

林麝源化脓隐秘杆菌 LAMP 快速检测方法的建立

唐婕¹, 刘二龙², 卢丽², 李斐然¹, 王永奇¹, 刘文华^{1*}

(1.陕西省动物研究所, 陕西 西安 710032; 2.广州出入境检验检疫局, 广东 广州 510730)

摘要: 根据 GenBank 已公布的化脓隐秘杆菌溶血素((*Pyolysin*, PLO)基因设计 6 条引物, 建立一种灵敏的环介导等温扩增方法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)用于化脓隐秘杆菌(*Arcanobacterium pyogenes*)的快速检测, 并对检测方法的特异性和灵敏度进行验证。对化脓隐秘杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、非 O1 霍乱弧菌、单增李斯特氏菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌、副溶血性弧菌、蜡样芽孢杆菌等 9 株实验菌株进行的特异性试验表明, 建立的 LAMP 方法仅对化脓隐秘杆菌的检测结果为阳性; 该方法的检测灵敏度在 DNA 水平上可达 112 fg。采用本研究建立的方法检测 20 份林麝临床病例样品, 共鉴定出 10 株化脓隐秘杆菌, 与 API Coryne 生化鉴定方法的符合率为 100%。

关键词: 林麝; 化脓隐秘杆菌; 环介导等温扩增(LAMP)

中图分类号: S865.4⁺1; S855.1⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2014)03-0316-05

Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of forest musk deer *Arcanobacterium pyogenes*

TANG Jie¹, LIU Er-long², LU Li², LI Fei-ran¹, WANG Yong-qi¹, LIU Wen-hua^{1*}

(1.Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032, China; 2.Guangzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510730, China)

Abstract: According to *Arcanobacterium pyogenes plo* gene sequences published on GenBank, six specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers were designed to establish a method of LAMP for detection of *Arcanobacterium pyogenes* from forest musk deer and the specificity and sensitivity of this method were assayed. The specific test results showed that positive results obtained only from *Arcanobacterium pyogenes* while the amplified results of 8 non-*Arcanobacterium pyogenes* strains including *Salmonella typhimurium*, non-O1 *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahemolyticus* and *Bacillus cereus* were negative. The detection sensitivity of the LAMP assay for *Arcanobacterium pyogenes* was 112 fg pure genomic DNA per 25 μ L reaction. The test based on the method of this essay were applied on 20 clinical samples, 10 clinical samples were positive which were in accord with API coryne identification.

Key words: forest musk deer; *Arcanobacterium pyogenes*; loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

化脓隐秘杆菌(*Arcanobacterium pyogenes*)为多形性、无运动性的革兰氏阳性杆菌, 曾被称为化脓棒状杆菌、化脓放线菌。Ramos等根据16S rRNA 基因进行系统进化分析后, 将化脓隐秘杆菌分类到隐秘杆菌属^[1-2]。化脓隐秘杆菌常寄生于上呼吸道、

消化道等的黏膜处, 是一种条件性致病菌, 能引起多种动物, 如猪、牛、羊、禽和人类的多种器官、黏膜的化脓性感染, 出现肺炎、乳房炎、子宫内膜炎、关节炎、外耳炎、膀胱炎及肝脏、肾脏脓肿等症^[3-5]。笔者发现化脓隐秘杆菌感染林麝可引起

收稿日期: 2014-01-02

基金项目: 陕西省科学院应用基础专项(2013K-12)

作者简介: 唐婕(1981—), 女, 湖南攸县人, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事野生动物疾病防治研究, yaya184@126.com; *通信作者, LWH8506@163.com

其颌下、鼻镜等处的脓肿,且与大肠杆菌、链球菌等混合存在,使感染加重,导致林麝的死亡^[6-7]。化脓隐秘杆菌毒力因子主要有溶血素(Pyolysin, PLO)、神经氨酸酶(Nan)、胶原结合蛋白(CbpA)及菌毛合成蛋白(Fim),其最主要的致病因子是细胞外毒素PLO^[8]。1997年, Billington 等^[9]从野生型化脓隐秘杆菌BBR1中克隆测序了*plo*全基因。

目前,化脓隐秘杆菌诊断主要采用细菌分离培养,但该菌生长速度慢,需要36~48 h才能长出菌落,并且对于菌落形态的判断要求实验人员具有丰富的经验,还需通过系列的生化试验进行鉴定,费时费力,延误治疗时机,造成严重的经济损失。除传统检测方法外,还有一些快速的检测方法,如免疫学方法和PCR等。免疫学方法虽然简单,但灵敏度不理想;PCR方法具有灵敏、快速等优点,但检测成本较高,仪器昂贵,扩增反应时间较长,并且对实验人员具有较高的要求^[2,4,10]。此外,临床上 *A. pyogenes*感染的病例大多为复合性感染,常因为不能快速检测出该致病菌,无法采取有针对性的治疗措施。

本试验拟根据 *A. pyogenes*的*plo*基因序列,建立适用于临床样品化脓隐秘杆菌检测的特异性强、灵敏度高的环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)可视化检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

鼠伤寒沙门氏菌(CMCC(B)50115);非O1霍乱弧菌(VbO);单增李斯特氏菌(ATCC 15313);表皮葡萄球菌(CMCC 26069);金黄色葡萄球菌(ATCC 6538);嗜水气单孢菌(ATCC 7966);副溶血性弧菌(ATCC 17802);蜡样芽孢杆菌(ATCC 11778)。以上

菌株均购自陆桥生物技术公司。化脓隐秘杆菌由笔者从陕西省养殖场林麝患脓肿部位分离纯化,并经 API Coryne鉴定系统鉴定。

1.1.2 主要试剂与仪器

主要试剂:血琼脂平板(北京陆桥公司);脑心浸液(BHI)(北京陆桥公司);wizad 基因组提取试剂(promega公司);Bst DNA polymerase large fragment (New England Biolabs公司);甜菜碱(Betaine)、MgCl₂ (Sigma公司);dNTPs(宝生物工程(大连)有限公司);SYTO-9荧光染料(Invitrogen公司);100 bp Ladder DNA Marker(北京百泰克生物技术有限公司)。

主要仪器:CT15RE 高速冷冻离心机(HITACHI);ND2000C 微量分光光度计(Thermo Scientific);S1000PCR 仪(BIO-RAD);anon 4200 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);通用型电泳仪(BIO-RAD);API Coryne 鉴定系统(法国梅里埃公司)。

1.2 方 法

1.2.1 LAMP 方法的建立

1) 模板DNA的制备。将化脓隐秘杆菌接种于新鲜BHI培养基中,37 °C微需氧条件下培养48 h。取1 mL菌液,离心取上清,采用wizad基因组DNA试剂盒提取DNA,作为LAMP反应的模板。

2) 引物的设计与合成。根据GenBank上化脓隐秘杆菌*plo*基因序列(登录号为U84782),用Primer Exploer V4引物设计软件设计一套特异性的LAMP引物,包括外引物F3、B3和内引物FIP(F1c+F2)、BIP (B1c+B2)、以及环引物Loop F、Loop B共六条,引物碱基序列见表1。引物委托英潍捷基公司合成。

3) LAMP。反应体系(25 μL):10×Thermopol Buffer 2.5 μL、5 μmol/L F3和B3各1 μL、40 μmol/L FIP和BIP各1 μL、20 μmol/L FLP和BLP各1 μL、10 mmol/L dNTPs 4 μL、5 mol/L甜菜碱5 μL、100 mmol/L

表 1 扩增 *plo* 基因的 LAMP 引物

Table 1 LAMP primer sets for specific amplification of *plo* gene

引物	引物序列(5'-3')	位置
FIP(F1c+F2)	TTGCCTCCAGTTGACGCTTAATAGCAAGTATCCTGACCATG	670~688 bp和610~631 bp
BIP(B1c+B2)	AAGGTCTCAGCCAAGCTCAACGAAGGAAGCGATAGCCAC	709~729 bp和765~783 bp
F3	TAAGGTCGTCATCAACAATCC	531~551 bp
B3	TATGTGGAGATGTCGGTGTA	813~832 bp
LoopF	CGTACCATAGTCTCATCGTAG	645~666 bp
LoopB	ACTTCGATGCAATTCATAAGCG	734~755 bp

F1c是F1的互补序列;B1c是B1的互补序列。

MgSO₄ 1 μL、8 U/μL Bst DNA polymerase 1 μL、模板DNA 2 μL(空白对照以2 μL ddH₂O代替模板DNA)、ddH₂O 3.5 μL。选取温度60、63、65 °C,时间40、60、80 min进行LAMP 反应扩增。采用SYTO-9 指示剂,阳性反应为黄绿色,阴性反应为棕褐色。对PCR产物进行电泳检测。确立最优反应温度和时间后进行下一步试验。

1.2.2 LAMP 方法特异性试验

分别用化脓隐秘杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、非O1霍乱弧菌、单增李斯特氏菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、嗜水气单孢菌、副溶血性弧菌、蜡样芽孢杆菌相应的培养基及培养温度增菌培养24 h后,取1 mL菌液以12 000 r/min离心3 min,弃上清,加ddH₂O 100 μL重悬,96 °C加热10 min,12 000 r/min离心5 min,取上清2 μL,作为DNA模板,进行LAMP 扩增,检验LAMP方法的特异性。

1.2.3 LAMP 方法灵敏度试验

于血琼脂平板上挑取单个化脓隐秘杆菌接种于新鲜的BHI培养基中,37 °C微需氧条件下培养48 h。取1 mL菌液,离心取上清,采用wizad基因组DNA试剂盒提取DNA,经微量分光光度计测得浓度后,对DNA进行10倍稀释,用于化脓隐秘杆菌的LAMP 检测体系的灵敏度试验。

1.2.4 临床样品检测

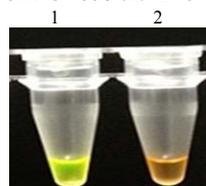
从陕西省养殖场无菌采集20份林麝患脓肿部位的脓液,置冰盒内低温运至陕西省动物研究所实验室。将采集的20份病料分别涂布接种于血琼脂平板,37 °C培养48 h。挑取圆形、光滑、表面突起、β-溶血的灰白色菌落接种BHI,37 °C培养24 h,按1.2.2中方法制备模板,进行LAMP检测。BHI菌液

继续培养48 h后,采用API Coryne鉴定系统对细菌进行生化鉴定,具体操作按说明书进行。

2 结果

2.1 LAMP 反应体系的优化

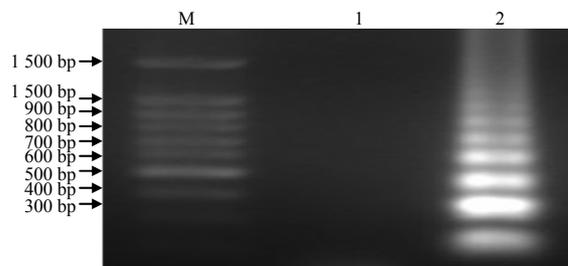
以化脓隐秘杆菌为模板,用不同温度和时间进行LAMP。结果:63 °C恒温反应60 min的样品呈黄绿色(图1),且能检测出梯度电泳条带(图2)。



1 空白对照样品;2 化脓隐秘杆菌样品。

图1 LAMP反应结果

Fig.1 Results of LAMP



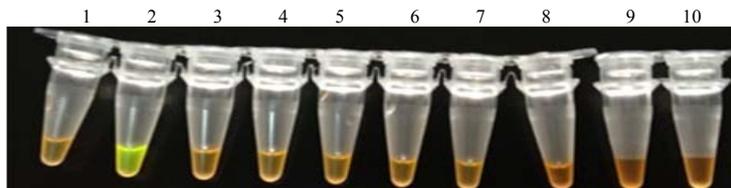
M 为 100 bp Ladder DNA marker; 1 空白对照样品;2 化脓隐秘杆菌样品。

图2 LAMP 产物的电泳检测结果

Fig.2 Electrophoresis for LAMP products

2.2 LAMP 方法的特异性

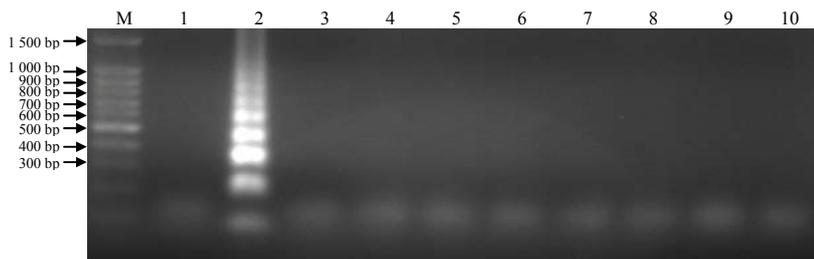
特异性试验结果(图3)表明,仅化脓隐秘杆菌的扩增产物显黄绿色。对扩增产物进行2%琼脂糖凝胶电泳检测,结果(图4)显示,仅化脓隐秘杆菌扩增产物呈现梯度条带,表明LAMP 检测方法具有良好的特异性。



1 阴性对照的 LAMP 产物;2 化脓隐秘杆菌的 LAMP 产物;3 沙门氏菌的 LAMP 产物;4 霍乱弧菌的 LAMP 产物;5 单增李斯特氏菌的 LAMP 产物;6 表皮葡萄球菌的 LAMP 产物;7 金黄色葡萄球菌的 LAMP 产物;8 嗜水气单孢菌的 LAMP 产物;9 副溶血性弧菌的 LAMP 产物;10 蜡样芽孢杆菌的 LAMP 产物。

图3 不同细菌样品的LAMP反应结果

Fig.3 Results of LAMP on different bacterial samples



M 100 bp Ladder DNA Marker; 1 阴性对照的LAMP产物; 2 化脓隐秘杆菌的LAMP产物; 3 沙门氏菌的LAMP产物; 4 霍乱弧菌的LAMP产物; 5 单增李斯特氏菌的LAMP产物; 6 表皮葡萄球菌的LAMP产物; 7 金黄色葡萄球菌的LAMP产物; 8 嗜水气单胞菌的LAMP产物; 9 副溶血性弧菌的LAMP产物; 10 蜡样芽孢杆菌的LAMP产物。

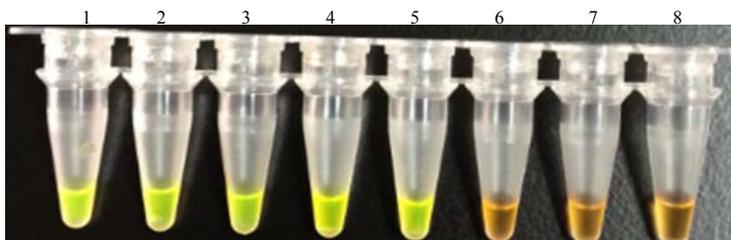
图4 不同细菌样品LAMP产物的电泳结果

Fig.4 Electrophoresis for LAMP products from different bacterial samples

2.3 LAMP 方法的灵敏度

测得化脓隐秘杆菌初始模板浓度为56 ng/μL。对经10倍梯度稀释的模板进行检测。10⁻²~10⁻⁶的稀释度模板(112×10⁻⁹~112×10⁻¹⁵ g的模板DNA)的扩增

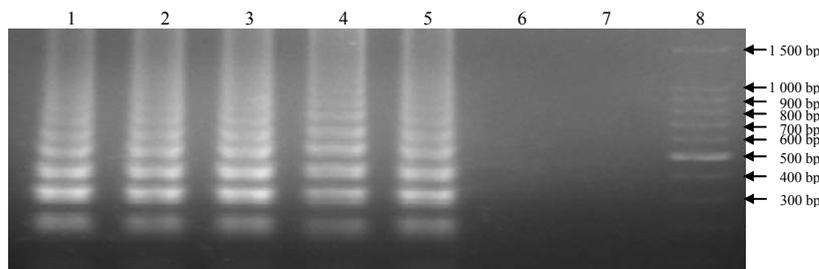
产物均呈现黄绿色(图5),电泳检测发现均有特异性的电泳梯状条带(图6)。即该LAMP体系可以检测到112 fg的化脓隐秘杆菌DNA。



1~7分别为模板稀释度为10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸(1.12 ng、112 pg、11.2 pg、1.12 pg、112 fg、11.2 fg、1.12 ag)的化脓隐秘杆菌基因组DNA扩增产物; 8为阴性对照的扩增产物。

图5 化脓隐秘杆菌稀释样品的LAMP检测结果

Fig.5 Results of LAMP for diluted *A. pyogenes*



1~6分别为模板稀释度为10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷(1.12 ng、112 pg、11.2 pg、1.12 pg、112 fg、11.2 fg)化脓隐秘杆菌基因组DNA扩增产物电泳结果; 7为阴性对照扩增产物; 8为100 bp Ladder DNA marker。

图6 化脓隐秘杆菌稀释样品的LAMP产物的电泳结果

Fig.6 Electrophoresis for LAMP products from diluted *A. pyogenes*

2.4 临床样品检测结果

用LAMP对采集的20份病料进行检测,发现10份样品中含有化脓隐秘杆菌。采用API Coryne鉴定系统进行生化鉴定,结果10份病料中分离的菌株经生化试验鉴定为化脓隐秘杆菌。LAMP方法对20份采集的病料样品进行检测的结果与API鉴定检测结果一致,符合率100%。

3 讨论

本研究建立了一种针对化脓隐秘杆菌的LAMP快速检测方法,较其他的分子生物学技术有以下优势:根据目的基因序列设计6条引物,对靶序列的8个特异序列的识别,保证了LAMP扩增的高度特异性,采用本方法对单增李斯特氏菌等8种菌的检测结果均为阴性;核酸提取可简化为适量菌液煮沸

后,取2 μ L上清,当作反应模板,在等温(63 $^{\circ}$ C)条件下反应1 h,即可完成整个LAMP反应,操作简便易行;特异性的引物设计使得引物介导的链延伸,循环过程形成茎环结构,本研究建立的化脓隐秘杆菌LAMP方法灵敏度在DNA水平上可达到112 fg;在添加了荧光染料后,阳性扩增管呈现黄绿色,阴性管无变化,可以直接用肉眼判定有无扩增产物,无须电泳分析或购置浊度仪,在临床检测的应用中具有较大的优势。

应用该LAMP方法对20份临床病料的检测,其结果与API生化鉴定方法的结果一致,表明该方法可明显缩短化脓隐秘杆菌引起的脓肿病的确诊时间。LAMP技术快速、简便,对实验室设备要求不高,因此,本研究建立的化脓隐秘杆菌的LAMP方法适合在技术条件相对落后的基层实验室、兽医站和养殖场使用。

参考文献:

- [1] Ramos C P, Foster G, Collins M D. Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: Description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1997, 47(1): 46-53.
- [2] 王密, 周玉龙, 朴范泽. 牛化脓性隐秘杆菌病PCR诊断方法的建立[J]. 微生物学通报, 2010, 37(9): 1320-1324.
- [3] Billington S J, Post K W, Jost B H, et al. Isolation of *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* from cases of feline otitis externa and canine cystitis[J]. J Vet Diagn Invest, 2002, 14 (2): 159-162.
- [4] 刘明春, 杨蕴力, 吴聪明, 等. 奶牛子宫内膜炎化脓隐秘杆菌的分离与PCR鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(11): 76-77.
- [5] 王居海, 张海波, 周玉龙, 等. 犊牛化脓隐秘杆菌性肺炎的病原鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(9): 85-87.
- [6] 唐婕, 胡罕, 王永奇, 等. 林麝化脓棒状杆菌的分离和鉴定[J]. 中国草食动物, 2011, 31(2): 71-73.
- [7] 唐婕, 刘文华, 王永奇. 大肠杆菌引起林麝死亡的初步研究[J]. 特产研究, 2009, 31(1): 23-24.
- [8] 郭文洁, 赵敬翠, 刘耀川, 等. 化脓隐秘杆菌毒力因子的研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(1): 52-53.
- [9] Billington S J, Jost B H, Cuevas W A, et al. The *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* hemolysin, pyolysin, is a novel member of the thiolactivated cytolysin family[J]. Bacterol, 1997, 179(19): 6100-6106.
- [10] 刘明春, 刘耀川, 赵敬翠, 等. 奶牛子宫内膜炎化脓隐秘杆菌16SrRNA基因的鉴定与分析[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(3): 343-345.
- [3] El-Toukhy N M K, Youssef A S, Mikhail M G M. Isolation, purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* MJA[J]. African Journal of Biotechnology, 2013, 12(20): 2957-2967.
- [4] Zhang Z F, Cho J H, Kim I H. Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO₂ on growth performance, relative immune organ weight, gas concentration in excreta, and intestinal microbial shedding in broiler chickens[J]. Livestock Science, 2013, 155(2/3): 343-347.
- [5] 王信喜, 李小娟, 张宜辉, 等. 家禽赖氨酸研究进展[J]. 中国饲料, 2011(16): 13-19.
- [6] Xing Y, Fan J, Yang T, et al. High lysine-yielding *Bacillus subtilis* as a promising alternative to antibiotic for its effects on performance and immune responses of Linwu ducks[J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2014, 13(6): 355-364.
- [7] 林谦, 戴求仲, 蒋桂韬, 等. 不同赖氨酸水平日粮对49-70日龄临武鸭屠宰性能的影响[J]. 中国饲料, 2014(1): 23-25.
- [8] 刘小英. 枯草芽孢杆菌制剂在南方鱼塘饲养肉鸭中的应用研究[J]. 饲料广角, 2009(1): 36-37.
- [9] 刘晓琳, 寇贺红, 周淑贞. 日粮中添加枯草芽孢杆菌对肉鸭生长性能的影响[J]. 中国家禽, 2010, 32(21): 53-54.
- [10] 杨桂芹, 韩钰婧, 张文克, 等. 日粮代谢能和可消化赖氨酸水平对21~42日龄肉仔鸡生长性能及血清生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2013, 25(2): 281-288.
- [11] 吴俊锋, 詹凯, 曹君平, 等. 枯草芽孢杆菌及其发酵豆粕对蛋鸡生产性能、蛋品质及血清生化指标的影响[J]. 中国家禽, 2012, 34(1): 22-26.
- [12] Josef O, Marcia R, Martin S, et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity[J]. Toxicology, 2008, 245(3): 194-205.
- [13] 朱莎, 张爱婷, 代腊, 等. 饲料铅污染对蛋鸡生产性能、蛋品质以及抗氧化性能的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(3): 534-542.
- [14] 李力. 用血清游离氨基酸测定法评价过瘤胃氨基酸的功效[J]. 饲料研究, 2001(6): 27-28.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维

(上接第298页)

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维