论文

基于颜色判定的环介导恒温扩增法快速检测副溶血性弧菌

刘威, 邹大阳, 尹志涛, 刘大伟, 李雪莲, 魏晓, 王雪松, 姜铮, 袁静*, 黄留玉*

军事医学科学院疾病预防控制中心, 北京 100071

* 联系人, E-mail: yuanjing6216@163.com; huangliuyuly@163.com

收稿日期: 2011-07-20; 接受日期: 2011-08-14

doi: 10.1360/052011-534

摘要 利用 DNA 环介导恒温核酸扩增法(LAMP)针对副溶血性弧菌特异基因 *tlh* 基因设计 4 条引物, 通过引物特异性识别 *tlh* 基因上的 6 个独立区域来快速检测副溶血性弧菌. LAMP 反应的过程中会产生白色沉淀焦磷酸镁, 故可以通过监测浊度来判定反应结果. 实时浊度仪监测反应结果表明, LAMP 反应在 60~65℃ 恒温条件下 50 min 内完成; 如果在反应前添加羟基萘酚兰(HNB), 蓝色的阳性结果很明显区别于紫色阴性结果; LAMP 方法的最低检出限为 9.74 pg/μL, PCR 方法最低检出限为 97.4 pg/μL, LAMP 方法检测灵敏度是 PCR 方法检测灵敏度的 10 倍, 且具有良好的特异性. LAMP 方法用于快速检测副溶血性弧菌具有检测过程简单、实验装置简便、反应结果肉眼可辨别、灵敏度高和特异性强的特点, 所以 LAMP 方法检测副溶血性弧菌特别适合用于现场和基层检疫及医疗单位的快速诊断.

关键词

tlh 基因
DNA 介导恒温
核酸扩增法
快速检测
副溶血性弧菌

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种重要的食源性致病菌, 广泛分布于海洋与盐湖中, 海产品中常有此菌^[1]. 人食用受该菌污染的食物后会引发严重急性肠胃炎而导致腹泻、呕吐及肠痉挛等, 有的重症患者还会脱水、休克昏迷, 甚至死亡. 近年来随着人们生活水平的提高, 海鲜的消费量也大大增加, 同时副溶血性弧菌引起的食物中毒事件也呈明显上升趋势, 副溶血性弧菌已成为中国首要的食源性致病菌^[2]. 副溶血性弧菌是进出口水产品检测的重要项目, 同时又是餐饮业检测的重要项目, 在饮用水、食品检测和食品中毒源调查及传染病源调查等工作中, 也经常需要对该菌进行检测. 因此, 快速灵敏

的检测手段是预防控制副溶血性弧菌传播的关键.

传统鉴定副溶血性弧菌的方法是分离培养、镜检观察、生化鉴定及嗜盐性实验等, 这些检测手段不仅需要专业技术人员和复杂的设备仪器, 同时鉴定过程耗时、操作复杂、灵敏度低. 随着核酸相关的鉴定方法的发展, 基于 PCR 的方法已经成功用于检测副溶血性弧菌^[3-5], 虽然 PCR 法在特异性和敏感性上有较大的提高, 但是检测时间仍然比较长, 大概 4~5 h, 同时 PCR 方法依赖精密的温度循环装置. 另外还有一些检测方法, 例如 DNA 杂交法^[6]、免疫色谱法^[7], 虽然其检测灵敏度比较高, 但是检测过程复杂, 不能满足快速检测的需求.

英文引用格式: Liu W, Zou D Y, Yin Z T, et al. Colorimetric detection of *Vibrio parahaemolyticus* by loop mediated isothermal amplification method. SCIENTIA SINICA Vitae, 2011, 41: 1037-1042, doi: 10.1360/052011-534

环介导恒温核酸扩增技术(loop-mediated isothermal amplification of DNA, LAMP)是一种新的分子生物学方法,它在等温条件下实现核酸扩增^[8]. LAMP 技术的反应原理是,根据序列保守区域设计的一对外引物、一对内引物和一对环引物特异性识别靶序列上的 6 个独立区域,在 Bst 大片段聚合酶的作用下引起自循环链置换反应,60~65℃ 范围 60 min 内,大量合成目标 DNA 的同时伴随有副产物——白色的焦磷酸镁沉淀产生.由于 LAMP 扩增过程依赖识别靶序列 6 个独立区域,所以反应特异性很强,并且核酸扩增过程是在恒温条件下进行,普通水浴锅或者有稳定热源的设备就能满足反应要求,检测成本大大降低.目前,LAMP 技术在卫生安全检测、疾病诊断以及环境安全监测等方面有成功应用的报道^[9].在本研究中,利用 DNA 环介导恒温核酸扩增法对副溶血性弧菌特异基因 *tlh* 进行快速检测,并且着重在灵敏度和特异性方面对此方法进行评价.

1 材料与方法

1.1 菌株

本实验所用菌株均来自军事医学科学院疾病预防控制中心传染病控制中心菌种库.分别是:副溶血性弧菌 678-2;嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)H62;鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)B260; ETEC44824; EIEC44825; EPEC2348; 福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)4536; 肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)50326-1; 宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei*)2531.

1.2 仪器

实时浊度仪 LA-320c,日本荣研化学株式会社;恒温金属浴,杭州博日科技有限公司;PCR 扩增仪,美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像系统:美国 Bio-Rad 公司;美国分光光度计, NanoDrop ND-100.

1.3 试剂

Bst 大片段 DNA 聚合酶购自 New England Biolabs 公司;Chelex-100、甜菜碱购自 Sigma 公司;硫酸镁、氯化钾、氢氧化钠、EDTA 和硫酸铵购自国药集团化学试剂有限公司;Tris-HCl 购自上海生科生物科技有限公司;Triton X-100 购自北京美莱博医学科技有限公司;dNTP 购自 pharmacia 公司;NP-40 购自 FLUKA 公司;羟基萘酚蓝(HNB)购自 Regal Biotechnology 公司;总 DNA 提取纯化试剂盒购自 Promega 公司;2×Tap MIX 购自天根生化科技(北京)有限公司;琼脂糖购自 AMRESCO 公司;引物合成由北京奥科鼎盛生物有限公司完成.

1.4 方法

(1) DNA 模板的制备. 根据之前的工作基础,用 Chelex 法提取细菌总 DNA. 方法如下:取 500 μL 细菌悬液,10000×g 离心 2 min,弃上清,加入 500 μL 双蒸水,再加入等体积的 Chelex 法 DNA 提取液(25 mmol/L NaOH, 10 mmol/L Tris-HCl, 1% Triton X-100, 1% NP-40, 0.1 mmol/L EDTA 和 2% Chelex-100),置于沸水中煮沸 10 min,转入 4℃ 放置 5 min 后,14000×g 离心 2 min,上清即为模板,置-20℃ 备用.

(2) LAMP 反应引物的设计. 从 NCBI 数据库中已获得已知的副溶血性弧菌特异基因 *tlh* 基因序列,GenBank 登录号: GU971655.1. 选择其中一段区域设计 LAMP 引物, LAMP 引物设计软件网址: <http://primerexplorer.jp/e/>. 将待扩增的 DNA 分为 6 个独立的区域,根据这 6 个区域分别设计 LAMP 反应所需的 2 对引物(内引物 FIP 和 BIP、外引物 F3 和 B3)(表 1).

(3) LAMP 反应. 25 μL 反应混合物各组分的浓度为: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100, 0.8 mol/L 甜菜碱, 8 mmol/L MgSO₄, 1.4 mmol/L dNTP, 8U Bst DNA 聚合酶, 40 pmol FIP 和 BIP, 5 pmol F3 和 B3. 将混合物置于 60~65℃ 恒温反应 60 min. 以双蒸水为

表 1 扩增 *tlh* 基因的 LAMP 引物序列

名称	引物序列
F3	5'-TGCAACATAGCGGTGAGTTG-3'
B3	5'-CAGAAGAGCACGGTTTCGT-3'
FIP	5'-GAGTGTGCAGCGTCTGGTGCTTTTGTGTTGGATGCGTGACAT-3'
BIP	5'-GAGCGCAATGCGTGGGTGTATTTTGAACGCGAGCGATCCTTG-3'

阴性对照.

(4) LAMP 反应结果检测. 实时浊度仪检测: LAMP 在反应过程中发生以下反应式:

其中 $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 即焦磷酸镁, 为白色沉淀. 依据此原理, 日本荣研化学株式会社开发出实时浊度仪 LA-320c, 每隔 6 s 测定反应管的浊度并绘制成曲线来判断反应的阴阳性. 基于羟基萘酚蓝 (HNB) 颜色改变检测. HNB 是一种金属离子指示剂, 根据反应液中镁离子的变化而呈现出不同的颜色, 阴性时为紫色, 阳性时为天蓝色. 使用时将 HNB 配制成 2.4 mmol/L 的反应液^[10], 保存于 -20°C 备用.

(5) LAMP 方法与 PCR 方法检测灵敏度比较实验. 为了比较 LAMP 方法与 PCR 方法的检测灵敏度, 以副溶血性弧菌 678-2 为检测对象, 提取其总 DNA, 定量后将总 DNA 进行 10 倍稀释度稀释, 使得最终稀释浓度为 974.5 ng/ μL , 97.45 ng/ μL , 9.745 ng/ μL , 974.5 pg/ μL , 97.45 pg/ μL , 9.745 pg/ μL , 0.9745 pg/ μL 和 0.0975 pg/ μL . 两条引物 F3 和 B3 用于 PCR 扩增反应. 25 μL PCR 反应总体积的组成: 1 μL 模板、各 10 pmol 引物、12.5 μL 2 $\times$ Taq MIX. 扩增循环条件为: 94°C 预变性 5 min, 之后 94°C 变性 30 s; 55°C 退火 30 s; 72°C 延伸 30 s, 共 32 个循环, 最后延伸 7 min. 取 PCR 产物 5 μL , 在 1% 含 EB 琼脂糖凝胶电泳上 120 V 电泳 35 min, 在凝胶成像系统下照像检测.

2 结果与分析

2.1 LAMP 检测方法的建立

以本研究设计的特异性引物对副溶血性弧菌 678-2 进行 LAMP 扩增, 阴性对照以水作为模板, 并用嗜麦芽寡养单胞菌 H62; 鲍曼不动杆菌 B260; ETEC44824; EIEC44825; EPEC2348; 福氏志贺菌 4536; 肠炎沙门氏菌 50326-1; 宋内志贺氏菌 2531 的基因组作为对照以检测特异性. 当反应体系中存在 *tlh* 基因时, 便发生 LAMP 扩增反应, 产生大量的焦磷酸镁白色沉淀, 反应液的浊度上升, 在图中表现为曲线上升, 从图 1(A)中可以看出只有副溶血性弧菌 678-2 的曲线发生了上升, 其他曲线均没有变化, 表明设计的引物具有良好的特异性.

当在反应前加入 1.25 μL 浓度为 2.4 mmol/L 的

图 1 LAMP 引物特异性实验

(A) 浊度仪检测结果; (B) HNB 检测结果. 1 为双蒸水阴性对照; 2 为副溶血性弧菌 678-2; 3 为嗜麦芽寡养单胞菌 H62; 4 为鲍曼不动杆菌 B260; 5 为 ETEC44824; 6 为 EIEC44825; 7 为 EPEC2348; 8 为福氏志贺菌 4536; 9 为肠炎沙门氏菌 50326-1; 10 为宋内志贺氏菌 2531

HNB 时, 从图 1(B)中可以看出只有副溶血性弧菌 678-2 的反应管的颜色变成了天蓝色表示为阳性, 其他的均为紫色表示为阴性, 说明设计的引物具有良好的特异性.

2.2 LAMP 方法与 PCR 方法用于检测副溶血性弧菌的灵敏度比较

将 10 倍梯度稀释的副溶血性弧菌总 DNA 分别用于 LAMP 反应和 PCR 反应, 检测结果见图 2. 如图 2(A)和(B)所示, 浊度仪检测和 HNB 检测得到的结果相同, LAMP 最低检测浓度为 9.74 pg/ μL . 如图 2(C)所示, PCR 反应产物是 175 bp 大小的扩增条带, PCR 最低检测浓度为 97.4 pg/ μL , LAMP 法灵敏度是 PCR 灵敏度的 10 倍.

3 讨论

自 2000 年开发以来, LAMP 技术在诊断和检测方面获得了很多成就, 主要包括临床疾病的诊断^[9,11,12]、流行性细菌或病毒的定性定量检测^[13-18]以及动物胚胎性别鉴定^[19]等方面. 本研究通过利用环介导恒温核酸扩增方法设计针对副溶血性弧菌特异基因 *tlh* 基因设计 LAMP 引物, 并用该引物灵敏地、快速地检测到副溶血性弧菌. Chelex 法提取基因组 DNA, 整个处

图2 LAMP法与PCR检测副溶血性弧菌灵敏度结果

(A) LAMP法浊度仪结果; (B) LAMP法HNB结果; (C) PCR法电泳结果. M为DNA marker D2000; 1, 974.5 ng/ μ L; 2, 97.45 ng/ μ L; 3, 9.745 ng/ μ L; 4, 974.5 pg/ μ L; 5, 97.45 pg/ μ L; 6, 9.745 pg/ μ L; 7, 0.9745 pg/ μ L; 8, 0.0975 pg/ μ L

理时间不超过 20 min; 反应过程快捷, 只需将反应混合液在恒温 60~65℃ 条件下保持 60 min 即可完成反应. 现在相当一部分研究者在检测 LAMP 反应结果时往往选择对反应结果进行电泳或者在反应完成后添加 SYBR Green I 荧光染料, 这 2 种方法都使反应产物暴露于空气中, 污染了环境, 极易造成假阳性, 而且电泳法检测 LAMP 反应并不能实时反应 LAMP 反应过程, 本研究中采用实时浊度仪和 HNB 检测, 反应完成后不开盖, 很好地杜绝了污染, 有效防止了假阳性.

LAMP 法在很多方面都优于 PCR 法, LAMP 法最

大的优点是实现了恒温扩增, 不像 PCR 法必须要热循环, 这样就摆脱了对热循环仪器的依赖, 只要有稳定的热源 LAMP 反应就可以发生, 极大的扩展了 LAMP 使用的范围, LAMP 之所以能在恒定的热源下发生反应是因为在 LAMP 反应液中添加了甜菜碱, 使双链 DNA 处于解链的动态平衡中, 在 *Bst* DNA 聚合酶的作用下实现扩增. 同时 Notomi 等人^[8]发现 LAMP 反应几乎不受反应混合液中存在的大量外源 DNA 和杂质的影响, 用 LAMP 反应来检测只有 6 个拷贝的肝炎病毒 B(HBV) 时, 实验结果表明, 存在于

反应混合液中的 100 ng 人基因组 DNA 没有影响到 LAMP 检测结果; Kaneko 等人^[20]研究也发现, LAMP 反应过程比 PCR 更不易受到临床样本中各种不同组分的影响, 并不需要从样本中纯化 DNA 出来. 但 PCR 反应却会因外源 DNA 或者样品中的抑制剂的存在而抑制其反应. 所以 LAMP 方法比 PCR 方法更适于临床样本快速检测. 同时, LAMP 反应通过 4 条引物特异性识别靶序列上的 6 个独立区域, 相对于 PCR 引物识别靶序列的 2 个独立区域而言, 特异性和灵敏

度大大提高, 假阳性出现的概率也随之降低. 本研究应用 LAMP 方法进行副溶血性弧菌快速检测, 特异性实验和灵敏度实验发现 LAMP 方法可以成功地检测到浓度为 9.74 pg/ μ L 的总 DNA 并且只对 *tlh* 基因特异. LAMP 方法虽然扩增原理复杂, 但是操作简便、用时少、灵敏度高、特异性强, 再加上其恒温反应条件, 所以适用于检验检疫部门和卫生医疗单位对副溶血性弧菌的检测, 并有望成为简易的常规检测手段, 尤其适用于基层单位.

参考文献

- 1 钟凯. 溶血弧菌快速检测的进展及其应用. 中国预防医学杂志, 2005, 6: 75-77
- 2 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究. 中国食品卫生杂志, 2004, 16: 3-9
- 3 Kaufman G E, Bowen M D, Meyer R F, et al. Real-time PCR quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters using an alternative matrix. J Food Prot, 2004, 67: 2424-2469
- 4 Takahashi H, Iwade Y, Konuma H, et al. Development of a quantitative real-time PCR method for estimation of the total number of *Vibrio parahaemolyticus* in contaminated shellfish and seawater. J Food Prot, 2005, 68: 1083-1088
- 5 Wark L N, Bej A K. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. Appl Environ Microbiol, 2006, 72: 2031-2042
- 6 Banerjee S K, Pandlan S, Todd E C, et al. A rapid and improved method for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* strains grown on hydrophobic grid membrane filters. J Food Prot, 2002, 65: 1049-1053
- 7 Kawatsu K, Ishibashi M, Tsukamoto T. Development and evaluation of a rapid, simple, and sensitive immunochromatographic assay to detect thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* in enrichment cultures of stool specimens. J Clin Microbiol, 2006, 44: 1821-1827
- 8 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res, 2000, 28: 63
- 9 Endo S, Komori T, Ricci G, et al. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. FEMS Microbiol Lett, 2004, 234: 93-97
- 10 Goto M, Honda E, Ogura A, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. Biotechniques, 2009, 46: 167-172
- 11 Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, et al. Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol, 2005, 43: 1625-1631
- 12 Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y, et al. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol, 2004, 42: 140-145
- 13 Poon L L, Leung C S, Tashiro M, et al. Rapid detection of the severe acute respiratory syndrome (SARS) corona virus by a loop-mediated isothermal amplification assay. Clin Chem, 2004, 50: 1050-1052
- 14 Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, et al. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. Vaccine, 2006, 24: 6679-6682
- 15 Yeh H Y, Shoemaker C A, Klesius P H, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel fish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri*. J Microbiol Methods, 2005, 63: 36-44
- 16 Hara K Y, Yoshino M, Kojima T, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. FEMS Microbiol Lett, 2005, 253: 155-161
- 17 Song T, Toma C, Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. FEMS Microbiol Lett, 2005, 243: 259-263
- 18 Ohtsuka K, Yanagawa K, Takatori K, et al. Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 6730-6735
- 19 Hirayama H, Kageyama S, Takahashi Y, et al. Rapid sexing of water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos using loop-mediated isothermal amplification. Theriogenology, 2006, 66: 1249-1256
- 20 Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, et al. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. J Biochem, 2007, 141: 499-501

Colorimetric Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by Loop Mediated Isothermal Amplification Method

LIU Wei, ZOU DaYang, YIN ZhiTao, LIU DaWei, LI XueLian, WEI Xiao,
WANG XueSong, JIANG Zheng, YUAN Jing & HUANG LiuYu

Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay was developed and validated for the specific detection of *Vibrio parahaemolyticus*. One set of primers were designed for recognizing six distinct sequences on *Vibrio parahaemolyticus*-specific gene *tlh*. LAMP reaction process will produce a white precipitate of magnesium pyrophosphate, and the reaction results can be judged by monitoring the turbidity. The real-time turbidity monitoring results show that LAMP reaction can be completed in a constant temperature of 60–65°C in 50 min. If adding hydroxy naphthol blue (HNB) before the reaction, blue-positive results are significantly different from the purple-negative results. The sensitivity of LAMP with detection limits of 9.74 g/μL is 10 times than that of PCR, and the primers designed had a good specificity too. The LAMP method reported here demonstrates a potential and valuable means for detection of *Vibrio parahaemolyticus*, especially for its rapidity, simplicity and low cost. The LAMP assay is suitable for on-site and primary quarantine, medical units for rapid diagnosis.

***tlh* gene, loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *Vibrio parahaemolyticus*, rapid diagnosis**

doi: 10.1360/052011-534