

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)病原 霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)PCR 与 LAMP 检测方法的比较研究*

张晓君 白雪松 毕可然 许加涛 秦 蕾 阎斌伦

(淮海工学院海洋学院 江苏省海洋生物技术重点实验室 连云港 222005)

摘要 采用分子生物学方法,以霍乱弧菌 *lolB* 为靶基因设计特异性引物,进行了霍乱弧菌的 PCR 和环介导等温核酸扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测技术研究,并对它们的特异性、灵敏性和实际应用进行了比较。结果表明,所建立的 PCR 检测霍乱弧菌的方法最低检测限为 4.0×10^3 CFU/ml; LAMP 检测方法在 65°C 下恒温扩增 60min,检测限为 4.0×10^1 CFU/ml,反应产物加入荧光染料 SYBR Green I 后反应液呈现明显的绿色;以温和气单胞菌、副溶血弧菌、鳃弧菌及美人鱼弧菌为对照菌株,检测结果均为阴性;霍乱弧菌人工染菌的 8 种水产品进行 PCR 及 LAMP 检测,结果均为阳性,而未染菌组均为阴性;PCR 及 LAMP 检测霍乱弧菌的方法均具有灵敏度较高、特异性强等优点,且 LAMP 检测霍乱弧菌的方法灵敏度是 PCR 方法的 100 倍,更适合于养殖现场检测的推广使用。

关键词 霍乱弧菌, PCR, LAMP, 特异性, 灵敏性

中图分类号 Q346

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)分类于弧菌科(Vibrionaceae)、弧菌属(*Vibrio*),是烈性肠道传染病霍乱的病原菌,已发现有 200 多个血清群,其中 O1 和 O139 血清群引起的霍乱是国际检疫传染病之一,也是我国重点防治的法定甲类传染病。此外,该菌的非 O1/非 O139 群菌株还可引起多种水产动物(鱼、虾、蟹、贝等)感染发病(王立平等, 1997; 杨鸞劫等, 2006; Kiiyukia *et al.*, 1992),是人与水产养殖动物共染的病原菌,尤其是该菌严重危害泥鳅养殖生产,是泥鳅养殖生产中常见的病原菌(邴旭文等, 2009; Zhang *et al.*, 2012)。因此,建立泥鳅病原霍乱弧菌快速、有效、准确的检测和诊断技术是预防此类疫病的重要技术手段之一。

世界各国学者建立了许多检测霍乱弧菌的有效

方法,其中传统细胞培养、生理生化特性、胶体金免疫层析法、改良免疫荧光菌球法、血清学分型及噬菌体分型已广泛应用(沈小婷等, 2011)。近年来,分子生物学检测技术以其高敏感性、高特异性、操作简单、耗时短等优点被广泛应用于霍乱弧菌的检测及分型研究。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)和环介导等温核酸扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术在灵敏度和特异性方面是两种良好的分子检测方法。本文根据 GenBank 中已发表的霍乱弧菌的 *lolB* 基因序列设计 PCR 引物和 LAMP 引物,建立了针对霍乱弧菌的 PCR 和 LAMP 检测方法,并且对它们的特异性、灵敏性和实际应用进行了较为详尽的比较,旨在为霍乱弧菌的安全检测及该菌引起的人及水生动物疾病的快速诊

* 江苏省水产三新工程重大项目资助, DY2012-3-7 号; 中央财政支持地方高校发展专项资金资助, CXTD16 号; 江苏高校优势学科建设工程项目资助, 2011。张晓君, 博士, 教授, E-mail: zxj9307@163.com

收稿日期: 2012-03-21, 收修改稿日期: 2012-05-25

断提供可行性方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株来源

供试霍乱弧菌菌株 NQ1 及 LD081008B-1 于 2009—2010 年间分离自江苏连云港市发病泥鳅(邢旭文等, 2009; Zhang *et al.*, 2012), 对照温和气单胞菌、副溶血弧菌、鳃弧菌及美人鱼弧菌均分离自发病水生动物(姚东瑞等, 2010; 张晓君等, 2009a, b; Zhang *et al.*, 2011), 本实验室保存供用, 菌株编号及相关基因在 GenBank 登录号见表 1。

1.2 细菌模板 DNA 的提取

将供试菌接种于营养肉汤中 28℃ 过夜培养后, 取 2ml 的菌悬液按细菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海赛百盛生物工程有限公司)说明书所述方法提取 DNA 作为 PCR 和 LAMP 模板, -20℃ 保存备用。

1.3 引物设计与合成

分别用 Primer premier5.0 和 Primer explorer V4 引物设计软件, 设计了以 *lolB* 为靶基因的霍乱弧菌的 PCR 特异性引物和 LAMP 特异性引物(表 2), 引物由上海生工合成。

1.4 霍乱弧菌 PCR 的反应条件优化及特异性检测

以 *lolB* 为靶基因设计的 PCR 引物对霍乱弧菌模板 DNA 进行扩增, 优化各循环参数和引物浓度, 筛

选出最佳反应模式。同时, 进行 4 株对照菌株模板 DNA 的 PCR 扩增以检测引物特异性。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 霍乱弧菌 LAMP 的反应条件优化及特异性检测

以 *lolB* 为靶基因设计的 LAMP 引物对霍乱弧菌模板 DNA 进行扩增, 选择不同浓度梯度的 Mg^{2+} 、dNTP、betaine, 调节内外引物浓度及比例, 优化出 LAMP 反应条件和各组分浓度, 确定最佳反应模式。同时, 进行 4 株对照菌株模板 DNA 的 LAMP 扩增以检测引物特异性。LAMP 产物一部分用琼脂糖凝胶电泳检测, 另一部分加入 1μl SYBR Green I 荧光染料轻轻振荡, 观察反应液的颜色变化判断结果。

1.6 霍乱弧菌 PCR 与 LAMP 的灵敏性检测

以菌液稀释方法进行灵敏性试验。将菌株培养至对数期, 利用平板计数法进行计数, 菌液初始浓度为 4.0×10^8 CFU/ml, 进行 10 倍比梯度稀释为: 4.0×10^8 、 4.0×10^7 、 4.0×10^6 、 4.0×10^5 、 4.0×10^4 、 4.0×10^3 、 4.0×10^2 、 4.0×10^1 、 4.0×10^0 CFU/ml, 分别取 2ml 菌液按 1.2 所述方法提取 DNA 作为 PCR 和 LAMP 扩增的模板, 阴性对照为灭菌去离子水。按照所建立的 PCR 与 LAMP 检测方法进行灵敏性检测。

1.7 霍乱弧菌 PCR 与 LAMP 检测的应用

购买市场水产品泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、文蛤

表 1 供试菌株及其来源
Tab.1 Origin of strains used in the study

菌株编号	菌种名称/来源	GenBank 登录号				
		16S rRNA	<i>gyrB</i>	<i>rpoA</i>	<i>rpoD</i>	<i>recA</i>
NQ1	霍乱弧菌/泥鳅	JF939043	JF909344	JF939042	—	JF939045
LD081008B-1	霍乱弧菌/泥鳅	GQ205447	GQ205452	—	—	—
NQ090701	温和气单胞菌/泥鳅	HM358836	HM358837	—	HM358838	—
JGB080708-1	副溶血弧菌/凡纳滨对虾	GQ205448	GQ205453	—	—	—
BH1	鳃弧菌/半滑舌鲷	GQ205444	GQ205449	—	—	—
ST1	美人鱼弧菌/半滑舌鲷	GU228793	GU228794	—	—	—

表 2 引物序列
Tab.2 Sequence of primers

引物名称		序列
PCR	F	5'-AGGGAGCAGCGTCCATTGTG-3'
	R	5'-CAATCACACCAAGTCACTC-3'
LAMP	FIP	5'-ACCGCGAACAAAGATGCACAAAAG-TTTT-TCAAGCTGTTCAACGGGAAT-3'
	BIP	5'-CGACCTGTAAGTTCAGCACGGT-TTTT-AGCCACAAAACTCTCACT-3'
	F3	5'-TCGGCAAGCCTAAAATCCAA-3'
	B3	5'-TCAGCGACAATCGTTCAACT-3'

(*Lioconcha castrensis*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)、日本对虾(*Penaeus japonicus*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、龙胆石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)人工染菌后, 取肌肉组织并匀浆, 增菌培养 4h 后按 1.3 方法提取 DNA 并按优化出的 PCR 和 LAMP 方法检测。对照组为未染菌的肌肉组织匀浆液。

2 结果

2.1 霍乱弧菌 PCR 检测方法的建立

通过对不同反应体系及反应条件下 DNA 扩增结果的比较, 确定了以 *lolB* 为靶基因检测霍乱弧菌的最佳 PCR 模式。25 μ l 的反应体系: ddH₂O 10 μ l, 正反引物各 0.2 μ l (10 μ mol/L), DNA 模板 2 μ l, 2 \times Power Taq PCR MasterMix 12.6 μ l。PCR 的反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 接着进入循环程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 45s、57.5 $^{\circ}$ C 退火 45s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 30 次循环, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 温育 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

2.2 霍乱弧菌 LAMP 检测方法的建立

经过优化之后的 LAMP 反应体系(25 μ l)为: 10 \times Thermopol buffer 2.5 μ l、dNTP 2.5 μ l (10mmol/L)、Mg²⁺ 2 μ l (25mmol/L)、甜菜碱 4 μ l (5mol/L), FIP、BIP 各 2 μ l (10 μ mol/L), F3、B3 各 0.5 μ l (10 μ mol/L)、DNA 模板 2 μ l、BstDNA 酶 1 μ l (8000U)、ddH₂O 6 μ l; LAMP 的反应条件为: 65 $^{\circ}$ C 下保持 60min, 之后 80 $^{\circ}$ C 灭活 10min。

2.3 霍乱弧菌 PCR 与 LAMP 的特异性扩增结果

供试 2 株霍乱弧菌及对照用温和气单胞菌、副溶血弧菌、鳗弧菌、美人鱼弧菌模板 DNA 经 PCR 和

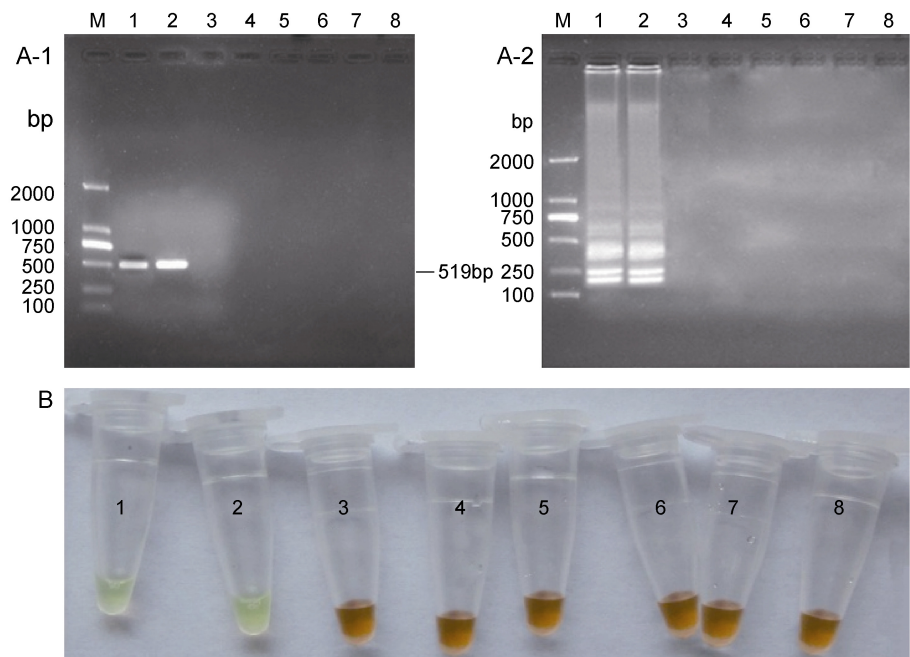


图1 霍乱弧菌 PCR 和 LAMP 两种检测方法的特异性

Fig.1 Specificity of PCR and LAMP methods for the detection of *V. cholerae*

注: M. DL2000; 1—2. 霍乱弧菌; 3. 温和气单胞菌; 4. 副溶血弧菌; 5. 鳗弧菌; 6. 美人鱼弧菌; 7—8. 阴性对照

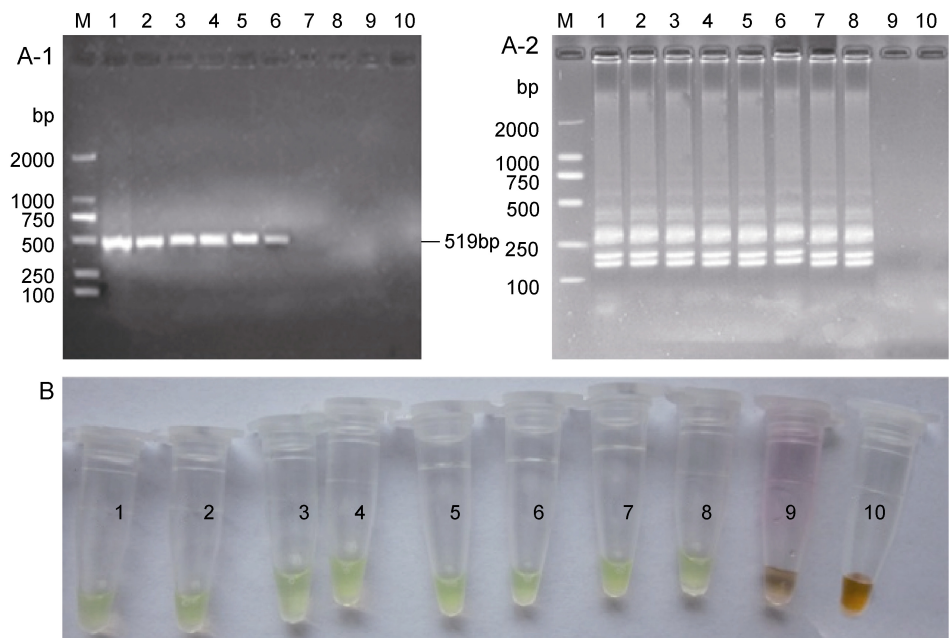


图2 霍乱弧菌 PCR 和 LAMP 两种检测方法的灵敏性

Fig.2 Sensitivity of PCR and LAMP methods for the detection of *V. cholerae*

M. DL2000; 1—9. 霍乱弧菌 *lolB* 扩增片段[菌液 10 倍系列稀释: 依次为(4.0 \times 10⁸)—(4.0 \times 10⁰) CFU/ml]; 10. 阴性对照

LAMP 扩增,结果显示以 *lolB* 为靶基因进行的 PCR 扩增,仅 2 株霍乱弧菌扩增出 519bp 条带,其它 4 种对照病原菌均未出现任何扩增条带(图 1A-1); LAMP 扩增结果显示,2 株霍乱弧菌均扩增出阶梯状条带,而其它 4 种病原菌均未出现任何扩增条带(图 1A-2),LAMP 反应液经 SYBR Green I 染色,可见 2 株霍乱弧菌呈现绿色的阳性反应,而其它 4 种对照病原菌均呈现橙色的阴性反应(图 1B)。该结果表明所建立的霍乱弧菌 PCR 与 LAMP 两种检测方法具有很好的特异性。

2.4 PCR 与 LAMP 检测霍乱弧菌的灵敏度

10 倍系列稀释菌液(4.0×10^8 — 4.0×10^0 CFU/ml)按 1.2 所述方法煮沸提取 DNA,按 2.1 和 2.2 优化出的 PCR 及 LAMP 反应条件进行检测,结果表明 PCR 能检测到的最低稀释度为 4.0×10^3 CFU/ml (图 2A-1),LAMP 方法能检测到的最低稀释度为 4.0×10^1 CFU/ml (图 2A-2),反应液加入 SYBR Green I 荧光染料后可

见明显的呈阳性的颜色反应(图 2B)。本实验建立的 PCR 和 LAMP 检测霍乱弧菌灵敏度分别为 4.0×10^3 CFU/ml 和 4.0×10^1 CFU/ml, LAMP 检测方法灵敏度要高于 PCR 方法 2 个数量级。

2.5 霍乱弧菌的 PCR 与 LAMP 检测应用

人工染菌的水产品组织匀浆增菌液,提取 DNA 分别进行 PCR 和 LAMP 检测。PCR 和 LAMP 检测电泳结果显示,人工染菌组均呈现阳性,未染菌组均无电泳条带(图 3A-1, A-2); LAMP 反应液加入 SYBR Green I 染色,可见人工染菌组呈现绿色阳性反应,未染菌组呈现橙色阴性反应(图 3B)。该结果表明 PCR 与 LAMP 两种方法均能将感染霍乱弧菌的样品准确检出。

3 讨论

有关霍乱弧菌的分子检测技术,国内外学者已多有报道, Gubala(2006)建立了基于 *rtxA* (repeat in

toxin)、*epsM* (extracellular secretory protein)、*mshA* (mannose-sensitive pili)及 *tcpA* (the toxin coregulated pilus) 4 种基因的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测霍乱弧菌的方法; Glukhov 等(1996)以操纵子 *ctxAB* 基因 DNA 区的引物进行套式 PCR 检测霍乱弧菌的产毒株; Rivera 等(2003)建立了基于 *ct* (cholera toxin)和 *tcp* (toxin co-regulated pilus) 2 种基因产毒型 O1 和 O139 群霍乱弧菌的多重 PCR 检测方法;黄晓蓉等(2006)以霍乱胶原酶基因 *vcc* 和霍乱毒素基因 *ctx* 为目的基因建立了多重 PCR 检测霍乱弧菌的方法;曲梅等(2008)根据霍乱弧菌毒力基因 *ctxAB* 和 *zot* 序列设计合成引物和 TaqMan 探针,建立了一种 TaqMan 荧光定量 PCR 检测霍乱弧菌毒力基因的方法;刘秀峰等(2006)以 *ctxA* 基因设计引物检测海产品中的霍乱弧菌;贺楠等(2009)以霍乱弧菌的溶血素基因 *hlyA* 设计引物,建立霍乱弧菌的 LAMP 快速检

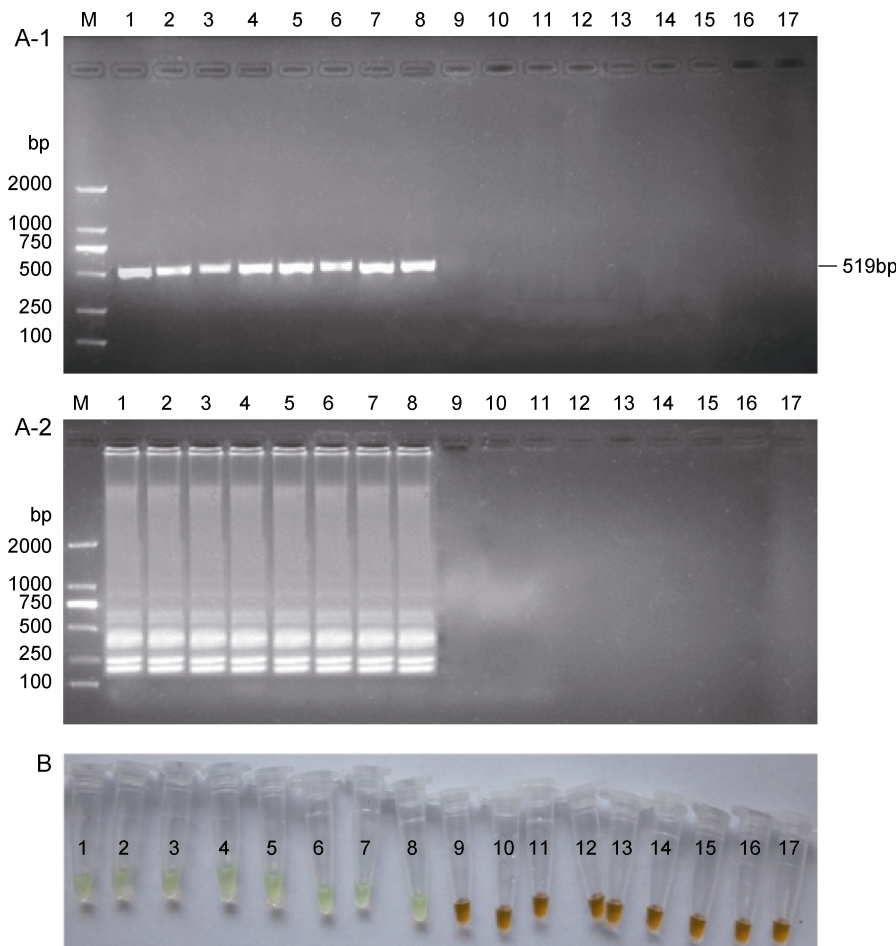


图3 霍乱弧菌的 PCR 与 LAMP 检测应用

Fig.3 Application of PCR and LAMP methods for the detection of *V. cholerae*
注: M. DL2000; 1—8. 染菌组织匀浆增菌液(依次为泥鳅、中国对虾、文蛤、毛蚶、缢蛭、日本对虾、三疣梭子蟹、龙胆石斑鱼); 9—16. 未染菌组织匀浆液; 17. 阴性对照

测方法,对 O1 群、O139 群、非 O1/O139 群进行一个快速筛选。柯雪梅等(2009)选择了霍乱弧菌特异的 *owpW* 基因作为靶序列,建立霍乱弧菌的 LAMP 检测方法。*lolB* 是一编码外膜脂蛋白基因(Matsuyama *et al.*, 1997),该基因能够检测所有霍乱弧菌生物型菌株(O1、O139 和 non-O1/non-O139)(Lalitha *et al.*, 2008),本文以霍乱弧菌 *lolB* 为靶基因设计了 PCR 和 LAMP 特异性引物,建立并比较分析了 PCR 与 LAMP 两种分子方法检测泥鳅霍乱弧菌的特异性、灵敏性及实际应用情况,结果表明两种方法均可用于泥鳅病原霍乱弧菌的检验。

PCR 技术在检测方面应用已相当广泛。环介导等温扩增技术(loop mediated isothermal amplification, LAMP)是 Notomi 等(2000)提出的一种价廉、迅速、简便、准确的核酸检测新技术。该方法主要是利用 4 种不同的特异性引物识别靶基因的 6 个特定区域,不需要模板的热变性、长时间温度循环,利用一种链置换 DNA 聚合酶(BstDNA polymerase)可在等温条件进行扩增反应,扩增效率高,可在 15—60min 扩 10^9 — 10^{10} 倍,并且操作简单、灵敏度高、特异性高。LAMP 扩增产物可以通过电泳检测呈特征性梯状条带外,还可以加入 SYBR Green I,观察反应液的颜色变化或直接通过肉眼观察沉淀有无判断。与 PCR 相比,LAMP 不需要昂贵的 PCR 仪热循环,只需要普通的水浴锅或者稳定热源设备即可,非常适合于病原微生物的现场快速检测和基层普及应用。本文建立的 PCR 与 LAMP 两种分子方法检测泥鳅霍乱弧菌,在特异性和人工染菌样品检测中,PCR 与 LAMP 表现出相同的效果;在灵敏性方面,LAMP 敏感性是 PCR 的 100 倍。结合 LAMP 检测成本低、耗时短、操作简单、不需昂贵仪器等优点,LAMP 技术检测霍乱弧菌的方法更适合临床及现场检测。

参 考 文 献

- 王立平, 张晓华, 刘 镁等, 1997. 中国对虾糠虾幼体病原菌(非 O1 群霍乱弧菌)的研究. 中国水产科学, 4(1): 45—51
- 曲 梅, 黄 芳, 严寒秋等, 2008. TaqMan 荧光 PCR 技术在霍乱弧菌毒力基因检测中的应用. 中国预防医学杂志, 9(5): 546—549
- 刘秀峰, 纪惠玲, 庄 玲等, 2006. 霍乱弧菌的 PCR 检测方法 及耐药性分析. 疾病监测, 21(8): 431—432
- 杨鸞劫, 俞菊华, 陈 辉等, 2006. 暗纹东方鲀非 O1 霍乱弧菌 的鉴定及毒力基因检测. 水产学报, 30(4): 525—530
- 邢旭文, 阎斌伦, 张晓君等, 2009. 泥鳅病原霍乱弧菌的表型 与分子鉴定. 海洋与湖沼, 40(6): 692—698
- 沈小婷, 赵雪涛, 2011. 霍乱弧菌检测方法的研究进展. 微生物 与感染, 6(2): 113—116
- 张晓君, 陈翠珍, 阎斌伦等, 2009a. 凡纳滨对虾病原副溶血弧 菌的表型及分子特征. 海洋与湖沼, 40(5): 654—661
- 张晓君, 秦国民, 阎斌伦等, 2009b. 半滑舌鳎病原鳃利斯顿氏 菌表型及分子特征研究. 海洋学报, 31(5): 112—121
- 柯雪梅, 陈胤瑜, 高 璐等, 2009. 霍乱弧菌 LAMP 快速检测 方法的建立及应用. 南方医科大学学报, 29(10): 2059— 2063
- 姚东瑞, 邢旭文, 朱 明等, 2010. 泥鳅(*Misgurnus anguilli- caudatus*)病原温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)分子鉴定 及耐药性研究. 海洋与湖沼, 41(5): 756—762
- 贺 楠, 雷质文, 梁成珠等, 2009. LAMP 方法检测霍乱弧菌的 研究. 中国热带医学, 9(1): 23—26
- 黄晓蓉, 吕海沧, 郑 晶等, 2006. 多重 PCR 方法检测霍乱弧 菌的研究. 微生物学杂志, 26(5): 11—13
- Glukhov A L, Onishchenko G G, Gordeev S A *et al.*, 1996. The determination of the content of the cholerae strains by means of the nested polymerase chain reaction. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 5: 20—22
- Gubala A J, 2006. Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*. Journal of Microbiological Methods, 65(2): 278—293
- Kiiyukia C, Nakajima A, Nakai T *et al.*, 1992. *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from ayu fish (*Plecoglossus altivelis*) in Japan. Applied and Environmental Microbiology, 58: 3078—3082
- Lalitha P, Siti Suraiya M N, Lim K L *et al.*, 2008. Analysis of *lolB* gene sequence and its use in the development of a PCR assay for the detection of *Vibrio cholerae*. Journal of Microbiological Methods, 75: 142—144
- Matsuyama S, Yokota N, Tokuda H, 1997. A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. EMBO Journal, 16: 6947—6955
- Notomi T, Okayama H, 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research, 28(12): e63
- Rivera I N, Lipp E K, Gil A *et al.*, 2003. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. Environmental Microbiology, 5(7): 599—606
- Zhang X J, Qin G M, Bing X W *et al.*, 2011. Phenotypic and molecular characterization of *Photobacterium damsela*, a pathogen of the cultured tongue sole *Cynoglossus semilaevis* in China. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 45(1): 1—13
- Zhang X J, Yao D R, Yan B L *et al.*, 2012. Identification of *Vibrio cholerae* as a causative bacterium for an ulcer disease of cultured loach *Misgurnus anguillicaudatus* in China. African Journal of Microbiology Research, 6(9): 2060—2070

**COMPARISON BETWEEN PCR AND LAMP METHODS FOR
THE DETECTION OF *VIBRIO CHOLERAE* ISOLATED FROM
DISEASED *MISGURNUS ANGUILLICAUDATUS***

ZHANG Xiao-Jun, BAI Xue-Song, BI Ke-Ran, XU Jia-Tao, QIN Lei, YAN Bin-Lun
(College of Ocean, Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu, Huaihai Institute of
Technology, Lianyungang, 222005)

Abstract The specific primers of polymerase chain reaction (PCR) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) were designed based on *lolB* gene. PCR and LAMP methods for the detection of *Vibrio cholerae* were established, and their specificity, sensitivity and practical application were compared in this study. The results showed the PCR primers could detect *V. cholerae* at the lowest level of 4.0×10^3 CFU/ml using PCR method, the LAMP primers could detect *V. cholerae* at the lowest level of 4.0×10^1 CFU/ml within 60min under isothermal condition at 65°C using the LAMP detection system. The green amplified products were observed directly by naked-eye in the reaction tube by addition of SYBR Green I, and no cross reaction was detected in 4 kinds of control pathogenic bacteria including *A. sobria*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* and *V. damsela*. The positive reaction was observed in PCR and LAMP detection system for artificial infected aquatic products, and control groups were negative. The studies revealed that they have equal effects between the PCR and LAMP in specificity and actual application, sensitivity level of LAMP is 100 times of the PCR method, and the LAMP method could be useful in the specific and rapid diagnose of the disease caused by *V. cholerae* in aquaculture.

Key words *Vibrio cholerae*, PCR, LAMP, Specificity, Sensitivity