

致病性弧菌检测新技术研究进展

王殿夫¹, 丁宁², 刘洪伟³, 徐文英⁴, 刘俊⁵,
李扬⁴, 麻丽丹³, 田卓^{4*}

(1. 辽东学院科研处, 丹东 118002; 2. 广东海关技术中心, 广东 510623; 3. 丹东海关综合技术服务中心, 丹东 118000; 4. 大连海关技术中心, 大连 116000; 5. 成都海关技术中心, 成都 644002)

摘要: 随着人们对水产品需求的增加及致病性弧菌引发的食源性疾病的流行, 致病性弧菌对水产养殖业及人类健康造成了巨大威胁, 基于此, 致病性弧菌检测新技术的开发变得尤为迫切。本文介绍了包括免疫学方法、核酸检测方法、基于生物芯片的检测方法、基于核酸适配体的检测方法、基于肽质量指纹图谱技术的检测方法、基于生物传感器技术的检测方法在内的6项检测技术, 分析了其优缺点及其在致病性弧菌中的应用。最后, 总结了致病性弧菌检测新技术的研究现状, 结合新兴技术指出未来研究方向, 为致病性弧菌的快速检测提供参考。

关键词: 致病性弧菌; 免疫学; 生物芯片; 核酸适配体; 肽质量指纹图谱; 生物传感器

Research progress in new technologies for detecting pathogenic *Vibrio*

WANG Dian-Fu¹, DING Ning², LIU Hong-Wei³, XU Wen-Ying⁴,
LIU Jun⁵, LI Yang⁴, MA Li-Dan³, TIAN Zhuo^{4*}

(1. Research Department of Liaodong University, Dandong 118002, China; 2. Technology Center of Guangdong Customs District, Guangdong 510623, China; 3. Comprehensive Technical Service Center of Dandong Customs, Dandong 118000, China; 4. Technology Center of Dalian Customs District, Dalian 116000, China; 5. Technology Center of Chengdu Customs District, Chengdu 644002, China)

ABSTRACT: With the increasing demand for aquatic products and the prevalence of foodborne diseases caused by pathogenic *Vibrio*, pathogenic *Vibrio* poses a huge threat to the aquaculture industry and human health. Therefore, higher requirements have been put forward for the sensitivity, specificity, and accuracy of prevention and detection technologies for pathogenic *Vibrio*. This article introduced 6 detection technologies, including immunological methods, nucleic acid detection methods, biochip based detection methods, nucleic acid aptamer based detection methods, peptide mass fingerprinting based detection methods, and biosensor based detection methods, analyzed the advantages and disadvantages of these technologies and their applications in pathogenic *Vibrio*. Finally, this article summarized the research status of new technologies for detecting pathogenic *Vibrio*, and future research directions were pointed out based on emerging technologies, providing references for the rapid detection of pathogenic *Vibrio*.

KEY WORDS: pathogenic *Vibrio*; immunology; biochip; nucleic acid adapter; peptide mass fingerprinting; biosensor

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1100800)、大连海关科研项目(2022DK06)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1100800), and the Dalian Customs Scientific Research Project (2022DK06)

*通信作者: 田卓, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。E-mail: tianzhuo1113@163.com

*Corresponding author: TIAN Zhuo, Master, Senior Engineer, Technology Center of Dalian Customs District, Dalian 116000, China. E-mail: tianzhuo1113@163.com

0 引言

弧菌是海洋环境中的主要致病菌之一,存在于世界各地的海水水域中,可引起细菌性食物中毒及人畜共患病,严重时可引起受感染者休克甚至死亡。弧菌生长迅速并且具有很强的适应能力,可在短时间内引起病害的大面积爆发,严重制约着我国水产养殖业和捕捞业的发展。随着我国沿海地区水产养殖规模的不断扩大,水产品质量安全问题日益突出,因此精准、快速、高效、简便的检测,借助先进精密的检测仪器,使用科学合理的检测方法检测食品中可能威胁消费者健康的病原菌,在最大程度上提高检测的时效性、精准性,才能有效提升食品安全质量,从而防止传染病的大爆发,减少对人类健康的威胁,同时降低经济损失,保障水产养殖产业的健康发展。

近年来,致病性弧菌的检测技术有了较大发展,相对于传统培养法,许多技术成熟的检测技术在时效性、灵敏度、特异性等方面具有更大的优势,本文对致病性弧菌的检测新技术进行了概括总结与分析对比,旨在为进一步开发新的致病性弧菌检测技术奠定基础。

1 检测新技术方法

1.1 免疫学方法

免疫学方法是依据抗原与抗体的反应,来观察组织细胞、特定抗原(抗体)的定性/定量技术。该技术可预先将某种标记物结合到抗体上,借助标记物的荧光或酶的有色反应、放射性或高电子密度,在光镜或电镜下观察抗原抗体反应。

1.1.1 免疫荧光技术

免疫荧光技术(immune fluorescence assay, IFA)是利用荧光标记抗体检测特定目标抗原^[1-2]。樊景凤等^[3]应用该技术,确定免疫血清和荧光抗体的最适工作浓度分别为1:1000和1:200,交叉反应和阻断试验表明该方法具有较高的特异性,同时检测结果表明该技术不仅能够检测已发病的凡纳滨对虾,而且能够检测带菌的凡纳滨对虾。但IFA技术还存在一些问题,如非特异性染色、结果判断和技术复杂等,因此,还需不断地改进其弊端,使其在致病菌的可视化检测中迅速发展。

1.1.2 酶联免疫吸附检测技术

每一种抗体都有其特定识别和结合的抗原,酶联免疫吸附检测技术(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)就是基于此原理,对抗原或抗体进行检测^[4-5]。职通瑞等^[6]以溶藻弧菌作为抗原,将辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)-羊抗兔血清作为抗体,建立了溶藻弧菌快速检测的间接ELISA方法,可检测细菌最低浓度为 10^4 CFU/mL。

ELISA法操作简单、特异性强、灵敏度高、不存在同位素和放射性污染的问题,检测试剂可长时间保存。此外,基于电化学免疫分析、光热效应、表面增强拉曼散射、化学发光免疫分析等设计的ELISA测定方法,具有简便、灵活、适用于痕量检测等优点,在致病性弧菌检测上得到了非常广泛的应用。但ELISA检测结果易受干扰、重复性差、不能同时分析多种成分^[7],未来还需进一步开发能够在污染现场进行快速且可靠的检测方法。

1.1.3 免疫磁珠分离技术

免疫磁珠分离技术(immunomagnetic beads separation techniques, IMBS),是以免疫学为基础,结合活性蛋白质,磁性纳米颗粒标记的抗体与抗原特异性结合后,在外界磁场的作用下,可以定向移动,从而达到富集、分离和纯化的目的^[8-9]。ZHAO等^[10]通过对IMBS试验条件的优化,包括对生物素化多克隆抗体、免疫磁珠剂量、培养时间、免疫磁性分离时间、免疫反应温度的优化,改良了副溶血性弧菌的定量检测方法,大大提高了灵敏度与检测效率,检出限为18.5 CFU/g。免疫磁珠分离技术也存在一些不足,比如在操作过程中涉及到阳性分选法及阴性分选法。阳性分选法中,需要对特异性的靶细胞进行标记,这有可能会引起细胞活化;同时阴性分选法中,会需要多种抗体来标记不需要的细胞。

1.1.4 胶体金免疫层析技术

胶体金免疫层析技术(colloidal gold immunochromatographic assay, GICA)是利用特异性抗原抗体反应,以胶体金为标记物,对抗原或抗体物质进行定性或定量分析的技术^[11]。吴美娇等^[12]建立了基于双抗体夹心原理的可视化免疫层析试纸条法,并应用于鲜虾及白蛤等海产品中副溶血性弧菌的检测,检出限为 4.77×10^3 CFU/mL。SAKATA等^[13]在传统细胞培养基中加入增菌培养物,建立了快速免疫层析法,结果表明,该方法可以在8.5 h内检测出牡蛎样品中的副溶血性弧菌,检出限为1.1~22 CFU/25 g。

GICA方便快捷、特异性强、无需设备和额外试剂、结果可视化,适合野外作业、现场检测等场合。但是,目前该方法在早期检测、灵敏度以及特异性等方面仍有很大的改进空间,同时GICA大部分为定性反应,难以量化,缺乏严密的质控体系,仅能作为一种粗筛方法。在灵敏度方面,微纳米级标记材料(如稀土化合物及纳米颗粒、量子点)和信号放大系统(如磁分离技术、级联放大)的出现,使得免疫层析试纸条的灵敏度有了一定的提高。另外,利用荧光标记物(如荧光微球、量子点或镧系元素纳米颗粒等)可实现多种靶标的同步检测。

1.2 核酸检测方法

1.2.1 聚合酶链式反应检测技术

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测技术是一种扩增DNA片段的技术^[14-15],PCR的出现很

大程度上解决了检测时限长、精准性低等问题,由 PCR 衍生出来的实时荧光定量 PCR (real time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)技术在反应过程中加入了荧光物质,利用荧光信号值实时检测靶基因,并用内(外)参对特定基因进行定量分析,从而准确定量或定性分析起始模板的量。RT-PCR 的原理主要包括荧光染料法^[16]、TaqMan 探针法^[17]、分子信标法^[18]、复合探针法^[19]4 种。

杨丽霞等^[20]以副溶血性弧菌特异性基因为基础合成环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)引物,加入适量荧光染料于 63°C 下反应 45 min,建立了一种基于荧光 PCR 技术与 ELISA 联用的方法,副溶血性弧菌检测灵敏度为 10 pg。YUAN 等^[21]通过建立实时荧光 PCR 盐化滚圈扩增对海产品中副溶血性弧菌进行快速检测,灵敏度为 3.2×10^0 fg/ μ L,检出限为 2.3×10^0 CFU/g。LING 等^[22]建立的脱氧胆酸钠-丙啉单叠氮-实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)法,可快速检测虾样品中的活副溶血性弧菌,检出限为 5×10^1 CFU/mL。RT-PCR 法是当前技术较为成熟的一种实时、快速的检测手段,适用于大批量的样本同时现场快速检测,便于对由食源性致病菌引起的食品安全事件进行大量样品的初筛。

多重 PCR (multiplex polymerase chain reaction, MPCR)是基于传统 PCR 法,但又可以同时多种致病菌进行检测的技术,可以实时、准确地检出食品中的副溶血性弧菌等致病菌^[23]。

微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)也称第三代 PCR 技术,属于单分子分析,可以绝对定量^[24]。ddPCR 采用终点检测荧光数量方法,不依赖扩增曲线的循环阈值,也不需要制作不同浓度样本对应的标准曲线,具有计量准确、可定量的特点。方佩佩等^[25]建立了海鲢鱼样品中副溶血性弧菌的微滴数字 PCR 定量检测法,通过将 *TLH* 基因作为靶基因对 ddPCR 方法特异性和定量检测线性范围进行验证和测定。LEI 等^[26]建立了一种基于单个完整细胞的多重液滴数字 PCR 法,实现了副溶血性弧菌的绝对定量检测,具有高特异性与灵敏度,检出限为 15 CFU/mL。

PCR 反应的特点是特异性强、灵敏度高以及简便快速等,但是 PCR 方法需要精密控温的温度循环器,仪器价格比较昂贵,同时 PCR 技术是基于已知微生物基因序列建立特异性引物,对于完全新型未知的病原体检测价值有限。另外,由于敏感度高,微量的污染即可能造成假阳性结果,以上这些因素使 PCR 技术往往在实验室中使用,而不能在现场检测中发挥作用^[27]。

1.2.2 基于恒温扩增的检测技术

与 PCR 技术相比,恒温扩增技术不需要复杂的变温过程和昂贵的控温仪器,兼具准确性和现场检测适用性,在环境监测、食品安全、疾病诊断等相关病原微生物快速

检测领域发挥着越来越重要的作用。

(1)环介导等温扩增技术

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术针对靶基因的 6 个区域设计引物,在恒温条件下高效扩增目标 DNA^[28]。LEE 等^[29]通过对 LAMP 方法的条件优化,建立了一种新型的比色 LAMP 分析检测出副溶血性弧菌,在温度为 58.8°C 时优化的比色 LAMP 方法检出限为 1.1×10^3 CFU/mL,且克服了 LAMP 法假阳性的弊端,是一种快速、灵敏、简便的检测方法。CAO 等^[30]用实时荧光定量 PCR 和实时荧光定量 LAMP 法对虾中副溶血性弧菌进行检测,结果显示实时荧光定量 LAMP 法的检出限为 2.8 CFU/g,为实时荧光定量 PCR 的 10 倍。KAMPEERA 等^[31]建立的一种 LAMP 和石墨烯丝网印刷电化学传感器联用法,在 45 min 内可快速检测海产品中的副溶血弧菌,检出限为 0.3 CFU/25 g。

LAMP 方法操作简便,无需借助大型仪器,在金属浴或恒温箱中即可反应。特异性强、灵敏度远高于传统的 PCR,成本低、反应时间短,30~60 min 内即可获得反应结果。

(2)重组酶聚合酶扩增技术

重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)技术只需一对引物,在恒温条件下,实现对痕量核酸模板上的目的片段的高效^[32]、指数扩增^[33-35]。RPA 技术主要包括:实时荧光重组酶聚合酶扩增(real-time RPA, RT-RPA)技术^[36]、侧流层析重组酶聚合酶扩增(lateral flow dipstick RPA, LFD-RPA)技术^[37-38]、数字芯片(chip-RPA)技术^[39-40]、ELISA-RPA 技术^[41]。占利等^[42]通过设计副溶血性弧菌 *tlh* 基因的保守序列筛选引物探针,利用实时 RPA 检测法检出了副溶血性弧菌,20 min 内就能完成检测,检出限为 5 pg/ μ L 反应。

与其他核酸扩增技术相比,RPA 技术具有以下优点:灵敏度高,检出限低至 1~10 copies;因其引物较长,不易产生非特异性扩增;在恒温下即可完成反应,不仅便携还降低了成本,大大增强了实用性;同时该方法已具有成熟的商业试剂盒,操作简洁,不需要专业的实验人员;检测结果可通过多种可视化方法进行展示,非常适用于现场的快速检测^[43-46]。当然,RPA 技术也存在一定的局限性,比如没有专门针对 RPA 设计引物和探针的软件,只能使用 PCR 的软件进行设计和筛选。

(3)滚环扩增技术

滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)技术是模仿自然界中环状 DNA 分子滚环式复制而建立的核酸等温扩增技术^[47]。实时荧光跨越式滚环等温扩增法(real-time fluorescent saltatory rolling circle amplification, RF-SRCA)是一种新兴的快速检测法,其对 LAMP 和 RCA 技术的不足之处进行了优化与改良,与 RCA 技术相比,无需锁式探针和连接酶以及人为环化过程,操作步骤简单,耗时缩短

约 3 h, 成本降低约 3/4; 与 LAMP 技术相比, 所需引物数量减少, 避免了引物之间的相互作用, 成本降低约二分之一, 可通过测序验证扩增结果的正确性, 大大提高了检出率及准确率, 是一种理想的具有高灵敏度、特异性强的新型快速检测方法。董晶等^[48]将 RF-SRCA 和叠氮溴化丙锭染料相结合, 建立起一种新型的快速检测法, 以此成功在虾样品中检测出副溶血性弧菌, 检出限为 2.08×10^1 CFU/g。CAO 等^[49]用改进的实时荧光 PCR 和实时 LAMP 方法检测虾样品中活的但不可培养的副溶血性弧菌, 检出效率较高, 检出限为 28 CFU/g。

在采用等温检测方法时, 十分容易出现背景干扰的问题。大量背景基因组的存在, 使得灵敏度和特异性大大降低。为减小背景干扰对于副溶血性弧菌检测的影响, ZHANG 等^[50]建立了一种基于靶环化 RCA 结合环介导扩增的等温扩增法, 通过使用短的动态适配器增加靶环的敏感性, 对牡蛎样品中的副溶血性弧菌进行检测, 检出限为 22 CFU/g。

(4) 依赖解旋酶 DNA 等温扩增技术

依赖解旋酶 DNA 等温扩增(helicase-dependent isothermal DNA amplification, HDA)技术模拟体内 DNA 自然复制的过程^[51], 可以在数小时内扩增出起始模板 10^6 倍的产物量。如果采用实时检测, 30 min 内即可获知扩增结果。HAD 技术原理简单、操作便捷, 可应用于凝胶电泳、实时定量检测和酶联免疫吸附实验中。各种等温扩增技术主要参数比较见表 1。

1.2.3 基于 CRISPR/Cas 技术的检测技术

成簇、规则间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)系统是由 CRISPR 和 Cas 组成, 存在于许多的古细菌和细菌中^[52-53]。

在 CRISPR 系统中存在着多种 Cas 蛋白, 按照 Cas 蛋白的组成, CRISPR 系统可以分为两大类。第一大类系统依赖的 Cas 蛋白为多亚基组成的多蛋白效应复合物, 包括 I

型、III型和IV型; 第二大类系统依赖的 Cas 蛋白为单一效应蛋白, 如II型的 Cas9、V型的 Cas12 和VI型 Cas13、Cas14 等^[54-57]。第二类 CRISPR 系统因其组成成分单一、系统简单, 因此在核酸检测中研究最多, 应用最广泛。ZHANG 等^[58]基于 CRISPR/Cas12a 系统, 建立了一种准确、简单、经济、适用于现场检测的可视化 PCR 检测方法, 实验结果表明虾样品中副溶血性弧菌的检出限为 1.02×10^2 拷贝/ μ L。Cas12a 采用多个检查点来确保 DNA 的精确定位与 Cas12a 不加选择的单链核酸降解作用相结合, 使其在体外核酸检测中得到了有效的应用, 多点检查保证了检测方法的特异性, 对体系内 ssDNA 不加选择的降解提高了反应的灵敏度。CRISPR/Cas12a 结合高灵敏信号转导技术的核酸检测传感器的出现摆脱了对核酸进行扩增的步骤, 使核酸检测变得更加简便, 如果核酸提取技术可以进一步简化, 这种检测技术有望用于床旁即时检测。

CRISPR/Cas 系统凭借其操作简单、靶向精准等优点, 在生物学领域的应用潜力备受关注, 但由于 CRISPR/Cas 的反式切割活性, 目前还不能实现多重检测; CRISPR/Cas 的定量检测需要昂贵仪器, 不适用于基层单位和现场使用。

1.3 基于生物芯片的检测方法

基因芯片检测技术, 又称生物芯片技术, 是利用基因序列的检测来识别细菌, 通过微加工技术, 将数以万计的一定序列的 DNA 片段固定在硅片表面, 形成规律性的 DNA 探针序列。刘莹^[59]使用基因芯片法和常规检测法对食源性致病菌的检出率进行比较, 实验结果表明基因芯片技术能高效地检出副溶血性弧菌, 其整体优势基本可以取代传统的常规培养法。徐晓丽等^[60]研究结果表明, 基因芯片法较传统基因测序检测范围更广、检测速度显著提高、且可以实现高通量检测, 有利于更加快速、有效地检测出病原菌。基因芯片能够对不同序列的微生物样品进行检测, 具有重复性好、精准、快速、高效等特点, 在致病性弧菌检测领域有着非常广泛的应用。

表 1 等温扩增技术主要参数比较

Table 1 Comparison of main parameters of isothermal amplification technologies

| 参数 | LAMP | RPA | HCR | SDA | RCA | HDA |
|--------------------|-------------------|-----------|-------|-----------|--------------------------------------|-----------------|
| 是否需要热变性 | 否 | 否 | 否 | 是 | 否 | 否 |
| 反应温度/ $^{\circ}$ C | 60~65 | 37~42 | 室温 | 37~40 | 37 | 60~65 |
| 酶的数量 | 1 | 3 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| 引物数量 | 4~6(靶向 6~8 个序列区域) | 2 | 2 | 2 或 4 | 1(单引物 RCA); 2(双引物 RCA); 多条(随机扩增 RCA) | 2 |
| 产物长度/bp | 约 200 | >200 | 约 200 | <200 | 环状, 约 100 | 80~120 |
| 反应时间/min | 15~60 | 5~60 | 15~60 | 60~120 | 约 240 | 30~120 |
| 产物检测方法 | 电泳/浊度/颜色/荧光 | 电泳/荧光/试纸条 | 电泳/荧光 | 电泳/荧光/试纸条 | 电泳 | 电泳/荧光/ELISA 试纸条 |

1.4 基于核酸适配体的检测方法

核酸适配体是指经过 SELEX (selective expansion of ligands by exponential enrichment) 技术筛选得到的短链 DNA 或 RNA 序列, 其对靶标物质有特殊的识别能力和高度的亲和力, 大小约为 6~40 kDa。单链寡核苷酸可以形成发夹、茎环、假节、凸环、G-四链体等多种结构, 这些复杂的空间结构成为适配体与靶标特定区域结合的结构基础^[61]。研究人员通过 SELEX 方法已经筛选了多种用于病原菌检测的核酸适配体, 如结合 *Vibrio fischeri* ATCC49387^[62-65]。核酸适配体依赖其独特的空间结构和制备技术, 具有高特异性、高稳定性、靶分子广、易于体外合成和修饰等优点, 已广泛用于病原微生物的检测。

1.5 基于肽质量指纹图谱技术的检测方法

肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprinting, PMF)技术是指基于质谱仪器对目的蛋白质进行分析、检测和鉴定的技术, 根据不同离子间质荷比(m/z)的差异来确定相对分子质量。随着质谱软电离技术的发展, 基于基质辅助激光解吸飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)的肽质量指纹谱微生物识别技术应运而生, 该技术在微生物中添加酸性基质辅助细胞裂解, 用激光激发细胞裂解物形成多肽并鉴定^[66]。PMF 检测技术具有灵敏度高、特异性强、时效快等优势, 在微生物检测领域应用广泛。李平等^[67]建立了一种 MALDI-TOF-MS 用于副溶血性弧菌的检测, 对从 5 种贝类样品中收集到的 65 株标准菌株, 利用 MALDI-TOF-MS 做鉴定, 主成分分析做同源性分析, 得到其重复性、灵敏度及特异性。韩笑等^[68]建立了 MALDI-TOF-MS, 通过采集分析 461 株副溶血性弧菌食品分离株的 MALDI-TOF-MS 指纹图谱, 在样品中成功检出副溶血性弧菌。多方研究表明, 该法具有快速、高通量、精确度高、单个检测成本低等优点^[69], 是一种十分具有发展前景的新兴检测方法。

1.6 生物传感器技术

生物传感技术是指被测物质在体内形成一个灵敏的感应器, 将其中的化学信号或光信号转化为电子信号, 由检测器对被测物质进行分析得出含量, 包括光学、电化学、压电生物传感器、适配体传感器等多种类型^[70]。LI 等^[71]

建立起一种恒温视觉传感器法对副溶血弧菌进行快速检测, 30 min 即可完成, 检出限为 1.29×10^3 CFU/mL。WU 等^[72]通过建立一种适配体传感器, 应用于常见的海产品中副溶血弧菌进行检测, 55 min 内即可完成, 且检出限低至 10 CFU/mL。REN 等^[73]建立了一种新型荧光共振能量转移(fluorescent resonance energy transfer, FRET)生物传感器, 对副溶血弧菌进行了检测, 大大提高了检出效率, 检出限低至 10 CFU/mL。YING 等^[74]建立基于杂交链反应和适配体的侧流比色生物传感器, 利用该法从样品中检测副溶血性弧菌, 67 min 之内即可检出, 检出限为 2.6×10^3 CFU/mL。HOU 等^[75]建立基于稀土掺杂 Bi_2WO_6 和 Ag_2S 的新型光电化学适配体传感器, 用于副溶血性弧菌的快速检测, 检出时间为 50 min, 检出限为 40 CFU/mL。DUAN 等^[76]建立基于量子点的 FOF1-ATP 酶适配体传感器, 分别在标虾和鲑鱼中检出副溶血性弧菌, 检出限低至 7 CFU/mL。

生物传感器技术具有快速、高效、准确、易于操作的特点, 同时能够对微量致病菌进行实时、快速的检测, 随着科技发展, 生物传感技术已被广泛应用于食品、医药、环境以及军事等各个领域, 并取得了较好效果。不同生物传感器技术主要参数比较见表 2。

2 结束语

随着科技的不断进步, 致病性弧菌的检测技术已经不再局限于相对成熟的方法, 例如传统检测法、免疫学方法、分子生物学法, 基于核酸恒温扩增或信号放大的检测方法等新兴检测技术, 为创新性地对致病性弧菌进行检测提供了可能。

本文通过综述致病性弧菌的检测新技术, 分析了各种技术的特点及优势。如何将这些新兴技术与现有技术相结合, 克服单项技术的局限性^[77], 为进一步开发新的致病性弧菌检测技术、改良检测试剂及创新检测方法奠定基础, 在确保灵敏度、精准度和稳定性的同时, 实现更低成本、更快速度、更高检测通量、操作简易化乃至全自动化是未来检测技术的重要发展方向。随着生物、计算机和统计学等技术在食品行业的应用, 有关食品安全的科研工作也会越来越深入, 同时随着人们对致病性弧菌的深入了解, 依据微生物特点研发的各种检测仪器设备, 将会在医药学、食品行业等病原微生物检测领域广泛运用, 为人类健康发展保驾护航。

表 2 生物传感器技术主要参数比较
Table 2 Comparison of main parameters of biosensor technology

| 传感器类型 | 恒温视觉传感器 | 适配体传感器 | FRET 生物传感器 | 侧流比色生物传感器 | 光电化学适配体传感器 | FOF1-ATP 酶适配体传感器 |
|-------|---------------------------|-----------|--------------|--------------------------|------------|------------------|
| 检测周期 | 30 min | 55 min | / | 67 min | 50 min | / |
| 灵敏度 | 1.29×10^3 CFU/mL | 10 CFU/mL | 0.067 nmol/L | 2.6×10^3 CFU/mL | 40 CFU/mL | 7 CFU/mL |

注: /代表未提及。

参考文献

- [1] BLENGINI CS, SCHINDLER K. Immunofluorescence technique to detect subcellular structures critical to oocyte maturation [J]. *Method Mol Biol*, 2018, 1818: 67–76.
- [2] ODELL ID, COOK D. Immunofluorescence techniques [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(1): e4.
- [3] 樊景凤, 李光, 王斌, 等. 间接免疫荧光抗体技术检测凡纳滨对虾红体病病原—副溶血弧菌[J]. *海洋环境科学*, 2007, (6): 501–503.
FAN JF, LI G, WANG B, *et al.* Indirect immunofluorescence antibody technology for detecting the pathogen of red body disease in *litopenaeus vannamei*-*Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Mar Environ Res*, 2007, (6): 501–503.
- [4] AIEX SA, CHANFRASEKARN N, MUKHERJEE A. Gold nanorod-based fluorometric ELISA for the sensitive detection of a cancer biomarker [J]. *New J Chem*, 2018, 42(19): 15852–15859.
- [5] DONG BL, HI HF, SUN JF, *et al.* Development of a fluorescence immunoassay for highly sensitive detection of amantadine using the nano assembly of carbon dots and MnO₂ nanosheets as the signal probe [J]. *Sen Actuators B-chem*, 2019, 286: 214–221.
- [6] 职通瑞, 宋晓玲, 张晓静, 等. 多抗间接 ELISA 方法的建立及其在海洋细菌快速检测中的应用[J]. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 71–76.
ZHI TR, SONG XL, ZHANG XJ, *et al.* Establishment of polyclonal antibody indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the application in the rapid detection of marine bacteria [J]. *Progress Fish Sci*, 2015, 36(2): 71–76.
- [7] 范莉. 酶联免疫吸附法在食品检验中的实践应用研究[J]. *食品安全导刊*, 2021, (27): 135–136.
FAN L. Research on the practical application of enzyme-linked immunosorbent assay in food inspection [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2021, (27): 135–136.
- [8] 于露, 孙秀兰. 免疫磁珠技术研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2011, 10: 17–19.
YU L, SUN XL. Research progress of immunomagnetic beads technology [J]. *Cere Oils*, 2011, 10: 17–19.
- [9] 黄艳梅, 刘道峰, 赖卫华, 等. 集成免疫磁珠富集和免疫层析的黄曲霉毒素 M₁ 快速检测法[J]. *分析化学*, 2014, 42(5): 654–659.
HUANG YM, LIU DF, LAI WH, *et al.* A rapid detection method for aflatoxin M₁ by integrating immunomagnetic bead enrichment and immunochromatography [J]. *Anal Chem*, 2014, 42(5): 654–659.
- [10] ZHAO LC, LV XR, CAO X, *et al.* Improved quantitative detection of VBNC *Vibrio parahaemolyticus* using immunomagnetic separation and PMA-qPCR [J]. *Food Control*, 2020, 110: 106962.
- [11] 李永勤. 以膜为固相载体的免疫胶体金快速试验[J]. *微生物学免疫学进展*, 2003, (1): 74–78.
LI YQ. Immunocolloidal gold rapid test using membranes as solid phase carriers [J]. *Progress Microbiol Immunol*, 2003, 3(1): 74–78.
- [12] 吴美娇, 吴有雪, 刘程, 等. 基于组合胶体金纳米颗粒的免疫层析试纸条快速可视化检测海产品中副溶血性弧菌[J]. *工业微生物*, 2021, 51(2): 1–9.
WU MJ, WU YX, LIU C, *et al.* Rapid visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood by immunochromatographic strip based on composited colloidal gold nanoparticles [J]. *Ind Microorg*, 2021, 51(2): 1–9.
- [13] SAKATA J, YONEKITA T, KAWATSU K. Development of a rapid immunochromatographic assay to detect contamination of raw oysters with enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2018, 264: 16–24.
- [14] ERLICH HA. Polymerase chain reaction [J]. *J Clin Immunol*, 1989, 9(6): 437–447.
- [15] SCHOCHE TMANG, OU CY, JONES WK. Polymerase chain reaction [J]. *J Infect Dis*, 1988, 158(6): 1154–1157.
- [16] GUDNASON H, DUFVA M, BANG DD, *et al.* Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: Effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature [J]. *Nucl Acids Res*, 2007, 35(19): e127.
- [17] 张惟材. 生物实验室系列实时荧光定量 PCR[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013.
ZHANG WC. Real-time quantitative PCR [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2013.
- [18] TAN W, WANG K, DRAKE TJ. Molecular beacons [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8(5): 547–553.
- [19] FOONGLADDA S, PHOLWAT S, EAMPOKALAP B, *et al.* Multi-probe real-time PCR identification of common mycobacterium species in blood culture broth [J]. *J Mol Diagn*, 2009, 11(1): 42–48.
- [20] 杨丽霞, 曾思思, 钟菲菲. 实时荧光等温扩增法检测 4 种常见食源性致病菌[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(14): 4692–4697.
YANG LX, ZENG SS, ZHONG FF. Detection of 4 kinds of food-borne pathogenic bacteria by real-time loop-mediated isothermal amplification method [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(14): 4692–4697.
- [21] YUAN N, YANG HY, ZHANG YZ, *et al.* Development of real-time fluorescence saltatory rolling circle amplification for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2022, 57(1): 610–618.
- [22] LING N, SHEN JL, GUO JJ, *et al.* Rapid and accurate detection of viable *Vibrio parahaemolyticus* by sodium deoxycholate-propidium monoazide-qPCR in shrimp [J]. *Food Control*, 2020, 109: 106883.
- [23] 卢鑫, 王立娟, 郭威, 等. 食品中志贺氏菌检测技术研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(1): 410–416.
LU X, WANG LJ, GUO W, *et al.* Research progress of *Shigella* detection technology in food [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(1): 410–416.
- [24] HINDSON BJ, NESS KD, MASQUELIER DA, *et al.* High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(22): 8604–8610.
- [25] 方佩佩, 赵丽青, 马云, 等. 副溶血性弧菌微滴数字 PCR 定量方法的建立[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(19): 252–257.
FANG PP, ZHAO LQ, MA Y, *et al.* Establishment of digital PCR assay for detection of *Vibrio parahemolyticus* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(19): 252–257.
- [26] LEI SW, GU XK, ZHONG QP, *et al.* Absolute quantification of *Vibrio parahaemolyticus* by multiplex droplet digital PCR for simultaneous detection of *tlh*, *tdh* and *ureR* based on single intact cell [J]. *Food Control*, 2020, 114: 107207.
- [27] CANGELOSI GA, MESCHKE JS. Dead or alive: Molecular assessment of microbial viability [J]. *Appl Environ Microb*, 2014, 80(19): 5884–5891.
- [28] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, *et al.* Loop-mediated isothermal

- amplification (LAMP) principle, features, and future prospects [J]. *J Microbiol*, 2015, 53(1): 1–5.
- [29] LEE JE, MUN H, KIM SR, *et al.* A colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on HRP-mimicking molecular beacon for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 151: 111968.
- [30] CAO X, ZHAO L, ZHANG J, *et al.* Detection of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp samples using improved real-time PCR and real-time LAMP methods [J]. *Food Control*, 2019, 103: 145–152.
- [31] KAMPEERA J, PASAKON P, KARUWAN C, *et al.* Point-of-care rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood using loop-mediated isothermal amplification and graphene-based screen-printed electrochemical sensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 132: 271–278.
- [32] DAHER RK, STEWART G, BOISSINOT M, *et al.* Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. *Clin Chem*, 2016, 62(7): 947–958.
- [33] MAFFERT P, REVERCHON S, NASSER W, *et al.* New nucleic acid testing devices to diagnose infectious diseases in resource-limited settings [J]. *Eur J Clin Microbiol*, 2017, 36(10): 1717–1731.
- [34] 景志刚, 董浩, 狄栋栋, 等. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(6): 47–53.
- JING ZG, DONG H, DI DD, *et al.* Research progress on recombinase polymerase amplification [J]. *Biotechnol Bull*, 2016, 32(6): 47–53.
- [35] 高威芳, 朱鹏, 黄海龙. 重组酶聚合酶扩增技术: 一种新的核酸扩增策略[J]. *中国生物化学分子生物学报*, 2016, 32(6): 627–634.
- GAO WF, ZHU P, HUANG HL. Recombinase polymerase amplification: a new DNA/RNA amplification strategy [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2016, 32(6): 627–634.
- [36] EULER M, WANG Y, HEIDENREICH D, *et al.* Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of biothreat agents [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(4): 1110–1117.
- [37] 孙魁. 基于 LFD-RPA 的核酸可视化检测技术的建立及应用[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
- SUN K. Establishment and application of nucleic acid visualization detection technology based on LFD-RPA [D]. Beijing: Chinese People's Liberation Army Academy of Military Medical Sciences, 2017.
- [38] 王晓勋, 徐嘉良. 重组酶聚合酶扩增技术及其在食品安全领域的应用[J]. *食品科技*, 2018, (6): 1–7.
- WANG XX, XU JL. Recombinase polymerase amplification technology and its application in the field of food safety detection [J]. *Food Sci Technol*, 2018, (6): 1–7.
- [39] 刘静. RPA 技术与微滴数字 PCR 在转基因玉米与大豆检测中的应用[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- LIU J. Application of RPA technology and microdroplet digital PCR in the detection of transgenic maize and soybean [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.
- [40] SCHULER F, SCHWEMMER F, TROTTER M, *et al.* Centrifugal step emulsification applied for absolute quantification of nucleic acids by digital droplet RPA [J]. *Lab Chip*, 2015, 15(13): 2759–2766.
- [41] CAO Y, ZHENG K, JIANG J, *et al.* A novel method to detect meat adulteration by recombinase polymerase amplification and SYBR green I [J]. *Food Chem*, 2018, 266: 73–78.
- [42] 占利, 徐昌平, 张云怡, 等. 副溶血性弧菌实时重组酶聚合酶扩增检测技术研究[J]. *预防医学*, 2019, 31(7): 653–657.
- ZHAN L, XU CP, ZHANG YX, *et al.* Real-time recombinase polymerase amplification for detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *China Preve Med J*, 2019, 31(7): 653–657.
- [43] 陈佳平, 兰全学. 荧光型重组酶聚合酶扩增技术检测食品中大肠埃希氏菌 O157[J]. *食品科技*, 2020, 45(3): 326–332.
- CHEN JP, LAN QX. Detection of *Escherichia coli* O157 in food by fluorescent recombinase polymerase amplification technology [J]. *Food Sci Technol*, 2020, 45(3): 326–332.
- [44] 张闪闪, 何斌, 李书光, 等. 可视化 RPA-LFD 技术快速检测猪链球菌[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(2): 538–547.
- ZHANG SS, HE B, LI SG, *et al.* Rapid detection of streptococcus suis with visual RPA-LFD technology [J]. *Acta Vet Zootechn Sin*, 2022, 53(2): 538–547.
- [45] DAI T, YANG X, HU T, *et al.* Comparative evaluation of a novel recombinase polymerase amplification-lateral flow dipstick (RPA-LFD) assay, LAMP, conventional PCR, and leaf-disc baiting methods for detection of *Phytophthora sojae* [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1884.
- [46] 杜亚楠, 赵笑, 范小瑞, 等. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展及其应用[J]. *上海农业学报*, 2018, 34(6): 117–122.
- DU YN, ZHAO X, FAN XR, *et al.* Advances and application of recombinase polymerase amplification [J]. *Acta Agric Shanghai*, 2018, 34(6): 117–122.
- [47] 张俊, 曾照芳. 滚环扩增技术的原理及其应用的研究[J]. *生物信息学*, 2012, 10(1): 12–14.
- ZHANG J, ZENG ZF. Principle of rolling circle amplification and its discussion in application [J]. *Chin J Bioin*, 2012, 10(1): 12–14.
- [48] 董晶, 徐慧, 郭威, 等. 实时荧光跨越式滚环等温扩增结合 PMA 检测虾产品中的活副溶血性弧菌[J]. *食品科学*, 2021, 42(24): 289–295.
- DONG J, XU H, GUO W, *et al.* Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in edible crustaceans by real-time fluorescence saltatory rolling circle amplification combined with propidium monoazide [J]. *Food Sci*, 2021, 42(24): 289–295.
- [49] CAO X, ZHAO LC, ZHANG JF, *et al.* Detection of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp samples using improved real-time PCR and real-time LAMP methods [J]. *Food Control*, 2019, 103: 145–152.
- [50] ZHANG BY, SUN WH, RAN LL, *et al.* Anti-interference detection of *Vibrio parahaemolyticus* from aquatic food based on target-cyclized RCA with dynamic adapter followed by LAMP [J]. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(3): 352.
- [51] VINCENT M, XU Y, KONG H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification [J]. *EMBO Rep*, 2004, 5(8): 795–800.
- [52] DEVEAU H, GARNEAU JE, MOINEAU S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2010, 64: 475–493.
- [53] MARRAFFINI LA, SONTHEIMER EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(3): 181–190.
- [54] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, KELLNER MJ, *et al.* Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439–444.
- [55] LI SY, CHENG QX, WANG JM, *et al.* CRISPR-Cas12a-assisted nucleic

- acid detection [J]. Cell Discov, 2018, 4: 20.
- [56] LI L, LI S, WU N, *et al.* HOLMESv2: A CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation [J]. ACS Synth Biol, 2019, 8(10): 2228–2237.
- [57] WANG B, WANG R, WANG D, *et al.* Cas12aVDet: A CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection [J]. Anal Chem, 2019, 91(19): 12156–12161.
- [58] ZHANG MY, LIU CZ, SHI Y, *et al.* Selective endpoint visualized detection of *Vibrio parahaemolyticus* with CRISPR/Cas12a assisted PCR using thermal cycler for on-site application [J]. Talanta, 2020, 214: 120818.
- [59] 刘莹. 基因芯片法与常规检测法在食源性疾病中的应用对比分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(19): 6478–6482.
LIU Y. Comparative analysis of the application of gene chip method and conventional detection method in foodborne diseases [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(19): 6478–6482.
- [60] 徐晓丽, 林娟, 鄢仁祥. 基因芯片与高通量测序技术的原理与应用的比较[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(11): 1166–1174.
XU XL, LIN J, YAN RX. Comparison of principle and application of the gene chip and high-throughput sequencing technologies [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2018, 34(11): 1166–1174.
- [61] YANG S, LI H, XU L, *et al.* Oligonucleotide aptamer-mediated precision therapy of hematological malignancies [J]. Mol Ther-Nucl Acids, 2018, 13: 164–175.
- [62] ZOU Y, DUAN N, WU S, *et al.* Selection, identification, and binding mechanism studies of an ssDNA aptamer targeted to different stages of *E. coli* O157:H7 [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(22): 5677–5682.
- [63] SHIN WR, SEKHON SS, KIM SG, *et al.* Aptamer-based pathogen monitoring for *Salmonella enterica* ser. Typhimurium [J]. J Biomed Nanotechnol, 2018, 14(11): 1992–2002.
- [64] SHIN WR, SEKHON SS, RHEE SK, *et al.* Aptamer-based paper strip sensor for detecting *Vibrio fischeri* [J]. ACS Comb Sci, 2018, 20(5): 261–268.
- [65] SHAHDORDIZADEH M, TAGHDISI SM, ANSARI N, *et al.* Aptamer based biosensors for detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Sen Actuators B-Chem, 2017, 241: 619–635.
- [66] BIZZINI A, GREUB G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification [J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(11): 1614–1619.
- [67] 李平, 黄涵, 钟汶兵. MALDI-TOF MS 用于副溶血性弧菌检测初探[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(1): 69–72, 77.
LI P, HUANG H, ZHONG WB. Preliminary study on the use of MALDI-TOF MS to detect *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J Pathogen Biol, 2019, 14(1): 69–72, 77.
- [68] 韩笑, 刘莉, 王紫薇, 等. 副溶血性弧菌 MALDI-TOF-MS 检测方法的建立与应用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(1): 237–245.
HAN X, LIU L, WANG ZW, *et al.* Establish and apply of detection of *Vibrio parahaemolyticus* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2020, 20(1): 237–245.
- [69] SCHIRMEISTER F, DIECKMANN R, BECHLARS S, *et al.* Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients [J]. Eur J Clin Microbiol, 2014, 33(5): 767–778.
- [70] 张静. 基于抗菌肽的生物传感器在食源性致病菌检测中的应用[J]. 化学通报, 2021, 84(12): 1300–1305.
ZHANG J. Application of antimicrobial peptides-based biosensor methods in detection of foodborne pathogens [J]. Chemistry, 2021, 84(12): 1300–1305.
- [71] LI XT, SU Y, CHU HS, *et al.* Rapid strand replacement primer thermostat visual sensor based on *Bst* DNA polymerase and pyrophosphatase for detecting *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Food Chem, 2020, 310: 125955.
- [72] WU W, ZHOU M, HE H, *et al.* A sensitive aptasensor for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Sen Actuators B-Chem, 2018, 272: 550–558.
- [73] REN DX, SUN CJ, HUANG ZJ, *et al.* A novel FRET biosensor based on four-way branch migration HCR for *Vibrio parahaemolyticus* detection [J]. Sen Actuators B-Chem, 2019, 296: 126577.
- [74] YING N, WANG Y, SONG XF, *et al.* Lateral flow colorimetric biosensor for detection of *Vibrio parahaemolyticus* based on hybridization chain reaction and aptamer [J]. Microchim Acta, 2021, 188(11): 381.
- [75] HOU YX, ZHU LL, HAO HS, *et al.* A novel photoelectrochemical aptamer sensor based on rare-earth doped Bi₂WO₆ and Ag₂S for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microchem J, 2021, 165: 106132.
- [76] DUAN N, WU SJ, WANG J, *et al.* Quantum dot-based F0F1-ATPase aptasensor for *Vibrio parahaemolyticus* detection [J]. Food Anal Method, 2019, 12(8): 1849–1857.
- [77] 胡玲, 张顺, 崔燕, 等. 人体常见致病性弧菌检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(16): 6439–6447.
HU L, ZHANG S, CUI Y, *et al.* Advance on research for detecting technology of common pathogenic *Vibrio* in human [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(16): 6439–6447.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



王殿夫, 硕士, 高级实验师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 2361756@163.com



田 卓, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。
E-mail: tianzhuo1113@163.com