

数字 PCR 技术在水产病原菌检测中的应用

马新冉, 肖雨晴, 雷春, 王宏新, 王磊

(鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264039)

摘要: 数字 PCR 是一种新兴的基因检测方法, 是继常规 PCR、实时荧光定量 PCR 之后的第三代 PCR 基因检测技术。在传统的水产病原菌的分子检测方法中, 普通 PCR 检测结果需要通过琼脂糖凝胶电泳检测、耗时长, 并且不能对检测病原进行定量; 实时荧光定量 PCR 技术则需要依赖内参基因进行相对定量分析, 难以满足水产病害快速精准检测的需要。数字 PCR 技术实现了对检测样本的绝对定量分析, 具有前所未有的准确度和重现性, 为快速准确地进行水产病原菌的检测提供了崭新的技术平台, 具有广阔的发展和应用前景。本文主要介绍了数字 PCR 的产生、原理和分类, 并深入探讨了数字 PCR 技术在水生生物致病菌和水产品食源性致病菌检测中的应用。

关键词: 数字 PCR; 水产病原菌; 食源性致病菌; 定量分析; 检测

中图分类号: S911.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-8020(2020)01-0048-07

自上个世纪 80 年代以来, 我国水产养殖业的规模和产量发展迅速, 已成为国内农业经济的四大支柱产业(粮食、肉类、水产和禽蛋)之一^[1]。据中国水产养殖网统计, 我国 2018 年水产品年产量突破 8900 万 t。然而, 由于水产养殖规模的扩大、养殖密度的增加以及养殖环境的恶化, 各种水产病害不断爆发, 发病区的发病率达到 30%, 带病率高达 40%~80%, 减产量达到 30%~40%, 严重的阻碍了水产养殖业的发展^[2]。统计显示, 水产养殖病害约有 400~500 种, 大多数是由细菌、真菌、病毒和寄生虫等引起。其中细菌性病原品种多, 分布广, 传播速度快, 对水产养殖业造成巨大危害^[3]。另外, 细菌还会造成水产品的污染、腐败, 给水产养殖业下游的水产加工业也带来严重的经济损失。常见的水生生物致病菌主要有: 副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)^[4]、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)^[5]、点状气单胞菌 (*Aeromonas punctata*)^[6]、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[7]、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)^[8]、温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*)^[9]; 水产品食源性致病菌主要有: 沙门氏菌 (*Salmonella*)^[10]、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)^[11]、大肠杆菌 (*Escherichia*

coli)^[12]、志贺氏菌 (*Shigella Castellani*)^[13]、李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)^[14] 等, 如何对这些水产病原菌进行快速检测越来越受到水产养殖业和水产加工业从业人员和研究人员的普遍关注。

目前, 针对水产病原菌的检测技术主要有细菌分离培养鉴定、生理生化指标检测、电子显微镜检测和分子生物学检测等方法, 但是细菌培养及生理生化指标检测方法具有耗时、费力、精确性和可靠性有限的缺点, 而电子显微镜检测需要依赖高端的设备。目前 PCR (polymerase chain reaction) 检测技术以其快速、灵敏、易于普及等优点成为目前水产病原菌检测中应用最普遍的技术。近年来, 在常规 PCR 和实时荧光定量 PCR (Real-time Quantitative PCR, qPCR) 基础上迅速发展起来了第三代 PCR 技术——数字 PCR (digital PCR, dPCR)。数字 PCR 是一种核酸分子绝对定量分析技术, 它是一种将 PCR 反应物进行有限稀释, 随后在大量不同的反应单元中进行独立的 PCR 扩增, 最后根据泊松分布原理及阳性微滴的个数与比例经过统计学分析直接数出 DNA 分子的个数的技术^[15]。该技术不需要内参基因, 也不必制作标准曲线, 对特异性模板扩增抑制剂等干扰因素

收稿日期: 2019-09-10; 修回日期: 2019-12-11

基金项目: 山东省重点研发计划 (2019GSF107091; 2019GSF109114); 山东省海洋与渔业科技创新计划 (2017YY04)

第一作者简介: 马新冉 (1998—), 女, 山东菏泽人, 研究方向为分子生物学。E-mail: maxinran6160@163.com

通信作者简介: 王磊 (1975—), 男, 山东泰安人, 教授, 硕士研究生导师, 博士, 研究方向为分子生物学。E-mail: wanglei9909@163.com

的耐受性更强,能够在 2~3 h 内对低浓度的核酸样品进行精确定量^[16-17]。数字 PCR 以其操作简便、耐受性强、检测灵敏度高、特异性好及绝对定量等优势受到人们的青睐^[18],被广泛应用于物种鉴定、微生物检测、疾病诊断、转基因定量分析等方面^[19-20],应用前景广阔。目前,数字 PCR 检测已经在一些常见的水生生物致病菌和食源性病原菌中开展,例如副溶血性弧菌、沙门氏菌、大肠杆菌等。本文在现有研究的基础上,对数字 PCR 在水产病原菌检测中的应用展开了综述。

1 数字 PCR 的产生

自 1985 年 K.Mullis 发明聚合酶链式反应技术以来^[21],PCR 技术作为一种快速、高效、简便的体外核酸扩增技术被广泛应用于医学、生物学、食品卫生等领域。但第一代 PCR 检测技术需对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,电泳过程中需要用到溴化乙锭等有毒害的染料,且耗费时间。除此之外,该技术只能判断扩增产物的分子量大小,不能进行精确的定量分析。1992 年,日本科学家 Higuchi 等^[22]提出了 qPCR 技术的设想。在此之上,美国 ABI 公司于 20 世纪 90 年代后期,在一代 PCR 技术的基础上发展了利用标准曲线的相对定量,被称为“第二代 PCR 技术”。该技术引入了荧光基团,运用荧光信号的累积和 PCR 产物的增加,同步对 PCR 进行程度进行实时检测,最后借助标准曲线对待测模板进行定量分析。该方法可以实现在 PCR 产物扩增的同时进行闭管定量检测,具有污染少、灵敏度高等优点。但是,由于 qPCR 需要以内参基因作为参照,在扩增过程当中不能确保稳定的扩增效率,用于定量分析的循环阈值(Ct)不是恒定不变的,目标基因与内参基因扩增效率不同将导致定量结果与实际情况存在一定的偏差,只能做到相对定量。为了达到绝对定量的目的,早在 1992 年 qPCR 技术成熟之前, Morley 等^[23]为检测体细胞突变导致的白血病,将体外培养的细胞分配在多个培养孔中,发现突变克隆遵循泊松分布,他们将这个原理移植到 PCR 扩增上,将待测核酸样品有限稀释使每个样孔中只获得单个模板分子,PCR 扩增后通过泊松分析实现高灵敏度地定量白血病细胞。这一过程,他们称之为“有限稀释 PCR”,也就是数字 PCR 的前

身。1999 年, Vogelstein B 等^[24]提出了数字 PCR 的概念,将一个样本平均分配到数百乃至上万个反应单元中,每个反应单元独立开展 PCR 扩增,在反应结束后利用统计学手段对收集到的各个反应单元的荧光信号进行数据分析。他们在分析鼠类肉瘤病毒致癌基因同源突变体 B1(v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, B-RAF) 基因时,为避免体细胞基因的干扰和提高检测灵敏度,将样本分配到 384 个孔板中分别扩增,通过用不同的荧光检测突变基因和正常基因得出突变率。但是在早期,由于很难实现样品分配的均匀性,数字 PCR 的发展受到限制^[25]。近来随着技术的不断完善和一些新技术的出现,数字 PCR 技术逐渐突破瓶颈实现商业化,Fluidigm 公司于 2006 年生产出第一个商业化的芯片式数字 PCR 仪, Bio-Rad 公司于 2011 年、2013 年相继推出基于油包水乳技术的微滴式 PCR。

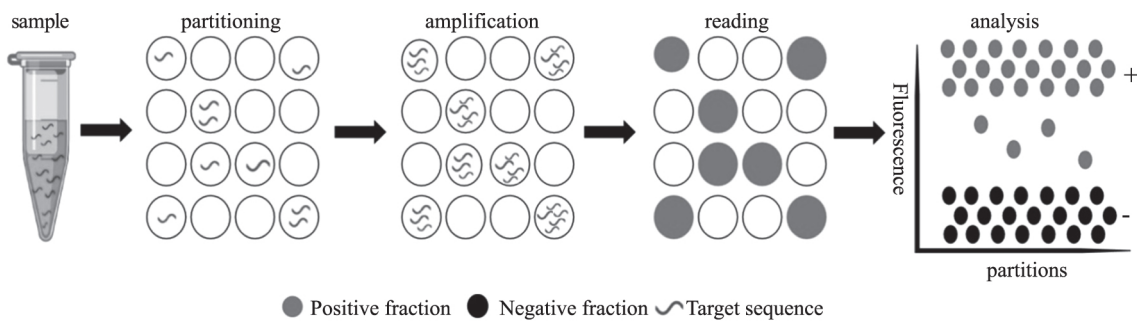
2 数字 PCR 的原理

数字 PCR 包含 PCR 扩增和荧光信号采集两个部分,将核酸样品进行微滴化稀释处理后平均分配到几万至几十万单元中进行反应,使各个反应单元有一个或多个拷贝的目标分子,有些可能没有目标分子,之后对每一个反应单元进行 PCR 扩增,再利用统计学的方法对每一个反应室的荧光信号进行分析,根据泊松分布原理和荧光信号阳性反应单元比例计算出目的核酸序列的拷贝数,实现精准绝对定量。(图 1)

3 数字 PCR 定量分析方法

数字 PCR 采用直接计数的方法进行定量分析,在每一个反应单元中,如果反应单元中有荧光信号的记作 1,无荧光信号的记作 0。含有 1 个拷贝以上目标分子的反应单元,显示荧光信号。据理论可知,若样品中目标 DNA 浓度极低,那么有荧光信号的独立单元可以视为只含有一个拷贝的目标分子,最后通过统计总数得出样品中的目标分子拷贝数。但由于数字 PCR 的反应单元在实际应用时难以达到此种理想条件,就需要利用泊松概率分布公式进行计算^[27-28]。

$$P = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda} \quad (1)$$

图 1 数字 PCR 原理^[26]Fig.1 The principle of digital PCR^[26]

式(1)中, λ 是每一个反应单元中含目标 DNA 分子的平均浓度, p 是以对应的 λ 为计算数值, 每一个反应单元中所含 k 个拷贝目标 DNA 分子的概率。

$\lambda = cm$, 其中 c 为样品的原始浓度, m 为样品的稀释系数。如果 $k = 0$ 时, 上式可变为 $p = e^{-\lambda} = e^{-cm}$, 其中 p 可以看作是无荧光信号的反应单元数与反应单元总数的比值^[29], 即

$$\frac{n-f}{n} = e^{-cm}, \quad (2)$$

其中, n 代表反应单元的总数, f 代表含有荧光信号的反应单元数。上式经过两边取对数简化, 得到:

$$cm = \ln\left(1 - \frac{f}{n}\right), \quad (3)$$

按照上述公式的计算方法, 代入相应的数值, 就可以计算出样本的最初拷贝数。

由于数字 PCR 是基于全部检测数据, 采用统计学方法, 进行终点检测, 得到目标序列的拷贝数, 因此直接可以对其精确的绝对定量检测^[27, 30]。与传统的 PCR 相比, 数字 PCR 采用的是终点检测, 它不依赖于扩增曲线的循环阈值(Ct)进行定量, PCR 反应几乎不受扩增效率的影响, 数字 PCR 对扩增抑制物的耐受能力有明显的提高, 不需要加入内参基因和制作标准曲线, 并且具有很高的准确度、灵敏度和重现性^[31-32]。数字 PCR 能够快速精准地将样品平均分配成大量的独立单元, 每个单元中与目标序列有竞争性作用的背景序列浓度被大大降低, 所以数字 PCR 技术在复杂背景中也特别适合检测稀有突变^[33-34]。

4 数字 PCR 分类

在 20 年左右的时间里, 从数字 PCR 概念的提出至今, 相关技术和产业化得到了迅猛的发展, 但如何实现样品向各反应单元的均匀分配一直是数字 PCR 推广的瓶颈。迄今为止, 根据分液方式划分, 数字 PCR 技术可分为三类: 微流体式数字 PCR (microfluidic digital PCR, mdPCR)、微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 和芯片式数字 PCR (chip digital PCR, cdPCR)。

4.1 mdPCR

mdPCR 通过微流体通道来对 DNA 模板进行分液, 每个被分隔开的区域都可进行相互独立的 PCR 反应, 通过对每个微域荧光信号的检测, 最后根据所得数据进行统计学分析得出目的序列含量。此项技术虽然能生成纳升级别或更小液滴, 但所形成的液滴需要借助一定的吸附方式才能与 PCR 反应体系相结合, 在实际应用中具有局限性, 因此 mdPCR 技术已逐渐被淘汰^[15]。

4.2 ddPCR

ddPCR 技术是经过微滴发生器处理, 短时间内将待测样品分到上万个纳升甚至皮升级别的微滴中, 然后以这些独立的液滴为反应基本单元进行扩增反应。在反应终止后, 检测各个微液滴的荧光信号, 通过计算显示为阳性的扩增液滴所占的总数比例来检测目标基因的含量^[35]。ddPCR 检测通量高, 操作简单、成本相对较低, 是比较理想的检测方式。

4.3 cdPCR

在 cdPCR 中,大量的反应液通过微流控等技术被导入到芯片的反应仓或通孔中完成 PCR 反应,通过扫描检测荧光信号得到数据,经统计学分析最后计算出目的序列的含量^[10].cdPCR 技术可以做到在较短的时间内精准地将反应流体分成大量的独立单元,并且能够根据不同的需求来调整反应重复数量,具有成本低、通量高、体积小的优点,因此受到众多研究人员的青睐。

5 数字 PCR 在水产病原菌中的应用

5.1 针对副溶血性弧菌的检测

副溶血性弧菌是一种革兰氏阴性水产致病菌,也是一种不可忽视的水产品的食源性致病菌,普遍存在于海水、海底沉积物及鱼虾蟹贝等海产品中,往往能造成水生生物胃肠道感染、心肌、肝脏脏损伤等。食用由该菌污染的海产品可引起头痛、呕吐和急性胃肠炎等食物中毒症状,严重者可引发败血症^[36]。方佩佩等^[17]采用 ddPCR 技术,建立了一种针对副溶血性弧菌的快速定量检测方法,以副溶血性弧菌 *TLH* 基因为靶基因,并以鳕鱼为样品进行阳性添加,副溶血性弧菌的最低检出限浓度为 4.7×10^1 CFU/mL,对应基因拷贝数为 2 copies/20 μ L。翁文川等^[37]利用 ddPCR 技术对基围虾和帆立贝中副溶血性弧菌进行了检测,其最低检测限分别为 1.9×10^1 CFU/g 和 8.96 CFU/g。Venkateswaran 等^[38]运用常规 PCR 方法针对 *gyrB* 基因对副溶血性弧菌进行 PCR 扩增,在 100 μ L 的反应体系中,活菌的最低检测限为 5 CFU 和 DNA 的最低检测限为 4 pg。Cordova^[39]等以副溶血性弧菌中的 *pR72H* 基因作为引物,进行 PCR 扩增,结果显示特异性、灵敏度都较好。高学祥等^[40]运用传统的细菌培养法检测副溶血性弧菌,检出限通常为 10^4 CFU/mL。1993 年, Lee^[41]等针对 *tdh* 基因进行 PCR 检测,结果显示,可以检测出全部的阳性菌株,其余菌株扩增均为阴性;灵敏度高,最低检测量可达到 40 pgDNA。1999 年, Kim^[42]等以副溶血性弧菌中的 *toxR* 基因序列设计 PCR 引物,并对 14 株溶血性弧菌和 14 株其他弧菌进行 PCR。结果表明,其他菌株没有特异性扩增的亮带,而所有的副溶血性弧菌都存在一条 368 bp 的

特异性扩增的亮带。Bej 等^[43]于 1994 年分别针对 *tl* *tdh* *trh* 设计了不同的引物对,对 *tl* *tdh* *trh* 同时进行扩增。结果表明,所有的副溶血性弧菌都扩增出了其自身特异的 *tl* 基因;有 54% 的副溶血性弧菌被检测出扩增了 *tdh* 基因;仅有 38.73% 的副溶血性弧菌被检测出扩增了 *trh* 基因;该法灵敏度高,在牡蛎培养肉汤内,检测限可达到 1~10 CFU/g。扈庆华等^[44]对分子信标检测副溶血性弧菌的实时 PCR 反应体系进行了改良, DNA 灵敏度为 166.6 fg/ μ L,细胞菌液灵敏度为 69 CFU/mL。与 qPCR 相比, ddPCR 定量检测副溶血性弧菌灵敏度更高、结果准确可靠。数字 PCR 能够有效地避免扩增抑制成分的影响,更适合对低丰度核酸样本的检测。

5.2 针对沙门氏菌的检测

目前世界范围内,沙门氏菌是最重要的食源性病原微生物之一,常存在于肉类、蛋类、奶制品等众多食品中。在虾、贝以及虹鳟、大西洋鲑、罗非鱼等水产品甚至水体表面都有沙门氏菌的检出^[45]。赵新等^[46]根据沙门氏菌 *invA* 毒力基因序列,建立了一种沙门氏菌 ddPCR 的快速定量检测沙门氏菌的方法,检测灵敏度可达到 10^2 CFU/mL。李亚茹等^[47]采用免疫磁珠分离实时荧光 PCR 快速检测虾中沙门氏菌,对于虾中鼠伤寒沙门氏菌的检测限为 5×10^1 CFU/25 g。雷风等^[48]应用斑点酶联免疫吸附法检测鱼粉进行高通量检测,结果沙门氏菌的最低检出量为 400 CFU/mL。利用 ddPCR 定量检测沙门氏菌,无需进行质粒的构建和标准曲线的建立,即可快速、准确、直接地分析沙门氏菌的含量,避免了标准曲线量值偏差对样品定值的准确性的影响,该方法为沙门氏菌污染的快速定量检测提供了技术支撑,为微生物风险评估体系的完善奠定了基础。

5.3 针对大肠杆菌的检测

大肠杆菌是水产养殖中常见的微生物。多年来,致泻性大肠杆菌引起的腹泻病例的比例一直居高不下。儿童和老人是致泻性大肠杆菌的易感群体,对其中的 O157:H7 (*E. coli* O157:H7) 出血性大肠杆菌的感染发病率高达 50%^[43]。董莲华等^[49]以 O157:H7 中的 *rfbE* 基因为目标基因,构建了可以准确定量的 ddPCR 方法。对 ddPCR 反应中的探针浓度进行了优化,最终检出限为 1 CFU/

mL.而利用传统的分离培养方法,鉴定和检测 *E. coli* O157:H7,至少需要4~7天,检出限约为 10^4 CFU/mL.常规PCR技术则可检测30 CFU/mL的大肠杆菌^[50].姜君等^[51]针对*E. coli* O157:H7的*rfbE*基因建立了TaqMan探针荧光定量PCR方

法,在无需富集的情况下,检出限可达到3 CFU/mL.

近年来PCR技术在水产病原菌检测中的应用具体见表1.

表1 PCR检测技术在水产病原菌检测中的应用

Tab.1 Application of PCR in detection of aquatic pathogens

检测方法	水产病原菌	最低检测限	检测样品	基因	文献
数字PCR	副溶血性弧菌	4.7×10^1 CFU/mL	鲳鱼	<i>TLH</i>	方佩佩等 ^[17]
	沙门氏菌	1×10^2 CFU/mL	沙门氏菌标准菌株	<i>invA</i>	赵新等 ^[45]
	大肠杆菌	1 CFU/mL	大肠杆菌标准菌株	<i>rfbE</i>	董莲华等 ^[48]
	副溶血性弧菌	1.9×10^1 CFU/g	人工污染基围虾	<i>TLH</i>	翁文川等 ^[36]
	副溶血性弧菌	8.9 CFU/g	工污染小帆立贝	<i>TLH</i>	翁文川等 ^[36]
常规PCR	副溶血性弧菌	5×10^1 CFU/mL	溶血弧菌菌株	<i>gyrB</i>	Venkateswaran K.等 ^[37]
	大肠杆菌	30 CFU/mL	养殖水体	<i>Stx1</i>	Bonetta S.等 ^[49]
qPCR	副溶血性弧菌	6.9×10^1 CFU/mL	混合菌株	<i>TDH</i>	扈庆华等 ^[33]
	沙门氏菌	5×10^1 CFU/25g	虾	<i>ttt</i>	李亚茹等 ^[46]
	大肠杆菌	3 CFU/mL	养殖水体	<i>rfbE</i>	姜君等 ^[51]

6 结语与展望

数字PCR作为“第三代PCR技术”,不仅在操作方面比其他PCR简单,而且具有着灵敏度高、重现性好、特异性强、不依赖标准曲线和Ct值等特点,且能做到对目标DNA或RNA分子的绝对定量,尤其是能有效避免反应抑制剂的影响,已应用于水产病原菌的检测.数字PCR技术正以其快捷、准确、操作简便、技术领先等优势受到研究人员的青睐,在水产领域中显示出美好的应用前景.但目前数字PCR技术由于仪器昂贵,检测成本较高,大大限制了该方法在水产领域的推广使用,相信随着数字PCR技术的迅速发展和完善、检测费用的大幅下降,将为水产领域提供新的检测途径,为水产养殖业和水产加工业的健康发展保驾护航.

参考文献:

[1] 张奇亚.我国水生动物病毒病研究概况[J].水生生物学报,2002(1):89-101.
 [2] 黄志斌,刘志军,廖国礼,等.水产养殖动物疾病防控与安全用药[J].广东饲料,2009,18(8):43-46.
 [3] 何琳.环介导等温扩增技术快速检测水产动物病原的研究[D].杭州:浙江大学,2012.
 [4] STEWART B J, MCCARTER L L. *Vibrio parahaemolyticus* FlaJ, a homologue of FlhJ, is required for production of a flagellin[J]. Molecular Microbiology, 1996, 20

(1): 137-149.

[5] GONZALEZ S F, OSORIO C R, SANTOS Y. Evaluation of the AQUARAPID-Va, AQUAEIA-Va and dot-blot assays for the detection of *Vibrio anguillarum* in fish tissues[J]. Journal of Fish Diseases, 2004, 27(11): 617-621.
 [6] 樊慧敏,马倩倩,商泽昊,等.工厂化淡水养殖凡纳滨对虾甲壳溃疡症病因与防治研究[J].生物学杂志,2019,36(3):65-69.
 [7] 周宇,周秋白.嗜水气单胞菌防控技术研究进展[J].生物灾害科学,2012,35(2):126-133.
 [8] 李军.中国对虾幼体致病菌哈维氏弧菌的分离及其生物学特性研究(英文)[J].海洋与湖沼,1998(4):353-361.
 [9] HOKAMA A, IWANAGA M. Purification and characterization of *Aeromonas sobria pili*, a possible colonization factor[J]. Infection and Immunity, 1991, 59(10): 325-334.
 [10] 李聪,刘健慧,李志辉,等.4种食源性致病菌的多重PCR快速检测方法研究[J].食品研究与开发,2019,40(21):164-169.
 [11] 李大鹏,高玉荣,张凤琴,等. Mesenterocin ZLG85对金黄色葡萄球菌抗菌机制研究[J].农产品加工,2019(21):5-7.
 [12] 高扬,尹啸冰,王彤.肠道致病菌PCR检测及应用价值评估[J].首都食品与医药,2019,26(22):101.
 [13] 刘立兵,孙晓霞,姜彦芬,等.食品中检测志贺氏菌的实时荧光RPA方法的建立与应用[J].中国食品学报,2019,12(9):1-5.
 [14] HANSEN C H, VOGEL B F, GRAM L. Prevalence and

- survival of *Listeria monocytogenes* in Danish aquatic and fish-processing environments [J]. *Journal of Food Protection* 2006, 69(9): 2113-2122.
- [15] 李智杰, 刘占悝, 李健友, 等. 数字 PCR 技术研究进展 [J]. *特产研究* 2019, 41(1): 120-123.
- [16] 林佳琪, 苏国成, 苏文金, 等. 数字 PCR 技术及应用研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2017, 33(2): 170-177.
- [17] 方佩佩, 赵丽青, 马云, 等. 副溶血性弧菌微滴数字 PCR 定量方法的建立 [J]. *食品工业科技*, 2018, 39(19): 252-257.
- [18] 胡园园. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的核酸检测方法研究 [D]. 武汉: 中国科学院研究生院(武汉病毒研究所) 2016.
- [19] 张博诚, 张显玉, 孙根, 等. 液滴数字 PCR 在乳腺癌精准治疗中的应用 [J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(3): 146-149.
- [20] 周圆, 单长林, 李孝军, 等. 运用微滴式数字 PCR 技术检测转基因玉米品系的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(14): 175-178.
- [21] SAIKI R K, SCHARF S, FALOONA F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia [J]. *Science*, 1985, 230(4732): 1350-1354.
- [22] HIGUCHI R, DOLLINGER G, WALSH P S, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences [J]. *Biotechnology (Nature Publishing Company)*, 1992, 10(4): 413-417.
- [23] MORLEY A A, SYKES P J, NEOH S H, et al. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution [J]. *Biotechniques*, 1992, 13(3): 444-449.
- [24] Vogelstein B, Kinzler K W. Digital PCR [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(16): 9236-9241.
- [25] 詹成, 燕丽, 王琳, 等. 数字 PCR 技术的发展和应 [J]. *复旦学报(医学版)* 2015, 42(6): 786-789.
- [26] NYARUABA R, MWALIKO C, KERING K K, et al. Droplet digital PCR applications in the tuberculosis world [J]. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 2019, 117: 85-92.
- [27] DUBE S, QIN J, RAMAKRISHNAN R. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nano fluidic device [J]. *PLoS One* 2008, 3(8): e2876.
- [28] 林彩琴, 姚波. 数字 PCR 技术进展 [J]. *化学进展*, 2012, 24(12): 2415-2423.
- [29] 李春勇. 数字 PCR 技术原理及应用 [J]. *生物技术世界* 2014(11): 10-13.
- [30] SANDERS R, HUGGETT J F, BUSHHELL C A, et al. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification [J]. *Analytical Chemistry* 2011, 83(17): 6474-6484.
- [31] ZIMMERMANN B G, GRILL S, HOLZGREVE W, et al. Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis [J]. *Prenatal Diagnosis*, 2008, 28(12): 1087-1093.
- [32] HINDSON C M, CHEVILLET J R, BRIGGS H A, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 1003-1005.
- [33] DINGLE T C, SEDLAK R H, COOK L, et al. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances [J]. *Clinical Chemistry*, 2013, 59(11): 1670-1672.
- [34] AGAPOVA S, STEPHENSON K, MANARY M, et al. Detection of low concentration host m RNA transcripts in Malawian children at risk for environmental enteropathy [J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2013, 56(1): 66-71.
- [35] 龚永平, 郝中香, 陈珍容, 等. 微滴式数字 PCR 绝对定量应用研究进展 [J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(8): 686-690.
- [36] 唐晓阳. 水产品中副溶血性弧菌风险评估基础研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- [37] 翁文川, 管锦绣, 谢会, 等. 水产品中副溶血性弧菌 PMA-dd PCR 活菌定量检测方法的研究 [J]. *现代食品科技* 2019, 35(6): 273-279+190.
- [38] VENKATESWARAN K, DOHMOTO N, HARAYAMA S. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(2): 681-687.
- [39] CORDOVA J L, ASTORGA J, SILVA W, et al. Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreak [J]. *Biological Research* 2002, 35(3/4): 433-440.
- [40] 高学祥, 韦帮海, 徐海虹. 实时荧光定量 PCR 法与常规 PCR 法及细菌培养法检测副溶血弧菌的比较 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2009, 23(9): 873-875.
- [41] LEE C, PAN S F. Rapid and specific detection of the thermostable direct haemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by the polymerase chain reaction [J]. *Journal of General Microbiology*, 1993, 139(12): 3225-3231.
- [42] KIM Y B, OKUDA J, MATSUMOTO C, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains the species level by PCR targeted to the *toxR* gene [J]. *Journal of Clinical*

- cal Microbiology ,1999 ,37(4) : 1173-1177.
- [43] BEJ A K ,PATTERSON D P ,BRASHER C W ,et al. Detection of total and hemolysin - producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl* ,*dh* and *trh* [J]. Journal of Microbiological Methods ,1999 ,36(3) : 215-225.
- [44] 扈庆华 ,郑薇薇 ,石晓路 ,等.改良分子信标—实时 PCR 快速检测副溶血弧菌 [J]. 现代预防医学 , 2004 ,31(3) : 441-443.
- [45] 李青.基于 *invA* 基因的电化学 DNA 传感器的构建及用于沙门氏菌快速高灵敏的检测[D].重庆:重庆医科大学 2012.
- [46] 赵新 ,兰青阔 ,陈锐 ,等.应用微滴数字 PCR 技术快速检测食用菌中沙门氏菌 [J]. 食品与生物技术学报 2017 ,36(3) : 315-321.
- [47] 李亚茹 ,周冬根 ,夏杏洲 ,等.免疫磁珠分离—实时荧光 PCR 快速检测虾中沙门氏菌 [J]. 现代食品科技 2017 ,33(11) : 235-242.
- [48] 雷风.应用 Dot-ELISA 法检测鱼粉中的沙门氏菌 [J]. 中国畜牧科技 ,1991 ,21(8) : 23-25.
- [49] 董莲华 ,张玲 ,姜君 ,等.大肠杆菌 O157 : H7 微滴数字 PCR 定量方法的建立 [J]. 分析化学 ,2015 ,43(3) : 319-324.
- [50] BONETTA S ,BORELLI E ,BONETTA S ,et al. Development of a PCR protocol for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp ,in surface water [J]. Environmental Monitoring and Assessment , 2011 ,177(1-4) : 493-503.
- [51] 姜君 ,王鹏志 ,刘利成 ,等.肠出血性大肠杆菌 (O157: H7) 的特异性荧光探针检测方法的建立 [J]. 现代生物医学进展 2012 ,12(12) : 2201-2204.

Application of Digital PCR in Detection of Aquatic Pathogens

MA Xinran ,XIAO Yuqing ,LEI Chun ,WANG Hongxin ,WANG Lei

(School of Life Sciences ,Ludong University ,Yantai 264039 ,China)

Abstract: The digital PCR technology is a new method for gene detection ,which is the third generation of PCR gene detection technology after conventional PCR and real - time fluorescence quantitative PCR. In the traditional molecular detection method of aquatic pathogenic bacteria ,the common PCR products need to be detected by agarose gel electrophoresis ,which is long time consuming and cannot detect pathogenic bacteria quantitatively. Real - time fluorescence quantitative PCR technology relies on internal reference genes for relative quantitative analysis ,which is difficult to meet the needs of detecting the aquatic diseases rapidly and accurately. By contrast ,digital PCR technology can achieve absolute quantitative analysis ,with unprecedented accuracy and reproducibility. Digital PCR has broad application prospects ,providing a new technology platform for rapid and accurate detection of aquatic pathogens. This paper mainly introduced the generation ,principle and classification of digital PCR. The application of digital PCR to detect the aquatic pathogens and foodborne pathogens of aquatic products was also discussed.

Keywords: digital PCR; quantitative analysis; aquatic pathogen; foodborne pathogen; detection

(责任编辑 李维卫)