· 检验技术 ·

霍乱弧菌毒力基因 LAMP 方法快速检测*

姚文山[1], 吴家林[2], 沙丹[2], 马广源[2], 张敬平[2]

摘　要: 目的　建立快速、特异检测霍乱弧菌的环介导等温扩增(LAMP)方法。**方法**　针对霍乱弧菌毒素基因(*ctxA*)设计 4 条引物, 建立环介导等温扩增检测方法, 优化反应体系, 测定方法的特异性和灵敏度, 并进行鱼肉模拟样品和实际样品检测。**结果**　LAMP 最佳反应条件为 8.0 mmol/L Mg^{2+}、0.6 mmol/L dNTPs、1.6 μmol/L FIP 和 BIP(2 条内引物)、0.2 μmol/L F3 和 B3(2 条外引物); 对细菌纯培养物的检测灵敏度为 10 cfu/mL, 对鱼肉模拟样品检测灵敏度为 10^2 cfu/g; 在 16 份实际样品中检测出 4 份 ctxA 基因阳性。**结论**　建立的 LAMP 方法灵敏度高、特异性强, 可快速地检测食品样品中霍乱弧菌。

关键词: 环介导等温扩增(LAMP); 霍乱弧菌; ctxA 基因
中图分类号: R 378.3; R 155.5　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2015)01-0067-03　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-01-20

Rapid detection of *Vibrio cholerae* toxic genes with loop-mediated isothermal amplification method

YAO Wen-shan*, WU Jia-lin, SHA Dan, et al(*Department of Medical Nursing, Panjin Vocational and Technical College, Panjin, Liaoning Province* 124000, China)

Abstract: Objective　To establish a loop-mediated isothermal amplification(LAMP) method for rapid detection of *Vibrio cholerae*. **Methods**　Four primers were designed specifically according to *ctxA* gene of *Vibrio cholerae*. The LAMP system was developed and optimized. The specificity and sensitivity of this system were evaluated. Artificially contaminated fish and practical samples were detected. **Results**　The LAMP method was highly sensitive and specific. The sensitivity of the LAMP detection was 10 cfu/ml of bacteria samples and 10^2 cfu/g of *Vibrio cholerae* in artificially contaminated fish. The assay identified 4 *Vibrio cholerae*, with *ctxA* primers from 16 practical samples. **Conclusion**　A rapid, specific and sensitive LAMP method for detection of *Vibrio cholerae* was established and could be used in rapid detection of *Vibrio cholerae* in food samples.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; *Vibrio cholerae*; ctxA gene

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)分为产毒株和非产毒株[1], 前者携带表达致病毒素的毒力基因, 易引起暴发流行, 是严重威胁公众生命健康的主要传染源, 针对毒素的检测有助于诊断病原、判定疫情发展态势和采取适当有效的防制策略和措施。霍乱肠毒素(*Cholera entero* toxin, CT)是主要的致病因子, 其编码基因(*Cholera entero* toxin A, ctxA)是霍乱弧菌染色体 CTX 遗传单元的组成成分, 在不同血清群和生物型间高度保守, 是诊断产毒菌株的首选目的基因。应用环介导等温扩增技术[2](loop-mediated isothermal amplification, LAMP)在食源性致病菌的快速检测上已有一些实践[3-5], 本研究建立的食品中霍乱弧菌毒力基因 LAMP 快速检测方法, 可在 2 h内获得检测结果, 适合于现场应急使用并在基层普及推广, 结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　菌株: 霍乱弧菌、沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、变形埃希菌、单核细胞增生李斯特菌、肠出血性大肠埃希菌 O157: H7、小肠结肠炎耶尔森菌、蜡样芽孢杆菌、溶血性链球菌、气单胞菌(无锡市疾病预防控制中心保藏)。引物由上海生工生物工程有限公司合成; Bst DNA 聚合酶、10 × thermo pol buffer(美国 New England Bio-labs 公司); 甜菜碱(美国 Sigma 公司); $MgCl_2$、dNTP mixture、100 bp DNA ladder Marker(大连宝生物有限公司); 琼脂糖(美国 Promega 公司); 培养基(北京陆桥技术有限公司)。Master cy-

* **基金项目**: 卫生部科研基金(WKJ2006 - 2 - 10); 无锡市卫生系统"十一五"重大综合发展项目(WZD0601); 无锡市卫生系统科研项目(XM0901)
作者单位: 1. 盘锦职业技术学院医疗护理系, 辽宁 盘锦 124010; 2. 无锡市疾病预防控制中心
作者简介: 姚文山(1973 -), 男, 黑龙江伊春人, 副教授, 副主任医师, 本科, 主要从事临床病原学研究。
通讯作者: 吴家林, E-mail: wjl6042@163.com
数字出版日期: 2014 - 12 - 4 11: 41
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20141204.1141.020.html

cler® ep gradient S PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司)、水平电泳仪(美国 Bio-RAD 公司)、Tanon 4100 型凝胶成像系统(上海天能公司)。

1.2　LAMP 方法建立

1.2.1　细菌 DNA 模板提取　取细菌纯培养物 1 mL,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入100 μL DNA 提取液,充分悬浮混匀,100 ℃水浴 10 min。10 000 r/min 离心 1 min,取上清于 -20 ℃保存备用。

1.2.2　引物设计与合成　根据 GenBank 中霍乱弧菌毒素基因 ctxA 保守序列,用 Primer Expolrer 4.0 软件在线设计出 4 条 LAMP 引物,包括 2 条外引物 F3 和 B3 和 2 条内引物 FIP 和 BIP,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。序列如下:F3:5′-CGTATGAGGCGCATAGAGTT-3′; B3: 5′-CGAGCCTATCGTTAAGCT-3′; FIP5′-: GAATGGTGAACACCATCCCATGCTACTGATCGTGTACAT CTAG AACA-3′;BIP:5′-CGAGGTTCTAGTACATATAGCAAGCTCAGCTCCTGCTGCTAAT-3′。

1.2.3　LAMP 反应体系及其优化　反应体系 25 μL,内含外引物(F3、B3)、内引物(FIP、BIP)、10 × ThermoPolbuffer、dNTPs、$MgCl_2$、甜菜碱、Bst DNA 聚合酶、ddH_2O 和 DNA 模板,反应条件:65 ℃ 60 min,80 ℃ 10 min 终止反应。分别优化内外引物浓度比、dNTPs 浓度、Mg^{2+} 浓度,确定最佳反应条件。

1.2.4　结果判断　LAMP 扩增产物可肉眼观察反应体系浊度的变化,或加入 1 μL 荧光染料 1 000 × SYBR GREEN I,观察颜色变化,或 2.0 % 琼脂糖凝胶电泳,观察电泳条带。

1.2.5　特异性试验　对霍乱弧菌、沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌、单核细胞增生李斯特菌、肠出血性大肠埃希菌 O157:H7、小肠结肠炎耶尔森菌、蜡样芽孢杆菌、溶血性链球菌、气单胞菌 12 种常见食源性致病菌均用设计好的 LAMP 引物进行扩增,验证引物的特异性。

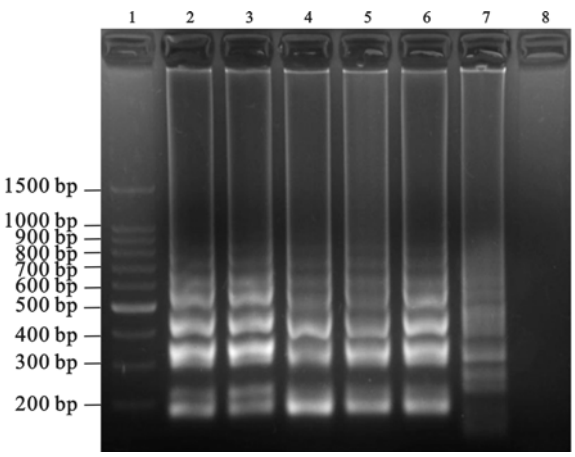
1.2.6　灵敏度试验　挑取霍乱弧菌培养物至灭菌生理盐水中,比浊法估计菌浓度为 10^8 cfu/mL,用灭菌生理盐水 10 倍梯度稀释至 10^0 cfu/mL,从各浓度稀释液取 1 mL 接种平板,菌落计数确定菌浓度。取各浓度稀释液直接制备模板,LAMP 反应后电泳检测,能检出的最低细菌浓度为该体系的检测灵敏度。

1.3　模拟样品检测　随机采集市售鱼肉样品 10 份,经国标法验证均不含沙门菌。挑取细菌培养物至 5 mL 灭菌生理盐水中,麦氏比浊法估计菌浓度为 10^8 cfu/mL,各称取 10 g 鱼肉样品加入不同试管,将菌液 2 mL 与各样品混合并补加灭菌生理盐水至 20 mL,均质混匀。用灭菌营养肉汤从 10^7 cfu/g开始倍比稀释至 10^0 cfu/g,取各浓度稀释液平板计数。各取 1 mL 提取 DNA,LAMP 扩增后电泳分析。

1.4　实际样品检测　对采集市场、食品污染物监测样品和历年来本实验室收集保存和相关单位惠赠的食物中毒样品 DNA 共计 16 份采用 LAMP 方法进行检测,所有样品均同时采用卫生部标准方法 WS 289 - 2008 复核。

2　结　果

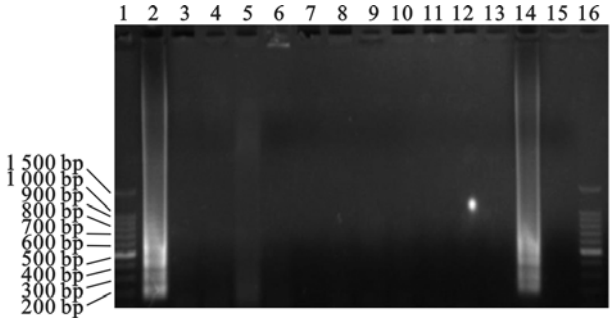
2.1　LAMP 检测方法建立(图 1)　针对霍乱弧菌 ctxA 基因进行 LAMP 扩增,凝胶上显示 LAMP 反应典型的阶梯形条带,阴性对照无条带出现;分别加入 1 μL 荧光染料 1 000 × SYBR GREEN I,发现阳性反应管中液体变绿色,而阴性对照管呈现橙色,表明建立的 LAMP 方法有效可行。通过单因素优化实验改进反应参数,确定 LAMP 最佳反应条件:8.0 mmol/L Mg^{2+}、0.6 mmol/L dNTPs、1.6 μmol/L FIP 和 BIP、0.2 μmol/L F3 和 B3。



注:1:100 bp DNA Marker;2 ~ 7:霍乱弧菌;8:阴性对照。

图 1　霍乱弧菌 LAMP 检测电泳结果

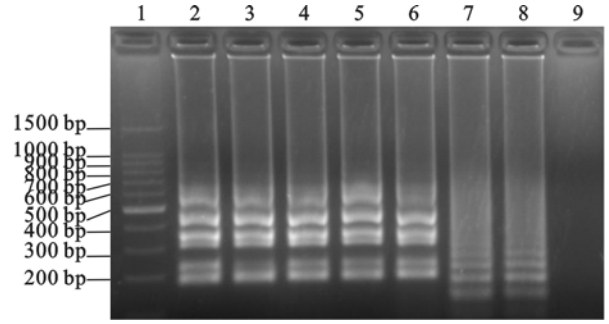
2.2　特异性(图 2)　用优化的 LAMP 反应体系对所收集到的实验菌株进行特异性验证,部分验证结果见图 2。电泳结果显示,霍乱弧菌均出现梯状条带呈现阳性反应,其他菌株无条带为阴性,表明所建立的 LAMP 方法能特异性地检测霍乱弧菌。



注：1、16：100 bp DNA ladder Marker；2～13：分别为霍乱弧菌、沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、变形杆菌、肠出血性大肠埃希菌 O157：H7、小肠结肠炎耶尔森菌、蜡样芽孢杆菌、溶血性链球菌、气单胞菌；14：阳性对照；15：阴性对照。

图 2　霍乱弧菌 LAMP 特异性验证结果

2.3　灵敏度（图 3）　通过平板计数法确定霍乱弧菌原始菌液浓度为 2.4×10^8 cfu/mL，10 倍倍比稀释成梯度菌液，分别提取 DNA 进行 LAMP 扩增，结果显示，稀释浓度为 2.4×10^0 cfu/mL 时无电泳条带，表明 LAMP 法检测灵敏度为 2.4×10^1 cfu/mL。



注：1：100 bp DNA ladder Marker；2～8：2.4×10^7～2.4×10^1 cfu/mL；9：阴性对照。

图 3　霍乱弧菌 LAMP 灵敏度结果

2.4　模拟样品（鱼肉）检测结果　霍乱弧菌菌液人工污染猪肉制备的模拟样品经平板计数测得浓度为 6.3×10^8 cfu/g，10 倍梯度稀释后 LAMP 检测，电泳结果显示，稀释到 10^2 cfu/g 时还出现典型的 LAMP 扩增条带，而 10 cfu/g 浓度检测结果显示阴性，表明 LAMP 法对污染食品中沙门菌的检测灵敏度为 6.3×10^2 cfu/g。

2.5　实际样品检测应用　采用 LAMP 技术对市场采集、食品污染物监测样品及食物中毒样品共计 16 份进行检测，共检出阳性样品 4 份，均为食物中毒样品 DNA，而食品污染物监测和市场采集样品未检出阳性。所有样品均同时采用卫生部标准方法 WS 289－2008 复核，LAMP 与标准方法检测结果完全一致，表明 LAMP 法检测结果真实可靠，能够用于日常样品和突发食源性疫情应急检测。

3　讨　论

霍乱弧菌肠毒素侵袭宿主肠粘膜上皮细胞而致病，毒力基因可通过诱导形成溶源性噬菌体在菌株间水平传递[6]，由此导致产毒株和非产毒株的转换变异，产毒株是食品安全与环境监测的主要研究对象，分子流行病学研究表明，产毒株绝大多数具有 ctxA 基因，因而常被用作霍乱弧菌产毒菌株快速检测的靶基因[7]。本研究选取 ctxA 基因作为 LAMP 检测目的基因，在其保守区设计引物，试验验证特异性较好，检测灵敏度达到 2.4×10^1 cfu/mL。本研究检测出的 4 份 ctxA 基因阳性标本均为食物中毒样品，而在采自食品污染物监测和市场的样品中来检出阳性菌株，且除非有特殊培养要求，一般检测结果均可在 2 h 内获得，表明在日常食品安全监测和食物中毒应急处置中应用 LAMP 技术开展霍乱弧菌检测是切实可行的。而 LAMP 方法具有快速、特异、灵敏、操作简便，不需要特殊仪器，成本低廉等特点，适合于现场快速检测和基层样品初筛应用，具有较强的实际应用价值和良好的应用前景。

参考文献

[1] 张政，朱水荣，黄良. 等. 霍乱弧菌几种肠毒素基因的检测研究[J]. 中国公共卫生，2001，17(12)：1095－1096.
[2] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63.
[3] Zhao X, Li Y, Park M, et a1. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the femA gene for rapid detection of *Staphylococcus aureus* from clinical and food samples[J]. J Microbiol Biotechnol, 2013, 23(2): 246－250.
[4] Anjum MF, Lemma F, Cork DJ, et a1. Isolation and detection of extended spectrum β-lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae from meat using chromogenic agars and isothermal loop-mediated amplification (LAMP) assays[J]. J Food Sci, 2013, 78(12): 1892－1898.
[5] Fei W, Lin J, Qianru Y, et a1. Rapid and specific detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 in ground beef, beef trim, and produce by loop-mediated isothermal amplification[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(8): 2727－2736.
[6] Miller JF. Bacteriophage and the evolution of epidemic cholera[J]. Infect Immun, 2003, 71(6): 1981－1982.
[7] Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholera*[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62(4): 1301－1314.

收稿日期：2014－02－11　（解学魁编辑　郑新校对）