

动物饲料中沙门氏菌环介导等温扩增(LAMP) 快速诊断方法的建立

孙园园, 赵鹏

(镇江出入境检验检疫局, 江苏镇江 212008)

摘要:根据 GenBank 公布的沙门氏菌高度保守的 *fimY* 蛋白基因序列, 利用 Primer explorer V4 软件设计 4 条针对沙门氏菌 *fimY* 基因的特异性引物, 通过对 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、反应温度、反应时间、特异性、敏感性、重复性和稳定性及符合率等方面, 优化 LAMP 各种反应条件, 建立针对沙门氏菌 LAMP 快速诊断方法。结果表明, 该方法具有较强的特异性; 比 PCR 检测方法敏感性高 100 倍, 对沙门氏菌的最低检出量为 6.2 CFU/mL; 对 24 份样品的 3 次检测结果与国标法完全一致。证明建立的针对 *fimY* 蛋白基因的 LAMP 检测方法操作简便, 特异性强, 敏感性高, 适用于现场检测。

关键词:沙门氏菌; 饲料; 环介导等温扩增; 快速诊断

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2012)01-0032-05

沙门氏菌病是公共卫生学上具有重要意义的人畜共患病之一, 由沙门氏菌引起的食物中毒屡居首位(蔡宝祥, 2004)。动物性产品中含有多种丰富的营养成分, 非常适宜于沙门氏菌的生长繁殖, 人们一旦摄入了含有大量沙门氏菌的动物性产品, 就会引起细菌性感染, 进而在毒素的作用下发生食物中毒(桑杰等, 2006; Vugia 等, 2004)。各种饲料中均可发现沙门氏菌, 尤其是动物性饲料(如鱼粉)常见(Adak 等, 2002; Voetsch 等, 2004)。鉴于沙门氏菌对人类健康的严重危害, 目前世界各国政府对动物性饲料中沙门氏菌的限量标准均制定出非常严格的规定, 对动物性饲料中沙门氏菌的规定均为不得检出, 为所有微生物限量标准中的最严格级(王章云, 1999)。

目前, 沙门氏菌的检测方法有很多, 如常规的培养分离、乳胶凝集试验、免疫荧光、酶联免疫吸附试验(ELISA)及 PCR、核酸探针、荧光定量 PCR 检测方法等。常规的培养分离等操作复杂, 费时费力; 而乳胶凝集试验、ELISA 等方法检测沙门氏菌虽然能够实现快速、简便检测, 但是敏感性不高, 易出现假阳性和假阴性(刘佩红等, 2005; 曲站红等, 2005; 叶

宇鑫等, 2009); 普通 PCR、Real-time PCR 等分子生物学方法敏感、特异, 且操作简便、快速, 能够弥补 ELISA 方法的不足, 但是需要特殊的仪器, 如 PCR 扩增仪等, 无法满足基层和现场检测的需求(钟伟军等, 2008; Fitts 等, 1983)。

本研究选择沙门氏菌保守特异的 *fimY* 基因为靶基因, 利用环介导等温扩增技术, 建立了针对沙门氏菌的 LAMP 快速检测方法; 该方法灵敏、快速、准确、操作简单, 不需要特殊仪器, 适用于现场检测(Notomi 等, 2008), 为动物饲料中沙门氏菌的检测提供一种成本低、操作简单, 快速、敏感和特异、结果易于判定、便于现场快速检测和诊断的检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂 沙门氏菌标准株及其它菌株均购自中国兽医药品监察所。分离株由镇江出入境检验检疫局分离保存; *rTaq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、dNTP、DL2000 DNA Marker 均购自大连宝生物有限公司; BstDNA(New England Biolabs Inc, USA 公司); 琼脂糖(西班牙 Biowest 公司); 甜菜碱(Sigma 公司); 1000 $\times$ 荧光染料 SYBR Green I (Invitrogen 公司); QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Germany); 其他试剂购自上海生物工程有限公司。

1.2 主要仪器 DYY-BC 电泳仪(北京六一仪器厂); 超纯水系统(美国 Millipore 公司); GL200 凝胶成像系统(美国 Eastman Kodak 公司); Centrifuge 5415R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); 数

收稿日期: 2011-05-16

作者简介: 孙园园(1979—), 女, 山东人, 硕士生, 主要从事动物传染病学研究。

通信作者: 赵鹏(1980—), 男, 山东人。Tel: 0511-88856728; E-mail: zhaop1@jsciq.gov.cn

基金项目: 江苏出入境检验检疫局科研立项(2010KJ05)。

显恒温水浴锅 HH-2(国华电器有限公司);恒温摇床(武汉瑞华仪器设备有限公司)。PCR 仪(英国 Techne 公司)

1.3 饲料样品的处理 取饲料样品 25 g,加入装有 225 mL 缓冲蛋白胨水的 500 mL 广口瓶内。如果饲料样品量不是 25 g,饲料样品质量与预增菌液的体积比应约为 1/10。当检测来自同一特定样品的多个饲料样品时,若有证据表明饲料样品混合不影响检验结果,饲料样品可以混合。37 °C 培养 18 h,取上清用于基因组提取。

1.4 沙门氏菌核酸的提取 用 QIAamp® DNA Blood Mini Kit 试剂盒提取沙门氏菌细菌基因组,方法详见说明书。

1.5 引物设计 根据 GenBank 公布的沙门氏菌 *fimY* 蛋白基因序列(登录号: AM933172, AM933173, CP000026, CP000857, CP001127, CP001144, M90677),利用 Primer explorer V4 软件设计 4 条针对沙门氏菌 *fimY* 基因的特异性引物;其中,内引物 F 由 F1c、TTTT linker 和 F2 组成;内引物 B 由 B1、TTTT linker 和 B2c 组成;外引物 F/B 和环引物 F/B 分别由单条引物构成。引物由上海生工生物技术有限公司合成,引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列
Sal-F3	5'-CTGTACGCGAAGCCTTGTT-3'
Sal-B3	5'-ACTGCTGGAGCAGCCGRA-3'
Sal-FIP	5'-AAGAGGCRCTTGCCTAAAGTTTTGC-CAAACCTCGCTTATCGG-3'
Sal-BIP	5'-TAGCACGTCAGCAAAGCGTACCTTTTTGT-GGGGAAGGTTAAGGAGG-3'

1.6 沙门氏菌 LAMP 检测方法的建立及反应体系的优化 沙门氏菌 LAMP 的反应体系为 25 μ L: 2.5 μ L 10 $\times$ Buffer (200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8, 25 °C)、100 mmol/L 氯化钾、100 mmol/L 硫酸铵、20 mmol/L 硫酸镁和 1% 曲拉通 X-100), 1.0 μ L *Bst* DNA 聚合酶 (8 U/ μ L)、4 μ L 2.5 mmol/L dNTP、0.5 μ L 40 μ mol/L 内引物 1, 0.5 μ L 40 μ mol/L 内引物 2, 0.5 μ L 5 μ mol/L 外引物 1, 0.5 μ L 5 μ mol/L 外引物 2, 3.0 μ L 模板, 5.0 μ L 5 μ mol/L 甜菜碱和 7.5 μ L 超纯水。将含 LAMP 反应液的 PCR 反应管置于金属浴 60、61、62、63、64、65 °C 中进行反应;用最佳温度等温扩增 15、30、45、60 min;同时优化 Mg^{2+} 离子和 dNTP 的浓度进行 LAMP 扩增,反应结束后同时进行琼脂糖凝胶电泳

和可视化检测。可视化检测方法为 LAMP 反应结束后,加入 1 μ L 的 SYBR Green I 染料,阳性结果呈现明显的翠绿色,而阴性结果则为淡橙色。

1.7 使用限制性内切酶 *Dra* I 对沙门氏菌 LAMP 扩增产物的酶切鉴定 用 *Dra* I 酶在 37 °C 消化 LAMP 产物,取 5 μ L 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,观察结果。酶切体系为 10 μ L: 2.75 μ L H_2O , 1 μ L 10 $\times$ M Buffer, 0.25 μ L *Dra* I (10 U/ μ L), 6 μ L LAMP 产物。

1.8 LAMP 的敏感性试验 将猪霍乱沙门氏菌株 C500 (6.2×10^6 CFU/ μ L), 进行 10 倍倍比稀释成 1.0×10^{-1} 至 1.0×10^{-7} 。用所建立的 LAMP 检测方法和 PCR 检测方法进行灵敏性比对试验。

1.9 LAMP 的特异性试验 抽提沙门氏菌、志贺氏菌和非阳性菌株,按照所建立的沙门氏菌 LAMP 检测方法,进行特异性试验。

1.10 临床检测的重复性 对实验室所保存的 24 份不同菌种,采用常规核酸抽提后进行沙门氏菌 LAMP 检测 3 次,并将检测结果与国标法 (GB4789.4-2010) 的比较检测结果作比较,来验证该方法的重复性。

2 结果与分析

2.1 沙门氏菌 LAMP 反应体系的优化 在 25 μ L 反应体系中,于 PCR 反应管中分别加入沙门氏菌基因组模板,于恒温金属浴上进行 LAMP 扩增。反应结束后同时进行琼脂糖凝胶电泳和可视化检测。可视化检测方法为 LAMP 反应结束后,加入 1 μ L 的 SYBR Green I 染料,阳性结果呈现明显的翠绿色,而阴性结果则为淡橙色。分别在不同的温度 60、61、62、63、64、65 °C 下进行反应,从反应结果颜色和条带明亮程度可以得出,最佳反应温度为 63 ~ 65 °C (图 1);将反应分别进行 15、30、45、60 min, PCR 电泳结果显示,反应时间在 15 min 时出现梯形条带,45 和 60 min 的反应液梯状条带亮度相同达到最亮,证明 45 min 即可停止反应 (图 2)。在终浓度分别为 2、3、4、5、6 mmol/L 的镁离子浓度和在终浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mmol/L 的 dNTP 浓度下进行反应,由电泳图可见,当镁离子浓度为 3 ~ 4 mmol/L,电泳条带最亮,可见最佳的镁离子浓度为 3 ~ 4 mmol/L (图 3);在 dNTP 浓度为 0.4、0.5、0.6 mmol/L 时,得到了最佳的电泳效果,可见最佳的 dNTP 浓度为 0.4 ~ 0.6 mmol/L (图 4)。

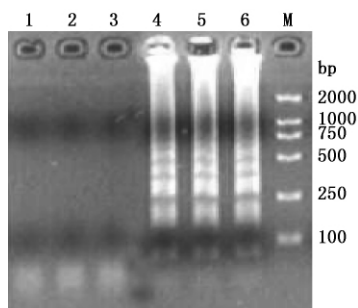


图1 LAMP 温度梯度电泳结果

注:1为60℃;2为61℃;3为62℃;4为63℃;5为64℃;6为65℃;M为DL2000 DNA Marker。

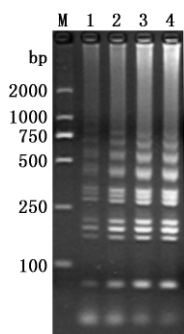


图2 LAMP 反应时间优化的电泳结果

注:M为DL2000 DNA Marker;1为15 min;2为30 min;3为45 min;4为60 min。

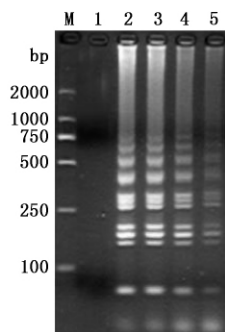


图3 不同浓度镁离子 LAMP 反应结果

注:M为DL2000 DNA Marker;1为2 mmol/L;2为3 mmol/L;3为4 mmol/L;4为5 mmol/L;5为6 mmol/L。

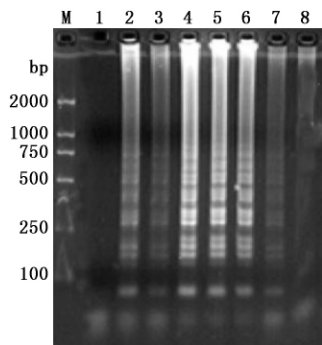


图4 不同浓度 dNTP LAMP 反应结果

注:M为DL2000 DNA Marker;1为0.1 mmol/L;2为0.2 mmol/L;3为0.3 mmol/L;4为0.4 mmol/L;5为0.5 mmol/L;6为0.6 mmol/L;7为0.7 mmol/L;8为0.8 mmol/L。

2.2 使用限制性内切酶 *Dra* I对沙门氏菌 LAMP 扩增产物的酶切鉴定结果 用 *Dra* I酶在37℃消化LAMP产物,取5 μL产物用2%琼脂糖凝胶电泳,结果发现,产物被切成106和238 bp两个片段,与预期结果相同,证明扩增产物即为目的片段(图5)。

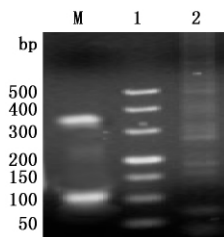


图5 LAMP 产物酶切结果

注:M为500 bp Marker;1为LAMP扩增产物酶切;2为LAMP扩增产物。

2.3 LAMP 敏感性试验 将猪霍乱沙门氏菌株 C500(原始浓度为 6.2×10^6 CFU/mL)进行10倍比稀释成 1.0×10^{-1} 至 1.0×10^{-7} 等7个稀释度。用所建立的 LAMP 检测方法和 PCR 检测方法进行灵敏性比对试验。由图6可见,1~6泳道有电泳条带,7泳道没有电泳条带,说明 LAMP 测定沙门氏菌模板浓度灵敏度为6.2 CFU/mL,PCR电泳结果显示将沙门氏菌模板浓度稀释 1.0×10^{-6} 至 1.0×10^{-7} 倍时没有电泳条带产生,说明 PCR 的灵敏度为 6.2×10^2 CFU/mL(图7)。

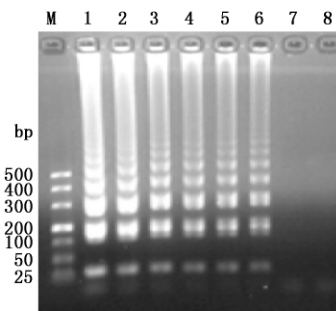


图6 LAMP 敏感性的电泳结果

注:M为DL500 DNA Marker;1~7为 1.0×10^{-1} 至 1.0×10^{-7} 等7个标准品稀释度为模板的 LAMP 产物;8为阴性对照。

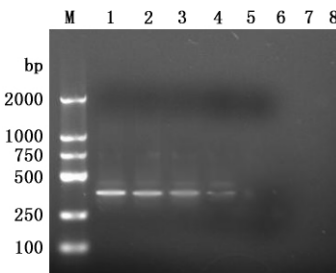


图7 PCR 敏感性检测

注:M为DL2000 DNA Marker;1~7为 1.0×10^{-1} 至 1.0×10^{-7} 等7个标准品稀释度为模板的 PCR 产物;8为阴性对照。

2.4 LAMP 特异性试验 所建立的沙门氏菌 LAMP 检测方法可以检测出沙门氏菌核酸,不能检测出其它细菌核酸(图 8)。

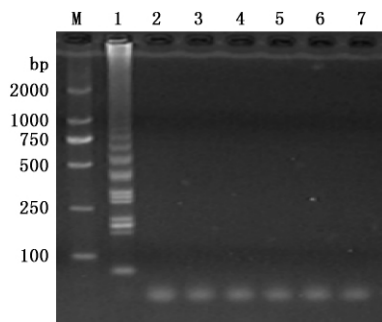


图 8 LAMP 特异性的电泳结果

注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1 为以沙门氏菌基因组为模板的 LAMP 产物; 2 为以大肠杆菌基因组为模板的 LAMP 产物; 3 为以金黄色葡萄球菌基因组为模板的 LAMP 产物; 4 为以链球菌基因组为模板的 LAMP 产物; 5 为空肠弯曲杆菌; 6 为产气肠杆菌; 7 为阴性对照。

2.5 临床检测的重复性 对实验室所保存的 24 份不同菌种, 分别是甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、鸡伤寒沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌、猪伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、鸭沙门氏菌、霍乱弧菌 O 群、霍乱弧菌 O 群、金黄色葡萄球菌、小肠结肠炎、耶尔森氏菌、溶血性链球菌、阪崎肠杆菌、产气肠杆菌、大肠杆菌、肠出血性、大肠杆菌 O₁: H、产肠毒素大肠杆菌、肠致病性大肠杆菌、肠侵袭性大肠菌、痢疾志贺菌, 采用常规核酸抽提后进行沙门氏菌 LAMP 检测 3 次, 并将检测结果与国标法 (GB4789. 4—2010) 检测结果作比较, 结果第 1 次检测, LAMP 法结果与国标法符合率为 100%; 第 2 次检测 LAMP 法结果与国标法符合率仍为 100%, 第 3 次检测 LAMP 法结果与国标法符合率为 100%, 3 次检测结果说明本方法具有很好的重复性, 均无假阳性和假阴性出现(表 2)。

表 2 LAMP 检测方法与国标法 (GB4789. 4—2010) 检测结果比较

菌株	来源	国标结果	LAMP 结果		
			1	2	3
沙门氏菌	分离株	+	+	+	+
甲型副伤寒沙门氏菌	CMCC50001	+	+	+	+
乙型副伤寒沙门氏菌	CMCC50004	+	+	+	+
丙型副伤寒沙门氏菌	分离株	+	+	+	+
猪霍乱沙门氏菌	分离株	+	+	+	+
鸡伤寒沙门氏菌	分离株	+	+	+	+
鸡白痢沙门氏菌	分离株	+	+	+	+
猪伤寒沙门氏菌	分离株	+	+	+	+
鼠伤寒沙门氏菌	CMCC50115	+	+	+	+
肠炎沙门氏菌	ATCC13076	+	+	+	+
鸭沙门氏菌	分离株	+	+	+	+
霍乱弧菌 O 群	ATCC14035	—	—	—	—
霍乱弧菌 O 群	ATCC51394	—	—	—	—
金黄色葡萄球菌	ATCC29213	—	—	—	—
小肠结肠炎耶尔森氏菌	ATCC9610	—	—	—	—
溶血性链球菌	CMCC32121	—	—	—	—
阪崎肠杆菌	ATCC51329	—	—	—	—
产气肠杆菌	分离株	—	—	—	—
大肠杆菌	ATCC25922	—	—	—	—
肠出血性大肠杆菌 O ₁ : H	ATCC35150	—	—	—	—
产肠毒素大肠杆菌	ATCC35401	—	—	—	—
肠致病性大肠杆菌	分离株	—	—	—	—
肠侵袭性大肠菌	分离株	—	—	—	—
痢疾志贺菌	ATCC51253	—	—	—	—

注: “+”表示结果为阳性, “—”表示结果为阴性。

3 讨论

LAMP 作为一种新的核酸诊断技术, 具有快速、敏感、特异、结果易于判定、便于现场快速检测和诊断疾病等特点, 在病原的诊断方面呈现出良好的

应用前景。LAMP 只在 60~65 °C 进行恒温扩增, 只要水浴锅即可, 也不需要特殊的仪器, 因此非常简便; 另外, 由于 LAMP 是恒温扩增, 不需要 PCR 仪升降温的时间, 扩增时间短, 在 1 h 内即可完成反

应,而一般的 PCR 至少需要 2~3 h。由于 LAMP 在 DNA 扩增过程中可产生大量的焦磷酸镁而使反应液呈现混浊,使其反应结果易于观察,在 LAMP 扩增结束后无需电泳就可直接肉眼观察反应是否有混浊现象来判断扩增与否,也可直接加入荧光染料 SYBY Green I 后,通过肉眼观察直接判定结果,因此扩增产物不需要进行电泳,这样就可以应用于基层检测和现场检测,大大地提高了检测效率。

沙门菌的特异性引物基因一般分为属特异性、血清群特异性和血清型特异性 3 类。目前多数研究人员都是使用属特异性引物基因用以检测沙门氏菌。LAMP 技术的关键是靶基因的选择,目前采用的检测技术均以沙门氏菌侵袭蛋白 *invA* 基因作为靶基因,而在沙门氏菌属中 *Salmonella* 和 *Salmonella* 不含该基因,因此选择 *invA* 基因为靶基因势必会造成这两种沙门氏菌的漏检。此外,*invA* 广泛存在于肠杆菌科细菌中,以此作为检测靶基因,也可造成检测假阳性。研究结果表明,*fimY* 基因是沙门氏菌属独有的基因且高度保守,是理想的检测靶基因。

本研究对 LAMP 检测动物饲料中沙门氏菌试验影响因素进行了研究。确定最佳反应体系构成及检测程序;该方法具有较强的特异性和敏感性,对沙门氏菌的最低检出量为 6.2 CFU/mL,是 PCR 敏感度的 100 倍。利用沙门氏菌 LAMP 检测方法检测 24 份不同菌种,发现其结果与国标法(GB4789.4—2010)检测结果全相同。利用 LAMP 技术检测食品中沙门氏菌,灵敏度高,耗时短,特异性强,可在 45 min 内完成对沙门氏菌核酸的检测,比目前普遍采用的 PCR 检测方法时间缩短一倍;该方法适用于现场检测和大量样品高通量检测,在基层动物性饲

料中沙门氏菌检测等领域具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 1 王章云. 肠炎沙门氏菌引起的食物中毒细菌学调查[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(3): 115.
- 2 叶宇鑫, 李琳. 原位荧光 LAMP 技术检测食源性沙门氏菌[J]. 分析与检测, 2009, 35(3): 137~141.
- 3 刘佩红, 屠益平, 等. 沙门氏菌检测技术研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005, 6: 2~3.
- 4 曲站红, 邓国华, 贾永清. ELISA 技术及其在禽病诊断中的应用[J]. 畜牧兽医科技信息, 2005(1): 63~66.
- 5 胡秀彩, 胡宏晓, 吕爱军. 鲤鱼肠道中沙门氏菌、志贺氏菌分离鉴定及药敏试验[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(4): 210~212.
- 6 钟伟军, 赵明秋, 邓中平, 等. 荧光定量 PCR 快速检测食品中沙门氏菌方法的建立及初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 3: 220~224.
- 7 桑杰, 史小为. Dot-ELISA 检测香肠中沙门氏菌的研究[J]. 草业与畜牧, 2006(3): 9~11.
- 8 蔡宝祥. 家畜传染病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- 9 Adak G K, Long S M, O'Brien S J. Trends in indigenous food-borne disease and deaths, England and Wales, 1992 to 2000. Gut, 2002, 51: 832~841.
- 10 Fitts R, Diamond M, et al. DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods[J]. Appl Environ Microbiol, 1983, 46(5): 1146~1151.
- 11 Notomi T, Okayama H H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA nucleic acids res[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 30: 154~160.
- 12 Voetsch A C, Van Gilder T J, Angulo F J, et al. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. Clin Infect Dis, 2004, 38(Suppl 3): S127~S134.
- 13 Vugia D J, Samuel M, Farley M M, et al. Invasive *Salmonella* infections in the United States, FoodNet, 1996—1999; incidence, serotype distribution, and outcome. Clin Infect Dis, 2004, 38(Suppl 3): S149~S156.

Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of *Salmonella* in Animal Food

SUN Yuan-yuan, ZHAO Peng

(Zhenjiang Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhenjiang 212008, China)

Abstract: According to the highly conserved *fimY* gene of *Salmonella*, reported in the GenBank, by primer explorer V4 software, one set primer including four primers, were designed and the method for detecting the *Salmonella* with LAMP was developed after optimizing the reaction conditions. The results showed that the detection limit of the LAMP assay was 6.2 CFU/mL which was 100-fold higher than that of PCR. The test results of 24 samples by LAMP method was fully consistent with these by the national standard method. The results showed the LAMP method is more reliable and convenient for rapid, sensitive and specific diagnosis of *Salmonella*.

Key words: *Salmonella*; animal feed; LAMP; rapid detection