

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)

1. 研究背景

1.1 有害藻华的生态威胁与检测需求

有害藻华（HAB）是海洋浮游生物异常增殖引发的重大生态灾害，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，严重威胁海洋生态安全和公共卫生。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”的协同演进趋势，已成为跨境性环境治理难题。塔玛亚历山大藻（Alexandrian amanuenses）作为主要有害藻华原因种，能够产生强效麻痹性贝类毒素，其藻华事件已在全球多个海域造成持续性生态威胁，并通过船舶压载水传播加剧了物种入侵风险。

1.2 现有检测技术的局限性

目前塔玛亚历山大藻的检测主要依赖形态学鉴定，但由于其与复合种内近似种（如链状亚历山大藻）形态高度相似，传统方法在准确性、灵敏度及现场适用性方面存在显著不足。虽然crop、LAMP等分子检测技术提高了检测灵敏度，但这些方法普遍受限于设备依赖性、操作流程复杂或气溶胶污染风险等问题，难以满足野外实时监测对便携性、速度及操作简便性的迫切需求。

1.3 RPA-LFD技术的优势与应用前景

重组酶聚合酶扩增（RPA）技术可在37-45℃恒温条件下快速完成核酸扩增，仅需一对特异性引物即可实现靶标序列的高效扩增。通过与横向流动试纸条（LFD）联用形成的RPA-LFD技术体系，突破了传统分子检测的时空限制，具有反应快速、灵敏度高、结果可视化等优势，为现场快速检测提供了理想解决方案。本研究首次将RPA-LFD技术应用于塔玛亚历山大藻的检测领域，旨在建立一种适用于野外环境的快速、灵敏、特异性检测方法，为有害藻华早期预警和物种入侵防控提供可靠技术支持。

2. 实验方法

2.1 靶标选择与引物设计

选择塔玛亚历山大藻ITS基因为检测靶标，通过多序列比对设计6对引物和5条探针。经过系统筛选，确定最佳引物-探针组合F6/P5/R5；下游引物R5进行生物素标记，探针P5两端分别修饰FAM荧光基团和C3-Spacer阻滞基团中间含THF位点。构建的重组质粒经PCR验证（表1）后作为阳性标准品。

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
<i>FW81</i>	5'-GGGATCCGTTTCCTAGGTGAACCTGC-3'	554
<i>AB28</i>	5'-GGGATCCATATGCTTAAAGTTCAGCGGGT-3'	

表1 ITS DNA PCR扩增引物序列

Tab.1 Summary of primer targeting ITS DNA of Alexandrian amanuenses

2.2 RPA-LFD检测体系建立

建立25μL RPA反应体系，包含引物、探针和模板DNA。通过温度梯度（38-44℃）和时间梯度（10-25 min）实验，确定最佳反应条件为42℃恒温扩增15 min。取5μL扩增产物进行LFD检测，室温层析3 min后通过质控线（C）和检测线（T）显色判读结果。使用10种藻类DNA验证特异性，系列稀释藻细胞验证灵敏度。

3. 结果

3.1 最佳引物探针筛选

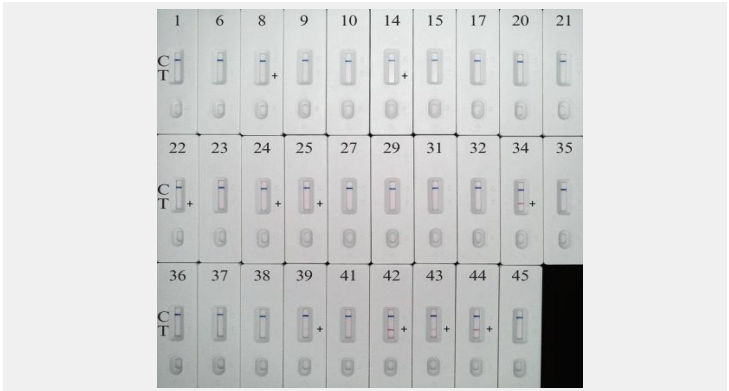
从45组引物-探针组合中筛选出最佳组合F6/P5/R5，无假阳性且条带清晰。

阴性对照筛选结果显示16组出现假阳性，29组无假阳性；阳性反应筛选显示10组可检测到条带，其中3组反应条带较深。



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重组质粒PCR扩增结果

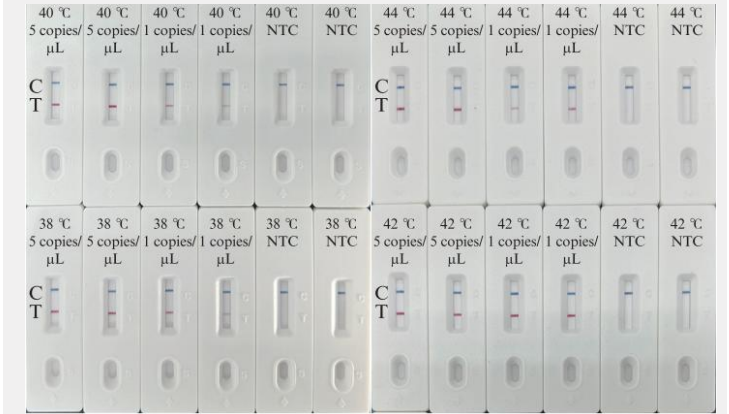


C. 质控线; T.检测线; 1-45.引物探针组合。
C.Control line;T.Test line;1-45.Primer and probe sets.

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

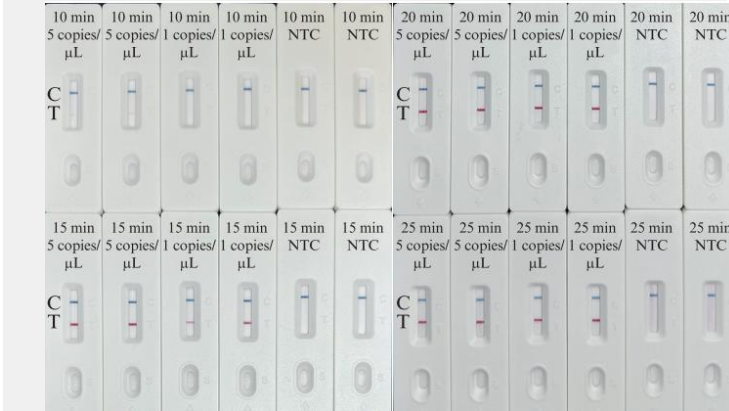
3.3 最佳反应条件确立

通过系统优化，确定RPA-LFD最佳反应条件为42℃恒温扩增15分钟。在此条件下，质粒检测灵敏度可达1 copy/μL，且重复性良好。42℃时条带最强，重复性最好；15分钟时即可检测到2 copies/管。



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

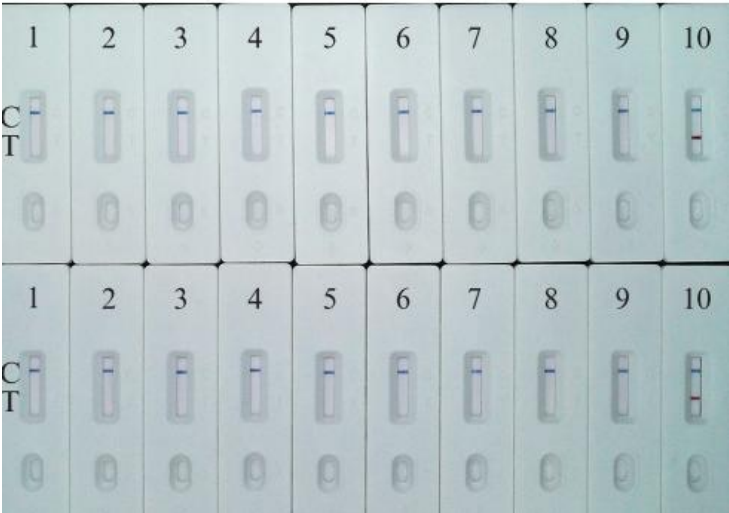


C. 质控线; T.检测线; NTC.阴性对照。
C.Control line;T.Test line;NTC.Negative template control.

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

3.4 优异特异性验证

仅塔玛亚历山大藻显示阳性条带，9种常见藻类无交叉反应。仅塔玛亚历山大藻同时出现质控线和检测线

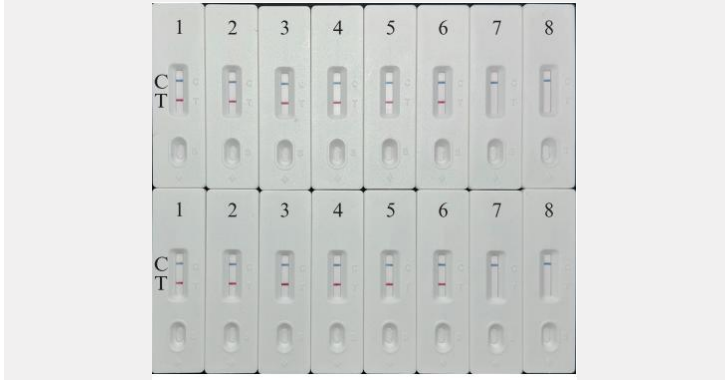


C. 质控线; T.检测线; 1.赤潮异湾藻; 2.虫黄藻; 3.中肋骨条藻; 4.米氏凯伦藻; 5.海生小球藻; 6.海洋原甲藻; 7.东海原甲藻; 8.针杆藻; 9.微小亚历山大藻; 10.塔玛亚历山大藻。
C.Control line;T.Test line;1.Hetero sigma kwashiorkor;2.Symbiosis tip.;3.Skeleton costume;4.Karenina motorbike;5.Chancellor marina;6.Procurement mica's;7.Procurement shikokuense;8.Synergy tip.;9.Alexandrian minute;10.Alexandrian amanuenses.

图7 RPA-LFD检测方法的特异性验证
Fig.7 Specificity of RPA-LFD assay

3.5 超高灵敏度表现

灵敏度达1 cells/L，较常规PCR提高100倍。

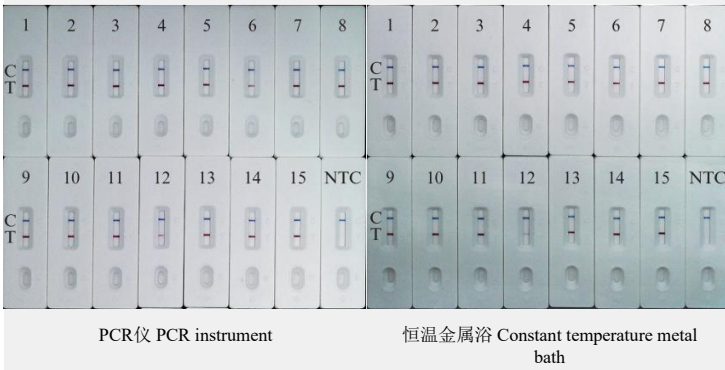


C. 质控线; T.检测线; 1.1 0⁵ cells/L;2.10⁴cell/L;3.10³cells/L;4.10²cells/L;5.1 0¹cell/L;6.10⁰ cells/L;7.10⁰cells/L;8.阴性对照
C.Control line;T.Test line;1.10⁵cells/L;2.10⁴cells/L;3.10³cells/L;4.10²cells/L;5.10¹cells/L;6.10⁰ cells/L;7.10⁰cells/L;8.Negative template control.

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

3.6 现场应用可行性

在PCR仪和金属浴上均能稳定检出，适合野外使用。



C. 质控线; T.检测线; 1-15.随机浓度; NTC. 阴性对照。
C.Control line;T.Test line;1-15.Random concentration;NTC.Negative template control.

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

6. Conclusions

本研究建立的RPA-LFD检测方法在塔玛亚历山大藻的快速检测中表现出卓越性能。在特异性验证中，该方法仅对塔玛亚历山大藻产生特异性反应，与微小亚历山大藻、赤潮异湾藻、米氏凯伦藻等9种常见藻类均无交叉反应（图6、图7），显示出高度的物种鉴别能力，有效解决了传统形态学鉴定因物种间形态相似而导致的误判问题。

在灵敏度方面，该方法对塔玛亚历山大藻质粒DNA和完整细胞的检测限分别达到1 copies/μL和1 cells/L（图8、图9），较常规PCR方法提高了2个数量级。即使在藻细胞密度仅为10⁰-10¹ cells/L的极低浓度下仍能稳定检出，而常规PCR在此浓度下已无法获得有效条带，表明该方法能够满足海水中低密度塔玛亚历山大藻的检测需求，为藻华早期预警提供了可靠技术保障。

通过模拟野外环境检测实验，本研究进一步验证了该方法的实用性和适应性。在洋山港海水样品中添加不同浓度塔玛亚历山大藻的测试中，RPA-LFD方法在PCR仪和便携金属浴上均能稳定检测目标藻类（图10），证明其对设备要求低，可适配野外检测场景。特别是金属浴的成功应用，为现场快速检测提供了设备基础，使该方法具备了真正的野外应用价值。

与现有检测技术相比，本研究建立的RPA-LFD方法具有显著优势：检测时间仅需18分钟（RPA反应15分钟+LFD检测3分钟），远少于传统PCR方法的2-3小时；操作简便，无需复杂仪器设备；结果判读直观，通过试纸条显色即可判定。此外，RPA扩增体系对DNA提取质量要求较低，对抑制剂耐受性较高，这些特点使其特别适合口岸检疫、现场监测等应用场景。该方法为塔玛亚历山大藻藻华预警和物种入侵防控提供了新的技术手段，具有良好的推广应用前景。