



基于核酸适配体的胶体金比色法检测鳃弧菌*

黄将远^{1,2)} 郑江^{1,2)**} 薄军³⁾ 徐晓津^{1,2)} 谭英¹⁾⁽¹⁾ 集美大学水产学院, 厦门 361021; ⁽²⁾ 鳃弧菌现代产业技术教育部工程研究中心, 厦门 361021;⁽³⁾ 自然资源部海洋第三研究所, 厦门 361005)

摘要 **目的** 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 可引起鲑鱼、鳊鱼、鲈鱼和牙鲆等多种水产养殖动物的疾病, 是水产养殖中的一种重要病原菌, 对其进行快速检测是确保水产养殖安全和食品安全所必需的。**方法** 本文利用鳃弧菌与其核酸适配体之间较强的亲和力, 通过鳃弧菌夺取胶体金颗粒表面的核酸适配体, 使胶体金溶液的吸光度发生变化, 从而建立一种可定量检测鳃弧菌的方法。**结果** 该方法对鳃弧菌的吸光度值显著高于对溶藻弧菌、铜绿假单胞菌、变形假单胞菌、嗜水气单胞菌和迟钝爱德华氏菌等非目标菌的吸光度值 ($P < 0.01$), 并在 $1 \sim 10^5$ CFU/ml 的检测范围内呈现较好的线性关系。用该方法对不同盐度和鱼体组织样品进行加标回收检测, 结果显示回收率和相对标准偏差等指标都符合相应检测标准。**结论** 该检测方法对鳃弧菌有较好的特异性, 可用于水产品或食品中鳃弧菌的定量检测。

关键词 鳃弧菌, 核酸适配体, 亲和特异性, 吸光度**中图分类号** S9, Q17**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0262

鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 是水产养殖中的重要条件致病菌, 当养殖环境恶化或机体受创时, 鱼类等养殖品种极易感染鳃弧菌等病原菌, 出现体表溃烂出血、肠黏膜脱落、肝脏坏死, 甚至出现全身性组织病变等症状, 给水产养殖业造成巨大的经济损失^[1-5]。对鳃弧菌进行快速的检测鉴定是其病害防治的前提和基础。目前对弧菌的检测方法主要有微生物培养法、分子生物学等方法。微生物培养法存在耗时耗力、难以定量等问题^[6], 分子生物学法则成本较高、不能对结果进行直观判定、存在不同程度的假阳性问题^[7]。因此, 开发更为理想的鳃弧菌检测技术就显得十分必要。

核酸适配体 (aptamer) 是通过指数富集的配体系统进化 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 技术筛选出的一类能与靶目标特异性结合的寡核苷酸分子^[8-9]。与传统抗体相比, 核酸适配体具有高特异性、高亲和力、易合成、易修饰和稳定性好等优点^[10-11], 在疾病诊断与治疗、食品安全检测、细菌检测和环境监测等领域都得到广泛的应用^[12-15]。

本文将鳃弧菌的核酸适配体与胶体金结合形成

相应的检测复合物, 利用鳃弧菌可特异性地结合竞争检测复合物中的核酸适配体, 从而释放出有特定颜色的胶体金颗粒, 建立了一种可快速检测鳃弧菌的比色法。文中对该方法的原理、检测特异性、检测复合物的制备条件、定量检测效果等方面进行了研究和探讨, 相关成果对于鳃弧菌的病害防治以及核酸适配体的应用开发都具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

粒径为 20 nm 胶体金溶液, 湖州英创生物科技有限公司; 核酸适配体 H1 (5'-TCAGTCGCTTCGCCGTCTCCTTCTGCTCCTACTGACCACCCCGGCTGCACAAGAGGGAGACCCAGAGGG-3'), 为实验室前期筛选获得的鳃弧菌核酸适配体^[1], 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 用超

* 福建省自然科学基金 (2021J01823) 和鳃弧菌现代产业技术教育部工程研究中心开放基金 (RE202205, RE202308) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0592-6181420, E-mail: zhengjiang618@163.com

收稿日期: 2023-07-05, 接受日期: 2023-08-08

纯水配制成浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的贮存液, 于 -20°C 冰箱保存备用; 针式过滤器 50 mm, 上海新亚微孔滤膜公司; 滤膜, 上海新亚微孔滤膜公司, 直径 50 mm, 孔径 0.22 μm ; 海水晶, 江西盐通科技有限公司, 盐度 30‰, 可用于配制不同盐度的海水。

金属浴 TU-10, 海一恒科技有限公司; 纯水机 Smart-RO15, 上海和泰仪器有限公司; 高速台式离心机 TGL-16C, 上海安亭科学仪器厂; 全波长酶标仪 ReadMax2100P, 上海闪耀生物科技有限公司; 可调式混匀仪 MX-S, 北京大龙兴创实验仪器股份有限公司。

1.2 细菌和培养基

鳃弧菌、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 均由集美大学病原微生物实验室提供。

胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB 培养基), 用于鳃弧菌、溶藻弧菌、迟钝爱德华氏菌和嗜水气单胞菌的培养; LB 培养基, 用于铜绿假单胞菌和变形假单胞菌的培养。

1.3 实验方法

1.3.1 NaCl 浓度对检测吸光度的影响

取浓度为 2.4 $\mu\text{mol/L}$ 适配体 20 μl 与 60 μl 胶体金溶液结合, 在 25°C 下、200 r/min 摇床孵育 60 min, 将所得复合物与 20 μl 用超纯水悬浮的 10^5 CFU/ml 的鳃弧菌混合, 再在 25°C 下、200 r/min 摇床孵育结合 70 min, 然后分别与 60 μl 浓度为 100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600 mmol/L 的 NaCl 溶液混合反应, 测定混合液在 520 nm 处的吸光度值 (A_{520}), 获得吸光度与 NaCl 浓度的关系曲线, 以确定 NaCl 的浓度。

1.3.2 检测过程中吸收光谱的变化

整个检测过程经历了如下 4 个阶段: 胶体金 (Au) $\rightarrow$ 胶体金+核酸适配体 (Au+Apt) $\rightarrow$ 胶体金+核酸适配体+鳃弧菌 (Au+Apt+Va) $\rightarrow$ 胶体金+核酸适配体+鳃弧菌+NaCl (Au+Apt+Va+NaCl), 分别对这 4 个阶段的吸收光谱进行分析检测。具体如下所述。取 60 μl 胶体金作为样品 1 (Au)。60 μl 胶体金与 20 μl 浓度为 2.4 $\mu\text{mol/L}$ 的适配体 H1 在 25°C 下、200 r/min 摇床孵育结合 60 min, 作为样品 2 (Au+Apt)。样品 2 中加入 20 μl 浓度为 10^4 CFU/ml 的鳃弧菌, 在 25°C 下、200 r/min 摇床孵育 70 min,

得到样品 3 (Au+Apt+Va)。样品 3 中加入 60 μl 浓度为 400 mmol/L 的 NaCl 得到样品 4 (Au+Apt+Va+NaCl)。用超纯水分别将样品 1~3 稀释到总体积为 160 μl , 与样品 4 的总体积一样, 以排除体积不同导致的干扰, 然后用酶标仪在波长 320~700 nm 范围内扫描这 4 个样品获得相应的吸收光谱图。

1.3.3 特异性分析

将 2.4 $\mu\text{mol/L}$ 的核酸适配体于 95°C 金属浴中加热 5 min, 再冰浴 10 min。然后取 20 μl 适配体与 60 μl 胶体金结合, 配制成 80 μl 适配体-胶体金复合物。再用超纯水将 6 种细菌 (鳃弧菌、嗜水气单胞菌、变形假单胞菌、铜绿假单胞菌、迟钝爱德华氏菌和溶藻弧菌) 分别稀释至 $10\sim 10^7$ CFU/ml, 制成菌悬液, 然后各取 20 μl 与 80 μl 的胶体金-适配体复合物结合, 作为实验组; 另取 20 μl 的超纯水代替菌悬液, 与 80 μl 的胶体金-适配体结合, 作为对照组。实验组和对照组一同在 25°C 、200 r/min 摇床孵育结合 70 min, 随后离心取上清液, 与 60 μl 、400 mmol/L 的 NaCl 溶液混合反应, 然后测定混合液在 520 nm 处的吸光度值。由于实验组复合物中的适配体会被鳃弧菌夺取, 导致胶体金暴露, 加入 NaCl 后, 暴露的胶体金颗粒就会在 NaCl 的作用下发生聚集作用, 导致溶液的吸光度值发生变化, 而对照组没有菌, 也没有相应的聚集作用, 因此鳃弧菌对应的吸光度值=实验组的吸光度值-对照组的吸光度值。

1.3.4 胶体金-适配体复合物的制备条件优化

适配体与胶体金结合时间的优化: 2.4 $\mu\text{mol/L}$ 的核酸适配体于 95°C 金属浴中加热 5 min, 再冰浴 10 min, 然后取 20 μl 该适配体与 60 μl 的胶体金混合, 于 25°C 下 200 r/min 摇床结合不同时间, 之后分别加入 60 μl 400 mmol/L 的 NaCl 溶液混合反应, 再在 520 nm 处检测溶液的吸光度值, 绘制吸光度和结合时间的关系曲线, 根据这个曲线确定相应的结合时间。

适配体与胶体金结合比例的研究: 将 10 $\mu\text{mol/L}$ 的核酸适配体于 95°C 金属浴中加热 5 min, 再冰浴 10 min, 然后分别稀释为如下浓度梯度: 1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8 $\mu\text{mol/L}$ 。取 60 μl 胶体金溶液分别与 20 μl 上述浓度的适配体混合, 在 25°C 下 200 r/min 摇床结合 60 min, 随后每个样品加入 60 μl 400 mmol/L 的 NaCl 溶液混合反应, 测定 520 nm 处的吸光度值, 获得吸光度与适配体浓度的关系曲线, 根据这个曲线确定相应的结合比例。

1.3.5 鳃弧菌与胶体金-适配体复合物的结合时间研究

取 80 μl 适配体-胶体金复合物与 20 μl 浓度分别为 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 CFU/ml 鳃弧菌结合, 于 25°C 下 200 r/min 摇床孵育结合不同时间, 然后加入 60 μl 400 mmol/L 的 NaCl 溶液混合反应, 测定混合液在 520 nm 处的吸光度值, 获得吸光度与结合时间的关系曲线, 根据该曲线确定相应的结合时间。

1.3.6 定量检测研究

将目标菌鳃弧菌用超纯水分别稀释为 1、10、50、 10^2 、 5×10^2 、 10^3 、 5×10^3 、 10^4 、 5×10^4 和 10^5 CFU/ml, 然后取 80 μl 适配体-胶体金复合物分别与 20 μl 上述各浓度的鳃弧菌悬液结合, 于 25°C 下 200 r/min 摇床孵育结合 70 min, 作为实验组。另取上述 20 μl 超纯水代替菌悬液作为对照组, 与实验组执行相同操作。然后每个样品中各加入 60 μl 400 mmol/L 的 NaCl 溶液混合反应, 混合液在 520 nm 处测定吸光度值, 则鳃弧菌对应的吸光度值=实验组的吸光度值-对照组的吸光度值。以鳃弧菌浓度的对数 (10 为底) 为横坐标, 以其吸光度值为纵坐标, 作图并进行线性拟合, 可得到相应的定量曲线及其拟合方程。

1.3.7 海水样品加标回收检测的研究

胶体金对盐溶液敏感, 少量盐溶液就会导致胶体金的聚集变色, 干扰实验结果。而鳃弧菌可在海水环境下生存, 样品中经常含有海水成分, 因此海水盐度对检测结果有较大干扰, 需要对样品进行前处理。本研究先用能截留细菌的滤膜对海水样品进行过滤, 再用超纯水将滤膜上的菌洗涤下来, 经此前处理后再进行检测, 以消除海水盐度的干扰, 并通过加标回收实验进行验证。具体方法如下:

a. 加标样品的配制。用超纯水将 30‰ 海水晶配制为盐度分别为 0‰、40‰、60‰、70‰ 和 80‰ 的海水, 再用超纯水将鳃弧菌稀释至 20 、 2×10^2 、 2×10^3 、 2×10^4 CFU/ml。分别取上述菌悬液各 2 ml 与 2 ml 上述海水样品混合配制加标样品, 此时加标样品中的盐度分别为 0‰、20‰、30‰、35‰ 和 40‰, 鳃弧菌的浓度分别为 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 CFU/ml。

b. 样品的前处理。取 1 ml 加标样品用针式过滤器过滤, 让加标样品中的菌被截留在滤膜上, 然后将滤膜浸泡于 4 ml 超纯水中用混匀仪振荡 5 min,

使滤膜上的鳃弧菌脱落, 取出滤膜, 溶液 13 000 r/min 离心, 去上清, 菌沉淀再加入超纯水 4 ml 洗涤 1 次, 然后 13 000 r/min 离心, 去上清, 最后加入超纯水 1 ml 重悬菌沉淀。

c. 检测。按 1.3.6 中超纯水中菌浓度的测定方法, 对前处理后的菌悬液进行检测, 获得海水加标样品对应的吸光度值。即实验组取 20 μl 步骤 b 前处理后的菌悬液与 80 μl 胶体金-适配体复合物混合结合, 之后加入 60 μl 、400 mmol/L NaCl 使胶体金聚集变色; 对照组取 20 μl 超纯水代替实验组中的菌悬液, 与实验组同样操作。实验组和对照组都各 3 个平行。样品对应的吸光度值=实验组吸光度值-对照组吸光度值, 回收率=回收量/加入量 $\times$ 100%。

1.3.8 鱼体样品加标回收检测的研究

a. 加标样品的配制。将鳃弧菌的鳃、胃、肾、表皮、血液和肌肉等组织器官取出并剪碎, 分别称取 0.5 g, 浸泡于 5 ml 的超纯水中 1 h, 然后离心取上清制成相应的组织悬液。分别取 2 ml 上述组织悬液, 与 2 ml 浓度为 20 、 2×10^2 、 2×10^3 、 2×10^4 CFU/ml 菌悬液混合, 形成菌浓度分别为 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 CFU/ml 的加标样品。

b. 样品的前处理。取 1 ml 上述组织的加标样品用针式过滤器过滤, 按 1.3.7 的步骤 b 进行前处理, 最后获得 1 ml 菌悬液。

c. 检测。按 1.3.7 中步骤 c 的方法对前处理后的菌悬液进行检测, 获得鱼体组织加标样品对应的吸光度值。实验组和对照组都各 3 个平行。样品对应的吸光度值=实验组吸光度值-对照组吸光度值, 回收率=回收量/加入量 $\times$ 100%。

1.3.9 统计分析

所有实验均至少 3 组平行, 用 t 检验函数对实验数据进行组间差异分析, $P<0.05$ 为显著差异, $P<0.01$ 为极显著差异。

2 结果与讨论

2.1 检测原理

核酸适配体能通过静电吸附作用附着到胶体金 (Au) 颗粒表面, 将胶体金包裹保护起来, 从而使胶体金在高盐环境下不会发生聚集 (图 1)。本研究采用对鳃弧菌有特异亲和力的核酸适配体来包裹胶体金颗粒, 当环境中存在鳃弧菌时, 鳃弧菌会从胶体金表面夺走适配体, 使胶体金颗粒裸露出

来,从而在高盐环境下发生聚集,溶液出现颜色变化和吸光度值的变化,而且溶液在特定波长520 nm下的吸光度值与鳃弧菌的浓度在一定范围

内呈现出较好的线性关系,从而可以通过测定 A_{520} 来实现对鳃弧菌的定量检测。

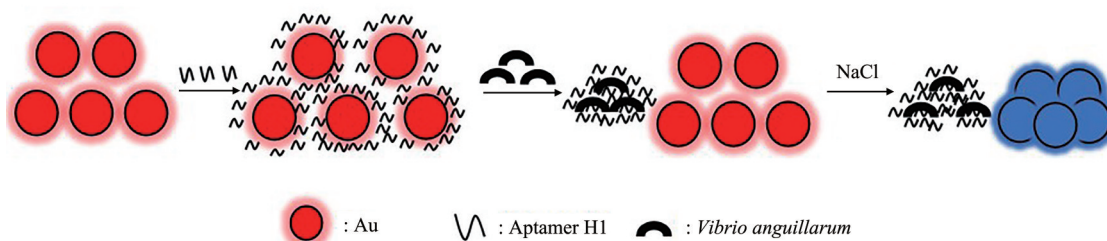


Fig. 1 Schematic illustration of colorimetric assay of *Vibrio anguillarum* based on AuNP and aptamer

2.2 NaCl浓度对检测吸光度的影响

吸光度值随着NaCl浓度的增加逐渐降低,在400 mmol/L以上后,吸光度值趋于平稳(图2)。说明高浓度的NaCl溶液会使胶体金颗粒聚集变色,吸光度值下降,但浓度达到一定阈值后,胶体金颗粒已完全聚集,再增加NaCl浓度,吸光度值也基本不再变动,因此后续都采用400 mmol/L的NaCl浓度。

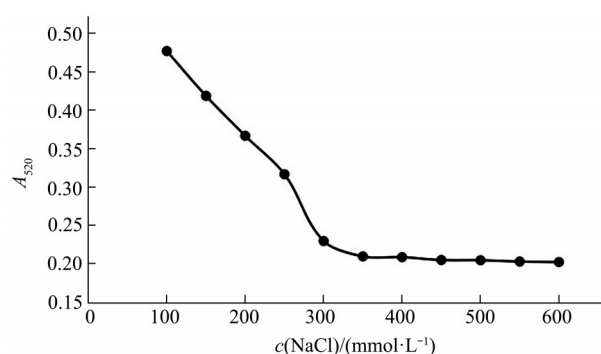


Fig. 2 Effect of NaCl concentration

2.3 检测过程中吸收光谱的变化

胶体金(Au)、胶体金与适配体结合形成复合物(Au+Apt)、胶体金-适配体复合物与鳃弧菌结合后(Au+Apt+Va),以及最后加入NaCl聚集变色后(Au+Apt+Va+NaCl)的4个阶段,吸收光谱都较为相似,均在520 nm处出现相应的吸收峰(图3),说明适配体、菌、NaCl的加入并没有改变胶体金的吸收峰位置,这与刘中成等^[16]、刘长勇等^[17]的研究结论是一致的。另外,从图中还可以发现,适配体的加入,保护了胶体金颗粒,使溶液

的 A_{520} 增加,细菌的加入则夺取了胶体金表面的适配体,使胶体金颗粒暴露,导致 A_{520} 下降,而NaCl的加入则导致胶体金颗粒的聚集变色,导致 A_{520} 的大幅下降。

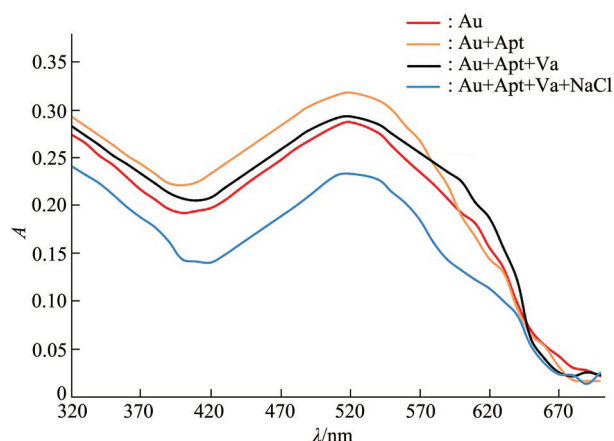


Fig. 3 Absorption spectra

2.4 特异性分析

如图4所示,菌浓度为0的是空白对照,在菌浓度为 $10 \sim 10^7$ CFU/ml区间,鳃弧菌的吸光度值都显著高于其他5种菌($P < 0.01$),说明该方法对鳃弧菌有较好的特异性。不过,鳃弧菌的吸光度值在 $10 \sim 10^5$ CFU/ml区间是随菌浓度升高而升高,在 $10^5 \sim 10^7$ CFU/ml区间则随菌浓度升高而下降,且在 $10^5 \sim 10^7$ CFU/ml区间鳃弧菌的吸光度值与其他5种菌的差异变小,因此,对鳃弧菌相对较好的检测范围应该是在 10^5 CFU/ml以内。另外,图5显示,随着鳃弧菌浓度的增加,胶体金溶液的颜色呈现出由红变蓝,再变红的特性。在菌浓度 $10 \sim 10^2$ CFU/ml

区间, 胶体金溶液呈红色, 当菌浓度增加到 $10^3 \sim 10^5$ CFU/ml 区间, 胶体金溶液变为蓝色, 且颜色逐渐加深, 当菌浓度增加到 $10^6 \sim 10^7$ CFU/ml 区间, 胶体金溶液又变成浅红色。说明胶体金的聚集变色作用在菌浓度 $10 \sim 10^5$ CFU/ml 范围中是随菌浓度的增加逐步增强的, 但在 10^6 CFU/ml 以上这种聚集变色效果却反而降低了。

鳃弧菌能特异性识别并吸附胶体金-适配体复合物中的适配体, 使胶体金颗粒裸露, 并在 NaCl 作用下聚集变蓝色, 菌浓度越大, 吸附的适配体越多, 胶体金颗粒裸露的越多, 聚集变色作用越明显。在鳃弧菌菌浓度为 $10 \sim 10^2$ CFU/ml, 由于菌浓

度较低, 聚集变色作用并不明显, 溶液还是呈现胶体金的红色; 当菌浓度达到 $10^3 \sim 10^5$ CFU/ml, 聚集变色作用显著, 胶体金溶液变成蓝色并随菌浓度的增加而逐渐加深; 当菌浓度增加到 $10^6 \sim 10^7$ CFU/ml, 复合物中的适配体已完全被菌吸附, 所有的胶体金颗粒已完全裸露, 此时过量的鳃弧菌已不能起到聚集变色的效果, 反而由于其具有的菌体蛋白质和核酸, 这些物质反而会对胶体金颗粒起到一定保护作用, 减弱胶体金颗粒的聚集变色作用, 因此胶体金溶液的颜色又变成浅红色。这种对胶体金的过量保护作用在一些蛋白质的检测中也有所报道^[16, 18]。

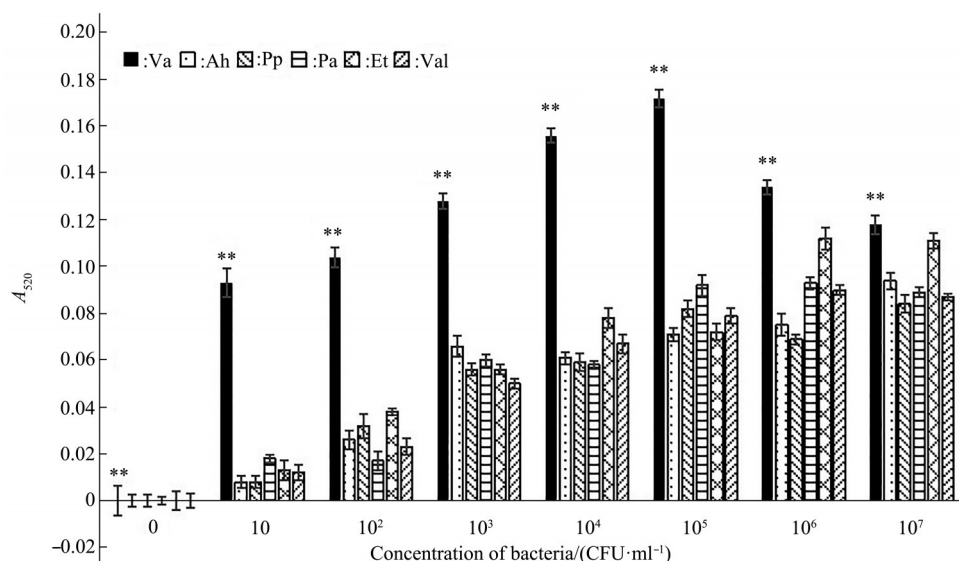


Fig. 4 Absorbance at 520 nm of *V. anguillarum* (Va), *A. hydrophila* (Ah), *Pseudomonas plecoglossicida* (Pp), *P. aeruginosa* (Pa), *E. tarda* (Et), *V. alginolyticus* (Val) at different concentrations

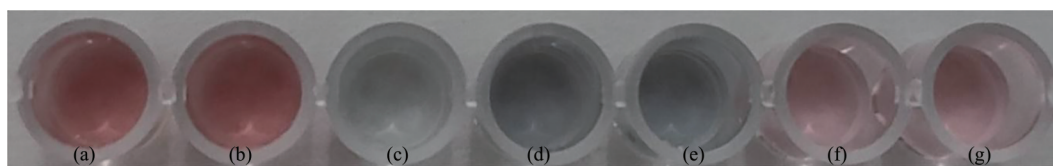


Fig. 5 Color changes of detection solution with the concentrations of *V. anguillarum* from 10 to 10^7 CFU/ml (a-g) $10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7$ CFU/ml of *V. anguillarum*.

2.5 胶体金-适配体复合物制备条件的优化

本文重点研究了复合物制备过程中胶体金与适配体的结合时间和结合比例。随着胶体金与适配体结合时间的延长, 吸光度值逐渐增大, 在结合 60 min 后趋于平稳, 不再明显增加 (图 6)。因此, 后续选择 60 min 作为二者结合反应的时间。

图 7 则显示, 随适配体浓度升高, 相应的吸光

度值也显著上升, 在适配体浓度到达 $2.4 \mu\text{mol/L}$ 之后趋于平稳, 不再显著增加, 说明此时胶体金颗粒已完全被适配体包裹, 再增加适配体浓度已无显著效果, 因此后续胶体金-适配体复合物的制备采用 $60 \mu\text{l}$ 的胶体金与 $20 \mu\text{l}$ $2.4 \mu\text{mol/L}$ 的适配体 H1 作为二者的结合比例。

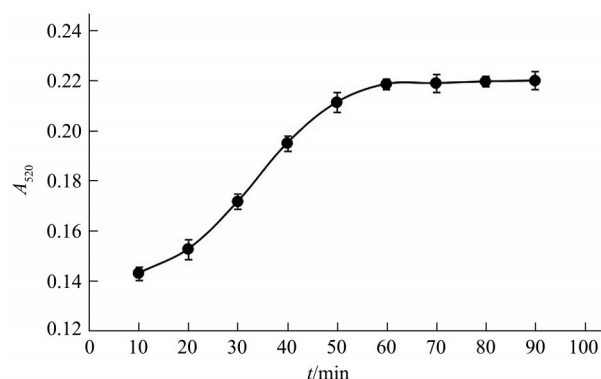


Fig. 6 Effect of binding time of aptamer and colloidal gold

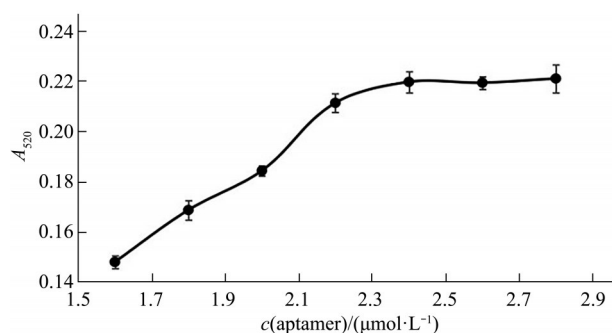
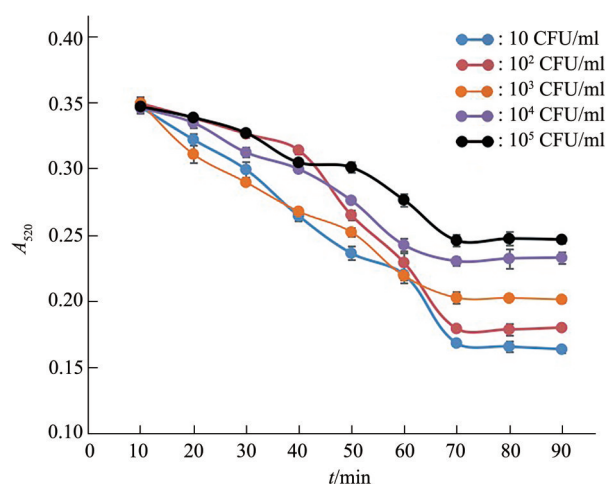


Fig. 7 Effect of concentration of aptamer

2.6 鳗弧菌与胶体金-适配体复合物的结合时间研究

不同浓度的鳗弧菌与胶体金-适配体复合物混合后,随着结合时间的增加,吸光度值均逐渐减小,并且都在70 min后趋于平稳(图8),说明鳗

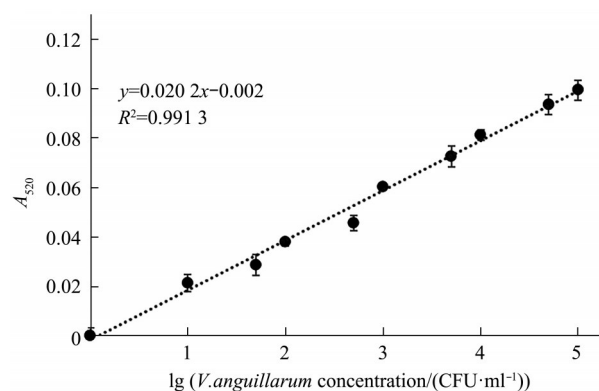
Fig. 8 Effect of binding time of *V. anguillarum* and Au-aptamer complex

弧菌与复合物的反应在70 min时已反应完全,因此后续都选择70 min作为鳗弧菌与复合物的结合反应时间。

另外,随着菌浓度的增加,溶液最终的吸光度值也是逐渐增加的。这可能是因为菌浓度越高,吸附的适配体也越多,裸露的胶体金颗粒也越多,加NaCl后的聚集变色作用也越强,因此溶液最终的吸光度值与菌浓度呈现正相关性。

2.7 鳗弧菌的定量分析

如图9所示,鳗弧菌与胶体金-适配体复合物结合后,随着鳗弧菌浓度增大,吸光度值也逐渐增大,且在浓度为 $1\sim 10^5$ CFU/ml区间呈现出良好的线性关系,线性拟合系数达到0.991 3,说明该检测方法在 $1\sim 10^5$ CFU/ml范围可实现对鳗弧菌的定量检测,最低检测限为1 CFU/ml。

Fig. 9 Quantitative analysis of *V. anguillarum*

2.8 海水样品的检测

对不同盐度的海水样品进行检测,盐度为0的空白对照组,相对标准偏差为1.31%~2.11%,回收率为117.30%~126.08%,而有盐度的实验组,相对标准偏差为0.62%~3.05%,回收率为92.68%~130.47%(表1)。实验组的波动略大。但该方法总体相对标准偏差均小于12%,符合相应的检测体系标准^[19]。同时,根据2020年的《中华人民共和国药典》中对微生物计数的要求,回收率要处于50%~200%范围内^[20],采用该方法进行检测的回收率均达到要求。因此该方法在实际检测中是可行的,可用于海水等样品中鳗弧菌的检测。

Table 1 Detection of *V. anguillarum* of seawater samples in recovery experiment

Seawater salinity/‰	Added amount/(CFU·ml ⁻¹)	<i>A</i> ₅₂₀	Relative standard deviation/%	Rate of recovery/%
0	10	0.020 2±0.002	2.11	126.08
	10 ²	0.039 8±0.001	2.00	117.30
	10 ³	0.060 2±0.005	1.58	119.55
	10 ⁴	0.080 7±0.003	1.31	123.71
20	10	0.019 4±0.003	1.47	114.66
	10 ²	0.040 3±0.004	1.71	124.75
	10 ³	0.060 5±0.003	1.13	124.18
	10 ⁴	0.080 9±0.002	1.41	127.05
30	10	0.019 3±0.004	0.83	113.79
	10 ²	0.039 8±0.004	1.55	117.30
	10 ³	0.060 1±0.002	0.81	119.10
	10 ⁴	0.080 7±0.004	2.32	123.71
35	10	0.017 5±0.004	3.05	92.68
	10 ²	0.038 6±0.006	1.87	101.92
	10 ³	0.060 9±0.004	1.45	130.47
	10 ⁴	0.081 0±0.005	2.20	128.99
40	10	0.020 1±0.004	1.45	124.18
	10 ²	0.040 5±0.004	1.31	126.56
	10 ³	0.059 5±0.001	1.49	111.23
	10 ⁴	0.080 4±0.006	0.62	119.55

2.9 鱼体组织样品的检测

不同盐度的样品, 添加量为 10 CFU/ml 时, 加标回收率是 101.53%~148.46%, 添加量为 10² CFU/ml 时, 加标回收率是 129.48%~145.12%, 添加量为 10³ CFU/ml 时, 加标回收率是 83.33%~136.56%, 添加量为 10⁴ CFU/ml 时, 加标回收率是 133.48%~149.60% (表 2)。根据 2020 年的《中华人民共和国

药典》中对微生物计数的要求, 回收率要处于 50%~200% 范围内, 上述回收率均符合要求^[19]。同时, 该方法检测海水样品获得的相对标准偏差均小于 12%, 符合检测体系标准^[20]。综上所述, 该检测方法准确可靠, 可用于水产品或食品中鳎弧菌的检测。

Table 2 Experimental results of labeling recovery of *V. anguillarum* from eel tissues

Fish tissue	Added amount/(CFU·ml ⁻¹)	<i>A</i> ₅₂₀	Relative standard deviation/%	Rate of recovery/%
Gill	10	0.021 0±0.003	1.96	137.60
	10 ²	0.041 8±0.004	2.29	147.90
	10 ³	0.061 0±0.003	1.59	130.97
	10 ⁴	0.082 9±0.002	1.01	159.58
Stomach	10	0.023 0±0.002	1.42	172.18
	10 ²	0.041 0±0.004	2.13	133.99
	10 ³	0.060 2±0.002	1.13	119.55
	10 ⁴	0.083 0±0.002	1.02	160.79
Kidney	10	0.021 9±0.003	1.78	151.89
	10 ²	0.041 2±0.004	2.04	137.08
	10 ³	0.060 5±0.004	1.89	124.65
	10 ⁴	0.080 4±0.005	2.41	119.55

Continued to Table 2

Fish tissue	Added amount/(CFU·ml ⁻¹)	A ₅₂₀	Relative standard deviation/%	Rate of recovery/%
Epidermis	10	0.018 6±0.004	2.42	105.06
	10 ²	0.037 7±0.002	0.93	92.68
	10 ³	0.060 0±0.005	2.52	117.30
	10 ⁴	0.080 9±0.004	1.56	127.05
Muscle	10	0.020 8±0.004	2.36	135.01
	10 ²	0.042 3±0.004	2.29	155.39
	10 ³	0.060 7±0.001	0.71	126.56
	10 ⁴	0.082 8±0.003	1.25	158.37
Blood	10	0.018 3±0.004	2.42	101.53
	10 ²	0.039 4±0.002	1.32	112.50
	10 ³	0.058 0±0.006	3.03	93.74
	10 ⁴	0.082 1±0.004	1.87	145.12

3 结 论

利用鳃弧菌与其适配体有较高的亲和特异性,鳃弧菌会将吸附在胶体金颗粒表面的适配体夺走,使胶体金颗粒裸露出来,并在高盐条件下发生聚集变色,而且胶体金溶液在520 nm处的吸光度值与菌浓度呈现较好线性关系。本文基于此原理,对NaCl浓度、适配体与胶体金的结合时间、结合比例等关键因素进行了研究优化,建立了比色法快速检测鳃弧菌的方法。该方法特异性好、稳定性高、检测过程简单快捷,在1~10⁵ CFU/ml范围内可实现对鳃弧菌的定量检测,最低检测限为1 CFU/ml,体现出了较好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 郑江,刘慧敏,黄力行,等.鳃弧菌核酸适配体的筛选及其结合蛋白的分离鉴定.生物化学与生物物理进展,2022,49(1): 250-261
Zheng J, Liu H M, Huang L X, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2022, 49(1): 251-261
- [2] Daniel C, Paul D A, Ruiqi X, *et al.* Comparative genome analyses of *Vibrio anguillarum* strains reveal a link with pathogenicity traits. Microorganisms, 2017, 1(2): 1-14
- [3] Frans I, Michiels C W, Bossier P, *et al.* *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. J Fish Dis, 2011, 34: 643-661
- [4] 丁承超,谢曼曼,曾海娟,等.弧菌外膜蛋白Ompk基因序列分析及其多克隆抗体的制备.食品科学,2016,37(23): 141-146
Ding C C, Xie M M, Zeng H J, *et al.* Food Sci, 2016, 37(23): 141-146
- [5] Wang J J, Li Q, Huang L X. Effect of the zinc transporter ZupT on virulence mechanism of mesophilic *Aeromonas salmonicida* SRW-OG1. Anim Res One Health, 2023, 1: 1-13
- [6] 卢春霞,李红敏,孙凤霞,等.基于适配体识别的侧向层析法快速检测单核细胞增生李斯特氏菌.食品与生物技术学报,2020,39(4): 85-91
Lu C X, Li H M, Sun F X, *et al.* J Food Sci Biotechnol, 2020, 39(4): 85-91
- [7] 山珊,黄昭鸿,黄艳梅,等.不对称PCR技术结合免疫层析法快速检测产志贺毒素大肠埃希氏菌.食品科学,2021,42(2): 312-318
Shan S, Huang Z H, Huang Y M, *et al.* Food Sci, 2021, 42(2): 312-318
- [8] Mariia D, Silvie R, Helena G, *et al.* Current approaches in selex: an update to aptamer selection technology. Biotechnol Adv, 2015, 33: 1141-1161
- [9] Zhuo Z J, Yu Y Y, Wang M L, *et al.* Recent advances in selex technology and aptamer applications in biomedicine. Int J Mol Sci, 2017, 18(10): 2142
- [10] Tatsuo A, Yoshikazu N. Aptamers: a review of their chemical properties and modifications for therapeutic application. Molecules, 2019, 24(23): 4229
- [11] Tomas H, Dinshaw J P. Adaptive recognition by nucleic acid. Science, 2000, 287(5454): 820-825
- [12] Wendy M, Li Y. Recent progress in nucleic acid aptamer-based biosensors and bioassays. Sensors, 2008, 8(11): 7050-7084
- [13] Sara T, Maria M, Marco M. Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. Biomol Eng, 2007, 24(2): 191-200
- [14] Dong Y, Xu Y, Yong W, *et al.* Recent progress in nucleic acid aptamer-based biosensors and bioassays. Crit Rev Food Sci, 2013, 54(12): 1548-1561
- [15] Naser A, Mohammad Y M, Seyyed R M, *et al.* Naser alizadeh, aptamer-assisted novel technologies for detecting bacterial pathogens. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 737-745
- [16] 刘中成,赵丽健,刘利鹏,等.基于胶体金检测核酸适配子与蛋白相互作用的新方法.高等学校化学学报,2015,36(4):

- 638-645
Liu Z C, Zhao L J, Liu L P, *et al.* Chem J Chinese U, 2015, **36**(4): 638-645
- [17] 刘长勇, 卢春霞, 陈霞, 等. 基于适配体-阳离子化合物诱导纳米金聚集比色法快速检测苏丹红. 食品工业科技, 2023, **44**(3): 279-285
Liu C Y, Lu C X, Chen X, *et al.* Sci Technol Food Ind, 2023, **44**(3): 279-285
- [18] 白文荟, 刘金钊, 陈爱亮. 纳米金比色法在食品安全检测中的应用研究进展. 食品安全质量检测学报, 2014, **5**(7): 1944-1950
Bai W H, Liu J C, Chen A L, *et al.* J Food Saf Qual, 2014, **5**(7): 1944-1950
- [19] 孔德莉, 罗思, 彭瑞晨, 等. 基于无标记金纳米簇的新型荧光生物传感器在赭曲霉毒素 A 快速检测中的应用. 食品科学, 2021, **42**(4): 263-270
Kong D L, Luo S, Peng R C, *et al.* Food Sci, 2021, **42**(4): 263-270
- [20] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 538-543
National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 538-543

Detection of *Vibrio anguillarum* by Colorimetry Based on Colloidal Gold and Aptamer*

HUANG Jiang-Yuan^{1,2)}, ZHENG Jiang^{1,2)**}, BO Jun³⁾, XU Xiao-Jin^{1,2)}, TAN Ying¹⁾

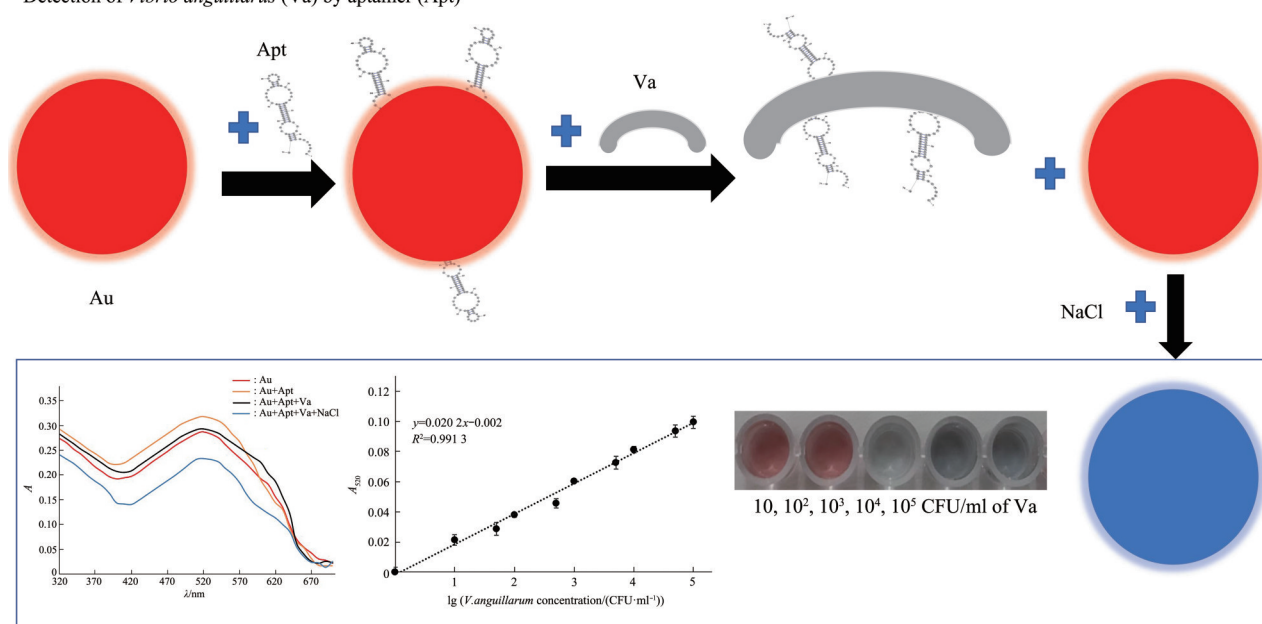
(¹⁾Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China;

²⁾Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China;

³⁾Third Institute of Oceanology, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China)

Graphical abstract

Detection of *Vibrio anguillarum* (Va) by aptamer (Apt)



Abstract Objective *Vibrio anguillarum* is an important pathogen in aquaculture, which can infect salmon, eel, perch and flounder. Rapid detection is necessary to ensure aquaculture and food safety. **Methods** Based on the strong affinity between *V. anguillarum* and its aptamers, the bacterium can capture its aptamer from the surface of colloidal gold particles and change the absorbance of the colloidal gold solution. Thus, a colorimetric method for the quantitative detection of *V. anguillarum* was established. **Results** The optical density for *V. anguillarum* by the present method was much higher than those of non-target bacteria such as *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* ($P<0.01$). The detection method had good linear relationship in the range of 1–10⁵ CFU/ml. The seawater samples with different salinities and fish body tissue samples were detected for the application, and the results showed that the recoveries and relative standard deviations of these samples were in line with the corresponding detection standards. **Conclusion** The present detection method has good specificity for *V. anguillarum* and can be used for the quantitative detection of the bacterium in aquatic products or food.

Key words *Vibrio anguillarum*, aptamer, affinity specificity, absorbance

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0262

* This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Fujian Province (2021J01823) and the Open Funds from the Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education (RE202205, RE202308).

** Corresponding author.

Tel: 86-592-6181420, E-mail: zhengjiang618@163.com

Received: July 5, 2023 Accepted: August 8, 2023