

• 论 著 •

荧光环介导恒温扩增技术检测嗜肺军团菌方法的建立^{*}

李辉腾¹, 郭旭光², 陈瑞娟¹, 柯茂彬¹

(1. 广东同江医院检验科, 广东顺德 528300; 2. 广州医科大学附属第三医院检验科, 广东广州 510150)

摘要:目的 探讨利用环介导恒温扩增技术(LAMP)建立可以准确快速检测嗜肺军团菌的方法。方法 选取嗜肺军团菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞杆菌、大肠埃希氏菌、阪崎肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、副溶血性弧菌菌株, 根据嗜肺军团菌毒力 mip 基因的 6 个特殊区域, 使用 Primer Explorer Version 4 软件设计 LAMP 引物(mip-1, mip-2, mip-3), 提取病原菌基因组 DNA 进行 LAMP, 评价其特异性、最低检测限和稳定性。结果 筛选出 mip-3 引物在测定嗜肺军团菌的 LAMP 反应体系中扩增约 10 min 出峰且峰值较高; 非嗜肺军团菌菌株没有扩增反应; LAMP 检测限可达 100 fg/μL; mip-3 引物在 10 次重复检测中几乎同时出峰, 稳定性良好。结论 建立的 LAMP 检测方法具有特异性强、稳定性高特点, 能快速、准确检测出嗜肺军团菌, 具有较大的推广及应用前景。

关键词:嗜肺军团菌; 荧光环介导恒温扩增; 快速检测方法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.023

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2017)22-3136-03

Establishment of method to detect legionella pneumophila by LAMP technology^{*}

LI Huiteng¹, GUO Xuguang², CHEN Ruijuan¹, KE Maobin¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Tongjiang Hospital, Shunde, Guangdong 528300, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510150, China)

Abstract: Objective To establish a accurate and rapid method of loop-mediated isothermal amplification(LAMP) for detecting Legionella Pneumophila(LP). **Methods** The strains of LP, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Enterobacter sakazakii, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, shigella flexneri and Vibrio parahaemolyticus were selected. According to six special domains of toxicity-related mip gene on LP, the LAMP primers(mip-1, mip-2, mip-3) were designed by using the Primer Explorer Version 4. 0. The genomic DNA was extracted for conducting LAMP. Then its specificity, lowest detectable limit and stability were evaluated. **Results** The screened primer mip-3 appeared the peak after amplification for about 10 min in the LAMP reaction system for detecting LP, moreover the peak value was higher; while the strains of non-LP had no amplification reaction; the LAMP detection limit could reach 100 fg/μL. The primer mip-3 appeared the peak almost at the same time in 20 times of duplicated detection, and its stability was good. **Conclusion** The established LAMP detection method has the advantages of strong specificity and high stability, can rapidly and accurately detect LP and has large prospect of promotion and application.

Key words: legionella pneumophila; loop-mediated isothermal amplification; rapid detection method

嗜肺军团菌是引起军团病的病原菌, 是一种常见的呼吸道致病菌。不同个体感染嗜肺军团菌后表现出的临床症状轻重不一, 该菌可引起以肺部为主的全身性感染, 也可并发重症肺炎^[1]。目前, 针对嗜肺军团菌的检测方法主要是传统培养法和分子生物学检测法。传统培养法操作繁琐, 培养周期长(需要 7~10 d)^[2]; 分子生物学检测法主要是提取 DNA 后进行聚合酶链式反应(PCR)凝胶电泳分析, 或对标中提取的 DNA 直接采用 PCR 法进行检测。这些常见的检测细菌的分子生物学方法比较成熟, 但其对操作人员和实验室有一定的要求, 难以在基层普及和推广^[3]。环介导恒温扩增技术(LAMP)具有特异性强、灵敏度高、检测成本低和操作步骤简单的特点, 已经被广泛应用于细菌、真菌、病毒、寄生虫等多种病原体的快速检测^[4]。本研究采用实时荧光 PCR 仪开发一种实时荧光 LAMP 技术对嗜肺军团菌的特异基因片段进行扩增, 以期建立一种嗜肺军团菌的快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 嗜肺军团菌菌株获赠于广州市微生物研究

所, 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞杆菌、大肠埃希氏菌、阪崎肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌由广州医科大学附属第三医院微生物实验室分离和鉴定, 鼠伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、副溶血性弧菌菌株购自广州双螺旋基因技术公司。

1.2 仪器与试剂 ZYD-S1 恒温实时荧光 PCR 检测仪、细菌基因组核酸提取试剂盒购自广州双螺旋基因技术有限公司, VITEK2 Compact 全自动细菌鉴定仪购自法国梅里埃公司。Bst DNA 聚合酶、10×Thermopol 缓冲液购自美国 NEB 公司, 脱氧核糖核苷三磷酸购自大连宝生物工程公司, 甜菜碱、密封液购自美国 sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 靶基因的选取与引物设计合成方法 选取巨噬细胞感染增强因子(mip)基因为嗜肺军团菌的特异基因, 在 NCBI 网站中查找所挑选的基因序列, 并对查到的各基因序列进行比对。采用 LAMP 引物设计软件 Primer Explorer Version 4 设计 3 套引物, 由上海生工生物工程有限公司合成。见表 1~3。

1.3.2 LAMP 引物的筛选及反应体系优化方法 将合成的 3

* 基金项目: 佛山市医学类科技攻关项目(2015AB002593)。

作者简介: 李辉腾, 女, 副主任技师, 主要从事临床检验研究。

套引物均按 $40 \mu\text{m}$ (内引物): $5 \mu\text{m}$ (外引物): $20 \mu\text{m}$ (环引物)的比例配制成引物混合液,然后取 $1 \mu\text{L}$ 混合液进行恒温扩增反应。 $25 \mu\text{L}$ 反应体系为:引物 PM $1 \mu\text{L}$, $2 \times$ 反应液 $12.5 \mu\text{L}$,Bst 聚合酶 8 U ,SYTO9 $0.5 \mu\text{L}$,待检标本 $2 \mu\text{L}$,超纯水补足至 $25 \mu\text{L}$ 。采用嗜肺军团菌 DNA(10^7 copies/mL)作为阳性对照,

非嗜肺军团菌 DNA(10^7 copies/mL)作为阴性对照,以阴性符合率作为初步的筛选依据。反应过程在恒温荧光检测仪中进行(63°C 、 45 min)。反应结束后,选择出峰较早、扩增效率较高且无特异扩增的引物作为最佳引物进行后续试验。

表 1 嗜肺军团菌 mip-1 引物

名称	序列(3'~5')	长度(bp)
F3	GCG TTG TTG TAT TGC CAA G	19
B3	CCA TAT GCA AGA CCT GAG G	19
FIP(F1c+F2)	CGG TAC CAT CAA TCA GAC GAC CAT GGT GTT AAA CCC GGA AA A	42
BIP(B1c+B2)	GCA ACG TTC CAG GTT TCA CAA GTT TCC CAA GTT GAT CCA GC	41
LoopF	ATT CGA CAG TGA CTG TAT CCG	21
LoopB	CCC TGG ATG GAC AGA AGC	18

表 2 嗜肺军团菌 mip-2 引物

名称	序列(3'~5')	长度(bp)
F3	GAA GAT GAA ATT GGT GAC TGC	21
B3	ACG TCT TTC ATT TGC TGT TC	20
FIP(F1c+F2)	TCG GCA CCA ATG CTA TAA GAC AAT GTC AAC AGC AAT GGC T	40
BIP(B1c+B2)	TGT TAA TCC GGA AGC AAT GGC TGG TTA AAG CCA ATT GAG CG	41
LoopF	CTA ATG ATG TGG CAT CGG TTG	21
LoopB	TGC AAG ACG CTA TGA GTG G	19

表 3 嗜肺军团菌 mip-3 引物

名称	序列(3'~5')	长度(bp)
F3	GTT GTT GTA TTG CCA AGT GG	20
B3	TTT CAT TTG GGC CAA TAG GT	20
FIP(F1c+F2)	ACG TTG CTG GCT TAC CAG TTA GTC ACT GTC GAA TAT ACT GGT	42
BIP(B1c+B2)	TGG ATG GAC AGA AGC TTT GCA CCA TAT GCA AGA CCT GAG G	40
LoopF	ACG GTA CCA TCA ATC AGA CG	20
LoopB	AGC TGG ATC AAC TTG GGA AAT	21

1.3.3 特异性试验方法 分别提取嗜肺军团及其他常见病原菌(金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、阪崎肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、福氏志贺氏菌、大肠埃希氏菌、副溶血性弧菌和铜绿假单胞杆菌)的基因组 DNA,按照设计的反应条件进行扩增,对数据进行分析,评价引物的特异性。

1.3.4 敏感性试验方法 测量提取的基因组 DNA 浓度,将浓度为 $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的嗜肺军团菌基因组 DNA 进行 10 倍梯度稀释(100 、 10 、 $1 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 和 $100 \text{ fg}/\mu\text{L}$)后作为模板,加入 LAMP 反应体系中反应,观察其扩增曲线,最后确认引物最低检测限。

1.3.5 重复性试验方法 用最佳引物检测浓度为 $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的嗜肺军团菌基因组 DNA,重复检测 10 次,并与浓度为 $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的嗜肺军团菌基因组 DNA 的检测结果进行比对。

2 结 果

2.1 引物设计结果 LAMP 引物包括特异结合靶序列上的 6 个特异区域的 2 个外引物和 2 个内引物。内引物 FIP 包含 F1c(与 F1 区域互补)和 F2 序列,内引物 BIP 包含 B1c(与 B1 区域互补)和 B2 序列,外引物为 F3 和 B3 序列。本研究在外引物的基础上引入环引物,缩短了反应时间,提高了灵敏度。见图 1。

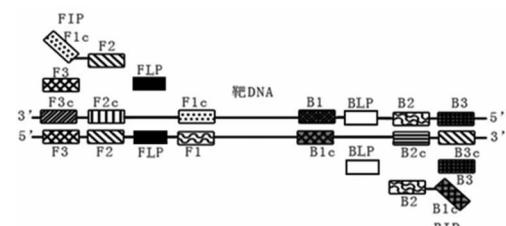


图 1 LAMP 引物的组成及对应区域

2.2 引物筛选结果 3 套引物阴性对照均没有出现扩增,mip-1 引物在 40 min 内没有出峰,mip-2 和 mip-3 引物在反应开始后 $10 \sim 15 \text{ min}$ 出峰。mip-3 比 mip-2 出峰时间早,约在反应开始后 10 min 出峰,且峰值较高,因此选出 mip-3 为最佳引物。

2.3 特异性试验结果 金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、阪崎肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、福氏志贺氏菌、大肠埃希氏菌、副溶血性弧菌和铜绿假单胞杆菌等其他病原菌均未出现扩增现象,只有嗜肺军团菌发生特异性扩增。

2.4 敏感性试验 试验结果显示浓度为 $100 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 的嗜肺军团菌基因组 DNA 在反应 33 min 左右出峰,反应结束后有“S”

型扩增曲线,此浓度为 mip-3 最低检测限。

2.5 重复性试验结果 mip-3 引物在 10 次重复检测中几乎同时出峰,多条扩增曲线重叠,可见稳定性良好。

3 讨 论

嗜肺军团菌属于胞内寄生菌,培养鉴定周期长,对大多数抗菌药物耐药,人群普遍易感染,是医院感染的重要病原菌之一,其临床表现可为轻重不等的感染症状。因此探讨快速检测嗜肺军团菌对临床诊断和治疗具有重要意义。近年来 LAMP 技术被广泛地运用于分子诊断技术领域中,其特点是:设备简单、特异性强、灵敏度高、操作简便、反应快等^[5]。目前国内学者研究的 LAMP 检测方法主要有肉眼观察法和添加荧光染料法。肉眼观察法主要通过肉眼观察反应浊度的变化,但存在弱阳性结果难以判断的缺点;而添加荧光染料法的主要缺点是反应结束后开盖会导致产物的气溶胶污染^[7]。

本研究基于 LAMP 的基本原理,利用 Bst DNA 聚合酶和针对靶序列设计的两对特殊的内、外引物,特异性识别靶序列上的 6 个独立区域,启动循环链置换反应。在恒温实时荧光反应中,内引物杂交在目标 DNA 区,启动互补链合成,再通过外引物在同一链上互补序列。这样周而复始形成有很多环的花椰菜结构的茎-环 DNA 混合物,从而实现对目的基因快速检测^[7]。本研究建立的 LAMP 方法的主要优点是:(1)本研究根据嗜肺军团菌 mip 毒力基因靶序列上的 6 个独立区域设计设计了 6 条引物,能特异性识别嗜肺军团菌 mip 基因,加入环引物缩短反应时间^[8],在 63 °C 的 LAMP 反应体系中恒温反应 10 min 左右便可以出峰,与传统 PCR 方法相比反应时间大大缩短;(2)特异性引物能找出标本中相对应的基因序列进行识别扩增,且在反应结束时可根据有或无“S”型扩增曲线则判定为阳性或阴性,试验具有高度的特异性和较强的直观性;(3)试验选取的嗜肺军团菌和 8 种其他病原菌的 DNA 在 LAMP 体系中同步扩增,仅有嗜肺军团菌出现阳性结果,试验具有良好的特异性;(4)LAMP 检测限可达 100 fg/μL,试验具有较高灵敏性;(5)稳定性试验中 10 条反应曲线几乎同时出峰且反应曲线重叠,试验具有良好的稳定性;(6)加入新型荧光染料 SYTO-9 进行实时荧光动态监测能直观反映整个扩增过程的动态变化^[9];(7)LAMP 检测方法不需要预先进行双链 DNA 的变性,不需要热循环仪器^[10]。总之,本研究建立的 LAMP 检测方法创新性强,引物设计独特,出峰时间早,反应时间缩短,可直观判断,无需开盖,避免了在扩增后开盖导致的气溶胶污染。本研究不足之处主要是:(1)DNA 提取过程仍需特别注意污染,需在生物安全柜中操作,使用滤芯吸嘴等避免污染;(2)本试验只是定性检测,下一步将设计标准曲线尝试用于定量检测;(3)用于试验的标本量比较少,下一步需要对临床标本进行验证。

(上接第 3135 页)

- a collagen binding adhesin? [J]. J Biol Chem, 2002, 277(45):43017-43023.
- [11] 韩乾国,余汝佳,高燕渝,等.临床分离表皮葡萄球菌生物膜相关遗传背景与表现型关系研究[J].四川医学,2006,27(5):453-455.
- [12] 李燕,李冬冬,陶传敏,等.表皮葡萄球菌生物膜形成及相关基因的检测及评价[J].中华医院感染学杂志,2010,20(4):473-476.
- [13] Rohde H, Kalitzky M, Kroger N, et al. Detection of viru-

综上所述,LAMP 方法具有反应速度快、特异性强、灵敏度高、方便快捷、能够直观地观察试验结果等优点,可为检测嗜肺军团菌提供一种新的快速检测方法,有望成为临床的常规检测方法。

参考文献

- [1] 杨俊发,柴晓宇,许飞. LAMP 技术在肺部非典型感染病原体检测中的应用[J]. 重庆医学,2013,42(18):2122-2124.
- [2] 吕沁风,郑伟,罗鹏,等.嗜肺军团菌环介导等温扩增检测法的建立[J].浙江大学学报(医学版),2010,39(3):305-310.
- [3] 张明哲,陈曦,徐俊锋,等.环介导等温扩增技术在转基因水稻 Bt63 检测中的应用[J].生物技术通报,2014,30(2):69-74.
- [4] 李红梅,江晓,刘助红,等.白斑综合症病毒实时荧光 LAMP 检测方法的建立及应用[J].水生生物学报,2014,39(1):142-148.
- [5] 李琳,周蓉,李冰,等.环介导恒温核酸扩增法在病原微生物快速检测领域的应用[J].现代食品科技,2014,30(6):301-307.
- [6] 刘孝波,蒋栋能,项贵明,等. LAMP 结合示差脉冲伏安法快速检测肺炎克雷伯菌的方法建立及临床应用[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(12):1539-1541.
- [7] 郭旭光,黄美淦,刘庆锋,等.实时荧光环介导恒温扩增技术检测嗜麦芽窄食单胞菌方法的建立[J].广东医学,2016,37(24):3663-3666.
- [8] 刘琳琳,蒋栋能,蒲晓允.利用环介导恒温扩增法快速检测伤寒杆菌[J].国际检验医学杂志,2013,34(5):534-535.
- [9] 徐前明,袁恒青,赵长城,等.岗地弓形虫 529 bp 重复序列环介导等温扩增检测方法的建立[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2016,34(5):444-447.
- [10] 李启明,马学军,高寒春,等.逆转录环介导等温核酸扩增技术(RT-LAMP)在 H5N1 禽流感病毒基因检测中的应用[J].病毒学报,2008,24(3):178-184.
- [11] 戴婷婷,陆晨晨,郑小波.环介导等温扩增技术在病原物检测上的应用研究进展[J].南京农业大学学报,2015,38(5):695-703.

(收稿日期:2017-04-12 修回日期:2017-07-01)

lence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12):5614-5619.

- [14] 徐金莲,孙自庸,简翠,等.临床分离表皮葡萄球菌相关基因与生物膜表型的关系[J].国际检验杂志,2014,35(11):1387-1389.

(收稿日期:2017-03-26 修回日期:2017-07-15)