

基于 LAMP-LFD 技术的有害赤潮藻东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*)快检方法*

邹怡欣 黄海龙 乔龙亮 党晨阳 庞建虎 吕佩文 王佳棋 朱 鹏

(宁波大学海洋学院 宁波 315211)

摘要 以东海原甲藻的 ITS 序列(Internal transcribed spacer, ITS)为检测靶标,将生物素标记的环介导恒温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)扩增产物与经异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的探针特异性杂交,并结合横向流动试纸条(Lateral flow dipstick, LFD)肉眼直接观察检测结果,建立了有害赤潮藻东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)的快速检测技术。经优化后的最适条件为 63°C、30min,较常规 PCR 扩增缩短约 2h。结果表明: LAMP-LFD 可特异性检出东海原甲藻,对常见赤潮藻检测结果均为阴性;其对东海原甲藻基因组 DNA 的检测最低限为 47pg/ μ L,是常规 PCR 技术(以 F3/B3 为引物的)的 10 倍。LAMP-LFD 技术能高效、特异地检出东海原甲藻,仪器设备依赖性低,结果可视化,有望成为赤潮原因种检测监控的常规方法。

关键词 东海原甲藻;环介导恒温扩增技术;横向流动试纸条;生物快检

中图分类号 X55 doi: 10.11693/hyhz20170800208

赤潮灾害频发已经成为制约海洋经济可持续发展的严重环境问题之一(Zingone *et al*, 2000; 曹敏杰, 2015)。东海是中国近海赤潮问题最严重的海区(任姝彤, 2015),而东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)作为一种有害赤潮藻,已成为东海赤潮多发区最具有代表性的藻种之一(朱德弟等, 2009; 周名江等, 2003。其在长江口附近、浙江近海以及福建沿岸海域几乎每年都会引发世界罕见的大规模赤潮。该藻是由 Lu 等(2005)在东海分离的一种原甲藻,依照其超微结构,细胞形状特性,确定为一种新种。过去的二十年间,东海原甲藻暴发赤潮频率高范围广,且持续时间长,其现场密度(细胞密度 10^7 ind./L)对较低等的浮游动物的繁殖存在一定程度的不利影响(Li *et al*, 2010; Lu *et al*, 2005)。2000 年以来,东海原甲藻连续几年在我国舟山群岛和东海长江口海域暴发了大规模赤潮(邓光等, 2009)。2008 年,东海原甲藻赤潮又出现在浙江渔山列岛和中街山列岛,面积均超过 1000km² (龙华等,

2008)。2010 年 6 月,福建定海湾发生东海原甲藻与夜光藻双相赤潮,海区表层水体中东海原甲藻细胞数平均值高达 1.47×10^7 ind./L(李正华, 2016)。据数据显示,2001 至 2010 年间每年都有东海原甲藻赤潮暴发,在 2013 年东海原甲藻作为第一优势种引发赤潮的次数达 16 次,高于其他赤潮引发种位居第一(黄海燕等, 2016)。

早期赤潮生物的分析鉴定以形态学观察为主,但东海原甲藻形态微小且与其他原甲藻相似度高,故难以用显微镜鉴定进行区分。在东海原甲藻被分离定为新种之初就与美国国家海洋藻种中心(Culture center of marine phytoplankton, CCMP)保藏的编号为 CCMP1517 的具齿原甲藻(*Prorocentrum dentatum*)藻株是否为同一个种产生了较大争议(吕颂辉等, 2003; 齐雨藻等, 2003; 罗立明, 2006)。由此看来,相似的形态特征给藻类鉴定带来了很大困难,而日益严重的赤潮灾害需要更加特异、准确、快速的检测手段。

* 宁波市科技攻关项目, 2017C110003 号; 浙江省公益技术应用研究, 2017C33133 号; 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目, CARS-47 号。邹怡欣, 本科生, E-mail: zouyixin1995@foxmail.com

通讯作者: 朱 鹏, 硕士生导师, 副教授, E-mail: zhupengnbu@163.com

收稿日期: 2017-08-18, 收修改稿日期: 2017-11-20

环介导恒温扩增技术结合横向试纸条 (Loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick, LAMP-LFD) 作为新兴检测技术, 在快速检测方面已被多次应用, 如检测海豚链球菌(王瑞娜等, 2014)、猪瘟病毒(朱俊灵等, 2016)、鳃利斯顿氏菌(董培培等, 2011)等。结果显示此技术具有较高的特异性及灵敏度, 具备高效的经济及社会效益。陈先锋等(2015)、Huang 等(2017)分别将 LAMP-LFD 技术应用于扁浒苔(*Ulva compressa*)和剧毒卡罗藻(*Karlodinium veneficum*)的检测, 印证了此技术在藻类的快速检测上的巨大优势。

本研究采用了核酸环介导恒温扩增技术, 该方法最初由 Notomi 等(2000)人设计并用于病原微生物的检测。针对靶基因的不同区域设计了 4 种特异性引物, 与此同时, 利用 *Bst* DNA 聚合酶的链置换活性在恒温条件下(60—65°C)高效(0.5—1h)扩增目标 DNA, 并结合横向流动试纸条 (Lateral flow dipstick, LFD) 试纸条直接对结果进行检测, 进一步简化实验操作。LAMP-LFD 技术通过将 LAMP 引物中的上游内引物 FIP、环引物 LF 分别进行生物素标记和异硫氰酸荧光素标记后进行基因组 DNA 的恒温扩增, 扩增产物采用具有生物素抗体和异硫氰酸荧光素抗体的横向流动试纸条进行检测, 肉眼直接观察结果。和其他 LAMP 产物检测手段相比, LFD 操作简便, 安全无污染, 不需任何仪器设备; 通过探针的特异性杂交进一步降低结果的假阳性(周前进, 2016)。

本研究根据东海原甲藻 DNA 的 ITS 序列设计了 3 对引物及 1 条异硫氰酸荧光素标记的探针, 经优化反应条件后建立 LAMP-LFD 检测技术, 为东海原甲藻的检测提供一种快速便捷的检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株和样品

选取有害赤潮藻东海原甲藻作为实验对象, 并选取塔玛亚历山大藻、盒型藻、裸甲藻、中肋骨条藻、米氏凯伦藻、赤潮异弯藻、剧毒卡罗藻 7 种常见赤潮引发种用于 LAMP-LFD 技术的特异性分析实验, 藻种具体信息见表 1。藻种均由宁波大学海洋学院藻种库提供。

藻种使用 f/2 海水培养基, 光照强度 18—27 mol/(m²·s), 温度 22°C, 盐度 23—25 个单位, 12h 光暗交替, 静置培养。为了避免藻细胞结块, 需每天手动摇瓶 3 次, 待所有培养物在相同条件下生长至固定相后用于实验(Kiatpathomchai *et al*, 2008)。

表 1 用于 LAMP-LFD 方法检测的藻种
Tab.1 Algal species for assay

藻名	英文名称	分离株
塔玛亚历山大藻	<i>Alexandrium tamarense</i>	NMBjah048
盒型藻	<i>Odontella cf. sinensis</i>	NMBguh018
东海原甲藻	<i>P. donghaiense</i>	NMBRah03-2
裸甲藻	<i>Gymnodinium</i> spp.	NMBjah053
中肋骨条藻	<i>Skeletonema costatum</i>	NMBguh004-2
米氏凯伦藻	<i>Karenia mikimotoi</i>	NMBjah049
赤潮异弯藻	<i>Heterosigma askashiwo</i>	NMBjah0552
剧毒卡罗藻	<i>K. veneficum</i>	NMBjah047

1.2 藻基因组 DNA 的提取

各藻分离株基因组 DNA 提取参照基因组 DNA 提取试剂盒(Takara)进行。简言之, 将培养至对数期的藻液离心获得藻细胞后, 用含 RNase A (10mg/mL)和 Proteinase K (20mg/mL)的裂解液在 56°C 下裂解 30min 后用试剂盒进行 DNA 抽提, 而后用 50μL 蒸馏水洗脱基因组 DNA。获得的样品经 1%凝胶检测后 -20°C 保存备用。DNA 的浓度和纯度测定使用 Eppendorf biophotometer 紫外分光光度计, 每个样本重复测定 3 次后取其平均值。实验前, 将所有藻基因组 DNA 稀释到相同数量级。

1.3 东海原甲藻 ITS 区的克隆以及序列的获得

将提取的东海原甲藻 DNA 作为模板, 扩增引物为 For: 5'-GTCGTCGACGTAGGTGAACCTGCAGAA GGATCA; Rev: 5'-CCTGCAGTCGACATATGCTTAA ATTCAGCAGG(张宝玉等, 2004)进行东海原甲藻的 ITS 序列扩增。反应体系(50μL): dNTPs (0.25mmol/L) 2μL, 10×PCR Buffer 2.50μL, 5U/μL rTaq DNA 聚合酶 0.25μL, 引物终浓度 0.20μmol/L, 模板 1μL, 用双蒸水定容。反应条件为: 94°C 预变性 5min; 接着进行 35 个循环: 94°C 变性 40s, 55°C 复性 45s, 72°C 延伸 60s; 末次循环结束后 72°C 延伸 10min。1%琼脂糖凝胶检测 PCR 扩增产物。分离产物经割胶回收后进行目的片段的重组质粒制备(Takara pmd19-T Vector), 阳性重组质粒由桑尼生物科技有限公司(上海)测序。

1.4 LAMP 引物的设计

经 BLAST 验证后, 测序所得序列与 GenBank 中序列号为 JN595869.1 的序列同源性高达 100%, 故确定其为东海原甲藻的 ITS 序列, 序列长度为 646bp。利用环介导等温扩增法引物设计软件 Primerexplore V5 (<http://primerexplorer.jp/e/>)并依照引物设计的原则(Piepenburg *et al*, 2006; Kaewphinit *et al*, 2013; Khunthong *et al*, 2013; Wang *et al*, 2013; Sun *et al*,

2014)进行引物的设计。针对目标序列的保守区域设计了 3 对引物, 包含外引物 Pd-F3/Pd-B3、内引物 Pd-FIP/Pd-BIP、环引物 Pd-LF/Pd-LB 用于 LAMP 反应, 引物信息及位置见表 2、图 1。PCR 反应使用设

计的 LAMP 外引物(Pd-F3, Pd-B3)作为上下游引物进行扩增。其中, 环引物 Pd-LF 和上游内引物 Pd-FIP 的 5'端分别进行异硫氰酸荧光素标记以及生物素标记。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 2 LAMP-LFD 方法检测东海原甲藻的引物和探针序列
Tab.2 Designed primers and DNA probe for the detection of *P. donghaiense* in LAMP-LFD assay

引物	类型	长度(碱基数)	引物序列(5'—3')
Pd-F3	上游外引物	19	GTCGTCGACGTAGGTGAAC
Pd-B3	下游外引物	18	CACTGGCAGCAAGGACAA
Pd-FIP*	上游内引物	41	CCACCCAGATCCTCACCAACTG-CTGCAGAAGGATCACTCGC
Pd-BIP	下游内引物	40	TGGAGATAGCATCGATGCCCC-GCCCAGAAGACGGTCTGA
Pd-LF*	上游环引物	22	ACAATGAATCAAATGGGTGCGT
Pd-LB	下游环引物	20	CGGATACTCGAGGGCAGCAA

注: Pd-LF*: 5'端异硫氰酸荧光素标记; Pd-FIP*: 5'端生物素标记

1.5 东海原甲藻的 PCR 检测

使用 LAMP 外引物(Pd-F3/Pd-B3)作为 PCR 的上下游引物对模板 DNA 进行扩增。PCR 反应体系(50 μ L): dNTPs (0.25mmol/L) 2 μ L, 5U/ μ L rTaq DNA 聚合酶 0.25 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.50 μ L, 引物终浓度为 0.20 μ mol/L, 模板 1 μ L, 无菌水补足体系。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 接着进行 35 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 55 $^{\circ}$ C 复性 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40s; 末次循环结束后, 72 $^{\circ}$ C 扩增 10min(袁健, 2012)。扩增产物采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳观察结果。

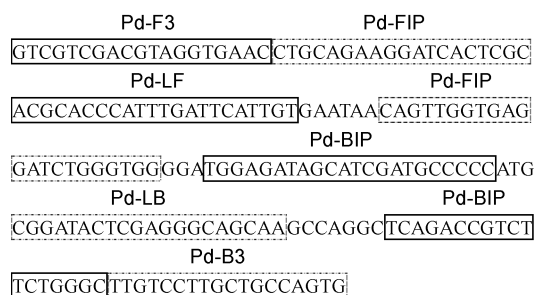


图 1 东海原甲藻序列 LAMP-LFD 引物设计示意图

Fig.1 The diagram of designed primers of *P. donghaiense* used in LAMP-LFD assay

1.6 LAMP 反应条件优化

以实验株的东海原甲藻的基因组 DNA(4.7 \times 10ng/ μ L)作为模板, 使用 LAMP 等温扩增试剂盒(北京博奥生物公司)进行 LAMP 扩增条件的优化。LAMP 反应体系(20 μ L), 包括内引物 Pd-FIP/Pd-BIP 各 1.6 μ mol/L, 外引物 Pd-F3/Pd-B3 各 0.2 μ mol/L, 环引物 Pd-LF/Pd-LB 各 0.4 μ mol/L, BEQ2 10 μ L, 最后加入 2 μ L 模板 DNA, 用双蒸水补足体系。以无菌水作模板

为阴性对照。分别在 61、63 和 65 $^{\circ}$ C 下进行实时荧光定量 LAMP 扩增反应, 分析起峰时间和荧光强度的变化确定最适反应温度和时间。

1.7 利用 LFD 检测 LAMP 产物(LAMP-LFD)

利用优化后的 LAMP 反应体系进行恒温扩增。将经生物素标记的 Pd-FIP-bio 和 FITC 探针标记的 Pd-LF-fitc 分别代替原 LAMP 反应体系中的 Pd-FIP 和 Pd-LF 进行等温扩增。反应后取 5 μ L 扩增产物加入 50 μ L Buffer 中混匀, 垂直插入 LFD 试纸条常温反应约 3min, 肉眼直接判断结果(蔡怡等, 2016; 周前进等, 2016)。有生物素标记的 LAMP 产物与探针 Pd-BIP-fitc 特异性杂交后形成的杂交产物与 LFD 上的生物素抗体结合在检测线上, 而未杂交的探针则结合在控制线上(陈先锋, 2015), 结果可通过检测线与控制线的显色情况直接判断。检测用 LFD 检测试剂盒(Milenia GenLine Hybri Detect)购自宁波博奥生物公司。

1.8 PCR、LAMP、LAMP-LFD 特异性比较

选取塔玛亚历山大藻、盒型藻、裸甲藻、中肋骨条藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、剧毒卡罗藻 7 种东海常见赤潮藻基因组 DNA 为模板, 按优化后的反应体系和条件进行 LAMP 扩增以验证引物的特异性。无菌水为模板作阴性对照。扩增产物分别用 LFD 试纸条和荧光定量仪检测。

以设计的 LAMP 外引物(F3/B3)为上下游引物, 提取的 8 个藻的基因组 DNA 为模板进行 PCR 的扩增。反应体系(50 μ L): 5U/ μ L rTaq DNA 聚合酶 0.25 μ L, dNTPs (0.25mmol/L) 2 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.50 μ L, 引物终浓度 0.20 μ mol/L, 模板 DNA 1 μ L, 无菌水补足体系。以无菌水为模板作为阴性对照。PCR 反应条件为:

预变性 94°C 5min; 接着进行 35 个循环: 94°C 变性 40s, 55°C 复性 40s, 72°C 延伸 40s; 末次循环结束后, 72°C 扩增 10min。1%琼脂糖凝胶电泳检测检测扩增产物。

1.9 PCR、LAMP、LAMP-LFD 灵敏度比较

以提取的东海原甲藻的基因组 DNA 10 倍梯度稀释(4.7×10^1 — 4.7×10^{-6} ng/ μ L)后的 8 个基因组 DNA 为模板, 无菌水作为阴性对照, 进行有 biotin 标记的 LAMP 反应。扩增产物分别用 LFD 和荧光定量仪检测。用于确定 LAMP 技术的最低检测限度并比较其与 PCR 扩增灵敏度的优劣。

以上述 8 个浓度的基因组 DNA 为模板, LAMP 外引物 Pd-F3 和 Pd-B3 为上下游引物, 进行 PCR 扩增。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.10 LAMP-LFD 的野外样验证

从东海各站点采集的 10 个海水样品, 具体地理位置见图 2。样品经 20 μ m 的滤膜过滤后, 取 500mL 滤液离心得藻细胞后用于基因组 DNA 的提取, 具体方法参考 1.2 所述。提取的野外样品基因组 DNA 用于 LAMP-LFD 的鉴定。

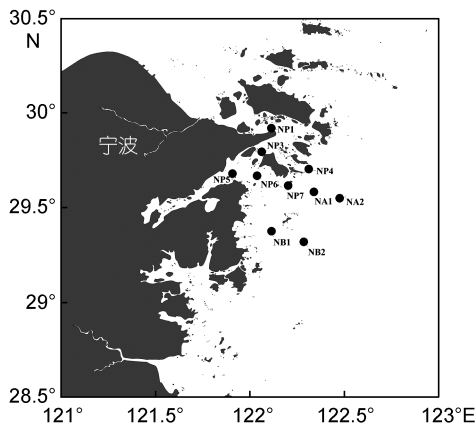


图 2 野外样的地理位置

Fig.2 Geographic location of the field for sampling

2 结果

2.1 LAMP 反应条件的优化

由实时荧光定量 LAMP 可知, 引物在 61、63、65°C 的起峰时间都在 10min 左右, 且分别在 22、20、21min 达到稳定期, 从扩增时间来看, 温度对本研究扩增反应影响不大。较 61、65°C 时的扩增结果而言, 63°C 下有最高荧光强度, 见图 3。故最终确定环介导等温扩增技术的最适条件为 63°C 恒温 30min。

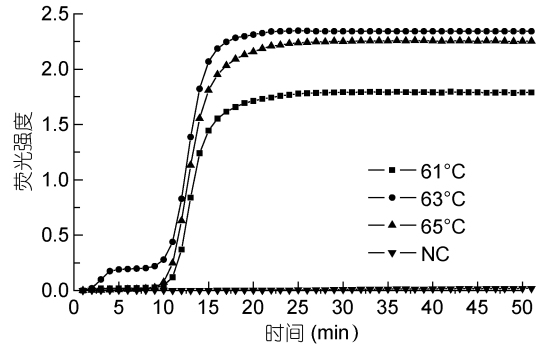


图 3 LAMP 反应条件的优化

Fig.3 Optimization of LAMP reaction conditions
注: NC: 阴性对照, 以无菌水为模板。

2.2 LAMP-LFD、LAMP 与 PCR 的特异性验证

以所建立的 LAMP-LFD、LAMP 与 PCR 的实验方法对 8 株常见赤潮藻进行检测。产物分别经由横向流动试纸条、荧光定量和凝胶电泳检测, 见图 4。结果表明, PCR 检测结果东海原甲藻呈阳性扩增, 但同时塔玛亚历山大藻、米氏凯伦藻和剧毒卡罗藻的 DNA 也出现了非特异性扩增现象。LAMP 反应中, 东海原甲藻存在明显扩增, 在 10min 左右即出现了明显的“S”型荧光曲线, 22min 左右扩增即达到稳定期, 其余 7 株藻扩增曲线平滑, 均没有产生特异性荧光曲线。而 LFD 试纸条仅在东海原甲藻扩增时出现了明显检测线, 其余藻类皆未能检测到条带, 为阴性。

2.3 LAMP-LFD、LAMP 与 PCR 的灵敏度验证

以不同浓度的东海原甲藻基因组 DNA 为模板, 验证 LAMP 的灵敏度。产物分别经由横向流动试纸条、荧光定量和凝胶电泳检测, 见图 5。结果表明, 通过 PCR 方法能够检测到的最低浓度为 0.47ng/ μ L。当模板浓度稀释至 47pg/ μ L 时, LAMP 仍能检测到明显“S”型荧光曲线, 且随着基因组 DNA 浓度的降低, 曲线出峰时间和到达稳定期时间有规律后移, 但基本都能在 30min 左右完成扩增。利用 LFD 能够检测到的最低浓度是 47pg/ μ L, 与 LAMP 反应相同, 是以 Pd-F3 和 Pd-B3 为引物的常规 PCR 检测灵敏度的 10 倍。

2.4 LAMP-LFD 野外样的验证

LAMP-LFD 结果为: NP-1, NP-4, NA-1 海水样品基因组 DNA 样品同时出现检测线和控制线, 检测结果呈阳性, 有东海原甲藻的特异性扩增; 其余 7 个样品无检测线有控制线, 结果均呈阴性, 见图 6。总体而言, LAMP-LFD 技术适用于本领域的野外快速检测。

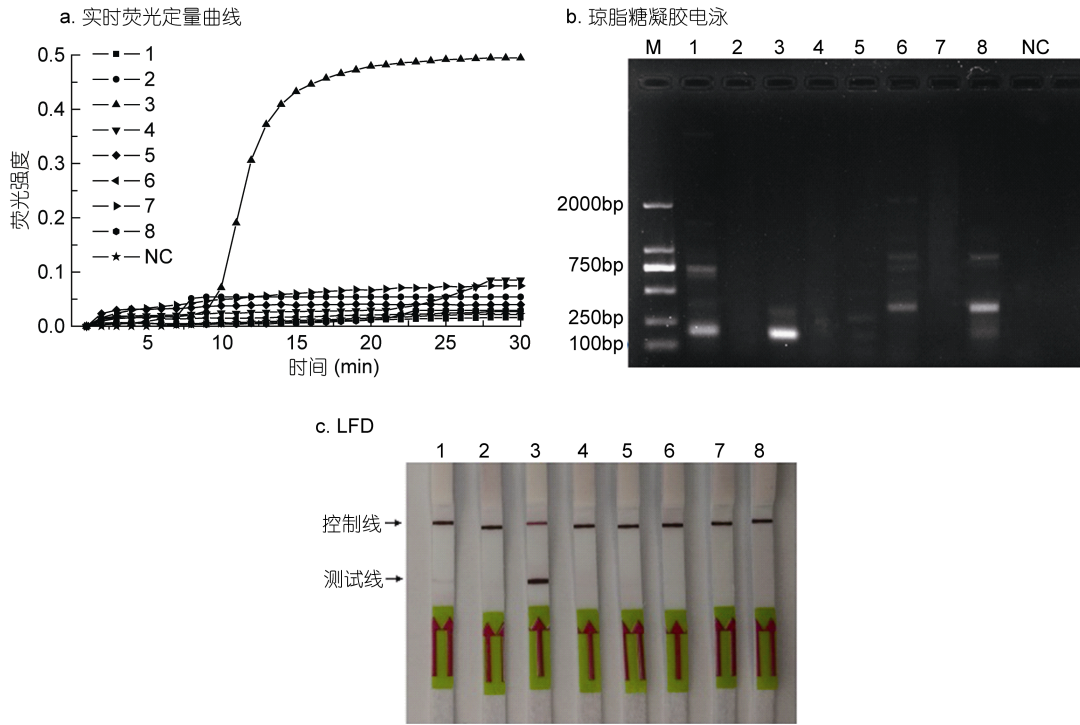


图4 LAMP、PCR、LAMP-LFD 特异性比较

Fig.4 Comparison in the specificity of LAMP (a), PCR (b), LAMP-LFD (c) for detection of *P. donghaiense*
 注: M: DL2000 DNA Marker; NC: 阴性对照, 以无菌水为模板; 1—8 分别表示以塔玛亚历山大藻、盒型藻、东海原甲藻、裸甲藻、中肋骨条藻、米氏凯伦藻、赤潮异弯藻、剧毒卡罗藻 DNA 为模板。

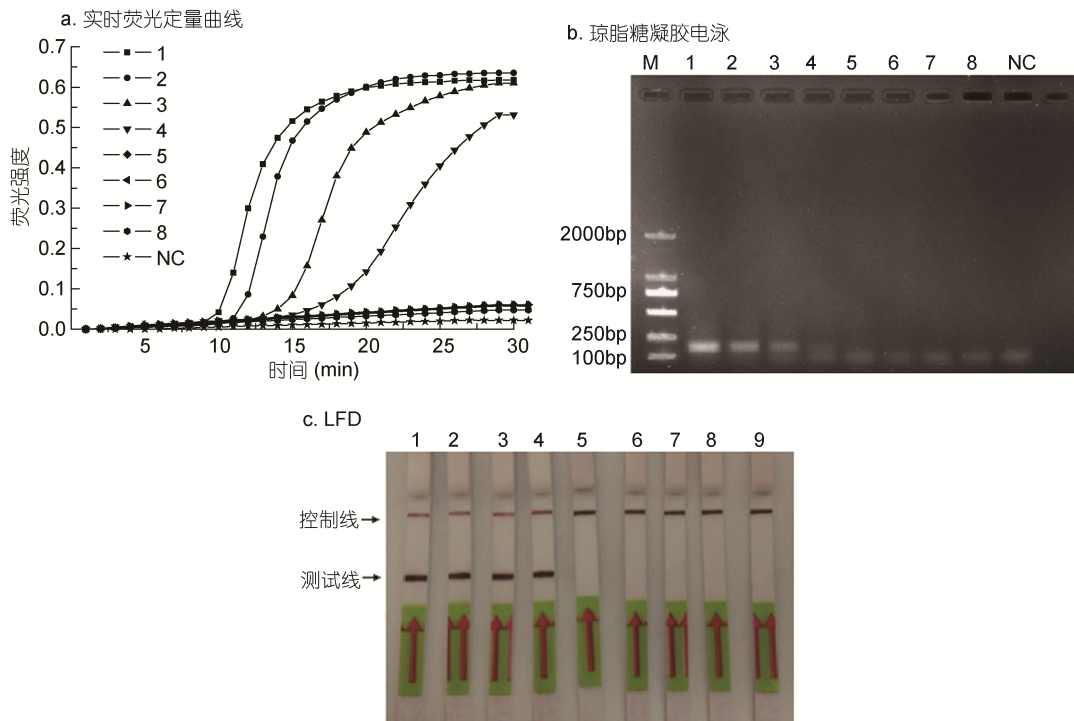


图5 LAMP (a)、PCR (b)、LAMP-LFD (c)灵敏度比较

Fig.5 Comparison in the sensitivity of LAMP (a), PCR (b), LAMP-LFD (c) for detection of *P. donghaiense*
 注: M: DL2000 DNAMarker; NC: 阴性对照, 以无菌水为模板; 1—8 分别表示以浓度为 4.7×10^1 、 4.7 、 4.7×10^{-1} 、 4.7×10^{-2} 、 4.7×10^{-3} 、 4.7×10^{-4} 、 4.7×10^{-5} 、 4.7×10^{-6} ng/ μ L DNA 为模板。

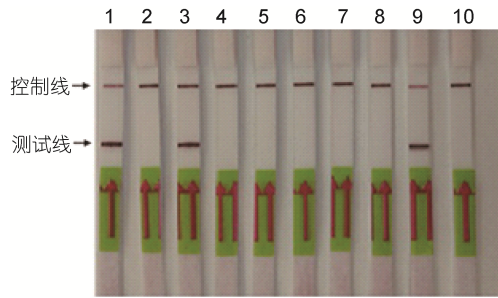


图 6 LAMP-LFD 野外样结果

Fig.6 LAMP-LFD for detection of field samples

注: 1—10 分别表示水样 NP-1、NP-3、NP-4、NP-5、NP-6、NP-7、NB-1、NB-2、NA-1、NA-2

3 讨论

近年由东海原甲藻引起的赤潮在我国呈现高发、频发的态势, 给水产养殖、旅游等产业以及海洋生态环境产生了巨大的影响。因此, 建立准确有效的东海原甲藻野外快检技术对赤潮的检测、预防和控制具实际意义。

目前, 从分子水平对藻类进行鉴定已逐步成为研究热点, 免疫学检测方法(ELISA)和基于 PCR 的分子生物学检测方法被运用于藻类检测中(唐晨, 2012)。王曲圆等(2013)人通过扩增藻的细胞色素 *b* 基因建立了东海原甲藻的荧光定量 PCR 体系; 袁健(2012)针对核糖体 DNA 的 ITS 序列建立了包括东海原甲藻在内的三种东海赤潮藻的荧光定量 PCR 定性定量分析方法; 张宝玉等(2005)使用 ITS 序列设计的 DNA 探针通过荧光原位杂交技术有效地鉴定了东海原甲藻以及塔玛亚历山大藻。但是荧光原位杂交对样品和实验操作环境要求高、需要经验丰富的操作人员; PCR 技术灵敏度高, 但对仪器设备要求高, 此类方法仅限于实验室检测。新兴的 LAMP 技术特异性强、灵敏度高, 较传统 PCR、荧光原位杂交、ELISA 等技术有设备要求低、时间短、操作简便等优点, 被逐步运用于分子水平的检测。蔡怡等(2016)人利用 LAMP-LFD 技术特异性的检测山茶梗结线虫的检测极限低至 $4\text{pg}/\mu\text{L}$, 低于常规 PCR 方法的 100 倍。周圆(2016)等人利用 LAMP-LFD 技术对油菜茎基溃疡病菌的检测灵敏度为 $114\text{fg}/\mu\text{L}$, 比 PCR 检测高 10 倍。LAMP 技术因其在检测领域显现出来的优势在藻类的分子鉴定和检测中也有了更广泛的运用, 该技术已被用来检测短凯伦藻(张凤英等, 2012)、产毒亚历山大藻(刘芳等, 2007)、米氏凯伦藻(王越, 2015)等并显示出良好的特异性和灵敏度, 在野外样品的检测中也表现出良好

的实用性。

近年来, 转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)序列和编码核糖体 RNA 基因(Ribosomal RNA gene, rRNA)作为分子指标已被广泛应用于藻类的分类以及种类鉴定(张宝玉等, 2004)。其中, ITS 在同种生物中非常保守, 其选择压力小、变异速率快, 可用于属级、种级甚至种以下水平的比较。另外, ITS 区长度较稳定, 含 5.8S 在内总长保持在 500—800bp, 其两端的 18S、28S 序列有高保守性, 可方便的设计通用引物对 ITS 区进行扩增并测定序列(高杨, 2004)。

本研究针对东海原甲藻的特异性序列设计了六条引物, 优化条件后, 用于 LAMP-LFD 检测。结果表明, 在 63°C 下运用环介导等温扩增 30min 后, 将 LFD 试纸条垂直插入反应液 5min 后即可用肉眼观察(王瑞娜, 2014)。利用该技术不仅可检出低浓度的东海原甲藻, 而且针对塔玛亚历山大藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、中肋骨条藻等引发赤潮的常见藻类表现出良好的特异性。本实验建立的 LAMP-LFD 方法最低可检测到 $47\text{pg}/\mu\text{L}$ 的东海原甲藻基因组 DNA, 是以 Pd-F3 和 Pd-B3 为特异性引物的 PCR 方法的 10 倍。进一步将 LAMP-LFD 方法用于东海原甲藻野外样检测, 部分样品有特异性条带, 结果表现良好的实用性。

使用 LAMP-LFD 方法检测, 使检测时间大大缩短, 并且检测结果可视化。若模板采用简单的煮沸方法提取(Shi *et al*, 2009), 只需要一个简单的恒温水浴锅在短时间内即可完成核酸的扩增以及检测。由于对设备的要求低、操作简单、成本低廉, 非专业的检测人员足可以胜任该工作。LAMP-LFD 技术使整个检测过程在一定程度上摆脱了实验室条件的限制, 更加适用于野外检测。该项技术还可推广到其他有害赤潮藻的快速检测, 可准确、高效、特异地鉴别有害赤潮藻, 为沿海地区赤潮藻的大暴发提供预警以便进行早期防治。

4 结论

本研究根据东海原甲藻的 ITS 序列建立了 LAMP-LFD 特异性检测方法。该技术在东海原甲藻的野外快速检测方面具有重要意义, 可以在水体中东海原甲藻浓度低的时候监测赤潮生长的趋势并及时进行防治。其种种特点使 LAMP-LFD 技术在实际应用中具有很大的优势, 作为一项新型的藻野外快检技术, 有望得到大规模的应用。

参 考 文 献

- 王 越, 沈鑫绿, 赵世焯等, 2015. pH 对米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)种群生长、营养吸收及无机碳亲和力的影响. 海洋环境科学, 34(4): 488—493
- 王曲圆, 甄 毓, 袁 健等, 2013. 东海原甲藻细胞色素 *b* 基因实时荧光定量 PCR 检测体系优化. 应用生态学报, 24(2): 541—548
- 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
- 邓 光, 耿亚洪, 胡鸿钧等, 2009. 几种环境因子对高生物量赤潮甲藻——东海原甲藻光合作用的影响. 海洋科学, 33(12): 34—39
- 龙 华, 周 燕, 余 骏等, 2008. 2001—2007 年浙江海域赤潮分析. 海洋环境科学, 27(S1): 1—4
- 任姝彤, 2015. 中国近海突发性海洋灾害的特征分析与评分. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文
- 刘 芳, 王 丽, 李 琳等, 2007. 环介导等温核酸扩增技术快速检测产毒亚历山大藻. 现代食品科技, 23(11): 71—74
- 吕颂辉, 张玉宇, 陈菊芳, 2003. 东海具齿原甲藻的扫描电子显微结构. 应用生态学报, 14(7): 1070—1072
- 朱俊灵, 叶佐东, 邓洁汝等, 2016. 猪瘟病毒 RT-LAMP-LFD 检测方法的建立与应用. 华南农业大学学报, 37(1): 1—7
- 朱德弟, 陆斗定, 王云峰等, 2009. 2005 年春初浙江近海的低温特征及其对大规模东海原甲藻赤潮发生的影响. 海洋学报, 31(6): 31—39
- 齐雨藻, 王 艳, 2003. 我国东海赤潮原甲藻应属哪种? 应用生态学报, 14(7): 1188—1190
- 张凤英, 石彦红, 马凌波等, 2012. 环介导恒温扩增技术快速检测短凯伦藻. 应用与环境生物学报, 18(3): 482—488
- 张宝玉, 王广策, 齐雨藻等, 2005. 用荧光原位杂交(FISH)技术鉴定赤潮甲藻的研究. 高技术通讯, 15(11): 101—105
- 张宝玉, 王广策, 张 炎等, 2004. 东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)和海洋原甲藻 APBM(*P. micans* APBM)的 5.8S rDNA 及其转录间隔区(ITS)的克隆和序列分析. 海洋与湖沼, 35(3): 264—272
- 李正华, 2016. 福建定海湾一次东海原甲藻与夜光藻双相赤潮浅析. 渔业研究, 38(2): 132—136
- 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 圆, 黄海龙, 李孝军等, 2016. 油菜茎基溃疡病菌 LAMP—LFD 检测方法的建立. 植物检疫, 30(4): 32—37
- 周名江, 颜 天, 邹景忠, 2003. 长江口邻近海域赤潮发生区基本特征初探. 应用生态学报, 14(7): 1031—1038
- 周前进, 陈先锋, 蔡 怡等, 2016. 孔石莼(*Ulva pertusa*) LAMP-LFD 快速检测方法的建立. 海洋与湖沼, 47(2): 380—389
- 罗立明, 胡鸿钧, 李夜光等, 2006. 东海原甲藻的分子鉴定. 海洋学报, 28(1): 127—131
- 唐 晨, 2012. PCR 技术在对典型有害藻类检测中的应用. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文
- 袁 健, 2012. 东海三种重要赤潮藻荧光定量 PCR 检测技术的建立和应用. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文
- 高 杨, 2004. 有害赤潮藻的分子生物学分类与鉴定. 厦门: 厦门大学硕士学位论文
- 曹敏杰, 2015. 浙江近岸海域海洋生态环境时空分析及预测关键技术研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文
- 黄海燕, 康林冲, 杨 翼等, 2016. 2013 年我国近海赤潮引发种种类和分布研究. 海洋科学, 40(11): 17—27
- 董培培, 李长红, 丁文超等, 2011. 环介导等温扩增技术与横向流动试纸条法快速检测鳃利斯顿氏菌的研究. 水产科学, 30(2): 63—68
- 蔡 怡, 周前进, 顾建锋等, 2016. 山茶根结线虫的 LAMP-LFD 快速检测方法. 农业生物技术学报, 24(5): 770—780
- Huang H L, Zhu P, Zhou C X *et al*, 2017. The development of loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for detection of *Karlodinium veneficum*. Harmful Algae, 62: 20—29
- Kaewphinit T, Arunrut N, Kiatpathomchai W *et al*, 2013. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using loop—mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick in clinical samples. Biomed Research International, 2013: 926230
- Khunthong S, Jaroenram W, Arunrut N *et al*, 2013. Rapid and sensitive detection of shrimp yellow head virus by loop—mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. Journal of virological methods, 188(1): 51—56
- Kiatpathomchai W, Jaroenram W, Arunrut N *et al*, 2008. Shrimp taura syndrome virus detection by reverse transcription loop—mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. Journal of Virological Methods, 153(1): 214—217
- Li J, Glibert P M, Zhou M J, 2010. Temporal and spatial variability in nitrogen uptake kinetics during harmful dinoflagellate blooms in the East China Sea. Harmful Algae, 2010, 9(6): 531—539
- Lu D D, Jeanette G, 2001. Five red tide species in genus *Prorocentrum* including the description of *Prorocentrum donghaiense* Lu SP. nov. from the East China Sea. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 19(4): 337—344
- Lu D D, Goebel J, Qi Y Z *et al*, 2005. Morphological and genetic study of *Prorocentrum donghaiense* Lu from the East China Sea, and comparison with some related *Prorocentrum* species. Harmful Algae, 4(3): 493—505
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H *et al*, 2000. Loop—mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research, 28(12): e63
- Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L *et al*, 2006. DNA detection using recombination proteins. PLoS Biology, 4(7): e204
- Shi Y H, Zhang F Y, Ma L B, 2009. Reliable and rapid genomic DNA extraction method of three species of red tide algae. Marine Fisheries, 31(4): 438—443
- Sun Y L, Yen C H, Tui C F, 2014. Visual detection of canine parvovirus based on loop—mediated isothermal amplification combined with enzyme—linked immunosorbent assay and with lateral flow dipstick. The

Journal of Veterinary Medical Science, 6(4): 509—516

213—220

Wang X M, Teng D, Guan Q F *et al*, 2013. Detection of roundup ready soybean by loop—mediated isothermal amplification combined with a lateral—flow dipstick. Food Control, 29(1):

Zingone A, Enevoldsen H O, 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. Ocean & Coastal Management, 43(8—9): 725—748

RAPID DETECTION OF *PROROCENTRUM DONGHAIENSE* BASED ON LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION COMBINED WITH LATERAL FLOW DIPSTICK

ZOU Yi-Xin, HUANG Hai-Long, QIAO Long-Liang, DANG Chen-Yang, PANG Jian-Hu,
LÜ Pei-Wen, WANG Jia-Qi, ZHU Peng

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract On the basis of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with a lateral flow dipstick (LFD), we established a rapid method to detect *Prorocentrum donghaiense*. A DNA probe labeled by fluorescein isothiocyanate (FITC) and forward inner primer biotinylated were designed specifically to identify the target gene. The hybridization of biotinylated LAMP product and the FITC-labeled probe in combination with LFD (lateral flow dipstick) were able to be detected visibly. The optimization conditions were 63°C for 30min, saving nearly 2h if by PCR. The results show that the new method is highly specific, and no characteristic amplification was observed when taking other common red tide algae species as a template. The detection limit was 47pg/μL of *P. donghaiense* genomic DNA, which is 10 times lower than the conventional PCR using primers Pd-F3/Pd-B3. Therefore, LAMP-LFD can detect *P. donghaiense* efficiently and specifically, depend less on the equipment, and presents results in good visualization; and it may become a conventional method to detect and monitor red tide.

Key words *Prorocentrum donghaiense*; loop-mediated isothermal amplification (LAMP); lateral flow dipstick (LFD); quick detection