

# 基于 LAMP 技术针对溶藻弧菌 *gyrB* 基因快速检测方法的建立

陈昌国, 陈秋圆, 侯兵兵, 刘新萍, 董优优

(解放军总医院第六医学中心检验科, 北京 100048)

**摘要:** **目的** 应用环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 建立针对溶藻弧菌 *gyrB* 基因的快速检测方法。**方法** 以溶藻弧菌标准株 (ATCC-17749) 和溶藻弧菌野生株 (WT) 为研究对象, 通过在线生物学软件 (<http://primerexplorer.jp/e/>) 设计针对溶藻弧菌 *gyrB* 基因的 LAMP 引物, 利用恒温水浴进行等温扩增, 优化反应条件, 建立快速检测方法。**结果** ①经 2g/dl 凝胶电泳结果显示反应温度为 61℃ 时扩增产物成像效果较 60℃, 62℃ 和 63℃ 明显, 为适宜反应温度; ②在 61℃ 条件下反应 60 min 和 90 min 凝胶电泳成像效果差异不大, 反应时间为 60 min 能满足扩增需要; ③利用同一体系对临床 6 种其它常见致病菌进行等温扩增时未出现阳性条带, 提示整个体系特异度较好; ④采用模板稀释法验证该 LAMP 体系检测的灵敏度为 10<sup>-4</sup> mg/L。**结论** 建立了基于 LAMP 技术针对溶藻弧菌 *gyrB* 基因的快速检测方法, 具有良好的特异度和敏感度, 对快速检测溶藻弧菌有重要意义。

**关键词:** 环介导等温扩增技术; 弧菌; 溶藻弧菌; 快速检测; *gyrB* 基因

**中图分类号:** R378.3; Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2019) 06-006-04

**doi:**10.3969 / **j.issn.**1671-7414.2019.06.002

## Establishment of the Rapid Detection Method Targeting to *GyrB* Gene of *Vibrio Parahaemolyticus* Based on LAMP Technology

CHEN Chang-guo, CHEN Qiu-yuan, HOU Bing-bing, LIU Xin-ping, DONG You-you

(Department of Clinical Laboratory, the Six Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

**Abstract:** **Objective** To establish a rapid method for the detection of *Vibrio alginolyticus* by loop mediated isothermal amplification (LAMP). **Methods** Taking the *Vibrio alginolyticus* (ATCC-17749) and *Vibrio alginolyticus* (WT) as the research object, designing of LAMP primers for the *gyrB* gene by online biology software (<http://primerexplorer.jp/e/>), isothermal amplification was carried out in a constant temperature water bath, and the reaction conditions were optimized, and established a quick test response system. **Results** ① The results of 2g/dl gel electrophoresis showed that the imaging effect of the amplified products was obviously higher than that of 60℃, 62℃ and 63℃ at the reaction temperature of 61℃. ② There was no significant difference in gel electrophoresis effect at 60 min and 90 min at 61℃, and the reaction time was 60 min, which could meet the need of amplification. ③ There was no positive band in isothermal amplification of 6 other common clinical pathogenic bacteria using the same system, suggesting that the specificity of the whole system was good. ④ Template dilution method was used to verify the sensitivity of the LAMP system for detection of 10<sup>-4</sup> mg/L. **Conclusion** A rapid detection method for *gyrB* gene of *Vibrio alginolyticus* based on LAMP technology was established, which has good specificity and sensitivity, and has important significance for rapid detection of *Vibrio alginolyticus*.

**Keywords:** loop-mediated isothermal amplification; *vibrio*; *vibrio alginolyticus*; rapid detection; *gyrB* gene

溶藻弧菌是一种常见的嗜盐性革兰氏阴性弧菌, 有较强的适应性和抗逆性, 广泛分布于海水及河口入海处, 其数量在海洋各类弧菌中居于首位<sup>[1-3]</sup>。溶藻弧菌由 Miyamoto 在 1961 年命名, 其生物学特性与副溶血弧菌有较多相似之处, 是水生动植物弧菌病的主要病原菌之一<sup>[1,4-5]</sup>。此外, 溶藻弧菌不但会引起多种人类感染性疾病, 如伤口感染、食物中毒及

中耳炎等, 严重时可引起败血症危及生命<sup>[6-9]</sup>; 而且, 该菌是沿海地区感染性腹泻和食物中毒的主要病原菌之一, 其作为致病菌的相关研究日益受到重视<sup>[10-11]</sup>。

目前, 分子生物学检测溶藻弧菌的靶点有 16s rRNA 基因、*colH* 基因、*dnaJ40* 基因以及 *hsp60* 基因等<sup>[10]</sup>。虽然 16s rRNA 基因是细菌分子系统鉴定

**基金项目:** 军队后勤科研重点项目, 编号: BHJ14J005。

**作者简介:** 陈昌国 (1979-), 男, 博士, 副主任技师, 研究方向为病毒与肿瘤发生, 病原微生物分子检测方法, E-mail: 1234\_chen@sina.com。

的“金标准”，但其进化上的过度保守不利于区分相似种，而更适用于种以上水平的鉴定<sup>[12-13]</sup>。gyrB即促旋酶（gyrase）B亚基，其在细菌中广泛存在，与16sRNA相比，gyrB基因进化速度更快且在近乎全部细菌中呈单拷贝形式，更适用于细菌种的鉴定。在弧菌中gyrB基因具有较高同源性，不同弧菌之间具有明显遗传距离，其稳定准确区分不同弧菌的特点使得它可以作为检测的靶点<sup>[14]</sup>。本实验以溶藻弧菌gyrB基因为研究对象，基于LAMP技术建立一种溶藻弧菌的快速检测方法，实验结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象 实验使用的菌株包括：溶藻弧

表1 gyrB基因LAMP引物序列

类别	引物序列
gyrB F1c	GAGCACGTGCTGCATCGATGATTTTTCTGATTGAGAACCCGACA
gyrB B1c	GAAGCAGCGCGTAAAGCTCGTTTTTGAAGGCCAGCTAGGTC
gyrB F3:	TTGAGTCTGCAATGGGTGAA
gyrB B3:	GCCGGATCTTTTCTGACA

### 1.3 方法

1.3.1 细菌核酸粗提物制备：将菌种从-80℃冰箱取出后快速复温并接种在TCBS、哥伦比亚血平板上，将平板置孵箱中37℃培养12h，取适量细菌至含有100μl核酸裂解液的EP管中，室温裂解15min，中间涡旋振荡3次，100℃恒温金属浴加热10min，13000r/min室温离心5min，取上清作为模板。

1.3.2 LAMP反应体系：10×Bst r/min buffer 2.5μl, MgSO<sub>4</sub>(25mmol/L) 1.2μl, dNTP (10mmol/L) 1.6μl, 内引物各0.8μmol, 外引物各0.2μmol, Bst DNA聚合酶(8 U/μl) 1μl, DNA模板2μl, ddH<sub>2</sub>O 15.7μl。

1.3.3 反应温度的优化：将相同反应混合液在不同的温度下(60, 61, 62和63℃)反应60min, 80℃灭活5min, 取5μl反应产物在2g/dl凝胶中进行电泳，以出现清晰明显条带的反应温度为优，确定最佳反应温度。

1.3.4 反应时间的优化：将相同反应混合液在61℃分别反应60min和90min, 然后80℃灭活5min, 将反应产物在2g/dl凝胶中进行电泳，以出现条带的清晰程度判断反应时间对扩增效果的影响。

## 2 结果

2.1 不同温度下扩增效果的比较 凝胶电泳结果见图1。不同反应温度获得的扩增效果不一，61℃条件下得到的gyrB扩增产物电泳条带最清晰明显，提示61℃为适宜反应温度。

菌ATCC-17749(由李艳君博士提供)、溶藻弧菌野生株-WT(由本科室分离并保存)、粪肠球菌ATCC-29212、金黄色葡萄球菌ATCC-25293、腐生葡萄球菌ATCC-BAA750、霍氏肠杆菌ATCC-700323、铜绿假单胞菌ATCC-27853、大肠埃希氏菌ATCC-25922菌株均为本科室保存。

1.2 试剂和仪器 普通恒温水浴，凝胶电泳仪均是本科室常用设备。0.1mmol/L MgSO<sub>4</sub>溶液，10×Reaction Buffer, Solution Mix, Bst DNA聚合酶均购自New England Biolabs公司，特异性引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成，后期处理按照引物合成单说明进行操作，引物序列见表1。

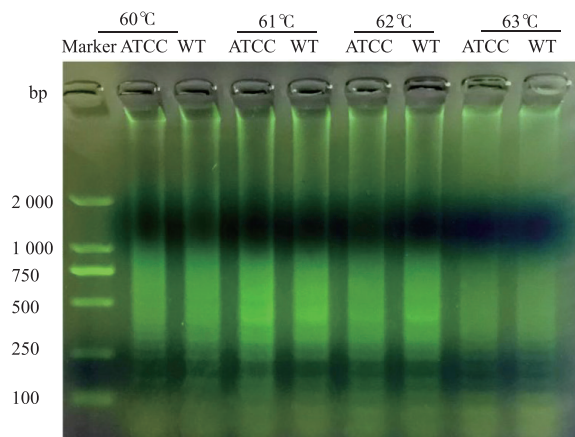


图1 不同温度 gyrB 基因 LAMP 扩增产物凝胶电泳结果

2.2 不同反应时间扩增效果的比较 见图2。在61℃反应60min和90min扩增效果相差不大，反应条件使用60min反应时间即可满足实验要求。

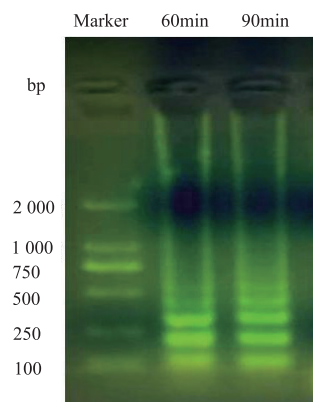
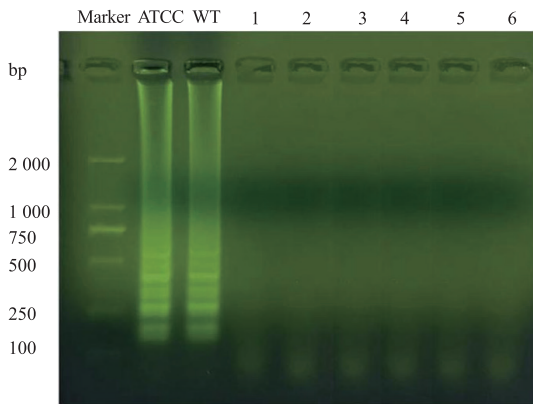


图2 不同反应时间 gyrB 基因 LAMP 扩增效果

**2.3 特异性评价** 使用优化后的 LAMP 反应体系对溶藻弧菌野生株、溶藻弧菌标准菌株及其它 6 种常见致病细菌的标准株进行扩增,电泳结果显示仅溶藻弧菌标准菌株和溶藻弧菌野生株有 *gyrB* 基因阳性扩增条带,其它 6 种常见致病细菌标准株均无扩增条带,见图 3。提示该反应体系的特异性较好。



注: 1. 粪肠球菌 ATCC-29212; 2. 金黄色葡萄球菌 ATCC-25293; 3. 腐生葡萄球菌 ATCC-BAA750; 4. 霍氏肠杆菌 ATCC-700323; 5. 铜绿假单胞菌 ATCC-27853; 6. 大肠埃希氏菌 ATCC-25922 菌株。

图 3 溶藻弧菌标准菌株、溶藻弧菌野生株及其它种细菌 *gyrB* 基因扩增条带

**2.4 灵敏度评价** 将溶藻弧菌标准株提取的核酸母液进行系列稀释作为扩增反应模板,当浓度为  $10^2\text{mg/L}$ ~ $10^{-4}\text{mg/L}$  时,每个浓度均有 *gyrB* 阳性扩增条带,当浓度为  $10^{-5}\text{mg/L}$  时未出现 *gyrB* 扩增条带。所以,该反应体系的检测灵敏度为  $10^{-4}\text{mg/L}$ ,与我们前期 Taqman 荧光定量 PCR 结果相比<sup>[20]</sup> 具有较好的灵敏度,见图 4。

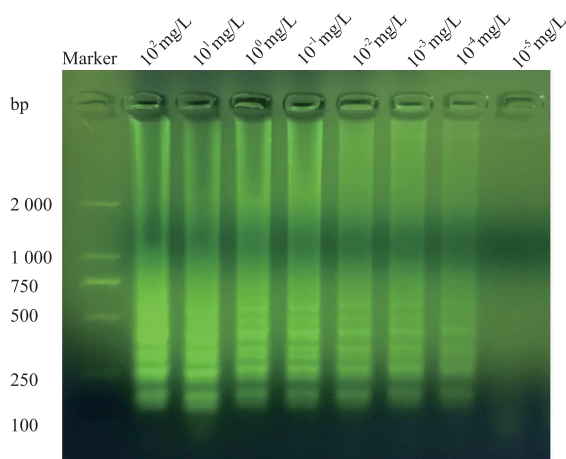


图 4 不同浓度核酸 *gyrB* 基因的 LAMP 扩增结果

### 3 讨论

溶藻弧菌是海水中最常见的优势弧菌,既是

海水养殖动物的重要致病菌,也是多种人类疾病的致病菌,对水产养殖业以及人类健康有着重要影响<sup>[15]</sup>。目前,溶藻弧菌的检测主要是传统的微生物鉴定方法和常规的分子生物学方法。传统培养鉴定检测方法完成一个鉴定周期用时较长且步骤繁琐;常见的分子生物学方法如普通 PCR、荧光定量 PCR 等不但需要 PCR 仪且对场地和人员的操作要求相对较高,不利于在条件相对简陋的条件下开展工作<sup>[16]</sup>。环介导等温扩增(LAMP)技术是由 NOTOMI 等<sup>[17]</sup>于 2000 年报道的一种核酸等温扩增技术,其原理是针对靶基因的 6 个位点设计 2 对特异性引物(内、外引物各一对),应用一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶(Bst DNA 酶)通过链置换方式进行高效扩增,具有高特异度、高灵敏度、简便、快速、低成本及对仪器要求低的特点,已广泛应用于微生物、病毒、寄生虫等多种领域<sup>[18-19]</sup>。

本研究中通过在线软件针对 *gyrB* 基因设计了 LAMP 引物,首先将反应体系在不同温度条件进行反应,2g/dl 凝胶电泳结果显示  $61^\circ\text{C}$  的反应条件下扩增产物的条带最为清晰,效率较高;在确定了反应条件后我们对反应时间的长短进行了优化,2g/dl 凝胶电泳结果显示在最佳反应温度下反应 60 min 的效果即能满足后续实验的要求并不需要延长反应时间来提高扩增效率。确定反应温度及反应时间后,我们对该方法的特异度和敏感度进行了评估。该体系在特异性检测中溶藻弧菌标准株和溶藻弧菌野生株扩增结果为阳性,其它菌株扩增结果为阴性,可以有效地对溶藻弧菌及其它 6 种常见致病菌进行区分,具有较好的特异度;在敏感度检测中当溶藻弧菌标准株核酸模板浓度为  $10^2\sim 10^{-4}\text{mg/L}$  时,每个浓度均出现阳性扩增条带,当模板浓度降低到  $10^{-5}\text{mg/L}$  时未出现阳性条带,说明该体系检测的灵敏度为  $10^{-4}\text{mg/L}$ 。

综上所述,我们基于 LAMP 技术建立了一种以 *gyrB* 基因为分子靶点的快速、简便、准确的溶藻弧菌检测方法,对溶藻弧菌的快速检测具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] RAMESH KUMAR P, KALIDAS C, TAMILMANI G, et al. Microbiological and histopathological investigations of *Vibrio alginolyticus* infection in cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) cultured in sea cage [J]. Indian Journal of Fisheries, 2014, 61(1): 124-127.
- [2] CHEN Mingxia, LI Heyang, LI Gang, et al.



- Distribution of *Vibrio alginolyticus*-like species in Shenzhen coastal waters, China [J]. Braz J Microbiol. 2011, 42(3):884-896.
- [3] 马聪, 陈昌国, 蒋学兵, 等. 中国海域海洋细菌分布特征分析 [J]. 解放军医学杂志, 2012, 37 (9) :909-913.
- MA Cong, CHEN Changguo, JIANG Xuebing, et al. Distribution characteristics of marine bacteria in the China Seas [J]. Med J Chin PLA, 2012, 37 (9) :909-913.
- [4] GU Dan, GUO Min, YANG Minjun, et al. A  $\sigma^E$ -mediated temperature gauge controls a switch from luxR-mediated virulence gene expression to thermal stress adaptation in *Vibrio alginolyticus* [J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(6): e1005645.
- [5] RUWANDDEEPIKA, H A D, JAYA WEERA T S P, BHOWMICH P P, et al. Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of *Vibrios* belonging to the Harveyi clade [J]. Reviews in Aquaculture, 2012, 4(2): 59-74.
- [6] TSILIA V, KERCKHOF F M, RAJKOVIC A, et al. *Bacillus cereus* NVH 0500/00 can adhere to mucin but cannot produce enterotoxins during gastrointestinal simulation [J]. Applied and Environment Microbiology, 2016, 82(1): 289-296.
- [7] ARDIC N, OIYURT M. Case report : Otitis due to *Vibrio alginolyticus* [J]. Mikrobiyol Bul, 2004, 38(1/2): 145-148.
- [8] Li Xiaochun, XIANG Zhengyang, XU Xiaoming, et al. Endophthalmitis caused by *Vibrio alginolyticus* [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(10):3379-3381.
- [9] OTTAVIANI D, LEONI F, ROCCHIEGANI E, et al. Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 132(1): 47-53.
- [10] 王海波, 张京云, 王多春, 等. 溶藻弧菌 TaqMan 实时 PCR 快速检测体系的建立 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21 (5): 1150-1152.
- WANG Haibo, ZHANG Jingyun, WANG Duochun, et al. Establishment of TaqMan real-time PCR assay for the rapid detection of *Vibrio alginolyticus* [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2011, 21 (5): 1150-1152.
- [11] 封会茹, 游京蓉, 刘玉堂, 等. 溶藻弧菌引起暴发型食物中毒的病原学研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(4): 331-334.
- FENG Huiru, YOU Jingrong, LIU Yutang, et al. Research of one abrupt food poisoning caused by *Vibrio alginolyticus* [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2003, 15(4): 331-334.
- [12] TEH C S, CHUA K H, THONG K L. Simultaneous differential detection of human pathogenic and nonpathogenic *Vibrio* species using multiplex PCR based on gyrB and pntA genes [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(6):1940-1945.
- [13] LUO Peng, HU Chaoqun. *Vibrio alginolyticus* gyrB sequence analysis and gyrB-targeted PCR identification in environmental isolates [J]. Dis Aquat Organ, 2008, 82(3):209-216.
- [14] 张世秀. 四种弧菌 gyrB 基因的克隆和溶藻弧菌快速检测试剂盒研制 [D]. 海口: 海南大学, 2006.
- ZHANG Shixiu. Cloning of gyrB genes of four *Vibrios* and development of rapid detection kit for *Vibrio alginolyticus* [D]. Haikou: Hainan University, 2006
- [15] 苑淑宾, 朱爱意. 溶藻弧菌对水产动物致病性及其防治的研究进展 [J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2012, 31(3): 256-264.
- YUAN Shubin, ZHU Aiyi. Progress on pathogenicity research on *Vibrio alginolyticus* to aquatic products [J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2012, 31(3): 256-264.
- [16] WEI Shuang, ZHAO Hui XIAN Yuyin, et al. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2014, 79(2):115-118.
- [17] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res. 2000, 28(12):E63.
- [18] GEIGER K, BROWN J. Rapid testing for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: implications for antimicrobial stewardship [J]. Am J Health Syst Pharm, 2013, 70(4):335-342.
- [19] 周广舟, 徐苏丽, 谭晓荣, 等. LAMP 技术在动物病毒病原检测中的应用进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29 (2) :179-182.
- ZHOU Guangzhou, XU Suli, TAN Xiaorong, et al. Progress in medicinal viruses detection by loop-mediated isothermal amplification technology [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2013, 29 (2) :179-182.
- [20] 陈昌国, 侯兵兵, 陈秋圆, 等. Taqman- 探针荧光定量 PCR 鉴定溶藻弧菌方法的建立 [J]. 实用检验医师杂志, 2017, 9(1):1-4.
- CHEN Changguo, HOU Bingbing, CHEN Qiuyuan, et al. Establishment of a method for the identification of *Vibrio alginolyticus* by Taqman-Probe fluorescence quantitative PCR analysis [J]. Chin J Lab Pathol, 2017, 9(1):1-4.

收稿日期: 2019-07-22

修回日期: 2019-08-30