

快速检测大肠埃希菌 LAMP 方法的建立^{*}

任春阳,田甜,田杰[△]

(沈阳市第四人民医院检验科, 辽宁沈阳 110031)

摘要:目的 建立一种环介导等温扩增(LAMP)反应快速检测大肠埃希菌的方法。方法 根据美国国立卫生研究院基因序列数据库(Genbank)上大肠埃希菌的 lacZ(登录号:M74750)基因序列,设计 4 条特异引物(2 条内引物,2 条外引物),对 lacZ 基因进行扩增,对扩增反应进行优化,采用琼脂糖电泳及肉眼观察结果。结果 将提取的 13 株细菌 DNA 进行 LAMP 反应,仅大肠埃希菌得到阳性结果,LAMP 检测下限为 15 cfu/mL。结论 LAMP 检测大肠埃希菌是快速、低成本、特异性强、灵敏度高的方法,适合临床开展。

关键词:大肠埃希菌; 环介导等温扩增; 快速检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.19.042

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)19-2668-02

Development of loop mediated isothermal amplification for rapid detection of *Escherichia coli* *Ren Chunyang, Tian Tian, Tian Jie[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Fourth People's Hospital of Shenyang City, Shenyang, Liaoning 110031, China)

Abstract; Objective To apply a one-step loop-mediated isothermal amplification(LAMP) assay for rapid detection of *Escherichia coli*. **Methods** According to the Genbank of *Escherichia coli* lacZ(accession number:M74750), a set of four specific primers were designed for the *Escherichia coli* LAMP assay and optimized the reaction. The results were judged with naked eyes and electrophoretic analysis. **Results** Genomic DNAs from 13 bacterial strains including *Escherichia coli* strains were amplified using LAMP, and no amplicon was observed in the other bacterial strains. The detection limits of LAMP assay was 15 cfu/mL. **Conclusion** LAMP assay is extremely rapid, cost-effective, specific and highly sensitive and has potential usefulness for clinical application.

Key words: *Escherichia coli*; loop-mediated isothermal amplification; rapid detection

大肠埃希菌为革兰阴性杆菌,是医院内常见的致病菌之一,可引起各种肠道外感染,如尿路感染、血液感染等^[1-2]。目前,大肠埃希菌的检测仍以传统的培养方法(如分离培养、生化鉴定等)为主,但传统的培养方法操作繁琐、费时费力,不能快速为临床提供可靠的结果。PCR法检测大肠埃希菌具有特异性强、灵敏度高等特点,但检测成本较高,需要专门规划设计的实验室以及昂贵的仪器。因此,发展新的快速准确、操作简便、经济实用的方法检测和鉴定大肠埃希菌一直是研究的热点。2000年,Notomi等^[3]首先提出了一种新的核酸扩增技术,即环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法,LAMP检测方法的整个反应依赖4条特异性引物和一种具有链置换活性的DNA聚合酶(Bst DNA聚合酶),在等温条件下可高效、快速、高特异性地扩增靶序列,可直接通过副产物焦磷酸镁沉淀的浊度判断是否发生反应。该技术解决了核酸诊断上出现的诸多难题,使其作为快速诊断成为可能。目前,LAMP检测方法已经广泛应用于对病毒、细菌、真菌、支原体、寄生虫,以及环境、食品中细菌等病原体的检测研究,甚至在肿瘤的研究中,均取得了可喜的成就。本文首次针对大肠埃希菌 lacZ 基因设计特异性引物,建立并优化了大肠埃希菌的 LAMP 检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料 大肠埃希菌标准菌株 ATCC 25922、铜绿假单胞菌标准菌株 ATCC 27853、金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC 25923 购自卫生部临床检验中心,其他菌株均为沈阳市第四人民医院微生物室临床鉴定菌株。Bst DNA 聚合酶购自 New

England Biolabs 公司, 甜菜碱 (betaine) 购自 Sigma 公司, dNTP、硫酸镁购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 引物的设计与合成 根据 Genbank 中大肠埃希菌 *lacZ* 基因序列,使用 Primer Explorer V4 软件设计一套 LAMP 引物,其中 F3/B3 为外引物,FIP/BIP 为内引物,见表 1。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,用蒸馏水溶解后分装, -20 ℃冰箱保存备用。

表 1 LAMP 检测方法所用引物名称及序列

引物名称	引物序列 (5'~3')
F3	CAT GGG GGA TCC CAA GCT
B3	TTG TTA GCA GCC GGA TCA G
BIP	CCT TGC AGC ACA TCC CCC TTT GTT GGG AAG GGC GAT C
FIP	CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC ATA GAG GTA CCG CAT GCG ATA

1.3 细菌基因组 DNA 的提取

采用煮沸法制备 DNA 模板, 细菌经营养琼脂培养基在 37 ℃ 条件下培养 24 h 后, 挑取细菌单个菌落于 100 μL 无菌蒸馏水中, 混匀后于 100 ℃ 水浴 10 min, 冰浴 2 min, 12 000 r/min 离心 10 min。上清液即为反应模板, -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.4 LAMP 检测方法的建立及优化 配制 25 μL 反应体系, 包括硫酸镁、甜菜碱、dNTPs、内引物、外引物、Bst DNA 聚合

* 基金项目:沈阳市科技局基金项目(F12-193-43)。 作者简介:任春阳,男,主管检验师,主要从事临床细菌学的研究工作。 △ 通讯作者,E-mail:tianjie_4v@163.com。

酶、Bst 缓冲液(10×),以及适量的 DNA 模板,最终补蒸馏水至 25 μ L,混匀,置水浴锅中恒温反应一段时间后,通过肉眼观察反应体系的浊度变化进行判断。本研究通过选择不同浓度的硫酸镁、甜菜碱、dNTPs、引物(包括内引物和外引物)进行 LAMP 检测方法优化,先对其中一个因素设置不同梯度,而其他因素为固定值,反应结束后,产物于 1.0%琼脂糖凝胶电泳,观察扩增效果,确定最佳反应条件。

1.5 特异性和灵敏度试验 分别提取大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌标准菌株,以及临床分离菌株基因组 DNA,进行 LAMP 反应,观察本试验的特异性。用过夜培养的大肠埃希菌标准菌 ATCC 25922 配制成 0.5 麦氏浊度细菌悬液,用无菌生理盐水进行 10 倍倍比稀释,然后取各稀释度菌液 1 mL,使用煮沸法提取 DNA,取 2 μ L 上清液作为模板进行检测,观察灵敏度。

2 结果

2.1 大肠埃希菌 lacZ 基因 LAMP 检测方法的建立 以本研究设计的一组特异性引物对大肠埃希菌 lacZ 基因 DNA 进行 LAMP 反应,并以无菌蒸馏水作为阴性对照,将扩增产物进行琼脂糖电泳,大肠埃希菌出现 LAMP 反应特征性阶梯形条带,而阴性对照组未出现特征性条带,与预期结果相符。扩增产物加入 SYBR Green I 荧光染料,肉眼可见明显的颜色变化,阴性管呈绿色,阴性对照管则保持橙黄色不变。

2.2 LAMP 检测方法条件优化结果 经过多次试验,对不同浓度梯度的硫酸镁、甜菜碱、dNTPs 进行优化,电泳观察效果,确定最佳反应条件,建立的扩增反应体系如下:Bst DNA 聚合酶(8 U)1 μ L、Bst 缓冲液(10×)2.5 μ L、dNTPs(10 mmol/L)1 μ L、甜菜碱(5 mol/L)5 μ L、硫酸镁(100 nmol/L)1.5 μ L、F3 与 B3(引物浓度为 20 μ mol/L)各 0.25 μ L、BIP 与 FIP(引物浓度为 20 μ mol/L)各 2.0 μ L、DNA 模板 2.0 μ L、蒸馏水 7.5 μ L。混匀后,65 $^{\circ}$ C 等温扩增 45 min。不同 dNTPs 浓度对 LAMP 反应的影响见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 特异性检测结果 本研究对 13 株细菌的 DNA 进行 LAMP 反应,只有 6 株大肠埃希菌为阳性结果(肉眼观察反应管,可见白色沉淀,加入 SYBR Green I 染料呈绿色,琼脂糖凝胶电泳呈现特征性阶梯形条带),其他细菌为阴性结果,可见 LAMP 反应检测的特异性强。结果见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.4 灵敏度检测结果 将 10 倍倍比稀释的大肠埃希菌基因组 DNA 为模板,进行 LAMP 反应,加入 SYBR Green I 后,观察结果,随后进行电泳,结果呈绿色的反应产物电泳时均出现特异性的阶梯形条带,说明出现 LAMP 反应,其颜色变化情况与电泳结果一致,可以判定本方法的检测下限为 15 cfu/mL。

3 讨论

大肠埃希菌是人体肠道中的正常寄生菌,但也是临床各部位感染的重要致病菌。传统上,对大肠埃希菌的诊断主要依靠平板培养分离鉴定法,但该方法检测周期长达 3 d,费时、费力,不利于临床的快速诊断,所以寻找更快速、更简易、更准确的检测方法是临床工作的发展方向。

LAMP 检测方法是一种在等温条件下高特异性、高灵敏度、快速扩增靶序列 DNA 的技术,无需昂贵的仪器设备,在可控温水浴箱中 1 h 内就可以完成全部反应,使对大肠埃希菌的快速诊断成为可能。

本研究针对大肠埃希菌的 lacZ 基因设计了 4 条引物,保证了 LAMP 反应的特异性,并成功检测出大肠埃希菌,而其他细菌的基因不能扩增出来,表明该引物有很高的特异性。通过

优化硫酸镁、甜菜碱、dNTPs 及引物浓度,建立了 LAMP 检测方法,整个体系的最优反应过程是在恒温 65 $^{\circ}$ C 条件下孵育 45 min,可直接判定结果。

LAMP 检测方法的灵敏度非常高,甚至高于荧光定量 PCR^[3-5]。本研究所建立的用于检测大肠埃希菌的 LAMP 反应检测下限为 15 cfu/mL,所以该方法方便快捷,适合临床检测大肠埃希菌。

LAMP 检测方法扩增效率高、反应时间短,但易发生气溶胶污染,造成假阳性等问题,也成为阻碍该技术应用的瓶颈^[6-15]。因此,许多学者在这方面也尝试了很多努力。比如 Tao 等^[16]在反应体系中加入不耐高温且含荧光染料的微晶石蜡,反应结束后升温使其融化释放荧光染料,判读结果,从而避免开盖,减少污染的发生。

LAMP 检测方法不需要特殊的试剂和仪器设备,而且随着近年来各国研究者对该技术的不断完善与改进,有理由相信 LAMP 检测方法一定会有更广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Johnson JR. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection[J]. Infect Dis Clin North Am, 2003, 17(2):261-278.
- [2] 胡慧,段志刚,崔保安. 动物源大肠埃希菌 O157:H7 多重 PCR 检测方法的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2011, 39(3):34-39.
- [3] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):E63.
- [4] 叶文,杨柳青,张如胜,等. 沙门菌属 LAMP 检测方法在食品卫生检验中的应用评价[J]. 中华疾病控制杂志, 2011, 15(9):785-787.
- [5] Uemura N, Makimura K, Onozaki M, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing pneumocystis pneumonia[J]. J Med Microbiol, 2008, 57(1):50-57.
- [6] 李霞,张宏伟,郑文杰,等. 耐甲氧西林葡萄球菌 mecA 基因的 LAMP 检测方法研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(8):68-71.
- [7] 赵明秋,王伟芳,王波,等. 猪瘟病毒可视化 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 广东畜牧兽医科技, 2011, 36(2):26-28.
- [8] 王翔,张骞,张钊,等. 甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因 RT-LAMP 检测方法的建立与初步应用[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(5):696-699.
- [9] 王翔,许信刚,张骞,等. 人博卡病毒 LAMP 检测方法的建立及初步应用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2010, 24(4):308-310.
- [10] 范晴,谢芝勋,刘加波,等. 牛病毒性腹泻病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(2):248-251.
- [11] 徐芊,孙晓红,赵勇,等. 副溶血弧菌 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(12):66-72.
- [12] 杨承,项天河. LAMP 检测方法在尿液中检测大肠埃希菌的应用评价[J]. 右江民族医学院学报, 2011, 33(5):623-624.
- [13] 吴绍强,孙晓智,林祥梅,等. 亚洲 I 型口蹄疫病毒环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立[J]. 检验检疫科学, 2008, 18(1):9-12.
- [14] 朱海,吕敬章,范放,等. E. coli O157:H7 LAMP 检测方法的建立[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(2):98-101.
- [15] 史亚东,董海聚,王荣军,等. 微小隐孢子虫 LAMP 检测方法的探索[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(12):1195-1201.
- [16] Tao ZY, Zhou HY, Xia H, et al. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of Plasmodium vivax infection[J]. Parasit Vectors, 2011, 4(4):115-119.