

• 临床检验研究论著 •

志贺菌和肠侵袭性大肠埃希菌 LAMP 检测方法的建立及应用*

张如胜, 宋克云, 欧新华, 陈静芳, 姚 栋, 苏 良, 孙边成

(长沙市疾病预防控制中心, 湖南长沙 410006)

摘要:目的 建立针对侵袭性质粒抗原 H(ipaH)编码基因的环介导等温扩增(LAMP)方法。方法 利用 LAMP 方法对 4 株志贺菌、1 株肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC)和 20 株其他肠道菌 DNA 在 65 ℃恒温扩增 30 min 或 60 min 后观察结果。结果 4 株志贺菌和 EIEC 可通过肉眼和电泳观察到阳性结果,而其他肠道菌为阴性。LAMP 检测特异性与聚合酶链反应(PCR)相似,但敏感性比 PCR 高 10 倍。LAMP、PCR 检出下限分别为 1.2×10^2 、 1.2×10^3 CFU/mL。LAMP 和分离培养法对 70 例食物中毒患者和健康者肛拭子标本检测结果符合率为 100%。结论 LAMP 由于具有快速和无需特殊仪器的优点,可广泛用于肛拭子标本志贺菌和 EIEC 的检测。

关键词:环介导等温扩增; 志贺菌属; 大肠杆菌; 侵袭性质粒抗原 H

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)01-0020-03

Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli*

Zhang Rusheng, Song Keyun, Ou Xinhua, Chen Jingfang, Yao Dong, Su Liang, Sun Biancheng

(Center for Disease Control and Prevention of Changsha, Changsha, Hu'nan 410006, China)

Abstract: **Objective** To develop a loop-mediated isothermal amplification(LAMP) method targeting the invasion plasmid antigen H(ipaH) for the detection of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli(EIEC). **Methods** DNA of four strains of Shigella, one strain of EIEC and twenty strains of other enteric bacterial were amplified under isothermal conditions(65 ℃) within 60 or 30 min, then the results were tested. **Results** Both naked eye and agarose gel electrophoresis could detect positive reaction in Shigella and EIEC, but not in other bacteria. The specificity of LAMP was similar to polymerase chain reaction(PCR), but the sensitivity of LAMP was 10 times higher than that of PCR. The detection limit of LAMP was 1.2×10^2 CFU/mL, whereas that of PCR was 1.2×10^3 CFU/mL. The coincidence rate of LAMP and isolated culture assay to detect 70 rectal swab samples from patients with diarrhea and healthy subjects was 100%. **Conclusion** Due to its rapidity and minimal equipment requirement, LAMP might be a useful and rapid detection method of Shigella and EIEC in rectal swab samples.

Key words: loop-mediated isothermal amplification assay; Shigella; Escherichia coli; ipaH

感染性腹泻主要病原体是志贺菌和肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC),早期确诊对疾病治疗极为重要^[1-2]。目前常用诊断方法为微生物培养,但试验操作繁琐,检测耗时长,不利于快速检测。针对志贺菌和 EIEC 侵袭性质粒抗原 H(ipaH)的聚合酶链反应(PCR)和实时 PCR 虽具有快速、敏感、特异的特点,但对仪器、设备的要求较高,尚难以普及应用^[2-4]。环介导等温扩增(LAMP)利用具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶,可在恒温条件下进行特异、敏感和高效的核酸扩增和定量分析,已用于多种病原体检测^[5-11]。本研究建立了针对志贺菌和 EIEC 的 ipaH 基因 LAMP 检测方法,并对该方法进行了应用和评价。

1 材料与方法

1.1 标准菌株与临床标本 4 种志贺菌、1 株 EIEC 和 20 种其他肠道细菌标准菌株由本实验室保存。除霍乱弧菌在 HKM 缓冲液中增菌外,其余菌株均在 BPW 缓冲液中 37 ℃培养 12 h。福氏志贺菌(CMCC-51572)在 BPW 缓冲液中 37 ℃培养 12 h 后,利用 PBS 配制 10 倍系列稀释至浓度为 $1.2 \times 10^1 \sim 1.2 \times 10^7$ CFU/mL 的菌液,用于 LAMP 和 PCR 敏感性检测;取各稀释度菌液 0.1 mL 平行涂布于 BPW 平板上,37 ℃孵育 18 h 后计数菌落数,确定每个稀释度的菌落总

数^[12]。70 例肛拭子标本(10 例来自食物中毒患者、60 例来自健康者)用于 LAMP 特异性检测,同时经 HKM 增菌培养后进行凝集试验,以凝集试验作为金标准评价 LAMP 检测性能^[13]。

1.2 DNA 提取 利用 DNA 提取试剂盒提取增菌液和肛拭子标本 DNA, DNA 利用 30 μL 洗脱液进行稀释并保存于一 80 ℃备用。每个稀释浓度的福氏志贺菌采取同样的方法提取 DNA 后进行 LAMP 和 PCR 方法检测。

1.3 引物设计 利用 Primer Explorer V4 软件设计 4 条针对 ipaH 基因(GenBank 登录号:M32063)的 LAMP 引物,包括内引物 FIP、BIP 和外引物 F3、B3。

1.4 LAMP 反应 25 μL 反应体系包括模板 DNA 1.0 μL, FIP、BIP(40 μmol/L)各 1.0 μL, F3、B3(10 μmol/L)各 0.5 μL, 10×Bst DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μL, dNTP 混合液(各 10 mmol/L)3.5 μL, 三甲胺乙内酯(5 mol/L)5.0 μL, MgSO₄ (250 mmol/L)0.6 μL, Bst DNA 聚合酶(8 U/μL)1.0 μL, ddH₂O 8.4 μL, 轻弹混匀,恒温水箱内 65 ℃孵育 60 min 后 80 ℃孵育 2 min,结束 LAMP 反应^[5]。采用含核酸染料的 3% 琼脂糖凝胶,电压 70 V 条件下电泳 60~100 min 后于凝胶成像系统中

* 基金项目:长沙市科技计划资助项目(K0902167-31)。 作者简介:张如胜,男,主管检验技师,主要从事新发传染病分子检测研究。

成像观察,显示 LAMP 特征性梯状条带判为阳性,无任何条带判为阴性。

1.5 PCR 反应 以 F3、B3 作为 PCR 反应上、下游引物,25 μ L 反应体系包括模板 DNA 2.0 μ L,F3、B3(20 μ mol/L)各 0.5 μ L,10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L,dNTP 混合液(各 2.5 mmol/L)2.0 μ L,Taq plus 酶(5 U/ μ L)0.5 μ L,ddH₂O 17.0 μ L,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s 循环 35 次,72 $^{\circ}$ C 6 min。采用含核酸染料的 2% 琼脂糖凝胶,电压 90 V 条件下电泳 30 min 后于凝胶成像系统中成像观察,PCR 扩增目的产物片段为 203 bp。

表 1 LAMP 引物序列

引物	序列(5'→3')	基因位点(bp)
F3(F3)	TACCGTCTCTGCACGCA	1096~1112
B3(B3C)	CGAAAAGGCCTTCTGATGC	1280~1298
F1P(F1C、F2)	GCGAAAGACTGCTGTCTGAAGCTTTCCGTGAACAGGTCGCT	F1C;1173~1194/F2;1124~1141
B1P(B2C、B1)	TGCCACTGAGAGCTGTGAGGACTGATGGACCAGGAGGGTT	B2C;1261~1278/B1;1207~1228

2.2 LAMP 特异性分析 4 株志贺菌和 1 株 EIEC 在 LAMP 和 PCR 反应中均为阳性,20 种其他细菌为阴性(见表 2)。LAMP 阳性反应可见特征性梯状条带,阴性反应未见任何条带(见图 2A);反应液中加入 SYBR Green I 后,绿色为阳性,棕色为阴性(见图 2B)。图 2 见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”。

表 2 PCR 和 LAMP 扩增结果

菌株	PCR	LAMP
福氏志贺菌(CMCC-51572)	+	+
痢疾志贺菌(CMCC-51252)	+	+
鲍氏志贺菌(ATCC-9207)	+	+
宋内志贺菌(ATCC-25931)	+	+
肠侵袭性大肠埃希菌(CMCC-44825-3)	+	+
肠致病性大肠埃希菌(CMCC-44155-10)	—	—
产志贺毒素大肠埃希菌(CMCC-44824-3)	—	—
肠出血性大肠埃希菌(CMCC-44050-3)	—	—
大肠埃希菌(ATCC-25922)	—	—
霍乱弧菌(569B)	—	—
霍乱弧菌(M045)	—	—
副溶血弧菌(VPL4-90)	—	—
溶藻弧菌(ATCC-17749)	—	—
单核细胞增生李斯特菌(CMCC-54002)	—	—
无害李斯特菌(ATCC-33090)	—	—
普通变形杆菌(CMCC-49027)	—	—
奇异变形杆菌(CMCC-49005)	—	—
金黄色葡萄球菌(CMCC-26003-25)	—	—
金黄色葡萄球菌 SEA(ATCC-13565)	—	—
金黄色葡萄球菌 SEB(ATCC-14458)	—	—
金黄色葡萄球菌 SEC(ATCC-19095)	—	—

1.6 LAMP 产物分析 利用 Taq I 对 ipaH LAMP 扩增产物 65 $^{\circ}$ C 条件下酶切过夜,酶切产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳分析,酶切片段理论大小为 150、121、61 bp。对 LAMP 产物进行 TA 克隆测序,测序引物为靶基因(F2~B2)区段引物,F2 序列为 5'-TTC CGT GAA CAG GTC GCT-3',B2 为 5'-TGA TGG ACC AGG AGG GTT-3'。

2 结 果

2.1 引物设计 4 条 LAMP 引物序列见表 1,引物序列在目的基因中的位置见图 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

续表 2 PCR 和 LAMP 扩增结果

菌株	PCR	LAMP
金黄色葡萄球菌 SEE(ATCC-27664)	—	—
肠炎沙门菌(ATCC-13076)	—	—
鼠伤寒沙门菌(CMCC-50115)	—	—
伤寒沙门菌(CMCC-50071)	—	—

2.3 LAMP 产物分析 LAMP 扩增产物经 Taq I 酶切获得与预期大小一致的片段,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。ipaH 基因 LAMP 产物 TA 克隆测序结果为: TGA TGG ACC AGG AGG GTT TTC CGG AGA TTG TTC CAT GTG AGC GCG ACA CGG TCC TCA CAG CTC TCA GTG GCA TCA GCA GCA CAG CGA AAG ACT GCT GTC GAA GCT CCG CAG AGG CAC TGA GTT TTT CCA GCC ATG CAG CGA CCT GTT CAC GGA A(5'-B2-B1-F1C-F2C-3')。

2.4 LAMP 反应敏感性分析 LAMP 反应 60 min 时检测下限为 1.2 $\times$ 10² CFU/mL(见图 4A),PCR 反应敏感性为 1.2 $\times$ 10³ CFU/mL(图 4 见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.5 LAMP 反应时间分析 1.2 $\times$ 10⁷ CFU/mL 福氏志贺菌菌液不同 LAMP 反应时间产物电泳图见图 5(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。LAMP 反应 30~60 min 产物电泳和肉眼观察均为阳性结果,反应 10~25 min 产物电泳和肉眼观察均为阴性。

2.6 LAMP 应用评价 利用 LAMP 和分离培养法对 70 例肛拭子标本进行检测,结果显示 10 例食物中毒患者肛拭子标本中有 6 例检测为阳性,培养法证实为痢疾志贺菌,另外 4 例食物中毒患者和 60 例健康者肛拭子标本均为阴性,LAMP 和分离培养法符合率为 100%。

3 讨 论

引物设计是 LAMP 技术的关键,质量较差的引物易导致 4 条引物之间相互聚合,形成最小片段小于 100 bp 的 LAMP

非特异性梯状条带^[15]。本研究针对 ipaH 基因设计引物^[16], 建立的 LAMP 方法可准确扩增出志贺菌和 EIEC, 电泳结果显示为特征性梯状条带, 其中 156 bp 的最小片段通过测序得到证实(图 2)。针对靶基因的 6 个位点设计 4 条引物使 LAMP 具有非常高的特异性^[5]。已有较多将 LAMP 应用于感染性病原体诊断的报道^[7,15-19]。本研究中, LAMP 电泳结果显示 4 种志贺氏菌和 1 株 EIEC 可扩增出特征性梯状条带, 而其他对照菌株未见特征性梯状条带, 证实 LAMP 能够高度特异地扩增出志贺菌和 EIEC 所携带的 ipaH 基因。

有研究表明 LAMP 敏感性强于 PCR 或实时 PCR^[3,12]。本研究亦显示 LAMP 比 PCR 敏感 10 倍, 且所建立 LAMP 检测志贺菌和 EIEC ipaH 基因灵敏度达 1.2×10^2 CFU/mL^[16], 较既往研究报道的 4×10^3 CFU/mL 更为敏感, 可能与 DNA 提取方法有关。本研究使用商品化试剂盒提取标本 DNA, 而既往研究使用的是简易的煮沸法^[16]。因此, 本研究建立的高敏感性 LAMP 更适用于腹泻的诊断。LAMP 最显著的特征是产生大量的 DNA 片段, 伴随产生肉眼可见的焦磷酸镁白色副产物^[7]。尽管肉眼观察较为简单, 但白色副产物量太少不利于肉眼观察判断结果。因此, 本研究在 LAMP 反应体系中加入 SYBR Green I 荧光染料以便于肉眼判断, 结果显示反应 30~60 min 即可进行电泳和肉眼判断。因此, LAMP 检测结果易于判断, 具有广泛推广应用的基础。本研究采用 LAMP 和分离培养法检测 70 例肛拭子标本, 结果显示两种方法符合率为 100%, 且前者检测耗时短, 可在 24 h 内报告结果, 而后者需要 48~72 h。

总之, 相比 PCR 和分离培养法, 本研究建立的 LAMP 检测方法无需特殊仪器设备, 能够特异、敏感、简单和快速检测 ipaH 基因, 可广泛用于志贺菌和 EIEC 核酸检测。

参考文献

- [1] Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies[J]. Bull World Health Organ, 1999, 77(8): 651-666.
- [2] Thiem VD, Sethabutr O, von Seidlein L, et al. Detection of shigella by a PCR assay targeting the ipaH gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 2031-2035.
- [3] Hough HS, Sethabutr O, Echeverria P. A simple polymerase chain reaction technique to detect and differentiate Shigella and enteroinvasive Escherichia coli in human feces[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 1997, 28(1): 19-25.
- [4] Sethabutr O, Venkatesan M, Yam S, et al. Detection of PCR products of the ipaH gene from Shigella and enteroinvasive Escherichia coli by enzyme linked immunosorbent assay[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2000, 37(1): 11-16.
- [5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucl Acid Res, 2000, 28(3): e63.
- [6] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. J Biochem Biophys Methods, 2004, 59(2): 145-157.
- [7] Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex, M. avium, and M. intracellulare in sputum samples[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(6): 2616-2622.
- [8] Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, et al. Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3): 1348-1352.
- [9] Parida M, Posadas G, Inoue S, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(1): 257-263.
- [10] Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification(RT-LAMP)[J]. J Virol Methods, 2008, 151(2): 264-270.
- [11] Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y, et al. Rapid diagnosis of human herpes virus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(1): 140-145.
- [12] Hara-Kudo Y, Nemoto J, Ohtsuka K, et al. Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing Escherichia coli using loop-mediated isothermal amplification[J]. J Med Microbiol, 2007, 56(3): 398-406.
- [13] Ministry of Health of the People's Republic of China. WS287-2008 Diagnostic criteria for bacillary and amoebic dysentery[M]. 1st ed. Beijing, China: People's Medical Publishing House, 2009: 4-6.
- [14] Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ. Use of Shigella flexneri ipaC and ipaH gene sequences for the general identification of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli[J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(12): 2687-2691.
- [15] 欧新华, 张如胜, 宋克云, 等. 逆转录-环介导等温扩增方法检测甲型 H1N1 流感病毒[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(5): 443-445.
- [16] 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[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 243(1): 259-263.
- [17] Horisaka T, Fujita K, Iwata T, et al. Sensitive and specific detection of Yersinia pseudotuberculosis by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(11): 5349-5352.
- [18] Seki M, Yamashita Y, Toriogoe H, et al. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the lytA gene for detection of Streptococcus pneumoniae[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4): 1581-1586.
- [19] 杨秋林, 张如胜, 伍和平, 等. 应用环介导等温扩增技术检测卡氏肺孢子 DNA[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28(6): 565-567.

(收稿日期: 2012-10-08)