

# 水产品和水体中创伤弧菌现场可视化环介导恒温扩增快检方法的建立及应用

田卓<sup>1,2,3</sup>, 杨莉莉<sup>2</sup>, 郑秋月<sup>2</sup>, 麻利丹<sup>4</sup>, 刘圣聪<sup>5</sup>, 尚德静<sup>1\*</sup>, 曹际娟<sup>2\*</sup>

(1. 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116033; 2. 大连民族大学, 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 大连 116600; 3. 大连海关技术中心双 D 港实验室, 大连 116000; 4. 丹东海关综合技术服务中心, 丹东 118000; 5. 大连天正实业有限公司, 大连 116000)

**摘要:** **目的** 基于环介导恒温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术建立水产品 and 养殖水域中创伤弧菌的现场可视化快速检测方法。**方法** 以创伤弧菌作为研究对象, 分别采用煮沸法和离心柱法提取基因组 DNA, 优化弧菌 DNA 提取方法; 以创伤弧菌 *gyrB* 基因作为靶基因, 设计筛选最佳的适于 LAMP 的引物序列, 分别通过 LAMP 荧光扩增曲线(加 SYTO-9 荧光染料), 以及 LAMP 可视化观察扩增产物的颜色变化(加钙黄绿素), 开展特异性、灵敏度和重复性实验分析。**结果** 煮沸法为适合于弧菌基因组 DNA 提取的快捷方法; 优化筛选的引物可以特异地检测创伤弧菌, 检测核酸浓度的灵敏度可以达到 10 fg/ $\mu$ L, 并且结果稳定、可靠。采用该方法进行实际样品的检测应用, 在 558 份水体样品和 655 份水产品样品中, 创伤弧菌阳性检出率分别为 9.01% 和 8.60%, 阳性检出率明显高于传统的分离培养鉴定结果。**结论** 低技术要求、低设备成本及检测时间短使得可视化 LAMP 快检方法成为现场可使用的理想选择, 对于水产养殖业来说更方便。

**关键词:** 创伤弧菌; 水产品; 水体; 可视化; 环介导恒温扩增技术

## Establishment and application of visual loop-mediated isothermal amplification rapid detection method for *Vibrio vulnificus* in aquatic products and waters

TIAN Zhuo<sup>1,2,3</sup>, YANG Li-Li<sup>2</sup>, ZHENG Qiu-Yue<sup>2</sup>, MA Li-Dan<sup>4</sup>, LIU Sheng-Cong<sup>5</sup>, SHANG De-Jing<sup>1\*</sup>, CAO Ji-Juan<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116033, China; 2. Key Laboratory of Biotechnology and Resource Utilization of Ministry of Education, Dalian University for Nationalities, Dalian 116600, China; 3. Dalian Customs Technology Center Double D Port Laboratory, Dalian 116000, China; 4. Dandong Customs Comprehensive Technical Service Center, Dandong 118000, China; 5. Dalian Tianzheng Industrial Co., Ltd., Dalian 116000, China)

**基金项目:** 辽宁省“兴辽英才计划”项目(XLYC2002106)、大连市高层次人才创新支持计划项目(2019CT09)、辽宁省自然科学基金项目(2019-ZD-0869)

**Fund:** Supported by the Liaoning “Xingliao Talent Plan” (XLYC2002106), the Dalian High-level Talents Innovation Support Program (2019CT09), and the Natural Science Foundation of Liaoning Province (2019-ZD-0869)

\*通信作者: 尚德静, 博士, 教授, 主要研究方向为细胞生化。E-mail: dejingshang9@gmail.com

曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品生物工程。E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn

\*Corresponding author: SHANG De-Jing, Ph.D, Professor, College of Life Sciences, Liaoning Normal University, 1 Liushu South Street, Ganjingzi District, Dalian 116033, China. E-mail: dejingshang9@gmail.com

CAO Ji-Juan, Ph.D, Professor, Key Laboratory of Biotechnology and Resource Utilization of Ministry of Education, Dalian University for Nationalities, Dalian 116600, China. E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn

**ABSTRACT: Objective** To establish a field visual rapid detection method for *Vibrio vulnificus* in aquatic products and aquaculture waters based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology. **Methods** The genomic DNA of *Vibrio vulnificus* were extracted by boiling method and centrifugal column method, respectively, to optimize the extraction method of *Vibrio* DNA; the *gyrB* gene of *Vibrio vulnificus* was used as the target gene, and the optimal primer sequence suitable for LAMP was designed and screened, and the color changes of amplified products (plus calcein) were visually observed by LAMP fluorescence amplification curve (plus SYTO-9 fluorescent dye) and LAMP, respectively, to carry out the experimental analysis of specificity, sensitivity and repeatability. **Results** Boiling method was a quick method for genomic DNA extraction of *Vibrio*; the optimized primers could specifically detect *Vibrio vulnificus* with a sensitivity of 10 fg/ $\mu$ L for nucleic acid concentration, and the result was stable and reliable. The method was applied to the detection of actual samples, in 558 water samples and 655 water samples, the positive detection rates of *Vibrio vulnificus* were 9.01% and 8.60%, respectively, which were significantly higher than the results of traditional isolation and culture identification. **Conclusion** Low technical requirements, low equipment costs and short detection time make the visual LAMP quick detection method an ideal choice for field use and more convenient for aquaculture.

**KEY WORDS:** *Vibrio vulnificus*; aquatic products; aquaculture waters; visual; loop-mediated isothermal amplification

## 0 引 言

弧菌是海洋环境里常见的细菌类群,广泛分布于河口、海湾、近岸海域的海水及海洋生物的体表及肠道中<sup>[1]</sup>。弧菌属细菌(*Vibrio* spp.)引起的弧菌病是鱼类、贝类、虾类、蟹类等危害最大、流行最广的细菌性疾病之一<sup>[2-3]</sup>。据报道至少有 12 种弧菌具有致病性,不仅给水产养殖业带来巨大经济损失,还会引起严重的公共卫生问题<sup>[1,4]</sup>。其中创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)是水产品养殖中危害较大的一种弧菌,全球因食用污染海鲜而致死的大部分病例与其相关<sup>[5-6]</sup>。创伤弧菌引起的感染性疾病致死率可高达 50%以上,是目前发现致死率最高的致病弧菌<sup>[7-9]</sup>。

如今,通过水产品及养殖水环境传播的创伤弧菌,特别是由创伤弧菌感染造成的原发性败血症,几乎全是因为生食或者食用未煮熟的牡蛎而致。创伤弧菌引起的疾病具有发病急、病情重、病死率高等特点,50%的患者在发病后 48 h 内死于多器官衰竭<sup>[10]</sup>,其感染引起的脓毒症病死率大于 50%<sup>[7]</sup>,如果患者在 72 h 内未进行相应处理,病死率便会增加到 100%<sup>[11]</sup>。随着气候变暖和海上作业活动的增加及具有感染高危因素如饮酒、肝脏疾病、血液系统疾病、糖尿病的人群增多,综合导致创伤弧菌感染呈增加趋势<sup>[12-13]</sup>。由此可见,水产品和水体环境中创伤弧菌的污染情况依然严重。开展创伤弧菌快速检测方法研究,对确保食用水产品和水体环境安全非常重要<sup>[14]</sup>。

由于弧菌微量,实验室分离培养生长缓慢且易受其他弧菌抑制生长,生化鉴定技术复杂,水产品中创伤弧菌的检测费时费力,需要专业的技术人员,且不易在养殖场普及。开发创伤弧菌现场快速检测技术可为水产养殖场提供一种

便利简单的监测方法,可以减少养殖户经济损失、降低公共卫生问题发生风险,具有较高的经济效益和社会效益。环介导恒温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是日本生物学家 NOTOMI 等<sup>[15]</sup>于 2000 年提出的一种新型的核酸扩增方法,该技术在等温条件下完成核酸的扩增,具有高特异性、高效性、低技术要求等优点<sup>[16]</sup>,已广泛应用于病原菌检测、疾病诊断等领域<sup>[17-18]</sup>。目前更多的研究人员从水产品中开展了霍乱弧菌<sup>[19]</sup>、副溶血性弧菌<sup>[20]</sup>、溶藻弧菌<sup>[21-22]</sup>、哈维氏弧菌<sup>[23]</sup>、弗尼斯弧菌<sup>[24]</sup>等致病性弧菌的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测方法研究,也有研究人员开展了创伤弧菌在内的致病性弧菌多重 PCR 方法<sup>[25-29]</sup>及创伤弧菌 LAMP 检测方法的研究<sup>[17-18,30-31]</sup>,但尚未见开展可视化 LAMP 检测方法研究。

本研究以创伤弧菌的 *gyrB* 基因为靶基因,设计了 6 条 LAMP 引物,利用显色反应,建立一种新型、快速、简便、准确的创伤弧菌现场可视化 LAMP 快检方法,以期在现场检测中成为检测创伤弧菌的良好手段。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

所用菌株共 9 种,包括创伤弧菌(*Vibrio vulnificus* ATCC 27562)、灿烂弧菌(*Vibrio splendidus* ATCC 33125)、拟态弧菌(*Vibrio mimicus* CICC 21613)、麦氏弧菌(*Vibrio metschnikovii* ATCC 27562)、费尼斯弧菌(*Vibrio furnissii* IQCC 12309)、河流弧菌(*Vibrio fluvialis* CICC 21612)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus* ATCC17749)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802)、鳗弧菌(*Vibrio anguillarum* CICC 10475); 本研究所使用的标准菌种均购自中国工业

微生物菌种保藏管理中心, 并经过生化鉴定实验后于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件保存。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒(货号: DP302, 天根生化科技北京有限公司); 煮沸法 DNA 裂解试剂[货号: No.9182, 宝生物工程(大连)有限公司]; DNA 恒温扩增试剂盒(货号: 051011M, 广州双螺旋基因技术有限公司); 荧光目视检测试剂[钙黄绿素, 货号: SLP221, 荣研生物科技(中国)有限公司]; 质量分数 3%氯化钠碱性蛋白胨缓冲液(alkaline peptone buffer, APB)(货号: CM401B)、溶菌肉汤(lysogeny broth, LB)琼脂(货号: CM159)、硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium, TCBS)(货号: CM402)(北京陆桥技术股份有限公司); 改良纤维二糖多粘菌素 B 多粘菌素 E(modified cellobiose-polymyxin B-colistin, mCPC)琼脂(货号: HB4151, 青岛高科园海博生物股份有限公司)。

## 1.2 仪器与设备

MGC-100 恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); 3K15 离心机(德国 Sigma 公司); BSA822 电子天平(德国 Sartorius 公司); 400SW 均质器(法国 Interscience 公司); Micro Drop 超微量分光光度计(上海宝予德科学仪器有限公司); 7500 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司); CFX96 实时荧光 PCR 仪(芬兰 BIO-DL 公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 样品处理及基因组 DNA 的提取

环境水体样品: 在环境水体(江河水等)上、中、下段各布置不少于 1 个监测点, 每个监测点采集 2 份水样, 每份 500 mL。取 1 mL 水样加入到事先分装有 9 mL 的 3%氯化钠 APB 的 15 mL 离心管中, 置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养 24 h。取 1 mL 增菌培养液, 12000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液, 沉淀用于提取 DNA。

牡蛎等贝类: 用流动自来水清洗外壳的泥沙, 用体积分数 75%酒精棉球擦洗外壳, 用灭菌钳将贝类开壳, 称取约 20 g 内容物, 置无菌均质袋中, 加入 50 mL 体积分数 0.85%无菌生理盐水, 均质 3~5 min, 使样品充分分散。吸取 1 mL 样品均质液, 加入到事先分装有 9 mL 的 3%氯化钠 APB 的 15 mL 离心管中, 置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中过夜

培养。取 1 mL 增菌培养液, 12000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液, 沉淀用于提取 DNA。

鱼类: 患病鱼体表用 75%酒精棉消毒, 在无菌条件下, 分别取肝、脾、肾和溃疡病变等处的组织, 称取约 20 g 放入无菌均质袋, 然后按照牡蛎等贝类的方法进行均质、增菌培养及提取 DNA。

虾蟹类: 使用 75%酒精棉消毒后, 解剖剪分离样品, 去壳, 称取约 20 g 内容物, 按照牡蛎等贝类的方法进行均质、增菌培养及提取 DNA。

上述样品在增菌培养后, 用一次性无菌接种环沾取少量增菌培养液并均匀涂布于 TCBS 琼脂培养基上, 置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中过夜培养。用接种环挑取绿色和黄色的单菌落, 在 mCPC 琼脂培养基上进行纯化培养, 按照美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)发布的 BAM-2004 提供的第一法: 最大可能数法(most probable number, MPN)进行生化鉴定。

本研究分别采用煮沸 DNA 裂解法(以下简称煮沸法)和离心柱提取 DNA 法(以下简称离心柱法)对弧菌进行基因组 DNA 的提取, 以优化出快速、适宜于弧菌的 DNA 提取方法。煮沸 DNA 裂解法提取步骤: 将样品分别加入 100  $\mu\text{L}$  的裂解试剂中悬浮菌体, 用振荡器混合,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  煮沸 10 min; 12000 r/min 离心 2 min, 取上清液,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻保存备用; 离心柱提取 DNA 法采用商业化提取试剂盒操作步骤进行基因组 DNA 的提取。

### 1.3.2 引物的设计与合成

依据 NCBI GenBank 数据库中公布的创伤弧菌 *gyrB* 基因(GenBank: MN540397.1)作为靶序列, 经比对分析后, 确定 *gyrB* 基因的保守序列, 利用 Primer Explore V4 软件各设计出了 6 套 LAMP 引物。最终, 筛选出创伤弧菌的最佳引物序列如表 1 所示, 均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

### 1.3.3 LAMP 反应体系及条件

LAMP 反应体系为  $2\times\text{RM}$  反应液 12.5  $\mu\text{L}$ 、*Bst* DNA 聚合酶 1.0  $\mu\text{L}$ 、SYTO-9 荧光染料 0.5  $\mu\text{L}$ (或可视化的钙黄绿素 1.0  $\mu\text{L}$ )、引物 1.0  $\mu\text{L}$ (内引物终浓度 0.4~1.6  $\mu\text{mol/L}$ ; 外引物终浓度为 0.1~0.2  $\mu\text{mol/L}$ ; 环引物终浓度为 0.1~0.8  $\mu\text{mol/L}$ )、DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 超纯水补齐至总体积 25  $\mu\text{L}$ 。

表 1 创伤弧菌 *gyrB* 基因的 LAMP 扩增引物及序列  
Table 1 LAMP amplification primer and sequence of *Vibrio vulnificus gyrB* gene

<i>gyrB</i> 基因	引物序列(5'-3')
VV-OF	GCTTGCTATCATCGGTGAT
VV-OB	CACCGTCACGCTGTG
VV-IF	AACGCTTGAATACCACCTTCATACAATCCTAGCGAAGCGTCT
VV-IB	TCACTCACTTGAACCGCAACAGCCACTTCAACCGCAA
VV-LF	CGACACGCCAGAGTTCA
VV-LB	TTAATGCCGAGCGTGAAGA

通过实时荧光 PCR 仪或 LAMP 实时浊度仪扩增来观察荧光扩增曲线(加 SYTO-9 荧光染料), 荧光基团选择 SYBR, 设置反应条件为 63 °C 15 s, 63 °C 45 s 作为 1 个循环, 于 63 °C 45 s 处收集荧光信号, 45 个循环, 反应结束后分析荧光扩增曲线结果。

通过可视化观察扩增产物的颜色变化(加钙黄绿素), 设置反应条件为恒温水浴 63 °C 保温 30 min, 然后 95 °C 2 min 终止反应/冰浴终止反应, 在紫外光下(波长 240~260 nm, 350~370 nm)观察呈现绿色荧光为阳性结果, 无绿色荧光则为阴性结果。

### 1.3.4 特异性实验

为评价创伤弧菌可视化 LAMP 检测方法的特异性, 根据表 1 中优化筛选后的 LAMP 引物和上述反应体系和条件对创伤弧菌、灿烂弧菌、拟态弧菌、麦氏弧菌、费尼斯弧菌、河流弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、鳗弧菌的基因组 DNA 进行扩增反应, 反应结束后, 通过观察荧光扩增曲线(加 SYTO-9 荧光染料)和紫外光下观察扩增产物的颜色变化(加钙黄绿素), 分析检测结果, 进行双平行实验, 分别检验本研究可视化 LAMP 检测方法的特异性。

### 1.3.5 灵敏度实验

使用超微量分光光度计测定创伤弧菌基因组 DNA 的浓度后, 按照倍比稀释方法将创伤弧菌的 DNA 浓度分别调成以下系列浓度:  $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、10、1、0.1 fg/ $\mu$ L。每个浓度进行双平行实验, 灭菌双蒸水作为阴性对照, 按照 LAMP 反应检测过程, 确定本方法的灵敏度。

### 1.3.6 重现性实验

将创伤弧菌的基因组 DNA 浓度均调至 1 ng/ $\mu$ L, 以此作为起始浓度, 进行 10 倍稀释, 选取灵敏度实验结果中确定的最低检测浓度作为 DNA 模板, 进行 LAMP 检测实验, 采用 20 次平行实验以验证方法的可重复性。

### 1.3.7 在水产品及养殖水域中的实际检测应用

采集 655 份水产品样品, 包括餐饮环节中的水产品样品 155 份、超市流通环节中的水产品样品 189 份、农贸市场中的水产品样品 206 份、网店中的水产品样品 105 份; 采集 558 份水体样品, 包括海水样品 440 份、江河水样品 98 份、养殖场环境海水样品 20 份。采用本研究建立的可视化 LAMP 检测方法, 对所采集的样品进行检测, 并对经 LAMP 检出阳性结果的样品进行创伤弧菌的菌落分离培养和生化鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 弧菌基因组 DNA 提取方法优化结果

选取创伤弧菌、灿烂弧菌、副溶血性弧菌和鳗弧菌的菌株增菌液, 采用煮沸 DNA 裂解法和离心柱 DNA 纯化法分别提取基因组 DNA, 使用超微量分光光度计测定吸收值并计算浓度。2 种 DNA 提取方法的吸光度  $A_{260}/A_{280}$  比值的核酸纯度方差分析结果见图 1。由图 1 可知, 无论采取何种提取方法, 核酸纯度的指标值( $A_{260}/A_{280}$ )均能达到 1.5 及以上, 该 2 种方法之间无显著差异( $P>0.05$ ), 基本满足正常的核酸检测需求。然而, 煮沸法残留较多碳水化合物, 后续进行 LAMP 扩增时需要将模板 DNA 进行稀释, 以降低其他成分的干扰。

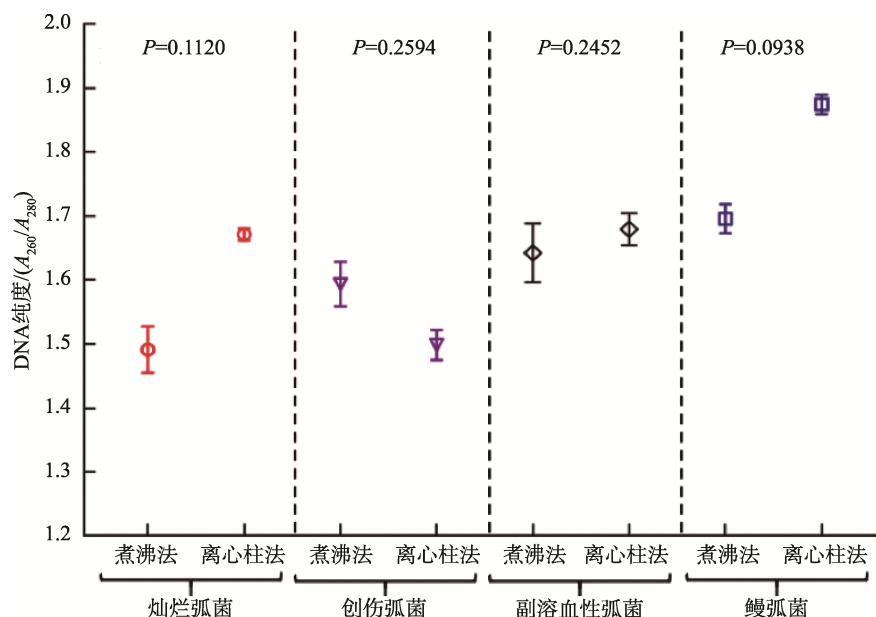
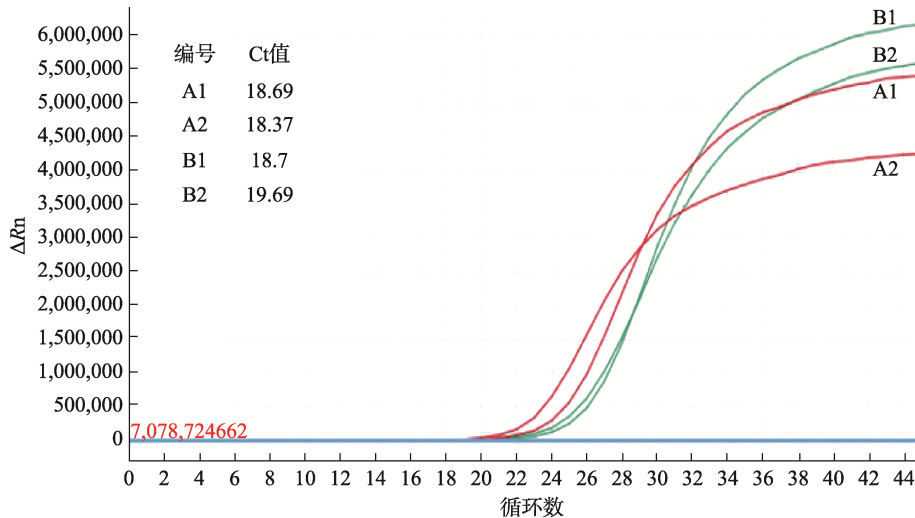


图 1 4 种弧菌基因组 DNA 纯度指标值( $A_{260}/A_{280}$ )的方差分析结果

Fig.1 Results of ANOVA for purity index values ( $A_{260}/A_{280}$ ) of genomic DNA of 4 kinds of *Vibrio genomic*

以创伤弧菌为例分析不同方法提取 DNA 的 LAMP 扩增效果。通过 LAMP 荧光扩增曲线分析反应结果(加 SYTO-9 荧光染料)如图 2 所示,通过紫外光下观察产物颜色浊度变化结果(加钙黄绿素),如图 3 所示。由图 2、3 可见,采用 2 种不同方法提取的创伤弧菌 DNA,通过 LAMP 反应均能产生典型的荧光扩增曲线,且循环数(cycle

threshold, Ct)值基本一致。通过紫外光下观察产物颜色浊度变化,也均可以产生典型的绿色荧光阳性结果。可见,煮沸 DNA 裂解法中残留的碳水化合物并不能影响 LAMP 反应,同时具备提取时间短、成本低、方便操作等优势。综合分析,本研究选取煮沸 DNA 裂解法进行弧菌基因组 DNA 的提取。



注: A1、A2: 采用离心柱法提取基因组 DNA 的创伤弧菌样本; B1、B2: 采用煮沸法提取基因组 DNA 的创伤弧菌样本。

图 2 创伤弧菌不同提取方法 LAMP 荧光扩增曲线结果

Fig.2 Results of LAMP fluorescence amplification curve with different extraction methods for *Vibrio vulnificus*



注: 1、2: 采用离心柱法提取基因组 DNA 的创伤弧菌样本; 3、4: 采用煮沸法提取基因组 DNA 的创伤弧菌样本; 5、6: 水对照。

图 3 紫外光下创伤弧菌不同提取方法的可视化检测结果

Fig.3 Visual detection results of different extraction methods of *Vibrio vulnificus* under ultraviolet light

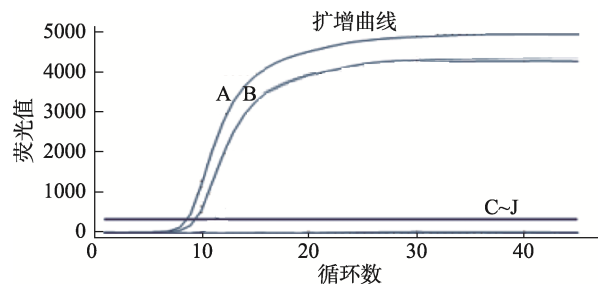
## 2.2 LAMP 引物的筛选结果

通过 LAMP 荧光扩增曲线分析(加 SYTO-9 荧光染料)创伤弧菌的 LAMP 引物筛选结果。其中阳性对照为创伤弧菌,阴性对照为副溶血性弧菌。针对创伤弧菌 *gvrB* 基因序列设计的 6 套引物进行 LAMP 反应后,结果为: 第 1、5、6 套引物,创伤弧菌阳性对照的出峰时间约为 15、10、11 min,阴性对照均无扩增; 第 2、3 套引物,创伤弧菌阳性对照的出峰时间约为 16、20 min,但阴性对照分别在 50、30 min 出现翘尾及假阳性的情况; 第 4 套引物整体曲线倾斜向上,无峰值。因此,综合以上结果,选择出峰较早且无非特异性扩

增的创伤弧菌第 5 套引物(序列见表 1)用于后续实验。

## 2.3 特异性实验结果分析

特异性实验结果显示,经 LAMP 检测,创伤弧菌均有特异性扩增,2 次重复结果相一致,其他弧菌的扩增均为阴性。荧光扩增曲线结果见图 4,紫外光下扩增产物的颜色浊度变化结果见图 5。说明本研究设计的创伤弧菌 LAMP 引物均具有良好的特异性。



注: A、B: 创伤弧菌; C~J: 副溶血性弧菌等其他 8 种弧菌。

图 4 LAMP 荧光扩增曲线分析检测创伤弧菌的特异性结果  
Fig.4 Specificity of detection of *Vibrio vulnificus* by LAMP fluorescent amplification curve analysis

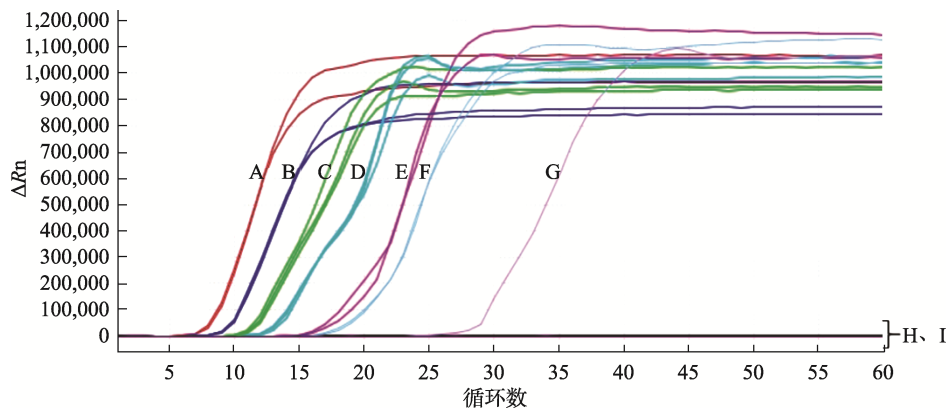


注: A: 创伤弧菌; B~H: 副溶血性弧菌等其他 7 种弧菌。

图 5 紫外光下观察可视化 LAMP 检测创伤弧菌的特异性结果  
Fig.5 Observation of the specific results of visual LAMP detection of *Vibrio vulnificus* under UV light

## 2.4 灵敏度实验结果分析

将创伤弧菌 8 个不同浓度的基因组核酸作为扩增反



注: A:  $10^6$  fg/μL; B:  $10^5$  fg/μL; C:  $10^4$  fg/μL; D:  $10^3$  fg/μL; E:  $10^2$  fg/μL; F:  $10$  fg/μL; G:  $1$  fg/μL; H:  $0.1$  fg/μL; I: 空白对照。

图 6 LAMP 荧光法检测创伤弧菌灵敏度实验结果

Fig.6 Experimental results on that sensitivity of *Vibrio vulnificus* detection by LAMP fluorometry



注: A:  $10^6$  fg/μL; B:  $10^5$  fg/μL; C:  $10^4$  fg/μL; D:  $10^3$  fg/μL; E:  $10^2$  fg/μL; F:  $10$  fg/μL; G:  $1$  fg/μL; H:  $0.1$  fg/μL; I: 空白对照。

图 7 紫外光下创伤弧菌灵敏度的 LAMP 可视化检测结果  
Fig.7 Results of LAMP visual detection of *Vibrio vulnificus* sensitivity under UV light

## 2.5 重复性实验结果

为分析创伤弧菌 LAMP 检测方法的重复性, 以最低检测浓度  $10$  fg/μL 的 2 种弧菌基因组 DNA 为模板进行 LAMP 反应, 各进行 20 次重复实验, 荧光扩增曲线实验结果表明, 创伤弧菌的 20 次重复实验结果一致且均为阳性, 出峰时间短、扩增曲线完整, 说明采用 LAMP 方法检测创伤弧菌具有良好的重复性和稳定性。

## 2.6 在实际样品中的检测应用

采用本方法对采集的水产品样品和水体样品进行实

应模板, LAMP 反应荧光扩增曲线结果(加 SYTO-9 荧光染料)见图 6, 紫外光下扩增产物的颜色浊度变化结果(加钙黄绿素)见图 7。由图 6 可见, 当创伤弧菌的浓度在  $10$  fg/μL 及以上时, 均有荧光扩增曲线出现且结果稳定, 当为  $1$  fg/μL 浓度时均只能概率性的检出且结果不稳定; 由图 7 可见,  $10$  fg/μL 及以上浓度的创伤弧菌, 紫外光下均观察到扩增产物呈现绿色荧光浊度变化, 而当浓度为  $1$  fg/μL 时浊度变化不显著。因此, 综上结果, 创伤弧菌的 LAMP 方法检测灵敏度为  $10$  fg/μL, 且荧光扩增曲线和紫外光下观察扩增产物的颜色变化灵敏度结果基本一致。

际检测应用。经 LAMP 检测, 在 655 份水产品样品中, 有 59 份样品检出创伤弧菌阳性, 阳性检出率为 9.01% (59/655)。在 558 份水体样品中, 有 48 份样品检出创伤弧菌阳性, 阳性检出率为 8.60% (48/558)。通过比较基于荧光扩增曲线, 以及基于可视化观察扩增产物的颜色变化, 所建立的 LAMP 方法检测水产品样品和水体样品的结果完全一致。

针对采用 LAMP 检出阳性结果的样品, 采用实时荧光 PCR 方法<sup>[4]</sup>进行验证, 结果符合率为 100%。同时, 进行创伤弧菌的菌落分离培养和生化鉴定, 经鉴定, 创伤弧菌阳性菌株检出率为 83.76% ( $P=0.00002$ )。王紫薇等<sup>[4]</sup>对北京市市场随机采集的 105 份水产品进行了创伤弧菌检验, 验证了实时荧光 PCR 和细菌鉴定系统 VITEK 方法的准确率分别为 100%和 67.50%。本研究结果表明, 水产品和水体中创伤弧菌分离培养的阳性检出率明显低于 LAMP 的阳性检出率, 分析其原因在于, 很多弧菌菌株生长缓慢, 生化鉴定结果不稳定。

### 2.6.1 不同种类样品创伤弧菌检出情况

655 份水产品样品中 LAMP 检测结果如表 2 所示。创伤弧菌阳性样品种类分别是淡水鱼、海水虾蟹、海水鱼、

贝类, 阳性样品数量最高的是贝类。由此推测, 贝类更易富集弧菌。经卡方检验分析, 贝类样品阳性检出率明显高于海水鱼样品( $\chi^2=82.51, P<0.01$ ), 明显高于淡水鱼样品( $\chi^2=82.51, P<0.01$ )、淡水虾蟹样品( $\chi^2=82.51, P<0.01$ )、头足类样品( $\chi^2=82.51, P<0.01$ ), 与海水虾蟹样品阳性检出率无统计学差异( $\chi^2=1.71, P>0.05$ )。

表 2 不同种类水产品中创伤弧菌的 LAMP 检测情况  
Table 2 Detection of *Vibrio vulnificus* in different aquatic products by LAMP assay

样品	采样数量/份	创伤弧菌	
		检出阳性份数	检出率/%
淡水虾蟹	36	0	0
淡水鱼	105	6	5.71
海水虾蟹	53	6	11.32
海水鱼	171	12	7.02
贝类	189	35	18.52
头足类	101	0	0
合计	655	59	9.01

558 份水体样品 LAMP 检测结果如表 3 所示。经卡方检验分析, 海水样品阳性检出率明显高于江河水产品( $\chi^2=82.51, P<0.01$ ), 养殖场水样品阳性检出率明显高于江河水产品( $\chi^2=82.51, P<0.01$ ), 海水样品与养殖场水样品阳性检出率无统计学差异( $\chi^2=1.71, P>0.05$ )。

表 3 水体样品创伤弧菌的 LAMP 检测情况  
Table 3 Detection of *Vibrio vulnificus* in water samples by LAMP assay

样品	采样数量/份	创伤弧菌	
		检出阳性份数	检出率/%
海水	440	45	10.23
河水	98	2	2.04
养殖场水	20	1	5.00
合计	558	48	8.60

### 2.6.2 不同月份创伤弧菌的检出情况

弧菌是喜温性细菌。有研究表明, 随着水温上升, 弧菌的检出率呈现上升趋势。因此, 夏季弧菌的检出率最高。本研究的检测结果也证实了这种情况, 3~5 月、6~8 月、9~11 月、12~2 月采样数量分别为 174 份、235 份、132 份、114 份, 检出阳性数量分别为 18 份、70 份、17 份、2 份, 检出率分别为 10.34%、29.79%、28.03%、1.75%, 6~8 月创伤弧菌的检出率最高。

### 2.6.3 不同采样环节创伤弧菌的检出情况

在中国, 多数农贸市场为开放式的管理方式, 因此,

不同种类的商品之间存在交叉污染的情况。与农贸市场相比, 超市管理会相对规范, 减少了商品间污染的机会。因此, 农贸市场中创伤弧菌的污染情况会高于超市。本研究的检测结果也证实了这种情况, 餐饮环节、超市、农贸市场、网店的采样数量分别为: 155 份、189 份、206 份、105 份, 检出阳性数量分别为 18 份、14 份、68 份、7 份, 检出率分别为 11.61%、7.41%、33.01%、6.67%, 农贸市场中创伤弧菌的检出率最高。

## 3 结论与讨论

本研究首次建立了创伤弧菌的基于观察扩增产物颜色变化(加钙黄绿素)的可视化 LAMP 检测方法, 对 655 份水产品样品和 558 份水体样品进行了检测比较, 以验证该方法应用于水产养殖现场监测的适用性。结果表明, 该方法与实时荧光 PCR 方法的检测结果符合率为 100%, 与经典的分离培养鉴定创伤弧菌符合率为 83.76% ( $P=0.00002$ ), 可视化 LAMP 检测方法的阳性检出率显著高于经典的分离培养鉴定方法, 具有统计学意义。

因此, 根据本研究的实际应用结果所建立的水产品及水体中创伤弧菌现场可视化 LAMP 检测方法, 能够快速检测创伤弧菌, 特别是可视化检测仅需要恒温环境即可完成, 简单、快速、经济, 对水产养殖中创伤弧菌的及时控制及预防具有重要意义。

## 参考文献

- [1] 王亮. 灿烂弧菌的鉴定及溶血素检测[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011. WANG L. Identification and hemolysin of *Vibrio splendidus* isolates [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2011.
- [2] 张力支. 基于新型纳米金核酸试纸条对灿烂弧菌快速检测的研究[D]. 烟台: 鲁东大学, 2020. ZHANG LZ. Rapid detection of *Vibrio brilliant* based on new nano gold nucleic acid strip [D]. Yantai: Ludong University, 2020.
- [3] DENG YQ, XU LW, CHEN HX, et al. Prevalence, virulence genes, and antimicrobial resistance of *Vibrio* species isolated from diseased marine fish in China [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 14329–14337.
- [4] 王紫薇, 汪琦, 赵晓娟, 等. 2016 年北京市水产品中创伤弧菌的污染调查及两种检测方法比较[J]. *中国食品卫生杂志*, 2018, 30(2): 182–186. WANG ZW, WANG Q, ZHAO XJ, et al. Investigation of *Vibrio vulnificus* contamination in seafood in Beijing in 2016 and comparison of two detection methods [J]. *Chin J Food Hyg*, 2018, 30(2): 182–186.
- [5] 闫茂仓, 陈少波, 单乐州, 等. 22 味中草药对创伤弧菌和灿烂弧菌体外抑菌作用筛选[J]. *水生态学杂志*, 2010, 3(2): 95–98. YAN MC, CHEN SB, SHAN LZ, et al. Selection of 22 kinds of Chinese herbal medicines on bacteriostasis *in vitro* on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio splendidus* [J]. *J Hydroecol*, 2010, 3(2): 95–98.
- [6] HENG SP, LETCHUMANAN V, DENG CY, et al. *Vibrio vulnificus*: An environmental and clinical burden [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1–25.
- [7] HORSEMAN MA, SURANI S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: An important cause of severe sepsis and skin and soft tissue infection [J]. *Int J Infect Dis*, 2011, 15(3): 157–166.

- [8] CRAIG BA, JAMES DO. *Vibrio vulnificus*: New insights into a deadly opportunistic pathogen [J]. Environ Microbiol, 2018, 20(2): 423–430.
- [9] 张丽娜, 王明义, 杨小蕾, 等. 海洋创伤弧菌 LAMP 快速诊断方法的建立与评价[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(5): 577–582.  
ZHANG LN, WANG MY, YANG XL, *et al.* Establishment and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detecting marine *Vibrio vulnificus* [J]. Int J Lab Med, 2016, 37(5): 577–582.
- [10] STAMM LV. Role of TLR4 in the host response to *Vibrio vulnificus*, an emerging pathogen [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010, 58(3): 336–343.
- [11] ANDERSON M, KNUDSON M, FRIEBERG E, *et al.* Fatal *Vibrio vulnificus* sepsis in vertically acquired hepatitis C [J]. J Pediatr Gastr Nutr, 2013, 56(5): 32–33.
- [12] BAKER AC, TRINANES J, GONZALEZ EN, *et al.* Non-cholera *Vibrios*: The microbial barometer of climate change [J]. Trends Microbiol, 2017, 25(1): 76–84.
- [13] OLIVER JD. *Vibrio vulnificus*: Death on the half shell. A personal journey with the pathogen and its ecology [J]. Microb Ecol, 2013, 65(4): 793–799.
- [14] 倪佳蕾. 水产品中创伤弧菌的快速检测技术研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2012.  
NI JL. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in aquatic products [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2012.
- [15] NOTOMI T, OKAYAM AH, MASUBUCHI H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [16] BECHERER L, BORST N, BAKHEIT M, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-review and classification of methods for sequence specific detection [J]. Anal Methods, 2020, 12(6): 717–746.
- [17] 王青柏, 李良秋, 徐鹏, 等. 创伤弧菌生物学特性和检测技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(5): 33–36.  
WANG QB, LI LQ, XU P, *et al.* Research progress on biological characteristics and detection techniques of *Vibrio vulnificus* [J]. J Anhui Agric Sci, 2019, 47(5): 33–36.
- [18] 葛航, 吴朦晨, 张明洲, 等. 食源性致病菌等温扩增检测技术等研究进展[J]. 分析测试学报, 2019, 38(7): 874–881.  
GE H, WU MC, ZHANG MZ, *et al.* Research progress of isothermal amplification techniques for detection of food-borne bacteria [J]. J Instrum Anal, 2019, 38(7): 874–881.
- [19] 秦国民, 张晓君, 毕可然, 等. 基于 *tolB* 和 *toxR* 两种基因的水产品中霍乱弧菌双重 PCR 检测方法[J]. 食品科学, 2011, 32(22): 273–275.  
TAI GM, ZHANG XJ, BI KR, *et al.* Detection of *Vibrio cholerae* from aquatic animals by duplex PCR based on *tolB* and *toxR* genes [J]. Food Sci, 2011, 32(22): 273–275.
- [20] LEI SW, GU XK, XUE W, *et al.* A 4-plex droplet digital PCR method for simultaneous quantification and differentiation of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* based on single intact cells [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1727–1738.
- [21] TAO J, LIU WW, DING W, *et al.* A multiplex PCR assay with a common primer for the detection of eleven foodborne pathogens [J]. J Food Sci, 2020, 85(3): 1–11
- [22] 陈昌国, 陈秋圆, 侯兵兵, 等. 基于 LAMP 技术针对溶藻弧菌 *gyrB* 基因快速检测方法的建立[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(6): 6–9.  
CHENG CG, CHEN QY, HOU BB, *et al.* Establishment of the rapid detection method targeting to *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* based on LAMP technology [J]. J Mod Lab Med, 2019, 34(6): 6–9.
- [23] REGEV Y, DAVIDOVICH N, BERZAK R, *et al.* Molecular identification and characterization of *Vibrio* species and mycobacterium species in wild and cultured marine fish from the eastern mediterranean sea [J]. Microorganisms, 2020, 8: 863–880.
- [24] 王殿夫, 何平, 王青, 等. 弗尼斯弧菌 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(7): 10–19.  
WANG DF, HE P, WANG Q, *et al.* Establishment and application of a PCR based method for detection of *Vibrio furnissii* [J]. Periodi Ocean Univ China (Nat Sci Ed), 2018, 48(7): 10–19.
- [25] XU YG, SUN LM, WANG YS, *et al.* Simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay [J]. Food Control, 2017, 71: 64–70.
- [26] KIM HJ, RYU JO, LEE SY, *et al.* Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics [J]. BMC Microbiol, 2015, 15(1): 239.
- [27] KIM JY, LEE JL. Multipurpose assessment for the quantification of *Vibrio* spp. and total bacteria in fish and seawater using multiplex real-time polymerase chain reaction [J]. J Sci Food Agric, 2014, 94(13): 2807–2817.
- [28] NEOGI SB, CHOWDHURY N, ASAKURA M, *et al.* A highly sensitive and specific multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* [J]. Lett Appl Microbiol, 2010, 51(3): 293–300.
- [29] WEI S, ZHAO H, XIAN YY, *et al.* Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 79(2): 115–118.
- [30] REN CH, HU CQ, LUO P, *et al.* Sensitive and rapid identification of *Vibrio vulnificus* by loop-mediated isothermal amplification [J]. Microbiol Res, 2009, 164(5): 514–521.
- [31] 别闯南, 王权, 白雪瑞. 检测创伤弧菌两种毒力基因的环介导等温扩增检测方法的建立[J]. 中国动物传染病学报, 2018, 23(5): 470–472.  
BIE CN, WANG Q, BAI XR. Establishment of loop mediated isothermal amplification for detection of two virulent genes of *vibrio vulnificus* [J]. Chin J Anim Infect Dis, 2018, 23(5): 470–472.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

## 作者简介



田 卓, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: tianzhuo1113@163.com



尚德静, 博士, 教授, 主要研究方向为细胞生化。

E-mail: dejingshang9@gmail.com



曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品生物工程。

E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn