

研究报告

环介导等温扩增技术快速检测施罗氏弧菌(*Vibrio shilonii*)杨艺滢^{1,2,4} 陈偿^{1,2,3*} 罗鹏^{1,2} 丁雄祺^{1,2,4} 谢媚^{1,2,4}

(1. 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东 广州 510301)

(2. 中国科学院南海海洋研究所 广东省应用海洋生物学重点实验室 广东 广州 510301)

(3. 中国科学院南海海洋研究所 西沙、南沙深海海洋环境观测研究站 广东 广州 510301)

(4. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要:【背景】近年来,珊瑚白化事件频有发生,面临着严重衰退。由气候变化引起的珊瑚病原菌快速增殖是导致珊瑚白化的主要因素之一。施罗氏弧菌是枇杷珊瑚的致病菌,能侵入珊瑚虫体内而使珊瑚白化死亡。【目的】优化并建立一种钙黄绿素显色法快速检测珊瑚致病菌施罗氏弧菌的环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测技术。【方法】以枇杷珊瑚致病菌施罗氏弧菌为研究对象,针对施罗氏弧菌的 *rpoD* (RNA polymerase subunit D)基因设计 6 条特异性扩增引物,建立 LAMP 检测体系并检测其特异性和灵敏度,同时对 LAMP 法、常规 PCR 和荧光定量 PCR 3 种检测方法进行比较分析。【结果】供检测的 10 个样品菌株中,施罗氏弧菌反应结果为阳性,呈亮绿色,其他 9 株包括阴性对照(灭菌水为模板)反应结果为阴性,呈浅橙黄色;同时,所建立的钙黄绿素-LAMP 方法最低检测限度为 3.641×10^3 cps/mL,具有与荧光定量 PCR 等同的灵敏度和准确性,是常规 PCR 最低检测限度的 0.1%;此外,通过模拟野外海水样品检测发现,钙黄绿素-LAMP 方法对海水样品中施罗氏弧菌的检测限度可达 1.3×10^2 CFU/mL。【结论】建立的钙黄绿素-LAMP 检测技术具有很好的特异性、灵敏度和准确性,其操作简单、方便,无需昂贵仪器,适用于野外现场珊瑚致病菌施罗氏弧菌的快速检测。

关键词: 枇杷珊瑚, 施罗氏弧菌, 环介导等温扩增

Foundation item: Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA13020302)

***Corresponding author:** Tel: 86-20-89235772; E-mail: chen.chang@scsio.ac.cn

Received: November 26, 2017; **Accepted:** March 21, 2018; **Published online** (www.cnki.net): March 22, 2018

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(A类)资助(XDA13020302)

***通信作者:** Tel: 86-20-89235772; E-mail: chen.chang@scsio.ac.cn

收稿日期: 2017-11-26; **接受日期:** 2018-03-21; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-03-22

Detection of *Vibrio shilonii* by using Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

YANG Yi-Ying^{1,2,4} CHEN Chang^{1,2,3*} LUO Peng^{1,2} DING Xiong-Qi^{1,2,4} XIE Mei^{1,2,4}

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

(3. Xisha/Nansha Ocean Observation and Research Station, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

(4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Background] Coral bleaching events occur frequently which causes the coral reef undergoing severe degeneration in recent years. Disease caused by pathogens is one of the reasons for coral bleaching. *Vibrio shilonii* was identified to be a pathogen that is able to infect the coral *Oculina patagonica* and cause its bleaching. However, its epidemiology remains largely unknown due to the lack of a rapid diagnostic tool. [Objective] To establish a rapid and simple method for detection of *V. shilonii* using Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique. [Methods] A set of 6 specific primers based on the target of *rpoD* sequence was designed for LAMP amplification. The sensitivity and specification of the primers were tested and conditions for LAMP amplification were optimized. The products of LAMP were visualized with fluorescent reagent of calcein and agarose gel electrophoresis respectively. The limitation of the method was compared with conventional PCR and Real-time PCR. [Results] The result showed that this method can specifically detect *V. shilonii* without showing cross-reaction with closely related vibrio species or other bacteria. The detection limit is visualized with calcein was 3.641×10^3 cps/mL of the plasmids carrying *rpoD*, which was 1 000 times more sensitive than conventional PCR and similar to that of Real-time PCR method; Meanwhile, this method was shown to be able to directly detect the pathogen in the seawater with a minimum concentration of 1.3×10^2 CFU/mL. [Conclusion] Overall, this study revealed that the method we developed has high specificity and sensitivity for diagnosis of *V. shilonii*. It is more sensitive and more convenient than the conventional PCR or real-time PCR. Therefore, it has the potential to be used for diagnosis in the field.

Keywords: *Oculina patagonica*, *Vibrio shilonii*, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

珊瑚礁是一个复杂的生境，其生态系统是海洋中生产力水平极高的生态系统之一，具有极其重要的生态功能^[1]，有“海洋中的热带雨林”之称^[2]。但近年来全球范围内的珊瑚礁生态系统正在遭受严重威胁与破坏，最直观的表现就是珊瑚白化。珊瑚白化是由于珊瑚虫及其体内共生的虫黄藻所组成的共生体系崩溃而导致珊瑚变白的生态现象^[3-4]。珊瑚礁白化日益严重，甚至没有停止的迹象^[5]。

前人的研究报道指出大规模的珊瑚漂白事件与全球变化密切相关^[6]，如气候变化导致的海水温度升高和海洋酸化；而海水污染日益严重，淤泥颗

粒淤积过多、过度捕捞、天敌长棘海星的暴发和暴风雨等多种因素也可导致珊瑚白化^[7]。另外，由细菌引起的珊瑚疾病暴发也时有发生^[8]，如溶珊瑚弧菌(*Vibrio coralliilyticus*)在海水温度较高的情况下，可使紫色柳珊瑚^[9-10]和鹿角珊瑚^[3-4]产生白化和死亡；污水中常见的一种人类机会致病菌粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)可导致鹿角珊瑚患白斑病^[11-13]。本研究的目标施罗氏弧菌(*Vibrio shilonii* ATCC BAA-91)是一种珊瑚细胞病原菌，它能侵入枇杷珊瑚细胞内部感染共生虫黄藻，导致枇杷珊瑚白化^[14-16]。施罗氏弧菌与地中海弧菌(*Vibrio*

mediterranei)同物异名,但地中海弧菌是否可以导致珊瑚白化还尚未得知^[17]。

施罗氏弧菌的发病机制在过去的 10 年间被广泛研究^[18],Toren 和 Banin 等很好地阐明了施罗氏弧菌对枇杷珊瑚的致病机理,施罗氏弧菌粘附到珊瑚表面后渗透到珊瑚虫体内,其为了在珊瑚细胞内生存而产生的超氧化物歧化酶可保护自身免受氧化应激的伤害,最后产生光合作用抑制肽 Toxin P 抑制虫黄藻的光合作用,使珊瑚逐渐白化^[19-20]。2006 年,Reshef 等根据施罗氏弧菌-枇杷珊瑚白化模式系统的研究提出珊瑚益生菌假说,其研究表明,珊瑚确实可通过改变自身的共生菌群以迅速适应环境的变化,最终能产生抵抗珊瑚致病菌的抵抗力^[21]。但在实验室感染实验中,施罗氏弧菌能在珊瑚组织中繁殖及保留至少 2 周^[16]。然而,施罗氏弧菌感染的宿主范围、流行病学和诊断技术的研究十分有限,因此,建立一种特异性好、灵敏度高且高效的检测方法迫在眉睫。

环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification,LAMP)检测技术是由日本学者 Tomita 等发明的,是在 PCR 的基础上建立起来的一种新型核酸扩增技术^[22]。自 LAMP 技术发明以来就被广泛应用于各种人畜致病菌^[23-27]、寄生虫病^[28-29]和流感病毒^[30]的快速检测。在此基础上,LAMP 还被不同的研究者针对各自的研究需要进行了不同程度的改造,如 Ge 等^[31]研发了一种以纳米粒子作为传感器进行级联入侵的耦合多重反转录的新型 LAMP 检测方法,可用于流感病毒 3 种亚型的同时检测。通过在 NCBI 数据库中对不同种的施罗氏弧菌以及其他弧菌属的 *rpoD* 基因进行比对分析后,本研究基于施罗氏弧菌管家基因 *rpoD* (RNA polymerase subunit D)的种内高度保守性和种间高度特异性,建立环介导等温扩增快速检测技术,从而为野外现场快速检测以及预防珊瑚白化提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

施罗氏弧菌(*Vibrio shilonii* ATCC BAA-91)购自美国菌种保藏中心,溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus* XSBZ-14)^[32]由海南大学海洋学院谢珍玉老师惠赠,大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司。副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* TF2)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus* TF3)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae* HN375)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[33]由本实验室提供。欧文氏弧菌(*Vibrio owensii* DY05)、弗尼斯弧菌(*Vibrio furnissii*)、坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*)、嗜气芽孢杆菌(*Bacillus aerophilus*)分离自南海健康滨珊瑚的粘液,并已进行 16S rRNA 基因菌种鉴定以及各项生理生化指标检测,现由本实验室保存。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

2216E (Marine Broth)液体培养基, BD 公司。TCBS 琼脂培养基、LB 液体培养基、TSB (Tryptic Soy Broth)液体培养基,广东环凯微生物技术有限公司。

pClone007 Simple Vector Kit,广州擎科新业生物技术有限公司; Premix Taq、PrimeSTAR Max Premix (2 \times)、DL2000 DNA Marker, 6 \times Loading Buffer, TaKaRa 公司; 氨苄青霉素,广州康龙生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒,康宁公司; *Bst* 2.0 DNA 聚合酶, New England BioLabs 公司; Calcein、10 \times dNTP Mix, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

梯度 PCR 仪,广州誉维生物科技仪器有限公司; 恒温金属水浴锅,杭州博日科技有限公司; 离心机, Thermo Fisher Scientific 有限公司; 可调式混匀仪, SCILOGES 公司; 电泳仪, Hoefer 公司; 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; Thermal Cycle Dice Real Time System III, TaKaRa 公司; 落地普通型大容量全温度恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取

分别将单克隆的 *Vibrio shilonii* ATCC BAA-91、*Vibrio alginolyticus* XSBZ-14、*Vibrio parahaemolyticus* TF2、*Vibrio vulnificus* TF3、*Vibrio cholerae* HN375、*Vibrio owensii* DY05、*Vibrio furnissii*、*Vibrio campbellii*、*Staphylococcus aureus*、*Bacillus aerophilus* 接种至 2216E 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养过夜。采用煮沸法, 取 500 μ L 菌液 12 000 \times g 离心 2 min, 去上清, 加入 100 μ L 灭菌的去离子水重悬, 100 °C 金属浴 10 min 后, 置于冰上 2 min, 12 000 \times g 离心 2 min, 上清液作为扩增模板, -20 °C 保存备用。

1.2.2 LAMP 特异性引物设计与合成

根据 GenBank 中公布的 *Vibrio mediterranei* CECT7873^[17] 的 *rpoD* 基因序列 (登录号为 HF542090.1), 在 NCBI 上进行 BLASTn 比对分析后, 基于 *rpoD* 基因的特异性区域, 利用软件 Primer Designer 设计 6 条特异性引物, 分别为外引物 F3/B3、内引物 FIP/BIP 和环引物 LoopF/LoopB, 见表 1 和图 1, 引物交由广州擎科新业生物技术有限公司合成。

1.2.3 LAMP 检测体系的建立

扩增反应体系参考庞耀珊等的方法^[34]并进行一

定优化: 25 μ L 反应体系: 10 \times Isothermal Amplification Buffer 2.5 μ L, 8 U/ μ L *Bst* DNA polymerase 1 μ L, 100 mmol/L MgSO₄ 1.5 μ L, 10 mmol/L dNTP Mix 3.5 μ L, 40 μ mol/L FIP/BIP 1 μ L, 10 μ mol/L F3/B3 0.5 μ L, 10 μ mol/L LoopF/LoopB 1 μ L, 10 mmol/L MnCl₂ 1.25 μ L, 10 mmol/L 甜菜碱 4 μ L, 1 mmol/L 钙黄绿素 2 μ L, 待检测菌株 DNA 2 μ L (阴性对照以 2 μ L 灭菌水替代), 灭菌水补充至 25 μ L。反应条件为: 65 °C 金属浴反应 60 min, 80 °C 灭活 10 min。反应结束后, 直接观察反应结果颜色的变化, 或者用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 30 min, 电压 135 V, 检测扩增结果。

表 1 特异性检测引物

Table 1 Primers used for LAMP in the study

引物名称 Primers	引物序列 Sequences (5'→3')
F3	AGACGAAGACGACGAAGA
B3	CTTCACTTGACTCATTACCAGT
FIP*	GGCTGTCGTAACCATATTCGTTGATGAGG AAGAGGAAGAAGATACA
BIP*	CACATGAGTTGGTCCAAGAAGTCTCGCAT GATCAGACGCTC
LoopF	ACCAGTTGAAGGTCTTGATAGC
LoopB	CGCACTTCTATGGATCGTGTA

注: *: FIP 与 BIP 分别由 F1c 和 F2、B1c 和 B2 组成。

Note: *: FIP and BIP consist of F1c and F2, B1c and B2 respectively.

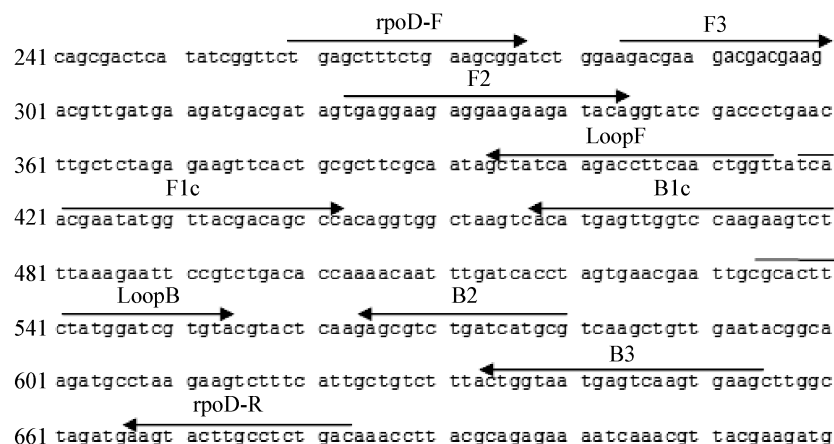


图 1 各引物的序列顺序及其在基因序列中的对应位置

Figure 1 Sequence of primers and the binding regions of primers

1.2.4 LAMP 特异性检测

Vibrio shilonii ATCC BAA-91、*Vibrio alginolyticus* XSBZ-14、*Vibrio parahaemolyticus* TF2、*Vibrio vulnificus* TF3、*Vibrio cholerae* HN375、*Vibrio owensii* DY05、*Vibrio furnissii*、*Vibrio campbellii*、*Staphylococcus aureus*、*Bacillus aerophilus* 共 10 株菌用于验证 1.2.3 中建立的 LAMP 检测方法针对 *Vibrio shilonii* 的特异性, 基于以上 10 株细菌的基因组进行 LAMP 检测, 反应体系和反应条件同 1.2.3。

1.2.5 LAMP 灵敏度检测

根据 GenBank 中公布的 *Vibrio mediterranei* 的 *rpoD* 基因序列(登录号为 HF542090.1), 利用 Primer Primer 5 软件设计特异性引物对 *rpoD*-F/*rpoD*-R, 利用 Primer Express 3.0.1 设计荧光定量 PCR 引物对 *QrpoD1*-F/*QrpoD1*-R (表 2), 引物交由广州擎科新业生物技术有限公司合成。

以施罗氏弧菌 DNA 为模板, 基于表 2 中设计的引物对 *rpoD*-F/*rpoD*-R PCR 扩增一段大小为 425 bp 的序列, 此序列包含 LAMP 检测方法的靶序列。PCR 反应条件: 95.0 °C 5 min; 95 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

用 DNA 纯化回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行纯化得到目的片段, 将其克隆到 pClone007 Simple Vector 中, 构建重组质粒 pClone007-*rpoD*, 然后转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 于添加 100 mg/mL 氨苄青霉素抗性的 LB 平板上挑取克隆, 再利用引物对 M13F/M13R 通过菌液 PCR 检测含有目的片段的重组子, 测序验证。

表 2 重组质粒构建和荧光定量 PCR 引物

Table 2 Primers used to construct recombinant plasmid and real-time PCR in the study

引物名称 Primers	引物序列 Sequences (5'→3')
<i>rpoD</i> -F	CTGAGCTTCTGAAGCGGA
<i>rpoD</i> -R	GTCAGAGGCAAGTACTTC
M13F	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC
<i>QrpoD1</i> -F	TCGACCCTGAAGTCTGCTCTAGAG
<i>QrpoD1</i> -R	ACCTGTGGGCTGTCGTAACC

将测序结果正确的重组子放大培养, 用质粒提取试剂盒提取质粒 pClone007-*rpoD*, 浓度为 90 ng/ μ L。根据公式^[35]计算质粒的拷贝数为 3.641×10^{13} cps/mL。将 pClone007-*rpoD* 重组质粒用灭菌水进行梯度稀释得到不同浓度的质粒作为扩增模板, 浓度分别为 10^{12} – 10^1 cps/mL, 阴性对照添加无菌水替代质粒。分别用常规 PCR、LAMP 和荧光定量 PCR 法, 利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定检测常规 PCR 和 LAMP 扩增结果, 并比较 3 种方法的灵敏度。

1.2.6 海水样品检测

采集珊瑚养殖缸中的人工海水 50 mL。将施罗氏弧菌 BAA-91 接种至 TSB 液体培养基中培养过夜, 再用所采集的人工海水对施罗氏弧菌 BAA-91 进行不同浓度的稀释: (1) 将稀释后的各稀释液取 100 μ L 分别涂布于 TCBS 平板上进行菌落计数; (2) 同时取 1 mL 各稀释液直接用水煮法提取 DNA, 再取 2 μ L DNA 作为 LAMP 扩增模板, 每个稀释浓度做 3 个平行。在反应结束后, 观察反应产物的颜色变化, 并利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。

1.2.7 LAMP 扩增结果检测

LAMP 扩增结果可视化采用钙黄绿素显色法, 通过肉眼观察反应产物的颜色变化, 阳性反应产物呈亮绿色, 而阴性对照则为浅橙黄色。此外, 反应产物还可用凝胶电泳检测扩增结果, 阳性反应其产物电泳结果呈梯状条带, 反之则无条带。

2 结果与分析

2.1 LAMP 检测方法的建立及其特异性检测

LAMP 扩增反应结束后, 钙黄绿素荧光显色法检测结果显示, 11 个扩增反应中, 只有 *Vibrio shilonii* 的基因组 DNA 呈现亮绿色, 判断为阳性, 其他 10 个对照样品, 分别为 *Vibrio alginolyticus* XSBZ-14、*Vibrio parahaemolyticus* TF2、*Vibrio vulnificus* TF3、*Vibrio cholerae* HN375、*Vibrio campbellii*、*Vibrio owensii* DY05、*Vibrio furnissii*、*Bacillus aerophilus*、*Staphylococcus aureus* 以及阴性

对照(添加无菌水),扩增前后均无颜色变化,呈浅橙黄色,判断为阴性(图 2A)。凝胶电泳检测结果显示,11 个扩增反应中,只有 *Vibrio shilonii* 的基因组 DNA 呈现 LAMP 特异性梯状条带,而其他 9 种细菌和阴性对照均未见 LAMP 特异性梯状条带(图 2B)。实验结果表明,基于 *rpoD* 基因建立的 LAMP 检测方法对 *Vibrio shilonii* 具有较高的特异性。

2.2 LAMP 灵敏度检测结果

通过构建包含 *rpoD* 基因的重组质粒,检测 LAMP 方法的灵敏性,同时与荧光定量 PCR 以及普通 PCR 进行灵敏度比较分析。实验结果显示,LAMP 对 10 倍系列稀释的质粒 DNA 最低检测限为 10^3 拷贝(图 3A、B),与荧光定量 PCR 方法相当(图 3D),但比常规 PCR 敏感 1 000 倍(图 3C)。

2.3 海水样品检测结果

海水样品中添加了 *Vibrio shilonii* ATCC BAA-91 以制备模拟样品。经平板计数,浓度为

1.3×10^7 CFU/mL,图 4 显示的是人工模拟样品的检测结果。如图 4 所示,LAMP 在模拟海水样品中的检测灵敏度为 1.3×10^2 CFU/mL,当菌浓度低于 1.3×10^1 CFU/mL 时无显色反应,与电泳结果一致(图 4)。

3 讨论与结论

珊瑚白化正在严重威胁和破坏着全球珊瑚礁的健康,严重影响了珊瑚礁生态系统的平衡,其中由细菌引起的导致主要造礁珊瑚死亡白化是阻碍珊瑚礁生态恢复的一个重要因素^[36]。随着全球气候的变化,如海水温度异常升高、海洋酸化等加大了珊瑚致病菌的危害,施罗氏弧菌作为导致珊瑚白化的重要致病菌之一^[14-16],其感染的宿主范围、流行病学和诊断技术的研究十分有限,因此建立特异性好、灵敏度高且准确性好的施罗氏弧菌检测技术,对野外现场快速检测以及预防珊瑚白化具有重要意义。

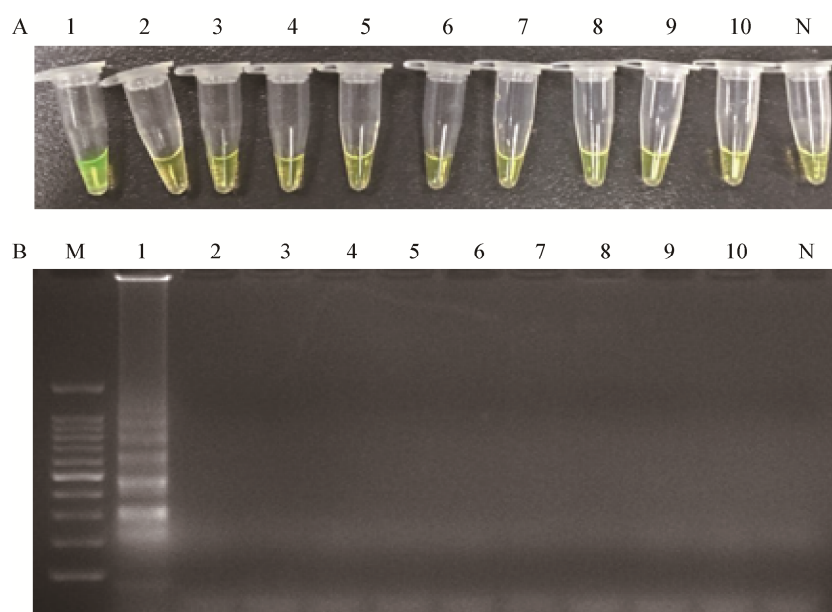


图 2 LAMP 特异性检测钙黄绿素显色结果(A)和凝胶电泳结果(B)

Figure 2 The product specificity of LAMP visualized with Calcein (A) and agarose gel electrophoresis (B)

注: M: 100 bp DNA ladder; 1: 施罗氏弧菌; 2: 溶藻弧菌; 3: 副溶血弧菌; 4: 创伤弧菌; 5: 霍乱弧菌; 6: 坎氏弧菌; 7: 欧文氏弧菌; 8: 嗜气芽孢杆菌; 9: 弗尼斯弧菌; 10: 金黄色葡萄球菌; N: 阴性对照。

Note: M: 100 bp DNA ladder; 1: *Vibrio shilonii* ATCC BAA-91; 2: *Vibrio alginolyticus* XSBZ-14; 3: *Vibrio parahaemolyticus* TF2; 4: *Vibrio vulnificus* TF3; 5: *Vibrio cholerae* HN375; 6: *Vibrio campbellii*; 7: *Vibrio owensii* DY05; 8: *Bacillus aerophilus*; 9: *Vibrio furnissii*; 10: *Staphylococcus aureus*; N: Negative control.

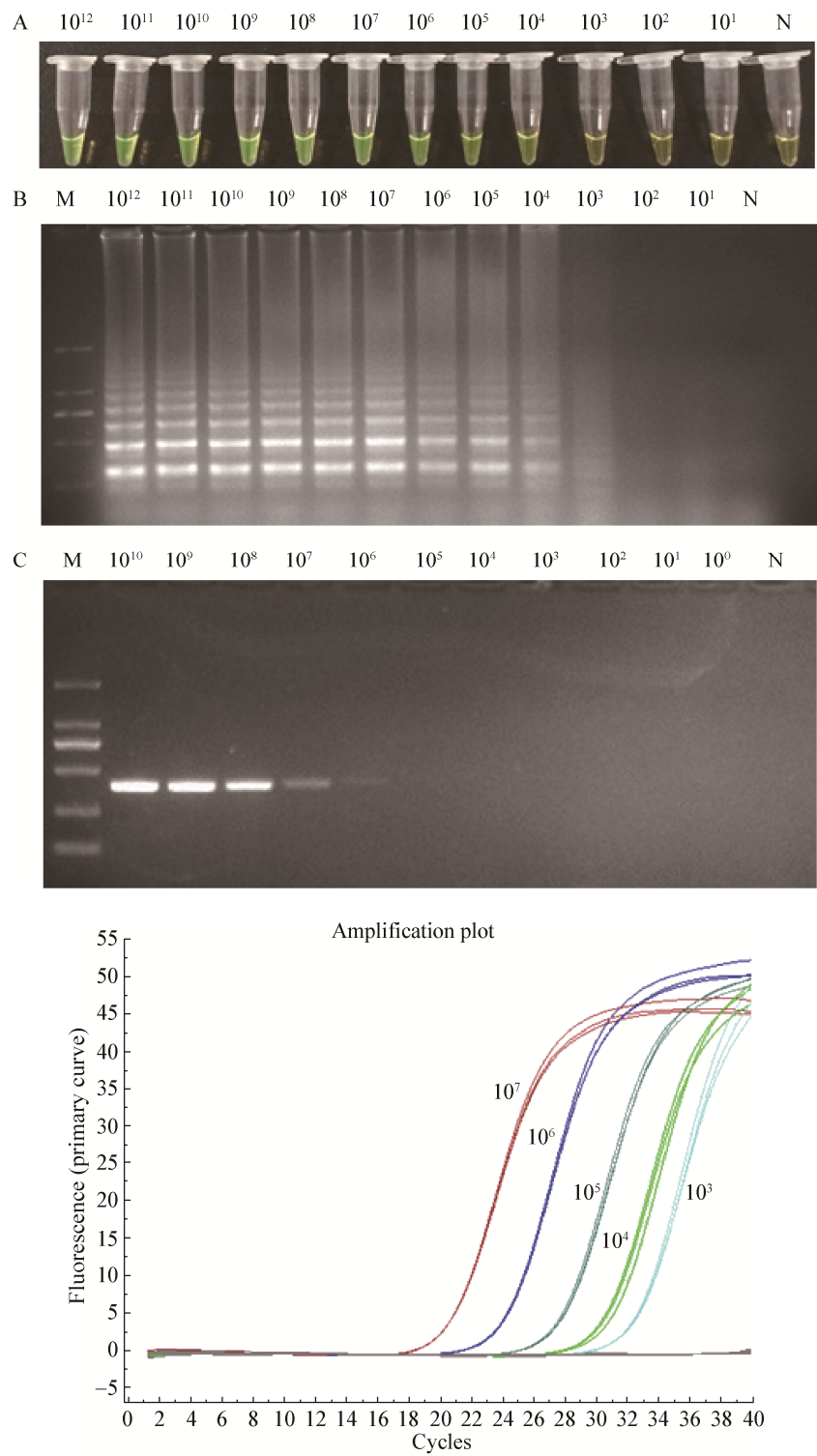


图 3 LAMP 灵敏度检测钙黄绿素显色结果(A)、凝胶电泳结果(B)、常规 PCR 结果(C)和荧光定量 PCR 结果(D)
Figure 3 The detection sensitivity of LAMP (A and B), comparison to conventional PCR (C) and real-time PCR (D)

注: N: 阴性对照; M: Marker DL2000.

Note: N: Negative control; M: Marker DL2000.

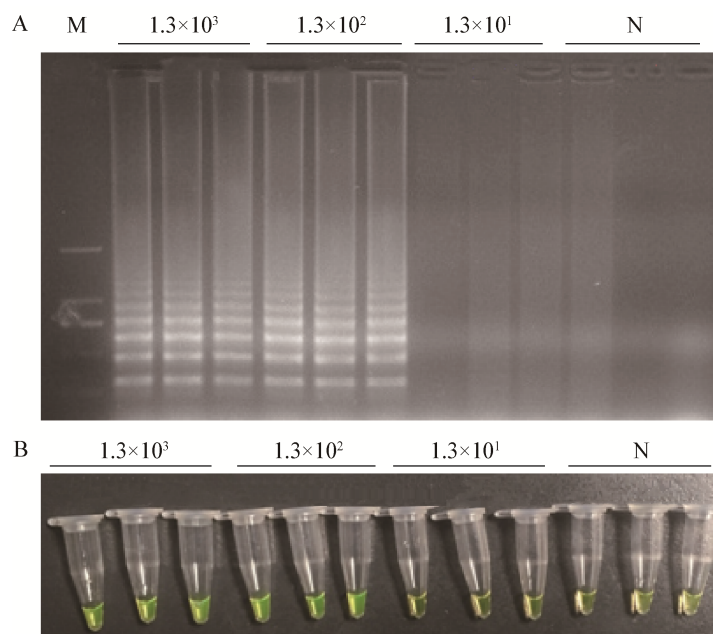


图4 海水样品检测钙黄绿素检测结果(A)和凝胶电泳结果(B)

Figure 4 The detection limit directly from sea water visualized with Calcein (A) and agarose gel electrophoresis (B)

注: M: Marker DL2000; N: 阴性对照.

Note: M: Marker DL2000; N: Negative control.

本实验针对施罗氏弧菌的 *rpoD* 基因设计了 6 条特异性引物,从而保证了 LAMP 反应的特异性和灵敏度。本研究中应用了具有链置换活性的高效 *Bst* DNA 聚合酶,使得 LAMP 可以在等温条件下快速反应。通过灵敏度测试发现, LAMP 比常规 PCR 敏感 1 000 倍(图 3B、C),具有与荧光定量 PCR 等同的灵敏度,最低检测限度可达到 3.641×10^3 cps/mL (图 3B、D);此外,通过模拟野外海水样品检测发现, LAMP 对海水样品中施罗氏弧菌的检测限度可达 1.3×10^2 CFU/mL,具有与其他研究者相当检测限度^[25],说明海水成分中高浓度的盐离子对 LAMP 检测体系以及检测结果影响不大。综合比较分析本研究的 3 种检测方法,常规 PCR 和荧光定量 PCR 需要依赖昂贵的 PCR 仪,而 LAMP 仅需一个恒温水浴锅,操作简单方便,因此在上述 3 种检测方法中 LAMP 法在野外现场病原菌检测中最具优势。

早期 LAMP 技术针对靶基因的 6 个区域设计 4 条特异引物,随着技术的改进,添加 2 条环引物

使得 DNA 合成效率大大增加。LAMP 扩增产物的检测方法主要有浊度检测^[37]、荧光显色^[38]和凝胶电泳检测。LAMP 反应过程中,随着 DNA 大量合成,形成一种副产物焦磷酸根离子,而焦磷酸根离子与体系中的镁离子结合形成沉淀。沉淀的产生引起反应液浊度的变化,可利用浊度仪实时监测并记录浊度的变化,当浊度达到一定浓度时^[26],可通过凝胶电泳形成特异性“梯形条带”。钙黄绿素是一种螯合剂,在锰离子存在时被淬灭不发光。随着 LAMP 反应的进行,阳性反应会形成大量的焦磷酸根,与钙黄绿素竞争锰离子,当钙黄绿素游离出来便可自发荧光,由原本的橘黄色变成亮绿色。本实验中,我们在反应体系中加入 2 μ L 1 mmol/L 的钙黄绿素和 1.25 μ L 10 mmol/L 的 $MnCl_2$,使得反应从开始至结束均不需要打开反应管,可避免产生假阳性,检测时间短,直接观察颜色变化,就可判读反应结果。

综上所述,本研究所建立的 LAMP 检测技术检测速度快、灵敏度高、特异性好,还简化了检测操

作和设备要求, 适用于实验条件差的野外现场珊瑚致病菌的快速检测。

REFERENCES

- [1] Zhao MX, Yu KF, Zhang QM. Review on coral reefs biodiversity and ecological function[J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(1): 186-194 (in Chinese)
赵美霞, 余克服, 张乔民. 珊瑚礁区的生物多样性及其生态功能[J]. 生态学报, 2006, 26(1): 186-194
- [2] Wang LR, Zhao HT. The general characteristics of the coral reef ecosystem[J]. Chinese Journal of Ecology, 2001, 20(6): 41-45 (in Chinese)
王丽荣, 赵焕庭. 珊瑚礁生态系的一般特点[J]. 生态学杂志, 2001, 20(6): 41-45
- [3] Ben-Haim Y, Thompson FL, Thompson CC, et al. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2003, 53(1): 309-315
- [4] Li S, Yu KF. Recent development in coral reef bleaching research[J]. Acta Ecologica Sinica, 27(5): 2059-2069 (in Chinese)
李淑, 余克服. 珊瑚礁白化研究进展[J]. 生态学报, 2007, 27(5): 2059-2069
- [5] Zhao J. The severe phenomenon of coral reef bleaching in the world[J]. Ecological Economy, 2016, 32(8): 2-5 (in Chinese)
赵静. 全球珊瑚礁白化现象严重[J]. 生态经济, 2016, 32(8): 2-5
- [6] Ben-Haim Y, Zicherman-Keren M, Rosenberg E. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 4236-4242
- [7] Anthony KRN, Connolly SR, Hoegh-Guldberg O. Bleaching, energetics, and coral mortality risk: Effects of temperature, light, and sediment regime[J]. Limnology and Oceanography, 2007, 52(2): 716-726
- [8] Hoegh-Guldberg O. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs[J]. Marine and Freshwater Research, 1999, 50(8): 839-866
- [9] Bally M, Garrabou J. Thermodependent bacterial pathogens and mass mortalities in temperate benthic communities: a new case of emerging disease linked to climate change[J]. Global Change Biology, 2007, 13(10): 2078-2088
- [10] Vezzulli L, Colwell RR, Pruzzo C. Ocean warming and spread of pathogenic *Vibrios* in the aquatic environment[J]. Microbial Ecology, 2013, 65(4): 817-825
- [11] Patterson KL, Porter JW, Ritchie KB, et al. The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(13): 8725-8730
- [12] Sutherland KP, Ritchie KB. White pox disease of the Caribbean Elkhorn Coral, *Acropora palmata*[A]/Rosenberg E, Loya Y. Coral Health and Disease[M]. Herdelberg, Berlin: Springer, 2004: 289-300
- [13] Sutherland KP, Shaban S, Joyner JL, et al. Human pathogen shown to cause disease in the threatened elkhorn coral *Acropora palmata*[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23468
- [14] Kushmaro A, Banin E, Loya Y, et al. *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(4): 1383-1388
- [15] Banin E, Israely T, Kushmaro A, et al. Penetration of the coral-bleaching bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 3031-3036
- [16] Banin E, Israely T, Fine M, et al. Role of endosymbiotic zooxanthellae and coral mucus in the adhesion of the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi* to its host[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 199(1): 33-37
- [17] Fabiano FL, Hoste B, Thompson CC, et al. The coral bleaching *Vibrio shiloi* Kushmaro et al. 2001 is a later synonym of *Vibrio mediterranei* Pujalte and Garay 1986[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2001, 24(4): 516-519
- [18] Rosenberg E, Falkovitz L. The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching[J]. Annual Review of Microbiology, 2004, 58: 143-159
- [19] Toren A, Landau L, Kushmaro A, et al. Effect of temperature on adhesion of *Vibrio* strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on coral bleaching[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(4): 1379-1384
- [20] Banin E, Vassilakos D, Orr E, et al. Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*[J]. Current Microbiology, 2003, 46(6): 418-422
- [21] Reshef L, Koren O, Loya Y, et al. The coral probiotic hypothesis[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(12): 2068-2073
- [22] 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
- [23] Wang H, Huang Q, Huang JF, et al. Rapid detections of *OprD2* gene in *Pseudomonas aeruginosa* using loop-mediated isothermal amplification[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2013, 36(6): 543-547 (in Chinese)
王欢, 黄庆, 黄君富, 等. 铜绿假单胞菌 *OprD2* 基因环介导等温扩增快速检测技术的研究[J]. 中华检测医学杂志, 2013, 36(6): 543-547
- [24] Xu YM, Zhou DY, Tang F, et al. Design and analysis of LAMP primers used in differentially detecting *Yersinia enterocolitica* and *Brucella* spp.[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2013, 17(1): 19-22 (in Chinese)
徐云明, 周德颖, 唐峰, 等. 区别检测小肠结肠炎耶尔森氏菌与布鲁氏菌 LAMP 引物的设计与分析[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(1): 19-22
- [25] Xiao LP. Application and study of LAMP technique in the detection of *Salmonella* in infectious diarrhea[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2015, 25(24): 4240-4242 (in Chinese)
肖丽萍. 环介导技术在感染性腹泻沙门菌检测中的应用与研究

- 究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(24): 4240-4242
- [26] Zhou Y, Wang Q, Cai ZH, et al. Loop-mediated isothermal amplification-based rapid detection for *Shigella dysenteriae* in food samples[J]. Microbiology China, 2017, 44(9): 2247-2254 (in Chinese)
周杨, 万强, 蔡芷荷, 等. 环介导等温扩增技术在食品中痢疾志贺氏菌快速检测[J]. 微生物学通报, 2017, 44(9): 2247-2254
- [27] Ding WC, Hu JR, Shi YH, et al. Establishment of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Vibrio alginolyticus*[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2009, 42(1): 70-76 (in Chinese)
丁文超, 胡健饶, 史雨红, 等. 环介导恒温扩增技术快速检测溶藻弧菌[J]. 分子细胞生物学报, 2009, 42(1): 70-76
- [28] Zhang YY, Ye Q, Wang ZR, et al. Preliminary exploration of loop-mediated isothermal amplification based on *cox2* gene of *Echinococcus granulosus*[J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2017, 35(2): 169-172 (in Chinese)
张艳艳, 叶倩, 王正荣, 等. 基于 *cox2* 基因的细粒棘球绦虫环介导等温扩增检测方法的初步建立[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2017, 35(2): 169-172
- [29] Ponce C, Kaczorowski F, Perpoint T, et al. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening patients with imported malaria in a non-endemic setting[J]. Parasite, 2017, 24: 53
- [30] Sharma V, Chaudhry D, Kaushik S. Evaluation of clinical applicability of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection and subtyping of Influenza A viruses[J]. Journal of Virological Methods, 2018, 253: 18-25
- [31] Ge YY, Zhou Q, Zhao KC, et al. Detection of influenza viruses by coupling multiplex reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with cascade invasive reaction using nanoparticles as a sensor[J]. International Journal of Nanomedicine, 2017, 2017(12): 2654-2656
- [32] Xie ZY, Ke SW, Hu CQ, et al. First characterization of bacterial pathogen, *Vibrio alginolyticus*, for *Porites andrewsi* White syndrome in the South China Sea[J]. PloS One, 2013, 8(9): e75425
- [33] Tian YS, Chen T, Huang W, et al. A new L-type lectin (LvLTLC1) from the shrimp *Litopenaeus vannamei* facilitates the clearance of *Vibrio harveyi*[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2018, 73: 185-191
- [34] Pang YS, Xie ZX, Xie LJ, et al. Development and application of visual loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for shrimp (*Penaeus orientalis*) White spot syndrome virus[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2013, 21(8): 1002-1008 (in Chinese)
庞耀珊, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 对虾白斑综合征病毒可视化环介导等温扩增(LAMP)检测技术的建立与应用[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(8): 1002-1008
- [35] Tarazona E, Lucena T, Arahal DR, et al. Multilocus sequence analysis of putative *Vibrio mediterranei* strains and description of *Vibrio thalassae* sp. nov.[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2014, 37(5): 320-328
- [36] Zhao Z, Ren CH, Jiang X, et al. Comparative study of specificity and sensitivity for IHNV detection between Real-time PCR and LAMP methods[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(5): 984-989 (in Chinese)
赵哲, 任春华, 江晓, 等. 荧光定量 PCR 与 LAMP 检测 IHNV 的特异性和灵敏性比较[J]. 水生生物学报, 2010, 34(5): 984-989
- [37] Huang LY, Yu KF. Review on coral disease: types, ecological influences and the relationships with environmental factors[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(5): 1328-1340 (in Chinese)
黄玲英, 余克服. 珊瑚疾病的主要类型、生态危害及其与环境的关系[J]. 生态学报, 2010, 30(5): 1328-1340
- [38] Mekata T, Sudhakaran R, Kono T, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of yellow head virus in shrimp[J]. Journal of Virological Methods, 2009, 162(1/2): 81-87
- [39] Zhang YW, Li XN, Guo PP, et al. Fluorescent reagent in detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18(3): 508-513 (in Chinese)
张跃伟, 李旭妮, 郭盼盼, 等. 荧光显色在环介导等温扩增(LAMP)检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的应用[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(3): 508-513