环介导等温扩增技术快速检测奶粉中的单增李斯特菌

路彦霞[1]，孟兆祥[2]，马晓燕[1]，王羽[1]，张先舟[1]，张伟[1]
（1. 河北农业大学食品科技学院，河北保定 071001）
（2. 中国检验检疫科学研究院食品风险管理与应用研究所，北京 100123）

摘要：环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种在等温条件下特异、灵敏、快速的新型基因扩增技术。试验以单增李斯特菌为研究对象，根据其特有的*hlyA* 基因设计了一套特异性引物，进行LAMP扩增。结果表明，LAMP检测单增李斯特菌的灵敏度为2.45×10^1 cfu/mL，其对人工感染奶粉样品的检出限为7.32×10^1 cfu/mL。对其它食品病原菌进行检测，结果均未出现目的条带，特异性强。表明LAMP法适合于食品中污染单增李斯特菌的快速检测。

关键词：单增李斯特菌；LAMP；hlyA 基因；快速检测
文章篇号：1673-9078(2012)6-703-706

Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk Powder by Loop-mediated Isothermal Amplification

LU Yan-xia[1], MENG Zhao-xiang[2], MA Xiao-yan[1], WANG Yu[1], ZHANG Xian-zhou[1], ZHANG Wei[1]
(1.College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China) (2.Institute of Food Risk Management and Application, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

Abstract: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel DNA amplification technology with high specificity, efficiency and rapidity under isothermal conditions. In this research, a set of specific LAMP primers were designed to amplify the specific *hlyA* gene of *Listeria monocytogenes* by LAMP technology. The results showed that the detection sensitivity and detection limit of the LAMP method for purely cultured *Listeria monocytogenes* were 2.45×10^1 cfu/mL and 7.32×10^1cfu/mL, respectively. For other food pathogens, the target bands were not found . This method was suitable for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods.

Key words: *Listeria monocytogenes*; LAMP; *hlyA* gene; rapid detection

单核细胞增生李斯特氏菌（*Listeria monocytogenes*, LM，简称为单增李斯特菌）是一类兼性胞内生长的革兰氏阳性细菌，广泛分布于自然界，致病力较强，可导致人和动物败血症、流产、脑膜炎等，病死率高达30%~70%，是人类最重要的食源性病原菌之一[1~3]。目前单增李斯特菌的检验方法主要是传统的细菌分离培养、生化鉴定法及PCR相关技术。传统方法操作复杂，检测周期长，且特异性差、灵敏度较低。PCR相关技术虽然具有特异性强、灵敏度高等特点，但是检测成本高、实用性差的缺点不利于现场快速检测及基层推广[4~5]。

环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是日本学者Notomi等在2000年发明的一种新颖的核酸体外扩增新技术，该法针对靶基因的6个区域设计4条特异引物，利用一种链置换DNA聚合酶在恒温条件下孵育几十分钟即可完成核酸扩增反应[6]，具有简单、快速、高效、特异性强的特点。在DNA大量合成时，会产生副产物—焦磷酸镁白色沉淀，只要用肉眼观察其浊度情况，就能判断扩增与否[7-8]。

收稿日期：2012-03-26
基金项目：河北省自然科学基金（C2008000216）
作者简介：路彦霞(1978-)，女，硕士研究生，研究方向为食品安全
通讯作者：张伟，教授，硕士生导师

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes* CMCC 54001)、大肠杆菌 O157:H7(*E.coli* O157:H7)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia entercolitica* CMCC 52302)、普通变形杆菌(*Proteus Vulgaris* CMCC 49027)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* CMCC 63302)、乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi-B* CMCC 50004)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritis* CMCC50041)、福氏志贺氏菌(*Shigella Flexnei* CMCC51571)、宋内氏志贺氏菌(*Shigella sonnei* CMCC

51334)，购自中国医学细菌保藏管理中心(CMCC)；阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii* ATCC 51329)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 14458)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802)，购自中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC)。

1.1.2 主要仪器与设备

JY600 型电泳仪：北京东方电泳设备有限公司；UVIpro 凝胶成像系统：华粤企业有限公司；数显超级恒温水浴锅：金坛市杰瑞尔电器有限公司；DLCJ-1N 无菌工作台：哈尔滨市东连公司；TGL-16B 台式高速离心机：上海安亭科学仪器厂；SPX-150B-Z 生化培养箱：上海博迅实业公司；手提高压灭菌锅、电子分析天平、移液枪等。

1.1.3 试剂

DNA 聚合酶（Bst DNA ploymerase large fragment），购自 New England Biolab 公司；dNTPs、$MgCl_2$、DNA Marker、DNA 提取试剂盒，购自宝生物工程(大连)有限公司；TSB-YE 培养基，购自北京路桥技术有限责任公司；奶粉，购自当地超市；引物(内、外引物)，合成于上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 纯菌培养

单增李斯特菌接种至胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤（TSB-YE）培养基37 ℃并200 r/min摇床过夜培养，用生理盐水进行10倍系列稀释，采用稀释平板法进行菌落计数，同时从每个稀释梯度中吸取1 mL菌液，用试剂盒法提取基因组DNA，进行LAMP试验。

1.2.2 人工污染奶粉

在人工污染单增李斯特菌前，奶粉按FDA推荐的常规检验法证实不含单增李斯特菌。然后将单增李斯特菌人工污染到奶粉中：取25 g奶粉溶于225 mL灭菌生理盐水中，然后对奶粉溶液人工污染不同浓度的单增李斯特菌，人工污染的奶粉溶液中单增李斯特菌的浓度为7.32×10^8 cfu/mL~7.32×10^0 cfu/mL。同时从每稀释度奶粉溶液中取1 mL分别加入l mL无水乙醇、l mL氨水和l mL石油醚，混匀，以12000 r/min离心10 min。弃去上清液，剩余的沉淀分别用1 mL 10 mmol/L TE(pH 7.8)溶解。再用试剂盒法提取溶液中单增李斯特菌基因组DNA，进行LAMP试验。

1.2.3 引物设计与合成

单增李斯特菌*hlyA* 基因编码的李斯特菌溶血素是其主要毒力因子[9]。根据GenBank公布的单核细胞增生李斯特菌*hlyA* 基因序列中的保守序列，采用引物设计软件Primer Explorer 4.0进行设计，筛选出一套特异性的LAMP引物，包括外引物F3、B3和内引物FIP、BIP，引物序列见表1。引物委托上海生工生物技术有限公司合成。

表1 单增李斯特菌*hlyA* 基因的LAMP引物

Table 1 Primers of hlyA gene of Listeria monocytogenes for LAMP assay

引物名称	碱基序列(5'-3')
F3	AAGCTGCTTTTGATGCTG
B3	ACTCCTGGTGTTTCTCGA
FIP	CGGCTTTGAAGGAAGAATTTTTGAT -CCGTAAGTGGGAAATCTGTC
BIP	TACGGTGGTTCCGCAAAAGA -TTTCAAAATATCTCGTAAGTCTCC

1.2.4 LAMP反应的建立

经过反复摸索试验，确定按如下体系和反应条件进行LAMP扩增。配制LAMP反应体系25 μL，包括：10 μmol/L的内引物(FIP和BIP)各2 μL，10 μmol/L的外引物(F3和B3)各0.5 μL，2.5 mmol/L dNTP 4μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 4μL，10×Bst DNA聚合酶反应缓冲液2.5 μL，8 U的Bst DNA聚合酶大片段，DNA模板1.5 μL，灭菌的去离子水补至25 μL。混匀，于63 ℃温育60 min，80 ℃灭活10 min。产物于2.0%琼脂糖凝胶电泳分析，同时肉眼观察有无白色焦磷酸镁沉淀，判断反应的发生。

1.2.5 LAMP反应特异性试验

1.1.1所列12株试验菌株用试剂盒提取基因组DNA，灭菌双蒸水为阴性对照，进行LAMP扩增，验证方法特异性。

1.2.6 LAMP反应灵敏度试验

1.2.1纯菌培养10倍系列稀释的菌液用试剂盒提取DNA作为模板，进行LAMP扩增，验证方法灵敏度。

1.2.7 人工污染奶粉检测检出限试验

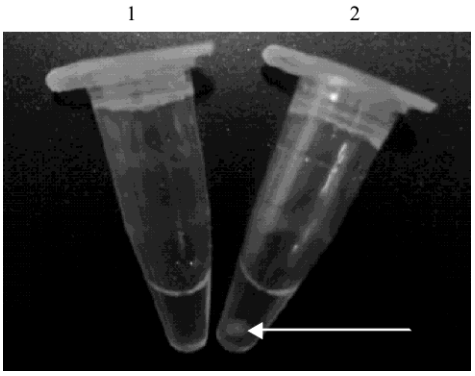
人工污染的奶粉溶液的单增李斯特菌的浓度从7.32×10^8 cfu/mL~7.32×10^0 cfu/mL，按1.2.2方法处理样品提取DNA，进行LAMP扩增，验证方法检出限。

2 结果

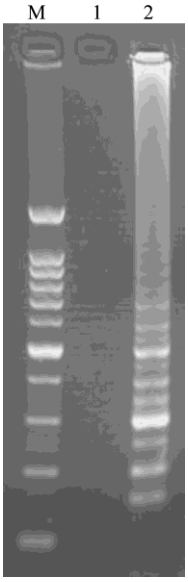
2.1 LAMP检测方法的建立

以本研究设计的一套特异性引物对单增李斯特菌基因组DNA按1.2.4所述方法进行扩增反应，结果如图1所示。单增李斯特菌基因组DNA泳道产生阶梯状条带，以灭菌双蒸水作为模板的阴性对照未出现条带；另外，反应管经12000 r/min离心数秒后肉眼观察，阳性反应管管底可见少量白色沉淀，而阴性对照管未出现沉淀，表明此套LAMP引物能够有效扩增单增李斯特菌*hlyA* 基因，本研究所建立的检测单增李斯特菌的LAMP方法

可行。



a



b

图1 单增李斯特菌LAMP检测

Fig.1 Detection of Listeria monocytogenes by LAMP

注：a: 1-透明液体为阴性，模板为灭菌双蒸水；2-白色沉淀为阳性，模板为单增李斯特菌CMCC 54001；b: M-100bp DNA Marker；1-灭菌双蒸水阴性对照；2-单增李斯特菌CMCC 54001的LAMP扩增产物。

2.2 特异性检测结果

分别对12株实验菌株进行扩增，采用琼脂糖凝胶电泳验证单增李斯特菌LAMP 检测方法的特异性，结果如图2所示。仅单增李斯特菌株出现特有的阶梯状扩增条带，其他致病菌株均未出现阶梯状条带，表明特异性强。

2.3 灵敏度检测结果

经平板计数，原始菌液浓度为2.45×10^9 cfu/mL，进行10倍系列稀释，每个稀释度用试剂盒法提取DNA作为模板，分别进行LAMP扩增，结果如图3所示。当稀释到10^9倍(2.45×10^0 cfu/mL)时；不再出现阶梯状条带。即所建立的单增李斯特菌LAMP检测方法的灵敏度为2.45×10^1 cfu/mL。

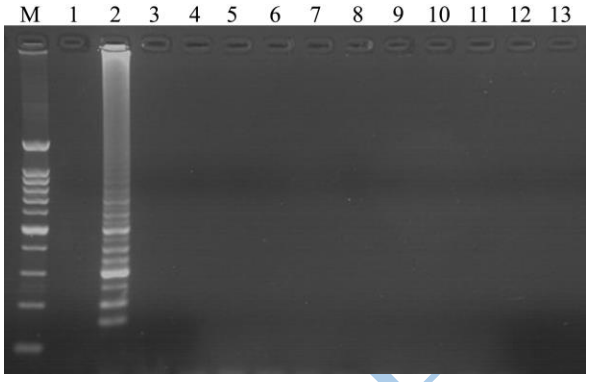


图2 LAMP反应的特异性检测结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis for specificity test by LAMP

注：M-100 bp DNA Marker；1-阴性对照；2-单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes* CMCC 54001)；3-大肠杆菌O157:H7(*E.coli O157:H7*)；4-小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia entercolitica* CMCC 52302)；5-普通变形杆菌(*Proteus Vulgaris* CMCC 49027)；6-蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* CMCC 63302)；7-乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi-B* CMCC 50004)；8-肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritis* CMCC50041)；9-福氏志贺氏菌(*Shigella Flexnei* CMCC51571）；10-宋内氏志贺氏菌(*Shigella sonnei* CMCC 51334)；11-阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii* ATCC 51329)；12-金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 14458)；13-副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802)。

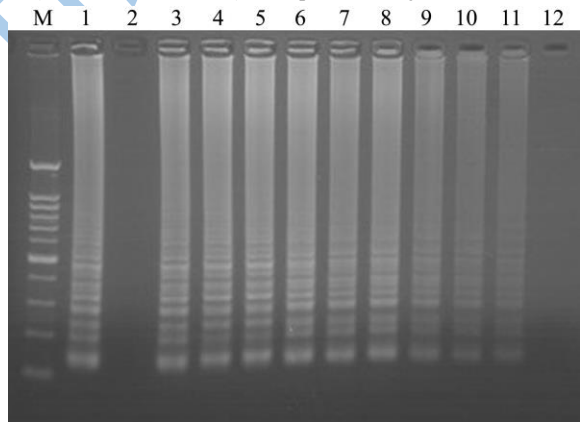


图3 LAMP反应的灵敏度检测结果

Fig.3 Agarose gel electrophoresis for sensitivity test by LAMP

注：M-100 bp DNA Marker；1-阳性对照；2-阴性对照；3-2.45×10^9 cfu/mL；4-2.45×10^8 cfu/mL；5-2.45×10^7 cfu/mL；6-2.45×10^6 cfu/mL；7-2.45×10^5 cfu/mL；8-2.45×10^4 cfu/mL；9-2.45×10^3 cfu/mL；10-2.45×10^2 cfu/mL；11-2.45×10^1 cfu/mL；12-2.45×10^0 cfu/mL。

2.4 人工污染奶粉检测检出限结果

测定原始菌液浓度为7.32×10^8 cfu/mL。人工污染奶粉后，每个稀释度分别提取DNA，进行LAMP扩增，结果如图4所示。当稀释到10^8倍(7.32×10^0 cfu/mL)时；不再出现阶梯状条带。即所建立的单增李斯特菌LAMP检测实样的检出限达到7.32×10^1cfu/mL。

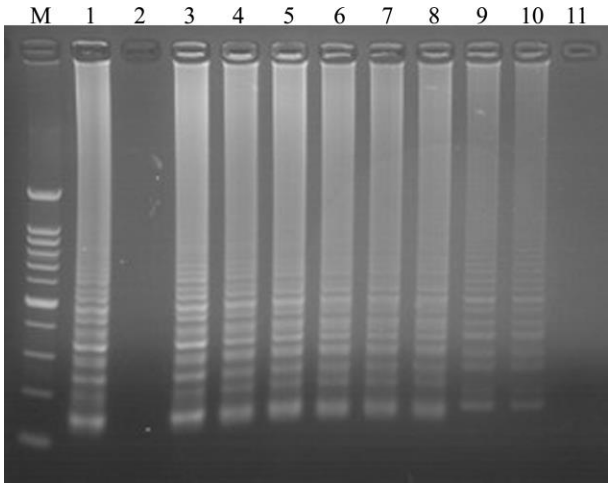


图4 LAMP检测人工污染奶粉的检出限

Fig.4 Limit test of artificially polluted milk powder by LAMP

注：M-100 bp DNA Marker；1-阳性对照；2-阴性对照；3-7.32×10^8 cfu/mL；4-7.32×10^7 cfu/mL；5-7.32×10^6 cfu/mL；6-7.32×10^5 cfu/mL；7-7.32×10^4 cfu/mL；8-7.32×10^3 cfu/mL；9-7.32×10^2 cfu/mL；10-7.32×10^1 cfu/mL；11-7.32×10^0 cfu/mL。

3 讨论

本试验以单增李斯特菌*hlyA* 基因为目的基因，利用LAMP专用软件设计1套特异性LAMP反应引物，通过优化试验确定单增李斯特菌LAMP检测反应体系和程序，从灵敏度、检出限、特异性、沉淀反应等各方面对单增李斯特菌进行了全面检测。结果表明，应用LAMP法检测单增李斯特菌的灵敏度为2.45×10^1 cfu/mL，实样检测检出限为7.32×10^1 cfu/mL，灵敏度和检出限都比较高；在特异性和稳定性的试验中，LAMP法也表现出较强的特异性；并且通过观察可视性沉淀的生成，使观察反应结果更为直观。LAMP方法不需要昂贵的PCR仪，用恒温水浴锅即可完成扩增反应，是一种便捷、特异性强、灵敏度高的检测方法。

LAMP作为一项新技术也有其自身的局限性。LAMP方法对于引物的要求比较高，设计更为复杂[10]；并且在操作过程中易发生污染，实验过程中由于扩增样品产生汽溶胶现象而易产生假阳性结果[11]，因此每一个环节的操作都需要小心谨慎。但是LAMP在病原体检测上所表现出的诸多优点，已经使其在开展研究病原体快速检测手段方面显示出了令人鼓舞的前景。LAMP法不需要特殊的试剂和仪器设备，相信随着对技术的不断完善与改进，建立起一套总成本低廉的检测体系，将作为一种快速检测技术广泛应用于病原体检测和疾病快速诊断等领域。

参考文献

[1] 何洁,苏永泉,徐贵升,等.食品中金黄色葡萄球菌、单增李斯特氏菌和副溶血性弧菌的MPCR法检测[J].现代食品科技,2006,22(2):215-218

[2] 李翠云.单核细胞李斯特菌研究近况[J].中国热带医学,2010,10(1):120-122

[3] 付萍.中国七类食品中单核李斯特氏菌污染状况调查[J].卫生研究,1999,28(2):106

[4] DATTA A R. Sys thet ic olinodeoxyrihonu cleolicle probes for detect ion of *Listeria monocytogenes* [J]. Applied and Environmental M icrob iology, 1998, 54(12): 29-33

[5] KAWASAKI S, HORIKOSHI N, OKADA Y. Mu ltip lex PCR for smiultaneous detection of Salmonella spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coil* O157: H7 in meat samp les [J]. Journal of Food Product, 2005, 68(3): 551-556

[6] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): 63

[7] Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers [J]. BMC Biotechnology, 2006, (6): 3

[8] 朱胜梅,吴佳佳,徐驰,等.环介导等温扩增技术快速检测沙门菌[J].现代食品科技,2008,24(7):725-729

[9] 殷月兰.李斯特菌溶血素基因的原核表达及其生物学特性[J].微生物学报,2004,44(6):752-755

[10] 邵军军,周广青.环介导等温扩增技术及其在分子诊断中的应用[J].实用诊断与治疗杂志,2007,21(6):450-452

[11] 李玉锋.LAMP技术在食品致病菌检测中的研究进展[J].西华大学学报(自然科学版),2011,30(1):16-18

欢迎订阅

《现代食品科技》·中文核心期刊