

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2019.08.04

沙门氏菌 LAMP 快速检测方法的建立

郭澍强, 贺生芳, 郝俊虎*, 谈静慧, 杨旭光, 李婧

(宁夏检验检疫局检验检疫综合技术中心, 银川 750002)

[收稿日期] 2019-03-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 08-0023-07 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为实现沙门氏菌的快速检测, 根据沙门氏菌特异性 *invE*、*hilA*、*invA*、*hut* 基因编码区序列, 分别设计合成 4 套引物, 通过对引物筛选和反应条件优化, 建立了以 *invA* 特异性基因设计合成引物的沙门氏菌环介导等温扩增检测方法。本方法对沙门氏菌定性检测灵敏度可达到 10^1 CFU/mL (细菌浓度), 其灵敏度比普通 PCR 高 10 倍且反应结果易于观察。以 6 种沙门氏菌和 8 种非沙门氏菌细菌 DNA 为模板进行 LAMP 扩增检测, 并无交叉反应。结果显示, 设计的 LAMP 引物组和建立的沙门氏菌的 LAMP 检测方法具有特异性好、灵敏度高、快速、费用低廉等优点, 可应用于动物和食品样品中肠道沙门氏菌 6 个亚种的快速检测。

[关键词] 沙门氏菌; LAMP; *invA* 基因; 引物; 检测方法

Development of Rapid LAMP Test Method for *Salmonella*

GUO Shu-qiang, HE Sheng-fang, HAO Jun-hu*, TAN Jing-hui, YANG Xu-guang, LI Jing

(Technology Center of Ningxia Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Yinchuan 750002, China)

Corresponding author: HAO Jun-hu, E-mail: 676989752@qq.com

Abstract: In order to establish a rapid detection of *Salmonella*, four pairs of primers were designed and synthesized according to the *invE*, *hilA*, *invA* and *hut* gene sequences of *Salmonella*. By screening primers and optimizing reaction conditions, one *Salmonella* loop-mediated isothermal amplification assay was developed using *invA* primers. The sensitivity of the method for qualitative detection of *Salmonella* could reach 10^1 CFU/mL, and its sensitivity was 10 times higher than that of ordinary PCR, and the reaction result is easy to observe. LAMP amplification assays were performed when 6 *Salmonella* and 8 non-*Salmonella* bacterial DNAs was used as templates. The results showed that the LAMP detection method of *Salmonella* has the advantages of high specificity, high sensitivity, rapidity and low cost, which can be applied to the rapid detection of six subspecies of *Salmonella* in animal and food samples.

Key words: *Salmonella*; LAMP; *invA* gene; primer; detection method

作者简介: 郭澍强, 硕士, 从事动物检疫及临床兽医诊断技术研究。

通讯作者: 郝俊虎。E-mail: 676989752@qq.com

沙门氏菌是肠杆菌科中的一个重要菌属^[1],可引起鸡白痢、禽伤寒、犊牛腹泻、奶牛乳房炎等多种动物疾病^[2-4]。同时,沙门氏菌也是一种重要的食源性致病菌,据统计,目前世界上 85% 的食物中毒是由沙门氏菌引起的^[5]。目前,对沙门氏菌的传统检测方法需要较长的实验周期,试剂多且杂^[6],在快速、特异检测方面具有一定的局限性。而其它各种检测方法敏感、快速,却需昂贵庞大的仪器设备、复杂繁琐的电泳过程等,进而使检测在受到条件限制的检验工作中,很难得到普遍应用^[7]。

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是 Notomi 等人在 2000 年发明的一种新的恒温核酸扩增技术。LAMP 技术可实现在恒温条件下(一般在 60 ~ 65 ℃)快速连续扩增,具有实验过程快速、简便,仪器设备简单、便携,

检测结果特异性强、灵敏度高的优点。LAMP 扩增结果观察方式多,凝胶成像系统观察结果、肉眼观察颜色变化及试纸条技术,也可使用实时荧光法和实时浊度法,通过实时荧光 PCR 仪或实时浊度仪对扩增结果进行实时观察^[8]。针对我国目前严峻的食品安全问题和复杂的口岸卫生监控形势,本文开展了沙门氏菌 LAMP 快速检测方法的研究,以实现快速检测。

1 材料与amp方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株及抗原 沙门氏菌实验用标准菌株购自中国工业微生物保存中心和北京路桥技术股份有限公司,试验用凝集抗原购自中国兽药药品监察所,详情见表 1。

表 1 菌种及抗原

Tab 1 Strains and antigens

菌株名称	编号	来源
鼠伤寒沙门氏菌	ATCC 14028	北京陆桥
甲型副伤寒沙门氏菌	ATCC 50084	北京陆桥
乙型副伤寒沙门氏菌	ATCC 50094	北京陆桥
鸡白痢及禽伤寒沙门氏菌凝集抗原	2018.05	中国兽药药品监察所
肠炎沙门氏菌	ATCC50335	北京陆桥
金黄色葡萄球菌	ATCC 6538	北京陆桥
痢疾志贺氏菌	CICC 10983	工业微生物菌种保藏中心
阪崎肠杆菌	CICC 21560	工业微生物菌种保藏中心
霍乱弧菌	CICC 23794	工业微生物菌种保藏中心
致病性大肠埃希氏菌	CICC 10372	工业微生物菌种保藏中心
布氏杆菌试管凝集抗原	2018.06	中国兽药药品监察所
肠出血性大肠埃希氏菌	CICC 21530	工业微生物菌种保藏中心
单增李斯特菌	ATCC 19115	北京陆桥
炭疽沉淀抗原	2018.09	中国兽药药品监察所

1.1.2 主要试剂和设备 上海生工细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒(产品批号: B518225), 荣研生物科技(中国)有限公司 2 × 反应缓冲液 RM、Bst DNA 聚合酶(产品批号: 5Z006), 天根 2 × Taq PCR Master Mix(产品批号: P4218), DL 1000 DNA Marker

(产品编号: 3591A), Applied Biosystems Veriti 96 - Well PCR 扩增仪, 日本荣研 LT - 16alpha 恒温扩增基因检测系统, Bio - radChemiDocXRS + 凝胶成像系统, 北京市六一仪器厂 DYY - 12 型电泳仪, Heal Force 生物安全柜。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计合成 按照 LAMP 引物设计原则,根据 GenBank 数据库中的沙门氏菌特异基因组序列,进行多序列比对,寻找一段高度保守区作为扩增对象,然后通过分子生物学软件 LAMP

Designer5 设计 4 组引物。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,采用 HPLC 纯化方式。合成后的引物用超纯水稀释成 100 pmol/L 溶液, -20 ℃ 保存备用。各引物序列见表 2。

表 2 沙门氏菌的 LAMP 检测用引物

Tab 2 Primers for LAMP Detection of *Salmonella*

基因	引物	序列(5' -3')
invA	F3	GAACGTGTCGCGGAAGTC
	B3	CGGCAATAGCGTCACCTT
	FIP	CCGGCCTTCAAATCGGCATCAATTTTGCCGATTTTCTCTGGATGG
	BIP	GAACGGCGAAGCGTACTGGATTTTCATCGCACCGTCAAAGGAA
hilA	F3	CGAAAATAACGCTGGGCAGA
	B3	ATCGCCAGTTGCAGAACG
	FIP	GCCCGGCGTAGATAATACGCAGTTTTGTACGCCGCTTTATTTCGT
	BIP	CCGGGGATCGGGACTCGTTATTTTTTTTATCGACCGACGGGATG
Hut	F3	GCGGATATTGCCGTGGAT
	B3	TGAGAAACAATCCGCGACG
	FIP	GTTCCCTTCCGTTAGCGGCTTTTTACCTGACGCAGGATTACCG
	BIP	CGCAAGAGTCCGCGTGTTATTTTGTACGACGAATGAGCAGACA
invE	F3	GCGACCCAGCATACTGATG
	B3	GCCTTCGGTAAAGCCTCATC
	FIP	GACATTTTCGTCGCTCGACTGGATTTTGGAAATACAACAGGCCGCA
	BIP	GCGGCTGGCCGAATTTTCGTATTTTAGCACGCGTTCAAACCTGT

1.2.2 最优引物的筛选 将生工生物工程(上海)股份有限公司合成的 4 组引物(invA 引物组、hilA 引物组、hut 引物组、invE 引物组)以沙门氏菌 DNA 为模板,吸取 20 μL 反应缓冲液和 1 μL Bst DNA 聚合酶制备预混溶液,每个反应管添加 20 μL 预混溶液,再添加 5 μL 试样溶液或对照溶液,待上机,后续试验溶液配制同等,在荣研 LT-16alpha 恒温扩增基因检测系统上同时进行 LAMP 反应,并设空白对照,反应温度为 65 ℃,反应时间为 60 min。日本荣研 LT-16alpha 恒温扩增基因检测系统有 Left 和 Right 两个反应槽,各反应槽有 8 个反应孔,其中 Left 反应槽的反应孔编号为 NO.1-8,Right 反应槽的反应孔编号为 NO.9-16,反应结束后观察扩增

曲线并读取 Tt(浊度上升开始时间)值和 Df(浊度上升值)值。

1.2.3 LAMP 反应条件的优化

1.2.3.1 反应温度的优化 以 1.2.2 筛选的最优引物组作为反应温度优化的扩增引物,以沙门氏菌 DNA 为模板,95 ℃ 酶失活 2 min,做 6 组对照,分别将反应混合物放在 60 ℃、61 ℃、62 ℃、63 ℃、64 ℃、65 ℃ 反应条件下进行 LAMP 反应,并设空白对照,反应结束后观察扩增曲线并读取 Tt 值和 Df 值。

1.2.3.2 反应时间的优化 以 1.2.2 筛选的最优引物组作为扩增引物,以沙门氏菌 DNA 为模板,以 1.2.3.1 筛选的最优温度设为反应温度,95 ℃ 酶失活 2 min,做 4 组对照,分别将反应混合物放在

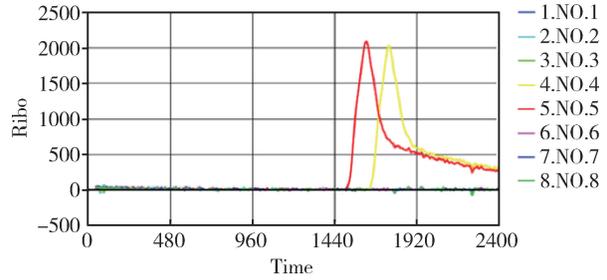
30 min、40 min、50 min、60 min 反应条件下进行 LAMP 反应,并设空白对照,反应结束后观察扩增曲线并读取 Tt 值和 Df 值。

1.2.4 特异性试验 为了验证设计引物对沙门氏菌检测的特异性,用 1.2.2 反应体系和 1.2.3 优化后条件,以 7 株非沙门氏菌细菌和 4 株阳性对照沙门氏菌培养物提取的 DNA、鸡白痢及禽伤寒沙门氏菌凝集抗原 DNA、布氏杆菌试管凝集抗原 DNA、炭疽沉淀抗原 DNA 为模板进行 LAMP 扩增检测,并设置空白对照,NO. 2 - 8(a) 依次为甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、鸡白痢及副伤寒沙门氏菌凝集抗原、肠炎沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、痢疾志贺菌,NO. 10 - 16(b) 依次为阪崎杆菌、霍乱弧菌、肠出血行大肠杆菌 O157:H7、致病性大肠埃希氏菌、布氏杆菌试管凝集抗原、单增李斯特菌、炭疽沉淀抗原,Left 反应槽的 NO. 1 和 Right 反应槽的 NO. 9 均为空白对照,反应结束后观察各反应孔有无扩增曲线的出现。

1.2.5 灵敏度试验 37 °C 培养后的菌液,用生理盐水 10 倍倍比稀释至 10^{-10} 。取菌落数在 30 ~ 300 之间的平板作平板计数,用该浓度级的 3 个平板菌落均数推算细菌浓度:菌落均数 × 稀释倍数 × 10;经平板计数,沙门氏菌原菌液浓度为 5×10^8 CFU/mL,10 倍倍比稀释后,对系列稀释的菌液进行 LAMP 与 PCR 检测,LAMP 反应条件同上,PCR 反应条件为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 40 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,进行 30 个循环;72 °C 延伸 5 min,4 °C 保存反应产物,反应结束后,取反应产物进行凝胶电泳检测,预计 PCR 产物长度为 194 bp,LAMP 反应结束后观察各反应孔有无扩增曲线的出现。

2 结果与分析

2.1 最优引物的筛选 反应结束后,通过观察扩增曲线并读取 Tt 值和 Df 值。结果显示,invA 引物组和 hut 引物组有扩增曲线,invA 引物组 Tt 值最早,且 Df 最高(图 1),说明 invA 引物组为最优引物组。invA 引物组 Tt 值和 Df 值的具体数值见表 3。



NO. 1 - 5 分别为空白对照、invE 引物组、hilA 引物组、hut 引物组和 invA 引物组

NO. 1 - 5 were the blank control group, invE primer group, hilA primer group, hut primer group and invA primer group

图 1 筛选最优引物组扩增曲线图

Fig 1 Screening the amplification curve of the optimal primer group

表 3 LAMP 引物筛选试验 Tt 值和 Df 值

Tab 3 Tt and Df values of LAMP primer screening test

NO	扩增组	Tt 值/min	Df 值
1	空白对照	--	--
2	invE 引物组	--	--
3	hilA 引物组	--	--
4	Hut 引物组	28:09	2025
5	invA 引物组	25:54	2097

2.2 LAMP 反应条件的优化

2.2.1 反应温度的优化 反应结束后,通过观察扩增曲线并读取 Tt 值和 Df 值。结果显示,当反应温度为 64 °C 时,引物组 Tt 值最早,且 Df 最高,扩增效果最好,说明最优反应温度为 64 °C。各反应组 Tt 值和曲 Df 值具体数值见表 4。

表 4 LAMP 反应温度优化试验的 Tt 值和 Df 值

Tab 4 Tt and Df values of LAMP reaction temperature optimization were obtained

No	反应温度/°C	Tt 值/min	Df 值
1	60	32:32	1456
2	61	29:06	1838
3	62	29:18	1849
4	63	26:53	2011
5	64	25:14	2135
6	65	26:41	1993

2.2.2 反应时间的优化 反应结束后,通过观察扩增曲线并读取 Tt 值和 Df 值。结果显示,当反应时间为 40 min 时,引物组 Tt 值最早,且 Df 最高,扩增效果最好,用时最短,因此,引物组 invA 扩增反应的最佳时间为 40 min。各反应组 Tt 值和 Df 值具体数值见表 5。

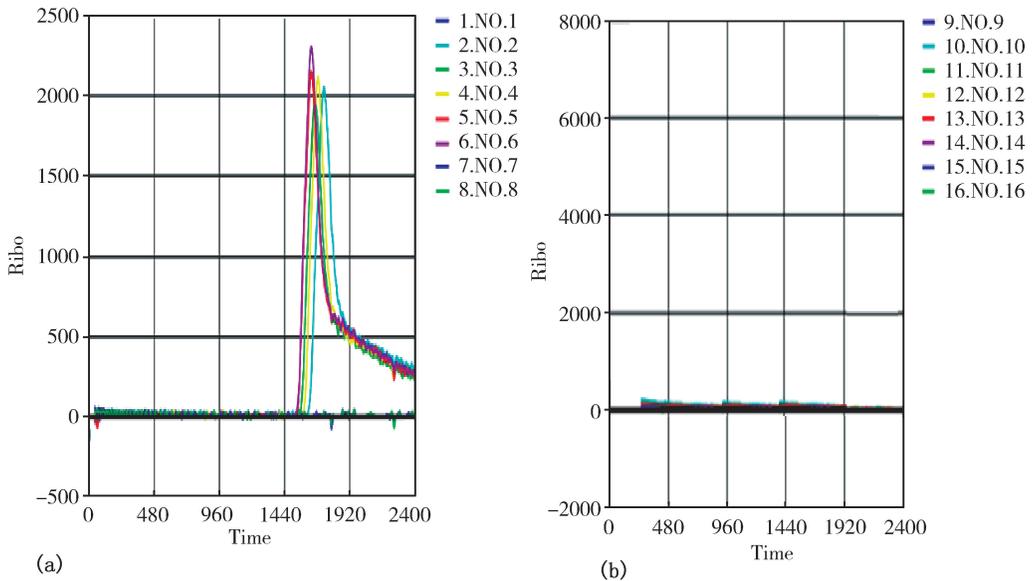
2.3 特异性试验 从图 2 可以看出,a 中 NO.2-6 反应孔有扩增曲线,其余反应孔均无扩增曲线,说明只有以沙门氏菌纯培养物、鸡白痢及副伤寒沙门氏菌凝集抗原提取的 DNA 模板有扩增曲线出现,其他反应孔均无扩增曲线出现。因此,引物组

表 5 LAMP 反应时间优化试验的 Tt 值和 Df 值

Tab 5 Tt and Df values in optimal LAMP

reaction time were obtained			
序号	反应时间/min	Tm 值/min	Df 值
1	30	—	—
2	40	26:43	2051
3	50	27:06	2044
4	60	27:15	1408

invA 引物组对沙门氏菌具有特异性,可用于对肠道沙门氏菌 6 个亚种的特异性检测。



NO.2-8(a)依次为甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、鸡白痢及副伤寒沙门氏菌凝集抗原、肠炎沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、痢疾志贺菌;NO.10-16(b)依次为阪崎杆菌、霍乱弧菌、肠出血性大肠杆菌 O157:H7、致病性大肠埃希氏菌、布氏杆菌试管凝集抗原、单增李斯特菌、炭疽沉淀抗原;NO.1和NO.9均为空白对照
NO.2-8(a) were *Paratyphoid salmonella a*, *Paratyphoid salmonella b*, *Paratyphoid salmonella murine*, *Pullorum gallinae* and *Paratyphoid salmonella agglutination antigen*, *Salmonella enteritis*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysentery*, respectively;
NO.10-16(b) were successively *Enterobacter sakazakii*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* O157:H7, pathogenic *E. coli*, *Brucella in vitro* agglutination antigen, *Listeria monocytogenes*, and *Anthrax* precipitation antigen, NO.1 and NO.9 were blank controls

图 2 特异性实验的扩增曲线图

Fig 2 Amplification curves of specific experiments

2.4 灵敏度试验 LAMP 检测扩增曲线结果见表 6, LAMP 灵敏度试验检测结果见图 3, PCR 检测结果见图 4。结果表明, PCR 法检测限为

10²CFU/mL, LAMP 检测限为 10, 其检测灵敏度是 PCR 方法的 10 倍, 说明 LAMP 检测方法的灵敏度优于 PCR 法。

表 6 灵敏度试验的 LAMP 检测结果

Tab 6 LAMP test results of sensitivity test

No	反应组/(CFU · mL ⁻¹)	Tt 值/min	Df 值
1	空白对照	—	—
2	10 ⁷	24: 13	2134
3	10 ⁶	24: 07	2132
4	10 ⁵	24: 12	2309
5	10 ⁴	24: 28	2324
6	10 ³	24: 50	2236
7	10 ²	24: 51	2200
8	10 ¹	23: 33	2239
9	10 ⁻¹	—	—

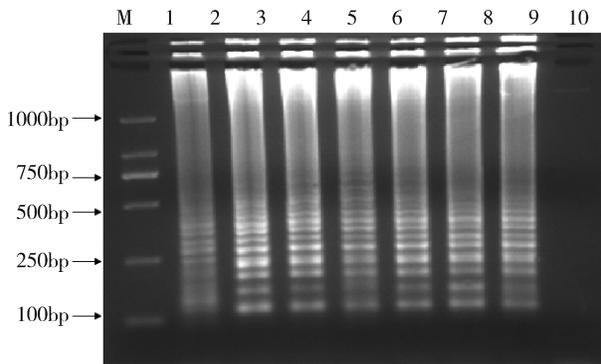


图 3 LAMP 灵敏度试验检测结果电泳图

Fig 3 Electrophoresis diagram of the results of LAMP sensitivity test

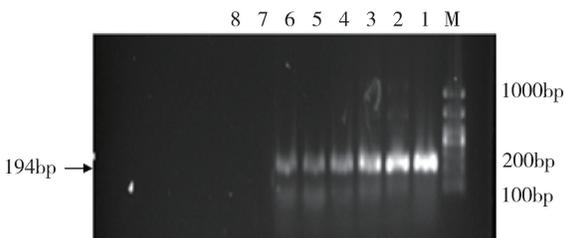
1-8 分别为 10⁷ ~ 10¹ CFU/mL 菌液和空白对照

图 4 灵敏度试验 PCR 检测电泳图

Fig 4 Electrophoresis was detected by PCR sensitivity test

3 讨论与结论

沙门氏菌病为人兽共患病,沙门氏菌即可引起多种动物感染,同时作为一种重要的食源性致病菌也可引起人类多种疾病。沙门氏菌在人类和动物

上引起的疾病主要临床症状表现为败血症和肠炎引起的腹泻,其临床表现与其它细菌、病毒引起的疾病症状非常相似,难以鉴别。随着人们对食品安全问题的重视程度日渐增高和基层兽医、一线口岸对快速检测、快速通关的要求,传统检测沙门氏菌耗时长、过程复杂,难以满足快速检测的要求。所以,有必要建立一种能快速、准确、简便、费用低廉的检测沙门氏菌的方法。而 LAMP 技术在特异性、灵敏度、反应时间、反应设备等方面占据明显优势,已被应用于细菌、病毒等的检测。LAMP 技术优点突出,不需要模板热变性、长时间温度循环、繁琐的电泳等过程,效率高,观察结果方便多样,非常适合基层和口岸一线工作人员大规模样品的快速检测。

相关研究表明,沙门氏菌 *invA* 基因具有属特异性,常被用作检测沙门氏菌的靶向基因^[9]。本实验通过对沙门氏菌 *invA* 特异性基因设计内外侧 4 条引物,通过对反应条件的优化,建立了肠道沙门氏菌 6 个亚种的 LAMP 快速检测方法,方法灵敏度可达到 10¹ CFU/mL(细菌浓度),其灵敏度比普通 PCR 高 10 倍且反应结果易于观察。LAMP 扩增产物进行凝胶电泳分析容易发生气溶胶污染,添加指示剂增加试验复杂程度,且观察容易出现误判。本试验利用 LAMP 等温实时浊度仪,通过测定扩增基因时出现的副产物焦磷酸镁的混浊度来判断是否存在目标基因。本方法通过仪器读取浊度吸光值,观察有无扩增曲线直接定性判定沙门氏菌检测阴阳性,方法操作方便快捷,灵敏度高,特异性强,恒温条件下实现快速检测,同时也避免了气溶胶对实验室的污染,特别适用于基层兽医、食品及口岸一线部门检测使用,对动物沙门氏菌及食品安全进行快速筛查具有重要意义。

参考文献:

- [1] World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th edition. Paris: Institute Pasteur, 2007:6 [M/OL]. [2019-03-15]. <https://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrechr/salmoms-index.html>.

- [2] Ogilvie T H. The persistent isolation of *Salmonella typhimurium* from the mammary gland of a dairy cow [J]. The Canadian Veterinary Journal, 1986, 27(9):329.
- [3] 王燕, 刘会杰, 马弘财, 等. 西藏拉萨市鸡源沙门氏菌分子生物学鉴定与血清分型[J]. 中国动物检疫, 2019, 36(2): 63-67.
- Wang Y, Liu H J, Ma H C, et al. Molecular biology identification and serotyping of chicken *Salmonella* in Lhasa City of Tibet [J]. China Animal Health Inspection, 2019, 36(2):63-67.
- [4] Cho Y I, Han J I, Wang C, et al. Casecontrol study of microbiological etiology associated with calf diarrhea [J]. Veterinary Microbiology, 2013, 166(3/4):375-385.
- [5] Office International des Epizooties. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: Office International des Epizooties, 2016: 1-3 [M/OL]. [2019-03-15]. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards.
- [6] 国家食品药品监督管理总局, 国家卫生和计划生育委员会. GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016-12-23.
- China Food and Drug Administration, National Health and Family Planning Commission of PRC. GB 4789.4-2016 National food safety standard - microbiological examination: *Salmonella* [S]. Beijing: Standards Press of China, 2016-12-23.
- [7] 赵春阳, 江强世, 刘畅, 等. 沙门氏菌检测方法研究进展 [J]. 中国奶牛, 2018(10):27-31.
- Zhao C Y, Jiang Q S, Liu C, et al. Advances in detection methods of *Salmonella* [J]. China Dairy Cattle, 2018(10): 27-31.
- [8] 刘业兵, 王强. 恒温扩增技术在动物疫病病原检测中应用现状及展望 [J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(10):9-13.
- Liu Y B, Wang Q. Current status and prospect of isothermal amplification in the detection pathogen of animal disease [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2010, 44(10):9-13.
- [9] 高志强, 汪琳, 张灿, 等. 沙门氏菌 LAMP 可视化检测方法的建立 [J]. 中国动物检疫, 2019, 36(2): 68-72.
- Gao Z Q, Wang L, Zhang C, et al. Development of a visual LAMP test method for *Samonella* [J]. China Animal Health Inspection, 2019, 36(2):68-72.

(编辑:李文平)