

LAMP 实时浊度法快速检测肠出血性大肠杆菌 O157 的研究

李碧霞^{1,2}, 游淑珠², 邝筱珊², 冯家望², 王小玉², 唐食明², 成晓维², 许喜林¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 珠海出入境检验检疫局技术中心, 广东珠海 519015)

摘要: 采用环介导等温扩增 (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP) 技术, 利用实时浊度仪实时检测 LAMP 反应过程中所产生的焦磷酸镁白色沉淀, 实现对扩增反应全过程的监控, 建立食品中肠出血性大肠杆菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157 的 LAMP 实时浊度法快速检测方法。针对 EHEC O157 抗原基因 *rfbE* 的序列设计 4 条特异性 LAMP 引物。通过实时浊度仪在恒温 63 °C 下 1 小时完成检测, 对方法的特异性、灵敏度、稳定性进行了评价, 并进行了食品样品添加试验以评价其应用于实际样品的效果。结果显示, 经优化后, 该方法的最低检出限为 2.8×10^3 CFU/mL, 与 PCR 法灵敏度比较高 100 倍。样品添加试验能检出的最低添加量为 2.8×10^0 CFU/25 g (或 mL)。LAMP 实时浊度法具有快速、灵敏、特异性高、操作简便的优势, 为食源致病菌快速筛查提供了一种良好的检测模式。

关键词: 环介导等温扩增技术; 实时浊度仪; 大肠杆菌 O157; 检测

文章编号: 1673-9078(2014)7-268-272

Rapid Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 by LAMP Real-time Turbidity Method

LI Bi-xia^{1,2}, YOU Shu-zhu², KUANG Xiao-shan², FENG Jia-wang², WANG Xiao-yu², TANG Shi-ming²,
CHENG Xiao-wei², XU Xi-lin¹

(1. School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. The Inspection Technical Center of Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China)

Abstract: Real-time monitoring of magnesium pyrophosphate produced from the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction was achieved by the turbidimeter. Four specific primers were designed according to the sequences of antigen gene *rfbE* of EHEC O157. Detection was completed at 63 °C on the real-time turbidimeter in 1 h. The specificity, sensitivity, stability of the method was evaluated. Results showed that after optimized, the lowest detection limit was 2.8×10^3 CFU/mL, and 100 times more sensitive than the PCR, and the minimal adding quantity of 2.8×10^0 CFU/25 g (or mL) could be detected. LAMP real-time turbidity method is rapid, sensitive, high specificity and easy to operate, which is a good pattern for fast screening of foodborne pathogens.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; real-time turbidimeter; *Escherichia coli* O157; detection

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, E.coli) 根据菌体抗原的不同, 可分为 150 多血清型, 其中有 16 个血清型致病性强, 引起腹泻, 统称致病性大肠杆菌^[1]。大肠杆菌 O157 属于肠出血性大肠杆菌 (EHEC), 是 20 世纪 70 年代后期发现的传染病, 能引起人的出血性腹泻和肠炎, 且并发溶血性尿毒综合症等, 严重的可致死亡^[2]。在美国和加拿大通常分离的肠道致病菌

收稿日期: 0214-02-26

基金项目: 国家质检总局科技计划项目 (2010IK174)

作者简介: 李碧霞 (1982-), 女, 助理工程师, 研究方向为食品工程

通讯作者: 许喜林 (1964-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为食品微生物与食品安全

中, 大肠杆菌 O157 已排在前三位。日本、加拿大及瑞士等国已将 O157:H7 列为必须报告的传染病, 世界卫生组织也已将大肠杆菌 O157:H7 列为食源性疾病病原菌^[3~5]。

致病性大肠杆菌 O157 的传统检测方法有多管发酵法、滤膜法和平板计数法, 这些方法存在耗时费力、步骤繁琐等不足之处, 已愈来愈不能满足人类对致病微生物快速、简易、高特异性的鉴定要求。而快速检测方法常见的有基于分子水平的 PCR 法、多重 PCR 法、荧光 PCR 法及基因芯片技术, 这些方法自动化程度高, 在一定程度上弥补了传统方法的不足。但除荧光 PCR 法外, 扩增产物都需要开盖暴露, 容易导致假

阳性,且需要昂贵的仪器及试剂耗材。基于免疫学的分析检测技术有免疫荧光技术、酶联免疫吸附法、免疫磁珠分离法等,还有一些代谢学的快速检测技术,这些方法所需设备简单、易操作。但一般需要提供数量较多的纯化细菌,或者需要对样品进行浓缩后收集,来提高单位体积的含菌量,在短时间内得到检测结果较难^[6-8]。LAMP技术是一种新型等温核酸扩增法,为快速基因检测提供了一种新的技术途径。LAMP实时浊度法通过实时浊度仪实时检测反应过程中所产生的白色沉淀,实现对扩增全过程的监控,不同于一般LAMP显色法只能靠终点观察扩增结果,提高引物筛选的效率。且4条LAMP引物特异性结合6个目标区域,比PCR具有更强的特异性,闭管反应不容易污染,不需电泳分析,一般60 min内完成检测,大大提高检测工作效率^[9-10]。本研究旨在针对大肠杆菌O157抗原基因rfbE设计LAMP引物,建立LAMP实时浊度快速检测方法,并对方法的特异性、灵敏度及稳定性进行评价。

1 材料和方法

1.1 主要仪器

GeneAmp PCR system 9700,美国ABI应用生物系统公司;振荡型恒温金属浴MB-102,杭州博日科技有限公司;凝胶成像系统Gel Doc EQ,美国BIO-RAD公司;LAMP实时浊度仪LA-320C,日本荣研生物公司;核酸浓度测定仪ND-1000,美国NanoDrop科技有限公司。

1.2 材料和试剂

10×PCR buffer, dNTPs, MgCl₂, Taq DNA聚合酶, DNA Marker DL1000, 6× loading buffer, dNTPs, MgCl₂, 宝生物工程(大连)有限公司; Bst DNA polymerase large fragment, New England Biolabs公司;甜菜碱(Betaine),广州威佳生物有限公司;琼脂糖,广州捷倍斯生物有限公司;DNA提取试剂盒(离心柱型),天根生化科技(北京)有限公司;LAMP引物,由宝生物工程(大连)有限公司。

标准菌株:普通大肠杆菌*escherichia coli*(ATCC 10798, CCTCC AB 200068, ATCC 13706);肠致病性大肠杆菌EPEC *enteropathogenic escherichia coli*(ATCC 43887);肠侵袭性大肠杆菌EIEC *enteroinvasive escherichia coli*(ATCC 43893);肠产毒性大肠杆菌ETEC *enterotoxigenic escherichia coli*(ATCC35401, 分离株ETEC O8, 分离株ETEC O78);肠出血性大肠杆

菌EHEC *enterohemorrhagic escherichia coli*O157: H7(NCTC 12900);肠出血性大肠杆菌EHEC O157(CCTCC AB 200051, ATCC 35150, EHEC O157-stx2);大肠杆菌*escherichia coli*O104: H12(分离株EC O104);大肠杆菌*escherichia coli*O4: H4(分离株EC O4);单核细胞增生李斯特菌*listeria monocytogenes*(CCTCC AB 97021);金黄色葡萄球菌*staphylococcus aureus*(CMCC(B) 26003);宋内氏志贺氏菌*Shigella sonnei*(CMCC 51334);肠炎沙门氏菌*salmonella enteritidis*(CCTCC AB 94018);副溶血性弧菌*vibrio parahaemolyticus*(ATCC 17802)。

1.3 LAMP引物设计和合成

根据LAMP引物设计的原则,针对GenBank公布大肠杆菌O157抗原基因rfbE序列,使用在线设计软件LAMP Designer设计特异引物,经筛选获得一套特异性引物。外引物F3和B3的序列分别为:

5'-TTCACACTTATTGGATGGTCTC-3'和5'-TA ACTTGCTCATTCGATAGGC-3';内引物FIP和BIP的序列分别为5'-ACTGGCCTTGTTTCGATGAG TTATTCTAACTAGGACCGCAGA-3'和5'-TCCACA CGATGCCAATGTACTCTTAATTCCACGCCAACCA A-3'。

1.4 样品DNA提取

称取25 g食品样品,剪碎,于225 mL的改良EC肉汤36 ± 1 °C培养18 h~24 h,然后取增菌液1 mL按照DNA提取试剂盒的说明书进行操作。所提取的DNA分装于-20 °C保存备用。

1.5 LAMP反应体系的建立及优化

以肠出血性大肠杆菌EHEC O157ATCC 35150的DNA作为模板,反应体系中固定参数为Tris-HCl(pH 8.8) 20 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgSO₄ 8 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 10 mmol/L, 0.1% Tween20, 8U Bst大片断DNA聚合酶, 2 μL DNA。设定5个变量参数进行单因素变化实验,包括反应温度(60.0 °C、61.0 °C、62.0 °C、63.0 °C、64.0 °C、65.0 °C), Mg²⁺的浓度(2.0 mmol/L、4.0 mmol/L、6.0 mmol/L、8.0 mmol/L、10.0 mmol/L), 甜菜碱的浓度(0.6 mol/L、0.8 mol/L、1.0 mol/L、1.2 mol/L、1.4 mol/L、1.6 mol/L), dNTP的浓度(0.8 mmol/L、1.0 mmol/L、1.2 mmol/L、1.4 mmol/L、1.6 mmol/L), 外引物与内引物浓度比(1:2、1:4、1:6、1:8、1:10)。参照LAMP浊度仪使用说明书,将混合物置于反应孔中,恒温反应90 min后80 °C下保温5 min以结束反应。选

择最优的参数组合作为最终的反应条件。

1.6 LAMP 的特异性试验

采用肠出血性大肠杆菌 O157 及多株食源性菌株 DNA 作为模板进行 LAMP 反应, 从而验证引物的特异性。

1.7 LAMP 的灵敏度试验

将 EHEC ATCC 35150 接种至营养肉汤于 36 °C 培养 24 h, 将肉汤用生理盐水稀释至浊度约为 0.5~1 个麦氏浊度制备成标准菌液, 用营养琼脂进行平板计数得到该标准菌液的菌体浓度为 2.8×10^8 CFU/mL。将标准菌液以十倍梯度稀释分别稀释成 2.8×10^7 CFU/mL, 2.8×10^6 CFU/mL, 2.8×10^5 CFU/mL, 2.8×10^4 CFU/mL, 2.8×10^3 CFU/mL, 2.8×10^2 CFU/mL, 2.8×10^1 CFU/mL, 2.8×10^0 CFU/mL 的菌液。每个稀释度菌液所提取的 DNA 模板分别取 2 μ L 进行 LAMP 实验, 以 ddH₂O (超纯净水) 代替 DNA 模板作为空白对照, 按照优化好的 LAMP 反应条件进行扩增, 以确定 LAMP 反应的灵敏度, 同时分别取 2 μ L 用于 PCR 扩增反应。按照 SNT 2797-2011 进行, PCR 扩增引物为 5'-attgcgctgaagccttg-3' 和 5'-cgagtacattggcattggcat cgtg-3', 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 60s, 56 °C 退火 60s, 72 °C 延伸 60s 进行 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存反应产物, PCR 产物长度为 499 bp。

1.8 LAMP 的稳定性试验

将 1.7 中稀释好的 2.8×10^5 CFU/mL, 2.8×10^4 CFU/mL, 2.8×10^3 CFU/mL 三个浓度的菌液, 每个稀释度分别取 2 μ L 进行 LAMP 实验, 以 ddH₂O (超纯净水) 代替 DNA 模板作为空白对照, 按照优化好的 LAMP 反应条件进行 8 次重复实验, 试验该方法的稳定性。

1.9 食品样品大肠杆菌 O157 添加试验

分别取牛奶、鱼糜、肉末、椰浆、调味酱、饼干、巧克力, 经 GB/T 4789.36-2008 传统培养确认为 EHEC O157 阴性。将 EHEC 标准菌株按 1.7 的方法把标准菌液稀释成 2.8×10^2 CFU/mL, 2.8×10^1 CFU/mL, 2.8×10^0 CFU/mL, 2.8×10^{-1} CFU/mL 的菌液, 添加 1 mL 至 25 g 上述样品中混合均匀, 制备成阳性模拟样品。用改良 EC 肉汤增菌后 18~24 h 后, 进行 LAMP 检测, 以确定上述不同食品基质对 LAMP 检测的影响。

2 结果与讨论

2.1 LAMP 反应体系的建立及优化

根据 LAMP 浊度法中扩增反应曲线的出峰时间、峰值及峰形作为评价指标, 经比较后得到最佳反应条件为 FIP 和 BIP 各 1.6 μ mol/L, F3 和 B3 各 0.2 μ mol/L, Tris-HCl (pH8.8) 20 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgSO₄ 8 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 10 mmol/L, 0.1% Tween20, 甜菜碱 0.8 mol/L, dNTP 1.4 mmol/L, 8U Bst DNA 聚合酶和 2 μ L DNA。63 °C 恒温反应 60 min 后 80 °C 5 min 结束反应, 结果如图 1 所示。

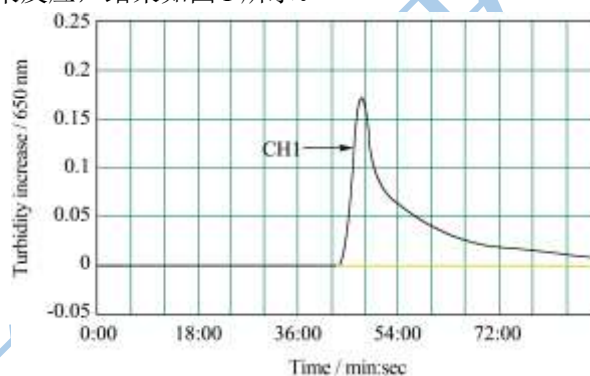


图 1 LAMP 反应体系的试验结果

Fig.1 Result of LAMP detection

注: CH1-EHEC 阳性对照 (ATCC 35150); CH2-EHEC 阴性对照 (ATCC 10798); CH3-空白对照 (水)。

2.2 LAMP 的特异性试验

rfbE 引物所建立的 LAMP 反应体系仅对 O157 型大肠杆菌呈阳性扩增, (图 2 中 CH1、CH2, 图 3 中 CH3、CH4, 而其余 3 种致泻性大肠杆菌和其他食源性菌株均未出现阳性扩增, 即使反应时间延长至 90 min 也未能检测到, 表明该引物特异性良好。

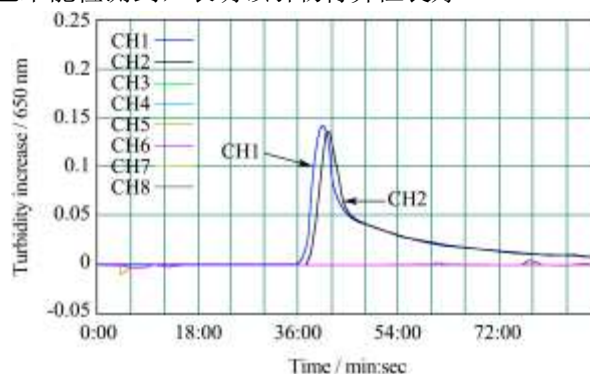


图 2 LAMP 反应体系特异性试验结果

Fig.2 Specificity result of LAMP

注: CH1-ATCC 35150; CH2-EHEC O157 分离株; CH3-ATCC 43887; CH4-CCTCC AB 97021; CH5-CCTCC AB 94018; CH6-CMCC(B)26003; CH7-ATCC 17802; CH8-空白对照 (超

纯水)。

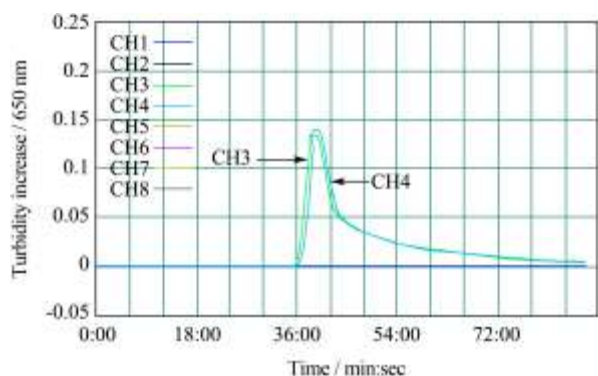


图3 LAMP 反应体系特异性试验结果

Fig.3 Specificity result of LAMP primers rfbE

注: CH1-空白对照 (超纯水); CH2-阴性对照 (ATCC 33291); CH3-NCTC 12900, CH4-CCTCC AB 200051, CH5-CMCCS1344; CH6-大肠杆菌 O4: H4 (分离株 EC04); CH7-ATCC10798; CH8-CCTCCAB20068。

2.3 LAMP 的灵敏度试验

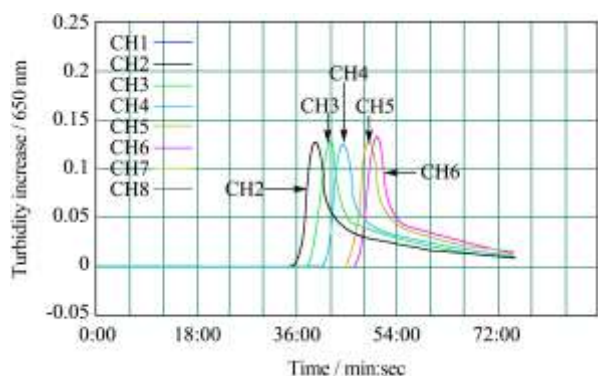


图4 LAMP 反应体系灵敏度试验结果

Fig.4 Sensitivity result of LAMP primers rfbE

注: CH1-空白对照 (超纯水); CH2-8 菌液浓度分别为: 2.8×10^7 CFU/mL, 2.8×10^6 CFU/mL, 2.8×10^5 CFU/mL, 2.8×10^4 CFU/mL, 2.8×10^3 CFU/mL, 2.8×10^2 CFU/mL, 2.8×10^1 CFU/mL。

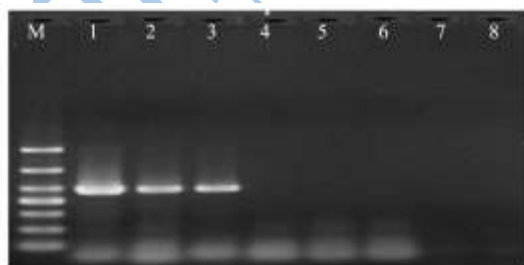


图5 PCR 灵敏度试验结果

Fig.5 Sensitivity result of PCR

注: M-DL1000; 1-8 菌液浓度分别为 2.8×10^7 CFU/mL, 2.8×10^6 CFU/mL, 2.8×10^5 CFU/mL, 2.8×10^4 CFU/mL, 2.8×10^3 CFU/mL, 2.8×10^2 CFU/mL, 2.8×10^1 CFU/mL, 空白对

照 (超纯水)。

从图 4 和 5 可知, LAMP 实时浊度法的检出下限可达到菌液浓度 2.8×10^3 CFU/mL, PCR 法的检出限为菌液浓度 2.8×10^5 CFU/mL。因此, LAMP 实时浊度法灵敏度高于 PCR 法。

2.4 LAMP 的稳定性试验

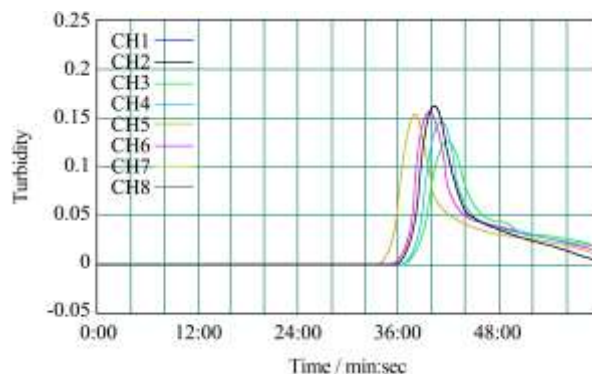


图6 LAMP 稳定性试验

Fig.6 Stability result of LAMP

注: CH1-8-菌液浓度为 2.8×10^5 CFU/mL

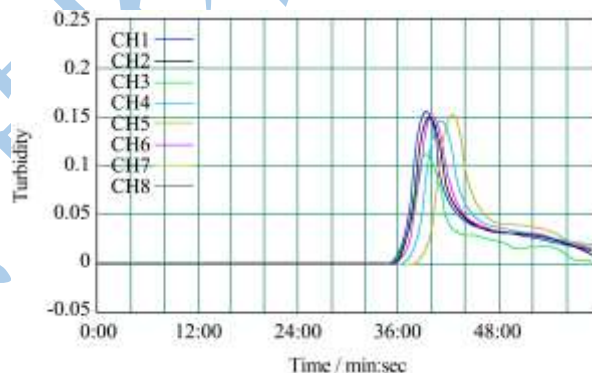


图7 LAMP 稳定性试验

Fig.7 Stability result of LAMP

注: CH1-8-菌液浓度为 2.8×10^4 CFU/mL

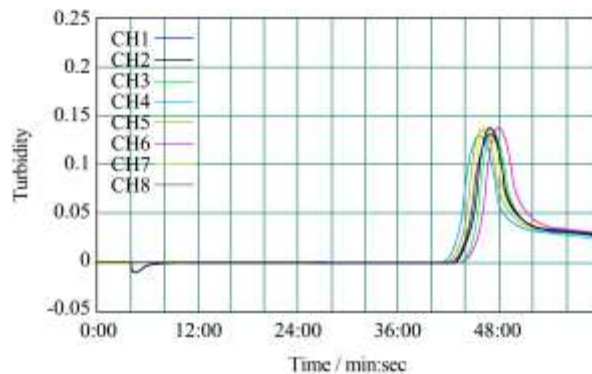


图8 LAMP 稳定性试验

Fig.8 Stability result of LAMP

注: CH1-8-菌液浓度为 2.8×10^3 CFU/mL

图 6~8 显示, 3 个菌液浓度的 8 次 LAMP 扩增反应均出现阳性扩展, 扩增曲线峰形及重复性较好, 表

明该方法的稳定性良好。

2.5 食品样品添加大肠杆菌 O157 研究结果

从表 1 可知, 各食品基质在添加菌浓度为 2.8×10^2 CFU/25g (mL)、 2.8×10^1 CFU/25g (mL)、 2.8×10^0 CFU/25g 方法中写的 25 (mL) 后经改良而 EC 肉汤增菌后, 用 LAMP 检测方法均能检出。当添加菌浓度为

2.8×10^{-1} CFU/25g (mL) 时, 该方法未能检出样品中的大肠杆菌 O157, 表明该方法检测这些食品基质的灵敏度可达 2.8×10^0 CFU/25g(mL), 这些食品基质对增菌及后续的 LAMP 反应并无抑制等影响。因此, 利用 LAMP 实时浊度法检测食品中的致病菌不仅灵敏度高, 而且特异性强, 应用前景广阔。

表 1 食品样品添加 O157 的检验结果

Table 1 Result of detection of E.coli O157 in samples

添加标准菌株 EHEC ATCC 35150 浓度/(25g/mL)	样品名称(检测结果:检出样品数/检测样品数)						
	牛奶	鱼糜	肉末	椰浆	调味酱	饼干	巧克力
2.8×10^2	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
2.8×10^1	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
2.8×10^0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
2.8×10^{-1}	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

3 结论

3.1 肠出血性大肠杆菌 O157 作为一种常见致病菌, 危害极大, 迫切需要建立一种简单可靠的快速筛选方法, 以便更好的进行监控, 为控制和预防所引起的疾病提供客观可信的资料。本研究以 EHEC O157 的抗原基因 *rfbE* 作为目标基因, 根据 LAMP 反应的原理及引物设计的原则, 经过优化试验确定了反应体系和程序。研究结果表明, 使用 LAMP 实时浊度法检测 EHEC O157 的灵敏度较高, 最低检出限为 2.8×10^3 CFU/mL, 高于同时采用的 PCR 法检测 100 倍, 添加菌量最低为 2.8×10^0 CFU/25g (或 mL) 的样品经增菌后能检出; 检测方法特异性强, 在 13 株相关致病菌的检测中没有发现假阳性和假阴性结果; 检测方法稳定性较好, 在 3 个污染等级进行 8 批次的重复实验以及 7 类常见食品的添加试验 (每类食品 10 个样品) 中, 结果稳定一致。利用实时浊度仪建立稳定的 LAMP 法后, 在实际应用中可利用 SYBR Green 等染料对扩增产物进行显色, 通过反应管最终的颜色变化肉眼观察检测结果, 则仅需恒温装置即可完成反应, 满足基层实验室或现场检测的需求。

3.2 综上所述, LAMP 实时浊度法检测食品中肠出血性大肠杆菌 O157 具有特异性强, 灵敏度高, 方便快捷, 成本低等特点, 作为食品微生物快速筛查的补充手段, 具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] Levine M M. Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteroinvasive, entero-hemorrhagic, and enteroadherent [J]. Infect. Dis., 1987, 155: 377-389

[2] QADRI F, SVENNERHOLM A M, FARUQE A S G, et al. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention [J]. Clin. Microbiol. Rev., 2005, 18(3): 465-483

[3] TORRES A G, ZHOU X, KAPER J B. Adherence of diarrheagenic Escherichia coli strains to epithelial cells [J]. Infect. Immun., 2005, 73(1): 18-29

[4] Fode-Vaughan K A, Maki J S, Benson J A, et al. Direct PCR detection of Escherichia coli O157: H7 [J]. Lett. Appl. Microbiol., 2003, 37(3): 239-243

[5] AL-AJMI D, PADMANABHA J, DENMAN S E, et al. Evaluation of a PCR detection method for Escherichia coli O157:H7/H- bovine faecal samples [J]. The Society for Applied Microbiology, 2006, 42: 386-391

[6] Vilchez S, D Reyes, M Paniagua, et al. Prevalence of diarrhoeagenic Escherichia coli in children from Leon, Nicaragua [J]. Med. Microbiol., 2009, 58:630-637

[7] Chizhikov V, Rasooly A, Chumakov K, et al. Microarray analysis of microbial virulence factors [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67(7): 3258-3263

[8] 郝江燕, 胡文忠, 冯叙桥, 等. 食品中大肠杆菌生物检测方法的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(15): 370-374

HAO Jiang-yan, HU Wen-zhong, FENG Xu-qiao, et al. Research progress on biological detection methods of Escherichia coli in food. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(15): 370-374

[9] 曾冰冰, 肖凯军, 石磊, 等. LAMP 方法在食品微生物检测中的应用 [J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(1): 22-25

ZENG Bing-bing, XIAO Kai-jun, SHI Lei, et al. Application of LAMP method on Detecting Microbiology in

- Food [J]. Journal of Modern Food and Pharmaceuticals, 2007, 17(1): 22-25
- [10] 张宏伟,叶露萌,彭杨思,等.利用环介导等温扩增技术对沙门氏菌进行检测[J].食品研究与开发,2009,30(5):115-118
- ZHANG Hong-wei, YE Lu-meng, PENG Yang-si, et al.Development of LAMP detection of salmonella in food[J]. Food Research and Development, 2009, 30(5): 115-118

