

海产品中霍乱弧菌实时浊度LAMP检测方法的建立

胡兴娟¹, 沈 彪¹, 江玲丽¹, 王莲芳², 滕 跃¹, 朱竹君¹

(1. 舟山出入境检验检疫局, 浙江 舟山 316000; 2. 德清县食品药品检验所, 浙江 德清 313200)

摘要: 为建立一种快速、敏感、特异、有效的检测霍乱弧菌方法, 以有效预防及控制霍乱弧菌感染, 针对霍乱弧菌 *ctxA* 基因的保守区域设计引物, 应用实时浊度仪进行环介导等温扩增(LAMP), 研究其特异性与灵敏性, 并利用该体系检测海产品中的霍乱弧菌。结果显示, 含 *ctxA* 基因的霍乱弧菌可得到特异性扩增, 而其他与霍乱弧菌(含 *ctxA* 基因)共存于海产品中的 7 种细菌均未得到扩增, DNA 检测下限为 81 fg/ μ L。用建立的实时浊度 LAMP 检测方法对 150 份海产品进行检测, 检出含霍乱弧菌的海产品 2 份, 与荧光定量 PCR 结果一致。表明建立的 LAMP 检测方法可用于海产品中霍乱弧菌的检测。

关键词: 霍乱弧菌; 环介导等温扩增; 实时浊度; *ctxA* 基因; 检测方法

中图分类号: S855.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)10-0127-04

Establishment of A Real-time Turbidimeter-based Loop-mediated Isothermal Amplification for Detection of *Vibrio cholera* in Seafood

HU Xing-juan¹, SHEN Biao¹, JIANG Ling-li¹, WANG Lian-fang²,
TENG Yue¹, ZHU Zhu-jun¹

(1. Zhoushan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhoushan 316000, China;

2. Deqing Institute For Food and Drug Control, Deqing 313200, China)

Abstract: In order to establish a rapid, sensitive, specific, and effective method for diagnosis of vibrio cholera, to prevent and control the bacteria infection, a loop-mediated isothermal amplification(LAMP) assay was developed with a set of primers designed for *V. cholera ctxA* gene. The real-time monitoring of the LAMP reaction was achieved by real-time turbidimeter, and the specificity and sensitivity were tested. The results showed that *V. cholera* with *ctxA* gene exhibited typical curves, and 7 strains of other bacteria concurred with *V. cholera* in seafood. The detection limitation of this method was 81 fg/ μ L for purified genomic DNA. Furthermore, a total of 150 seafood samples were tested by the established method and the virulence *ctxA* gene was detected from 2 samples, which was accordant with the result by the real-time quantitative PCR. This assay is rapid and reliable for detection of *V. cholera*.

Key words: *Vibrio cholera*; loop-mediated isothermal amplification; real-time turbidimeter; *ctxA* gene; detection method

弧菌属细菌大多能感染人和动物, 病原性弧菌是海水养殖动物最重要的细菌性病原, 其流行给全世界海水鱼类、贝类及甲壳类动物养殖业造成了巨大的损失^[1]。霍乱弧菌是一种重要的致病性弧菌,

尤其是在对虾养殖业^[2]。海产品一旦受到霍乱弧菌污染, 霍乱弧菌可能在其体内存活较长时间并污染水体; 同时将霍乱弧菌传给消费者, 导致疾病。霍乱弧菌对海产品养殖及安全的影响重大。因此, 在海

收稿日期: 2014-05-16

基金项目: 浙江检验检疫局科技计划项目(ZK201337)

作者简介: 胡兴娟(1981-), 女, 浙江绍兴人, 工程师, 硕士, 主要从事微生物检测方面的研究。E-mail: shxhxj@aliyun.com

产品及其养殖环境中对霍乱弧菌的监测和控制不能放松,有必要建立一种快速、敏感、特异、有效的诊断方法,以缩短对该菌的检测时间,降低该菌对养殖业带来的经济损失以及对人类健康安全的威胁。霍乱肠毒素(CT)是霍乱弧菌的主要毒力因子,可作为判断霍乱弧菌是否为流行株的主要依据,由 A 和 B 2 个亚单位组成,A 亚单位包含毒素的生物活性部分,由 *ctxA* 基因编码;B 亚单位为非毒素蛋白。

霍乱弧菌的传统检测方法操作较繁琐、检测周期长,不能满足大批样品检验检疫的需要。近年来发展的免疫学方法、荧光定量 PCR 等检测方法均存在检测成本高等局限性^[3],不利于在基层单位推广应用。Notomi 等^[4]报道了一种新的核酸扩增技术,即环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术,它依赖于能够识别靶 DNA 上 6 个特定区域的 4 条引物和 1 种具有链置换活性的 DNA 聚合酶,在恒温条件下高效扩增核酸,具有高特异性、快速灵敏、高效、操作简便等特点^[5]。目前,该技术在食源性致病菌的检测中已有研究应用报道^[6-10],但是针对霍乱弧菌的实时浊度 LAMP 检测技术鲜见报道。为此,本研究针对霍乱弧菌 *ctxA* 基因设计 LAMP 引物,建立霍乱弧菌 LAMP 方法,为快速检测霍乱弧菌、有效预防及控制霍乱弧菌感染奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 大肠杆菌(*E. coli*, ATCC25922)、金

黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538)、副溶血弧菌(*V. Parahaemolyticus*, ATCC 17802)购自广东环凯微生物研究所,非 O1/O139 霍乱弧菌分离株 H4-3(*V. choerae* non-O1/O139, H4-3)、溶藻弧菌分离株(*V. alginolyticus*, *V. alg*)、拟态弧菌分离株(*V. minicus*, *V. m*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*, *V. v*)均由舟山出入境检验检疫局水产品实验室保存。

1.1.2 主要试剂及仪器 缓冲蛋白胨水、碱性蛋白胨水购自北京路桥技术有限责任公司,细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自 Invitrogen 公司,荧光定量测定试剂盒购自上海之江生物科技有限公司,霍乱弧菌 O139 基因组 DNA 由舟山出入境检验检疫局水产品实验室保存,Loopamp DNA 扩增试剂盒、Loopamp 反应管购自北京蓝谱生物科技有限公司,实时浊度仪(LA-320C)为日本荣研株式会社产品, NanoDrop ND-100 分光光度计为美国 NanoDrop 科技公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取 将供试菌株于增菌培养基(弧菌以碱性蛋白胨水培养,其他菌株以缓冲蛋白胨水培养)中培养,按照试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA,建立参考菌株 DNA 模板库,保存于-20℃备用。

1.2.2 LAMP 引物设计 将 GenBank 中发表的霍乱弧菌基因序列进行比对,针对霍乱弧菌的 *ctxA* 基因,利用 PrimerExplorer V4 软件设计 3 组引物(表 1),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 扩增 *ctxA* 基因的 LAMP 引物序列

组别	引物	序列(5'-3')	长度/bp
[1]	F3	TGATAAGTTATATCGGGCAGAT	22
	B3	GTGGGCACTTCTCAAAC	18
	FIP	CGGTCAAAGTACTCACTCTGTCCCTCCTGATGAAATAAAGCAGT	45
	BIP	TCAACCTTTATGATCATGCAAGAGGGGAAACATATCCATCATCGTG	46
[2]	F3	CCTCAATTAGTTTGAGAAGTGC	22
	B3	ACCATCCATATATTTGGGAGTA	22
	FIP	TGGGTGCAGTGGCTATAACATATATCTTAGTGGGTCAAACATATATTGTC	49
	BIP	TGATGTATTAGGGGCATACAGTCCAATCCACCTAAAGCAGAAAC	45
[3]	F3	GGCTACAGAGATAGATATTACAGTA	25
	B3	CAAGGAATTTTACACCTAGACTT	23
	FIP	GCTCTTCCCTCCAAGCTCTACAGCAGATGGTTATGGATTG	40
	BIP	CGTGGATTTCATCATGCACCGGGGTTTTTCATCGCAAGT	39

1.2.3 LAMP 引物筛选 将针对 *ctxA* 基因设计的 3 组引物同时进行 LAMP 扩增,用 Loopamp 浊度仪检测 3 组引物扩增效率,优先选择扩增效率高且未出现非特异性扩增的引物。

1.2.4 LAMP 扩增 扩增反应在实时浊度仪上进

行。反应体系为 25 μ L:反应缓冲混合液 16 μ L,反应引物 F3、B3、FIP、BIP 各 1 μ L,反应酶类混合液(8 U/ μ L 大片段聚合酶)1 μ L,模板 DNA 1 μ L,剩余加 ddH₂O 水补足。其中,引物混合液 Primer Mix 中各反应引物浓度为 F3 20 pmol/ μ L、B3

20 pmol/ μ L、FIP 40 pmol/ μ L、BIP 40 pmol/ μ L。反应条件为:65 $^{\circ}$ C 60 min。

1.2.5 LAMP 试验结果的判别方法 以霍乱弧菌 O139 基因组 DNA 为阳性组,双蒸水为空白对照,菌株副溶血弧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、拟态弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌 H4-3 为阴性对照,同时进行 LAMP 扩增。通过 Loopamp 浊度仪判定是否发生 LAMP 扩增。结果判定标准:浊度超过 0.1 为阳性。

1.2.6 LAMP 扩增特异性试验 采用最优引物组并利用实时浊度仪分别对霍乱弧菌 O139、副溶血弧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、拟态弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌 H4-3 菌株 DNA 进行 LAMP 扩增,根据浊度变化观察结果检验方法的特异性。

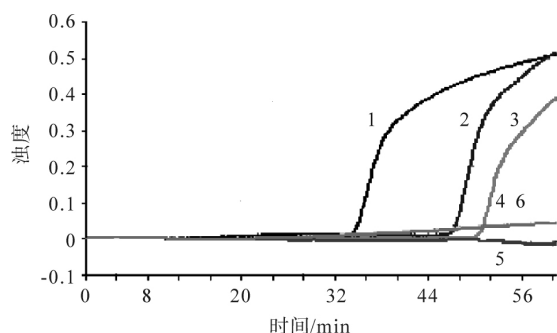
1.2.7 LAMP 扩增灵敏度试验 应用 Nano DropND-100 分光光度计测定霍乱弧菌 O139 基因组 DNA 含量,10 倍倍比稀释基因组 DNA 原液至稀释度为 $10^{-1} \sim 10^{-7}$,分别取稀释度为 $10^{-2} \sim 10^{-7}$ 的基因组 DNA 1 μ L 作为模板进行 LAMP 扩增,分析其灵敏度。

1.2.8 海产品中霍乱弧菌的检测 将 150 份各类海产品前处理后,预增菌,提取细菌基因组 DNA。被检海产品样品分别采用 LAMP 和荧光定量 PCR 方法进行检测,以验证 LAMP 方法的可靠性和实用性。

2 结果与分析

2.1 LAMP 引物筛选试验结果

将生工生物工程(上海)股份有限公司合成的 3 组引物以霍乱弧菌 DNA 为模板同时进行 LAMP 反应,并设空白对照。结果显示,3 组引物均可发生 LAMP 反应,空白对照均未发生 DNA 扩增,其中引物组[1]扩增速率最快,出峰时间最早(图 1)。选择引物组[1]作为 *ctxA* 基因的 LAMP 扩增反应最优引物组。

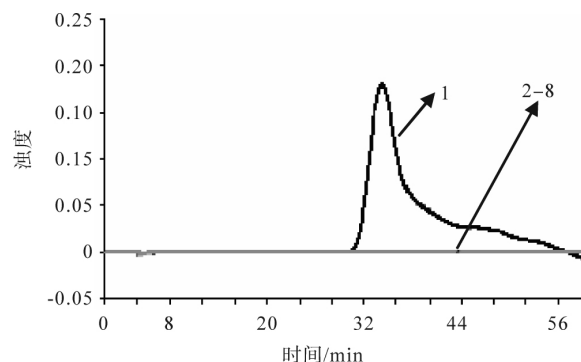


1—3 分别为[1]、[2]、[3]组引物阳性扩增;4—6 分别为[1]、[2]、[3]组引物空白对照

图 1 各组引物的 LAMP 扩增反应扩增曲线

2.2 LAMP 扩增特异性试验结果

特异性试验结果显示,在 20~60 min 霍乱弧菌 O139 DNA 发生扩增,浊度明显上升,LAMP 检测结果呈阳性;其余 7 株菌株 DNA 均未发生扩增,浊度无明显变化,LAMP 检测结果呈阴性(图 2)。表明 LAMP 方法特异性极高。

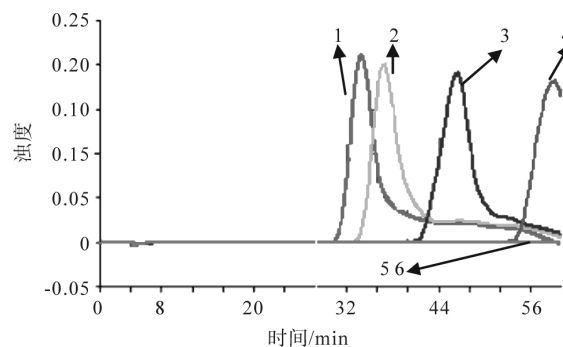


1—8 分别为霍乱弧菌(O139)、副溶血弧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、拟态弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌 H4-3 菌株

图 2 LAMP 特异性扩增速率曲线

2.3 LAMP 扩增灵敏度试验结果

基因组 DNA 含量检测结果显示,霍乱弧菌 O139 基因组 DNA 含量为 8.1 ng/ μ L。10 倍倍比稀释 DNA 原液进行 LAMP 检测,结果如图 3 所示,在 60 min 内, $10^{-2} \sim 10^{-5}$ 样品反应浊度都超过 0.1(阳性);随着模板浓度的降低,反应速率基本不变,反应峰值出现的时间延迟,至稀释度 10^{-5} 时仍能快速有效地扩增,表明霍乱弧菌 LAMP 方法可扩增稀释至约 81 fg/ μ L 的基因组 DNA。在反应中,从反应产物量达到可被判定的临近值到最终被判定为阳性仅耗时 4 min,说明该方法针对目的基因的序列扩增效率很高。



1—6 分别表示稀释度为 $10^{-2} \sim 10^{-7}$ 的霍乱弧菌 O139 基因组 DNA

图 3 LAMP 灵敏度试验扩增速率曲线

2.4 海产品中霍乱弧菌的检测结果

利用建立的 LAMP 检测方法对 150 份各类海

产品进行检测,其中 2 份样品检出霍乱弧菌阳性(检出率 1.3%),该结果与荧光定量 PCR 结果一致(表 2)。表明 LAMP 方法检测结果可靠。

表 2 含 *ctxA* 基因霍乱弧菌在样品中的检测结果

样品数/份	LAMP 检测		荧光定量 PCR	
	阳性数/份	检出率/%	阳性数/份	检出率/%
150	2	1.3	2	1.3

3 讨论

目前,多数建立的 LAMP 反应方法采用琼脂糖凝胶电泳来判定结果^[11],其只能分析 LAMP 反应的最终结果,且存在气溶胶污染实验室的危险,由于缺乏对反应的实时监控,很难排除假阳性和非特异反应等干扰因素,不能对检测结果做出准确的判定。本研究利用 LA-320 实时混浊仪来实时分析 LAMP 反应的结果,可直观、实时地观察反应的进行情况,并通过设置分析标准排除这些干扰因素。

引物的优化及筛选是快速、准确检测的基础。本试验采用 LAMP 技术针对霍乱弧菌 *ctxA* 基因序列设计了 3 组特异性引物,LAMP 扩增结果显示,3 组引物均可用于检测 *ctxA* 基因,通过进一步的试验筛选,最终确定了引物组[1]为最优引物组。

在 LAMP 的高效反应过程中,扩增目的序列的量富集到临界值时,会进入较高的反应速率达到反应峰值,模板的稀释只影响反应的起点时间并不影响反应的速率。本研究中至稀释度 10^{-5} 时反应时间较长,与反应最初的 DNA 模板量有关,但扩增产物富集到临界值后仅用时 4 min 到达反应峰值,且与其他各反应样品的峰值相近,证明了该检测方法具有很高的扩增效率。本研究建立的霍乱弧菌实时浊度 LAMP 检测方法对霍乱弧菌 O139、副溶血弧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、拟态弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌 H4-3 菌株 8 种菌株的特异性检测结果显示,除 O139 霍乱弧菌外,其他试验菌株的检测结果显示均为阴性,表明所采用的[1]组引物对霍乱弧菌具有很高的特异性。该方法的检测下限为 $81 \text{ fg}/\mu\text{L}$,这一结果与文献报道的检测下限 $76 \text{ fg}/\mu\text{L}$ ^[12]、 $36.1 \text{ fg}/\mu\text{L}$ ^[13] 的基因组 DNA 基本相符。为进一步评价该方法的可行性及效果,对 150 份水产样本进行检测,霍乱弧菌检出率 1.3%,检出率与荧光定量 PCR 结果一致。从样品采集到获得检测结果传统方法需要 3~5 d,而 LAMP 检测方法仅需 1 d,大大提高了检测效率。

参考文献:

- [1] 巩华,黄志斌. 弧菌病疫苗研究开发及其使用效果影响因素[J]. 广东饲料,2012,21(1):44-47.
- [2] 张培培,李俊,俞盈. 浙江省舟山地区水产品及其养殖环境中霍乱弧菌污染状况调查[J]. 动物医学进展,2010,31(S1):124-126.
- [3] Blackstone G M, Nordstrom J L, Bowen M D, et al. Use of a real time PCR assay for detection of the *ctxA* gene of *Vibrio cholerae* in an environmental survey of Mobile Bay[J]. J Microbiol Meth, 2007, 68(2): 254-259.
- [4] Notomi T, Okayam A H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63.
- [5] 王永,兰青阔,赵新,等. 抗虫转 *Bt* 基因水稻外源转基因成分环介导等温扩增技术检测方法的建立及应用[J]. 天津农业科学,2012,18(1):7-10.
- [6] Chen S Y, Ge B L. Development of a *toxR*-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Vibrio parahaemolyticus* [J]. BMC Microbiol, 2010, 10:41-49.
- [7] Wang F, Jiang L, Ge B L. Loop-mediated isothermal amplification assays for detecting shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and human stools[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(1):91-97.
- [8] Xu Z B, Li L, Chu J, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays on rapid detection of various types of *staphylococci* strains [J]. Food Res Int, 2012, 47(2):166-173.
- [9] 薛超波,黄朱梁,孙瑛,等. 海产品中创伤弧菌实时浊度 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报,2013, 35(11):912-915.
- [10] 许紫建,杨兵,苏霞,等. 空肠弯曲菌环介导等温扩增检测方法的建立和优化[J]. 华北农学报,2013, 28(3):222-226.
- [11] 张毅,胡定金. 环介导等温扩增技术检测克氏螯虾样品中的副溶血性弧菌[J]. 河南农业科学,2013, 42(3):128-130.
- [12] Yeh H Y, Shoemaker C A, Klesius P H, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri* [J]. J Microbiol Methods, 2005, 63(1): 36-44.
- [13] Gao H, Lei Z, Jia J, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Yersinia enterocolitica* in pork meat [J]. J Microbiol Methods, 2009, 77(2):198-201.