

实验动物金黄色葡萄球菌 LAMP 检测方法的建立

荣蓉,张丽芳,李雨函,佟巍,刘先菊,王艳蓉,向志光,刘云波

(中国医学科学院医学实验动物研究所 北京协和医学院比较医学中心卫生部实验动物检测中心,北京 100021)

【摘要】 目的 建立一种能够应用于实验动物金黄色葡萄球菌检测及鉴定的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)方法。方法 本研究针对金黄色葡萄球菌特异的 *nuc* 基因设计4条引物,对反应条件进行优化。结果 通过优化,该方法60℃、40 min、 Mg^{2+} 浓度8 mmol/L、dNTP浓度2.0 mmol/L、甜菜碱浓度0.8 mmol/L时,对金黄色葡萄球菌检测限为2 cfu,且与其它常见实验动物致病菌无交叉反应。反应结果可通过添加荧光染料SYBR green I直接肉眼观察。结论 本研究建立的金黄色葡萄球菌 LAMP 方法具有快速、灵敏、操作简单、设备要求低的特点,适用于基层、大批量样本、快速检测的要求。

【关键词】 LAMP; 金黄色葡萄球菌; 检测

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)04-0068-05

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.04.016

Establishment of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique for Detecting *Staphylococcus aureus* in Laboratory Animals

RONG Rong, ZHANG Li-fang, LI Yu-han, TONG Wei, LIU Xian-ju, WANG Yan-rong, XIANG Zhi-guang, LIU Yun-bo
(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Centre, Peking Union Medical College (PUMC); Laboratory Animal Health Monitoring Centre, Ministry of Health, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique for detecting *Staphylococcus aureus* in laboratory animals. **Methods** Four primers were designed and screened specifically to recognize the *nuc* gene of *Staphylococcus aureus*. Optimal reaction conditions were screened. **Results** 2 cfu extracted crude DNA and no cross reaction with other commonly seen pathogenic bacteria was found when the conditions were 60℃ for 40 min at least, Mg^{2+} at a concentration of 8.0 mmol/L, dNTP 2.0 mmol/L and betaine 0.8 mmol/L. The result of reaction can be directly observed with naked eye by adding a fluorescent SYBR green I dye. **Conclusions** This LAMP technique for detecting *Staphylococcus aureus* is sensitive, rapid and simple to perform, and can satisfy the requirements of grassroots lab, mass samples and quick detection.

【Key words】 Loop-mediated isothermal amplification; LAMP; *Staphylococcus aureus*; Detection; Laboratory animals

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)属水中,是人和动物体表、皮、毛、鼻、口腔、消化道的葡萄球菌属(*Staphylococcus*),广泛存在于空气和常见菌,也是一种条件性致病菌。金黄色葡萄球菌

[基金项目]中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(DWS1106)。

[作者简介]荣蓉(1985-),女,硕士研究生,研究方向:实验动物微生物学。

[通讯作者]刘云波(1962-),男,研究员,E-mail: liu-yunbo@126.com。

可引起人和动物皮肤软组织感染、败血症、乳房炎、心内膜炎、肺炎、肠炎、脑膜炎、骨髓炎、筋膜炎、关节炎、中毒性休克综合征等。对于实验大、小鼠,可引起化脓性睾丸炎、前列腺炎、卵巢脓肿、子宫内膜炎等,严重影响鼠群繁育和动物实验结果^[1]。中华人民共和国国家标准 GB14922. 2-2011《实验动物微生物学等级及监测》将金黄色葡萄球菌列为 SPF 级大鼠、小鼠、豚鼠、地鼠和兔等啮齿类实验动物必须检测和排除的病原菌。

实验动物金黄色葡萄球菌检测通常采用分离培养和生化鉴定相结合的方法,这种方法至少需要 5 d。环介导等温扩增是近年来发展起来的一项基因体外扩增的技术,利用 4 条不同的引物特异性地识别目的基因上面的 6 个特定序列,借助具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶,在恒温条件下催化新链的合成^[2]。在反应产物中加入 SYBR green I,绿色为阳性,橙色为阴性,可以直接肉眼观察判定结果。该技术由于操作简便、快速、灵敏度高、特异性强等优点被广泛应用于生命科学各领域。本研究将 LAMP 技术应用于实验动物金黄色葡萄球菌检测中,实现目的基因高效、快速的扩增,大大提高了检测效率、降低了检测成本。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 由本实验室保藏;金黄色葡萄球菌、沙门菌、小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌、肺炎克雷伯菌均为本实验室分离保藏。

1.1.2 主要试剂:细菌基因组 DNA 小量试剂盒购自 AxyPrep 公司;Bst DNA Polymerase 购自 NEB 公司;Betaine 购自 Sigma 公司;dNTP mixture、MgCl₂ 购自 TaKaRa 宝生物(大连)工程有限公司;SYBR green I 荧光染料购自北京天恩泽基因科技有限公司;DEPC 水购自 Solarbio 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计:根据金黄色葡萄球菌特有的

nuc 基因,利用 Primer Explorer IV 设计 4 条引物^[3],由北京阅微基因技术有限公司合成(表 1)。

1.2.2 菌株培养:金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 接种于血琼脂平皿,37℃ 培养 18 h ~ 24 h,挑取单菌落转接于营养肉汤培养基,37℃ 培养过夜。取 100 μL 菌液用于稀释与计数,其余菌液 6 000 r/min 离心 30 min,收集菌体溶于 DEPC 水中, - 20℃ 保存备用。

1.2.3 金黄色葡萄球菌的稀释与计数:取 100 μL 增菌培养后的菌液,用无菌 PBS 进行 10 倍递增稀释,每个稀释度吸取 100 μL 接种到血琼脂平板上,每个稀释度做 2 个平皿, L 棒涂布均匀,于 37℃ 培养 24 h 后进行计数。

1.2.4 模板制备:采用热裂解法制备粗制模板^[4]。取 50 μL 菌液溶于 50 μL DEPC 水,电磁炉煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液为粗制模板, - 20℃ 保存备用。

1.2.5 LAMP 扩增反应:

1.2.5.1 25 μL 扩增体系和反应条件^[5]: 1.6 μmol/L FIP、1.6 μmol/L BIP、0.2 μmol/L F3、0.2 μmol/L B3、1.6 mmol/L dNTP、4 mmol/L MgCl₂、0.8 mol/L betaine、LAMP buffer (20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)、10 mmol/L KCl、10 mmol/L (NH₄)₂SO₄、2 mmol/L MgSO₄、0.1% TritonX-100)、1 μL 模板、8 U Bst 酶。加入模板后煮沸 5 min,4℃ 3 min,再加入 Bst 酶,60℃ 60 min,80℃ 3 min,4℃ 保存。

1.2.5.2 特异性试验:按照 1.2.5.1 的 25 μL 扩增体系配制反应液,分别以金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、金黄色葡萄球菌、沙门菌、小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌、肺炎克雷伯菌的粗提 DNA 为模板进行扩增。

1.2.5.3 优化反应体系:按照 1.2.5.1 的 25 μL 扩增体系配制反应液,以金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 的粗提 DNA 为模板,对 LAMP 反应体系中的 dNTP 浓度、Mg²⁺ 浓度和 betaine 浓度以及反应时间进行优化。

表 1 引物序列

Tab. 1 Nucleotide sequences of the primers

引物 Primers	序列(5' - 3') Sequences	引物长度(bp) Primer length
F3	ACTCGAGTTTGACAAAGGT	19
B3	CGTTGTCTCGCTCCAAAT	19
FIP	TCGTTTACCATTTTCCATCAGCATCAAAGAAGCTGATAAATATGGACGT	50
BIP	TCAAGGCTTGGCTAAAGTTGCTTA- TTCGCTTGTGCTTCACTT	43

1.2.5.4 灵敏性试验:按照优化后的反应体系进行扩增。将模板浓度做倍比稀释,使每个反应体系的模板量为 1 cfu、2 cfu、3 cfu、4 cfu、5 cfu、10 cfu。

1.2.5.5 方法验证:取 20 粒 SPF 级小鼠粪便。经分离培养和生化鉴定^[6]证实有表皮葡萄球菌存在。将 20 份样品随机平均分为两组,每组中 5 份样品混入少量金黄色葡萄球菌 ATCC 25923。一组粗提 DNA 为 LAMP 反应的模板,编号为 1~10,11 号为空白对照;另一组用 AxyPrep 细菌基因组 DNA 小量试剂盒提取 DNA 为 LAMP 反应的模板,编号为 1'~10',11'号为空白对照。按照优化后的 25 μ L 扩增体系配制反应液进行扩增。扩增产物以 5 μ L 上样进行凝胶电泳观察结果,粗提 DNA 的一组每管剩余 20 μ L 加入 2 μ L 100 \times SYBR green I(以无水 DMSO 将 10 000 \times SYBR green I 稀释 100 倍)肉眼直接观察,橙色为阴性,绿色为阳性。

2 结果

2.1 特异性试验

对供试菌株分别进行 LAMP。结果显示,金黄色葡萄球菌反应管电泳结果均呈阳性,而其他菌株反应管电泳结果均呈阴性(见图 1),说明所设计的引物具有极强的特异性。

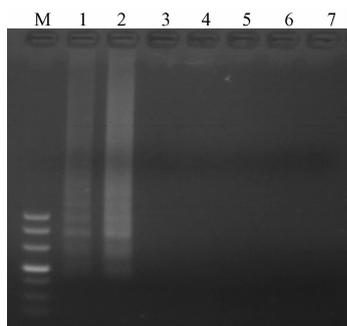


图 1 引物特异性凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of the LAMP-amplified DNA using specific primers

Note: M: marker DL500; 1: *Staphylococcus aureus* ATCC25923; 2: *Staphylococcus aureus*; 3: *Salmonella* spp.; 4: *Yersinia enterocolitica*; 5: *Yersinia pseudotuberculosis*; 6: *Klebsiella pneumoniae*; 7: blank control.

2.2 优化反应体系

2.2.1 dNTP 浓度对 LAMP 反应的影响:由图 2 可见,dNTP 的浓度为 1.6 mmol/L ~ 2.0 mmol/L 时均能扩增出靶 DNA。当 dNTP 的浓度达到 2.0 mmol/L 时,就能够得到均一、稳定的条带,继续增加 dNTP 浓度至 2.4 mmol/L,扩增效率稍有降低。

2.2.2 Mg^{2+} 浓度对 LAMP 反应的影响:由图 3 可见, Mg^{2+} 的浓度为 2 mmol/L ~ 7 mmol/L 时均能扩增出靶 DNA。当 Mg^{2+} 的浓度达到 6 mmol/L 时,就能够得到均一、稳定的条带,继续增加 Mg^{2+} 浓度至 7 mmol/L,扩增效率稍有降低。

2.2.3 Betaine 浓度对 LAMP 反应的影响:由图 4 可见,当 betaine 的浓度在 0.6 mol/L ~ 1.0 mol/L 范围内时对扩增反应的影响并不大,但仍可见当 betaine 的浓度达到 0.8 mol/L 时,扩增效果最好。

2.2.4 反应时间对 LAMP 反应的影响:在电泳 30 min 时就能观察到特异性条带,但在 60 min 才能得到均一、稳定的电泳条带(图 5)。

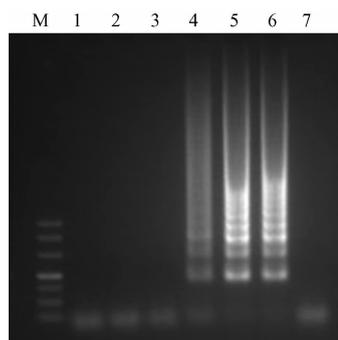


图 2 dNTP 浓度对 LAMP 反应的影响

Fig. 2 Effect of dNTP concentration on the LAMP reaction
Note: M: marker DL500; 1: dNTP 0.4 mmol/L; 2: dNTP 0.8 mmol/L; 3: dNTP 1.2 mmol/L; 4: dNTP 1.6 mmol/L; 5: dNTP 2.0 mmol/L; 6: dNTP 2.4 mmol/L; 7: blank control.

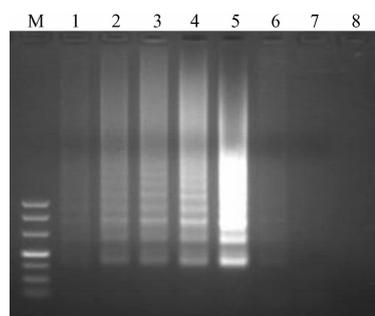


图 3 Mg^{2+} 浓度对 LAMP 反应的影响

Fig. 3 Effect of Mg^{2+} concentration on the LAMP reaction
Note: M: marker DL500; 1: Mg^{2+} 2 mmol/L; 2: Mg^{2+} 3 mmol/L; 3: Mg^{2+} 4 mmol/L; 4: Mg^{2+} 5 mmol/L; 5: Mg^{2+} 6 mmol/L; 6: Mg^{2+} 7 mmol/L; 7: Mg^{2+} 8 mmol/L; 8: blank control.

2.3 敏感性试验

根据条件优化试验结果调整金黄色葡萄球菌 LAMP 反应体系进行敏感性试验,结果显示,所设计

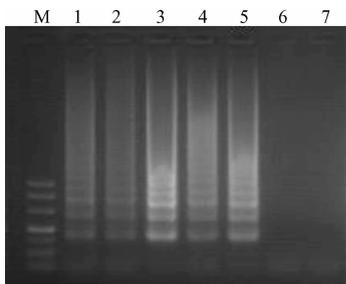


图 4 Betaine 浓度对 LAMP 反应的影响

Fig. 4 Effect of betaine concentration on the LAMP reaction

Note: M: marker DL500; 1: Betaine 0.6 M; 2: Betaine 0.7 mol/L; 3: Betaine 0.8 mol/L; 4: Betaine 0.9 mol/L; 5: Betaine 1.0 mol/L; 6: Betaine 1.1 mol/L; 7: blank control.

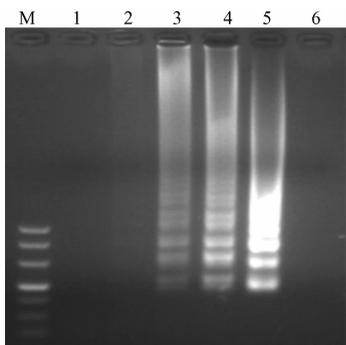


图 5 反应时间对 LAMP 反应的影响

Fig. 5 Effect of reaction time on the LAMP reaction

Note: M: marker DL500; 1: 20 min; 2: 30 min; 3: 40 min; 4: 50 min; 5: 60 min; 6: blank control.

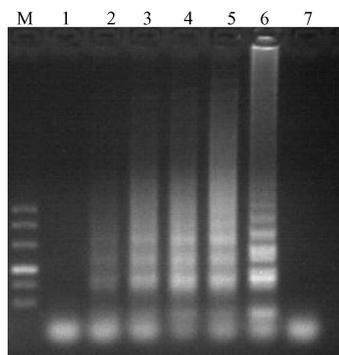


图 6 LAMP 敏感性电泳结果

Fig. 6 Agarose gel electrophoretogram of LAMP-amplified DNA of SA at different DNA concentration

Note: M: marker DL500; 1: 1 cfu; 2: 2 cfu; 3: 3 cfu; 4: 4 cfu; 5: 5 cfu; 6: 10 cfu; 7: blank control.

的特异性引物在最佳反应条件下,最低可检测到 2 cfu 热裂解法粗提 DNA 的金黄色葡萄球菌。(图 6)

2.4 方法验证

对供试粪便样品分别进行用 LAMP 进行检测。结果显示,未添加金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 的供试样品凝胶电泳结果均呈阴性,添加金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 的供试样品凝胶电泳结果均呈阳性(图 7),说明引物对表皮葡萄球菌并无交叉反应。同时,肉眼直接观察加入 SYBR Green I 荧光染料 的反应管,1~5 为橙色、6~10 为淡绿色、11 为橙色,与凝胶电泳结果相同。

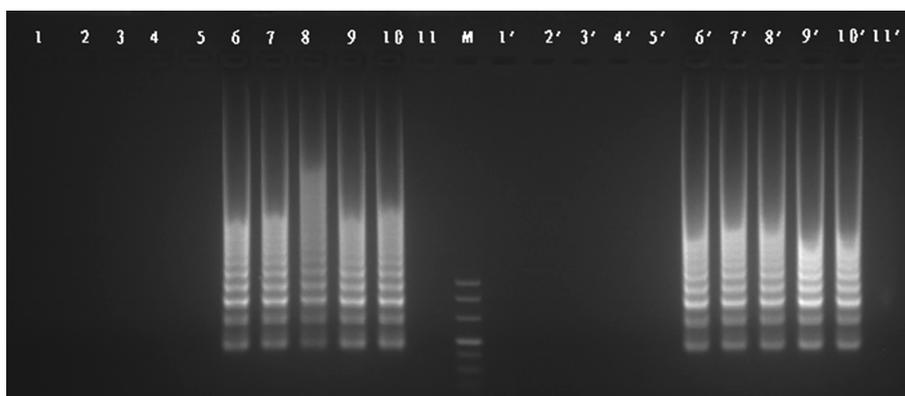


图 7 LAMP 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 7 Results of of LAMP- agarose gel electrophoresis

Note: M: Marker DL500; 1~5: stool samples of SPF mice processed by thermal cracking; 6~10: Thermal cracking stool samples added with *Staphylococcus aureus* ATCC25923 of SPF mice processed by thermal cracking; 11: Blank control; 1'~5': Stool samples of SPF mice processed by kit; 6'~10': Stool samples added with *Staphylococcus aureus* ATCC25923 of SPF mice processed by kit; 11': Blank control.

3 讨论

根据生物学特性、表型特征鉴定细菌的传统的分离培养法是实验动物国家标准中推荐的检测方法,这种方法存在许多不足之处:耗时长且步骤繁琐,要求有经验非常丰富的科研人员,并且这些方法很容易出现漏检。PCR 技术虽然越来越多地被应用于实验动物微生物检测,但是因为需要特殊的仪器,并且容易发生非特异性扩增使得它在实验动物微生物检测中的应用受到限制。LAMP 技术较常规的 PCR 技术操作更简单;无需昂贵的实验仪器,反应不需要控制温度的变化,仅需一台水浴锅就可完成整个扩增过程;结果判定简便,可直接根据有无焦磷酸镁沉淀的生成,或者根据加入荧光染料 SYBR green I 后颜色的变化,直接肉眼观测结果,省去 PCR 中的变温过程和电泳观察结果的步骤,大大缩短试验时间;另外 4 条引物必须完全匹配才能进行扩增使得 LAMP 技术比 PCR 技术具有更强的特异性。故 LAMP 技术能够满足基层、现场、即时、大批量样本检测的需要,克服了传统 PCR 方法的不足之处。

金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因编码耐热核酸酶,位于染色体上,长 966 bp。Brakstad 等^[7]人分别应用 PCR 的方法证明了 *nuc* 基因只存在于金黄色葡萄球菌中,而在其他葡萄球菌和非葡萄球菌中均不存在,是金黄色葡萄球菌的高特异性基因。

本研究针对金黄色葡萄球菌特异性的 *nuc* 基因设计的 LAMP 技术是一种特异性强、敏感性高、操作极其简便的快速检测方法。在 25 μ L 的 LAMP 体系中(1.6 μ mol/L FIP、1.6 μ mol/L BIP、0.2 μ mol/L F3、0.2 μ mol/L B3、2.0 mmol/L dNTP、6 mmol/L MgCl₂、0.8 mol/L betaine、20 mmol/L Tris-HCl (pH

8.8)、10 mmol/L KCl、10 mmol/L (NH₄)₂SO₄、2 mmol/L MgSO₄、0.1% ritonX-100、模板 DNA、8U BstDNA 聚合酶)仅需要 40 min ~ 60 min,就可以清晰检测出 2 cfu 粗提 DNA 的金黄色葡萄球菌。扩增结束后直接在反应管中加入只与双链 DNA 结合的 SYBR green I 可通过阳性结果呈绿色、阴性结果呈橙色,肉眼直接判定结果。从提取 DNA 开始,在 1.5 h ~ 2 h 内即可完成全部检测过程。诸多优点使得这项技术不仅能够满足对检测特异性、敏感性的要求,也能够满足实验动物饲养机构和基层实验室对大批量实验动物是否感染金黄色葡萄球菌进行初步筛选的需要。

参考文献:

- [1] 方喜业,邢瑞昌,贺争鸣. 实验动物质量控制 [M]. 北京,中国标准出版社,2008:371-372.
- [2] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): 63.
- [3] Eiken Chemical Co. Ltd. The principles of LAMP method [EB/OL]. <http://loopamp.eiken.co.jp/e/tech/index.html>. 2003,10.
- [4] 严剑波,王虹玲,朱水荣,等. 单增李斯特菌 LAMP 方法的建立 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(9): 2048-2050.
- [5] 周义正,王昌富,李向阳,等. 环介导等温扩增快速检测阳性血培养瓶中的金黄色葡萄球菌 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(9): 2075-2077.
- [6] 廖延雄. 兽医微生物实验诊断手册 [M]. 北京农业大学出版社, 1995, 81-114.
- [7] Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene [J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(7): 1654-1660.

[修回日期]2012-02-03