

孔石莼(*Ulva pertusa*)LAMP-LFD 快速检测方法^{*}的建立^{*}

周前进¹ 陈先锋^{1,2} 蔡怡¹ 段丽君² 段维军² 苗亮¹ 陈炯¹

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 宁波检验检疫科学技术研究院 宁波 315012)

摘要 采用环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)进行核酸扩增, 凭借横向流动试纸条(lateral flow dipstick, LFD)完成扩增产物检测, 建立了可快速检测孔石莼(*Ulva pertusa*)的 LAMP-LFD 方法。该方法首先在孔石莼的内转录间隔区序列(internal transcribed spacer, ITS)的 8 个种内保守区域设计 6 条特异性引物(上游内引物由生物素标记), 进行由生物素标记的 LAMP 反应; 同时, 在两条外引物的有效扩增区段内设计 1 条异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的探针, 生物素标记的 LAMP 产物与 FITC 标记的探针特异性杂交后, 在 LFD 上完成结果显示。优化后 LAMP 的反应条件为 63°C 反应 50min, 加上探针杂交与 LFD 检测共需 60min。结果表明, 利用该 LAMP-LFD 方法可特异性地检出孔石莼, 对浒苔(*Ulva prolifera*)等 9 种常见藻类的检测均呈阴性。利用该方法最低可检测到 3.04×10^{-2} pg/ μ L 的孔石莼基因组 DNA, 是以 LAMP 外引物进行的常规 PCR 方法的 1000 倍。针对一定数量的实际样本的检测结果表明, LAMP-LFD 方法与传统的形态学观察的结果一致。因此, 本研究建立的孔石莼 LAMP-LFD 快速检测方法, 具有特异性强、灵敏度高、操作简便等优点, 有望成为我国东部沿海孔石莼快速检测和定期监测的有效技术手段。

关键词 孔石莼; 内转录间隔区; 环介导等温扩增技术; 横向流动试纸条; 检测

中图分类号 Q948

doi: 10.11693/hyhz20141200344

孔石莼(*Ulva pertusa*)属于绿藻纲, 石莼目, 石莼科, 石莼属。石莼属(*Ulva*)藻类呈全球性分布, 多数种类生活在温带至亚热带海洋中, 部分生长在高潮带至低潮带和大干潮线附近岩石上或石沼中。石莼属藻类富含蛋白和多种微量元素, 具有很高的食用及药用价值(Torres *et al.*, 2014; Montingelli *et al.*, 2015; Ghadiryanfar *et al.*, 2016)。作为重要的经济藻类, 孔石莼(*U. pertusa*)、浒苔(*U. prolifera*)等已得到越来越多的开发利用。然而, 当石莼属藻类脱离固着基, 形成大量的漂浮增殖群体时, 将导致绿潮的暴发, 破坏底栖生态系统。自 20 世纪 70 年代初法国布列塔尼沿海首次报道以来, 绿潮发生范围已遍及欧洲沿海、美国东西海岸、东亚和东南亚沿海以及澳大利亚等国, 成

为世界性的海洋环境问题(Smetacek *et al.*, 2013)。

多年以来, 石莼属等绿潮藻的分类鉴定主要依赖于显微镜下的形态学观察, 通常以其形态、结构特征等作为主要的分类依据。然而, 石莼属藻类不同生长阶段的细胞结构和藻体形态有着很好的可塑性, 易随季节和环境的变化而变化(Blomster *et al.*, 1999, 2002), 导致形态学分类比较困难。因此, 以 PCR 为代表的分子生物学技术引入到绿潮藻类的检测。其中, rDNA-ITS 序列、rDNA-18s 序列、二磷酸核酮糖羧化酶大亚基基因(*rbcL*)等因其种间较大的差异性, 通常用作鉴定的靶标, 应用于藻类的系统分类和鉴定过程(Blomster *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012); 由于该类技术有一定的仪器依赖性, 要在特

^{*}国家星火计划项目, 2014GA701007 号; 浙江省重大科技专项重点社会发展项目, 2013C03045-1 号; 宁波市科技创新团队项目, 2015C110018 号。周前进, 博士, E-mail: mumu2325@163.com

通讯作者: 陈炯, 博士生导师, 研究员, E-mail: jchen1975@163.com

收稿日期: 2014-12-10, 收修改稿日期: 2015-10-19

定环境下由专业人员操作, 仅限于在实验室开展。

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是2000年发展起来的一种新的核酸扩增方法(Notomi *et al*, 2000)。相较于PCR技术, LAMP方法需针对靶序列的不同区域设计6—8条引物, 这些引物在反应过程中需完全与靶序列匹配才能完成扩增反应, 使得该方法具有良好的特异性。LAMP反应依赖于一种具有链置换功能的*Bst* DNA聚合酶, 恒温条件下即可完成核酸的大量扩增, 无需类似于PCR的反复升降温过程, 使得仪器设备的依赖性大幅度降低。因此, 自该技术发明以来已广泛应用于细菌、病毒、寄生虫等病原的检测(Niu *et al*, 2012; Nie *et al*, 2013; Notomi *et al*, 2015)。LAMP产物的检测主要以琼脂糖凝胶电泳或浊度检测为主, 仍依赖于凝胶成像系统和浊度仪等仪器(Parida *et al*, 2008); 依赖于荧光染料的肉眼观察和实时荧光LAMP法在某些微生物的检测中也取得了应用, 但非特异性扩增引起的假阳性成为限制该类检测手段广泛应用的重要因素(Mori *et al*, 2001, 2004; Schnetzinger *et al*, 2013)。LAMP-LFD技术是利用生物素标记的引物进行LAMP反应, 实现核酸的几何级数扩增, 随后将生物素标记的LAMP产物与异硫氰酸荧光素标记的特异性探针进行杂交, 杂交产物在经生物素抗体和异硫氰酸荧光素抗体处理的横向流动试纸条(lateral flow dipstick, LFD)上完成检测, 阳性的杂交产物会

在LFD的检测线位置呈现特征性的条带。相较于其它的LAMP产物检测手段, LFD无需任何仪器设备, 易于操作和携带; 而且可通过探针的特异性杂交进一步筛选扩增产物, 降低了结果的假阳性。该技术在传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)和海豚链球菌等多种水产病原微生物的基层即时检测中展示了良好的适用性(Ding *et al*, 2010; 王瑞娜等, 2014); 同时, 该方法在绿潮藻扁浒苔的鉴别诊断中也展示了一定的应用潜力(陈先锋等, 2015)。

本研究根据孔石莼核糖体DNA的内转录间隔区序列(rDNA-ITS)的保守区设计3对引物和1条异硫氰酸荧光素标记探针, 优化反应条件后, 建立LAMP-LFD技术, 为水体环境中孔石莼的定期检测和快速检测提供一种快捷可靠的方法。

1 材料与方法

1.1 藻种分离株及培养

实验所用的各微藻分离株(赤潮异弯藻、东海原甲藻、塔玛亚历山大藻、无纹环沟藻、锥状斯克里普藻等)由宁波大学海洋学院藻种实验室提供。实验中涉及的石莼属绿藻经母藻细断法分离后(Hiraoka *et al*, 1998), 按Duan等(2012)的方法于本实验室培养、保存。具体所用藻类见表1, 孔石莼分离株S66用于LAMP条件优化, 灵敏度优化, 特异性分析等试验。

表1 实验过程中使用的藻类分离株
Tab.1 Algal species used in LAMP-LFD assay

藻类名称	英文名称	分离株	来源
孔石莼	<i>Ulva pertusa</i>	S66	宁波检验检疫科学技术研究院培养
浒苔	<i>Ulva prolifera</i>	XS5	宁波检验检疫科学技术研究院培养(孙东等, 2011)
曲浒苔	<i>Ulva flexuosa</i>	SDF12	宁波检验检疫科学技术研究院培养(孙东等, 2011)
缘管浒苔	<i>Ulva linza</i>	HS42	宁波检验检疫科学技术研究院培养
-	<i>Ulva ohnoi</i>	FJ4	宁波检验检疫科学技术研究院培养
赤潮异弯藻	<i>Heterosigma akashiwo</i>	H1	周成旭博士惠赠(周成旭等, 2006)
东海原甲藻	<i>Prorocentrum donghaiense</i>	NMBjah045	周成旭博士惠赠(周成旭等, 2006)
塔玛亚历山大藻	<i>Alexandrium tamarense</i>	NMBjah048	周成旭博士惠赠(王金娜等, 2010)
无纹环沟藻	<i>Gyrodinium instriatum</i>	NMBjah046	周成旭博士惠赠(王金娜等, 2010)
锥状斯克里普藻	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	NMBjah044	周成旭博士惠赠(王金娜等, 2010)

1.2 藻类DNA的制备

按照植物组织基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)的步骤, 提取各藻类分离株的基因组DNA(Qiagen, Hilden, 德国)。获取的基因组DNA溶解于50 μ L的无菌去离子水中, 经Nanodrop 2000分光光

度计(Thermo Fisher Scientific, 美国)测定浓度后用作标准品, -30°C 贮存备用。

1.3 引物和探针设计

根据孔石莼的rDNA-ITS序列(GenBank登录号: HM584747), 在保守区域设计3对特异性引物(包括上

游外引物 UpeITS-F3、下游外引物 UpeITS-B3、上游内引物 UpeITS-FIP、下游内引物 UpeITS-BIP, 以及环引物 UpeITS-LF 和 UpeITS-LB), 用于 LAMP 实验(表 2, 图 1)。此外, 基于该扩增区段设计 1 条 DNA 探针 UpeITS-HP 用于 LFD 杂交试验(表 2, 图 1)。其中, 上游

内引物 UpeITS-FIP 的 5'端进行生物素(biotin)标记, 探针 UpeITS-HP 的 5'端进行异硫氰酸荧光素(FITC)标记。同时, 以外引物 UpeITS-F3 和 UpeITS-B3 进行常规 PCR 扩增, 扩增片段大小为 360 bp。引物的合成和标记均由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成。

表 2 孔石莼 rDNA-ITS 序列的 LAMP-LFD 引物和探针序列
Tab.2 The primers and DNA probe targeting rDNA-ITS of *U. pertusa* used in LAMP-LFD assay

引物	长度(碱基数)	序列(5'—3')	目的
UpeITS-F3	19-mer	TAGCCTCACCTGAACTCAG	LAMP/PCR
UpeITS-B3	18-mer	ACGGATATCTCGGCTCTC	LAMP/PCR
UpeITS-FIP(F1c+F2) ^a	39-mer(F1c:21-mer, F2:18-mer)	CGGCTGAAATACAGAGGCTCGTATCCTTCGTGGCTCACA	LAMP
UpeITS-BIP(B1c+B2)	39-mer(B1c:20-mer, B2: 19-mer)	GTTATTCGACGCTGAGGCAGCAGAATTCGTGAGTCAT	LAMP
UpeITS-LF	21-mer	TAGGTAGCTCGCTACTCCTAC	LAMP
UpeITS-LB	20-mer	GTGGTCTCATCCGAAGACTC	LAMP
UpeITS-HP ^b	20-mer	GCAAGCGCTGAGGGGTTAT	LFD

^a 上游引物 UpeITS-FIP 的 5'端进行 biotin 标记; ^b UpeITS-HP 的 5'端进行 FITC 标记

828 TAGCCTCACCTGAACTCAGGTCTCGAATGAATAGTGGGTATCCTTCGTG
UpeITS-F3 UpeITS-F2
781 GCTCACAGCAGCGACGCGGAGCCTCCGCCGTAGGAGTAGCGAGC
UpeITS-LFc
736 TACCTACTAGTCGGGGCCGCAATGGGCGCGCGAGCCTCTG
UpeITS-F1c
691 TATTTTCAGCCGCGCCGGCTGGCACGGGGCCAGTGACCGGGGGG
647 GCCAGGTCCACGCGCAAGCGCGTGAGGGGTTATTCGACGCTGAG
UpeITS-HP UpeITS-B1c
602 GCAGATGTGGTCTCATCCGAAGACTCGACCGGAATGTGCGTTCAA
UpeITS-LB
556 AGATTCGATGACTCACGGAATCTGCAATTCACACTACGTATCGCATT
UpeITS-B2c
TCGCTGCGTTCTTCATCGTTCGAGAGCCGAGATATCCCGT
UpeITS-B3c

图 1 孔石莼 rDNA-ITS 序列的 LAMP 引物设计示意图

Fig.1 Design of primers and DNA probe targeting ITS1-5.8S-ITS2 of *U. pertusa* used in LAMP-LFD assay
UpeITS-LFc, UpeITS-B1c, UpeITS-B2c 和 UpeITS-B3c 分别是 UpeITS-LF, UpeITS-B1, UpeITS-B2 和 UpeITS-B3 的互补序列

1.4 LAMP 反应条件确立

LAMP 反应体系参照 Ding 等(2010), 具体组成包括(25 μ L): UpeITS-F3 和 UpeITS-B3 各 0.2 μ mol/L, UpeITS-FIP 和 UpeITS-BIP 各 1.6 μ mol/L, UpeITS-LF 和 UpeITS-LB 各 0.4 μ mol/L, Tris-HCl (pH 8.80) 20mmol/L, KCl 10mmol/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10mmol/L, MgSO_4 6.5mmol/L, dNTPs 1.4mmol/L, betaine 0.8mol/L, Triton X-100 0.1%, *Bst* DNA 聚合酶(New England BioLabs, 美国) 8U, 藻类基因组 DNA 标准品 1 μ L, 无菌去离子水补足 25 μ L 体系。对于反应条件的优化, 主要从反应温度和时间两个方面考虑。*Bst* DNA 聚合酶的最佳活性温度范围在 60—65 $^{\circ}\text{C}$, 根据已经建立的多个 LAMP 方法, 我们得出 63 $^{\circ}\text{C}$ 和 65 $^{\circ}\text{C}$ 是最为常用的温度。因此, 本研究中 LAMP 反应的温度设定为 63 $^{\circ}\text{C}$, 并在此基础上完成了引物的筛选。为

进一步分析 DNA 模板浓度与 LAMP 反应效率之间的关系, 我们在 LAMP 反应体系中加入 0.1 mmol/L SYTO 9 荧光染料 (Invitrogen, 美国), 在晶芯 RT-Cycler 实时荧光定量 PCR 仪(博奥生物有限公司, 中国)上进行 LAMP 反应(即实时荧光 LAMP 反应), 据此可实时观察反应产物的生成情况。操作可大致概括为: 将孔石莼 S66 的 DNA 标准品以 10 倍浓度单位进行梯度稀释, 取 3.04×10^2 、 3.04×10^1 、 3.04×10^0 、 3.04×10^{-1} 、 3.04×10^{-2} 、 3.04×10^{-3} 和 3.04×10^{-4} pg/ μ L 等 7 个浓度的基因组 DNA 为模板, 在 63 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 LAMP 反应, 根据起峰时间和扩增强度分析反应时间与模板浓度之间的关系, 并初步确定 LAMP 反应的时间; 实时荧光 LAMP 的反应程序如下: 63 $^{\circ}\text{C}$ 1min; 63 $^{\circ}\text{C}$ 15s 和 63 $^{\circ}\text{C}$ 45s, 60 个循环, 于每个循环的 63 $^{\circ}\text{C}$ 45s 末端收集荧光信号。在此基础上, 分别选取较高浓度和最低检测浓度的基因组 DNA 为模板, 反应时间依次设置为 10、20、30、40、50 和 60min, 进行 LAMP 反应, 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 最终确定其反应时间。

1.5 利用 LFD 检测 LAMP 产物

经 biotin 标记的 LAMP 反应结束后, 向反应体系中加入 2 μ L 10pmol/ μ L 的探针 UpeITS-HP, 63 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 5 min, 最后 80 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5min 终止反应, 反应产物可利用 LFD 试纸条(Milenia GenLine HybriDetect, Milenia Biotec, 德国)检测, 具体操作如下: 取 80 μ L Buffer (Milenia GenLine HybriDetect, Milenia Biotec, 德国)于 1.5mL 离心管内, 加入 5 μ L 杂交液混匀, 将试纸条

检测端竖直浸没预混液中反应 5min, 肉眼判断结果。当 FITC 标记的探针与 biotin 标记的扩增产物特异性杂交后, 杂交产物与胶体金标记的 FITC 抗体结合形成的三元复合物结合在带有 biotin 抗体的检测线上; 多余的探针则与胶体金标记的 FITC 抗体结合后越过检测线, 最终结合在质控线上。

1.6 LAMP-LFD 的特异性验证

选择浒苔(*U. prolifera*) XS5、曲浒苔(*U. flexuosa*) SDF12、缘管浒苔(*U. linza*) HS42、*U. ohnoi* FJ4 等常见石莼属绿藻分离株, 以及赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*) H1、东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)、NMBjah045 塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarensense*) NMBjah048、无纹环沟藻(*Gyrodinium instriatum*) NMBjah046 和锥状斯克里普藻(*Scrippsiella trochoidea*) NMBjah044 等国内常见微藻种类, 用于 LAMP-LFD 的特异性实验。用于特异性实验的各藻类分离株的模板浓度统一调整为 $1.0 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{L}$, 产物分别采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和 LFD 进行检测。

1.7 LAMP-LFD 的灵敏度分析

取稀释后的孔石莼分离株 S66 的 6 个不同浓度的基因组 DNA (3.04×10^2 — $3.04 \times 10^{-3} \text{ pg}/\mu\text{L}$) 为模板, 按优化后的体系和条件进行有生物素标记的 LAMP 反应, 扩增产物分别采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和 LFD 进行检测。

以上述 6 个浓度的基因组 DNA 为模板, 外引物 UpeITS-F3 和 UpeITS-B3 为引物, 进行 PCR 扩增。25 μL PCR 反应体系, 包括: 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , dNTPs (0.25mmol/L) 2 μL , 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ UpeITS-F3 1 μL , 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ UpeITS-B3 1 μL , 5U/ μL *rTaq* DNA 聚合酶 (TaKaRa, 大连, 中国) 0.25 μL , 基因组 DNA 模板 1 μL , 用无菌去离子水补足 25 μL 体系。PCR 反应程序如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8 LAMP-LFD 的重复性实验

重新培养孔石莼分离株 S66, 平行制备 3 个样品, 按步骤 1.2 的方法提取基因组 DNA, 测定浓度后将浓度稀释至 LAMP-LFD 的最低检测浓度, 并以此为模板, 进行有生物素标记的 LAMP 反应, 产物分别采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和 LFD 进行检测。

1.9 海水样品检测

从福建和青岛等地区收集海水样品 17 份。样品经 100 目的筛绢网过滤后, 各取 400mL 水样培养于

500mL 的三角烧瓶中若干天, 至成熟藻体长成, 培养方法参照 Duan 等(2012)所述。成熟藻体用于形态学鉴定。另取筛绢网滤后水样 250mL 按步骤 1.2 的方法提取基因组 DNA, 利用 LAMP-LFD 和 PCR 进行鉴定。

2 结果

2.1 LAMP 反应时间的优化

在 63 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 以不同浓度的基因组 DNA 为模板进行的实时荧光 LAMP 实验结果表明, 当模板浓度在 $3.04 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 至 $3.04 \times 10^{-2} \text{ pg}/\mu\text{L}$ 范围内均可获得明显扩增(图 2A), 起峰时间随模板浓度降低而增加(图 2A), 范围约在 17—33min 之间(图 2A, 2B), 呈典型的线性相关性(图 2B)。各反应均在约 50min 时, 相对荧光强度达到平台期(图 2A)。当以较高浓度 ($3.04 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{L}$) 的基因组 DNA 为模板时, LAMP 扩增 30min 即可通过琼脂糖凝胶电泳的方式检测到明显的梯形条带, 反应至 40min 及以后产物浓度不再明显增加(图 2C)。当以较低浓度的基因组 DNA ($3.04 \times 10^{-2} \text{ pg}/\mu\text{L}$) 为模板时, 发现反应时间达到 40min 才能观察到明显的梯形条带, 至 50min 及以后产物浓度不再显著增加(图 2D), 与扩增曲线的结果(图 2A)相一致。因此, 确定 LAMP 的最适反应时间为 50min。

2.2 LAMP-LFD 检测的特异性

除孔石莼外, 选择其它 9 株国内常见的石莼属绿藻或微藻的基因组 DNA ($1.00 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{L}$) 为模板, 进行有生物素标记的实时荧光 LAMP 反应, 条件为 63 $^{\circ}\text{C}$ 反应 50min。结果表明, 以孔石莼的基因组 DNA 为模板的 LAMP 反应, 15min 左右即出现明显“S”形荧光曲线(图 3A), 利用琼脂糖凝胶电泳检测也出现明显的梯形条带(图 3B), LFD 的检测线位置也出现明显的条带(图 3C); 而以其它 9 种藻类基因组 DNA 为模板时, 实时荧光曲线呈光滑曲线, 未见明显扩增(图 3A), 琼脂糖凝胶电泳的结果未呈现梯形条带(图 3B), LFD 的检测线位置也未能检测到明显条带(图 3C), 检测结果为阴性。

2.3 LAMP-LFD 检测的灵敏度

结果表明, 当孔石莼的基因组 DNA 模板浓度稀释至 $3.04 \times 10^{-2} \text{ pg}/\mu\text{L}$ 时, 利用琼脂糖凝胶电泳仍可清晰地检测到梯形条带(图 4A), LFD 检测线位置也呈现明显的条带(图 4B); 当模板浓度进一步稀释至 $3.04 \times 10^{-3} \text{ pg}/\mu\text{L}$ 时, 琼脂糖凝胶电泳未能检测到梯形

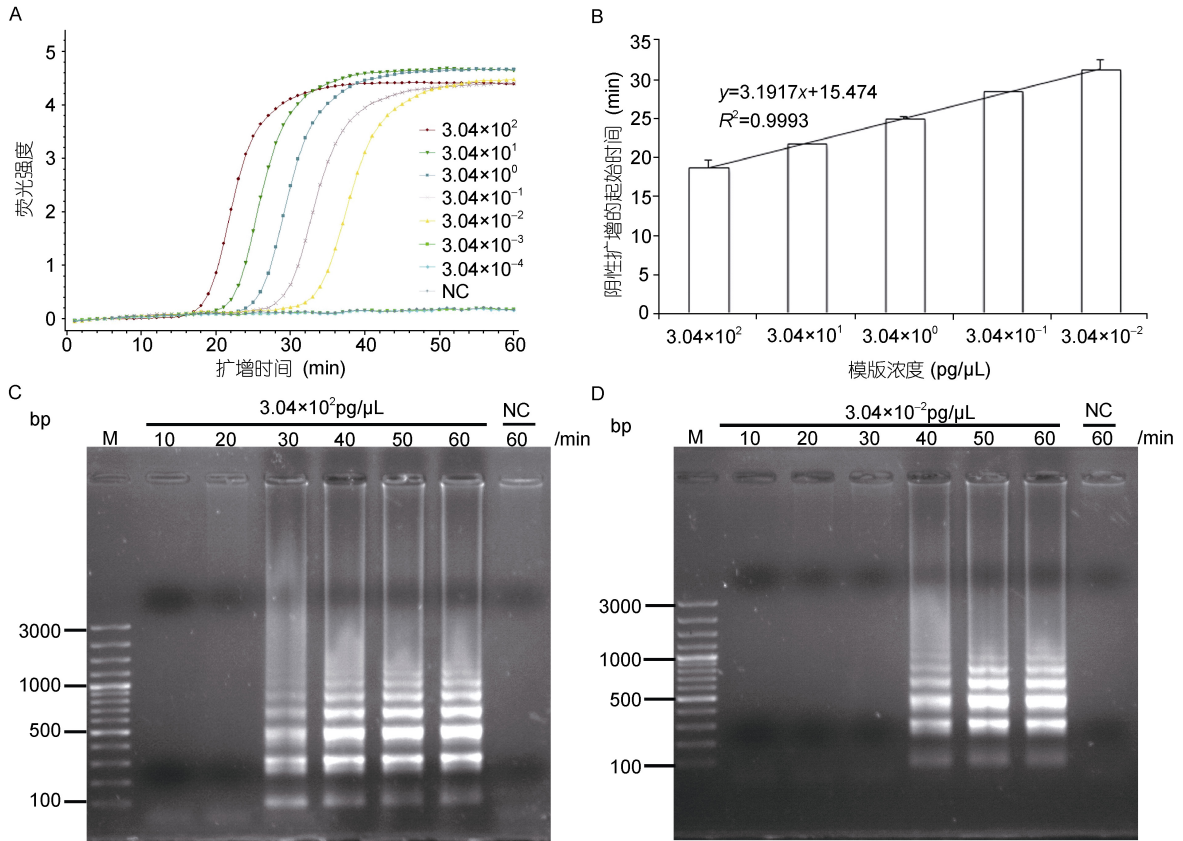


图2 LAMP 检测孔石莼最适反应时间的确定

Fig.2 Time optimization of LAMP for detection of *U. pertusa*

A: 不同浓度的基因组 DNA 为模板的实时荧光 LAMP 反应; NC, 不加任何 DNA. B: 扩增起始时间(起峰时间)与基因组 DNA 浓度的关系, 呈典型的线性相关性. C: 以较高浓度(3.04×10^2 pg/ μ L)基因组 DNA 为模板时, 不同反应时间下的 LAMP 产物. D: 以较低浓度(3.04×10^{-2} pg/ μ L)基因组 DNA 为模板时, 不同反应时间下的 LAMP 产物

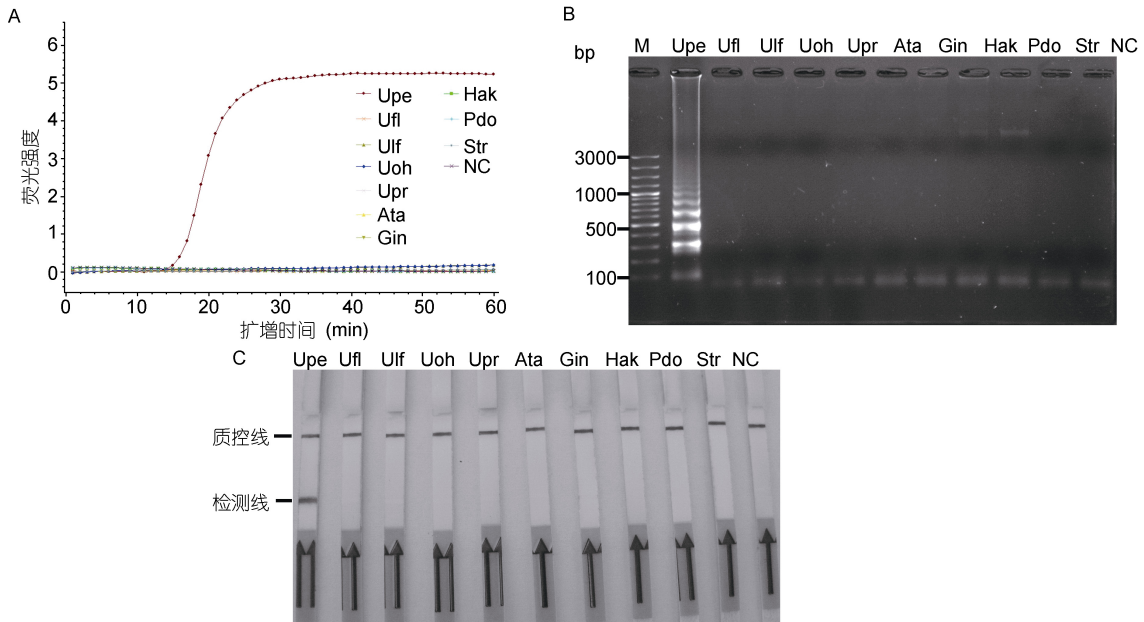


图3 LAMP(A、B)和 LAMP-LFD(C)的特异性实验结果

Fig.3 Specificity test of LAMP (A, B) and LAMP-LFD (C) for detection of *U. pertusa*

Upe, 孔石莼 S66; Ufl, 曲浒苔 SDF12; Uli, 缘管浒苔 HS42; Uoh, *Ulva ohnoi* FJ4; Upr, 浒苔 XS5; Ata, 塔玛亚历山大藻 NMBjah048; Gin, 无纹环沟藻 NMBjah046; Hak, 赤潮异弯藻 H1; Pdo, 东海原甲藻 NMBjah045; Str, 锥状斯克里普藻 NMBjah044; NC, 蒸馏水

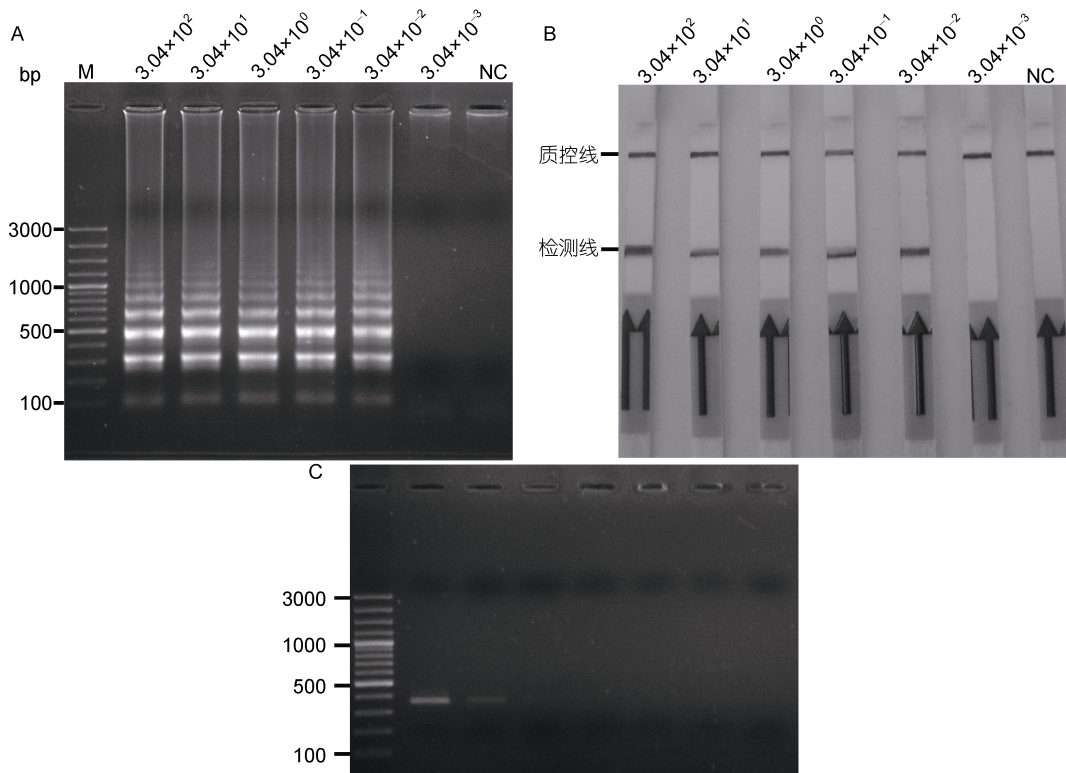


图4 LAMP(A)、LAMP-LFD(B)和PCR(C)检测孔石莼的灵敏度比较

Fig.4 Comparison in detection limit to *U. pertusa* by LAMP (A), LAMP-LFD (B), and PCR (C)
 NC: 不添加任何 DNA 模板; 3.04×10^2 — 3.04×10^{-3} : 孔石莼的基因组 DNA 浓度, 单位: $\text{pg}/\mu\text{L}$. LAMP-LFD 检测到的最低模板浓度为 $3.04 \times 10^{-2} \text{pg}/\mu\text{L}$; LAMP 为 $3.04 \times 10^2 \text{pg}/\mu\text{L}$; PCR 方法为 $3.04 \times 10^1 \text{pg}/\mu\text{L}$

条带(图 4A), LFD 检测线位置也未见条带(图 4B), 结果阴性, 该结果与实时荧光 LAMP 的检测结果一致(图 2A); 以外引物 UpeITS-F3 和 UpeITS-B3 为特异性引物的 PCR 反应, 检测灵敏度为 $3.04 \times 10^1 \text{pg}/\mu\text{L}$ (图 4C)。上述结果表明 LAMP-LFD 的灵敏度可达 $3.04 \times 10^{-2} \text{pg}/\mu\text{L}$, 是常规 PCR 方法灵敏度的 1000 倍。

2.4 LAMP-LFD 检测的重复性

结果表明, 以灵敏度浓度(约 $3.04 \times 10^{-2} \text{pg}/\mu\text{L}$)的孔石莼基因组 DNA 为模板, 在 63°C 反应 50min 条件下进行的 LAMP 反应, 产物利用 LFD 试纸条和琼脂糖凝胶电泳两种方式检测, 均能稳定地检测到目的产物的有效扩增(图 5); 以无菌去离子水为模板时, 结果皆为阴性(图 5); 这说明孔石莼的 LAMP-LFD 方法具有良好的技术重复性。

2.5 LAMP-LFD 检测海水样品中藻类的适用性分析

从青岛和福建等地区采集 17 份海水样品, 对 LAMP-LFD 方法应用于野外样本检测的适用性进行分析。对收集样本利用传统的显微观察方法鉴定发现来自青岛的 ZQ-5、TD-4、S73、S77 以及 S78 等 5 个

样品为孔石莼(表 3); LAMP-LFD 的检测结果表明青岛的 ZQ-4、ZQ-5、TD-2、TD-4、S73、S77 以及 S78 为孔石莼(表 3); 利用 PCR 的方法同样获得青岛的 ZQ-4、ZQ-5、TD-2、TD-4、S73、S77 以及 S78 为孔石莼(表 3), 其余样品呈阴性。

3 讨论

富营养化海区暴发的绿潮灾害已逐渐成为我国某些海域的常态化现象, 严重影响到当地的海水养殖和旅游业(Hiraoka *et al*, 2004; Sun *et al*, 2008)。研究证实, 原本多数具有较好的食用和药用价值的石莼属藻类如浒苔和孔石莼等, 如今已成为导致绿潮灾害频发的主要因素(Wang *et al*, 2015; Zhou *et al*, 2015)。传统的基于藻类形态学特征的显微镜观察方法, 需经过海水样本的过筛、培养等步骤培养出藻体, 除对培养设施和操作人员有较高要求外, 整个培养周期过长(30d 左右), 不能及时有效的反映藻类的分布情况。因此, 本研究以孔石莼的作为检测靶标, 建立了快速、准确的 LAMP-LFD 方法, 为孔石莼的快速筛选和鉴定提供了一种可靠方法。

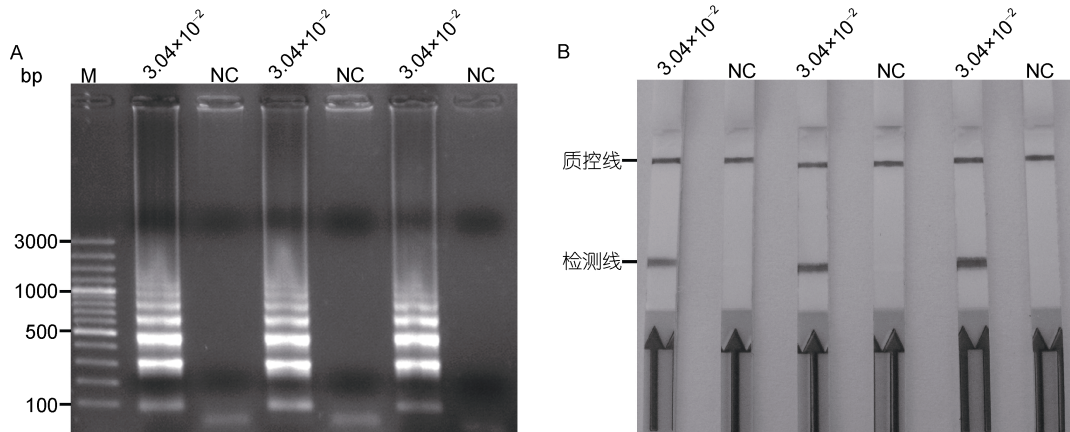


图 5 LAMP(A)和 LAMP-LFD(B)的重复性实验

Fig.5 Reproducibility of LAMP-LFD(A) and LAMP (B) for detection of *U. pertusa*
 NC: 不添加任何 DNA 模板; 3.04×10^{-2} , 孔石莼基因组 DNA 的浓度, 单位: $\text{pg}/\mu\text{L}$

表 3 利用显微观察、LAMP-LFD 以及 PCR 方法对海水样品中孔石莼的检测结果

Tab.3 Detection of *U. pertusa* from field samples by microscopic examination, LAMP-LFD, and PCR

样品编号	来源地	检测方法		
		显微观察	LAMP-LFD	PCR
ZQ-1	青岛	—	—	—
ZQ-2	青岛	—	—	—
ZQ-3	青岛	—	—	—
ZQ-4	青岛	—	+	+
ZQ-5	青岛	+	+	+
TD1	青岛	—	—	—
TD2	青岛	—	+	+
TD3	青岛	—	—	—
TD4	青岛	+	+	+
S69	青岛	—	—	—
S70	青岛	—	—	—
S73	青岛	+	+	+
S77	青岛	+	+	+
S78	青岛	+	+	+
FJ-10	福建	—	—	—
FJ-11	福建	—	—	—
FJ-12	福建	—	—	—

耗时短是目前核酸检测类方法追求的重要目标。LAMP 的扩增反应通常可在 1h 内完成, 尤其添加环引物, 可明显缩短 LAMP 的反应时间, 这也是 LAMP 方法相较于基于 PCR 原理的分子检测技术的重要优点。本研究中, 在添加环引物的前提下, 当 DNA 模板浓度较高, LAMP 反应在 20min 之内即可出现阳性扩增(图 2A); 通过琼脂糖凝胶电泳检测发现, 30min 时即可观察到明显的梯形条带(图 2C); 当模板浓度

降低至最低检测浓度时, 利用琼脂糖凝胶电泳的方法在 40min 也可以清晰地检测到梯形条带, 反应至 50min 左右时, 产物量即可达到最大值(图 2D)。当使用 LFD 检测时, LAMP 产物只需经过与特异性探针杂交 5min, 再将 LFD 试纸条浸入添加有杂交产物的反应液 3—5min, 即可完成结果判读。因此, 考虑到从 LAMP 反应开始计算, 整个检测时程在 1h 左右。除此之外, LAMP 反应的体系组成也是建立 LAMP 方法过程中重点考虑的因素。本研究使用的体系组成主要参考自 Ding 等(2010)的方法; 在此基础上, 通过添加荧光染料 SYTO 9, 利用荧光曲线得出 LAMP 扩增的起峰时间与 DNA 的浓度成线性关系, 模板浓度约低, LAMP 反应的起峰时间越延迟(图 2B)。

由于近年来石莼属绿藻引发的绿潮灾害逐渐引起人们的重视, 多种基于核酸的分子检测技术在绿潮藻类的检测与鉴定中取得了应用。其中, 基于 PCR 原理的核酸扩增技术占多数。Liu 等(2012)借助于核酸测序技术, 对 2007—2011 年间江苏省近海的绿潮藻类情况进行了调查, 发现浒苔(*U. prolifera*)能够抵抗该海域强烈的环境变化, 是该海域的主要优势藻类。Duan 等(2012)借助于内转录间隔区(ITS)、二磷酸核酮糖羧化酶大亚基基因(*rbcL*)以及 5S rDNA 等藻类常用的分子标志, 对采集于黄海的部分样本的藻类信息进行了分析, 发现该海域中存在有扁浒苔、孔石莼、缘管浒苔, 以及浒苔等多种绿潮藻类。Xiao 等(2013)基于 ITS 序列建立了 PCR-RFLP 技术, 应用于黄海海域石莼属和盘苔属藻类的鉴别。Zhao 等(2015)利用建立的 PCR-ISSR 技术(PCR-inter-simple sequence repeat)对黄海海域的漂浮浒苔分析发现, 浒苔的一个

独特的生态型是引起全球性绿潮的重要原因, 固着生长的浒苔种类不是该生态型的物种来源, 这两种不同生活方式的浒苔种之间很难发生基因漂流现象。Zhang 等(2015)建立了荧光原位杂交技术(FISH), 该技术无需依赖于 PCR 的核酸扩增, 借助于针对浒苔 5S rDNA 序列的特异性探针即可将浒苔与缘管浒苔、曲浒苔、扁浒苔、孔石莼, 以及盘苔属藻类区分开来。检测灵敏度是核酸检测类技术的重要指标。段维军等(2012)针对扁浒苔 ITS 序列建立的 PCR 方法最低可检测到 10 pg 的藻类基因组 DNA; 本实验室先前也针对扁浒苔的 rDNA-ITS 序列建立了 LAMP-LFD 技术, 最低可检测到 0.1 pg 的扁浒苔基因组 DNA(陈先锋等, 2015)。Chen 等(2016)基于多重 PCR 的原理建立的基因芯片技术能够特异性检测浒苔、扁浒苔等多种藻类, 最低检测灵敏度可达 0.5 ng 的基因组 DNA。本研究建立的 LAMP-LFD 技术, 能够将孔石莼与浒苔、曲浒苔和缘管浒苔等加以区分, 最低可检测到 3.04×10^{-2} pg/ μ L 的孔石莼基因组 DNA, 是以 UpeITS-F3 和 UpeITS-B3 为特异性引物的 PCR 方法的 1000 倍。17 个海水样本的检测结果表明, LAMP-LFD 方法检测孔石莼与传统的形态学观察的结果基本一致。因此, 该方法作为一种快检技术, 可作为孔石莼现场检测的重要工具并加以推广。

4 结论

本研究以孔石莼的 rDNA-ITS 序列为检测靶标建立了 LAMP-LFD 方法能够特异性地应用于孔石莼的检测。该方法检测时间短, 从核酸扩增到 LFD 结果展示, 整个检测过程仅需 60min。该方法具有良好的检测灵敏度, 最低可检测到 3.04×10^{-2} pg/ μ L 的孔石莼基因组 DNA。由于该技术从核酸扩增开始的整个检测过程能够彻底摆脱对于仪器设备的依赖性, 容易操作上手, 作为一种新型技术, 有望成为我国东部沿海孔石莼快速检测的有效手段之一。

参 考 文 献

- 王金娜, 严小军, 周成旭等, 2010. 产油微藻的筛选及中性脂动态积累过程的检测. 生物物理学报, 26(6): 472—480
- 王瑞娜, 周前进, 陈 炯, 2014. 环介导等温扩增联合横向流动试纸条可视化检测海豚链球菌方法的建立. 农业生物技术学报, 22(12): 1584—1594
- 孙 东, 孙存华, 段维军等, 2011. 宁波地区石莼属绿藻形态学观察及分子生物学鉴定. 安徽农业科学, 39(12): 6936—6938, 6942
- 陈先锋, 周前进, 王瑞娜等, 2015. 环介导等温扩增联合横向流动试纸条快速检测扁浒苔(*Ulva compressa*)的研究. 海洋与湖沼, 46(4): 819—827
- 周成旭, 马 斌, 汪飞雄等, 2006. 海洋原甲藻与三角褐指藻混合培养条件下的种群生长与氮磷营养盐变化. 海洋科学, 30(12): 58—61
- 段维军, 郭立新, 陈先锋等, 2012. 扁浒苔 PCR 快速检测方法研究. 海洋科学, 36(1): 30—35
- Blomster J, Bäck S, Fewer D P *et al*, 2002. Novel morphology in *Enteromorpha* (Ulvophyceae) forming green tides. American Journal of Botany, 89(11): 1756—1763
- Blomster J, Maggs C A, Stanhope M J, 1999. Extensive intraspecific morphological variation in *Enteromorpha muscoides* (Chlorophyta) revealed by molecular analysis. Journal of Phycology, 35(3): 575—586
- Chen X F, Zhou Q J, Duan W J *et al*, 2016. Development and evaluation of a DNA microarray assay for the simultaneous detection of nine harmful algal species in ship ballast and seaport waters. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 34(1): 86—101
- Ding W C, Chen J, Shi Y H *et al*, 2010. Rapid and sensitive detection of infectious spleen and kidney necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. Archives of Virology, 155(3): 385—389
- Duan W J, Guo L X, Sun D *et al*, 2012. Morphological and molecular characterization of free-floating and attached green macroalgae *Ulva* spp. in the Yellow Sea of China. Journal of Applied Phycology, 24(1): 97—108
- Ghadiryfar M, Rosentrater K A, Keyhani A *et al*, 2016. A review of macroalgae production, with potential applications in biofuels and bioenergy. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 54: 473—481
- Hiraoka M, Enomoto S, 1998. The induction of reproductive cell formation of *Ulva pertusa* Kjellman (Ulvales, Ulvophyceae). Phycological Research, 46(3): 199—203
- Hiraoka M, Shimada S, Uenosono M *et al*, 2004. A new green-tide-forming alga, *Ulva ohnoi* Hiraoka et Shimada sp. nov. (Ulvales, Ulvophyceae) from Japan. Phycological Research, 52(1): 17—29
- Lin Z J, Lin Z H, Li H H *et al*, 2012. Sequences analysis of ITS region and 18S rDNA of *Ulva*. ISRN Botany, 2012: 468193
- Liu F, Pang S J, Zhao X B *et al*, 2012. Quantitative, molecular and growth analyses of *Ulva* microscopic propagules in the coastal sediment of Jiangsu province where green tides initially occurred. Marine Environmental Research, 74: 56—63
- Montingelli M E, Tedesco S, Olabi A G, 2015. Biogas production from algal biomass: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 43: 961—972
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N *et al*, 2001. Detection of

- loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(1): 150—154
- Mori Y, Kitao M, Tomita N *et al*, 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 59(2): 145—157
- Nie K, Zhao X, Ding X *et al*, 2013. Visual detection of human infection with influenza A (H7N9) virus by subtype-specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(8): e372—e375
- Niu J H, Jian H, Guo Q X *et al*, 2012. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. *Plant Pathology*, 61(4): 809—819
- Notomi T, Mori Y, Tomita N *et al*, 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, 53(1): 1—5
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H *et al*, 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12): e63
- Parida M, Sannarangaiah S, Dash P K *et al*, 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 18(6): 407—421
- Schnetzing F, Pan Y W, Nocker A, 2013. Use of propidium monoazide and increased amplicon length reduce false-positive signals in quantitative PCR for bioburden analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(5): 2153—2162
- Smetacek V, Zingone A, 2013. Green and golden seaweed tides on the rise. *Nature*, 504(7478): 84—88
- Sun S, Wang F, Li C L *et al*, 2008. Emerging challenges: Massive green algae blooms in the Yellow Sea. *Nature Precedings*, <http://hdl.handle.net/10101/npre.2008.2266.1>
- Torres F A E, Passalacqua T G, Velásquez A M A *et al*, 2014. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(3): 265—276
- Wang J F, Li Nan, Jiang P *et al*, 2010. *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulveaceae, Chlorophyta) from two sides of the Yellow Sea: analysis of nuclear rDNA ITS and plastid *rbcL* sequence data. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 28(4): 762—768
- Wang Z L, Xiao J, Fan S L *et al*, 2015. Who made the world's largest green tide in China?-an integrated study on the initiation and early development of the green tide in Yellow Sea. *Limnology and Oceanography*, 60(4): 1105—1117
- Xiao J, Li Y, Song W *et al*, 2013. Discrimination of the common macroalgae (*Ulva* and *Blidingia*) in coastal waters of Yellow Sea, northern China, based on restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis. *Harmful Algae*, 27: 130—137
- Zhang Q C, Liu Q, Kang Z J *et al*, 2015. Development of a fluorescence *in situ* hybridization (FISH) method for rapid detection of *Ulva prolifera*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 163: 103—111
- Zhao J, Jiang P, Qin S *et al*, 2015. Genetic analyses of floating *Ulva prolifera* in the Yellow Sea suggest a unique ecotype. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 163: 96—102
- Zhou M J, Liu D Y, Anderson D M *et al*, 2015. Introduction to the special issue on green tides in the Yellow Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 163: 3—8

DEVELOPMENT OF A NOVEL LAMP-LFD METHOD FOR RAPID DETECTION OF *ULVA PERTUSA*

ZHOU Qian-Jin¹, CHEN Xian-Feng^{1,2}, CAI Yi¹, DUAN Li-Jun², DUAN Wei-Jun²,
MIAO Liang¹, CHEN Jiong¹

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Academy of Inspection and Quarantine, Ningbo 315012, China)

Abstract We developed a novel LAMP-LFD method for rapid detection of *Ulva pertusa* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) integrated with visual detection by a lateral flow dipstick assay (LFD). Six primers were designed according to the conserved regions of internal transcribed spacer (ITS) (among the primers, the forward inner primer was biotinylated) and used in the LAMP assay. In addition, a specific probe was designed based on the conserved sequence amplified by both outer primers, and labeled by fluorescein isothiocyanate (FITC). The biotinylated LAMP amplicons were hybridized exclusively with the FITC-labeled probe and detected via LFD. The optimized LAMP assay to detect *U. pertusa* was performed at 63 °C for 50 min, and for only 60 min when visualization via LFD is incorporated. The results demonstrate that LAMP-LFD could specifically detect *U. pertusa* and no characteristic amplification was observed when using genomic DNA of other 9 common algal isolates responsible for green tide or red tide. The detection limit using genomic DNA of *U. pertusa* was 3.04×10^{-2} pg/ μ L, which was 1000 times lower than that of the conventional PCR method using both outer primers. *U. pertusa* could be successfully detected from field samples by LAMP-LFD, which is coincident with the results obtained by the traditional microscopic examination. Therefore, the LAMP-LFD method is specific, sensitive, and easy, showing great potential in the rapid detection and routine monitoring of *U. pertusa* in the eastern coast of China.

Key words *Ulva pertusa*; internal transcribed spacer; loop-mediated isothermal amplification; lateral flow dipstick; detection