由荧光曲线

直观地反映菌量和具体反应时间的关系,达到实时监测的目的。实时可视化 PMA-LAMP 检测方法是一种简单高效、特异性高、灵敏度高的快速检测,无需依赖实验室精密仪器和专业人员,同时能排除死菌的干扰,避免出现假阳性的结果,造成不必要的物力财力浪费。该方法可以在基层或偏远地区的快速初筛领域推广应用,在商业和临床检测领域均具备广泛的应用前景。

### 参考文献

- [1] Su Y, Liu C. *Vibrio Parahaemolyticus*: A concern of seafood safety[J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 549-558
- [2] 吴世嘉,王艳,段诺,等.基于磁分离-上转换荧光标记的副溶血性弧菌免疫检测新方法研究[J].食品与生物技术学报, 2014,33(7):682-689  
WU Shi-jia, WANG Yan, DUAN Nuo, et al. Novel immunodetection method for *Vibrio parahaemolyticus* based on magnetic separation and upconversion nanoparticles labeling [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(7): 682-689
- [3] 刘秀梅.食源性疾病监控技术的研究[J].中国食品卫生杂志, 2004,16(1):3-9  
LIU Xiu-mei. Studies on the techniques for the monitoring and controlling foodborne illness [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2004, 16(1): 3-9
- [4] 陈茂义,胡婕,陈婷,等.副溶血性弧菌毒力基因研究进展[J].公共卫生与预防医学,2013,24(3):65-67  
CHEN Mao-yi, HU Jie, CHEN Ting, et al. Research progress of virulence genes of vibrio [J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2013, 24(3): 65-67
- [5] Nakaguchi Y. Contamination by *Vibrio parahaemolyticus* and virulent strains in seafood marketed in Thailand, Vietnam, Malaysia, and Indonesia [J]. Tropical Medicine and Health, 2013, 41(3): 95-102
- [6] 张倩华.副溶血性弧菌实验室检测研究进展[J].吉林医学, 2014,35(25):5720-5722  
ZHANG Qian-hua. Progress in laboratory detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Jilin Medical Journal, 2014, 35(25): 5720-5722
- [7] 窦勇,宁喜斌.副溶血弧菌间接 ELISA 快速检测法的建立[J].食品工业科技,2007, 28(6): 205-209  
DOU Yong, NING Xi-bin. The establishment of indirect ELISA rapid method for detecting *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(6): 205-209

- [8] 张蕾,曾静,魏海燕,等.纳米免疫磁分离-实时荧光聚合酶链式反应快速检测海产品中副溶血性弧菌[J].食品科学, 2014,35(4): 107-110  
ZHANG Lei, ZENG Jing, WEI Hai-yan, et al. A novel method of nano-Immunomagnetic separation-Real time-polymerase chain reaction for detecting *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods [J]. Food Science, 2014, 35(4): 107-110
- [9] Khamesipour F, Noshadi E, Moradi M, et al. Detection of *Vibrio* spp. in shrimp from aquaculture sites in Iran using polymerase chain reaction (PCR) [J]. Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation, 2014, 7(1): 1-7
- [10] Kaufman GE, Blackstone GM, Vickery MC, et al. Real-time PCR quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters using an alternative matrix [J]. Journal of food protection, 2004, 67(11):2424-2429
- [11] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63-e63
- [12] Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products [J]. Nature Protocols, 2008, 3(5): 877-882
- [13] 祝儒刚,吕淑霞,刘月萍,等.基于DNA染料EMA的PCR技术检测鉴别副溶血性弧菌死活细胞[J].食品与发酵工业, 2010,36(7):144-149  
ZHU Ru-gang, LV Shu-xia, LIU Yue-ping, et al. Detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus* cells based on DNA EMA PCR Dye [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(7): 144-149
- [14] Zhu R, Li T, Jia Y, et al. Quantitative study of viable *Vibrio parahaemolyticus* cells in raw seafood using propidium monoazide in combination with quantitative PCR [J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 90(3): 262-266
- [15] Fittipaldi M, Nocker A, Codony F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification [J]. J. Microbiol. Methods, 2012, 91(2): 276-289
- [16] Schnetzinger F, Pan Y, Nocker A. Use of propidium monoazide and increased amplicon length reduce false-positive signals in quantitative PCR for bioburden analysis [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(5): 2153-2162