

基于纳米金核酸探针的新型试纸条对灿烂弧菌快速检测

张力支¹, 魏亚楠¹, 王雪辉¹, 薛景壮¹, 齐珈俪¹, 王先钰¹, 王磊¹, 宿红艳²

1 鲁东大学 生命科学院, 山东 烟台 264025

2 鲁东大学 农学院, 山东 烟台 264025

张力支, 魏亚楠, 王雪辉, 等. 基于纳米金核酸探针的新型试纸条对灿烂弧菌快速检测. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3323-3333.

Zhang LZ, Wei YN, Wang XH, et al. A novel test strip assay based on gold nanoparticles-labeled nucleic acid probe for rapid detection of *Vibrio splendidus*. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3323-3333.

摘 要: 灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* 作为一种水产条件致病菌, 可以感染多种水产养殖动物, 给水产养殖业带来巨大的经济损失。文中将核酸外切酶III酶切信号放大策略和纳米金标记 DNA 探针核酸试纸条相结合, 建立了一种新型高效的灿烂弧菌检测方法, 检测结果可凭肉眼直接判定, 并突破了常规免疫试纸条单克隆抗体制备困难的障碍。经过实验条件优化, 该核酸试纸条对灿烂弧菌人工合成寡核苷酸 DNA 片段的检测限是 5 ng/mL, 对灿烂弧菌基因组 DNA 实际样本的检测限是 10 ng/mL, 较 PCR 法灵敏度高, 并对灿烂弧菌具有检测特异性。研究结果实现了核酸试纸条的快捷制备及对灿烂弧菌的高效检测, 为水产病害的防治开辟了新的途径。

关键词: 灿烂弧菌, 纳米金, 核酸外切酶III, 试纸条, 核酸检测

A novel test strip assay based on gold nanoparticles-labeled nucleic acid probe for rapid detection of *Vibrio splendidus*

Lizhi Zhang¹, Ya'nan Wei¹, Xuehui Wang¹, Jingzhuang Xue¹, Jiali Qi¹, Xianyu Wang¹, Lei Wang¹, and Hongyan Su²

1 College of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, Shandong, China

2 College of Agriculture, Ludong University, Yantai 264025, Shandong, China

Abstract: *Vibrio splendidus* is an opportunistic pathogen in aquaculture. It can infect a variety of aquaculture animals and has caused huge losses to the aquaculture industry. In this study, a novel and efficient method for detecting *V. splendidus* was developed by combining the exonuclease III amplification strategy with a nucleic acid test strip developed based on gold nanoparticles-labeled DNA probe. The results could be directly visualized by naked eyes, and this system overcame the difficulty in preparation of the monoclonal antibody used in conventional immunostrip. Upon optimization of experimental conditions, the detection limit of the strip was 5 ng/mL for the synthetic oligonucleotide DNA fragment and 10 ng/mL for the

Received: November 10, 2020; **Accepted:** January 14, 2021

Supported by: Key Technology Research and Development Program of Shandong Province, China (No. 2019GSF107091), Marine and Fisheries Science and Technology Innovation Program of Shandong Province, China (No. 2017YY04).

Corresponding authors: Lei Wang. Tel: +86-535-6685003; E-mail: wanglei9909@163.com

Hongyan Su. Tel: +86-535-6664665; E-mail: suhongyan66@126.com

山东省重点研发计划 (No. 2019GSF107091), 山东省海洋与渔业科技创新计划 (No. 2017YY04) 资助。

actual genomic DNA sample of *V. splendidus*. This test strip was more sensitive compared with the PCR method and was specific for the detection of *V. splendidus*. The rapid preparation of nucleic acid strip and the efficient detection of *V. splendidus* open a new way for the prevention and control of aquatic diseases.

Keywords: *Vibrio splendidus*, gold nanoparticles, exonuclease III, test strip, nucleic acid detection

灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* 属弧菌科 Vibrionaceae 弧菌属 *Vibrio*, 是一种分布在盐湖和海洋中的条件致病菌, 宿主范围广泛^[1], 可以引起大菱鲆、牙鲆、大西洋鲑、鳟鱼、鲈鱼、海参、蛤蜊、扇贝、牡蛎等多种水产养殖动物产生疾病, 给水产养殖业带来不可估量的经济损失^[2-3]。Reid 等和王印庚等报道灿烂弧菌是大菱鲆“黑瘦症”的主要致病菌, 鱼苗感染灿烂弧菌后死亡率高达 80%–90%^[4-5]; Zhang 等和 Sun 等报道灿烂弧菌可导致刺参患“腐皮综合征”, 发生大面积死亡^[6-7]。因此, 建立一种灵敏、高效的灿烂弧菌检测方法对水产养殖业的健康可持续发展具有重要意义。

目前针对灿烂弧菌已建立了两大检测体系: 基于蛋白质水平的免疫学检测技术 (如酶联免疫吸附测定 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、间接荧光抗体检测法等) 和基于核酸水平的分子生物学检测技术 (如聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR)、斑点杂交、环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等)^[8-12]。但这些方法普遍对专业要求比较高, 需要专业的检测人员和设备, 并且 PCR、斑点杂交和 LAMP 容易造成假阳性, 免疫学方法则需要制备抗体, 操作步骤烦琐^[13-14]。因此, 水产养殖领域迫切需要建立一种简便、快速、高效、适合现场检测的新技术。

纳米金 (Gold nanoparticles, AuNPs) 免疫层析检测试纸条是 20 世纪 80 年代在纳米金标记抗体技术和薄膜层析技术基础上快速兴起的一种蛋白快速检测技术^[15]。它利用抗原和抗体的特异性结合反应形成抗原-抗体-AuNPs 颗粒复合物, 在试纸条上富集形成有色沉淀线从而将免疫反应转化成可视化信号, 具有携带方便、操作简便、凭肉眼直接判断结果等优点, 已广泛应用于疾病诊断、

药物残留检测、环境监测等领域^[16-17]。然而, 研制免疫层析试纸条的关键是制备特异性高、亲和力强的单克隆抗体, 这需要经历烦琐的杂交瘤实验和长期的筛选过程, 耗费大量的人力与物力, 实验成功率低, 并且抗体偶联金标的过程也较为复杂, 这些都成为免疫试纸条研发的重要瓶颈^[18]。

本研究将核酸探针杂交技术与纳米金层析技术相结合, 研制开发了一种快速制备型纳米金核酸检测试纸条, 以纳米金标记的寡核苷酸探针取代金标抗体用于对病原微生物的检测, 打破了试纸条对抗体的依赖, 探针可直接在生物公司合成, 方便快捷、成本低廉。并结合核酸外切酶 III (Exonuclease III, Exo III) 的循环酶切策略实现了信号放大, 提高了检测的灵敏度。该检测技术为灿烂弧菌的快速、高效、可视化检测提供了新的思路, 为核酸试纸条的发展及推广奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

灿烂弧菌、鳃弧菌 *Vibrio anguillarum*、副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*、哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* 和溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus* 等海洋病原菌购于中国海洋微生物菌种保藏管理中心, 由本实验室保藏。

氯金酸、柠檬酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自国药集团化学试剂有限公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS) 购自华美生物工程有限公司; 吸收垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜 (nitrocellulose membrane, 简称 NC 膜)、黏贴底板购自上海杰一生物有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 EasyPure Bacteria Genomic DNA Kit 购自北京全式金生物技术有限公司; 核酸外切酶 Exo III 购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 仪器与设备

电热恒温培养箱购自宁波市科技园区新江南仪器有限公司；高速冷冻离心机购自美国 Thermo 公司；电泳仪购自北京市六一仪器厂；凝胶成像仪购自上海山富科学仪器有限公司；空气浴振荡器购自哈尔滨市东明医疗仪器厂；真空干燥箱购自上海新苗医疗器械制造有限公司；PCR 仪购自美国伯乐 (Bio-Rad) 公司；微量分光光度计购自美国通用电气 (GE) 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 引物设计

在 NCBI 数据库中查找灿烂弧菌不同菌株的基因组序列，经同源性分析发现灿烂弧菌的特异性保守区域，以此为根据设计发卡 DNA (Hairpin DNA) 和探针 2 (Probe 2)，再设计出探针 1 (Probe 1)、探针 3 (Probe 3) 以及用于 PCR 检测的引物 VSgyrB-F 和 VSgyrB-R。其中探针 1 为发卡 DNA 的环状部分 (loop)，探针 2 与灿烂弧菌的保守区域互补，探针 3 与探针 1 互补，具体序列见表 1，以上序列均由大连宝生物工程有限公司合成并纯化，获得的冻干粉用 TE 缓冲液溶解。

1.3.2 实验用基因片段及核酸样品的制备

根据灿烂弧菌基因组的保守区段设计一段用于检测的目标寡核苷酸片段 (Target DNA)，具体序列为：5'-CTGTCTGAGTTCCTTATCGAGAACC CAACAGAAG-3'。

另外，为了确保检测方法的实用性和可靠性，对标准水产病原菌的基因组 DNA 进行检测。将灿烂弧菌、鳃弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌和

溶藻弧菌等菌种接种到 2216E 液体培养基中，于 28 ℃、180 r/min 过夜培养。培养好的菌液按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 说明书提取基因组 DNA。提取的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测并通过紫外分光光度计测定含量，-20 ℃ 保存备用，该样品用于实际样本检测及试纸条的灵敏度和特异性检测。

1.3.3 核酸试纸条的制备

(1) AuNPs 的制备

利用柠檬酸钠还原法^[19-20]合成 AuNPs，具体步骤如下：取 1.0 mmol/L 氯金酸溶液 100 mL，搅拌加热沸腾后，立刻加入 10 mL 的柠檬酸钠溶液 (33.8 mmol/L)，当溶液的颜色从浅黄色变为酒红色，继续加热 20 min 后停止加热，待溶液自然冷却至室温，4 ℃ 避光备用。

(2) AuNPs 的表征

紫外-可见 (UV-Vis) 吸收光谱表征：利用 UV-Vis 分光光度计对制备的 AuNPs 进行 300–700 nm 波长范围吸收光谱扫描。透射电镜 (TEM) 表征：取 10 μL 的 AuNPs 溶液滴至覆炭铜网表面，室温干燥后，在 100 kV 电压下观察其形貌特征、粒径大小及其分散情况。

(3) AuNPs-探针 1 复合物的制备

取上述制备的 AuNPs 溶液 1 mL，4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min。弃上清，100 μL ddH₂O 重悬沉淀，分别调节 pH 值至 6.6、6.8、7.0、7.2 和 7.4，加入不同体积的 10 μmol/L 的探针 1 (1、5、10、20、30 和 40 μL)，混匀后 4 ℃ 避光放置 24 h，加入 60 μL 含 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (Phosphate

表 1 探针及扩增引物序列
Table 1 Probes and amplification primers used in the experiment

Name	Sequence (5'-3')
Probe 1	SH-AAAAAATCCAGTATACTCGACGTCAG
Probe 2	TTGGGTTCTCGATAAGGAAC
Probe 3	CTGACGTCGAGTATACTGGA
Hairpin DNA	GTTTCCTTATCGAGAACCCAATCCAGTATACTCGACGTCAGTTGGGTTCTCGATAAGGAACTCAGACAG
VSgyrB-F	ACCAACAAAACCCGATCATC
VSgyrB-R	AGCATCATCACCTGATGTTGC

buffer, PB: 20 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 20 mmol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0) 和 0.6 mol/L NaCl 的混合液。4 °C 下避光放置 48 h 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min。弃上清, 用含 10 mmol/L PB (pH 7.0) 和 0.3 mol/L NaCl 的混合液 500 μL 重悬沉淀, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。最后用 200 μL 含 10 mmol/L PB (pH 7.0) 和 0.3 mol/L NaCl 的混合液重悬沉淀, 进行 UV-Vis 吸收光谱扫描检测, 4 °C 避光保存备用。

(4) 核酸检测试纸条的制备

本研究制备的核酸试纸条由样品垫、金标结合垫、杂交膜、吸收垫及黏贴底板组成。其中样品垫 (17 mm×5 mm) 由玻璃纤维制成, 将其在缓冲液 (0.25% TritonX-100、20 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl, pH 8.0) 中浸泡 2 h, 37 °C 干燥 2 h。金标结合垫 (8 mm×5 mm) 由玻璃纤维制成, 将 25 μL 的 AuNPs-探针 1 复合物滴加到玻璃纤维上, 在室温下避光干燥过夜。杂交膜 (25 mm×5 mm) 分别选用上海杰一生物公司 NC-a102、NC-a103、NC-b111 三种不同型号的 NC 膜和型号为 NL-b105 的尼龙膜, 首先在 0.3 mol/L NaCl 和 10 mmol/L PB (pH 7.0) 的混合液中浸泡 2 h, 37 °C 干燥 2 h; 然后使用划线工具在膜上分别划上 10 $\mu\text{mol/L}$ 的探针 2 作为检测线 (Test line)、10 $\mu\text{mol/L}$ 的探针 3 作为质控线 (Control line), 两条线之间的间隔为 5.0 mm; 最后紫外线照射进行交联固定 2 h。吸收垫 (30 mm×5 mm) 由吸水纸组成, 用 0.3 mol/L NaCl 和 10 mmol/L PB (pH 7.0) 的混合液中浸泡 2 h, 经 37 °C 干燥 2 h。于黏贴底板 (77 mm×5 mm) 上依次粘贴上样品垫、金标结合垫、杂交膜和吸收垫, 各部分之间有 3 mm 左右的重叠, 以确证被检样品溶液及展开液在各部分之间发生位移。组装完成后的试纸条用重物压实过夜, 4 °C 下密封干燥保存。

1.3.4 Exo III 酶切处理

取 DNA 样品 (寡核苷酸 DNA 或基因组 DNA) 2 μL , 加入 13 μL 双蒸水和 4 μL 的杂交缓冲液 (0.1 mol/L PB, 3 mol/L NaCl, 0.1% SDS), 95 °C

水浴加热 5 min 后迅速置于冰浴中。另取 10 $\mu\text{mol/L}$ 的发卡 DNA 溶液 5 μL , 加入 15 μL 双蒸水中, 95 °C 水浴加热 5 min 后, 慢慢冷却至室温。将上述处理的 DNA 样品溶液和发卡 DNA 溶液均匀混合, 42 °C 加热 30 min 后, 加入 5 μL 10× Exo III 酶切缓冲液和 4 μL Exo III, 定容至 50 μL , 混匀后 37 °C 下孵育 60 min。酶切结束后, 70 °C 加热 10 min, 使 Exo III 失活, 酶切溶液自然冷却至室温用于试纸条检测。

1.3.5 试纸条检测

将上述 50 μL 酶切产物滴加至试纸条样品垫上, 5 min 之后再滴加 100 μL 展开液 (10 mmol/L PB, 0.3 mol/L NaCl, pH 7.0) 冲洗试纸条, 以确保 AuNPs-探针 1 复合物在展开液的推动下从金标结合垫上释放, 进而沿 NC 膜移动。将试纸条置于湿盒内, 37 °C 孵育 20 min 后观察最终的结果。若检测线及质控线都显示红色条带, 则检测样品为阳性; 若只有质控线显示红色条带, 则检测样品为阴性; 若检测线及质控线均无条带显现, 则说明检测结果无效。

1.3.6 试纸条灵敏度初步评价

检测样品将 Target DNA 用 Exo III 酶切后, 将酶切液的梯度稀释, 分别对应 Target DNA 的浓度为 100 ng/mL、50 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL 和 1 ng/mL, 分别滴加至试纸条上进行检测, 观察实验结果, 确定试纸条的检测限。

1.3.7 实际样本检测

(1) PCR 检测

将提取的灿烂弧菌基因组 DNA 分别稀释至 10 000、1 000、100、10 和 1 ng/mL, 以 VSgyrB-F 和 VSgyrB-R 为引物 (序列见表 2), 进行 PCR 检测。PCR 反应体系: DNA 模板 2 μL , 10×PCR Mix 3 μL , 正、反向引物各 2 μL , 无菌双蒸水补齐至 30 μL 。将反应液充分混合后, 按照以下程序进行扩增: 94 °C 5 min; 94 °C 60 s, 55 °C 60 s, 72 °C 90 s, 循环 30 次; 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

(2) 核酸试纸条检测

将提取的灿烂弧菌基因组 DNA 按照步骤 1.3.4 和 1.3.5 进行 Exo III 酶切处理和试纸条检测, 判定检测结果。

(3) 灵敏度检测

参考对 Target DNA 灵敏度的检测结果, 将灿烂弧菌基因组 DNA 分别稀释为 100、50、10、5 和 1 ng/mL 等不同浓度, 分别进行核酸试纸条检测, 根据实验结果确定试纸条检测法对灿烂弧菌的最低检测限。

(4) 特异性检测

参考步骤 1.3.2 提取灿烂弧菌、鳗弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌和溶藻弧菌等海洋病原菌的基因组 DNA, 将浓度均一至 100 ng/mL, 分别用核酸试纸条检测, 确定该核酸检测试纸条的特异性。

(5) 重现性检验

分别取 100、50、10、5 和 1 ng/mL 的灿烂弧菌基因组 DNA, 用试纸条重复检测 5 次, 确定该核酸检测试纸条的重现性。

(6) 稳定性检验

将试纸条密闭保存于自封袋内, 置于 4 °C 冰箱内, 每隔一个月取出试纸条, 检测 100、50、10、5 和 1 ng/mL 等不同浓度的灿烂弧菌基因组 DNA, 确定该核酸检测试纸条的稳定性。

2 结果与分析

2.1 检测原理

2.1.1 酶切信号放大原理

试纸条在实施试纸条检测之前, 我们首先通过 Exo III 循环酶切将信号放大, 具体原理如图 1 所示: 在变性条件下, 发卡 DNA 茎环结构打开, 其 3'端 (图 1 中的红色部分) 可与灿烂弧菌的保守区域发生互补, 当检测核酸样品 (DNA sample) 中有灿烂弧菌序列存在时, 便可与发卡 DNA 发生杂交结合。随后用 Exo III 处理, 该酶只能作用于互补双链中的 DNA 单链, 并沿 3'→5'方向酶切,

但无法切割游离的 DNA 单链。由于杂交后的 DNA sample 序列两端和发卡 DNA 的 5'端是游离的, 因此 Exo III 只能从 3'端切割发卡 DNA 的互补双链部分 (红色部分), 导致此部分降解, 发卡 DNA 5'端游离的 DNA 片段 (图 1 中的黑色部分) 和 DNA sample 则释放出来。释放的 DNA sample 又可再次与发卡 DNA 发生杂交, 再经 Exo III 酶切又释放出 DNA sample 和发卡 DNA 的 5'端部分, 如此循环往复, 最终使发卡 DNA 的 5'端片段 (黑色部分, 即 DNA fragments) 得到累积, 这样, 通过 Exo III 酶切可以将微量的灿烂弧菌 DNA 片段转化成大量的用于检测的 DNA 片段, 实现了信号的放大。酶切后的溶液即可滴加到试纸条样品垫上进行可视化检测。如果样品 DNA 中不含有灿烂弧菌的序列, 则不能与发卡 DNA 发生杂交, 上述的循环放大就不能进行。

2.1.2 试纸条显色原理

本核酸试纸条整体结构与常规的免疫试纸条相同, 也是由样品垫、金标结合垫、杂交膜、吸收垫及黏贴底板 5 个部分组成。但该试纸条完全

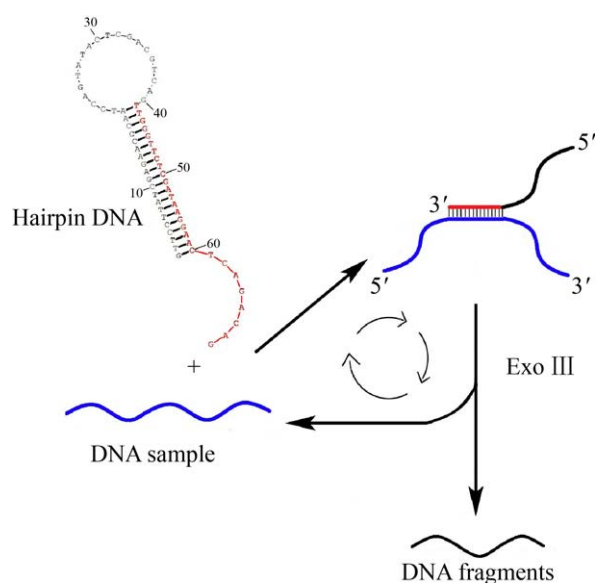


图 1 基于 Exo III 酶切的信号放大原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of signal amplification based on Exo III digestion.

不需要抗体,在接合垫上滴加的是 AuNPs-探针 1 结合物,NC 膜上检测线和质控线的成分分别为核酸探针探针 2 和探针 3。当检测液中有目的 DNA 存在时可于发卡 DNA 杂交,经 Exo III 反复酶切富集产生可用于检测的 DNA 片段,将此 DNA 片段滴加至样品垫,在毛细作用下慢慢迁移至金标结合垫,可与其上的 AuNPs-探针 1 杂交形成 AuNPs-探针 1-检测 DNA 复合物,并沿条带继续向上移动到 NC 膜。当复合物中的检测 DNA 片段与检测线上的探针 2 发生结合后, AuNPs 被吸附于检测线呈现红色条带,多余的 AuNPs-探针 1 继续向上迁移至质控线时,探针 1 可与质控线上的探针 3 结合,导致 AuNPs 在质控线上聚集而显色,最终检测线和质控线均显色。而当检测溶液中不存在目标灿烂弧菌 DNA 片段时,发卡 DNA 没有杂交对象与之杂交,无法被 Exo III 循环酶切,就不会有检测 DNA 片段产生。再用试纸条检测时由于没有检测 DNA 片段与 AuNPs-探针 1 结合形成复合物,试纸条不能在检测线上捕获 AuNPs,因此检测线不显红色条带;而 AuNPs-探针 1 则可与质控线上的探针 3 结合,所以仅质控线显红色条带。

2.2 试纸条制备

2.2.1 AuNPs 的合成与表征

由图 2A 可以看出合成的 AuNPs 溶液在自然

光下颜色呈酒红色,澄清透明、无明显的沉淀与悬浮物。用紫外分光光度计对 AuNPs 溶液进行 UV-Vis 吸收光谱扫描,溶液在 520 nm 处有一个明显的吸收峰(图 2B 中红色曲线),与 AuNPs 的特征等离子共振吸收峰相一致^[21]。并且吸收峰的峰形较窄,说明制备的 AuNPs 颗粒的粒径分布较为均匀。

AuNPs 的质量对试纸条的制备起着十分重要的作用,形状大小不规则的 AuNPs 颗粒常常因不能被 DNA 探针均匀包裹而发生聚集,将影响 AuNPs 迁移和最终试纸条的显色^[22]。在室温下放置 6 个月仍能保持稳定,无沉淀析出。利用透射电子显微镜对 AuNPs 的大小、形貌与分散性进行观察,由图 3 可看出 AuNPs 颗粒均呈球形,粒径均匀,大小约为 13–15 nm,分散良好,适合用于试纸条的制备。

2.2.2 AuNPs-探针 1 偶联条件的优化

(1) 最适 pH 的确定

为了研究探针 1 修饰 AuNPs 的最适 pH 值条件,将反应溶液调节至不同 pH 值,观察最终的反应情况。当溶液 pH 未达到 AuNPs 同探针 1 结合的最适 pH 时,反应液中 NaCl 的盐离子效应会中和游离的 AuNPs 表面的负电荷,导致聚沉现象发生,颜色由红变蓝。能维持溶液保持酒红色且

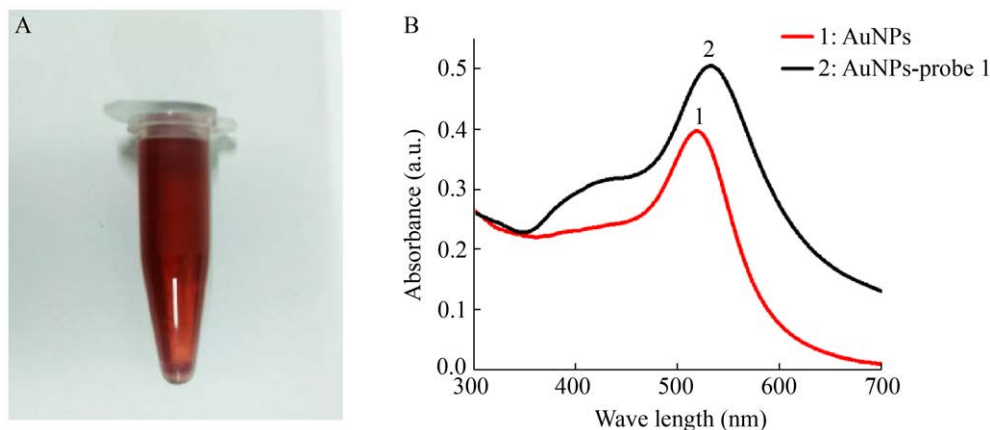


图 2 纳米金溶液照片 (A) 和紫外-可见光谱图 (B)

Fig. 2 Image of AuNPs solution (A) and UV-Vis spectra of AuNPs (B).

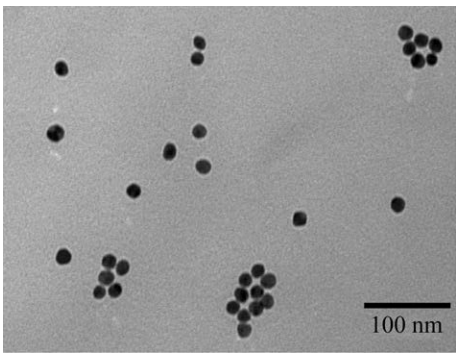


图 3 纳米金的透射电镜照片
Fig. 3 Transmission electron microscope image of AuNPs.

不发生沉淀的临界 pH 值即是探针 1 与 AuNPs 发生偶联的最适 pH^[23]。结果如图 4 所示：当 pH 为 6.6 时，溶液呈淡蓝色并伴随有少量沉淀析出；当 pH 为 6.8 时，溶液显蓝灰色并有沉淀伴随析出；当 pH 为 7.0 时，溶液虽然为酒红色但有少量沉淀析出；当 pH 为 7.2 时，溶液呈现酒红色并无沉淀析出。因此 pH 7.2 为 DNA 修饰 AuNPs 的最适 pH 值。

(2) 最适探针 1 加入量的确定

调节 AuNPs 溶液的 pH 值至最适 pH 值 7.2，各管分别加入不同体积的探针 1 溶液，观察偶联反应情况。当反应体系中探针 1 的体积逐渐减少时，游离的 AuNPs 会在 NaCl 的作用下发生聚集，溶液颜色由红变蓝。由图 5 可以看出，探针 1 的体积在 20 μL 以下的各管中都有沉淀析出，随着探针 1 加入体积的减少，溶液逐渐由深酒红色变为浅红，最后变为蓝色。最终确定 30 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的探针 1 溶液为修饰 AuNPs 的最适加入量。

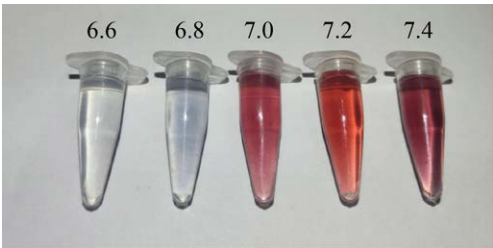


图 4 探针 1 修饰 AuNPs 的最适 pH 的确定
Fig. 4 Optimal pH for modifying AuNPs by Probe 1.

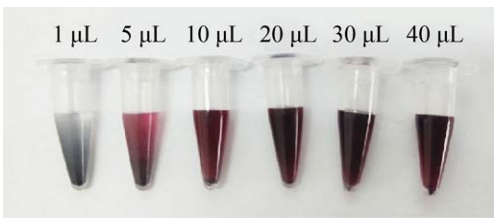


图 5 探针 1 修饰 AuNPs 的最适加入量的确定
Fig. 5 Optimal volume of Probe 1 for modifying AuNPs.

在最适条件下将 AuNPs 与探针 1 偶联后测定其 UV-Vis 吸收光谱，最高吸收峰位置发生了改变，由 519 nm 上升至 522 nm (图 2B 中黑色曲线)，说明修饰后 AuNPs 体积增大，出现了吸收峰红移，证明了 AuNPs 与探针 1 的成功交联。

(3) 杂交膜的选择

杂交膜是试纸条的关键部分，它是核酸样本与探针杂交发生的场所，直接影响到膜的层析速度和杂交显色的情况，展开速度适中、杂交效果好才能保证显色信号的清晰度。本实验分别选用上海杰一生物公司 NC-a102、NC-a103、NC-b111 三种不同型号的 NC 膜和 NL-b105 型尼龙膜作为试纸条的杂交膜。为了排除其他因素干扰、方便检测，我们只在杂交膜上用探针 3 划出一条质控线，在样品垫上滴加展开液，通过观察 AuNPs 的层析速度和质控线的显色情况确定最佳的杂交膜材料。

实验结果如图 6 所示：NC-b111、NL-b105 层析爬速较快，质控线不能很好显色；NC-a103 层析爬速较慢，在短时间内质控线显色不太清晰；NC-a102 层析速度适中，检测线显色最清晰，既能保证 AuNPs-探针 1 与探针 3 有充足的时间杂交、使较多的 AuNPs 固定聚集，又能使质控线在较短时间内清晰显现。通过上述实验，我们选定 NC-a102 型 NC 膜作为制备试纸条的杂交膜。

2.3 试纸条制备与灵敏度评价

为了便于开展试纸条的研究，我们首先以人工合成的灿烂弧菌寡核苷酸 DNA 片段 (Target DNA) 为检测对象。将 Target DNA 通过核酸外切酶 Exo III 进行信号放大，酶切后的酶切液进行梯

度稀释, 稀释后对应的 Target DNA 的浓度分别为 100、50、10、5 和 1 ng/mL, 然后用试纸条检测, 初步判定试纸条的灵敏度。

结果如图 7 所示: 随着 DNA 浓度的降低, 检测线的颜色逐渐减弱, 当样品浓度为 5 ng/mL 时检测线显示微弱的条带; 当浓度降至 1 ng/mL

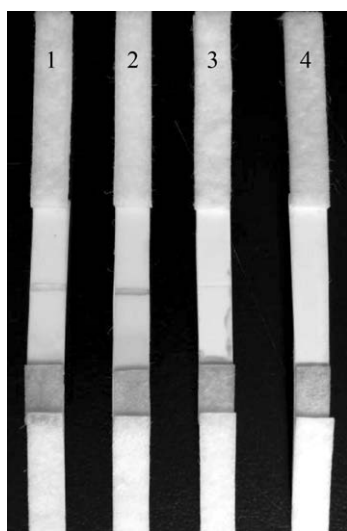


图 6 杂交膜的筛选

Fig. 6 Screening of hybrid membranes. 1: type NC-a103 NC membranes; 2: type NC-a102 NC membranes; 3: type NC-b111 NC membranes; 4: type NL-b105 nylon membrane.

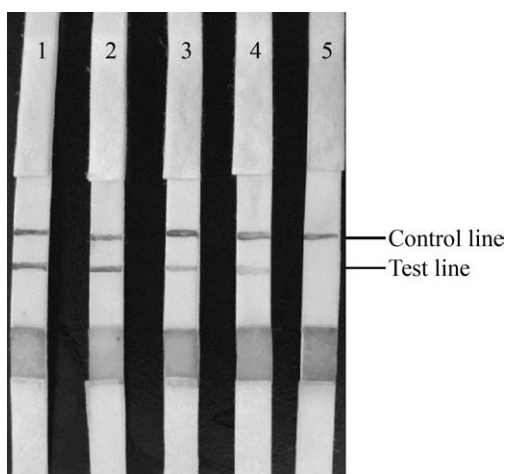


图 7 试纸条对人工合成目标 DNA 片段的灵敏度分析

Fig. 7 Sensitivity analysis of the test strips to the synthetic target DNA fragment. 1: 100 ng/mL; 2: 50 ng/mL; 3: 10 ng/mL; 4: 5 ng/mL; 5: 1 ng/mL.

时试纸条上的检测线消失。而质控线均显示清晰的条带, 证明所有用于测试的试纸条均显色有效。因此本灿烂弧菌核酸检测试纸条对人工合成的 Target DNA 的检测灵敏度是 5 ng/mL。

2.4 实际样本的检测

2.4.1 PCR 检测

为了对比本试纸条的检测效果, 在检测灿烂弧菌标准菌株实际样本时, 首先以常规分子生物学检测技术——PCR 技术作为参考和验证。将灿烂弧菌基因组 DNA 梯度稀释后, 用特异引物进行 PCR 扩增, PCR 扩增产物进行琼脂糖电泳检测, 结果如图 8 所示。浓度为 10 000、1 000 和 100 ng/mL 的样品可扩增出大于 250 bp 的条带, 与预期目的条带大小 (258 bp) 一致。当样品为 100 ng/mL 时可产生模糊的扩增条带, 当浓度下降到 10 ng/mL 时则没有扩增条带, 因此本实验条件下 PCR 方法对灿烂弧菌的最低检测限是 100 ng/mL。

2.4.2 核酸试纸条检测

(1) 灵敏度检测

为研究试纸条对实际样本的检测灵敏度, 首先将提取的灿烂弧菌基因组 DNA 与发卡 DNA 混合后 Exo III 酶切, 将得到的酶切液梯度稀释, 分别加至试纸条的样品垫上进行检测。结果如图 9 所示: 所有试纸条的质控线均显色, 说明试纸条显色有效。检测线的颜色则随着 DNA 浓度

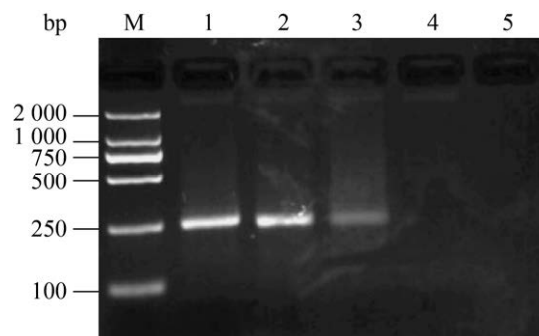


图 8 PCR 对实际样本的灵敏度分析

Fig. 8 Sensitivity analysis of PCR to actual samples. M: DL2000 marker; 1: 10 000 ng/mL; 2: 1 000 ng/mL; 3: 100 ng/mL; 4: 10 ng/mL; 5: 1 ng/mL.

的降低而逐渐减弱。5 ng/mL 和 1 ng/mL 浓度对应试纸条的检测线没有出现条带,呈阴性;10 ng/mL 试纸条显示微弱的条带,说明核酸试纸条检测法对灿烂弧菌实际样本的检测限为 10 ng/mL,较 PCR 检测法更为灵敏。

(2) 特异性检测

为研究试纸条的检测特异性,分别提取鳗弧菌、灿烂弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌和溶藻弧菌的基因组 DNA,经 Exo III 酶切后在试纸条上进行检测。结果如图 10 所示:只有灿烂弧菌样品

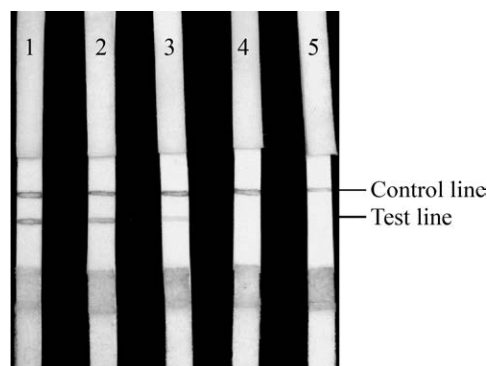


图 9 检测试纸条对实际样本的灵敏度分析
Fig. 9 Sensitivity analysis of test strips to actual samples. 1: 100 ng/mL; 2: 50 ng/mL; 3: 10 ng/mL; 4: 5 ng/mL; 5: 1 ng/mL.

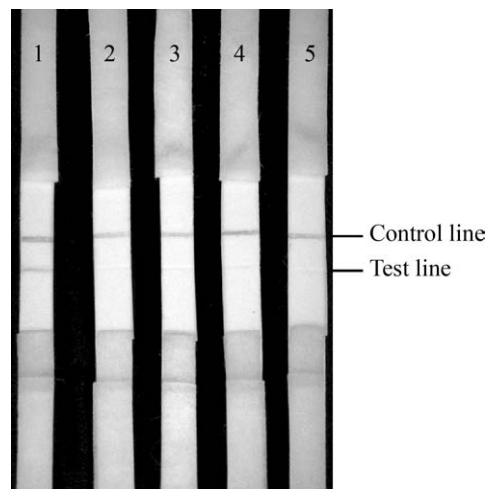


图 10 检测试纸条的特异性分析
Fig. 10 Specificity analysis of test strip. 1: *V. splendidus*; 2: *V. anguillarum*; 3: *V. harveyi*; 4: *V. parahaemolyticus*; 5: *V. alginolyticus*.

对应试纸条的检测线和质控线均显色,而其他菌种只有质控线显色,证明本研究建立的核酸试纸条特异性良好,不会受到其他水产病原菌的干扰。

(3) 重现性检测

分别用试纸条检测 100、50、10、5、1 ng/mL 等不同浓度的灿烂弧菌基因组 DNA 酶切液,每个浓度重复检测 5 次,结果表明,所有检测结果均一致,即样品浓度在检测限以下时,试纸条仅质控线显色;当样品浓度在检测限以上时,试纸条的检测线和质控线均显色。试纸条具有良好的检测重现性。

(4) 稳定性检测

用 4 ℃ 保存 1-6 个月的试纸条对 100、50、10、5、1 ng/mL 等不同浓度的灿烂弧菌基因组 DNA 的酶切液进行检测,检测结果均未发生改变,说明试纸条具有很好的稳定性,可满足实际应用的需要。

3 讨论

灿烂弧菌是水产养殖动物的重要致病菌,可导致海参的腐皮综合征,并造成鱼类鳍条基部和尾部充血、皮肤溃疡腐烂、内脏糜烂等,引发严重的传染性疾病,给我国水产养殖业造成了巨大的经济损失。因此,需要尽快对灿烂弧菌实施早期诊断,以便及时采取有效的防治措施,控制病害的传播和蔓延。通过多年的研究和探索,人们已针对灿烂弧菌建立了各种较为成熟的检测方法,但这些方法普遍存在成本高、耗时长、依赖专业检测人员和设备等缺点,一定程度上限制了在养殖基层的现场检测及应用推广^[24]。相比之下,检测试纸条操作简单,无需检测仪器设备,凭肉眼即可判定结果,受到养殖基层的青睐。目前市面上的检测试纸条几乎全部都是免疫试纸条,受到抗体制备的制约,开发周期漫长。与之相对应的核酸检测试纸条使用的核酸探针可针对检测对象灵活设计,并在生物公司订单式合成,成功绕开了制备抗体的瓶颈,有望为试纸条

研发带来新突破。

然而,核酸检测试纸条目前尚处于探索阶段,受检测灵敏度的影响,其应用与推广程度极其有限。虽然目前有不少核酸检测试纸条的报道,但其本质上依然是免疫试纸条,试纸条上的检测探针依然是抗体,最终只是以试纸条代替了琼脂糖凝胶电泳检测过程,利用免疫试纸条检测 PCR 扩增的目标核酸产物。该技术在 PCR 扩增的上下游引物中引入半抗原标记,经过 PCR 扩增的产物便带有双半抗原标记,能够与试纸条纳米金及检测线上的抗体结合,从而在试纸条上显色^[25-26]。这种检测方法并没有使试纸条脱离对抗体的依赖,不能从根本上简化试纸的制备和缩短检测过程。

本研究建立的基于纳米金标记的核酸检测试纸条结合了核酸外切酶 Exo III 循环酶切放大策略,不需要借助抗体和 PCR 扩增,真正实现了以核酸为检测探针的核酸试纸条的建立,极大地简化了制备和检测过程。该试纸条突破了现有免疫试纸条对抗体的依赖,合成组装方便快捷,生产成本低廉,无需专业人员和专门的仪器,实现了针对灿烂弧菌的可视化检测,简便、快速、灵敏,非常适合现场使用。研究结果表明该检测系统对灿烂弧菌人工寡核苷酸 DNA 片段和实际样品的最低检测限分别为 5 ng/mL 和 10 ng/mL,并且可以将灿烂弧菌与其他水产病原菌区分开来,具有很好的灵敏性和特异性。本研究为灿烂弧菌的快速检测开辟了新的途径,为核酸检测试纸条的推广与应用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Liu XL, Ji CL, Zhao JM, et al. Differential metabolic responses of clam *Ruditapes philippinarum* to *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* challenges. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 35(6): 2001-2007.
- [2] Thomson R, Macpherson HL, Riaza A, et al. *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J Appl Microbiol*, 2005, 99(2): 243-250.
- [3] Liu R, Qiu LM, Yu ZA, et al. Identification and characterisation of pathogenic *Vibrio splendidus* from Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) cultured in a low temperature environment. *J Invertebr Pathol*, 2013, 114(2): 144-150.
- [4] Reid HI, Treasurer JW, Adam B, et al. Analysis of bacterial populations in the gut of developing cod larvae and identification of *Vibrio logei*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* as pathogens of cod larvae. *Aquaculture*, 2009, 288(1/2): 36-43.
- [5] 王印庚, 张凤萍, 李胜忠, 等. 刺参腐皮综合征病原灿烂弧菌检测探针的制备及应用. *水产学报*, 2009, 33(1): 119-125.
- Wang YG, Zhang FP, Li SZ, et al. Detection of *Vibrio splendidus* causing skin ulcer syndrome of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) with DNA probes. *J Fish China*, 2009, 33(1): 119-125 (in Chinese).
- [6] Zhang C, Liang WK, Zhang WW, et al. Characterization of a metalloprotease involved in *Vibrio splendidus* infection in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Microb Pathogen*, 2016, 101: 96-103.
- [7] Sun YX, Du XF, Li SY, et al. Dietary *Cordyceps militaris* protects against *Vibrio splendidus* infection in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 45(2): 964-971.
- [8] Thongkao K. Establishment of immunological-based assay and molecular assay for rapid detection of *Vibrio harveyi*. *Procedia-Soc Behav Sci*, 2015, 197: 1627-1633.
- [9] Travers MA, Miller KB, Roque A, et al. Bacterial diseases in marine bivalves. *J Invertebr Pathol*, 2015, 131: 11-31.
- [10] Park JY, Kim SH, Lee KK, et al. Differential detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus genotypes by a fluorescence melting curve analysis using peptide nucleic acid probe-mediated one-step real-time RT-PCR. *J Virol Methods*, 2019, 267: 29-34.
- [11] Zhao RQ, Yu PC, Shan Y, et al. Rabies virus glycoprotein serology ELISA for measurement of

- neutralizing antibodies in sera of vaccinated human subjects. *Vaccine*, 2019, 37(41): 6060-6067.
- [12] Zhong RT, Liu SL, Wang XH, et al. A real-time isothermal amplification based portable microfluidic system for simple and reliable detection of *Vibrio splendidus*. *Analyt Methods*, 2020, 12(23): 2985-2994.
- [13] Powell AC, Paciotti GF, Libutti SK. Colloidal gold: a novel nanoparticle for targeted cancer therapeutics. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 624: 375-384.
- [14] Elise DS, Julia B, Barthelmebs L. Biosensing platforms for *Vibrio* bacteria detection based on whole cell and nucleic acid analysis: a review. *Talanta*, 2018, 190: 410-422.
- [15] Wu WD, Li M, Chen M, et al. Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* in tilapia. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 66-69.
- [16] Li JS, Deng T, Chu X, et al. Rolling circle amplification combined with gold nanoparticle aggregates for highly sensitive identification of single-nucleotide polymorphisms. *Anal Chem*, 2010, 82(7): 2811-2816.
- [17] Shi QQ, Huang J, Sun YN, et al. Utilization of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip based on surface-enhanced Raman spectroscopy for ultrasensitive detection of antibiotics in milk. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc*, 2018, 197: 107-113.
- [18] Xiao M, Xie KX, Dong XH, et al. Ultrasensitive detection of avian influenza A (H7N9) virus using surface-enhanced Raman scattering-based lateral flow immunoassay strips. *Anal Chim Acta*, 2019, 1053: 139-147.
- [19] Hu WG, Yan ZY, Li HM, et al. Development of a new colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detecting subgroup A of avian leukosis virus using colloidal gold nanoparticles. *Biochem Eng J*, 2019, 148: 16-23.
- [20] Wang ZX, Guo LL, Liu LQ, et al. Colloidal gold-based immunochromatographic strip assay for the rapid detection of three natural estrogens in milk. *Food Chem*, 2018, 259(9): 122-129.
- [21] Godipurge SS, Yallappa S, Biradar NJ, et al. A facile and green strategy for the synthesis of Au, Ag and Au-Ag alloy nanoparticles using aerial parts of *R. hypocrateriformis* extract and their biological evaluation. *Enzym Microb Technol*, 2016, 95: 174-184.
- [22] 陶春爱, 邱文英, 李刚等. 纳米金标记核酸探针检测小反刍兽疫病毒核酸的研究. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(7): 89-94.
- Tao CA, Qiu WY, Li G, et al. Study on peste des petits ruminants virus nucleic acid detection based on gold-nanoparticle conjuncted probe. *China Biotechnol*, 2012, 32(7): 89-94 (in Chinese).
- [23] 段静. 现场检测重金属离子的超高灵敏试纸条研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2012.
- Duan J. Development of a test strip platform for on-site and ultrasensitive detection of heavy metal ions[D]. Ningbo: Ningbo University, 2012 (in Chinese).
- [24] 秦璞, 胡晓, 张在阳, 等. 鱼类致病性迟钝爱德华氏菌胶体金快速检测试纸的研制. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2011, 37(3): 330-334.
- Qin P, Hu X, Zhang ZY, et al. Gold immunochromatography dipstick for rapid detection of fish pathogen *E. tarda*. *J East China Univ Sci Technol (Nat Sci Ed)*, 2011, 37(3): 330-334 (in Chinese).
- [25] 庞璐, 宋喆, 吴冬雪, 等. PCR-免疫胶体金试纸条方法检测食品中肠出血性大肠杆菌 O157:H7. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(2): 447-451.
- Pang L, Song Z, Wu DX, et al. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food by PCR-immunogold method. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(2): 447-451 (in Chinese).
- [26] 王之莹, 于文杰, 谢瑞彬, 等. 利用侧流核酸试纸条快速检测非洲猪瘟病毒. *农业工程学报*, 2020, 36(4): 294-299.
- Wang ZY, Yu WJ, Xie RB, et al. Rapid detection of African swine fever virus based on lateral flow nucleic acid assay. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2020, 36(4): 294-299 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)