

文章编号: 1674-5566(2025)05-0956-12

DOI: 10.12024/jsou.20250404857

基于RPA-LFD技术的塔玛亚历山大藻快速检测方法的建立

吴文静^{1,2}, 孙鹤宸³, 康伟², 胡健伟^{2,4}, 高倩², 王翠华²

(1. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023; 2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090;
3. 大连海洋大学 海洋科技与环境学院, 辽宁 大连 116023; 4. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了满足塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)在野外环境中快速检测的需求,以塔玛亚历山大藻内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)序列为靶标,设计了特异性引物和探针,将重组酶聚合酶扩增技术(Recombinase polymerase amplification, RPA)与横向流动试纸条(Lateral flow dipstick, LFD)相结合(RPA-LFD),实现了扩增结果的可视化。结果显示,RPA最佳反应条件为42℃、15 min,LFD检测时间为3 min。研究结果表明,基于RPA-LFD技术开发的塔玛亚历山大藻检测方法具有高度特异性,与常见藻类无交叉反应,能够特异性检出塔玛亚历山大藻。该方法对塔玛亚历山大藻质粒和细胞的检出限分别达到1 copies/ μ L和1 cells/L,较常规PCR提高了2个数量级。从特异性、灵敏度、便携性及时效性等方面综合评估,该方法可为实现塔玛亚历山大藻藻华的早期预警以及提升口岸对物种入侵的检测效率提供支持。

关键词: 塔玛亚历山大藻; 重组酶聚合酶扩增技术; 横向流动试纸条; 快速检测

中图分类号: Q 949.2

文献标志码: A

有害藻华(Harmful algal blooms, HAB)是海洋微型浮游生物异常增殖引发的生态灾害现象,其通过破坏食物网结构、引发水体缺氧及释放神经性毒素等机制,严重威胁海洋生物多样性、渔业资源及公共卫生安全^[1]。近三十年来,全球有害藻华事件呈现“范围扩张-频率激增-毒性增强”的协同演进特征^[2],尤其在河口、近岸等敏感海域,其生态威胁已从区域性事件升级为跨境性治理难题^[3-6]。研究^[7]表明,陆源营养盐输入、海水温度上升及压载水介导的物种扩散,是加剧有害藻华暴发的主要驱动因素。在此背景下,开发适用于野外环境的精准、高效检测技术以强化有害藻华物种的早期监测,将助力防控策略的及时制定,从而降低藻华暴发导致的经济损失^[8]。

塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)作为全球有害藻华的主要致灾甲藻,不仅是麻痹性贝类毒素(Paralytic shellfish toxins, PST)的核心产毒种,也是亚历山大藻属中生态危害最为显著的物种之一。其藻华事件已在美国缅因湾、加拿

大圣劳伦斯河口(年际性暴发)、欧洲沿岸、日本及中国近海等多海域形成常态化威胁,直接导致贝类毒素中毒事件激增,对海洋生态安全和公共卫生构成严峻挑战^[9]。当前,该物种的检测仍以形态学鉴定为主导,但因与塔玛亚历山大藻复合种(如链状亚历山大藻等)存在高度形态相似性,即使依赖专业分类学知识也难以实现精准区分^[10],致使传统方法在灵敏度、准确性及现场适用性方面存在显著局限。近年来,分子检测技术(如荧光原位杂交、三明治杂交、qPCR、基因芯片)的突破性进展^[6],推动了基于核酸特异性的客观化检测体系建立。而宏条形码分析、纳米材料探针、样品磁浓缩分离系统等新兴技术的引入,进一步拓展了检测维度的时空分辨率^[11-13]。尽管如此,上述方法普遍受限于设备依赖性和操作流程复杂等问题,难以适配野外实时监测场景。以环介导等温扩增技术^[14](Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)为代表的恒温扩增技术虽在多种藻类的野外检测中成功应

收稿日期: 2025-04-29 修回日期: 2025-07-19

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFC2601301)

作者简介: 吴文静(2002—),女,硕士研究生,研究方向为海洋生态学。E-mail: 13228702909@163.com

通信作者: 康伟, E-mail: kangw@ccsf.ac.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

用^[15-18],但其多引物设计需求易引发气溶胶污染导致假阳性^[19],也制约了其在塔玛亚历山大藻快速检测中的应用。

重组酶聚合酶扩增技术 (Recombinase polymerase amplification, RPA) 可在 37~45 °C 恒温条件下于 15~40 min 内完成核酸扩增,仅需一对特异性引物即可实现靶标序列的高效扩增,兼具高灵敏度和强特异性^[20]。通过将 RPA 与横向流动试纸条 (Lateral flow dipstick, LFD) 联用形成 RPA-LFD 技术体系,进一步突破了传统分子检测的时空限制,其反应更加快速,灵敏度更高,可实现扩增产物的可视化判读,也有效规避气溶胶污染导致的假阳性问题。该技术适合现场快速检测含有低浓度目标物种的天然样品,在剧毒卡尔藻 (*Karlodinium veneficum*) 和微小原甲藻 (*Prorocentrum minimum*) 等多个藻类的快速检测上已被证实是简单、快速、可靠的检测方法^[21-22]。然而,RPA-LFD 技术的性能高度依赖引物-探针组合的优化设计及与试纸条的兼容性匹配,其应用广度仍受限于靶标物种的基因位点保守性。

鉴于 RPA-LFD 技术的优势,本研究首次将 RPA-LFD 技术应用在塔玛亚历山大藻的检测领域,通过优化引物探针设计与反应条件,成功建立了一种适合野外场景,兼具时效性、高灵敏度与强特异性的可视化检测方法。经实际海水样品模拟验证,该方法可有效区分塔玛亚历山大藻,可为塔玛亚历山大藻藻华的早期预警及生物入侵防控提供可靠的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验室藻种及培养条件

本研究的塔玛亚历山大藻和其他用于验证的微小亚历山大藻 (*Alexandrium minutum*)、针杆藻 (*Synedra* sp.)、东海原甲藻 (*Prorocentrum shikokuense*)、海洋原甲藻 (*Prorocentrum micans*)、海生小球藻 (*Chlorella marina*)、米氏凯

伦藻 (*Karenia mikimotoi*)、中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*)、虫黄藻 (*Symbiodinium* sp.) 和赤潮异湾藻 (*Heterosigma akashiwo*) 均为本实验室分离并培养。藻种无菌接种于含有 75 mL 无菌 f/2±Si 培养基的 150 mL 三角锥形瓶中培养 (其中,针杆藻和中肋骨条藻使用加 Si 培养基,其余使用去 Si 培养基),光照强度为 66 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照周期 12D/12L,定期摇动并更换培养基。

1.2 DNA 提取及质量检测

取对数生长期的实验藻种细胞进行 4 000 r/min、15 min 离心,弃上清液,用超纯水将沉淀物冲洗转入 1.5 mL 离心管中,再次进行 12 000 r/min、10 min 离心,弃上清后置于液氮中冷冻 30 min,置于 -80 °C 保存待用。使用生工生物工程 (上海) 股份有限公司 Ezup 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒,根据说明书及实验室操作手册提供的方法提取基因组 DNA。利用 NanoDrop2000 测定浓度和纯度,以确定 260 nm 的吸光度和 A_{260}/A_{280} 的比率,经 1% 的琼脂糖凝胶电泳验证后保存于 -20 °C 以备用。

1.3 PCR 扩增和重组质粒的构建

以塔玛亚历山大藻基因组 DNA 为模板,采用文献报道的通用引物^[23]对 ITS1、5.8S rDNA 和 ITS2 组成的内部转录间隔区 (ITS) 基因进行 PCR 扩增,引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成 (表 1)。使用 SanPrep 型 DNA 凝胶提取试剂盒 (Sangon Biotech, 上海, 中国) 纯化 PCR 产物。将纯化的 PCR 产物与 pMD19-T 载体 (TaKaRa, 大连, 中国) 连接,然后转化到感受态大肠杆菌中,通过菌落 PCR 鉴定的阳性菌落接种至含 Amp 的 LB 液体培养基中培养后,在生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。将测序得到的目的藻种序列片段经 Editseq 软件去除两端的引物序列后,提交至 NCBI 网站,通过 BLAST 序列比对分析判断是否为所需的序列。

表 1 ITS rDNA PCR 扩增引物序列
Tab. 1 Summary of primer targeting ITS rDNA of *Alexandrium tamarense*

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	预扩增目的片段大小 Pre-amplification target fragment size/bp
TW81	5'-GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3'	554
AB28	5'-GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'	

1.4 RPA 引物和探针的筛选及 RPA-LFD 检测体系的建立

将塔玛亚历山大藻 ITS 区作为靶序列,在 GenBank 中寻找与塔玛亚历山大藻高度相似的序列并下载,进行多次比对以识别特定区域用于引物和探针设计。根据 RPA-LFD 检测探针设计和修饰原则,利用 Primer Premier 5.0 分子设计软件设计了 6 对特异性引物及 5 个探针。下游引物 5'端修饰 Biotin(生物素标记),探针的 5'端设置 FAM 荧光基团,3'端设置 C3-Spacer 阻滞位点,期间插入 THF(四氢呋喃)。引物和探针由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。

使用含塔玛亚历山大藻目的片段的质粒(5 copies/ μ L)为模板,使用层析型 DNA 恒温扩增试剂盒(上海生工)进行扩增,扩增体系总体积为 25 μ L,包含扩增试剂:19.45 μ L 双蒸水,1.25 μ L 激活剂,10 μ mol/L 正向引物 1 μ L,10 μ mol/L 反向引物 1 μ L,10 μ mol/L 探针 0.3 μ L,以及 2 μ L 质粒 DNA。

具体操作方法:先将引物探针和水按照体系要求配 mix,在管盖中分别加入 1.25 μ L 激活剂后,将 21.75 μ L mix 分装至反应管中,加入模板 2 μ L,盖紧管盖,上下颠倒混匀 8~10 次后,离心数秒,放入 PCR 仪中,设置反应条件为 40 $^{\circ}$ C,阴性反应 20 min,阳性反应 15 min。反应结束后,取 5 μ L 反应液加 75 μ L 双蒸水,混匀后在试纸条上点样。

1.5 RPA-LFD 检测方法反应条件的优化

利用构建的 RPA-LFD 反应体系,以含塔玛亚历山大藻目的片段的质粒 5 copies/ μ L 和 1 copies/ μ L 为模板,先分别比较筛选出的引物探针组在不同温度条件下(38、40、42、44 $^{\circ}$ C)对 RPA 反应的影响,每个浓度设 2 个平行,设 2 个阴性对照,最终通过 LFD 检测判断最佳的反应温度。确定好最佳反应温度后,再分别比较筛选出的引物探针组在不同反应时间下(10、15、20、25 min)对 RPA 反应的影响,每个浓度设 2 个平行,设 2 个阴性对照,最终通过 LFD 检测判断最佳反应时间。

1.6 RPA-LFD 检测方法的特异性验证

以提取的微小亚历山大藻、针杆藻、东海原甲藻、海洋原甲藻、海生小球藻、米氏凯伦藻、中肋骨条藻、虫黄藻和赤潮异湾藻的基因组 DNA

作为模板,塔玛亚历山大藻的基因组 DNA 为阳性对照,先将筛选的引物和探针进行常规 PCR 扩增,扩增产物进行 2% 的琼脂糖凝胶电泳,再进行 RPA-LFD 检测方法的特异性验证(各设 2 个平行)。

1.7 RPA-LFD 检测方法的灵敏性验证

为贴近检测实际,同时考虑样品过滤和 DNA 提取对检测灵敏性的影响,灵敏性验证按照藻密度梯度进行。具体方法:以 10^5 cells/L 藻液为起始浓度,按照 1 L 的终体积进行梯度稀释,分别得到 10^5 、 10^4 、 10^3 和 10^2 cells/L 的藻液。为减小继续稀释带来的误差,通过显微操作分别挑选纯培养的塔玛亚历山大藻放入配好的无菌海水中,按照 1 L 中放入 10 个细胞、1 L 中放入 1 个细胞和 10 L 中放入 1 个细胞的梯度得到 10^5 、 10^4 和 10^3 cells/L 的藻液,最终配置成 7 个浓度梯度。除 10^3 cells/L 浓度体积为 10 L 外,其余每个浓度体积均为 1 L。水样经 0.45 μ m 的聚碳酸酯滤膜(PCTE)过滤后,按照 CTAB 法提取 DNA^[24],分别以其基因组 DNA 和 ddH₂O 对照作为模板,进行常规 PCR 扩增和 RPA-LFD 检测(各设 2 个平行)。

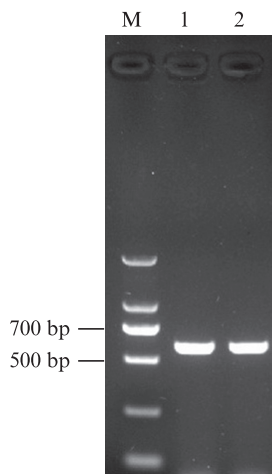
1.8 RPA-LFD 检测方法模拟检测野外样品

由于野外环境样品组成复杂,可能会干扰目标物种的检测。因此,模拟检测野外样品很有必要。本研究采集洋山港海水,使用光学显微镜进行镜检,确认无塔玛亚历山大藻后,分别向 1 L 水样中随机添加稀释后的塔玛亚历山大藻,共 15 个浓度组(终浓度包含 10^0 ~ 10^5 cells/L 的浓度梯度)和 1 个未添加的对照水样。将 1 L 水样经 0.45 μ m 的聚碳酸酯滤膜(PCTE)过滤后,按照 CTAB 法提取基因组 DNA 作为模板,在 PCR 仪和金属浴上分别反应后,进行 RPA-LFD 检测,同时对比 2 种加热装置的差异。

2 结果

2.1 重组质粒的构建结果

将塔玛亚历山大藻的阳性重组质粒进行 PCR 鉴定,结果显示,条带大小与预期大小一致(图 1)。将测序结果提交至 NCBI 网站后进行 BLAST 比对分析,确定结果为所需序列。



M. 标准物质 2 000;1,2. 重组质粒 PCR 产物。
M. DL2 000 DNA Marker; 1, 2. PCR product of the recombinant plasmid.

图1 重组质粒 PCR 扩增结果
Fig.1 PCR amplification results of the recombinant plasmid

2.2 RPA 特异性引物和探针的筛选结果

共计 45 对引物和探针组合参与筛选实验(表 2),筛选直接在试纸条上进行。先对 45 对引物和探针组合进行阴性(NTC)筛选,其中 16 组出现假

阳性,29 组无假阳性(图 2),再分别对 29 组无假阳性组进行阳性反应。结果显示,总共 10 组可以检测到条带,其中 3 组反应条带较深(图 3),最后选取第 44 组 F6P5R5 作为最佳引物探针组合,最佳引物、探针序列信息见表 3。

2.3 RPA-LFD 反应温度和时间的优化结果

根据引物探针筛选结果,以 F6P5R5 引物探针组合和含塔玛亚历山大藻目的片段的质粒 5 copies/ μ L 和 1 copies/ μ L 为模板,按照构建的 RPA-LFD 检测体系,分别比较不同温度条件下(38、40、42、44 $^{\circ}$ C)RPA 反应的差异。每个浓度设 2 个平行和 2 个阴性对照,结果如图 4 所示,在 42 $^{\circ}$ C 时条带最强,重复性较好。

以 42 $^{\circ}$ C 作为最佳温度,再分别比较不同反应时间下(10、15、20、25 min)RPA 反应的差异,每个浓度设 2 个平行和 2 个阴性对照。结果如图 5 所示,15 min 时即可检测到 2 copies/管,尽管没有 20 min 和 25 min 条带清晰,但已足够反应检测结果,所以确定最佳反应时间为 15 min。综合考虑,最终选择 42 $^{\circ}$ C、15 min 作为后续 RPA-LFD 的反应条件。

表 2 引物和探针组合
Tab. 2 Primer/probe sets

序号 Index	组合 Group	序号 Index	组合 Group	序号 Index	组合 Group	序号 Index	组合 Group	序号 Index	组合 Group
1	F1P1R1	10	F2P4R1	19	F5P1R5	28	F5P5R1	37	F6P2R6
2	F3P3R3	11	F2P4R2	20	F5P2R1	29	F5P5R2	38	F6P4R1
3	F4P3R4	12	F2P4R5	21	F5P2R2	30	F5P5R5	39	F6P4R2
4	F2P1R1	13	F2P4R6	22	F5P2R5	31	F5P5R6	40	F6P4R5
5	F2P1R5	14	F2P5R1	23	F5P2R6	32	F6P1R1	41	F6P4R6
6	F2P2R1	15	F2P5R2	24	F5P4R1	33	F6P1R5	42	F6P5R1
7	F2P2R2	16	F2P5R5	25	F5P4R2	34	F6P2R1	43	F6P5R2
8	F2P2R5	17	F2P5R6	26	F5P4R5	35	F6P2R2	44	F6P5R5
9	F2P2R6	18	F5P1R1	27	F5P4R6	36	F6P2R5	45	F6P5R6

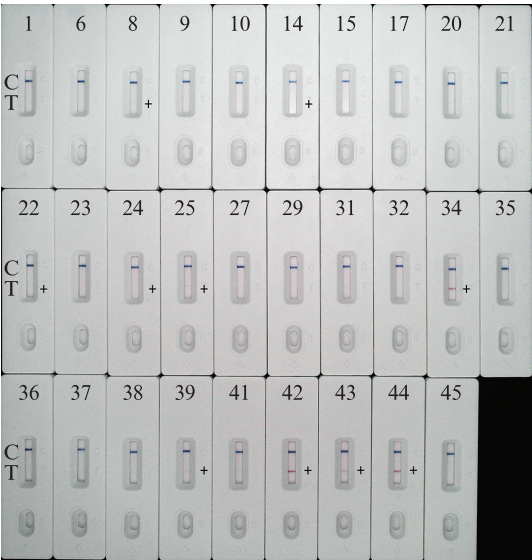
表 3 最佳引物探针序列
Tab. 3 Optimal primer/probe sequences

引物和探针 Primer and probe	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
F6	TGTTGTGAACAATAAAGGTCAATGTTTGCATTG
R5	GTTTCAGCGGGTTTATGTGCTTCACTTCACG
P5	CGTGGGGCAGACCTGTTTCGTCATTGATG[THF]TTGATATTTGTAAAT



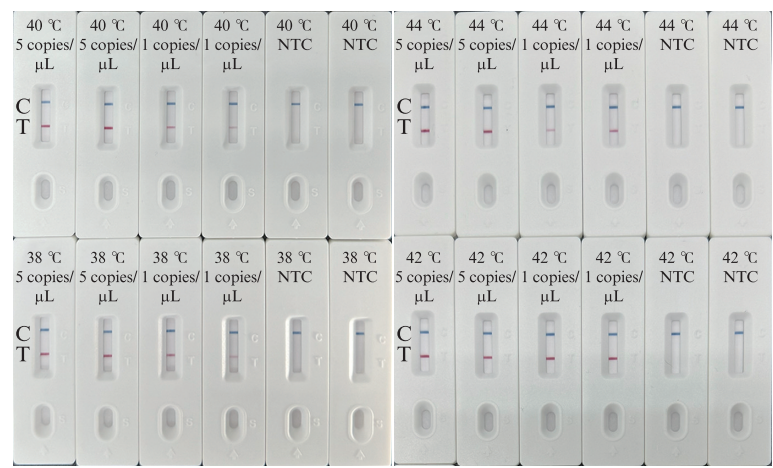
C. 质控线;T. 检测线;1-45. 引物探针组合。
C. Control line; T. Test line; 1-45. Primer and probe sets.

图2 RPA-LFD检测方法的引物探针组合NTC筛选
Fig. 2 Negative template control of primer and probe sets for RPA-LFD



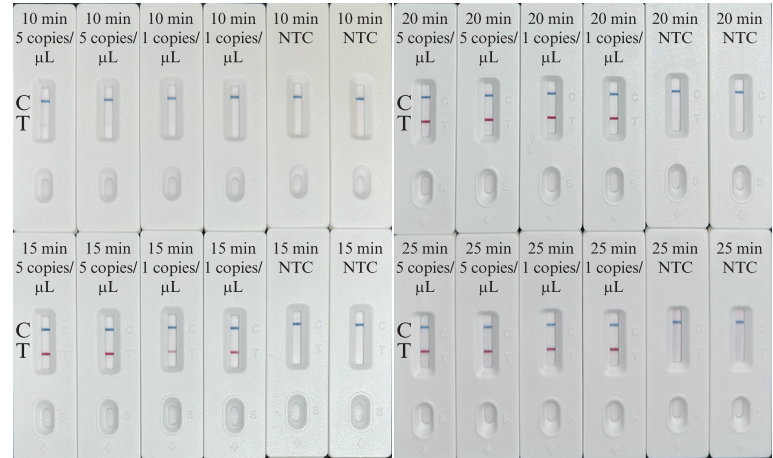
C. 质控线;T. 检测线;1-45. 引物探针组合。
C. Control line; T. Test line; 1-45. Primer and probe sets.

图3 RPA-LFD检测方法的引物探针组合阳性反应筛选
Fig. 3 Positive reactions of primer and probe sets for RPA-LFD



C. 质控线;T. 检测线;NTC. 阴性对照。
C. Control line; T. Test line; NTC. Negative template control.

图4 RPA-LFD 检测方法的最佳反应温度优化
Fig. 4 Optimization of RPA-LFD reaction temperature



C. 质控线;T. 检测线;NTC. 阴性对照。
C. Control line; T. Test line; NTC. Negative template control.

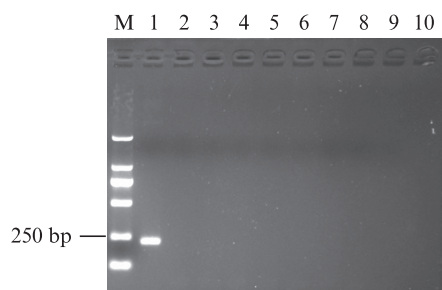
图5 RPA-LFD 检测方法的最佳反应时间优化
Fig. 5 Optimization of RPA-LFD reaction time

2.4 RPA-LFD 检测方法的特异性检测结果

为保证 RPA-LFD 检测方法的高度特异性,选择 10 种常见海洋藻类的基因组 DNA 作为模板 (DNA 浓度均>100 ng/μL),常规 PCR 检测结果如图 6 所示。仅塔玛亚历山大藻可以扩增出约 200 bp 的目的条带,与产物大小 190 bp 相符合,其他藻类均未有特异性条带出现。从图 7 结果看出,仅塔玛亚历山大藻在试纸条上同时出现质控线和检测线,其他测试藻种都只出现 1 条质控线。以上结果综合表明,RPA-LFD 检测方法对塔玛亚历山大藻具有高度特异性,并且不与其他测试藻类发生阳性扩增反应。

2.5 RPA-LFD 检测方法的灵敏性检测结果

以塔玛亚历山大藻基因组 DNA 和 ddH₂O 对照作为模板,分别进行常规 PCR 和 RPA-LFD 检测。藻细胞密度为 10²~10⁵ cells/L 时,常规 PCR 和 RPA-LFD 均可以检测到(图 8 和图 9),藻细胞密度为 10⁰~10¹ cells/L 时,仅 RPA-LFD 可检测到(图 9),常规 PCR 没有条带出现。结果表明,RPA-LFD 方法的检测灵敏度可以达到 1 cells/L,较常规 PCR 提高两个数量级,具有很好的灵敏度,能够满足塔玛亚历山大藻检测灵敏度的要求。



M. 标准物质 2 000; 1. 塔玛亚历山大藻; 2. 赤潮异湾藻; 3. 虫黄藻; 4. 中肋骨条藻; 5. 米氏凯伦藻; 6. 海生小球藻; 7. 海洋原甲藻; 8. 东海原甲藻; 9. 针杆藻; 10. 微小亚历山大藻。

M. DL2 000 DNA Marker; 1. *Alexandrium tamarense*; 2. *Heterosigma akashiwo*; 3. *Symbiodinium* sp.; 4. *Skeletonema costatum*; 5. *Karenia mikimotoi*; 6. *Chlorella marina*; 7. *Prorocentrum micans*; 8. *Prorocentrum shikokuense*; 9. *Synedra* sp.; 10. *Alexandrium minutum*.

图6 PCR特异性验证实验琼脂糖凝胶(2%)电泳

Fig. 6 Specificity of PCR by 2% agarose gel electrophoresis

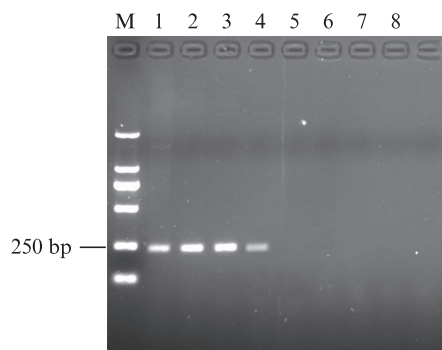


C. 质控线; T. 检测线; 1. 赤潮异湾藻; 2. 虫黄藻; 3. 中肋骨条藻; 4. 米氏凯伦藻; 5. 海生小球藻; 6. 海洋原甲藻; 7. 东海原甲藻; 8. 针杆藻; 9. 微小亚历山大藻; 10. 塔玛亚历山大藻。

C. Control line; T. Test line; 1. *Heterosigma akashiwo*; 2. *Symbiodinium* sp.; 3. *Skeletonema costatum*; 4. *Karenia mikimotoi*; 5. *Chlorella marina*; 6. *Prorocentrum micans*; 7. *Prorocentrum shikokuense*; 8. *Synedra* sp.; 9. *Alexandrium minutum*; 10. *Alexandrium tamarense*.

图7 RPA-LFD检测方法的特异性验证

Fig. 7 Specificity of RPA-LFD assay



M. 标准物质 2 000; 1. 10^5 cells/L; 2. 10^4 cells/L; 3. 10^3 cells/L; 4. 10^2 cells/L; 5. 10^1 cells/L; 6. 10^0 cells/L; 7. 10^{-1} cells/L; 8. NTC 阴性对照。

M. DL2 000 DNA Marker; 1. 10^5 cells/L; 2. 10^4 cells/L; 3. 10^3 cells/L; 4. 10^2 cells/L; 5. 10^1 cells/L; 6. 10^0 cells/L; 7. 10^{-1} cells/L; 8. Negative template control.

图8 PCR灵敏度实验琼脂糖凝胶(2%)电泳

Fig. 8 Sensitivity of PCR by 2% agarose gel electrophoresis

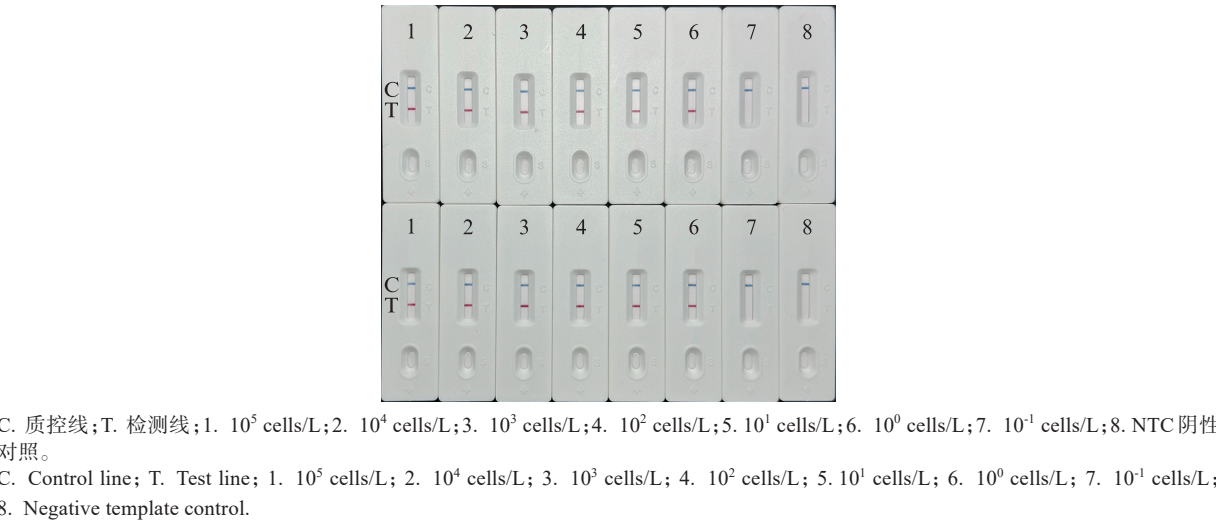


图9 RPA-LFD检测方法的灵敏性验证
Fig. 9 Sensitivity of RPA-LFD assay

2.6 RPA-LFD 检测方法模拟检测野外样品结果
以提取的基因组 DNA 作为模板,分别在 PCR 仪和金属浴上 42 °C 反应 15 min,结果如图 10 所示。在检出限内,本研究的 RPA-LFD 检测

方法不论在室内测试的 PCR 仪上还是适合野外的金属浴上均可以灵敏特异地检测出野外样品中的塔玛亚历山大藻。

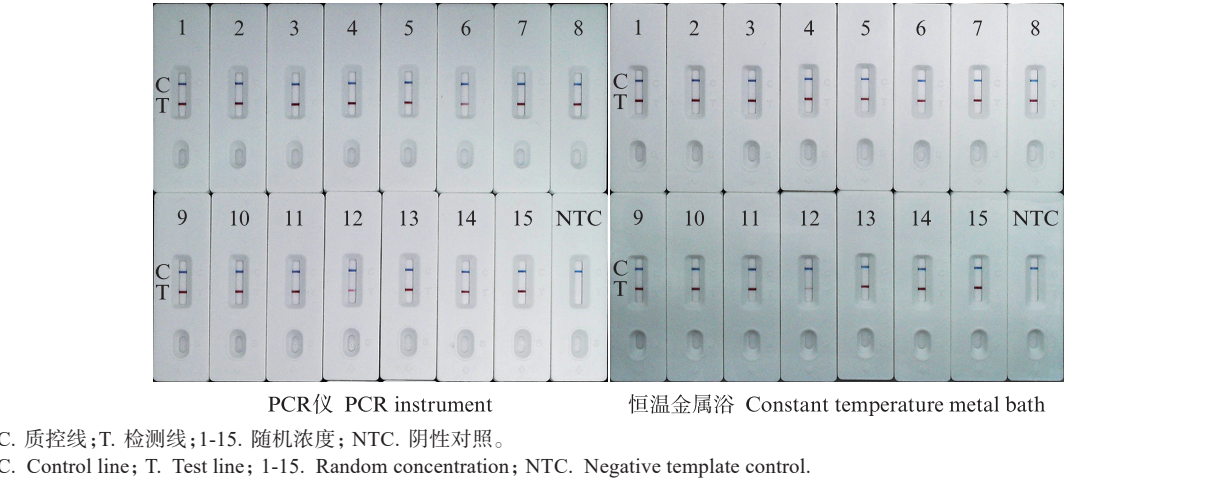


图10 RPA-LFD检测方法检测野外样品
Fig. 10 Detection of field samples using the RPA-LFD assay

3 讨论

塔玛亚历山大藻作为全球性广布种,其通过船舶压载水传播的入侵风险尤为突出。该物种的藻华暴发会对海洋环境、经济社会和人类健康造成严重威胁。鉴于此,迫切需要开发一种适合野外场景,兼具实时、特异、灵敏、便捷的检测方法,以满足塔玛亚历山大藻藻华早期预警及口岸对入侵物种快速检测的需求。

由于分子生物学技术较传统的形态学方法

更有优势,已逐步成为藻类检测方法的研究热点,如荧光定量PCR(qPCR)和多重PCR(mPCR)已广泛用于塔玛亚历山大藻的检测。高岩等^[25]利用qPCR检测塔玛亚历山大藻检出限为5个细胞,ECKFORD-SOPER等^[26]利用mPCR检测塔玛亚历山大藻检出限可达1个细胞。这些方法都需要经验丰富的操作人员,对仪器设备要求高,但不适用于野外检测。RPA-LFD技术以其在物种检测的优势,被广泛应用在食品和动物传染病等的快速检测上^[27-28]。目前,RPA-LFD技术已应用

在蓝藻、剧毒卡尔藻和微小原甲藻等藻类的检测上,显示了良好的特异性和灵敏度^[21-22,29]。以剧毒卡尔藻 RPA-LFD 检测方法为例,灵敏度较常规 PCR 高 2 个数量级,在野外样品的检测中也表现出良好的实用性,检测限可达 10^2 cells/L,较常规 PCR 高 2 个数量级^[21]。

本研究基于 RPA-LFD 技术开发了一种快速且可视化检测塔玛亚历山大藻的方法。由于转录间隔区(ITS)非常保守,选择压力小、变异速率快,常被用作分子标记广泛应用于藻类的检测,而且 ITS 区长度较稳定,含 5.8S 在内总长保持在 500~800 bp,其两端的 18S、28S 序列有高保守性,可方便设计引物^[18]。鉴于 ITS 区的优势,为保证高度特异性,参考 GenBank 中塔玛亚历山大藻及其相似序列,在 ITS 区设计了 6 对引物和 5 条探针,先进行假阳性筛选,再经过阳性筛选才最终确定了最适引物和探针组合,整个筛选过程直接在试纸条上进行,考虑了实验材料对结果的影响。在最适温度筛选上,本研究最终确定 42 °C 为最适温度,相比其它研究偏高^[21-22],这与使用的层析型 DNA 恒温扩增试剂盒(上海生工)有关,但不影响其恒温扩增的特点。检测时间上,在待测样品 DNA 提取好后,本研究在 18 min 内即可完成 RPA 扩增和 LFD 检测,相比传统 PCR 检测方法(至少 2~3 h)大大缩短了检测时间,也较文献中剧毒卡尔藻和微小原甲藻的检测时间(RPA 扩增和 LFD 检测时间共计为 30 min)缩短 12 min 以上^[21-22]。

由于海水中塔玛亚历山大藻的细胞密度通常很低,即使 $10^2\sim10^3$ cells/L 的低密度也有可能产生潜在的危害效应^[30]。因此,灵敏度作为检测方法的核心效能指标,直接决定了其在藻华预警、预报体系中的早期识别能力与可靠性。本研究在 RPA-LFD 检测方法的优化实验中,反应体系中加入 1 copies/ μ L 的质粒 2 μ L 在 42 °C 即可出现条带,表明本研究的 RPA-LFD 检测方法质粒灵敏度可达 1 copies/ μ L,明显高于 FU 等^[21-22]开发的剧毒卡尔藻和微小原甲藻的 RPA-LFD 检测方法的质粒灵敏度(均为 10 copies/ μ L)。本研究在灵敏度验证中,没有再选择 DNA 浓度作为灵敏性验证的依据,而是结合水样过滤和 DNA 提取的流程确定藻密度灵敏度。在统一过滤 1 L 海水的条件下,考虑过滤和 DNA 提取过程导致的损失,

其灵敏度依旧可以达到 1 cells/L,较常规 PCR 提高了 2 个数量级,与 mPCR 检测方法相当,也显著高于基于 LAMP 技术的检测方法(200 cells/mL)^[31]。实验结果也表明,样本处理过程中细胞捕获效率是影响检测方法灵敏度的关键因素之一。当水体中藻细胞密度低于检测限时,即便增加水样浓缩体积,仍需确保至少 1 个细胞被有效捕获并完成核酸提取方可实现检出,而低丰度样本的细胞随机分布特性将显著增加漏检概率。本研究发现,在常规过滤操作下,10 L 低浓度水样(含 1 个目标细胞)的样本处理过程中存在显著生物损失风险。尽管如此,本方法 1 cells/L 的检出限仍能充分满足快速检测塔玛亚历山大藻的需求。在实际应用中,DNA 提取质量(包括水体中游离 DNA 的有效获取)也是决定检测方法可靠性的关键。由于 RPA 扩增体系中的重组酶和单链 DNA 结合蛋白(SSB)的存在,使其对 DNA 提取质量的容忍度和对如腐殖酸等抑制剂的耐受性较普通 PCR 高。本研究以核糖体 DNA 内转录间隔区(ITS)序列为靶标,属于多拷贝基因,而且 RPA 扩增的目的片段长度较短(190 bp),这对于部分降解的 DNA 来说,仍可能保留足够的目标区域。综上,本研究的 RPA-LFD 检测方法对 DNA 提取质量并没有很高的依赖性,但对 DNA 粗提物的检测效率尚需进一步研究。

4 结论与展望

本研究建立的 RPA-LFD 检测方法可用于快速、特异性检测野外环境中的塔玛亚历山大藻,该方法操作简便、灵敏度和特异性高、反应时间短,配套试剂以市售冻干颗粒形式提供易获得,便于整合成检测试剂盒。配套设备小巧且易于携带,检测结果可及时对塔玛亚历山大藻的出现发出预警,为塔玛亚历山大藻藻华和外来入侵的早期预警及海洋环境监测提供了新工具,是现有塔玛亚历山大藻检测方法的良好替代方案和理想选择。在今后的研究中,还需加强适合野外场景的 DNA 快速提取装置和方法研究,比如开发常温裂解液,待滤膜裂解后直接取裂解液,利用 RPA-LFD 方法进行分析,还可将本研究的检测方法与样品采集和处理相整合,结合芯片技术和人工智能开发自动化平台,实现多技术联用,增强抗环境干扰和定量检测能力,推动塔玛亚历山大

藻检测方法的标准化和商业化推广。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] GOBLER C J, DOHERTY O M, HATTENRATH-LEHMANN T K, et al. Ocean warming since 1982 has expanded the niche of toxic algal blooms in the North Atlantic and North Pacific oceans[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(19): 4975-4980.
- [2] WELLS M L, TRAINER V L, SMAYDA T J, et al. Harmful algal blooms and climate change: learning from the past and present to forecast the future[J]. Harmful Algae, 2015, 49: 68-93.
- [3] WOLF D, GEORGIC W, KLAIBER H A. Reeling in the damages: harmful algal blooms' impact on Lake Erie's recreational fishing industry [J]. Journal of Environmental Management, 2017, 199: 148-157.
- [4] LIU Y, CAO X H, YU Z M, et al. Controlling harmful algae blooms using aluminum-modified clay[J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 103(1/2): 211-219.
- [5] GLIBERT P M. Harmful algae at the complex nexus of eutrophication and climate change[J]. Harmful Algae, 2020, 91: 101583.
- [6] 于仁成, 吕颂辉, 齐雨藻, 等. 中国近海有害藻华研究现状与展望[J]. 海洋与湖沼, 2020, 51(4): 768-788.
- YU R C, LYU S H, QI Y Z, et al. Progress and perspectives of harmful algal bloom studies in China[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2020, 51(4): 768-788.
- [7] HALLEGRAEFF G M. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge[J]. Journal of Phycology, 2010, 46(2): 220-235.
- [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] 代丽. 中国近海典型海域塔玛亚历山大藻复合种孢囊分布与长期变化研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2020.
- DAI L. Distribution pattern and long-term variation features of the resting cysts of *Alexandrium tamarense* species complex in typical regions of the China Seas[D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2020.
- [10] WANG L, ZHUANG Y Y, ZHANG H, et al. DNA barcoding species in *Alexandrium tamarense* complex using ITS and proposing designation of five species[J]. Harmful Algae, 2014, 31: 100-113.
- [11] HATFIELD R G, RYDER D, TIDY A M, et al. Combining nanopore sequencing with recombinase polymerase amplification enables identification of dinoflagellates from the *Alexandrium* genus, providing a rapid, field deployable tool[J]. Toxins, 2023, 15(6): 372.
- [12] 陈楠生, 张梦佳, 刘淑雅, 等. 中国海域赤潮物种多样性[J]. 海洋与湖沼, 2023, 54(3): 599-624.
- CHEN N S, ZHANG M J, LIU S Y, et al. Diversity of HAB species in coastal regions of China[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2023, 54(3): 599-624.
- [13] MEDLIN L K, OROZCO J. Molecular techniques for the detection of organisms in aquatic environments, with emphasis on harmful algal bloom species[J]. Sensors, 2017, 17(5): 1184.
- [14] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.
- [15] 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.
- [16] 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 veneticum* [J]. Harmful Algae, 2017, 62: 20-29.
- [17] 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.
- [18] 邹怡欣, 黄海龙, 乔龙亮, 等. 基于LAMP-LFD技术的有害赤潮藻东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)快检方法[J]. 海洋与湖沼, 2018, 49(3): 586-593.
- ZOU Y X, HUANG H L, QIAO L L, et al. Rapid detection of *Prorocentrum donghaiense* based on loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2018, 49(3): 586-593.
- [19] LEE P L M. DNA amplification in the field: move over PCR, here comes LAMP [J]. Molecular Ecology Resources, 2017, 17(2): 138-141.
- [20] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.
- [21] FU M Q, CHEN G F, ZHANG C Y, et al. Rapid and sensitive detection method for *Karlodinium veneticum* by recombinase polymerase amplification coupled with

- lateral flow dipstick[J]. *Harmful Algae*, 2019, 84: 1-9.
- [22] FU M Q, YANG Y C, ZHANG C Y, et al. Recombinase polymerase amplification combined with lateral-flow dipstick for rapid detection of *Prorocentrum minimum*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32(3): 1837-1850.
- [23] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, et al. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [24] COYNE K J, HANDY S M, DEMIR E, et al. Improved quantitative real-time PCR assays for enumeration of harmful algal species in field samples using an exogenous DNA reference standard [J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2005, 3(9): 381-391.
- [25] 高岩, 于仁成, 张青春, 等. 应用qPCR方法检测中国近海塔玛亚历山大藻复合种的研究[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(8): 2256-2263.
- GAO Y, YU R C, ZHANG Q C, et al. Application of qPCR method in detection of *Alexandrium tamarense* species complex in China [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(8): 2256-2263.
- [26] 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.
- [27] HU J Q, WANG Y, DING H M, et al. Recombinase polymerase amplification with polymer flocculation sedimentation for rapid detection of *Staphylococcus aureus* in food samples[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 331: 108691.
- [28] LIU W J, YANG Y T, DU S M, et al. Rapid and sensitive detection of goose parvovirus and duck-origin novel goose parvovirus by recombinase polymerase amplification combined with a vertical flow visualization strip[J]. *Journal of Virological Methods*, 2019, 266: 34-40.
- [29] LI J J, WANG C M, YU X, et al. Rapid detection of Cyanobacteria by recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strips [J]. *Water Supply*, 2019, 19(4): 1181-1186.
- [30] GEOHAB. Global ecology and oceanography of harmful algal blooms, science plan [M]. Baltimore and Paris: SCOR and IOC, 2001: 1-87.
- [31] 刘芳, 王丽, 李琳, 等. 环介导等温核酸扩增技术快速检测产毒亚历山大藻[J]. *现代食品科技*, 2007, 23(11): 71-74.
- LIU F, WANG L, LI L, et al. Rapid detection of toxic *Alexandrium* by loop-mediated isothermal amplification method [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 23(11): 71-74.

Establishment of detection method for *Alexandrium tamarense* by recombinase polymerase amplification coupled with lateral flow dipstick

WU Wenjing^{1,2}, SUN Hechen³, KANG Wei², HU Jianwei^{2,4}, GAO Qian², WANG Cuihua²

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, Liaoning, China; 2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Shanghai 200090, China; 3. College of Marine Science and Environment Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, Liaoning, China; 4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To meet the need for rapid detection of *Alexandrium tamarense* in field environments, it is imperative to develop a real-time method with high sensitivity and specificity. In this study, a visual method referred to as recombinase polymerase amplification coupled with lateral flow dipstick (RPA-LFD) was developed for rapid detection. The primers for RPA and the detection probe for LFD were designed to specifically target the internal transcribed spacer of *A. tamarense* by molecular cloning and multiple alignments of the related sequences. The results showed that the successful amplification for RPA could be achieved at optimal conditions of 42 °C and 15 min, and enough products were visually detected by the naked eye through an LFD after an automatic chromatography for 3 min at room temperature. The research indicated that the RPA-LFD exhibited exceptional specificity for *A. tamarense* and displayed no cross-reactivity with other common algae. The detection limits were as low as 1 copies/μL for plasmid DNA and 1 cells/L for intact cells, representing a 100-fold increase in sensitivity compared to conventional PCR methods. In conclusion, the developed RPA-LFD assay enables rapid detection of *A. tamarense*-induced HABs while enhancing invasive species screening efficiency at ports.

Key words: *Alexandrium tamarense*; recombinase polymerase amplification; lateral flow dipstick; rapid detection