

中肋骨条藻快速可视化现场检测方法的建立与应用

杨超¹, 甄毓^{1,2}, 秦铭俐³, 朱吉炜¹

(1.中国海洋大学 环境科学与工程学院 海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266100; 2.青岛海洋科学技术国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266071; 3.自然资源部 宁波海洋中心, 浙江 宁波 315012)

摘要:中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 是一种全球海域广布种与赤潮多发种, 对其进行检测与监测对海洋生态环境研究具有重要意义。本研究以核酸快速提取方法及环介导恒温扩增技术为基础, 建立了一种针对中肋骨条藻的快速可视化现场检测方法。该方法特异性强、灵敏度高 (可达 1.2 pg 基因组 DNA)、检测时间短 (100 min 以内), 可通过反应体系颜色变化对藻细胞有无进行快速判断。该方法经过大量野外样品的验证, 具有较高的可行性, 可被推广应用于中肋骨条藻的现场监测工作中。

关键词:赤潮; 中肋骨条藻; 现场检测; 环介导恒温扩增

中图分类号:X835 文献标识码:A 文章编号:1007-6336(2024)05-0787-10

Establishment and application of rapid visual *in-situ* detection method for *Skeletonema costatum*

YANG Chao¹, ZHEN Yu^{1,2}, QIN Mingli³, ZHU Jiwei¹

(1.Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2.Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China; 3.Ningbo Marine Center, Ministry of Natural Resources, Ningbo 315012, China)

Abstract: *Skeletonema costatum* is a widely distributed species in global waters, which also causes red tide frequently. It is of great significance to detect and monitor *S. costatum* for marine ecological environment research. In this study, a rapid visual *in-situ* detection method for *S. costatum* was developed based on rapid nucleic acid extraction and loop-mediated isothermal amplification. This method offers the advantages of high specificity, high sensitivity (1.2 pg genomic DNA) and rapid detection time (<100 min), and the presence or absence of cells can be determined through color changes in the reaction system. The method has been verified by a large number of field samples and holds great feasibility, which is expected to be widely used in field monitoring of *S. costatum*.

Key words: red tide; *Skeletonema costatum*; *in-situ* detection; loop-mediated isothermal amplification

在过去的几十年, 随着经济的快速发展和人口增长, 赤潮 (red tide) 的发生率显著增加, 已成为世界沿海国家共同面临的海洋环境问题^[1-2]。在众多赤潮致灾种中, 中肋骨条藻 (*Skeletonema*

收稿日期: 2023-10-24, 修订日期: 2023-12-11

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2022YFC3105202); 崂山实验室科技创新项目 (LSKJ202203700); 宁波市自然资源和规划局项目 (甬资规采合 2023 第 56 号)

作者简介: 杨超 (1998—), 男, 天津人, 硕士, 研究方向为海洋环境科学, E-mail: az2282308571@163.com

通信作者: 甄毓 (1978—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为海洋分子生态学, E-mail: zhenyu@ouc.edu.cn

costatum) 因其适应性强、藻华多发而备受关注。该藻是全球海域一种数量众多且最为常见的硅藻,在我国各海区也均有记录^[3-4]。一般而言,有害赤潮藻主要分为两类:一是能够产生毒素的微藻。这类赤潮藻多为甲藻,它们产生的毒素会污染水产品、导致鱼类死亡,甚至危害人体健康;二是不产生毒素但是繁殖速度极快的微藻。高密度的微藻会改变水体的理化特性,大量消耗水体中的溶解氧;同时还可能堵塞水生动物的呼吸器官,造成其窒息而亡;遮挡阳光,影响下层植物的光合作用,对水生环境造成危害^[5]。中肋骨条藻虽然不能产生毒素,但其个体微小,生长速度极快,据记载,自然条件下其最高密度可达 10^4 cells/mL,可以对海洋生态环境造成严重危害^[6-7],对该藻进行监测对海洋生态环境保护研究具有重要意义。

近年来,随着赤潮研究的不断深入,特别是新兴技术的大量引入,赤潮藻检测技术得到了快速发展。当前,赤潮检测技术大体可以分为以下几类:图像识别技术、基于化学生物标志物(如色素)的方法、基于核酸分析的方法、免疫分析方法、基于光学特性的分析方法等^[8-9]。核酸检测技术由于具有较高的灵敏度和准确性,在赤潮早期识别方面比其他检测方法具有更大的优势,成为藻种检测领域的研究热点。Miller and Scholin^[10] 和 Scholin 等^[11] 分别使用荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)和三明治杂交技术(sandwich hybridization assay, SHA)实现了对尖刺拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia pungens*)的检测。PCR(polymerase chain reaction)及其衍生技术,如 q-PCR(quantitative PCR)、m-PCR(multiplex PCR)等,由于具有操作便捷、高灵敏度等优点,被广泛应用于多种赤潮藻如微小亚历山大藻(*Alexandrium minimum*)^[12]、米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)^[13]、剧毒卡尔藻(*Karlodinium veneficum*)^[14] 的检测。但是 PCR 方法需要复杂的升、降温步骤,很大程度上限制了其在现场检测方面的应用。恒温扩增技术是 21 世纪新兴的一种核酸扩增技术,主要包含环介导恒温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase

amplification, RPA)、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)、链替代扩增(strand displacement amplification, SDA)和解旋酶依赖性扩增(helicase-dependent amplification, HAD)等技术^[15-17]。近些年来, LAMP 在赤潮藻检测中获得了较多应用^[18-22],但现有的大多数检测方法需要核酸提取和纯化步骤,不仅费时费力,具有一定的操作门槛,而且不适合野外样品的现场分析。

为了解决这一难题,本研究以核酸快速提取方法(先将样本裂解,再简单稀释)和环介导恒温扩增技术为基础,试图建立一种针对中肋骨条藻的快速可视化现场检测方法,希望整个检测过程可以在调查现场及较低的操作门槛下快速完成,从而在赤潮藻种的现场监测工作中进行推广与应用。

1 材料与方法

1.1 藻种培养

实验所需藻种信息如表 1 所示。所有藻均采用 f/2 培养基置于光照培养箱中培养,光照强度为 $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照周期为 12 h : 12 h,培养温度为 20 ℃。

表 1 实验所用藻种信息			
Tab.1 Information of algae species used in the experiment			
藻种中文名	藻种拉丁名	类别	来源
中肋骨条藻	<i>Skeletonema costatum</i>	硅藻门	中国黄海
旋链角毛藻	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	硅藻门	中国黄海
假微型海链藻	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	硅藻门	中国黄海
三角褐指藻	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	硅藻门	中国黄海
米氏凯伦藻	<i>Karenia mikimotoi</i>	甲藻门	中国东海
东海原甲藻	<i>Prorocentrum donghaiense</i>	甲藻门	中国东海
利玛原甲藻	<i>Prorocentrum lima</i>	甲藻门	中国东海
微小原甲藻	<i>Prorocentrum minimum</i>	甲藻门	中国南海
血红哈卡藻	<i>Akashiwo sanguinea</i>	甲藻门	中国东海
太平洋亚历山大藻	<i>Alexandrium pacificum</i>	甲藻门	中国东海
链状亚历山大藻	<i>Alexandrium catenella</i>	甲藻门	中国东海
球形棕囊藻	<i>Phaeocystis globosa</i>	定鞭藻门	中国黄海
浒苔	<i>Enteromorpha prolifera</i>	绿藻门	中国黄海

1.2 靶序列获取

1.2.1 DNA 提取

将处于对数生长期的中肋骨条藻细胞通过

0.45 μm 的滤膜收集于 1.5 mL 离心管中,使用 1 mL 灭菌海水冲洗滤膜,将膜上的藻细胞重悬,8000 g 离心 5 min,去掉上清液,按照袁健等^[23]的方法提取中肋骨条藻基因组 DNA 后,以双蒸水溶解。DNA 样品使用 1% 凝胶电泳定性检验后,利用超微量紫外分光光度计测定其浓度。用双蒸水以 10 倍梯度逐级稀释(浓度范围: $6 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^0 \text{ ng}/\mu\text{L}$),于 -20°C 条件下保存备用。

以同样的方法提取表 1 中其余 12 种藻的基因组 DNA,于 -20°C 条件下保存备用。

1.2.2 中肋骨条藻 ITS 区序列的获得

利用转录间隔区(internal transcribed sequence, ITS)通用引物 TW81(5'-GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC)和 AB28(5'-GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT)^[20] 对中肋骨条藻 ITS 区进行扩增,PCR 反应体系组成如下: TW81 和 AB28 引物各 0.5 μM , 1×EasyTaq

PCR SuperMix(全式金,青岛),12 ng 基因组 DNA,用双蒸水补足到 20 μL 。PCR 反应条件如下: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 45 s, 58°C 退火 45 s, 72°C 延伸 45 s,共 35 个循环;最后 72°C 延伸 7 min。PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验,确认扩增成功后送公司(华大基因,北京)测序。

1.3 引物设计

将测序获得的中肋骨条藻 ITS 区序列上传 Genbank,与不同株系中肋骨条藻(Accession Number: JN595884.1, JN595882.1, GU362423.1, GU362422.1, AY748237.1, AY748236.1)ITS 区序列进行比对,选择保守区域,然后将挑选出的保守区域与表 1 中的其余 12 种藻的 ITS 区域进行比对,选择特异性区域,将序列上传 Primer Explorer V5(<http://primerexplorer.jp/e/>)进行引物设计,提交公司(华大基因,北京)合成(表 2)。

表 2 LAMP 引物信息

Tab.2 LAMP primers information

引物名称	序列(5'-3')	长度/bp	融解温度(melting temperature, T_m)/ $^\circ\text{C}$
SC-F3	GGGTCACACAACGATGAAGA	20	54.8
SC-B3	AACGGAGTTCGTTGCCAA	18	54.7
SC-FIP (F1c-F2)	TACTCAGTAGCGCAATGTGCGT-GCAGCGAAATGCGATACGT	41	70.8
SC-BIP (B1c-B2)	TCTCTAAACCCCACTCAGCCGT-CACCATCACAGTCCAGCG	40	72.5
SC-LF	TCACGAAGTTCTGCAATTCGC	21	56.0
SC-LB	CTGCACTTAAGTGTGCTAGCAA	22	55.2

1.4 特异性验证

配制若干份 LAMP 反应体系,具体如下:引物 SC-F3 和 SC-B3 各 0.25 μL , SC-FIP 和 SC-BIP 引物各 2 μL , SC-LF 和 SC-LB 各 0.5 μL (引物工作液浓度均为 10 μM), 1×ThermoPol Reaction Buffer[20 mM Tris-HCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 0.1% Triton X-100, pH 8.8], 1 μL MgSO_4 溶液(4 mM), 3 μL dNTP(1.2 mM), 8 U of Bst DNA polymerase(NEB, 北京), 12 ng 基因组 DNA,用双蒸水补足到 25 μL 。将反应体系分装于 14 个 200 μL 离心管中,反应管 1 加入 2 μL (6 ng/ μL)中肋骨条藻基因组 DNA,反应管 2 加入 2 μL 双蒸水作为无模板对照(NTC),其

余 12 个反应管分别加入同数量级浓度的对照藻(表 1)基因组 DNA,将配制好的 14 份反应体系于 63°C 条件下温育 40 min,验证引物的特异性,产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检验。

1.5 灵敏度验证

配置多份 LAMP 反应体系,分装后,分别将 1.2.1 中梯度稀释的 2 μL 中肋骨条藻 DNA($6 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^0 \text{ ng}/\mu\text{L}$)加入不同反应管中,于 63°C 条件下温育 40 min,产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

为了比对 LAMP 和 PCR 方法的灵敏度,利用引物 SC-F3 和 SC-B3 进行 PCR 反应。PCR 反应体系如下: SC-F3 和 SC-B3 引物各 1 μL (引物

工作液浓度均为 10 μ M), 1 $\times$ EasyTaq PCR SuperMix (全式金, 中国), 12 ng 中肋骨条藻基因组 DNA, 用双蒸水补足到 20 μ L。PCR 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.6 快速检测方法的建立

1.6.1 中肋骨条藻培养样品检测

收集 1.80×10^6 个中肋骨条藻于 2 mL 离心管中, 8000 g 离心 10 min, 去除上清液, 加入 250 μ L TE 缓冲液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) 重悬藻细胞, 随后向离心管中加入 1 mL 细胞裂解液 [50 mM Tris, 100 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% SDS (*m/v*), 50% Formamide (*v/v*), pH8.0], 涡旋 10 s, 将反应体系于 65 $^{\circ}$ C 条件下裂解 30 min。待藻细胞裂解完毕, 吸取裂解混合液, 用 TE 缓冲液分别将其稀释 0、5、10、50、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 和 10^7 倍, 然后以稀释后的细胞裂解物为模板进行 LAMP 扩增反应, LAMP 反应体系组成和条件同上。

为了验证核酸快速提取方法的有效性, 同时比对 LAMP 和 PCR 的灵敏性, 将上述模板应用于常规 PCR, PCR 体系组成及反应条件同上。

1.6.2 模拟自然样品检测

取 0.2 mL 中肋骨条藻细胞液于 2 mL 离心管中, 向其中加入 1.8 mL 自然海水 (取自青岛石老人浴场, 镜检结果显示其中没有中肋骨条藻细胞), 8000 g 离心 10 min。去除上清液后, 向离心管中加入 250 μ L TE 缓冲液重悬藻细胞, 随后加入 1 mL 裂解液, 涡旋 10 s, 于 65 $^{\circ}$ C 条件下裂解 40 min, 后续操作同 1.6.1。同样地, 将上述细胞裂解物应用于常规 PCR 进行对比。

1.6.3 检测方法优化

由于自然海水样品中存在大量干扰物质, 稀释样品提取物可有效提高检测的稳定性, 因此需要对细胞裂解物进行稀释倍数的优化。将 1.6.2 中的细胞裂解物分别稀释 10、20、30、40、50 倍后, 将其作为 LAMP 反应的模板, 通过电泳条带亮度以及反应体系显色情况确定最佳稀释倍数。

1.7 快速检测方法的应用

利用快检方法对 2023 年 8 月采自宁波近海的 16 个野外海水样品进行检测。采样时, 使用 0.45 μ m 滤膜过滤 1 L 海水, 将海水中的微生物收集到膜上, 随后将膜样品置于 -80 $^{\circ}$ C 条件下冷冻保存; 同时, 在每个站位吸取 100 μ L 水样, 加入一滴鲁戈试剂, 制片, 对藻细胞数量进行显微计数, 计算水样中的藻细胞浓度。

检测时, 取 1/2 滤膜剪碎置于 2 mL 离心管中, 向其中加入 250 μ L TE 缓冲液重悬藻细胞, 随后加入 1 mL 细胞裂解液, 涡旋 10 s, 于 65 $^{\circ}$ C 条件下裂解 40 min, 然后用移液枪枪头挑出管中的碎膜, 吸取 5 μ L 上清液于 200 μ L 离心管中 (预装 145 μ L TE 缓冲液), 然后以此为模板进行 LAMP 反应。LAMP 反应体系组成及条件同上。

2 结果与讨论

2.1 引物设计

本研究以中肋骨条藻 5.8S-ITS2 区为靶序列, 设计了 6 条引物用于 LAMP 反应 (图 1), 分别是: 上游外引物 SC-F3, 下游外引物 SC-B3; 上游内引物 SC-FIP (包含 F1c 和 F2 两段); 下游内引物 SC-BIP (包含 B1c 和 B2)。另外, 为了加快反应速率同时提高扩增特异性, 设计了两条环引物: 上游环引物 SC-LF 和下游环引物 SC-LB。

LAMP 反应的产物是一系列大小不一的多环花椰菜结构的 DNA 片段混合物, 在电泳图上体现为阶梯状条带, 如图 2 所示。

近些年来, 被广泛用作赤潮藻分类的分子标记主要包括核糖体大亚基基因 (LSU)、核糖体小亚基基因 (SSU)、内转录间隔区基因 (ITS)、线粒体基因 (mt DNA)、叶绿体基因 (cp DNA) 等^[24-25]。其中, SSU 基因进化速度缓慢, 保守性较强, 适合属以上水平的分类鉴定, 何闪英等^[26]基于红色赤潮藻 SSU 基因, 建立了可以快速定量检测该藻的 q-PCR 检测方法, 检测限远低于发生赤潮时的藻密度, 具有较高的特异性和灵敏度。LSU 基因由于具有比 SSU 基因更快的进化速度, 适用于属及以上水平的分类研究, 被广泛用于各类赤潮藻的检测, 如赤潮异弯藻^[2]、强壮前沟藻^[20]、东海原甲藻^[27]等。与 LSU 和 SSU 基因相比, ITS

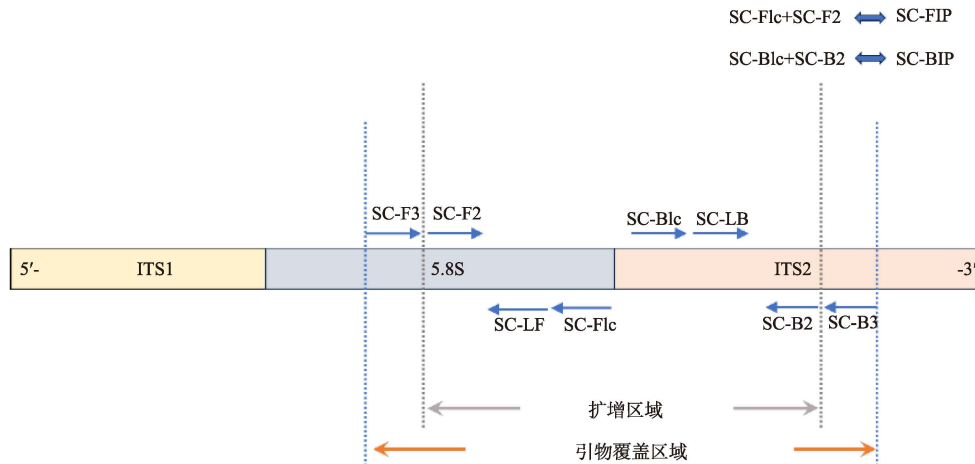
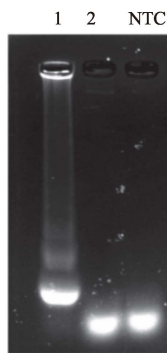


图1 引物位置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of primer positions



(1号样品添加中肋骨条藻基因组DNA; 2号样品添加表1中除中肋骨条藻外所有对照藻的混合基因组DNA; NTC为无模板对照)

图2 LAMP扩增产物电泳结果

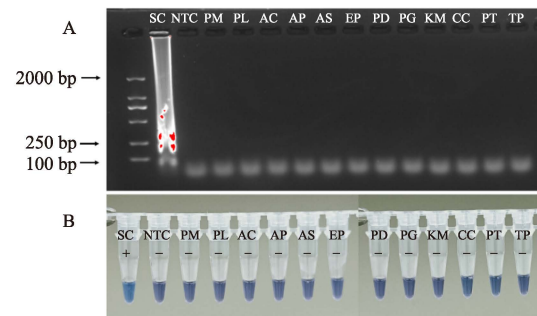
Fig. 2 LAMP amplification product electrophoresis results

基因拥有最快的进化速度,其中进化速度由快到慢排序为 ITS2>ITS1>5.8S, ITS 基因适合作为属及种水平物种分类的分子标记。所以,为了保证快检方法的高特异性和灵敏度,本研究选取具有高进化速率的 ITS 区作为引物设计的靶序列,对于不同属的赤潮藻种有着极佳的特异性,可以满足现场检测的要求。

2.2 特异性验证

为保证设计的引物能够高度特异地扩增中肋骨条藻目的基因,选择中国近海常见的13种赤潮藻(表1)验证引物的特异性。结果显示,本研究设计的6条LAMP引物能够高效扩增中肋骨条藻 ITS 区序列,而不会引起其余12种对照

藻的扩增(图3A),同时,LAMP方法的比色结果与电泳结果完全一致:添加中肋骨条藻基因组DNA的反应体系呈现天蓝色,为阳性;其余对照体系均呈紫罗兰色,为阴性(图3B)。



(A: LAMP 电泳结果; B: LAMP 可视化结果。SC: 中肋骨条藻; PM: 微小原甲藻; PL: 利玛原甲藻; AC: 链状亚历山大藻; AP: 太平洋亚历山大藻; AS: 血红哈卡藻; EP: 浒苔; PD: 东海原甲藻; PG: 球形棕囊藻; KM: 米氏凯伦藻; CC: 旋链角毛藻; PT: 三角褐指藻; TP: 假微型海链藻; NTC: 无模板对照)

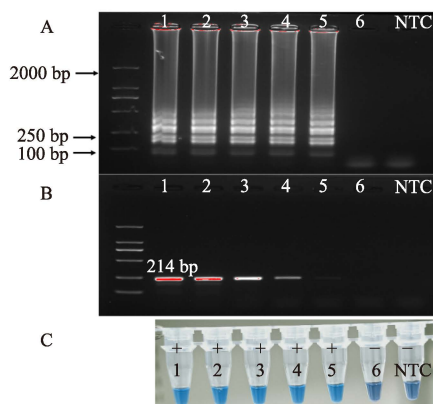
图3 特异性验证结果

Fig. 3 Results of specificity tests

2.3 灵敏度验证

以连续10倍梯度稀释的中肋骨条藻基因组DNA($6 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^0$ ng/ μ L)为反应模板,验证LAMP方法的灵敏度,并将其与常规PCR方法进行对比。结果显示,LAMP方法可以对低至 6×10^{-4} ng/ μ L浓度的基因组DNA实现扩增,比传统PCR的灵敏度高10倍(图4A和图4B);此外,1~5号反应管均呈现天蓝色(图4C),表明

LAMP 目视比色方法的灵敏度与电泳检测结果相当,均可以达到 1.2 pg 基因组 DNA,灵敏度要高于现有的中肋骨条藻检测方法^[4, 27-28]。



(A: LAMP 电泳结果; B: PCR 电泳结果; C: LAMP 可视化结果。1~6: 分别添加 6 ng/μL、0.6 ng/μL、0.06 ng/μL、0.006 ng/μL、0.0006 ng/μL、0.00006 ng/μL DNA 为反应模板; NTC: 无模板对照)

图4 灵敏度检测结果

Fig. 4 Results of sensitivity tests

2.4 快速检测方法的建立

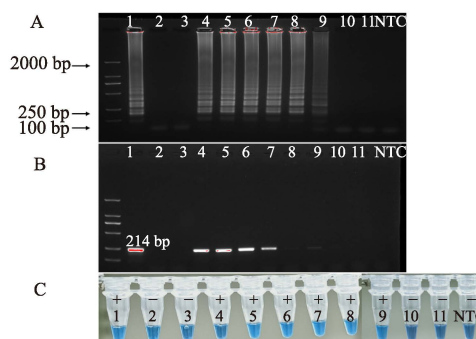
2.4.1 应用快速检测方法检测中肋骨条藻培养样品

在核酸提取过程中,本研究采用细胞裂解液快速释放核酸,但是细胞裂解液会对 Bst DNA 聚合酶(LAMP 反应核心酶)的活性产生一定程度的抑制,所以需要裂解后的细胞裂解物进行稀释才能将其作为基因扩增的模板。

图 5A 结果显示,对于中肋骨条藻培养样品,细胞裂解物至少要被稀释 10 倍才能作为 LAMP 检测的模板,细胞裂解物未被稀释或被稀释 5 倍时,LAMP 反应没有发生,这说明 Bst DNA 聚合酶的活性受到了抑制;当稀释倍数小于 10 倍时,传统 PCR 也没有扩增出任何条带(图 5B),这证明裂解液成分同样对 Tap 酶活性具有一定抑制作用。

当稀释倍数超过 10^5 倍时,LAMP 反应不再发生,而在细胞裂解物被稀释超过 10^3 倍时,传统 PCR 方法不能成功扩增靶序列,这意味着当以细胞裂解物中的核酸为模板进行扩增反应时,LAMP 方法最低可以对浓度为 14.4 cells/mL 的中肋骨条藻细胞中的目的基因实现成功扩增,换

言之,本方法对中肋骨条藻的检测极限可以达到 14.4 cells/mL,灵敏度要比传统 PCR 扩增高 100 倍(图 5A 和图 5B)。另外,9 号反应体系也呈现蓝色(图 5C),证明目视比色法的灵敏度和电泳法相当。



(A: LAMP 电泳结果; B: PCR 电泳结果; C: LAMP 可视化结果。1: 添加纯化 DNA 为反应模板的阳性对照; 2~11: 裂解混合液经 0、5、10、50、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 和 10^7 倍稀释后作为反应模板; NTC: 无模板对照)

图5 中肋骨条藻培养样品检测

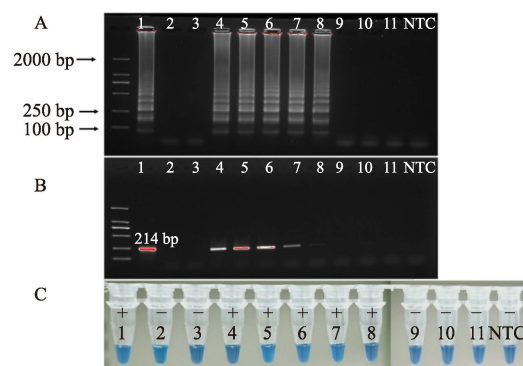
Fig. 5 Cultured cell detection of *Skeletonema costatum*

此外,当以 10 倍稀释的细胞裂解物为模板时,4 号样品呈现紫罗兰色而非天蓝色(图 5C),但是电泳结果显示 LAMP 扩增成功,也即 4 号样品出现假阴性。所以 10 倍稀释可能并非最佳稀释倍数。而当细胞裂解物被稀释 50 倍作为模板时,反应管颜色为天蓝色,所以最佳稀释倍数为 10~50 倍。

2.4.2 应用快速检测方法检测模拟自然海水样品

由于自然海水中存在许多杂质,这些杂质也有可能干扰 LAMP 反应,所以需要制备模拟自然海水样品对本方法进行验证,同时进一步确定稀释倍数。

对于模拟自然海水样品,当稀释倍数介于 10 倍至 10^4 倍时,LAMP 扩增能成功进行(图 6A),而传统 PCR 仅能在稀释倍数介于 10 倍至 10^3 倍时成功扩增出目的条带(图 6B),说明对于模拟自然海水样品,LAMP 要比传统 PCR 灵敏 10 倍。样品管 8(图 6C)趋于蓝色和紫罗兰色的过渡态,说明此时已经达到检测极限,换言之,可视化检测方法对于模拟自然海水样品也具有近乎电泳检测的灵敏度。



(A: LAMP 电泳结果; B: PCR 电泳结果; C: LAMP 可视化结果。1: 添加纯化 DNA 的阳性对照; 2~11: 裂解混合液经 0、5、10、50、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 和 10^7 倍稀释后作为反应模板; NTC: 无模板对照)

图6 中肋骨条藻模拟自然海水样品的检测

Fig. 6 Simulated natural sample detection of *Skeletonema costatum*

图 6C 中管 2(未稀释)的电泳结果虽然显示其未发生扩增,但是反应管却显示天蓝色,这可能是由于反应体系受到了裂解液中某些成分比如甲酰胺的干扰,导致异常显色,4 号管出现和 2.4.1 相似的假阴性现象,所以 10 倍稀释并非最佳稀释倍数。

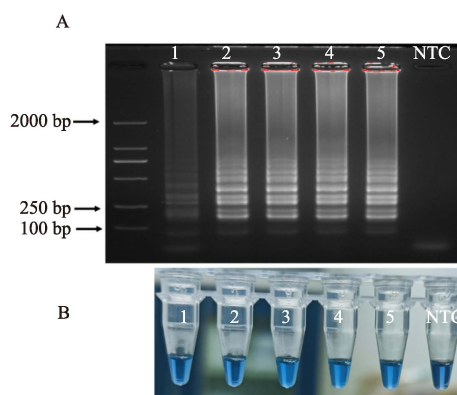
2.4.3 检测方法的优化

将裂解后获得的细胞裂解物分别稀释 10、20、30、40 和 50 倍,然后以此为模板,进行 LAMP 反应,结合电泳结果和比色结果综合确定最佳稀释倍数。如图 7B 所示,当细胞裂解物被稀释 10~50 倍时, LAMP 反应均能发生,而当其被稀释 10 倍时,电泳条带较浅,说明当细胞裂解物被稀释 10 倍时,裂解液成分仍然对反应有一定程度的抑制作用。

就图 7A 中 2~5 号泳道的电泳条带来看,其亮度没有明显区别,所以主要根据图 7B 中的比色结果确定最佳稀释倍数。2 号管和 3~5 号管均呈现天蓝色,但是 2 号管相对澄清,这意味着其扩增产物要少于 3~5 号管(扩增会产生大量焦磷酸镁导致体系浑浊,所以浑浊度越高往往意味着产物越多),所以 20 倍也不是最佳稀释倍数。

3~5 号管反应液的颜色、浑浊度相当,而稀释倍数越高也意味着模板浓度越低,这会影响检测方法的稳定性。所以,综合考虑裂解物成分的

抑制作用以及检测模板浓度,确定 30 倍为最佳稀释倍数。同时,这样也能回避低稀释倍数(小于等于 10 倍)可能造成的异常显色问题(图 5 中反应管 4 以及图 6 中反应管 4)。所以,本研究建立快速检测方法的基本步骤如下:在 65 ℃ 条件下恒温裂解藻细胞(30 min),将细胞裂解物稀释 30 倍后作为扩增的模板进行 LAMP 扩增,通过目视比色法对结果进行判定。整个过程总耗时在 100 min 以内,且不用打开反应管盖,可以有效避免气溶胶污染。



(A: LAMP 电泳结果; B: LAMP 可视化结果。1~5: 裂解混合液分别稀释 10、20、30、40、50 倍后作为反应模板; NTC: 无模板对照)

图7 稀释倍数优化结果

Fig. 7 Optimization of dilution ratio

近年来,研究者对于 LAMP-LFD 方法在赤潮藻检测中的应用进行了大量研究,针对多种赤潮藻建立了相应的 LAMP-LFD 检测方法,产物检测仅需要观察检测线的有无即可对扩增情况做出判断^[27]。但是 LFD 方法需要对探针进行荧光素标记,成本较高,所以并没有广泛应用于赤潮藻的现场检测。可视化显色法是在反应前或反应后向体系中添加显色剂,然后通过反应体系的颜色变化对扩增情况进行判断的方法。典型的显色剂包括钙黄绿素^[28-29]、羟基奈酚蓝(HNB)^[30]、SYBR Green I^[31] 和酚红^[32] 等。钙黄绿素使用时需要添加锰离子,锰离子会对反应产生抑制作用^[33]; SYBR Green I 需要在反应后加入,这无疑会增加气溶胶污染的风险;酚红对体系 pH 有着严格的要求, pH 变色范围较小; HNB 成本低,对反应无抑制作用,可于反应前加入体系,是一种

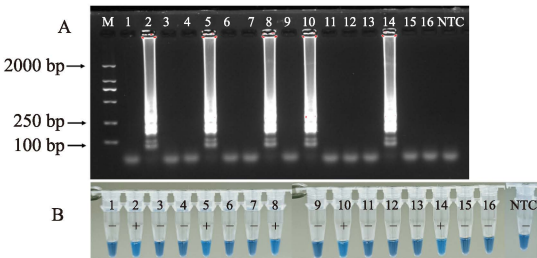
具有优良使用前景的显色剂。

现有的恒温扩增方法尤其是 LAMP 方法, 鲜有定量方面的研究, 这与 LAMP 的扩增原理有关, 其独特的链置换扩增方式以及产物的复杂性导致其难以做到精确定量^[15], 但是我们可以利用该技术对初始模板量进行粗略定量。在 LAMP 反应过程中会产生大量焦磷酸镁沉淀, 导致体系浑浊度上升, 基于此原理, 日本荣研会社开发了可以对 LAMP 反应进行实时监测的浊度仪。通过向反应体系内添加 SYBR Green I 等荧光染料, 利用实时荧光定量 PCR 仪可以对扩增反应进行实时监测。通过观测浊度曲线或荧光定量 PCR 仪扩增曲线的起峰时间可以对初始模板量进行粗略定量分析。一般来说, 初始模板量越大, 起峰时间越短。基于 HNB 显色剂, 本研究也对 LAMP 方法的粗略定量进行了一些探究。根据 Goto 等^[30] 的研究, 对于以 HNB 为显色剂的 LAMP 扩增体系, 其产物在波长 650 nm 处有最大的吸收峰。因此, 可以使用酶标仪对产物进行吸光度测定, 扩增成功反应体系的产物的吸光度要显著大于未发生扩增反应的体系。与 Goto 等的研究结果不同, 本研究发现: 当把 2.4.2 中一系列被梯度稀释的细胞裂解物分别作为反应模板时, 各个阳性扩增产物的吸光度也有较为明显的

差别(图中未展示), 基于此原理可以对初始模板量也即细胞浓度进行粗略定量分析, 但是该方法尚未成熟, 还需要进行更加深入的研究。另外, 如果基于此原理研发一个快速检测设备, 就有希望解决该方法存在的模板浓度较低时变色反应不够明显的缺点。

2.5 野外样品分析

利用本研究建立的可视化快速检测方法对采自浙江宁波近海海域的海水过滤样品进行检测, 检测结果如图 8 所示。分析快速检测结果和显微镜镜检结果(表 3)可知, 两种方法的结果高度一致, 说明本研究建立的快速可视化检测方法具有较好的实用性和稳定性。



(A: LAMP 电泳结果; B: LAMP 可视化结果。1~8: 依次对表 3 中各站位样品进行检测的结果; NTC: 无模板对照)

图 8 野外样品检测结果

Fig. 8 Tests for field samples

表 3 野外样品中肋骨条藻分析结果汇总

Tab.3 Summary of analysis of *Skeletonema costatum* in field samples

图8中编号	站位名称	镜检结果	快检结果(本研究)
1	XSG03表	未检出	未检出
2	XSG03底	检出(1.00×10^3 cells/L)	检出
3	XSG04表	未检出	未检出
4	XSG04底	未检出	未检出
5	XSG06表	检出(3.60×10^3 cells/L)	检出
6	XSG06中	未检出	未检出
7	XSG06底	未检出	未检出
8	XSG08表	检出(2.88×10^3 cells/L)	检出
9	XSG08中	未检出	未检出
10	XSG02表	检出(3.40×10^3 cells/L)	检出
11	XSG02底	未检出	未检出
12	XSG01表	未检出	未检出
13	XSG01底	未检出	未检出
14	QXS5表	检出(2.40×10^3 cells/L)	检出
15	QXS5底	未检出	未检出
16	QXS2表	未检出	未检出

3 结论

(1)本研究建立了一种中肋骨条藻的快速可视化现场检测方法,整个流程包括核酸提取(40 min)、扩增以及产物检测(40 min),整个过程可在100 min内完成。

(2)本方法操作简便、特异性强、灵敏度高(可达1.2 pg 基因组 DNA),最低可以检出14.4 cells/mL 浓度的中肋骨条藻。

(3)本研究建立的快速检测方法结果可以目视判断:阳性反应体系呈天蓝色并伴随一定程度的浑浊;阴性反应体系呈紫罗兰色且清澈透明。

参考文献:

- [1] ANDERSON D M. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs)[J]. *Ocean & Coastal Management*, 2009, 52(7): 342-347.
- [2] WANG B K, ZHANG C Y, LIU F Q G, et al. Development of a recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick assay for rapid and sensitive detection of *Heterosigma akashiwo*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2021, 33(5): 3165-3178.
- [3] 霍文毅, 俞志明, 邹景忠, 等. 胶州湾中肋骨条藻赤潮与环境因子的关系[J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32(3): 311-318.
- [4] 李成峰, 甄毓, 刘材材, 等. 中肋骨条藻抗体的制备及酶联免疫检测方法的建立[J]. *海洋湖沼通报*, 2015 (3): 131-138.
- [5] 周名江, 于仁成. 有害赤潮的形成机制、危害效应与防治对策[J]. *自然杂志*, 2007 (2): 72-77.
- [6] 陈楠生, 黄海龙. 中国海洋浮游植物和赤潮物种的生物多样性研究进展(一): 渤海[J]. *海洋与湖沼*, 2021, 52(2): 346-362.
- [7] ZHU J R, WANG J H, SHEN H T, et al. Observation and analysis of the diluted water and red tide in the sea off the Changjiang River mouth in middle and late June 2003[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(3): 240-247.
- [8] LIU F G, ZHANG C Y, WANG Y Y, et al. A review of the current and emerging detection methods of marine harmful microalgae[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 815: 152913.
- [9] 于志刚, 米铁柱, 姚鹏, 等. 赤潮藻鉴定与定量检测方法进展[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2009, 39(5): 1067-1076.
- [10] MILLER P E, SCHOLIN C A. Identification of cultured *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using species-specific LSU rRNA-targeted fluorescent probes[J]. *Journal of Phycology*, 1996, 32(4): 646-655.
- [11] SCHOLIN C A, BUCK K R, BRITSCHGI T, et al. Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-targeted probes in whole cell and sandwich hybridization formats[J]. *Phycologia*, 1996, 35(3): 190-197.
- [12] GALLUZZI L, PENNA A, BERTOZZINI E, et al. Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Alexandrium minutum* (a dinoflagellate)[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 1199-1206.
- [13] ECKFORD-SOPER L K, DAUGBJERG N. Development of a multiplex real-time qPCR assay for simultaneous enumeration of up to four marine toxic bloom-forming microalgal species[J]. *Harmful Algae*, 2015, 48: 37-43.
- [14] SUN Y J, CHEN G F, ZHANG C Y, et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for the parallel detection of harmful algal bloom-forming species distributed along the Chinese coast[J]. *Harmful Algae*, 2019, 84: 36-45.
- [15] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): e63.
- [16] BARREDA-GARCIA S, MIRANDA-CASTRO R, DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ N, et al. Helicase-dependent isothermal amplification: a novel tool in the development of molecular-based analytical systems for rapid pathogen detection[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(3): 679-693.
- [17] QU X J, JIN H J, LIU Y Q, et al. Strand displacement amplification reaction on quantum dot-encoded silica bead for visual detection of multiplex MicroRNAs[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(5): 3482-3489.
- [18] ZHANG F Y, MA L B, XU Z L, et al. Sensitive and rapid detection of *Karenia mikimotoi* (Dinophyceae) by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Harmful Algae*, 2009, 8(6): 839-842.
- [19] HUANG H L, ZHU P, ZHOU C X, et al. The development of loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for detection of *Karlodinium veneficum*[J]. *Harmful Algae*, 2017, 62: 20-29.
- [20] WANG L, CHEN G F, ZHANG C Y, et al. Rapid and sensitive detection of *Amphidinium carterae* by loop-mediated isothermal amplification combined with a chromatographic lateral-flow dipstick[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2019, 43: 72-79.
- [21] QIN Y, CHEN G F, ZHANG C Y, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification combined with a chromatographic lateral-flow dipstick for rapid detection of *Chattonella marina*[J]. *Harmful Algae*, 2019, 89: 101666.
- [22] HUANG H L, ZHU P, ZHOU C X, et al. Detection of *Skeletonema costatum* based on loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2017, 36: 36-42.

- [23] YUAN J, MI T Z, ZHEN Y, et al. Development of a rapid detection and quantification method of *Karenia mikimotoi* by real-time quantitative PCR[J]. Harmful Algae, 2012, 17: 83-91.
- [24] 甄 毓, 于志刚, 米铁柱. 分子生物学在微藻分类研究中的应用[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006, 36(6): 875-878.
- [25] 陈国福, 张春云, 王广策, 等. 用于赤潮藻分子系统学研究的遗传及分子标记[J]. 海洋科学进展, 2008, 26(4): 522-531.
- [26] 何闪英, 于志刚. 红色裸甲藻实时定量PCR快速检测方法的建立(英文)[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2009, 35(2): 119-126.
- [27] CHEN G F, MA C S, ZHANG C Y, et al. A rapid and sensitive method for field detection of *Prorocentrum donghaiense* using reverse transcription-coupled loop-mediated isothermal amplification[J]. Harmful Algae, 2013, 29: 31-39.
- [28] WONG Y P, OTHMAN S, LAU Y L, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(3): 626-643.
- [29] LIANG S Y, CHAN Y H, HSIA K T, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Entamoeba histolytica*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(6): 1892-1895.
- [30] GOTO M, HONDA E, OGURA A, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue[J]. Biotechniques, 2009, 46(3): 167-172.
- [31] Xu Y, Wang Y, Hu J, et al. Development and Visualization Improvement for the Rapid Detection of Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1) in *Penaeus vannamei* Based on an Isothermal Recombinase Polymerase Amplification Assay[J]. Viruses, 2022, 14(12): 2752.
- [32] POOLE C B, LI Z R, ALHASSAN A, et al. Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP)[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0169011.
- [33] 贾晓曼, 翟 浩, 张 勇, 等. LAMP技术的染料、辅助剂的研究进展[J]. 江西农业学报, 2018, 30(12): 60-65.

(本文编辑: 胡莹莹)