

引用格式:

张瑞轩, 曹景龙, 王卫民, 罗毅, 黎洁. 团头鲂皮特不动杆菌环介导等温扩增技术(LAMP)快速检测方法建立[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(3): 71–78.

ZHANG R X, CAO J L, WANG W M, LUO Y, LI J. Development of a rapid loop-mediated isothermal amplification(LAMP) detection method for *Acinetobacter pittii* in *Megalobrama amblycephala*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(3): 71–78.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



团头鲂皮特不动杆菌环介导等温扩增技术(LAMP) 快速检测方法建立

张瑞轩^{1,2}, 曹景龙³, 王卫民^{1,2}, 罗毅^{1,2}, 黎洁^{1,2,4*}

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070; 2. 水产养殖国家级实验教学示范中心, 湖北 武汉 430070;
3. 湖州市南浔区和孚镇应急管理服务中心, 浙江 湖州 313017; 4. 池塘健康养殖湖北省工程实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为了精准识别和监测鱼类中皮特不动杆菌(*Acinetobacter pittii*)的感染, 针对团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)源皮特不动杆菌的管家基因 $rpoB$ 设计特异性扩增引物, 通过反应体系和条件(包括反应温度、时间、 Mg^{2+} 浓度以及内、外、环引物用量比)优化及灵敏度和特异性检测, 建立一种基于环介导等温扩增技术(LAMP)的快速检测方法。结果表明: Mg^{2+} 最优浓度为6.0 mmol/L, 内、外、环引物最优用量比为8 : 1 : 4, 在63 °C恒温条件下反应30 min即可检测到皮特不动杆菌, 反应60 min可获得最优结果; 该LAMP方法的灵敏度是常规PCR方法的100倍, 最低检出量为1.4 cfu/mL; 在特异性检测方面, 该方法仅能检测出皮特不动杆菌, 与嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、摩根菌(*Morganella morganii*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)以及鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)等7种常见致病菌均无交叉反应; 此外, 该方法既可以通过检测体系的颜色变化直观读取结果, 也可以通过琼脂糖凝胶电泳分析结果。由此可见, 本研究中所建立的针对团头鲂源皮特不动杆菌的LAMP快速检测方法具有灵敏度高、特异性强、操作简便等特点, 可用于水产养殖业皮特不动杆菌引起的细菌性败血症的现场快速检测。

关键词: 团头鲂; 皮特不动杆菌; 细菌性败血症; 环介导等温扩增技术(LAMP); $rpoB$; 反应体系

中图分类号: S941.42

文献标志码: A

文章编号: 1007–1032(2025)03–0071–08

Development of a rapid loop-mediated isothermal amplification(LAMP) detection method for *Acinetobacter pittii* in *Megalobrama amblycephala*

ZHANG Ruixuan^{1,2}, CAO Jinglong³, WANG Weimin^{1,2}, LUO Yi^{1,2}, LI Jie^{1,2,4*}

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Aquaculture Education, Wuhan, Hubei 430070, China; 3. Emergency Management Service Center of Hefu Town, Nanxun District, Huzhou, Zhejiang 313017, China; 4. Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: A rapid detection method based on loop-mediated isothermal amplification(LAMP) was developed for *Acinetobacter pittii* in blunt snout bream(*Megalobrama amblycephala*). Specific primers targeting the $rpoB$ housekeeping gene were designed, and the reaction system and conditions, including temperature, time, Mg^{2+}

收稿日期: 2024–12–20

修回日期: 2025–03–11

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2400604)

作者简介: 张瑞轩(1987—), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士, 助理工程师, 主要从事动物疫病研究, zhangruixuan@mail.hzau.edu.cn; *通信作者, 黎洁, 博士, 高级工程师, 主要从事鱼类细菌性疾病研究, lijie@mail.hzau.edu.cn

concentration, and primer ratios, were optimized. The results showed that the optimal condition settings, Mg^{2+} concentration at 6.0 mmol/L, with an inner, outer and loop primer ratio of 8 : 1 : 4. The protocol could detect *A. pittii* within 30 min at 63 °C, with optimal results obtained after 60 min. The sensitivity was 100-fold that of conventional PCR, with a detection limit of 1.4 cfu/mL. The method showed high specificity for *A. pittii*, with no cross-reactivity against seven common fish pathogens, including *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas putida* and *Yersinia ruckeri*. Results could be directly visualized by color change profile or verified via gel electrophoresis. This LAMP protocol could provide high sensitivity, specificity, and simplicity, making it suitable for on-site detection of bacterial septicemia caused by *A. pittii* in aquaculture.

Keywords: *Megalobrama amblycephala*; *Acinetobacter pittii*; bacterial septicemia; loop-mediated isothermal amplification(LAMP); *rpoB*; reaction system

在水产养殖领域,鱼类的健康状况直接关乎产业的经济效益与可持续发展。团头鲂(*Megalobrama amblycephala* Yih)作为中国特有的重要淡水经济鱼类,起源于湖北省梁子湖,主要分布于长江中下游附属湖泊,因其生长迅速、肉质鲜美等特性^[1],在渔业生产中占据重要地位。然而,近年来皮特不动杆菌(*Acinetobacter pittii*)感染给团头鲂养殖带来了严峻挑战。

皮特不动杆菌属非发酵型革兰阴性球杆菌,不动杆菌属,广泛存在于土壤、池塘、养鱼场、废水等潮湿环境中^[2]。它与鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*)、醋酸不动杆菌(*A. calcoaceticus*)、医院不动杆菌(*A. nosocomialis*)等同属于鲍曼-醋酸钙不动杆菌复合体(ACB-complex)。该菌在医院环境中检出率高且危害严重,是医院获得性感染的重要条件致病菌之一^[3-4],尤其在机体免疫力低下时可引发呼吸道感染、菌血症及腹腔感染等症状^[5]。在水产养殖领域,不动杆菌的感染案例亦频见报道。1995年,顾天钊等^[6]于患病鳊鱼体内分离出鲍曼不动杆菌,后来又有美洲鳗鲡(*Anguilla rostrata*)^[7]和异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[8]感染鲍曼不动杆菌的案例,以及虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)^[9]和草鱼^[10]感染约翰逊不动杆菌、黑斑蛙感染洛菲不动杆菌^[11]等病例的报道。华中农业大学研究团队^[12-13]证实了皮特不动杆菌是新兴的鱼类致病菌,在江苏、湖北、河南等多地发病养殖池塘中检测到了100多株病原菌,其中有80多株鉴定为皮特不动杆菌,导致了团头鲂和泥鳅的高发病率和死亡率高。由此可见,不动杆菌已成为水产养殖业的新兴致病菌,对行业的健康发展构成了威胁。

加强该病原的早期快速诊断和筛查至关重要。传统的细菌鉴定方法如分离培养与生化检验,耗时较长且灵敏度有限;分子生物学技术如聚合酶链式反应(PCR)等虽显著提升了检测速度和准确性,然而其依赖精密的温控设备,限制了现场应用。鉴于此,开发高效、便捷、准确且适用于养殖环境的皮特不动杆菌检测技术迫在眉睫。环介导等温扩增(LAMP)技术^[14]以其高特异性、等温扩增等特点,在多种病原微生物检测中展现出巨大潜力。LAMP技术利用*Bst* DNA聚合酶的链置换活性,针对靶基因的6个区域设计4~6条特异性引物,在恒定温度(通常为60~65 °C)下高效扩增目标序列。目前,该技术已成功应用于新冠病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)^[15]、猴痘病毒(Orthopoxvirus monkeypox)^[16]、口蹄疫病毒^[17]等多种病原体的检测,以及水产动物病原体如凡尔滨对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis)^[18]、十足目虹彩病毒(Decapod iridescent virus 1)^[19]、罗非鱼湖病毒(Tilapia lake virus)^[20]、疱疹病毒(Herpesvirus)^[21-23]、弧菌属(*Vibrio*)^[24-29]、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)^[30]、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)^[31]、虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)^[32]、包纳米虫(*Bonamia*)^[33]、华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*)^[34-35]等的检测,极大地提升了检测效率。

当前,LAMP技术尚未应用于团头鲂皮特不动杆菌的检测。鉴于*rpoB*基因在皮特不动杆菌中的高度特异性与稳定性,笔者设计针对*rpoB*基因的LAMP扩增引物,并选用SYBR GREEN I作为扩增结果指示剂,构建一种可视化的LAMP快速检测方

法,旨在为水产养殖业皮特不动杆菌的防控提供一种快速有效的现场检测技术。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株:供试菌株分离自患病团头鲂,经鉴定为皮特不动杆菌(*A. pittii*),该菌株现保存于华中农业大学水产学院实验室。供试对照菌株包括恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、金黄葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),均由华中农业大学水产学院实验室保藏并提供;其他对照菌株包括弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)以及摩根菌(*Morganella morganii*),均购自中国典型培养物保藏中心。

试剂: *Bst* DNA聚合酶(8 000 U/mL)琼脂、10× ThermoPol反应缓冲液购自生工生物工程(上海)股份有限公司; $MgSO_4$ 溶液(100 mmol/L)购自NEB; dNTPs(10 mmol/L)、*Ex Taq* DNA聚合酶由宝生物工程(大连)有限公司提供; SYBR GREEN I由北京索莱宝科技有限公司供应。

主要仪器设备: PCR扩增仪(Eppendorf, Mastercycler® nexus gradient); 凝胶成像系统(Bio-Rad, Gel Doc XR+); 离心机(Eppendorf, 5425); 高压灭菌锅(SANYO, MLS-3780); 电子分析天平(SHIMADZU, TW223L); 微量移液器(Eppendorf); 超净工作台(北京东联哈尔滨仪器制造有限公司, DL-CJ-2NDI); 涡旋混匀器(上海沪西分析仪器厂有限公司); 电泳仪(北京六一仪器厂); 恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司); 恒温摇床(武汉瑞华仪器设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细菌基因组DNA提取

将皮特不动杆菌、恶臭假单胞菌、鲁氏耶尔森氏菌、嗜水气单胞菌、金黄葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、弗氏柠檬酸杆菌以及摩根菌划线接种于相应最适培养基平板上培养,挑取单菌落振荡培养至 $OD_{600\text{ nm}} \approx 0.8$ 。采用普通热裂解法提取细菌DNA: 将 100 μL 菌悬液加入1.5 mL离心管中,于100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴中裂解10~15 min后,12 000 r/min离心2 min,收

集上清液于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 皮特不动杆菌LAMP反应体系建立及反应条件优化

1) LAMP反应基础体系、程序、产物检测及结果判别。参照*Bst* DNA聚合酶使用说明,建立25 μL LAMP反应的基础体系,各成分使用比例列于表1。采用PCR仪进行扩增反应。LAMP反应程序: 先于恒温61 $^{\circ}\text{C}$ 保存60 min; 再于80 $^{\circ}\text{C}$ 作用10 min后终止反应。选择1.2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。向反应管中加入SYBR GREEN I染液,观察颜色变化(颜色由橘红色向黄绿色变化,颜色变化程度与LAMP的扩增强度成正比),从而确定最优条件。

表1 LAMP基础扩增体系

Table 1 The basic amplification system of LAMP			
试剂	原液浓度	加样 体积/ μL	终浓度
dNTPs	10 mmol/L	3.5	1.4 mmol/L
10× ThermoPol反应 缓冲液	10×	2.5	1×
$MgSO_4$ 溶液	100 mmol/L	1.5	6.0 mmol/L
<i>Bst</i> DNA聚合酶	8 000 U/mL	1.0	320 U/mL
内引物(FIP)	10 $\mu\text{mol/L}$	1.6	0.64 $\mu\text{mol/L}$
内引物(BIP)	10 $\mu\text{mol/L}$	1.6	0.64 $\mu\text{mol/L}$
外引物(F3)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.2	0.08 $\mu\text{mol/L}$
外引物(B3)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.2	0.08 $\mu\text{mol/L}$
环引物(LB)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.4	0.16 $\mu\text{mol/L}$
环引物(LF)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.4	0.16 $\mu\text{mol/L}$
DNA模板		2.0	
灭菌双蒸水		10.1	

2) LAMP反应引物筛选。运用MEGA 6.0比对前期实验室分离纯化出的数株皮特不动杆菌的*rpoB*基因序列,找出其保守性最强的一段序列作为目的基因,使用引物设计软件(Primer Explorer 5)共设计10套特异性引物,每套引物包括1对外引物(F3/B3)、1对内引物(FIP/BIP)和1对环引物(LF/LB)。所有引物均由北京擎科生物科技有限公司(武汉分公司)合成。采用LAMP反应的基础体系,对设计的10套特异性引物进行筛选,以获得最适引物组合。

3) LAMP反应温度的优化。共设置56.8、57.8、59.1、60.5、62.0、63.4、64.7、65.8 $^{\circ}\text{C}$ 等8个温度梯度进行扩增反应,从而确定最佳扩增温度。

4) LAMP反应时间的优化。在上述优化的条件下,改变LAMP的反应时间,设置0、15、30、45、60、70 min等6个时间梯度进行扩增反应,从而确定

最佳反应时间。

5) LAMP扩增体系的优化。在温度和反应时间优化的基础上采用单一变量法进行反应体系的优化。首先是Mg²⁺的优化:通过改变Mg²⁺的加样体积(0.0、0.5、1.0、1.5、2.0 μL),设置Mg²⁺终浓度梯度为0.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mmol/L。同时各浓度梯度均设置不加酶的阴性对照。其次是引物比例的优化:通过固定外引物(F3/B3)浓度,调整内引物(FIP/BIP)和环引物(LB/LF)的比例来优化LAMP,设置内引物(FIP/BIP)、外引物(F3/B3)、环引物(LF/LB)的用量比分别为8:1:1、8:1:2、8:1:4、4:1:1、4:1:2、4:1:4、2:1:1、2:1:2、2:1:4、1:1:1、1:1:2、1:1:4,其中,比例中“1”代表上、下游引物各0.2 μL,其余比例按此倍数计算(如8:1:1表示FIP/BIP各1.6 μL,F3/B3各0.2 μL,LF/LB各0.2 μL)。

1.2.3 LAMP扩增反应特异性检测

按照优化后的LAMP扩增条件,分别对皮特不动杆菌、恶臭假单胞菌、鲁氏耶尔森氏菌、嗜水气单胞菌、金黄葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、弗氏柠檬酸杆菌、摩根菌等8株供试菌进行扩增反应,以确定LAMP扩增反应的特异性。

1.2.4 LAMP扩增反应灵敏度检测

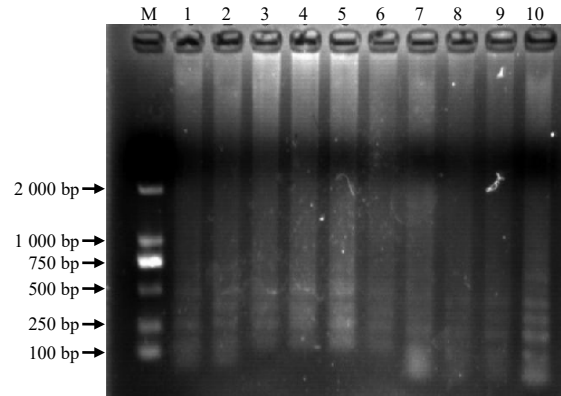
为检测LAMP方法的灵敏度,将皮特不动杆菌的菌悬液(1.4×10⁸ cfu/mL)进行10倍梯度稀释后分别提取DNA,每个梯度各取2 μL作为模板,进行优化后的LAMP扩增和PCR扩增。PCR体系:Premix Ex Taq聚合酶12.5 μL,上游、下游外引物(F3/B3)各1 μL,模板DNA 2 μL,灭菌双蒸水8.5 μL,总体积25 μL。PCR反应条件:95 °C预变性5 min;94 °C变性30 s,50 °C退火1 min,72 °C延伸45 s,共35个循环;72 °C延伸10 min;24 °C保存。选择1.2%琼脂糖凝胶电泳检测LAMP和PCR的扩增产物。

2 结果与分析

2.1 皮特不动杆菌LAMP检测条件优化结果

2.1.1 引物的选择

从图1可知,第10组引物产生的扩增条带最亮且最清晰,故选用第10组引物进行后续试验,其序列列于表2。



M为2 000 bp DNA ladder; 1~10依次为10组引物。

图1 不同引物下LAMP扩增反应的电泳检测结果

Fig.1 Electrophoresis detection results of LAMP amplification reactions with different primer sets

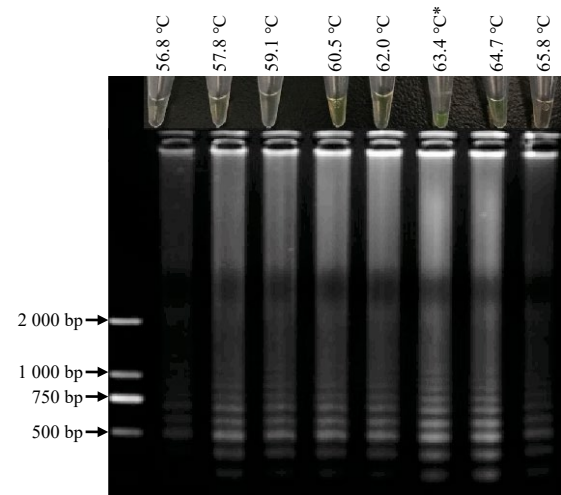
表2 皮特不动杆菌的LAMP引物

Table 2 The primers in LAMP for *Acinetobacter pittii*

名称	序列(5'—3')
上游外引物F3	ATCACCAAGCCCTTTAGC
下游外引物B3	GATAAGATGGCTGGTCGTC
上游内引物FIP	TTGGGCGTACCATCTCGTAT-CGCCATACCT AAGTGAGTC
下游内引物BIP	GTACACCGTTAGCATCGTGTG-CGGTAACA AGGGTGTGTGT
上游环引物LF	ACGTGGGTCAGATTCTTGA
下游环引物LB	GCATGTCTTCAACAGGTAAGATGT

2.1.2 反应温度优化的结果

从图2可知:在56.8、65.8 °C条件下,扩增条带较暗,反应效率较弱;在57.8、59.1、60.5、62.0 °C条件下,扩增条带均呈明亮的阶梯状分布,其中,



*表示最佳反应温度; M为2 000 bp DNA ladder。

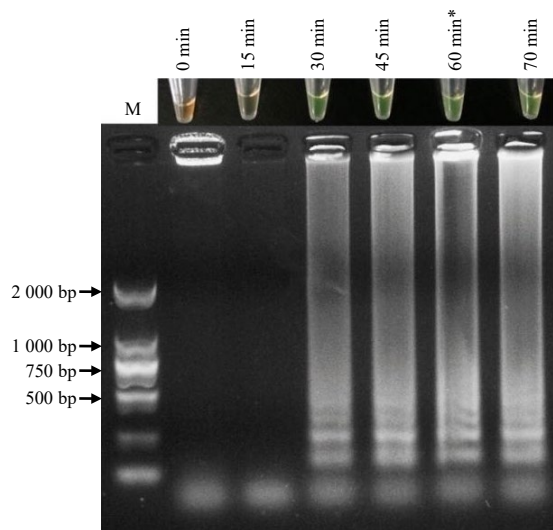
图2 不同反应温度下LAMP扩增反应的电泳和可视化检测结果

Fig.2 Electrophoresis and visual detection results of LAMP amplification at different reaction temperatures

63.4 °C和64.7 °C条件下的扩增条带尤为清晰。据此,选择63~64 °C为皮特不动杆菌LAMP检测的最适反应温度范围。从可视化检测结果可知,所有反应管均观察到颜色变化,但变化程度各异,随着温度的升高,绿色逐渐加深,63.4 °C时绿色最深,随后温度继续升高,颜色又逐渐变淡,其颜色变化与凝胶电泳的检测结果相吻合,这验证了LAMP反应的有效性 & 温度优化的准确性。

2.1.3 反应时间优化的结果

基于最佳反应温度的优化结果,将反应温度设置为63 °C,进行时间的优化试验。结果(图3)显示,从反应30 min开始出现梯形扩增条带,且随反应时间的延长,条带亮度逐渐增强,反应60、70 min时亮度均达到最高。这表明扩增时间达到30 min时即可检测到目标细菌,且在30~70 min内均可检测到目标细菌,其中,最优的反应时间为60 min。可视化检测结果显示,从反应15 min开始,样品颜色出现轻微改变,随着反应时间的增加,样品颜色逐渐加深,且反应45、60、70 min的样品颜色变化相近,其颜色变化与凝胶电泳的检测结果一致,进一步验证了时间优化的准确性。



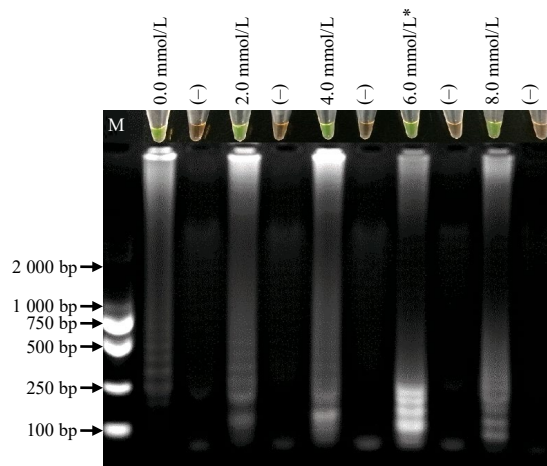
*表示最佳反应时间; M为2 000 bp DNA ladder。

图3 不同反应时间下LAMP扩增反应的电泳和可视化检测结果

Fig.3 Electrophoresis and visual detection results of LAMP amplification at different reaction times

2.1.4 LAMP反应体系的优化

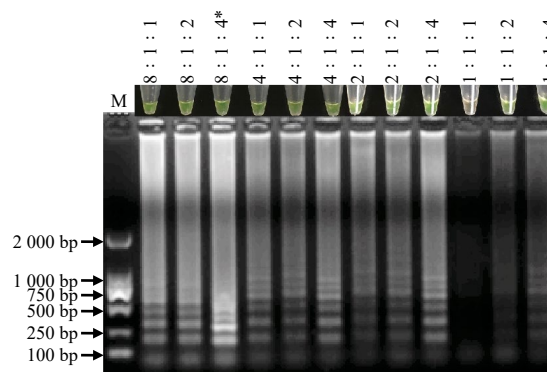
在63 °C条件下对LAMP反应体系中 Mg^{2+} 浓度及引物比例进行了优化,结果如图4和图5所示。



*表示最佳 Mg^{2+} 浓度; M为2 000 bp DNA ladder。

图4 不同 Mg^{2+} 浓度下LAMP扩增反应的电泳和可视化检测结果

Fig.4 Electrophoresis and visual detection results of LAMP amplification at different Mg^{2+} concentrations



*表示最佳引物比例; M为2 000 bp DNA ladder。

图5 不同内、外、环引物用量比下LAMP扩增反应的电泳和可视化检测结果

Fig.5 Electrophoresis and visual detection results of LAMP amplification with different primer ratios of inner, outer and loop primers

从图4可知:当体系中未单独添加 Mg^{2+} 时,LAMP反应虽能进行,但效率极低;随着 Mg^{2+} 浓度的增加,扩增效率逐渐提升,条带亮度也随之增强,当 Mg^{2+} 浓度达6.0 mmol/L时,梯形条带亮度最高,随后继续提高 Mg^{2+} 浓度,梯形条带亮度又有所降低,因此,确定6.0 mmol/L为LAMP扩增体系中最适的 Mg^{2+} 浓度。可视化检测结果显示,正常反应管均出现颜色变化,而对应的不加酶阴性对照管则无颜色变化。

从图5可知,当内、外、环引物用量比为8:1:4时,产物的电泳条带最明亮;可视化检测各反应管均出现颜色变化,但差异不大,仅在内、外、环引

物比为1：1：1时反应管呈现橘色，其余反应管均呈现黄绿色。结合电泳和可视化检测结果，确定内、外、环引物的最佳用量比为8：1：4。

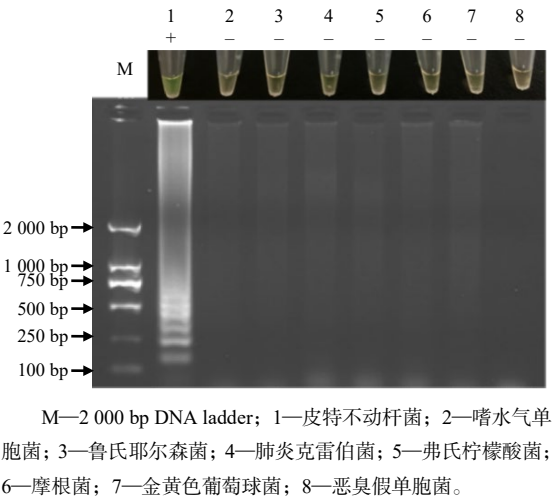
综上，通过对LAMP反应的时间、温度、Mg²⁺浓度及内、外、环引物用量比的探索，最终确定其最优体系(表3)和反应程序。LAMP最优反应程序：63℃下恒温反应60 min，再于80℃作用10 min以终止反应，扩增产物既可使用1.2%的琼脂糖凝胶进行电泳检测，也可加入SYBR GREEN I，根据其颜色变化进行结果判定。

表3 皮特不动杆菌LAMP检测的最优反应体系
Table 3 The optimal reaction system for LAMP detection of *Acinetobacter pittii*

试剂	原液浓度	加样 体积/ μL	终浓度
dNTPs	10 mmol/L	3.5	1.4 mmol/L
10× ThermoPol反应缓冲液	10×	2.5	1×
MgSO ₄ 溶液	100 mmol/L	1.5	6.0 mmol/L
<i>Bst</i> DNA聚合酶	8 000 U/mL	1.0	320 U/mL
内引物(FIP)	10 $\mu\text{mol/L}$	1.6	0.64 $\mu\text{mol/L}$
内引物(BIP)	10 $\mu\text{mol/L}$	1.6	0.64 $\mu\text{mol/L}$
外引物(F3)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.2	0.08 $\mu\text{mol/L}$
外引物(B3)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.2	0.08 $\mu\text{mol/L}$
环引物(LB)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.8	0.32 $\mu\text{mol/L}$
环引物(LF)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.8	0.32 $\mu\text{mol/L}$
DNA模板		2.0	
灭菌双蒸水		9.3	

2.2 LAMP检测皮特不动杆菌的特异性

从图6可知，仅有皮特不动杆菌扩增出清晰的梯状条带，其余7株参考菌株均未扩增出任何条带；仅1号皮特不动杆菌反应管变为绿色(阳性)，其余均为橘红色(阴性)，与琼脂糖凝胶电泳的结果一致。这表明建立的皮特不动杆菌LAMP恒温检测方法具有较高的特异性，未与其他鱼类常见致病菌发生交叉反应，且SYBR GREEN I能准确指示检测结果。

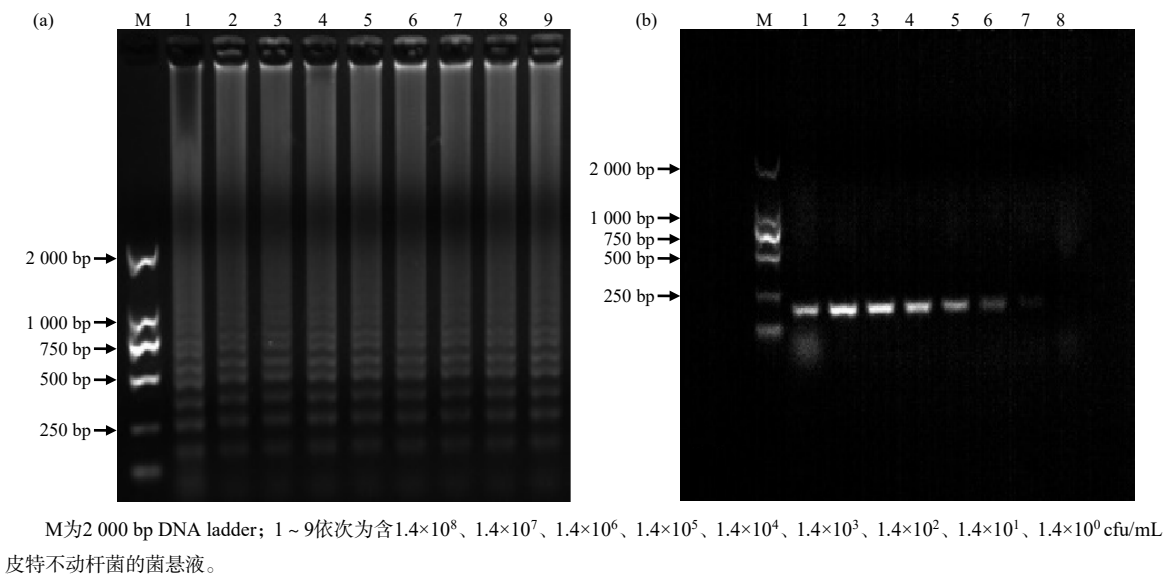


M—2 000 bp DNA ladder; 1—皮特不动杆菌; 2—嗜水气单胞菌; 3—鲁氏耶尔森菌; 4—肺炎克雷伯菌; 5—弗氏柠檬酸菌; 6—摩根菌; 7—金黄色葡萄球菌; 8—恶臭假单胞菌。

图6 LAMP检测方法特异性检测的结果
Fig.6 The specificity detection for LAMP

2.3 皮特不动杆菌LAMP检测的灵敏度

从图7可知，LAMP检测灵敏度可达1.4 cfu/mL，而普通PCR的检测灵敏度为1.4×10² cfu/mL。由此可见皮特不动杆菌LAMP方法的检测灵敏度是同等条件下普通PCR反应的100倍。



M为2 000 bp DNA ladder; 1~9依次为含1.4×10⁸、1.4×10⁷、1.4×10⁶、1.4×10⁵、1.4×10⁴、1.4×10³、1.4×10²、1.4×10¹、1.4×10⁰ cfu/mL 皮特不动杆菌的菌悬液。

(a) LAMP扩增方法; (b) PCR法
图7 LAMP与普通PCR灵敏度检测的结果

Fig.7 Results of sensitivity detection of LAMP and conventional PCR

3 结论与讨论

本研究中,基于 $rpoB$ 基因保守区域设计扩增引物,成功建立了专用于皮特不动杆菌的可视化LAMP检测方法,其灵敏度达 1.4 cfu/mL ,远高于常规PCR的 $1.4\times 10^2\text{ cfu/mL}$,这表明LAMP技术在早期病菌检测中具有明显优势。

$rpoB$ 基因编码RNA聚合酶 β 亚基,在细菌转录过程中起关键作用,兼具保守性与变异性^[36]。保守区便于引物设计,变异区可区分细菌种属^[37]。因此,在特异性检测中,嗜水气单胞菌等7种对照菌株未扩增,其 $rpoB$ 基因序列在引物结合区域与皮特不动杆菌存在碱基差异,导致引物无法有效结合,体现了引物设计的高度特异性。

从温度优化结果来看,在 $63\sim 64\text{ }^{\circ}\text{C}$ 扩增效果最佳,这与 Bst DNA聚合酶在此温度下活性最高且引物-模板复合物稳定性适中^[38]相关,类似的温度依赖现象在普通PCR扩增中也有体现^[39],进一步验证了温度优化的合理性。 Mg^{2+} 浓度为 6.0 mmol/L ,内、外、环引物用量比为 $8:1:4$ 以及 $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min 时检测效果最佳,这是因为合适的 Mg^{2+} 浓度保证了酶的活性和引物与模板的结合^[38],引物比例优化提高了扩增效率,而适宜的温度和时间为扩增提供了良好的反应条件,三者协同作用实现了高灵敏度和特异性的检测结果。

LAMP技术加入环引物LF和LB,可缩短扩增时间至 30 min ,灵敏度比常规PCR的高100倍,对皮特不动杆菌具有高度特异性,且等温扩增无需复杂的温控设备,适用于野外简陋条件。此外,该技术可视化优势显著,无需借助复杂的仪器或操作,实验人员仅凭肉眼即可观察到结果,极大地提高了实验效率。与传统检测方法相比,无论是在临床诊断的快速筛查,还是现场的即时检测,都展现出广阔的应用前景和极高的实用价值。

然而,LAMP技术也存在引物设计复杂、对交叉污染敏感、易受外源遗传物质干扰等不足^[40]。未来可探索LAMP技术在不同环境样品中的应用效果、与同属病原微生物的交叉反应情况,以及与其他技术如基因芯片、高通量测序等的结合,进一步提高LAMP技术的实用性、准确性和灵敏度。同时,针对LAMP技术的不足进行改进,如简化引物设计流程、提高对交叉污染的抵抗力等,也是未来研究

的重要方向。总之,LAMP技术在水产动物细菌性病原检测方面展现出了较大的优势和广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] GAO Z X, LUO W, LIU H, et al. Transcriptome analysis and SSR/SNP markers information of the blunt snout bream(*Megalobrama amblycephala*)[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42637.
- [2] AL ATROUNI A, JOLY-GUILLOU M L, HAMZE M, et al. Reservoirs of non-baumannii *Acinetobacter* species[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 49.
- [3] VIJAYAKUMAR S, BISWAS I, VEERARAGHAVAN B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update[J]. Future Science OA, 2019, 5(6): FSO395.
- [4] VILLALÓN P, ORTEGA M, SÁEZ-NIETO J A, et al. Dynamics of a sporadic nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex population[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 593.
- [5] SAHL J W, GILLECE J D, SCHUPP J M, et al. Evolution of a pathogen: a comparative genomics analysis identifies a genetic pathway to pathogenesis in *Acinetobacter*[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54287.
- [6] 顾天钊, 陆承平, 陈怀青. 鲍氏不动杆菌: 鳊鱼暴发性死亡的新病原[J]. 微生物学通报, 1997, 24(2): 104-106, 83.
- [7] 孙云, 何明旺, 张盼盼, 等. 美洲鳊鳊致病性鲍曼不动杆菌的分离、鉴定及致病性分析[J]. 水产学报, 2020, 44(9): 1561-1571.
- [8] 陆文浩, 陈辉, 王习达, 等. 异育银鲫致病性鲍曼不动杆菌的鉴定和系统发育分析[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(4): 303-309.
- [9] KOZIŃSKA A, PAŹDZIOR E, PEKALA A, et al. *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii*: the emerging fish pathogens[J]. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2014, 58(2): 193-199.
- [10] 胡秀彩, 吕爱军, 孙敬锋, 等. 草鱼肠道约氏不动杆菌的分离鉴定及药敏特性研究[J]. 水生态学杂志, 2019, 40(5): 99-103.
- [11] 李成伟, 王均, 苏航, 等. 黑斑蛙腐皮病病原分离、鉴定及致病性研究[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(17): 174-178.
- [12] LI J, CAO J L, WANG X, et al. *Acinetobacter pittii*, an emerging new multi-drug resistant fish pathogen isolated from diseased blunt snout bream(*Megalobrama amblycephala* Yih) in China[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(16): 6459-6471.
- [13] WANG X, LI J, CAO X J, et al. Isolation, identification and characterisation of an emerging fish pathogen, *Acinetobacter pittii*, from diseased loach(*Misgurnus anguillicaudatus*) in China[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2020, 113(1): 21-32.
- [14] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al.

- Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63.
- [15] LAMB L E, BARTOLONE S N, WARDE E, et al. Rapid detection of novel coronavirus/Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2(SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification[J]. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0234682.
- [16] YU C, ZUO L L, MIAO J, et al. Development of a novel loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of monkeypox virus infections[J]. *Viruses*, 2023, 15(1): 84.
- [17] LIM D R, KIM H R, CHAE H G, et al. Probe-based real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification(RRT-LAMP) assay for rapid and specific detection of foot-and-mouth disease virus[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(6): 2936–2945.
- [18] 葛辉, 吴建绍, 杨章武, 等. 凡纳滨对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)可视化环介导等温扩增(LAMP)技术方法的优化与应用[J]. *渔业研究*, 2021, 43(4): 357–365.
- [19] 邹莹, 郭晓萌, 万晓媛, 等. 十足目虹彩病毒(DIV1)环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用[J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 156–164.
- [20] YIN J Y, WANG Q, WANG Y Y, et al. Development of a simple and rapid reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification(RT-LAMP) assay for sensitive detection of *Tilapia lake virus*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(6): 817–824.
- [21] CANO I, WORSWICK J, MULHEARN B, et al. A seasonal study of koi herpesvirus and koi sleepy disease outbreaks in the United Kingdom in 2018 using a pond-side test[J]. *Animals*, 2021, 11(2): 459.
- [22] HE J Q, SHI X J, YU L, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of Cyprinid herpesvirus 2[J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 194(1/2): 206–210.
- [23] LIANG L G, XIE J, LUO D. Development of a rapid cyprinid herpesvirus 2 detection method by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 59(4): 432–437.
- [24] TIAN Z, YANG L L, QI X, et al. Visual LAMP method for the detection of *Vibrio vulnificus* in aquatic products and environmental water[J]. *BMC Microbiology*, 2022, 22(1): 256.
- [25] RAHMAN A M A, RANSANGAN J, SUBBIAH V K. Improvements to the rapid detection of the marine pathogenic bacterium, *Vibrio harveyi*, using loop-mediated isothermal amplification(LAMP) in combination with SYBR green[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(12): 2346.
- [26] ANUPAMA K P, CHAKRABORTY A, KARUNASAGAR I, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay as a point-of-care diagnostic tool for *Vibrio parahaemolyticus*: recent developments and improvements[J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2019, 19(3): 229–239.
- [27] 李涛, 周永灿, 曹贞洁, 等. 哈维氏弧菌可视化LAMP快速检测方法的建立及应用[J]. *广东海洋大学学报*, 2023, 43(6): 81–88.
- [28] 仲瑶, 贾惠齐, 苏鹏, 等. 水产品中哈维氏弧菌等温快速检测方法优化及比较[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(22): 143–151.
- [29] 邱洁瑜, 许乐儿, 张晴雅, 等. 牡蛎副溶血性弧菌原位LAMP方法的建立[J]. *中国食品工业*, 2023(23): 57–59.
- [30] ZHOU S, HUANG Q, YU M M, et al. Rapid visual detection of *Aeromonas salmonicida* by loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2021, 44(12): 1993–2001.
- [31] 公翠萍, 姜剑锋, 孙威, 等. 弗氏柠檬酸杆菌可视化LAMP检测方法的建立[J]. *水产学杂志*, 2025, 38(1): 78–81.
- [32] MA B, YU H T, FANG J H, et al. Employing DNA binding dye to improve detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in real-time LAMP[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 15860.
- [33] CANO I, WOOD G, STONE D, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the fast detection of *Bonamia ostreae* and *Bonamia exitiosa* in flat oysters[J]. *Pathogens*, 2024, 13(2): 132.
- [34] CAI X Q, XU M J, WANG Y H, et al. Sensitive and rapid detection of *Clonorchis sinensis* infection in fish by loop-mediated isothermal amplification(LAMP)[J]. *Parasitology Research*, 2010, 106(6): 1379–1383.
- [35] CHEN Y, WEN T, LAI D H, et al. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Clonorchis sinensis* from its first intermediate hosts, freshwater snails[J]. *Parasitology*, 2013, 140(11): 1377–1383.
- [36] ADÉKAMBI T, DRANCOURT M, RAOULT D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists[J]. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(1): 37–45.
- [37] LA SCOLA B, GUNDI V A K B, KHAMIS A, et al. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(3): 827–832.
- [38] OSCORBIN I, FILIPENKO M. *Bst* polymerase: a humble relative of *Taq* polymerase[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2023, 21: 4519–4535.
- [39] ALICIA GARCÍA F. Polymerase chain reaction(PCR) and how temperature modifies nucleotide pairings[J]. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*, 2021, 20(1): 556027.
- [40] LI R, WANG C, JI L L, et al. Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) assay for GMO on: recent progresses and future perspectives[J]. *Open Access Library Journal(OALib)*, 2015, 2: e1264.

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 柳 正