

# 重组酶介导扩增技术快速检测水产品中副溶血性弧菌

郝林慧<sup>1</sup>, 梁莹<sup>1</sup>, 罗纪军<sup>2</sup>, 申进玲<sup>3</sup>, 杨捷琳<sup>3</sup>, 余晓峰<sup>2</sup>, 薛峰<sup>1\*</sup>, 张弛<sup>4</sup>,  
蒋原<sup>3</sup>, 汤芳<sup>1</sup>, 戴建君<sup>1,5</sup>

(1. 南京农业大学教育部动物健康与食品安全国际合作联合实验室, 南京 210095; 2. 合肥海关技术中心, 合肥 230088;  
3. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135; 4. 南京市产品质量监督检验院, 南京 210008;  
5. 中国药科大学, 南京 211199)

**摘要: 目的** 建立重组酶介导扩增技术(recombinase aid amplification, RAA)快速检测副溶血性弧菌的分析方法。**方法** 根据副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) *tlh* 基因序列设计特异性引物, 经引物筛选, 建立副溶血性弧菌的 RAA 的快速检测方法。**结果** 该方法在 30 min 即可观察到检测结果。特异性试验结果表明 RAA 方法检测副溶血性弧菌与其他弧菌属菌种不存在交叉反应, 灵敏度试验分析结果表明 RAA 方法检测副溶血性弧菌检出限为 5.3 CFU/mL。用 100 份样品验证 RAA 方法的可靠性, 结果显示 RAA 方法和传统划线方法结果符合率为 100%, 表现出高度一致性。**结论** 本研究建立的 RAA 检测方法具有特异性强、灵敏度高、操作简便、快速等优点, 可用于水产品中副溶血性弧菌的检测。

**关键词:** 副溶血性弧菌; 重组酶介导扩增技术; 快速检测

## Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products by recombinase aid amplification

HAO Lin-Hui<sup>1</sup>, LIANG Ying<sup>1</sup>, LUO Ji-Jun<sup>2</sup>, SHEN Jin-Ling<sup>3</sup>, YANG Jie-Lin<sup>3</sup>, YU Xiao-Feng<sup>2</sup>,  
XUE Feng<sup>1\*</sup>, ZHANG Chi<sup>4</sup>, JIANG Yuan<sup>3</sup>, TANG Fang<sup>1</sup>, DAI Jian-Jun<sup>1,5</sup>

(1. Nanjing Agricultural University, Joint Laboratory of International Cooperation on Animal Health and Food Safety, Ministry of Education, Nanjing 210095, China; 2. Hefei Customs Technology Center, Hefei 230088, China; 3. Shanghai Customs Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine Technology Center, Shanghai 200135, China; 4. Nanjing Product Quality Supervision and Inspection Institute, Nanjing 210008, China; 5. China Pharmaceutical University, Nanjing 211199, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* by recombinase aided amplification (RAA). **Methods** Based on the *tlh* gene sequence of *Vibrio parahaemolyticus*, the specific primers were designed. After screening the primers, a rapid detection method of RAA was established. **Results** The detection results could be observed within 30 min. The results of specificity test showed that there was no cross reaction between the detection of *Vibrio parahaemolyticus* by RAA method and other *Vibrio* species. The results of

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1603600)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program (2018YFC1603600)

\*通信作者: 薛峰, 教授, 主要研究方向为食源性致病菌检控与致病机制研究。E-mail: xuefeng@njau.edu.cn

\*Corresponding author: XUE Feng, Professor, Nanjing Agricultural University, Joint Laboratory of International Cooperation on Animal Health and Food Safety, Ministry of Education, Nanjing 210095, China. E-mail: xuefeng@njau.edu.cn

sensitivity test showed that the limit of detection *Vibrio parahaemolyticus* by RAA method was 5.3 CFU/mL. A total of 100 samples were used to verify the reliability of the RAA method. The results show that the coincidence rate of the RAA method and the traditional crossing method was 100%, showed a high degree of consistency. **Conclusion** The RAA detection method established in this study has the advantages of strong specificity, high sensitivity, simple operation and rapidity, and can be used for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products.

**KEY WORDS:** *Vibrio parahaemolyticus*; recombinase aid amplification; rapid detection

## 0 引言

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*), 是广泛分布于海洋环境中的人类病原体<sup>[1]</sup>, 水产养殖业主要致病菌之一, 主要分布于海水、淤泥和鱼虾贝类等海产品中<sup>[2]</sup>。食用被副溶血性弧菌污染的食物后会引发腹泻、肠痉挛、呕吐等, 重者脱水、休克昏迷, 甚至死亡<sup>[3-5]</sup>, 造成巨大的经济损失。在我国发生的微生物食物中毒事件中, 副溶血性弧菌的检出率高居首位, 尤其在沿海地区<sup>[6]</sup>。此外, 副溶血性弧菌也是食品检测、食品中毒源调查<sup>[7]</sup>和进出口水产品检测<sup>[8]</sup>的重要项目之一。

传统检测副溶血性弧菌的方法操作烦琐, 周期较长。随着免疫学以及分子生物学的发展, 酶联免疫吸附法、免疫层析法、实时荧光 PCR 等方法成为快速检测方法的主流, 但所需仪器复杂、对操作人员要求高, 尚未在现场检测中普遍应用。因此, 建立适合实际应用的副溶血性弧菌快速检测方法具有实用意义<sup>[9]</sup>。重组酶介导扩增技术(recombinase aid amplification, RAA)是利用重组酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶恒温体外发生酶促反应, 快速完成解链、配对与延伸, 实现 DNA 快速复制的一项分子生物学检测技术<sup>[10-11]</sup>, 具备操作简单、反应快速、灵敏度高、特异性强等优点<sup>[12]</sup>, 已被应用到多种病原微生物检测中<sup>[13-16]</sup>。

本研究根据副溶血性弧菌的 *tlh* 基因<sup>[17]</sup>序列为靶基因, 建立一种快速检测水产品中副溶血性弧菌的 RAA 方法, 并通过与 GB 4789.7—2013《食品微生物检验 副溶血性弧菌检验》方法对比, 验证本方法的实用性, 以期水产品中副溶血性弧菌的快速检测提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

三文鱼 20 份、草虾 40 份、牡蛎 20 份、龙虾 20 份, 购自农贸市场和超市。

### 1.2 参考菌株

副溶血性弧菌 ATCC17802、副溶血性弧菌 ATCC33847、梅氏弧菌 CICC21660、哈氏弧菌 BNCC336937、溶藻弧菌 ATCC33787、河流弧菌 CICC21612、霍乱弧菌

BNCC232030、鳃弧菌 BCRC12908、创伤弧菌 CICC10383、拟态弧菌 CICC10474、单增李斯特菌 ATCC BAA751、奇异变形杆菌 ZCIC0058、福氏志贺氏菌 CMCC 5157、铜绿假单胞菌 ZCIC0034、大肠埃氏菌 ATCC 25922、鼠伤寒沙门氏菌 CMCC 50013、克罗诺杆菌 ATCC 21944、金黄色葡萄球菌 CMCC26003 均由本实验室保存。

### 1.3 主要生物制剂

RAA 核酸扩增试剂盒(荧光法)(江苏奇天基因生物科技有限公司); 细菌基因组 DNA 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]; 营养琼脂(青岛海博生物技术有限公司)。

### 1.4 主要仪器

RAA-B1600 恒温振荡混匀仪、RAA-F1620 恒温核酸扩增检测仪(江苏奇天基因生物科技有限公司); ZQZY-A8 摇床(上海知楚仪器有限公司)。

### 1.5 RAA 引物、探针的设计与合成

以 *tlh* 基因<sup>[18-19]</sup>和 *toxR* 基因<sup>[20-21]</sup>作为靶基因, 使用 AmplifX 在保守区域设计引物和探针, 使用 blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)进行对比, 由生工生物(上海)股份有限公司合成。引物、探针序列见表 1。

### 1.6 样品 DNA 提取

革兰氏阴性菌: 采用煮沸法, 提取纯菌 DNA。将菌接种于 10 mL 营养肉汤等液体培养基中, 36 °C±1 °C 培养 10~12 h, 双蒸水洗 3 遍, 弃上清液, 向沉淀中加入 100 μL 双蒸水使之充分悬浮, 煮 10 min, 以 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液于另一离心管中, 最终浓度为 40 ng/μL, -20 °C 保存备用。

革兰氏阳性菌: 取 10 mL 过夜增菌的培养基, 使用 TIANamp 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA, 最终浓度为 40 ng/μL。

### 1.7 反应体系和反应程序

以上述 1.6 提取的 DNA 为模板进行 RAA 检测。反应体系: 见表 2 反应程序: 分别加入各反应组分(表 2), 混匀离心后, 分装 43.5 μL 混合液至荧光基础反应单元中, 轻柔手弹使冻干粉充分重溶均匀, 短暂离心, 打开反应单元, 向每个反应单元的管盖上加入 2.5 μL 乙酸镁, 然后向各反应单元加入 4 μL 模板 DNA, 充分混匀并离心, 将反应管放入荧光检测仪中 39 °C 反应 30 min。

表 1 副溶血性弧菌 RAA 引物探针信息  
Table 1 RAA primer probe information of *Vibrio parahaemolyticus*

名称	序列	靶基因
VPtlh-F	TTAGATTTGGCGAACGAGAACGCAGACATTACG	
VPtlh-R	AGATGTTGCCTGTATCAGACAAGCTGTCCACCGA	tlh
VPtlh-P	TTACGTTCTCGCCGCTGACAATCGTTTC[FAM-dT][THF]A[BHQ-dT]ACAACCACACGAT-SpacerC3	
VPtoxR-F	CCAGAAGCGCCAGTAGTACCTGAAAAAGCA	
VPtoxR-R	TCACCAATCTGACGGAAGTGTGAGATTCCGCA	toxR
VPtoxR-P	TTATTTTATTTTGGCACTATTACTACCGA[FAM-dT][THF][BHQ-dT]GCGTACTGCTGTTTA	

表 2 RAA 反应体系表  
Table 2 RAA reaction system table

组分	用量/ $\mu\text{L}$
缓冲液 VI	25
引物 F (10 $\mu\text{mol/L}$ )	2.1
引物 R (10 $\mu\text{mol/L}$ )	2.1
引物 P (10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.6
纯化水	13.7
总体积	43.5

## 1.8 方法特异性验证

以 ATCC17802 副溶血性弧菌、ATCC33847 副溶血性弧菌以及 12 种非副溶血性弧菌标准菌株基因组为模板,用 *tlh* 引物和探针进行扩增,测试 RAA 方法的特异性。特异性测试包括包含性测试和排外性测试。包含性测试所用菌株为 1.2 参考菌株。分别使用 1.7 反应体系和反应程序进行 RAA 检测,验证所建立方法的特异性。

## 1.9 方法灵敏度测试

用棉签挑取 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上新鲜生长的副溶血性弧菌 ATCC 17802 于 10 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水中混匀,制成  $5.3 \times 10^5 \sim 5.3 \times 10^{-2}$  CFU/mL 的稀释液。从每个稀释度管子中分别吸取 1 mL 菌悬液提取 DNA,进行 RAA 反应;分别吸取 100  $\mu\text{L}$  菌液涂布于 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上,在  $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下,培养 12 h,对不同梯度菌液进行计数。

## 1.10 人工污染样品检测

参照 GB 4789.7—2013,称取 25 g 未检出副溶血性弧菌的冷冻虾仁样品于 225 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水中,分别吸取混合液于 21 个试管中,每个试管 4.5 mL。将 1.9 中一系列不同浓度梯度的菌悬液分别加入 21 个试管中,制成不同初始污染浓度( $5.3 \times 10^2 \sim 5.3 \times 10^{-4}$  CFU/mL)的水产

品样品,每个浓度 3 个重复共 21 份,分别提取 21 份样品中副溶血性弧菌 DNA,进行荧光 RAA 反应。同时与 GB 4789.7—2013 方法进行对比。

## 1.11 RAA 方法在水产品检测中的应用

参照 GB 4789.7—2013 方法对 100 份样品进行前处理增菌后,提取基因组 DNA,采用建立的 RAA 方法进行检测,并与 GB 4789.7—2013 方法对比。

## 2 结果与分析

### 2.1 方法特异性验证

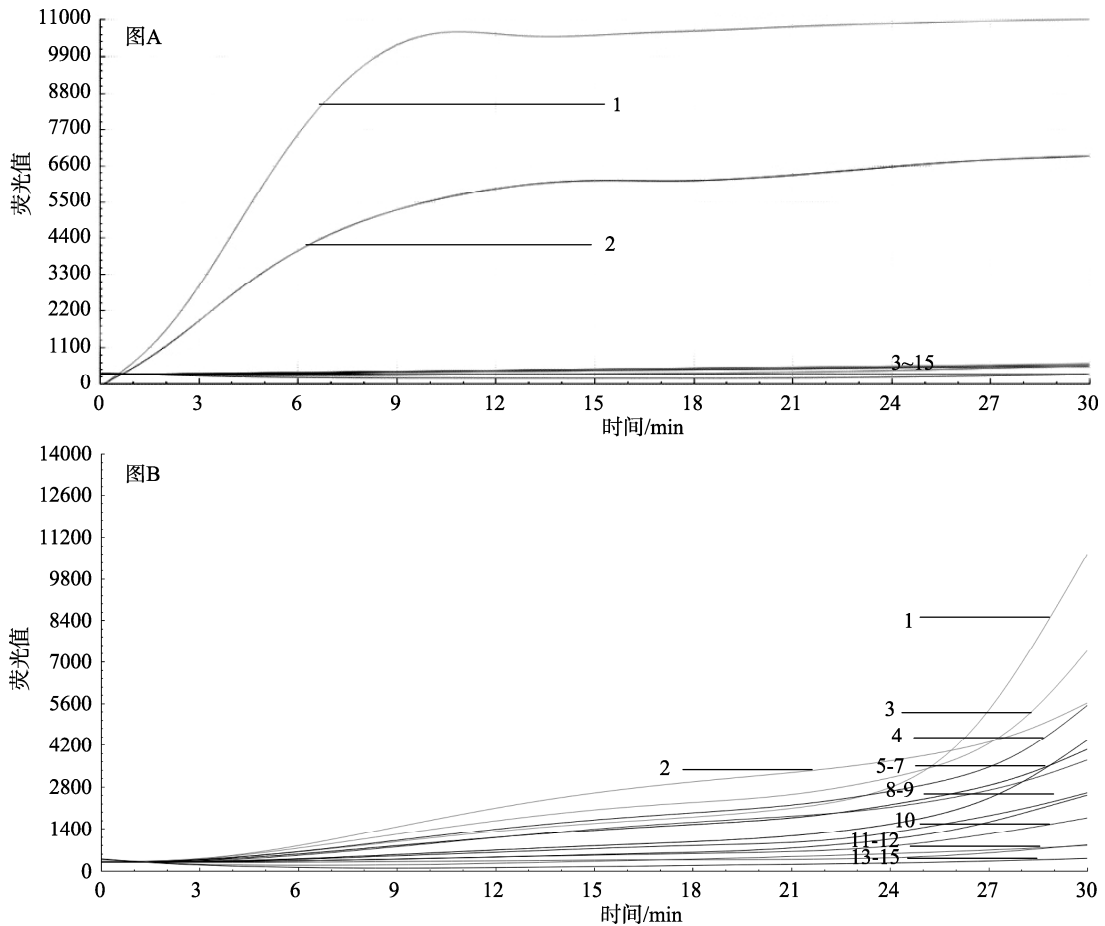
以 2 个副溶血性弧菌标准菌株 DNA,12 个非副溶血性弧菌标准菌株 DNA 和一个阴性对照为模板,分别对 VPtlh 和 VPtoxR 引物探针组合进行 RAA 扩增,见图 1。仅有 VPtlh 引物探针组合的副溶血性弧菌的 DNA 为模板的反应在 30 min 内检测到明显增加的荧光信号,结果为阳性。其他样本反应的荧光信号均未检测到明显增加,结果为阴性,无交叉反应,说明以 VPtlh 引物探针组合进行 RAA 扩增方法特异性较强。

### 2.2 方法灵敏度测试

以不同浓度( $5.3 \times 10^6 \sim 5.3 \times 10^{-2}$  CFU/mL)副溶血性弧菌 ATCC17802 菌液的 DNA 为模板,进行 RAA 检测方法的灵敏度验证试验。如图 2 所示,30 min 内  $5.3 \times 10^6 \sim 5.3$  CFU/mL 副溶血性弧菌 ATCC17802 的 DNA 均出现明显扩增。最低可检出菌液浓度为 5.3 CFU/mL 的 DNA。阴性对照无扩增曲线出现。与 GB 4789.7—2013 法(最低可检出菌液浓度为  $5.3 \times 10^2$  CFU/mL)对比,灵敏度高。

### 2.3 人工污染样品检测

如图 3 所示,人工污染样品检测结果表明,当人工污染浓度  $\geq 5.3 \times 10^1$  CFU/mL,RAA 即可在 30 min 时检出样品中副溶血性弧菌。与 GB 4789.7—2013 法(最低可检出菌液浓度为  $5.3 \times 10^2$  CFU/mL)对比,灵敏度高。

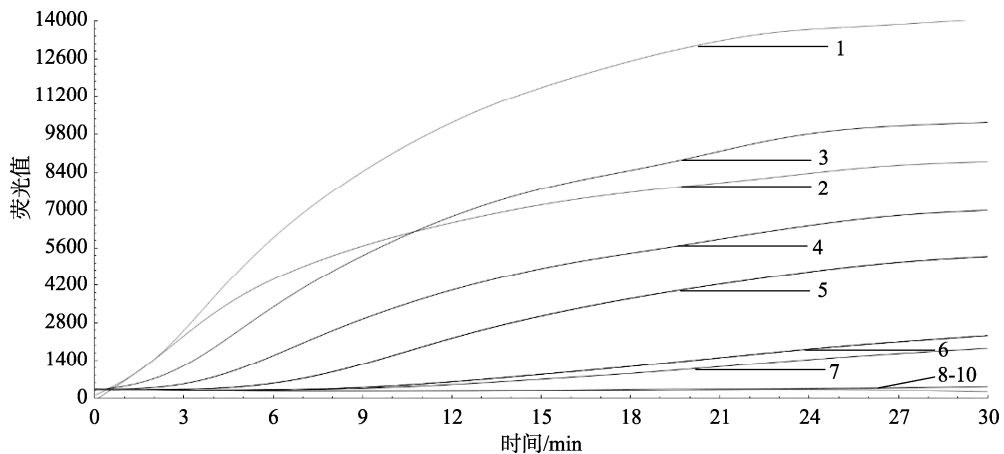


注: A: *VPtlh* 引物探针组合; B: *VPtoxR* 引物探针组合。

1: 副溶血性弧菌 ATCC17802; 2: 副溶血性弧菌 ATCC33847; 3: 梅氏弧菌 CICC21660; 4: 哈氏弧菌 BNCC336937; 5: 溶藻弧菌 ATCC333787; 6: 河流弧菌 CICC21612; 7: 霍乱弧菌 BNCC232030; 8: 鳗弧菌 BCRC12908; 9: 创伤弧菌 CICC10383; 10: 拟态弧菌 CICC10474; 11: 单增李斯特菌 ATCC BAA751; 12: 奇异变形杆菌 ZCIC0058; 13: 大肠埃希氏菌 ATCC 25922; 14: 鼠伤寒沙门氏菌 CMCC 50013; 15: 无菌水。

图 1 副溶血性弧菌特异性试验结果

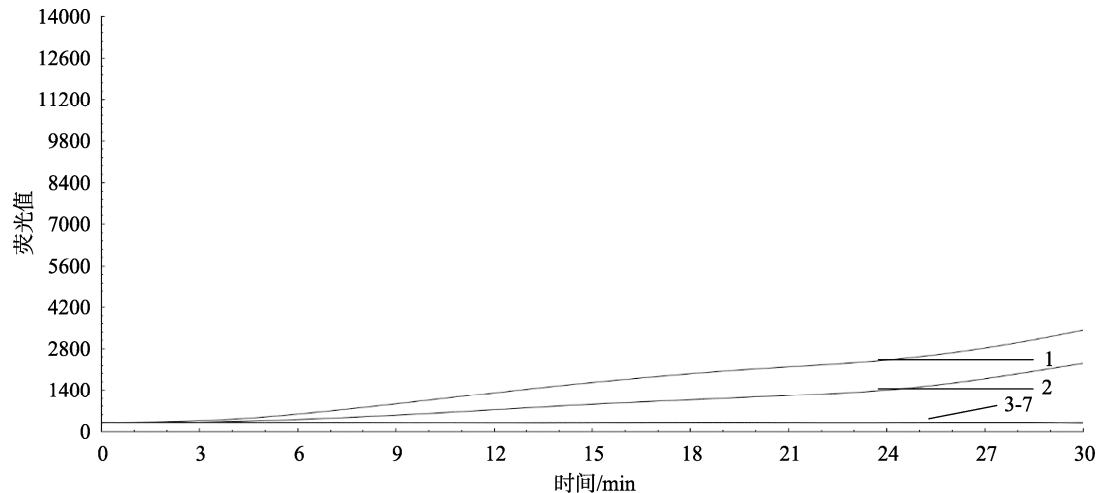
Fig.1 Specific test results of *Vibrio parahaemolyticus*



注: 1:  $5.3 \times 10^6$  CFU/mL; 2:  $5.3 \times 10^5$  CFU/mL; 3:  $5.3 \times 10^4$  CFU/mL; 4:  $5.3 \times 10^3$  CFU/mL; 5:  $5.3 \times 10^2$  CFU/mL; 6:  $5.3 \times 10^1$  CFU/mL; 7:  $5.3 \times 10^0$  CFU/mL; 8:  $5.3 \times 10^{-1}$  CFU/mL; 9:  $5.3 \times 10^{-2}$  CFU/mL; 10: 无菌水。

图 2 副溶血性弧菌 RAA 纯菌灵敏度结果

Fig.2 Sensitivity results of pure RAA bacteria of *Vibrio parahaemolyticus*



注: 1:  $5.3 \times 10^2$  CFU/mL; 2:  $5.3 \times 10^1$  CFU/mL; 3: 5.3 CFU/mL; 4:  $5.3 \times 10^{-1}$  CFU/mL; 5:  $5.3 \times 10^{-2}$  CFU/mL;  
6:  $5.3 \times 10^{-3}$  CFU/mL; 7:  $5.3 \times 10^{-4}$  CFU/mL。

图3 冷冻虾仁中不同浓度的副溶血性弧菌 RAA 检测结果

Fig.3 RAA detection results of different concentrations of *Vibrio parahaemolyticus* in frozen shrimp

## 2.4 水产养殖及水体中副溶血性弧菌的实际检测

对采集的 100 份样品进行 RAA 方法和 GB 4789.7—2013 法检测, 检测结果见表 3, 结果表明 2 种方法结果一致, 证明了所建立方法的准确性。

表 3 实际样品中副溶血性弧菌检测结果(CFU/mL)  
Table 3 Test results of *Vibrio parahaemolyticus* in actual samples (CFU/mL)

水产品类型	数量	RAA 方法	GB 4789.7—2013 法
三文鱼	20	0	0
草虾	40	19	19
牡蛎	20	0	0
龙虾	20	1	1

## 3 讨论与结论

近年来由于副溶血性弧菌引起的疾病发病率不断增加, 不仅对水产品养殖业造成较大的损失而且危害人类健康, 造成公共卫生事件<sup>[22-23]</sup>。

近年来新兴的 RAA 检测方法快捷、特异性强、灵敏度高, 对设备要求较低, 目前已经应用于霍乱弧菌<sup>[24]</sup>中。RAA 与 GB 4789.7—2013 法相比周期短、操作简单; 与分子生物学检测技术, 例如常规 PCR<sup>[25]</sup>、real-time PCR<sup>[26]</sup>和 DNA 探针<sup>[27]</sup>方法相比设备要求简单, 对操作人员要求低。本研究以副溶血性弧菌 *t1h* 基因序列为靶基因, 建立 RAA 快速检测方法, 相较于划线法更灵敏、方便, 具有特异性。对采集的 100 份样品进行检测, RAA 法检测结果与 GB 4789.7—2013 法具有一致性。但 RAA 方法和 GB

4789.7—2013 法在牡蛎中未检出副溶血性弧菌, 可能是因为样品采集时间为 2020 年年底, 副溶血性弧菌在牡蛎体内的含量较少<sup>[28]</sup>, 且样品采样点离出海口远, 受污染样品少<sup>[29]</sup>。

副溶血性弧菌活细菌拥有毒力和致病性, 对机体造成伤害, 未来可以将 RAA 检测方法与叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)<sup>[30]</sup>、叠氮溴化乙锭(ethidium monoazide, EMA)<sup>[31-32]</sup>、脱氧胆酸钠(sodium deoxycholate, SD)<sup>[33]</sup>等生物染料结合, 进一步区分活死菌以及致病菌株和非致病菌株, 进而可以判断副溶血性弧菌感染的严重性。

## 参考文献

- [1] LI L, MENG H, GU D, *et al.* Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis [J]. *Microbiol Res*, 2019, 222: 43–51.
- [2] BONNIN-JUSSERAND M, COPIN S, LE BRIS C, *et al.* *Vibrio* species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): Review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2019, 59(4): 597–610.
- [3] BRIET A, HELSENS N, DELANNOY S, *et al.* NDM-1-producing *Vibrio parahaemolyticus* isolated from imported seafood [J]. *J Antimicrob Chemoth*, 2018, 73(9): 2578–2579.
- [4] HOSSAIN MT, KIM YO, KONG IS. Multiplex PCR for the detection and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* strains using the *groEL*, *tdh* and *trh* genes [J]. *Mol Cell Probe*, 2013, 27(5-6): 171–175.
- [5] ELMAHDI S, DASILVA L V, PARVEEN S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review [J]. *Food Microbiol*, 2016, 57: 128–34.
- [6] 王立红, 韩东升, 韩崇旭, 等. 副溶血性弧菌大流行株的感染及基因分型研究现状[J]. *临床检验杂志*, 2018, 36(4): 283–284, 303.

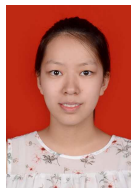
- WANG LH, HAN DS, HAN XX, *et al.* Research status of infection and genotyping of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strain [J]. *Chin J Clin Lab Sci*, 2018, 36(4): 283–284, 303.
- [7] 詹斌秉, 周伟华, 殷小娟, 等. 一起副溶血弧菌引起的食物中毒调查[J]. *江苏预防医学*, 2017, 28(6): 691–692.
- ZHAN BB, ZHOU WH, YING XJ, *et al.* Investigation of a food poisoning caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Jiangsu J Prev Med*, 2017, 28(6): 691–692.
- [8] 刘宁伟, 邹大阳, 董德荣, 等. 多重环介导等温扩增快速检测沙门菌、副溶血弧菌和单核细胞增生性李斯特菌方法的建立[J]. *军事医学*, 2016, 40(9): 767–772.
- LIU NW, ZHOU DY, DONG DR, *et al.* Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification for detection of *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* [J]. *Military Med Sci*, 2016, 40(9): 767–772.
- [9] 郭钦, 陈会, 徐海堂, 等. 副溶血弧菌快速检测技术研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(24): 395–400.
- GUO Q, CHEN H, XU HY, *et al.* Advancement of rapid detection technology for *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2016, 37(24): 395–400.
- [10] 张小平, 郑乐怡, 魏莹, 等. 重组酶介导扩增技术快速检测沙门菌方法的建立[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2017, 40(5): 317–319.
- ZHANG XP, ZHENG LY, WEI Y, *et al.* Establishment of a recombinase aided amplification assay for *Salmonella* detection [J]. *Chin J Frontier Health Quarant*, 2017, 40(5): 317–319.
- [11] 崔荣飞, 杨洁, 甄理, 等. 动物源性食品中致病微生物的快速 PCR 检测[J]. *今日畜牧兽医*, 2020, 36(11): 1–3.
- CHUI RF, YANG J, ZHEN L, *et al.* Rapid PCR detection of pathogenic microorganisms in animal-derived foods [J]. *Anim Husb Vet Today*, 2020, 36(11): 1–3.
- [12] 吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 等. 用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸[J]. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40(10): 983–988.
- LU B, CHENG HR, YAN QF, *et al.* Recombinase-aid amplification: A novel technology of *in vitro* rapid nucleic acid amplification [J]. *Sci Sin Vitae*, 2010, 40(10): 983–988.
- [13] 魏莹, 郭利川, 张小平, 等. 重组酶介导扩增方法快速检测 A 族乙型溶血性链球菌[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2018, 41(5): 314–316, 323.
- WEI Y, GUO LC, ZHANG XP, *et al.* Establishment of recombinase aided amplification assay for group a streptococcus pyogens detection [J]. *Chin J Frontier Health Quarant*, 2018, 41(5): 314–316, 323.
- [14] 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, 26(5): 65–68.
- LIU DH, WANG DL, GUO YH, *et al.* Advances in recombinase polymerase amplification [J]. *Inspect Quarant Sci*, 2016, 26(5): 65–68.
- [15] WANG WJ, WANG CG, BAI Y, *et al.* Establishment of reverse transcription recombinase-aided amplification-lateral-flow dipstick and real-time fluorescence-based reverse transcription recombinase-aided amplification methods for detection of the Newcastle disease virus in chickens [J]. *Poultry Sci*, 2020, 99(7): 3393–3401.
- [16] FAN X, LI L, ZHAO Y, *et al.* Clinical validation of two recombinase-based isothermal amplification assays (RPA/RAA) for the rapid detection of african swine fever virus [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1696.
- [17] BEJ AK, PATTERSON DP, BRASHER CW, *et al.* Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh* [J]. *J Microbiol Meth*, 1999, 36(3): 215–25.
- [18] NIU B, HONG B, ZHANG Z, *et al.* A Novel qPCR method for simultaneous detection and quantification of viable pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (*tlh* (+), *tdh* (+), and *ureR* (+)) [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1747.
- [19] 胡元庆, 黄玉萍, 李凤霞, 等. 水产品中副溶血性弧菌 LAMP 检测方法的优化[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(6): 313–320, 247.
- HU YQ, HUANG YP, LI FX, *et al.* Optimization of loop-mediated isothermal amplification methods for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2017, 33(6): 313–320, 247.
- [20] 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]. *Anim Husb Vet Med*, 2018, 50(4): 93–99.
- [21] 侯兵兵, 陈昌国, 李娜, 等. Taqman-探针荧光定量 PCR 鉴定副溶血弧菌方法的建立[J]. *现代检验医学杂志*, 2018, 33(1): 40–43.
- HOU BB, CHEN CG, LI N, *et al.* Establishment of a method for the identification of *Vibrio parahaemolyticus* by taqman-probe fluorescence quantitative PCR analysis [J]. *J Mod Lab Med*, 2018, 33(1): 40–43.
- [22] XU D, WU X, HAN J, *et al.* A cross-priming amplification assay coupled with vertical flow visualization for detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Mol Cell Probe*, 2015, 29(6): 527–530.
- [23] GENG Y, TAN K, LIU L, *et al.* Development and evaluation of a rapid and sensitive RPA assay for specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. *Bmc Microbiol*, 2019, 19(1): 186.
- [24] FANG WW, CAI YY, ZHU L, *et al.* Rapid and highly sensitive detection of toxigenic *Vibrio cholerae* based on recombinase-aided amplification combining with lateral flow assay [J]. *Food Anal Method*, 2021, 14(4): 687–696.
- [25] FEDERICI S, SERRAZANETTI DI, GUERZONI ME, *et al.* Development of a rapid PCR protocol to detect *Vibrio parahaemolyticus* in clams [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2018, 55(2): 749–759.
- [26] XU D, JI L, WU X, *et al.* Detection and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* by multiplexed real-time PCR [J]. *Can J Microbiol*, 2018, 64(11): 809–815.
- [27] 吴鹏, 许战洲, 李秀芹, 等. 分子生物学技术在海洋环境监测中的应用[J]. *生态科学*, 2016, 35(3): 201–209.
- WU P, XU ZZ, LI XQ, *et al.* Applications of molecular biological techniques in marine environmental monitoring [J]. *Ecol Sci*, 2016, 35(3): 201–209.
- [28] 林强, 李宁求, 付小哲, 等. 牡蛎养殖过程中副溶血弧菌与水质因子间的关系[J]. *水产学报*, 2012, 36(3): 415–421.
- LIN Q, LI NQ, FU XZ, *et al.* The relationship of *Vibrio parahaemolyticus* densities and water quality factor during oyster culture [J]. *J Fish China*, 2012, 36(3): 415–421.
- [29] 关文浩, 司徒慧媛, 房志家, 等. 湛江地区各市售对虾、牡蛎中副溶血性弧菌污染调查及耐药性分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2019, 29(22): 2689–2691, 2694.

- GUAN WH, SITU HY, FANG ZJ, *et al.* Contamination and drug resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in prawns and oyster products in Zhanjiang markets [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2019, 29(22): 2689–2691, 2694.
- [30] ZI C, ZENG D, LING N, *et al.* An improved assay for rapid detection of viable *Staphylococcus aureus* cells by incorporating surfactant and PMA treatments in qPCR [J]. *Bmc Microbiol*, 2018, 18(1): 132.
- [31] 凌南, 范滢钰, 任建鸾, 等. 食源性人兽共患病病原活菌检测技术研究进展[J]. *中国动物检疫*, 2018, 35(10): 68–73.
- LING N, FAN MY, REN JL, *et al.* Research progress on detection technologies of food-borne zoonotic diseases [J]. *China Anim Health Inspect*, 2018, 35(10): 68–73.
- [32] NOCKER A, CAMPER AK. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques [J]. *Fems Microbiol Lett*, 2009, 291(2): 137–42.
- [33] 郝乐友, 吕淑霞, 张超, 等. 表面活性剂脱氧胆酸钠在单增李斯特菌死活细胞 EMA-PCR 鉴别中的应用[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(6): 174–179.
- HAO LY, LU SX, ZHANG C, *et al.* Application of surfactant sodium

deoxycholate in the identification of dead and living cells of *Listeria monocytogenes* by EMA-PCR [J]. *Food Ferment Ind*, 2013, 39(6): 174–179

(责任编辑: 王 欣 郑 丽)

### 作者简介



郝林慧, 主要研究方向为食源性致病菌检控与致病机制研究。

E-mail: 17117125@njau.edu.cn



薛 峰, 教授, 主要研究方向为食源性致病菌检控与致病机制研究。

E-mail: xuefeng@njau.edu.cn