

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.11.015

基于微流控芯片技术的创伤弧菌特异性引物的筛选及验证^{*}张小红, 禹 乐, 朱启淦, 孟加榕[△]

第九〇九医院/厦门大学附属东南医院病理科, 福建漳州 363000

摘要:目的 探讨适用于创伤弧菌的特异性引物,通过微流控芯片技术进行一站式检测,为快速检测出病原体奠定基础。方法 通过 NCBI 网站获取靶基因序列,采用 MEGA7.0 软件对齐后设计出 19 对引物, BLAST 确定引物的特异度,再通过引物性能、灵敏度、快速变温实验筛选适用于微流控的引物,最后对引物的特异度与灵敏度进行评价。结果 成功筛选出 1 对适用于微流控的引物 vvhA10,微流控检测结果发现其特异度与灵敏度较高。结论 筛选出适用于微流控芯片的引物,用于全自动微流控检测可以满足应急检测或现场快速检测等方面的使用需求。

关键词:微流控芯片; 创伤弧菌; 引物筛选; 荧光定量聚合酶链反应; 即时检测**中图法分类号:**R446.1;R378.3**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2024)11-1579-08Screening and validation of *Vibrio vulnificus* specific primers based on microfluidic chip technology^{*}ZHANG Xiaohong, YU Le, ZHU Qigang, MENG Jiarong[△]

Department of Pathology, 909th Hospital/Southeast Hospital Affiliated to

Xiamen University, Zhangzhou, Fujian 363000, China

Abstract: Objective To explore the specific primers suitable for *Vibrio vulnificus* and to perform one-stop detection by microfluidic chip technology, so as to lay the foundation for rapid detection of pathogens. **Methods** The target gene sequence was obtained from the NCBI website, and 19 pairs of primers were designed after alignment by MEGA 7.0 software. The specificity of the primers was determined by BLAST, and the primers suitable for microfluidic were screened by primer performance, sensitivity and rapid temperature change test. **Results** A pair of primers vvhA10 was successfully screened. The results of microfluidic detection showed that its specificity and sensitivity were high. **Conclusion** The selected primers are suitable for automatic microfluidic chip detection, which can meet the needs of emergency detection or rapid detection in the field.

Key words: microfluidic chip; *Vibrio vulnificus*; screening of primers; fluorescence quantitative polymerase chain reaction; point-of-care testing

创伤弧菌是一种嗜温、嗜盐性的革兰阴性菌,广泛分布于海产品及海洋环境中^[1]。人可因食用受该菌污染的海产品、开放性伤口或破损皮肤暴露于受污染的盐水中而被感染,导致肠胃炎和原发性败血症等疾病,其中原发性败血症的病死率超过 50%^[2-5]。随着水产养殖业的发展与人类海上活动的增加,创伤弧菌感染率呈升高趋势,然而创伤弧菌感染发病快,最快 4 h 内即可发病。有研究报道,如果在 3 d 内没有得到妥善治疗,创伤弧菌感染患者的病死率可达到 100%^[6]。因此,创伤弧菌感染的快速诊断对于临床诊疗尤为重要。

创伤弧菌传统的检测方法耗时费力,通常需要 3

d 以上,操作烦琐且灵敏度低,而创伤弧菌感染发病快,传统的检测方法并不能满足临床快速诊疗的需要。而微流控芯片能够在一个芯片上实现样本制备、反应、分离、检测等流程,具有高通量、高效率 and 易操作的特点^[7],且微流控芯片因具有小型化、节约试剂、速度快、集成化程度高等优点,非常适用于处理突发公共卫生事件,但目前对于创伤弧菌的即时检测的研究较少见,成熟的即时检测体系少见报道。

创伤弧菌溶血素(vvh)基因在病情早期稳定期的表达水平最高,而毒素调控(ToxR)基因是在环境中广泛分布的毒力基因的表达调控基因,是跨膜毒力调节剂的同源物,二者在不同菌种之间的同源性较弱,

^{*} 基金项目:福建省漳州市自然科学基金项目(ZZ2021J09);福建省自然科学基金项目(2023J011843,2023J011841);联勤保障部队第九〇九医院自主项目(22MS001)。

作者简介:张小红,女,技师,主要从事即时检测与生物信息学方向的研究。[△] 通信作者,E-mail:mengjiarong@sina.com。

因此常作为创伤弧菌实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)的靶基因^[8-9]。理想的检测结果往往取决于引物的灵敏度与特异性^[10],本研究根据创伤弧菌 *vvhA*、*vvhB* 和 *ToxR* 基因,设计并筛选出 1 对适用于微流控芯片的创伤弧菌特异性引物,通过 1 个集成核酸提取和 PCR 检测模块的芯片,一站式完成样本裂解、核酸提取、荧光 PCR 扩增及结果分析,从而在 30 min 内实现全自动微流控检测,同时为筛选适宜的、特异度较高的微流控引物提供理论依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种来源 创伤弧菌(货号:ATCC 27562)、粪肠球菌(货号:ATCC 29212)、铜绿假单胞菌(货号:ATCC 27853)、金黄色葡萄球菌(货号:ATCC 6538)、单核增生李斯特菌(货号:ATCC 19115)、空肠弯曲菌(货号:ATCC 33291)、河流弧菌(货号:ATCC 33812)、溶藻弧菌(货号:ATCC 17749)、蜡样芽孢杆菌(货号:ATCC 14579)、霍乱弧菌(货号:ATCC 39315)均购自美国典型菌种保藏中心。

1.2 仪器与试剂 ABI-7500 实时荧光定量 PCR 仪购自美国应用生物系统公司;Gentier 48E/48R 实时荧光定量 PCR 检测系统购自西安天隆科技有限公司;MFCS-6 全自动微流控核酸分析仪购自厦门优迈科医学仪器有限公司。蛋白胨、酵母提取物、Bolton 肉汤、SCDLP 液体培养基、硫代硫酸盐枸橼酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基均购自北京索莱宝科技有限公司;核

酸提取试剂盒购自福建佰孟医学科技有限公司;创伤弧菌探针法定量 PCR 试剂盒购自上海信裕科技有限公司;热启动 PCR 酶(HsTaq)、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)均购自北京宝日医生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取 将创伤弧菌标准菌株按照国家标准进行复壮及生物化学鉴定,参照核酸提取试剂盒说明书,提取创伤弧菌基因组 DNA。

1.3.2 样本定量检测 参照创伤弧菌探针法定量 PCR 试剂盒说明书,将创伤弧菌基因组 DNA 作为模板进行荧光定量 PCR 扩增,以创伤弧菌每毫升拷贝数的对数为横坐标,循环数阈值为纵坐标绘制标准曲线,再将待测样本的循环数阈值从标准曲线中推算出样本的每毫升拷贝数。

1.3.3 引物和探针设计 参考 PCR 引物和探针设计的要求,在 NCBI 网站中获取不同来源的创伤弧菌 *vvhA* 基因序列、*vvhB* 基因序列、*Tox* 基因序列,汇成基因序列集,使用 MAGA 7.0 软件以 Accession number: KC821520.1 (*vvhA* 基因)、BAC99981.1 (*vvhB* 基因)、AF166120.1 (*ToxR* 基因)为模板,对齐后在保守序列中设计引物和探针,再使用 Oligo V6.22 软件对探针和引物进行筛选。将这些引物和探针在 NCBI 网站上 BLAST 对比,确认引物的特异性并作为候选引物,由上海生物工程技术有限公司进行合成。引物信息见表 1~3。

表 1 创伤弧菌 *vvhA* 基因的引物信息

引物	引物序列(5′-3′)	熔解温度(℃)	长度(bp)
<i>vvhA</i> 1-F	TCAAAGATTAAGTGTGTGTTGCAC	64.8	79
<i>vvhA</i> 1-R	CGATGGAAGCACCCGCATTA	71.3	
<i>vvhA</i> 1-P	CAGTCTCGTGTGGCGTTGAAATCA	74.2	
<i>vvhA</i> 2-F	ATTGTCCGTTTCACCGTCGAT	68.9	76
<i>vvhA</i> 2-R	TGTGATCTTGCTGTAGCTCGTTAAT	68.0	
<i>vvhA</i> 2-P	CGACAAGCCTGGCACGGGTA	73.5	
<i>vvhA</i> 3-F	AAAAAAGCCCGTGACCTAC	61.7	76
<i>vvhA</i> 3-R	TACCGATGGAGTAACCGTAAGTATC	66.6	
<i>vvhA</i> 3-P	CAGAAATGAGAACAAAACTACCAACACCGC	77.9	
<i>vvhA</i> 4-F	GCTCATTACCTACAATACTCGAA	65.0	88
<i>vvhA</i> 4-R	TCAAAATCACTCAATGATGAACG	65.2	
<i>vvhA</i> 4-P	TGGTGTTTGATACAAAAGACTATCGCATCA	75.9	
<i>vvhA</i> 5-F	ATGCTATTTACCGCCGCTCA	72.6	77
<i>vvhA</i> 5-R	TGGAATAAGAGATAGGGTTGAAGTT	65.6	
<i>vvhA</i> 5-P	TGGGGCAGTGGCTGGGTATTTGA	77.5	
<i>vvhA</i> 6-F	CAGCAGTACTGTGAAACAACGTATT	66.0	93
<i>vvhA</i> 6-R	TTGTTGCTCAATGACTGCAGTGT	68.0	

续表 1 创伤弧菌 *vvhA* 基因的引物信息

引物	引物序列(5′-3′)	熔解温度(℃)	长度(bp)
vvhA6-P	TGCTTCCGCTTCAAACAGTGGATGA	72.2	74
vvhA7-F	TTTATGGTGAGAACGGTGACAAA	67.2	
vvhA7-R	GTTCCAACTGCCGTGACAGCT	69.6	
vvhA7-P	CGGTTGCGGGTGGTTTCGGTTAAC	78.5	84
vvhA8-F	ATCCGATCGTTGTTTGACCGTAA	70.7	
vvhA8-R	CAATACCATTCTGTGCTAAGTTCG	68.0	
vvhA8-P	TGACAAAACGCTCACAGTCGAACAGTGT	77.5	84
vvhA9-F	ATTGGGAAGGCGATAAGCTCAT	69.4	
vvhA9-R	CATTACGACCACCAACAATATTTA	64.5	
vvhA9-1-R	CATTACGGCCACCGACAATGTTTA	73.3	71
vvhA9-P	CCGCTATGTTGATGGCAGTAATACTCG	74.9	
vvhA9-1-P	CCGCTATGTTGATGGCAACAATACTCG	77.3	
vvhA10-F	CGTAATGTTCAAGTAACCCCTG	64.3	71
vvhA10-R	TTGACTTGTTGTAATGTGGGTTTC	66.1	
vvhA10-P	AAATGAAGCAAATCAGGCGCGTT	74.5	
vvhA10-1-P	AAATGAAGCAACTCAGGCGCGTT	74.6	

注:F 表示正向引物;R 表示反向引物;P 表示探针。

表 2 创伤弧菌 *vvhB* 基因的引物信息

引物	引物序列(5′-3′)	熔解温度(℃)	长度(bp)
vvhB1-F	TAACAAAAATAGAAATGTAGGACGCC	68.5	89
vvhB1-R	CGCTGCCCAAAATTTGAACAT	69.9	113
vvhB1-P	ACCCTACTCTGCTGTTTGTTTGC	67.8	
vvhB2-F	CAGTACCAACAAAATGTCACGCTG	69.7	
vvhB2-R	TATGACTTTTTGCTTGAGTGATTT	63.6	90
vvhB2-P	CAGTAATGATGTGTTGTATGTCA	58.3	
vvhB3-F	GTAGCACCGTGGTGATTGATTTGA	71.1	
vvhB3-R	GCTGACAGTCCTAAACCAGTGAGT	66.8	91
vvhB3-P	AATCAAGCCTTGCGTCGTCA	68.6	
vvhB4-F	ACGGGGGTTTATCAAGGCGAC	72.2	
vvhB4-R	TCGGCTTGGGGATCGTTGAT	71.9	72
vvhB4-P	TCATTCTCGTCGGTGACATC	63.0	

注:F 表示正向引物;R 表示反向引物;P 表示探针。

表 3 创伤弧菌 *ToxR* 基因的引物信息

引物	引物序列(5′-3′)	熔解温度(℃)	长度(bp)
Tox1-F	GCATCATTTTTCATAAAGAGCAG	62.5	97
Tox1-P	ATACTTGAAAACCTCAGTTTATTGGCTGCGTC	76.4	73
Tox1-R	AAATCTTCCTACGTGAGTTGATCTC	65.7	
Tox2-F	AATCAATCGCTTGTTACGTAAC	62.0	
Tox2-P	ATGGGTGACAAATGTAAATTCAAGGTCAA	74.9	72
Tox2-R	AAACAGCGTTTTTACCACAA	61.0	
Tox3-F	ATAATGCTGGCACGTCAACAA	66.3	

续表 3 创伤弧菌 ToxR 基因的引物信息

引物	引物序列(5′-3′)	熔解温度(℃)	长度(bp)
Tox3-P	ATGGCCGCGTCGAAAAAAATT	76.9	
Tox3-R	CTAACAAAGAATAGCCCTTTAATT	60.0	
Tox4-F	TGAAGCTCTACTCAAATGAGTCT	60.5	82
Tox4-P	CTCAAGAGGTGGTGATCAACATCTCTGAATC	77.3	
Tox4-R	TAATTGTCGCTGACGTCCCAA	68.6	
Tox5-F	AAAATCGGGAAAAATCAAACCTT	64.7	75
Tox5-P	CCAACCCTTTCTATCTTATTCTGACTGGC	75.0	
Tox5-R	CCCCAATAATCAGCCAATAC	66.9	

注:F 表示正向引物;R 表示反向引物;P 表示探针。

1.3.4 引物性能筛选 将无酶水作为阴性对照,进行 PCR 扩增。扩增体系为 50.0 μL,其中 10×buffer 5.0 μL, dNTP(10.0 mm) 1.0 μL,正向引物(10.0 μm)3.0 μL,反向引物(10.0 μm)3.0 μL,探针引物(10.0 μm)1.0 μL, HsTaq 0.4 μL, A 试剂 10.0 μL, B 试剂 5.0 μL,模板 5.0 μL,DEPCE 水 16.6 μL。使用 ABI-7500 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增,反应条件为:95 ℃ 预变性 2 min,95 ℃ 变性 5 s,55 ℃ 退火 30 s,共 45 个循环。

1.3.5 引物灵敏度筛选 使用无酶水 10 倍梯度稀释菌液,将 1.3.4 筛选出的引物按照相同荧光定量 PCR 体系进行引物灵敏度筛选。

1.3.6 引物快速变温筛选 将 1.3.5 筛选出来的引物使用 Gentier 48E/48R 实时荧光定量 PCR 检测系统进行扩增,反应体系不变,反应条件为 95 ℃ 预变性 2 min,95 ℃ 变性 3 s,每秒下降 8 ℃,至温度达到 55 ℃,退火 6 s,共 45 个循环。

1.3.7 微流控样本检测 将待测样本平衡至室温,涡旋混匀 10 s,取 160.0 μL 加入预灌封试剂样本孔内,盖上样本孔按扣,放进芯片后置入 MFCS-6 全自动微流控核酸分析仪中,进行全自动核酸检测。

1.3.8 特异度检测实验 将经筛选的最适引物,以粪肠球菌、铜绿假单胞菌等 7 种临床常见病原菌作为阴性对照,基于 1.3.7 的检测结果评价引物的特异度,每组重复 3 次实验。

1.3.9 灵敏度检测实验 将创伤弧菌菌液配置成 3.90×10^7 copy/mL、 3.90×10^6 copy/mL、 3.90×10^5 copy/mL、 3.90×10^4 copy/mL、 3.90×10^3 copy/mL、 9.75×10^2 copy/mL,以无酶水作为阴性对照,基于 1.3.7 的检测结果评价引物的灵敏度,每组重复 3 次实验。

2 结 果

2.1 样本定量检测结果 标准曲线方程为 $Y=-3.931\times X+50.04(R^2=0.999)$,其中 Y 为循环数阈值,X 为每毫升创伤弧菌拷贝数的对数,得到创伤

弧菌样本的起始水平为 3.90×10^9 copy/mL。见图 1。

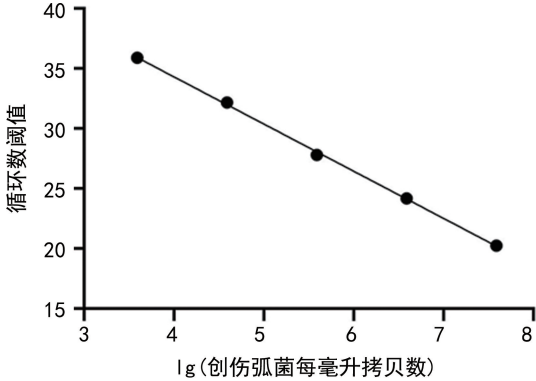


图 1 定量 PCR 检测创伤弧菌的标准曲线

2.2 引物性能筛选 标准的 PCR 扩增曲线是呈 S 型的,创伤弧菌 19 套引物的 PCR 扩增曲线见图 2,根据扩增曲线在对数期的扩增效率、平台期曲线是否上扬评估引物体系,最后选择 vvhA1、vvhA2、vvhA9、vvhA10、Tox5、vvhB1、vvhB3 基因引物进行后续检测。

2.3 引物灵敏度筛选 灵敏度测试结果见图 3,根据扩增曲线在低水平的扩增效率、循环数阈值是否按照水平递增选出 vvhA1、vvhA2、vvhA10、Tox5、vvhB1 基因引物进行后续检测。

2.4 快速变温实验 选择最低的 3 个水平进行检测,结果显示 vvhA1、vvhA2、vvhB1 基因引物在最低水平里均出现了漏检的情况,而 Tox5 基因引物重复性不好,因此选择 vvhA10 作为微流控上机引物。见图 4。

2.5 特异度检测实验 特异度检测结果显示,除创伤弧菌出现特异性扩增之外,其他细菌均未出现特异性扩增。见图 5。

2.6 灵敏度检测实验 微流控检测结果显示,水平在 9.75×10^2 copy/mL 以上,创伤弧菌都可以出现特异性扩增,即灵敏度可达到 9.75×10^2 copy/mL。见图 6。

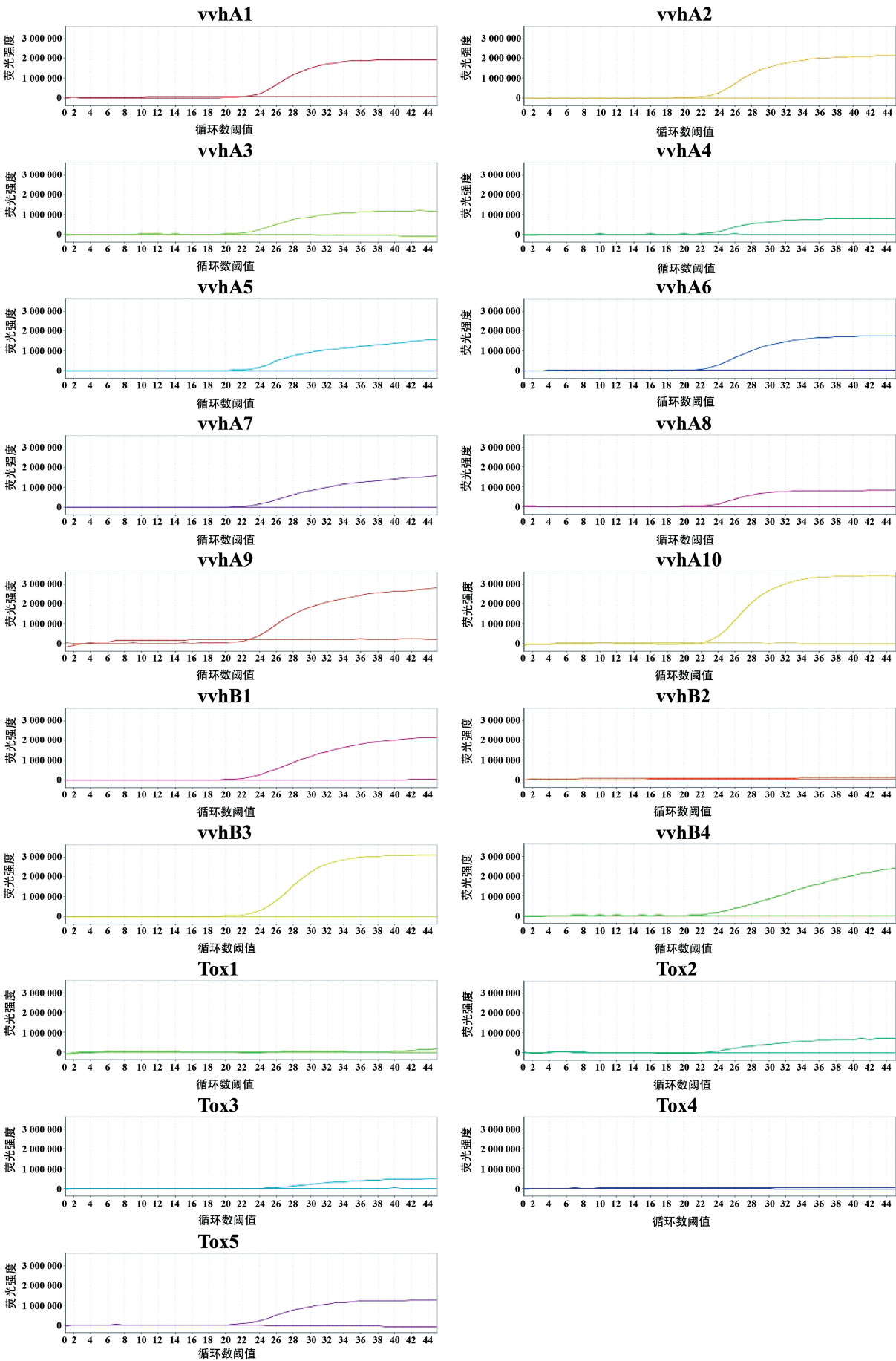


图 2 创伤弧菌引物实时定量 PCR 筛选结果(创伤弧菌水平为 3.90×10^7 copy/mL)

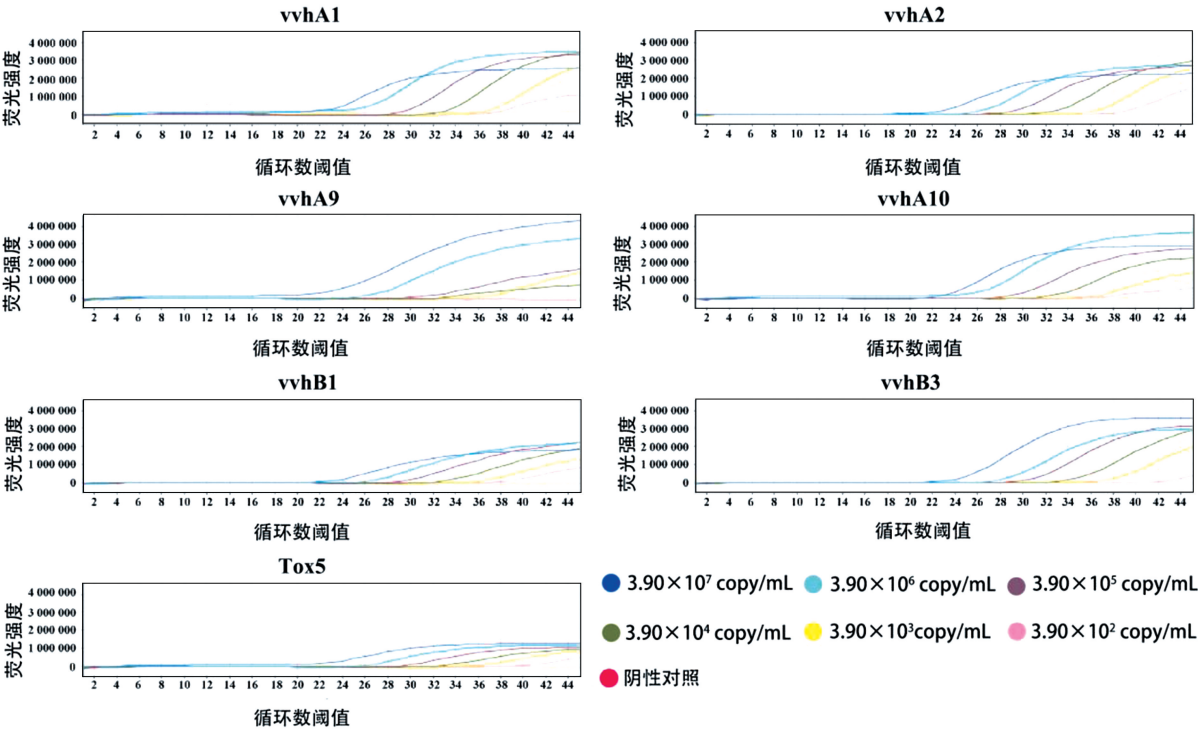


图 3 创伤弧菌引物灵敏度筛选结果

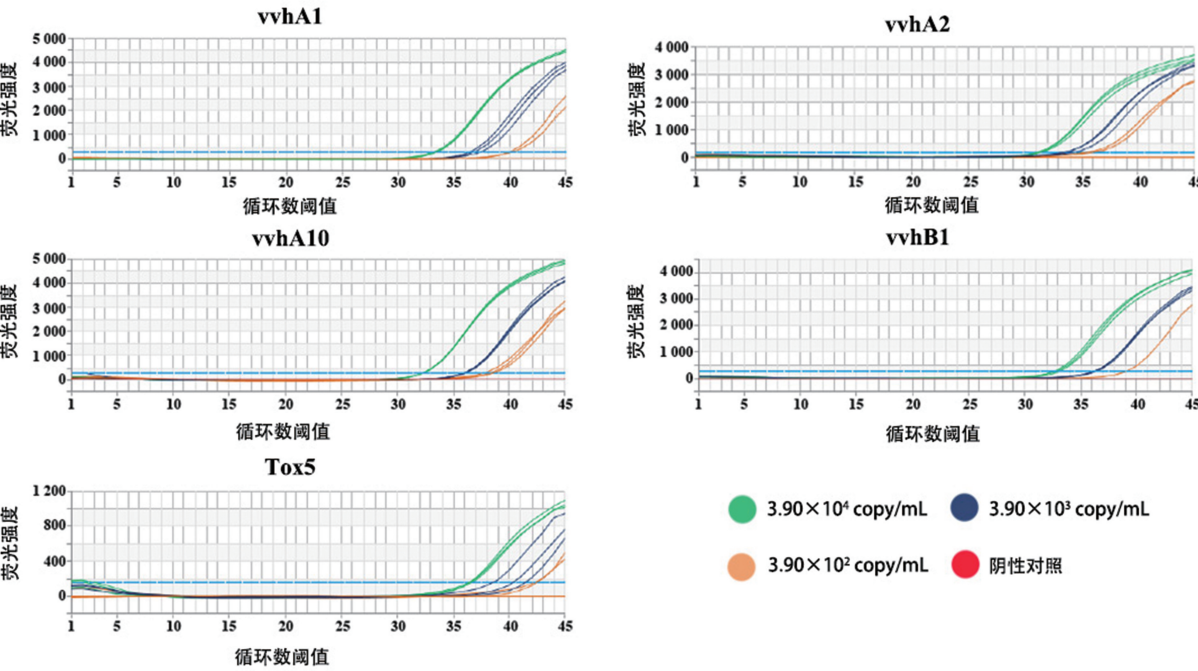


图 4 创伤弧菌引物快速变温筛选结果

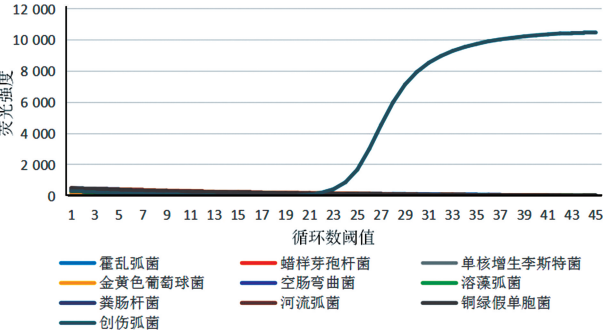


图 5 创伤弧菌微流控芯片 PCR 特异度检测结果

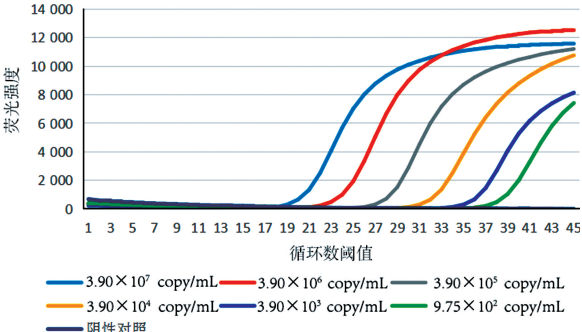


图 6 创伤弧菌微流控芯片 PCR 灵敏度测试结果

3 讨 论

本研究的目的是筛选出一套适用于创伤弧菌快速检测的微流控芯片特异性引物,该引物应具备较高的特异度、灵敏度,同时筛选微流控特异性引物可为现场快速检测病原体奠定基础。创伤弧菌感染起病急、病死率高,使得及时检测显得至关重要。传统的创伤弧菌检测方法基于选择性培养增菌并结合生物学及血清学检测,该方法费力耗时,操作烦琐且灵敏度低,并不能满足临床快速诊疗需要。随着分子生物学的发展,实时荧光定量 PCR 已广泛应用于各种临床致病菌的检测中,但仍对操作人员有一定技术要求且需一定时间去完成^[11]。而微流控芯片技术是近些年兴起的扩增技术,通过微流控芯片进行相关检测可极大简化操作步骤,提高检测效率,在病毒、病原菌及转基因的检测中均有成功应用的先例^[12-14],但目前市面上的微流控芯片系统基本都是核酸提取与检测分开进行的,尚未见一站式完成创伤弧菌检验的相关研究报道。

使用微流控芯片检测代替传统检测具有简便、快捷等优点,但这对引物的选择有更严苛的要求。为保证检测可在微流控状态下快速进行,引物需具备 3 个关键因素:(1)保证序列的保守性,没有交叉反应;(2)具备高灵敏度;(3)能适应快速变温反应^[15]。

引物的选择对于靶序列的特异性扩增至关重要,尤其在微生物领域。靶向不同物种中高度保守的基因可用于广泛的检测工作,而靶向特定物种甚至菌株特有的 DNA 序列则可用于特异度高的检测^[16-17]。对于指定的靶标区域,可以选择多对引物作为扩增序列的候选引物。如果引物及其产生的扩增子使 PCR 效率降低,导致产物量很低或为 0,那么引物可能会失去成为候选引物的资格^[18]。如徐媛媛等^[19]选取了哈维弧菌的 *vhhA* 基因、副溶血弧菌的 *ToxR* 基因等作为目标基因开展多重微流控荧光定量 PCR 快速检测技术的研究。通过查阅文献,本研究对创伤弧菌 3 种毒力基因(*vvhA* 基因、*vvhB* 基因、*ToxR* 基因)进行引物和探针的设计,通过理论分析初筛和传统荧光定量 PCR 筛选出 7 对性能较好的创伤弧菌特异性引物。此外,为进行有效的快速检测,其中最为关键的就是检测引物的灵敏度^[20]。特别是当待测样本中带菌率很低时,具有高灵敏度的引物就显得尤为重要。因此,本研究通过灵敏度实验筛选出 5 对引物进行后续验证。而 PCR 扩增过程涉及在不同温度之间重复循环,常规实时荧光定量 PCR 通常需要 1 h 以上才能完成,但微流体系统的升温速率高达 50 °C/s,在十几分钟内就可以完成扩增^[21]。故微流控引物需适应快速变温,以达到快速扩增的目的。本研究通过模拟微流控快速变温的条件成功筛选出 1 对引物,命名为 *vvhA10*。随后,将 *vvhA10* 作为微流控扩增的引物,对引物进行了特异度、灵敏度检测,结果发现该引物

具有较高的特异度和灵敏度。

本研究通过引物设计后筛选验证的方法得到 1 对适合检测创伤弧菌的特异性引物,与实验室常规的荧光定量 PCR 检测相比,操作简便,检测时间明显缩短,为现场快速检测病原体奠定了基础。

参考文献

- [1] JIN P, LEE C S. *Vibrio vulnificus* infection[J]. N Engl J Med, 2018, 379(4): 375-375.
- [2] BISHARAT N, AGMON V, FINKELSTEIN R, et al. Clinical, epidemiological, and microbiological features of *vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in israel, israel *vibrio* study group[J]. Lancet, 1999, 354(9188): 1421-1424.
- [3] DECHET A M, YU P A, KORAM N, et al. Nonfood-borne *vibrio* infections: an important cause of morbidity and mortality in the United States, 1997 - 2006[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(7): 970-976.
- [4] JONES M K, OLIVER J D. *Vibrio vulnificus*; disease and pathogenesis[J]. Infect Immun, 2009, 77(5): 1723-1733.
- [5] HENG S P, LETCHUMANAN V, DENG C Y, et al. *Vibrio vulnificus*: an environmental and clinical burden [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 997.
- [6] ELMAHDI S, DASILVA L V, PARVEEN S. Antibiotic resistance of *vibrio parahaemolyticus* and *vibrio vulnificus* in various countries: a review[J]. Food Microbiol, 2016, 57: 128-134.
- [7] SACKMANN E K, FULTON A L, BEEBE D J. The present and future role of microfluidics in biomedical research[J]. Nature, 2014, 507(7491): 181-189.
- [8] LEE S E, SHIN S H, KIM S Y, et al. *Vibrio vulnificus* has the transmembrane transcription activator *ToxRS* stimulating the expression of the hemolysin gene *vvhA* [J]. J Bacteriol, 2000, 182(12): 3405-3415.
- [9] ROH J B, LEE M A, LEE H J, et al. Transcriptional regulatory cascade for elastase production in *Vibrio vulnificus*: *LuxO* activates *LuxT* expression and *LuxT* represses *smcR* expression[J]. J Biol Chem, 2006, 281(46): 34775-34784.
- [10] 白晓晔, 钟智, 孙志宏, 等. 肠道中乳酸杆菌属特异性定量引物的筛选及验证[J]. 微生物学报, 2018, 58(11): 1997-2010.
- [11] 陈艳, 付萍. 创伤弧菌检测方法的研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2008, 35(2): 91-96.
- [12] NARAYANAMURTHY V, JEROISH Z E, BHUV-ANESHWARI K S, et al. Hepatitis C virus (HCV) diagnosis via microfluidics[J]. Anal Methods, 2021, 13(6): 740-763.
- [13] JIN J L, DUAN L J, FU J L, et al. A real-time LAMP-based dual-sample microfluidic chip for rapid and simultaneous detection of multiple waterborne pathogenic bacteria from coastal waters [J]. Anal Methods, 2021, 13(24): 2710-2721.

(2):167-192.

[2] YEOH K G, TAN P. Mapping the genomic diaspora of gastric cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(2):71-84.

[3] ZHANG H, ZHOU Q Q, SHEN W M. Circ-FOXM1 promotes the proliferation, migration and EMT process of osteosarcoma cells through FOXM1-mediated Wnt pathway activation[J]. *J Orthop Surg Res*, 2022, 17(1):344.

[4] PEI S, MA C X, CHEN J, et al. CircFOXM1 acts as a ceRNA to upregulate SMAD2 and promote the progression of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2022, 10(5):e1914.

[5] GONG Y, ZHANG S, WANG H X, et al. The involvement of the circFOXM1-miR-432-Gα12 axis in glioma cell proliferation and aggressiveness[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1):9.

[6] SOLIMAN S E, ELABD N S, EL-KOUSY S M, et al. Down regulation of miR-30a-5p and miR-182-5p in gastric cancer: clinical impact and survival analysis[J]. *Biochem Biophys Rep*, 2021, 27:101079.

[7] WU Y C, ZHANG C J, PENG D, et al. MiR-182-5p inhibits the tumorigenesis of clear cell renal cell carcinoma by repressing UBE2T[J]. *Hum Cell*, 2022, 35(2):542-556.

[8] HUSSEIN N A, RASHAD M M, ABDOU A S, et al. Gene profiling of SEC13, SMAD7, GHR1, long non-coding RNA GHRLOS, HIF-1α in gastric cancer patients [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):6555.

[9] SU J W, CHEN D, RUAN Y, et al. LncRNA MBNL1-AS1 represses gastric cancer progression via the TGF-β pathway by modulating miR-424-5p/SMAD7 axis [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3):6978-6995.

[10] CHEN Y, ZHANG Q, ZHOU Y, et al. Inhibition of miR-182-5p attenuates pulmonary fibrosis via TGF-β/SMAD pathway[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2020, 39(5):683-695.

[11] 高慎硕, 张智凯, 尹国庆, 等. miR-875-5p 通过靶向 USF2 抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(1):23-29.

[12] KOLE C, CHARALAMPAKIS N, TSAKATIKAS S, et

al. Immunotherapy for gastric cancer: a 2021 update[J]. *Immunotherapy*, 2022, 14(1):41-64.

[13] LI G Z, DOHERTY G M, WANG J P. Surgical management of gastric cancer: a review[J]. *JAMA Surg*, 2022, 157(5):446-454.

[14] FAN X H, LIU M, FEI L, et al. CircFOXM1 promotes the proliferation, migration, invasion, and glutaminolysis of glioblastoma by regulating the miR-577/E2F5 axis[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2022, 22(2):205-216.

[15] WANG G, JIANG Y, LU C, et al. CircFOXM1 promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma via regulating miR-1179/SPAG5 axis[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):23890-23898.

[16] LIU G X, ZHENG T, ZHANG Y, et al. CircFOXM1 silencing represses cell proliferation, migration and invasion by regulating miR-515-5p/Adam10 axis in prostate cancer[J]. *Anticancer Drugs*, 2022, 33(1):e573-e583.

[17] HUANG X X, ZHANG Q, HU H, et al. A novel circular RNA circFN1 enhances cisplatin resistance in gastric cancer via sponging miR-182-5p [J]. *J Cell Biochem*, 2020:1-12.

[18] CHEN B W, ZHOU Y, WEI T, et al. lncRNA-POIR promotes epithelial-mesenchymal transition and suppresses sorafenib sensitivity simultaneously in hepatocellular carcinoma by sponging miR-182-5p [J]. *J Cell Biochem*, 2021, 122(1):130-142.

[19] SADEGHIPOUR N, KUMAR S U, MASSOUD T F, et al. A rationally identified panel of microRNAs targets multiple oncogenic pathways to enhance chemotherapeutic effects in glioblastoma models[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):12017.

[20] MARESCA C, DI MAGGIO G, STOLFI C, et al. Smad7 sustains Stat3 expression and signaling in colon cancer cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(20):4993.

(收稿日期:2023-12-22 修回日期:2024-02-16)

(上接第 1585 页)

[14] XIANG X R, DIAO E J, SHANG Y T, et al. Rapid quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* via high-fidelity target-based microfluidic identification [J]. *Food Res Int*, 2022, 162(Pt A):112032.

[15] 俞露, 贺云蕾, 邓刚. 基于微流控芯片的实时荧光定量 PCR 技术快速检测血小板制剂细菌污染[J]. *临床检验杂志*, 2022, 40(7):495-497.

[16] HANNA S E, CONNOR C J, WANG H H. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations[J]. *Journal of Food Science*, 2005, 70(3):R49-R53.

[17] RODRÍGUEZ A, RODRÍGUEZ M, CÓRDOBA J J, et al. Design of primers and probes for quantitative real-time

PCR methods[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1275:31-56.

[18] LI K, BROWNLEY A. Primer design for RT-PCR[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 630:271-299.

[19] 徐媛媛, 于永翔, 王印庚, 等. 5 种主要海水养殖病原菌多重微流控荧光定量 PCR 快速检测技术的建立[J]. *渔业科学进展*, 2023, 44(3):222-234.

[20] 丁芳, 王国平, 易干军, 等. 不同引物对检测柑桔黄龙病菌灵敏度比较[J]. *植物保护学报*, 2007, 34(4):364-368.

[21] NOUWAIIRI R L, CUNHA L L, TURIELLO R, et al. Ultra-rapid real-time microfluidic RT-PCR instrument for nucleic acid analysis [J]. *Lab Chip*, 2022, 22(18):3424-3435.

(收稿日期:2023-11-06 修回日期:2024-03-05)