葡萄球菌耐药基因 *aph* 的 LAMP 检测方法研究

李秀梅[1]，梁智选[1]，李颖[1]，李霞[2]，黄金海[2]，王红军[3]
（1.天津市动物疫病预防控制中心，天津 300402）（2.天津大学生命科学学院，天津 300072）
（3.天津市畜牧业发展服务中心，天津 300384）

摘要：随着抗生素大量而广泛的使用，细菌的耐药性已成为世界范围内关注的问题，对细菌携带耐药基因的检测已成为生物安全调查评估的新途径。本实验应用 PCR 方法扩增新霉素耐药基因 *aph*，将其克隆于 pEASY-T1 载体并测序。通过 Genbank 同源性比较，在 *aph* 基因保守区设计了一套环介导等温扩增（LAMP）特异性引物，通过对 LAMP 反应体系和反应条件的优化，建立了耐新霉素 *aph* 基因的 LAMP 检测方法，其最佳工作条件为：甜菜碱浓度为 0.8 mol/L，Mg^{2+}浓度为 20 mmol/L，反应温度 63 ℃，时间 50 min。此方法可在 60 min 左右完成对 *aph* 基因的检测，特异性好。应用系列稀释的 *aph* 基因质粒进行敏感性检测比较，结果表明 *aph* 基因的 LAMP 检测灵敏度与 PCR 相当，检测限约 20 个拷贝。对 38 株葡萄球菌分离株的 *aph* 基因的 LAMP 检测表明，*aph* 基因阳性携带率为 84.2%。

关键词：葡萄球菌；环介导等温扩增；*aph* 基因
文章篇号：1673-9078(2015)7-326-330 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.050

Application of Loop-mediated Isothermal Amplification to Detect the *aph* Gene in *Staphylococcus*

LI Xiu-mei[1], LIANG Zhi-xuan[1], LI Ying[1], LI Xia[2], HUANG Jin-hai[2], WANG Hong-jun[3]
(1.Animal Disease Prevention and Control Center of Tianjin, Tianjin 300402, China) (2.School of Life Science, Tianjin University, Tianjin 300072, China) (3.Animal husbandry development and service Center of Tianjin, Tianjin 300384, China)

Abstract: Since the use of antibiotics in animal breeding, bacterial resistance has become a worldwide concern. Detection of drug-resistance genes is a new method for assessing biosecurity. The *aph* gene was cloned into the pEASY-T1 vector using PCR-based methods and sequenced. A set of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection primers was designed against a highly conserved region of the *aph* gene based on homology with *aph* loci in GenBank. The reaction conditions were optimized and LAMP detection methods for the *aph* gene were established. The optimal detection conditions were as follows: 0.8 mol/L betaine and 20 mmol/L Mg^{2+}, completed within 50 min in a 63 ℃ isothermal water bath. Compared to PCR detection, the LAMP method can be completed in a shorter time period with higher specificity. The sensitivity threshold was approximately 20.4 copies for the *aph* gene and was similar to that of the PCR method. The positive detection rate of the *aph* gene was 84.2% for 38 *Staphylococcus aureus* isolates.

Key words: *Staphylococcus*; loop-mediated isothermal amplification; *aph* gene

金黄色葡萄球菌广泛分布于自然界，其中人和动物为主要带菌者。随着氨基糖苷类抗生素的滥用，耐药性金葡菌逐渐增多[1]。其耐药机制十分复杂，临床上认为钝化酶的产生是氨基糖苷类耐药的主要机制。钝化酶主要有三类：氨基糖苷磷酸转移酶(aminoglycoside phosphotransferases，APH)、氨基糖苷乙酰转移酶(aminoglycoside acetyltmnsferases, AAC)和氨基糖苷类核苷转移酶(aminoglycoside nucleotidyltransferases，ANT)[2]。细菌能将氨基糖苷类抗生素的游离氨基乙酰化、游离羟基磷酸化或核苷化，使药物不易进入其体内，也不易与体内的靶位点-核糖体 30S 亚基结合，从而产生耐药[3]。

接合转座子是革兰阳性菌传播耐药基因的重要遗传物质。粪肠球菌(*E. faecalis*)(含有 Tn916，Tn918，Tn920，Tn925，Tn2702)；屎肠球菌(*E. faecium*)(含有 Tn5233)；酿脓链球菌(*S. pyogenes*)(含有 Tn3701)；无乳链球菌(*S. agalactiae*)(含有 Tn93951)；以及乳酸乳球菌(含有 Tn5276，Tn5301)等含有接合性转座子的乳酸菌常携带了四环素(tet(M))，红霉素(ermAM)，氯霉素(cat)和卡那霉素(aphA-3)的耐药基因，某些肠球菌

收稿日期：2014-06-23
基金项目：国家高技术研究发展计划（863 计划）项目（2012AA101605）
作者简介：李秀梅（1976-），女，高级兽医师，主要从事预防兽医学研究
通讯作者：王红军（1962-），男，高级兽医师，主要从事动物医学研究

所具有的耐药性基因还可以转移给其他菌属[14]。

近年来，由葡萄球菌引起的食物中毒，特别是奶产品的中毒事件越来越多。众多食物中毒事件分离出来的金葡菌经鉴定均有较高的耐药性[4]，建立简便、快速的葡萄球菌的耐药性检测方法，对避免集体食物中毒事件，指导医生正确使用抗菌药进行针对性治疗，避免盲目使用抗生素具有重要意义[5]。细菌耐药的常规检测技术有：药敏纸片扩散法[6]，PCR 检测法，前者较繁琐且敏感性不高；PCR 具有高灵敏和高特异性，但由于 PCR 扩增仪等设备的限制，在基础常规实验室不易开展，无法满足现场和基层检测的要求。环介导等温扩增技术是近年来发展起来的一种基于 PCR 原理的检测技术，其特异敏感，操作简便，结果易于观测。本实验以氨基糖苷磷酸转移酶耐药基因 *aph* 为靶序列，建立了葡萄球菌耐药基因 *aph* 的 LAMP 检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

38 株葡萄球菌，aph 检测阴性的乳酸菌 4 株，天津大学生命科学学院实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器

pEASY-T1 克隆载体：北京全式金生物技术有限公司；Bst DNA Polymerase：NEB 生物技术有限公司；甜菜碱：Sigma Alidrich 公司；DNA 快速纯化回收试剂盒：北京全式金生物技术有限公司；紫外分光定量仪：NanoDrop 2000，Thermo Electron；PCR 扩增仪：P×E 0.2，Thermo electron corporation。

1.3 *aph* 基因的克隆

1.3.1 *aph* 基因的 PCR 扩增

根据 GenBank 中序列号 AB255435 设计 *aph* 基因的 PCR 引物：Un1：5’-ACAAGATGGATTGCACGCAGGT-3’；Ln2：5‘- CGGCCACAGTCGATGAAT-3’，扩增片段大小为 624 bp。按文献[7]方法提取细菌基因组 DNA，建立 50 μL 体系，94 ℃变性 3 min；94 ℃变性 40 s，56 ℃退火 40 s，72 ℃延伸 50 s，共 30 个循环；72 ℃延伸 8 min。1%的琼脂糖凝胶电泳，120 V 电泳，紫外检测扩增产物。

1.3.2 *aph* 基因的克隆、鉴定及测序分析

按 DNA 片段快速胶回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化回收，连接和转化。用通用引物 T7 及特异性引物对重组质粒 pEASY T-aph 进行 PCR 鉴定。挑取 3 株 aph 阳性葡萄球菌菌株阳性重组菌株，按文献[7]方法提取质粒，送生工生物工程（上海）有限公司测序，对测序结果进行同源性比对。

1.4 LAMP 引物设计

经测序比对分析，选择 *aph* 基因高度保守区作为 LAMP 引物设计目标区域，利用 http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html 设计 LAMP 引物。设计结果包括 5 条引物，2 条外引物（F3、B3），2 条内引物（FIP、BIP），1 条环引物（LB），其中 F3 和 B3 也用于 PCR 扩增，引物序列见表 1。

表 1 葡萄球菌 aph 基因的 LAMP 引物

Table 1 Primers for the *aph* gene of *Staphylococcus aureus* for the LAMP assay

引物	大小/bp	引物序列（5’-3’）
FIP	39	CGAGTACGTGCTCGCTCGATG-ATCCGGCTACCTGCCCAT
BIP	40	ATGGAAGCCGGTCTTGTCGATC-TGAGGCTGGCGAACAGTT
LB	18	ACGAAGAGCATCAGGGGC
F3	16	GGCGGCTGCATACGCT
B3	18	ACGAGATCCTCGCCGTCG

1.5 细菌 DNA 的提取

3 株 aph 基因 PCR 检测阳性并克隆测序的葡萄球菌、4 株 aph 基因阴性乳酸菌分别作为阳性、阴性对照，所有菌株及 38 株作为样品检测的葡萄球 DNA 的提取，按文献[7]的方法进行。

1.6 LAMP 检测方法的建立

1.6.1 LAMP 反应体系及条件优化

应用 aph 基因克隆质粒为模板，摸索反应体系中不同甜菜碱、Mg^{2+}浓度，反应温度对检测结果的影响。选取甜菜碱浓度分别为 0 mol/L、0.2 mol/L、0.4 mol/L、0.8 mol/L、1.6 mol/L，优化甜菜碱浓度；反应体系中 Mg^{2+}浓度依次为 0 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L，再优化 Mg^{2+}浓度；设计梯度的 LAMP 反应程序，反应温度依次为：61 ℃、63 ℃、65 ℃，在这几个温度中优化反应温度。

1.6.2 LAMP 反应特异性

以 3 株 aph 基因阳性葡萄球菌和其他 4 株 aph 基因阴性乳酸菌的 DNA 作为模板，采用 25 μL 体系，模板 1-5μL，FIP/BIP 40 pmol/L，F3/B3 10 pmol/L，LB 20 pmol/L dNTP 10 mmol/L，Betaine 0.8 mol/L，$MgSO_4$

20 mmol/L，Bst 酶 8 U，10×Buffer 2.5 μL，双蒸水补齐。反应条件：63 ℃水浴恒温 50 min，80 ℃灭酶 5~10 min。反应产物用用 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析，观察 LAMP 反应的结果。

1.6.3 LAMP 反应的敏感性

用紫外 Nano Drop-1000 紫外分光光度的方法重组质粒 pEASY T-aph 进行定量，得到质粒浓度以计算质粒的拷贝数。10 倍梯度稀释，分别用做 LAMP 和 PCR 检测的模板，比较 LAMP 和 PCR 检测方法的灵敏度。

1.7 样品检测

用 LAMP 方法检测 38 株葡萄球菌中耐药基因 *aph* 的分布，比较肉眼观察反应后结果和琼脂糖凝胶电泳结果的一致性，并与 PCR 方法做比较。

2 结果与分析

2.1 *aph* 基因的克隆及鉴定

从 3 株 J1、ZTB4-1、ZNZ3 葡萄球菌分离株 PCR 扩增并克隆了约 624 bp 的 *pha* 基因片段，如图 1 所示，。其中 J1、ZTB4-1、ZNZ3 菌株（标号分别为 2、7、9）的基因被克隆并测序，测序结果显示，*aph* 基因克隆片段与 GenBank 中 AB255435 同源性为 99.7-100%。

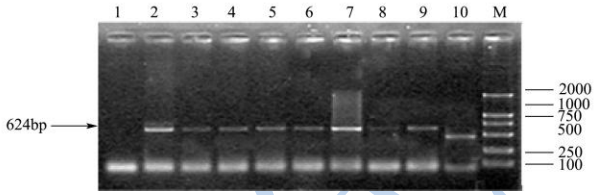


图 1 葡萄球菌 pha 基因的 PCR 检测及克隆

Fig.1 Cloning of drug-resistance *aph* gene fragments of *Staphylococcus aureus*

注：1~10，代表不同葡萄球菌菌株。

2.2 反应体系及条件优化

LAMP 反应体系中，甜菜碱最佳浓度 0.8 mol/L，Mg^{2+}最佳浓度为 20 mmol/L，最佳反应温度为 63 ℃。

2.3 LAMP 反应特异性

在电泳图 2 上，阳性葡萄球菌被检出，有梯状条带出现，而 aph 基因阴性乳酸菌的检出结果呈阴性，表明该套引物可特异检出携带氨基糖苷磷酸转移酶 aph 基因的葡萄球菌。

2.4 LAMP 反应的灵敏性

用琼脂糖凝胶电泳对质粒进行定量，结果为质粒模板原始浓度为 100 ng/μL，即约 2.04×10^{10} copies/μL。以 10 倍系列稀释的质粒为模板，应用优化的 LAMP 条件进行检测，可检测到 2.04×10^{1} copies/μL 质粒。同样的 PCR 检测方法可以检测到 2.04×10^{1} copies/μL 质粒，LAMP 灵敏度与 PCR 灵敏度相当。如图 3、4。

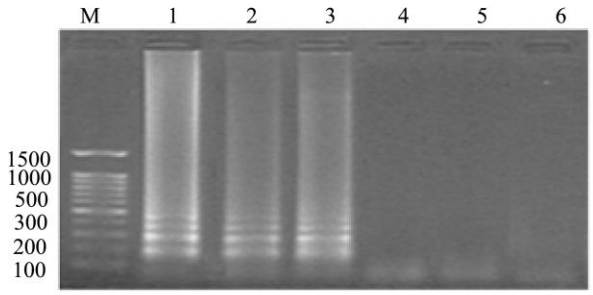


图 2 葡萄球菌 aph 基因的 LAMP 反应特异性结果

Fig.2 Specificity of the *aph* gene of *Staphylococcus aureus* for LAMP assay

注：泳道 1~3 分别：质粒模板来自阳性的葡萄球菌，泳道 4~5 分别为：质粒模板来自阴性乳酸菌，泳道 6 为阴性对照，M 代表 100 bp DNA marker。

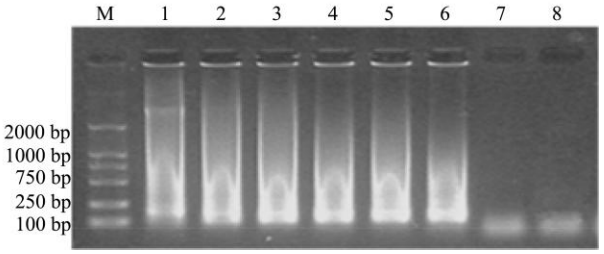


图 3 葡萄球菌 *aph* 基因的 LAMP 反应灵敏度结果

Fig.3 Sensitivity of the *aph* gene of *Staphylococcus aureus* for the LAMP assay

注：泳道 1~7 分别：模板浓度为 2.04×10^{6}、2.04×10^{5}、2.04×10^{4}、2.04×10^{3}、2.04×10^{2}、2.04×10^{1}、2.04×10^{0}、copies/μL 泳道 8 为阴性对照，M 为 D2000 DNA marker。

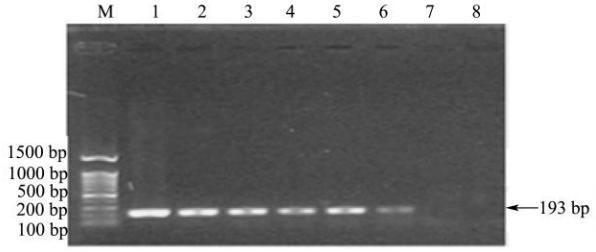


图 4 葡萄球菌 *aph* 基因的 PCR 反应灵敏度结果

Fig.4 Sensitivity of the *aph* gene of *Staphylococcus aureus* for the PCR assay

注：泳道 1-7 分别：模板浓度为 2.04×10^{6}、2.04×10^{5}、2.04×10^{4}、2.04×10^{3}、2.04×10^{2}、2.04×10^{1}、2.04×10^{0}，泳道 8 为

阴性对照，M 为 100 bp DNA marker。

2.5 样品的检测

38 株葡萄球菌分离株中 *aph* 基因的检测结果如表 2。由表显示，LAMP 方法检出率高于 PCR 检出率，两者符合率为 71%。

表 2 38 份样品的 LAMP 和 PCR 检测结果

Table 2 Analysis results of 38 field samples detected by LAMP and PCR assay

LAMP检测结果	PCR检测结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	21	11	32
阴性	0	6	6
合计	21	20	38

3 讨论

3.1 关于金黄色葡萄球对于氨基糖苷类抗生素的耐药性

环介导恒温扩增技术自发明以来，因其具有高特异性、高效率和快速反应的特点，故从 2003 年开始逐步被用于医学的临床检测和农业科学。目前关于 LAMP 用于耐药基因检测的文献少有报道。Sekiguchi J 等[8]将 LAMP 运用于检测绿脓假单胞菌中氨基糖苷类耐药基因 *aac(6')-Iae* 以及与喹诺酮类耐药有关的基因 *gyrA* 和 *parC*。Misawa Y 等[9]和 Lee 等[10]也相继运用 LAMP 检测耐甲氧西林金葡菌的 *mecA* 基因和肺结核分支杆菌中大环内酯类耐药基因 erm。而 LAMP 检测金葡菌新霉素耐药基因的 *aph* 的文献还未见报道。目前临床上已分离到 7 种 aph，本实验检测新霉素耐药的编码基因为 *aph（3'）-III*，这类基因主要位于质粒上，多与转座子相连，可在 G^+与 G 菌之间转移[11~12]。

由于长期使用及滥用抗生素等抗菌药物来预防和治疗葡萄球菌的感染，使得葡萄球菌耐药性问题越来越受到关注，已成为临床抗感染治疗和预防的难题之一，并且葡萄球菌大多具有多重耐药性[13]。抗生素对葡萄球菌越来越束手无策，有专家预言，若抗生素使用再居高不下，那么我们就有可能进入后“抗生素时代”，即回到抗生素发现之前的时代。未来抗生素可能不再是杀死细菌，而是作为一种类似于抗体的物质，瓦解细菌传递之间的信号分子，从而干扰细菌之间的信号传递[14]。

3.2 关于 LAMP 的反应条件

LAMP 反应扩增产物为梯状条带，反应结果通过 1.5%琼脂糖凝胶电泳来分析，根据梯状条带的有无和阴性对照来判断检测结果的阴阳性。若采用约 2%琼脂糖凝胶电泳进行分析，梯状条带效果将更为清晰。LAMP 方法具有高度的敏感性，操作时要防止气溶胶的形成，尽量减少污染。本实验对于葡萄球菌耐药基因 aph 检测，PCR 检测阳性样品、LAMP 检测阴性样品，二者均一致，符合率 71%。LAMP 检测的阳性率略高于 PCR 方法，究其原因：（1）不同 LAMP 引物的的扩增效率不同，这是由引物本身决定的；（2）对于不同 LAMP 的引物，都存在一个扩增的平台期，即随着反应时间的延长，扩增反应不再进行；（3）本实验采用 F3 和 B3 作为 PCR 的扩增引物，并非 PCR 扩增反应的最佳引物，影响了其检出效率。此外，进一步降低 LAMP 反应体系中模板浓度，反应时间，降低 LAMP 的假阳性判定，通过浊度测定值，确定阳性标准，将有助于方法的实用化。LAMP 法反应迅速，不需昂贵的仪器，可通过眼观直观判断。

通过 LAMP 反应条件的优化，电泳与目测结果的比较，发现 Mg^{2+}、甜菜碱浓度对反应结果有较大影响。LAMP 反应中 Mg^{2+}除了常规 PCR 反应中保证酶活性、反应特异性等作用外，也是反应副产物焦磷酸镁生成的必要条件，只有反应体系中 Mg^{2+}达到一定的浓度才能保证焦磷酸镁这种白色产物的累积，实现肉眼判定结果的目标[15]。当 Mg^{2+}浓度过高或者过低都没有发生 LAMP 反应，这是因为当 Mg^{2+}浓度过低时，对 DNA 聚合酶几乎没有催化作用，从而导致没有发生扩增反应；随着 Mg^{2+}浓度的增加，其催化作用逐渐增强，扩增产物增多，产物浓度增大，但到了一定程度，就对酶起抑制作用，从而抑制扩增反应。本试验中 Mg^{2+}为 20mM 时，反应结果可以直接通过肉眼观测，可以看到有焦磷酸镁沉淀引起的浑浊现象。Betaine 也是 LAMP 反应中的关键试剂，合适浓度的甜菜碱可以减低 DNA 双螺旋的稳定性，有助于打开 DNA 的二级结构，促进 DNA 解链和后续的反应进行；反应温度对 LAMP 实验的影响不大。所建立的 LAMP 方法只需 45～60 min 左右就可得到检测结果，适合于基层检测应用。虽然本实验 LAMP 与 PCR 的灵敏度相当，但由于 LAMP 有两对引物对靶序列进行识别，故其检出率高于 PCR。

结论：以耐新霉素 *aph* 基因为靶标建立的 LAMP 检测方法，能够快速、准确地检测葡萄球菌耐药基因 aph，检测灵敏度约为 20 个拷贝，仪器需求简单，可满足基层检测机构和现场疫源地检测的需要。

参考文献

[1] 黄革,周晓红,蒋文玲,等.多重 PCR 快速检测金黄色葡萄球菌中氨基糖苷类抗生素耐药基因及其临床应用[J].中国感染与化疗杂志,2009,9(4):244-247
HUANG Ge, ZHOU Xiao-hong, JIANG Wen-ling, et al. Development of multiplex PCR system for rapid detection of genes encoding aminoglycoside resistance in Staphylococcus aureus [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2009, 9(4): 244-247

[2] 李玉红.氨基糖苷类钝化酶耐药机制的研究进展[J].国外医学药学分册,2005,3(3):199-203
LI Yu-hong. Research advances in the mechanism of aminoglycoside modified enzyme [J]. Foreign Medical Sciences Section on Pharmacy, 2005, 3(3): 199-203

[3] Llano-Sotelo B, Azucena EF Jr, Kotra LP, et al. Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site [J]. Chem. Biol., 2002, 9(4): 455-463

[4] 张兰荣,王连秀,张文利.食品中金黄色葡萄球菌的污染状况及耐药性分析 [J].中国食品卫生杂志,2004,16(1):35-36
ZHANG Lan-rong, WANG Liang-xiu, ZHANG Wen-li. Contamination and drug resistance of Staphylococcus aureus in food [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2004, 16(1): 35-36

[5] 何国才.2008~2009 年金黄色葡萄球菌临床分离与耐药变迁[J].中外医疗,2010,15:43
HE Guo-cai. Isolation and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus from 2008 to 2009 [J].China Foreign Medical Treatment,2010,15:43

[6] 王爱玲,付明霞,宋向芹,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌检测方法的评估[J].滨州医学院学报, 2009,32(6):408-410
WANG Ai-ling, FU Ming-xia, SONG Xiang-qin, et a1. Evaluation of four techniques for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Journal of Binzhou Medical University, 2009, 32(6):408-410

[7] 李琳,黄金海,赵耘,等.葡萄球菌肠毒素基因分型 PCR 检测技术的研究[J].食品科学,2008,29(7):340-344
LI Lin, HUANG Jin-hai, ZHAO Yun, et a1. Study on PCR Method for Differentiating Genetype of Entertoxin of *S aureus* [J]. Food Science,2008,29(7):340-344

[8] Sekiguchi J, Asagi T, Miyoshi-Akiyama T, et a1. Outbreaks of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa in Community Hospitals in Japan [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(3): 979-989

[9] Misawa Y, Yoshida Y, Saito R, et a1. Application of loop-mediated isothermal amplification technique to rapid and direct detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in blood cultures [J]. J. Infect. Chemother, 2007, 13(3): 134-140

[10] Lee MF, Chen YH, Hsu HJ, et a1. One-tube loop-mediated isothermal amplification combined with restriction endonuclease digestion and ELISA for colorimetric detection of resistance to isoniazid, ethambutol and streptomycin in Mycobacterium tuberculosis isolates [J]. J. Microbiol. Methods, 2010, 83(1):53-58

[11] 王德海,程国富.葡萄球菌的耐药机制[J].动物科学与动物医学,2004,21(10):53-54
WANG De-hai, CHENG Guo-fu. Resistance mechanism of Staphylococcus [J]. Animal Science and Veterinary Medicine, 2004, 21(10):53-54

[12] Katla A K. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products [J]. Int. J. Food Microbiol., 2001, 67(1-2): 147-152

[13] 陈永庆,傅琳,陈天赐.医院感染金黄色葡萄球菌耐药性监测[J].中华医院感染学杂志,2008,18(1):85
CHEN Yong-qing, FU Lin, CHEN Tian-ci. Surveillance on Resistance of Staphalococcus in Nosocomial Infections [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2008, 18(1): 85

[14] 邓怡.未来的抗生素与细菌的耐药性[J].技术与市场, 2009, 16(10):88
DENG Yi. Future antibiotics and resistance of bacteria [J]. Technology & Market, 2009, 16(10): 88

[15] Toriniwa, Komiya T. Rapid detection and quantification of Japanese encephalitis virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. Microbiol. Immunol., 2006, 50: 379-387