

# 布鲁氏菌可视化环介导等温扩增方法的建立及应用

张萌<sup>1</sup>, 阳爱国<sup>2</sup>, 安翠红<sup>3</sup>, 侯巍<sup>2</sup>, 郭莉<sup>2</sup>, 袁东波<sup>2</sup>, 尹杰<sup>2</sup>, 莫茜<sup>2</sup>, 郭杨<sup>4</sup>, 吴宣<sup>2</sup>, 高露<sup>2</sup>, 王新<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100) (2. 四川省动物疫病预防控制中心, 四川成都 611130) (3. 陕西省疾病预防控制中心, 陕西西安 710054) (4. 四川省疾病预防控制中心, 四川成都 610041)

**摘要:** 布鲁氏菌病(简称布病)是一种由布鲁氏菌引起的人畜共患疾病,影响了畜牧业的健康发展,甚至威胁到了人类的健康安全,造成了较严重的经济社会损失。因此,对布鲁氏菌病的防控十分必要。本研究主要基于布鲁氏菌保守基因 *Omp2a*, 利用在线网站设计 3 对引物,并优化其反应条件与反应体系,建立了一种检测布鲁氏菌的可视化 LAMP 方法。同时,将建立好的 LAMP 方法与聚合酶链式反应(PCR)检测方法相比较,并交由陕西省疾病预防控制中心进行实际样本检测。结果表明,基于羟基萘酚蓝(HNB)指示剂,LAMP 扩增的结果可凭肉眼观察。建立的 LAMP 检测方法能准确区分布鲁氏菌与非布鲁氏菌,检测限为  $2.56 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L。在实际样品检测中,LAMP 检测方法相对于常规分离鉴定方法的敏感性和特异性均为 100%。因此,本研究建立的 LAMP 检测布鲁氏菌方法具有特异性强、灵敏度高优点,扩增 45 min 即可肉眼观察到检测结果,适用于现场和基层检测。

**关键词:** 布鲁氏菌; 环介导等温扩增; 可视化; 应用

文章编号: 1673-9078(2021)08-317-325

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.1218

## Establishment and Application of Visual Loop-mediated Isothermal Amplification of *Brucella* spp.

ZHANG Meng<sup>1</sup>, YANG Ai-guo<sup>2</sup>, AN Cui-hong<sup>3</sup>, HOU Wei<sup>2</sup>, GUO Li<sup>2</sup>, YUAN Dong-bo<sup>2</sup>, YIN Jie<sup>2</sup>, MO Qian<sup>2</sup>, GUO Yang<sup>4</sup>, WU Xuan<sup>2</sup>, GAO Lu<sup>2</sup>, WANG Xin<sup>1</sup>

(1.College of Food Science and Engineering, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, China) (2.Animal Disease Control Center of Sichuan, Chengdu 611130, China) (3.Center for Disease Control and Prevention of Shaanxi, Xi'an 710054, China) (4.Center for Disease Control and Prevention of Shaanxi, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** Brucellosis is a zoonotic disease caused by *Brucella*, which affects the healthy development of animal husbandry, even threatens the health and safety of human beings, and causes serious economic and social losses. Therefore, the prevention and control of Brucellosis is very necessary. In this study, based on *Omp2a*, a conserved gene of *Brucella*, three pairs of primers were designed by online website, and the reaction conditions and reaction system were optimized. At the same time, the established LAMP method was compared with PCR detection method, and was used for the detection of actual samples by Center for Disease Control and Prevention of Shaanxi. The results showed that the amplification results of LAMP could be observed by naked eyes based on HNB indicator. The LAMP detection method can accurately distinguish *Brucella* from non-*Brucella*, and the detection limit is  $2.56 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L. In the actual sample detection, the sensitivity and specificity of LAMP were 100% compared with conventional separation and identification methods. Therefore, the LAMP detection method established in this study has the advantages of strong specificity and high sensitivity. The detection results can be observed by naked eye after 45 min amplification, which is suitable for field and grass-roots detection.

**Key words:** *Brucella* spp.; loop-mediated isothermal amplification; visualization; application

引文格式:

张萌,阳爱国,安翠红,等.布鲁氏菌可视化环介导等温扩增方法的建立及应用[J].现代食品科技,2021,37(8):317-325

ZHANG Meng, YANG Ai-guo, AN Cui-hong, et al. Establishment and application of visual loop-mediated isothermal amplification of *Brucella* spp. [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 317-325

收稿日期: 2020-12-29

基金项目: 四川省科技计划项目(2018JY0039); 国家自然科学基金面上项目(31871894; 31271858)

作者简介: 张萌(1996-),女,硕士,研究方向: 食源性致病微生物检验检测

通讯作者: 阳爱国(1967-),男,博士,研究员,研究方向: 人畜共患病; 王新(1973-),男,博士,教授,研究方向: 食源性致病微生物及分子生物学和食品安全

近年来,羊奶因其与人类乳汁的相似性比牛奶更高、营养丰富、易于消化吸收等特点备受人们喜爱,甚至被称为“奶中之王”<sup>[1]</sup>。陕西省因其特殊的地理位置和历史原因,奶山羊产业链发展迅速,富平县甚至被授予“中国羊乳之都”称号。2018年,陕西省启动了“千亿级奶山羊全产业链”工程。奶山羊产业备受关注,人们对羊奶及其制品的需求越来越大。而羊是导致布鲁氏菌病流行与爆发的主要食源性动物。据统计,2018年陕西省共突发4起布鲁氏菌病疫情、报告发病15例<sup>[2]</sup>。因此,对布鲁氏菌病的防治与快速诊断刻不容缓。

布鲁氏菌(*Brucella* spp.)是一种无运动性、无荚膜、兼性厌氧的革兰氏阴性杆菌,且具有较强的致病性和宿主特异性<sup>[3]</sup>。1985年,布鲁氏菌被系统地分为了6个种19个型,包括牛种布鲁氏菌(*B. abortus*)8个型、猪种布鲁氏菌(*B. suis*)5个型、羊种布鲁氏菌(*B. melitensis*)3个型、犬种布鲁氏菌(*B. canis*)、绵羊附睾种布鲁氏菌(*B. ovis*)和沙林鼠布鲁氏菌(*B. neotome*)各1个型<sup>[4]</sup>。由感染布鲁氏菌而引起的人畜共患疾病称为布鲁氏菌病(Brucellosis,以下简称布病)。最易感染布病的动物包括牛、羊和猪<sup>[5]</sup>。动物通过食用被污染的饲料和接触被感染的动物而患病。患病后的动物表现为流产、不孕、产奶量下降等症状<sup>[6]</sup>。人类通过接触被感染的动物、食用被污染的肉类或者奶制品而患病<sup>[2]</sup>。众所周知,布病已经对畜牧业造成严重的经济损失并且严重影响其发展,甚至威胁到人类的健康安全。因此,建立一种快速、简单、灵敏的方法检验布鲁氏菌显得尤为重要。

目前,用于检测布鲁氏菌的方法主要包括病原学检测、血清学检测及分子生物学方法<sup>[7]</sup>。其中最常用的检测方法是病原学检测,即分离培养出目标菌株,被称作是检测布病的“黄金标准”。但该方法对实验室的要求较高、检测周期较长、灵敏度较低且常用于发病期检测<sup>[8,9]</sup>。血清学检测包括试管凝集试验、补体结合试验、虎红平板凝集试验等方法,则具有单克隆抗体制备周期长且复杂、实际操作中限制条件较多、检测成本较高等缺点<sup>[10,11]</sup>。分子生物学检测包括聚合酶链式反应(PCR)、实时定量PCR(RT-PCR)等方法,具有灵敏度高、特异性强等优点,但这些大多需要昂贵的专业仪器设备,不适合现场检验<sup>[11-14]</sup>。2000年,Notomi研发出了一种新的分子检测技术,称为环介导等温扩增技术(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)。这一技术采用DNA聚合酶和一组四个引物对DNA靶序列进行扩增,反应可在60~65℃等温条件下进行扩增,一般60 min即可反应

完全<sup>[15]</sup>。与传统的检测方法比较,LAMP具有高特异性、高灵敏度、快速高效等优点,适合基层与现场检验<sup>[15-19]</sup>。

基于以上优点,LAMP已经被广泛应用于病原微生物的快速检测方面,如金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、肠球菌耶尔森氏菌、志贺氏菌等<sup>[20-23]</sup>。本研究主要针对布鲁氏菌的保守基因*Omp2a*设计3对LAMP引物,对布鲁氏菌进行检测,优化LAMP反应条件与反应体系,建立了一种特异、灵敏和可视化的LAMP检测布鲁氏菌的方法。同时,本研究还检测了该方法的特异性和灵敏度。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和样本来源

布氏菌病活疫苗(猪种S2株、牛种A19株、羊种M5株)为天康生物股份有限公司产品;大肠杆菌ATCC25922、沙门氏菌H9812、金黄色葡萄球菌ATCC29213、单核细胞增生李斯特菌CMCC 54004、蜡样芽孢杆菌ATCC14579、小肠结肠炎耶尔森氏菌和福氏志贺氏菌对照菌株均来自西北农林科技大学食品科学与工程学院食源性病原微生物实验室保存。实际羊种布鲁氏菌核酸样本及该方法的验证由某疾病预防控制中心实验室提供。

#### 1.1.2 主要试剂

基因组抽提试剂盒购自杭州博日科技有限公司;10×ThermoPol Buffer、MgSO<sub>4</sub>、Bst DNA Polymerase Large Fragment聚合酶购自南京诺唯赞生物科技有限公司;dNTP Mix(10 mM)购自上海笛笛生物科技有限公司;甜菜碱购自大连美仑生物技术有限公司;羧基萘酚蓝(HNB)购自上海源叶生物科技有限公司;SYBR Green I(10000×)购自北京索莱宝科技有限公司。

#### 1.1.3 主要仪器与设备

高压灭菌锅(MDF-U5411)购自上海申安高压仪器设备有限公司;超净工作台(NU-425-400E)购自苏州净化设备有限公司;超纯水机(Milli-Q Synthesis)购自法国Millpro公司;PCR仪(Mycircle)购自美国Bio-Rad公司;电泳仪(DYY-6C)购自北京六一生物科技有限公司;凝胶成像系统(GEL DOC XR)购自美国Bio-Rad公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 LAMP引物的设计与合成

表 1 LAMP 引物序列

Table 1 Primer sequence of LAMP assays

引物	引物序列 (5'-3')
F3	GGCCTGAAATATGCTGGCG
B3	TCGGGGGCAATGAACTTTG
FIP	GCCACGAACCTTTGTAGCCCAT-GGTTTCGATCGCTGGTGTT
BIP	GCAGGGCGCATATTTCGTCCG-ACCCAGACAGCCCAATC
LF	CGATGACCGAGTCATAGGCA
LB	ACCAGAACTACGGTCAGTGG

在 GenBank 数据库中检索布鲁氏菌 *Omp2a* 基因序列,选取不同种属的 *Omp2a* 基因序列(A Y008719.1、MF966952.1、MF966953.1、AY008721.1、AY008720.1),通过 Clustal 软件比对分析,选取特异性好的保守片段。通过在线软件 PrimerExplorer V5 (<http://primerexplorer.jp/e/>) 设计一套 LAMP 引物,包括两条外引物 (F3、B3)、两条内引物 (FIP、BIP) 和两条环引物 (LF、LB),如表 1 所示。引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成,用 ddH<sub>2</sub>O 溶解后分装, -20 °C 冰箱保存备用。

### 1.2.2 细菌基因组 DNA 的提取

取购买布鲁氏菌活疫苗株 S2、A19 和 M5 加入无菌水后,放置于 80 °C 水浴锅内灭活 30 min,按照细菌基因组提取试剂盒使用说明进行布鲁氏菌基因组的提取,测定 DNA 模板浓度及纯度,存放于 -20 °C 冰箱备用。其它菌株的 DNA 由西北农林科技大学食品科学与工程学院食源性病原微生物实验室保存。

### 1.2.3 LAMP 检测方法的优化

根据 Bst DNA Polymerase Large Fragment 聚合酶的说明书推荐,将双蒸水、10×ThermoPol Buffer、MgSO<sub>4</sub>、dNTP Mix、甜菜碱、FIP 和 BIP、F3 和 B3、LF 和 LB、HNB、Bst DNA Polymerase Large Fragment 和模板 DNA (含量为 10 ng、1 ng、0.1 ng 等) 在冰浴条件下依次加入到 EP 管中,混合均匀,于加热器或 PCR 仪恒温孵育 1 h。反应结束后,将 EP 管于 85 °C 下灭活 5 min,扩增产物于 4 °C 冰箱中保存。

#### 1.2.3.1 LAMP 反应温度优化

设置反应温度为 60 °C、61 °C、62 °C、63 °C、64 °C、65 °C 和 66 °C,以 S2 标准菌株的 DNA (25.6 ng/μL) 为反应模板,检测 LAMP 最适的反应温度。根据琼脂糖凝胶结果选择最适反应温度。

#### 1.2.3.2 LAMP 反应时间优化

设置反应时间为 15、30、45、60、75 和 90 min,以 S2 标准菌株的 DNA (25.6 ng/μL) 为反应模板,检测 LAMP 最适的反应时间。根据琼脂糖凝胶结果选择最适反应时间。

#### 1.2.3.3 Mg<sup>2+</sup>浓度优化

设置 Mg<sup>2+</sup>的浓度分别为 0 mM、2 mM、4 mM、6 mM、8 mM、10 mM、12 mM 和 14 mM,以 S2 标准菌株的 DNA (25.6 ng/μL) 为反应模板,检测 LAMP 最适的 Mg<sup>2+</sup>浓度。根据琼脂糖凝胶结果选择最适 Mg<sup>2+</sup>浓度。

#### 1.2.3.4 Bst 聚合酶浓度优化

设置 Bst 聚合酶的浓度分别为 0.192 U/μL、0.256 U/μL、0.320 U/μL、0.384 U/μL 和 0.448 U/μL,以 S2 标准菌株的 DNA (25.6 ng/μL) 为反应模板,检测 LAMP 最适的 Bst 聚合酶浓度。根据琼脂糖凝胶结果选择最适 Bst 聚合酶浓度。

#### 1.2.3.5 甜菜碱浓度优化

设置甜菜碱的浓度分别为 0 M、0.2 M、0.4 M、0.6 M、0.8 M 和 1.0 M,以 S2 标准菌株的 DNA (25.6 ng/μL) 为反应模板,检测 LAMP 最适的甜菜碱浓度。根据琼脂糖凝胶结果选择最适甜菜碱浓度。

#### 1.2.3.6 dNTPs 浓度优化

设置 dNTPs 的浓度分别为 0 mM、0.6 mM、1.0 mM、1.4 mM、1.8 mM 和 2.2 mM,以 S2 标准菌株的 DNA (25.6 ng/μL) 为反应模板,检测 LAMP 最适的 dNTPs 浓度。根据琼脂糖凝胶结果选择最适 dNTPs 浓度。

#### 1.2.3.7 内外引物浓度比优化

设置内外引物的浓度比分别为 2:1、4:1、6:1、8:1、10:1 和 12:1,以 S2 标准菌株的 DNA (25.6 ng/μL) 为反应模板,检测 LAMP 最适的内外引物浓度比。根据琼脂糖凝胶结果选择最适内外引物浓度比。

#### 1.2.3.8 可视化染料 HNB 浓度优化

设置 HNB 的浓度分别为 0 μM、60 μM、120 μM、180 μM 和 240 μM,以 S2 标准菌株的 DNA (25.6 ng/μL) 为反应模板,检测 LAMP 最适的 HNB 浓度。根据琼脂糖凝胶结果选择最适 HNB 浓度。重复 3 次。

### 1.2.4 LAMP 扩增结果检测

#### 1.2.4.1 琼脂糖凝胶电泳检测

LAMP 反应扩增后的产物是若干个不同长度的茎

环 DNA 混合物, 其在琼脂糖凝胶电泳中的条带呈现特殊的梯状结构。使用浓度为 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳。电泳时, DNA Marker (DL2000) 与 LAMP 扩增产物的点样量分别是 5  $\mu\text{L}$  和 2  $\mu\text{L}$ , 电压为 120 V, 电泳时间为 35 min。电泳后的凝胶置于凝胶成像系统中紫外成像。成像后的电泳条带为特殊的梯状结构, 则扩增结果为阳性; 若无条带, 则扩增结果为阴性。

#### 1.2.4.2 可视化 HNB 染料检测

LAMP 反应过程中会消耗混合溶液中的  $\text{Mg}^{2+}$ 。而羟基萘酚蓝 (HNB) 是一种常见的金属指示剂, 含有不同浓度  $\text{Mg}^{2+}$  的混合液体颜色不同。在白色背景下观察扩增产物的颜色: 若扩增产物保持紫罗兰色不变, 则表明 DNA 未扩增, 结果为阴性; 若扩增产物颜色变为蓝色, 则表明 DNA 扩增, 结果为阳性。

#### 1.2.5 LAMP 特异性检测

为确保建立方法的特异性, 用优化好的反应体系及反应条件检测 3 种布鲁氏菌及 7 种非布鲁氏菌, 每种细菌的 DNA 模板添加量为 1  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.2.6 LAMP 灵敏度检测

采用 10 倍梯度稀释法检测建立方法的检测限。每个梯度的 DNA 模板取 1  $\mu\text{L}$  加于优化好的反应体系中, 在最适反应条件下扩增并判断结果。

#### 1.2.7 聚合酶链式反应 (PCR) 比较验证

常规 PCR 的引物及反应条件来自文献<sup>[24]</sup>, 其具体序列如表 2 所示。

表 2 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequence of PCR assays

引物	引物序列 (5'-3')
正向引物	GCGCATTCTTCGGTTATGAA
反向引物	CGCAGGCGAAAACAGCTATAA

PCR 反应体系 (25  $\mu\text{L}$ ): 2.5  $\mu\text{L}$  的 10 $\times$ Buffer、5  $\mu\text{L}$

dNTP Mix (2.5 mM)、3  $\mu\text{L}$   $\text{MgSO}_4$  (25 mM)、0.5  $\mu\text{L}$  F3 (12.5  $\mu\text{M}$ )、0.5  $\mu\text{L}$  B3 (12.5  $\mu\text{M}$ )、0.125  $\mu\text{L}$  Taq 酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ )、1  $\mu\text{L}$  DNA 模板 (含量分别为 10 ng、1 ng、0.1 ng 等), 用双蒸水补足体系。

PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  继续延伸 5 min 后在 4  $^{\circ}\text{C}$  下保存。

#### 1.2.8 LAMP 重复性检测

本研究所有实验均重复 3 次及以上, 以确保实验具有良好的重复性与稳定性。

#### 1.2.9 LAMP 进行阳性布鲁氏菌 DNA 和阴性对照菌 DNA 的验证检测

将本研究建立好的 LAMP 最佳试剂及其扩增条件提供给某疾病预防控制中心实验室进行 9 份阳性布鲁氏菌 DNA 和 4 份阴性对照菌 DNA (包括大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、伤寒沙门菌和蜡样芽胞杆菌) 的验证检测。

#### 1.2.10 统计学分析

计算 LAMP 检测方法相对常规分离方法检测布鲁氏菌的敏感性和特异性。敏感性和特异性的计算公式如下:

$$\text{敏感性}/\% = [\text{真阳性数}/(\text{真阳性数} + \text{假阳性数})] \times 100\%$$

$$\text{特异性}/\% = [\text{真阴性数}/(\text{真阴性数} + \text{假阳性数})] \times 100\%$$

LAMP 和 PCR 的检测结果, 采用 SPSS 18.0 统计软件对敏感性和特异性进行卡方检验,  $p < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 LAMP 检测方法优化结果

优化后的 LAMP 检测方法体系如表 3 所示。

表 3 优化后的 LAMP 体系

Table 3 Optimization of LAMP assays

组分	体积/ $\mu\text{L}$	终浓度
10 $\times$ ThermoPol Buffer	2.5	1 $\times$
$\text{MgSO}_4$ (100 mM)	2.0	8 mM
dNTP Mix (10 mM)	3.5	1.4 mM
甜菜碱 (5 M)	1.0	0.2 M
FIP/BIP (20 $\mu\text{M}$ )	2.0	1.6 $\mu\text{M}$
F3/B3 (5 $\mu\text{M}$ )	1.0	0.2 $\mu\text{M}$
LF/LB (20 $\mu\text{M}$ )	1.0	0.8 $\mu\text{M}$
HNB (3 mM)	1.5	180 $\mu\text{M}$
Bst DNA Polymerase Large Fragment (8 U/ $\mu\text{L}$ )	1.0	0.32 U/ $\mu\text{L}$
模板 DNA	1.0	
双蒸水	Up to 25	

优化后 LAMP 检测方法的反应条件是：62 °C 反应 45 min。

### 2.1.1 LAMP 反应温度的优化结果

在设置好的温度梯度下进行 LAMP 反应，结果如图 1 所示。由图可见，在设置的反应梯度温度范围内，LAMP 扩增都有较清晰的梯状条带。其中反应温度为 62 °C 时，LAMP 的梯状条带最为清晰明亮。因此，选择 62 °C 为 LAMP 反应最适温度。

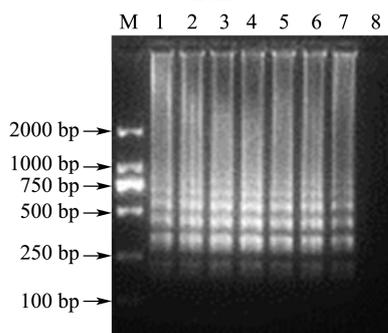


图 1 反应温度的优化结果

Fig.1 Optimization of reaction temperature

注：M 为 2000 bp Marker；1~7 泳道分别为 60 °C、61 °C、62 °C、63 °C、64 °C、65 °C 和 66 °C，以 S2 标准菌株的 DNA 为反应模板进行 LAMP 扩增后的琼脂糖凝胶电泳结果；8 泳道为空白对照。

### 2.1.2 LAMP 反应时间的优化结果

在设置好的时间梯度下进行 LAMP 反应，结果如图 2 所示。由图可见，反应时间为 30 min 时，LAMP 扩增即出现清晰明亮的梯状条带且呈现稳定趋势。为保证建立 LAMP 方法的灵敏度及稳定性，选择 45 min 为最优反应时间。

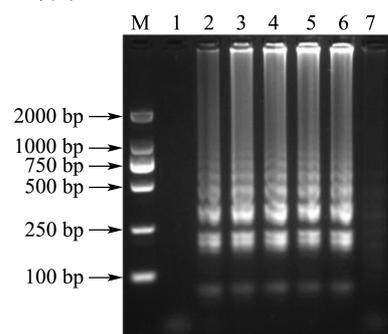


图 2 反应时间的优化结果

Fig.2 Optimization of reaction time

注：M 为 2000 bp Marker；1~6 泳道反应时间分别为 15 min、30 min、45 min、60 min、75 min 和 90 min，以 S2 标准菌株的 DNA 为反应模板进行 LAMP 扩增后的琼脂糖凝胶电泳结果；7 泳道为空白对照。

### 2.1.3 Mg<sup>2+</sup>浓度的优化结果

在设置好的 Mg<sup>2+</sup>浓度下进行 LAMP 反应，结果如图 3 所示。由图可见，Mg<sup>2+</sup>浓度为 4 mM~14 mM 时，

LAMP 扩增即出现清晰明亮的梯状条带且呈现稳定趋势。其中 Mg<sup>2+</sup>浓度为 8 mM 时，扩增产物最多，电泳条带最为清晰明亮。当 Mg<sup>2+</sup>浓度过高时，电泳条带变得模糊，LAMP 反应被抑制。因此，选取 8 mM 为最适 Mg<sup>2+</sup>浓度。

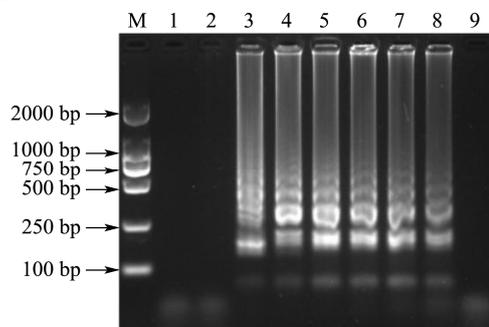


图 3 Mg<sup>2+</sup>浓度的优化结果

Fig.3 Optimization of the concentration of Mg<sup>2+</sup>

注：M 为 2000 bp Marker；1~8 泳道反应体系中 Mg<sup>2+</sup>的浓度分别为 0 mM、2 mM、4 mM、6 mM、8 mM、10 mM、12 mM 和 14 mM，以 S2 标准菌株的 DNA 为反应模板进行 LAMP 扩增后的琼脂糖凝胶电泳结果；9 泳道为空白对照。

### 2.1.4 Bst 聚合酶浓度的优化结果

在设置好的 Bst 聚合酶浓度下进行 LAMP 反应，结果如图 4 所示。由图可见，Bst 聚合酶浓度在 0.192 U/μL~0.448 U/μL 范围内，LAMP 扩增均出现清晰明亮的梯状条带。在设置范围内，Bst 聚合酶浓度对 LAMP 扩增的影响无明显差异。根据前期实验经验，选取 0.320 U/μL 为最适 Bst 聚合酶浓度。

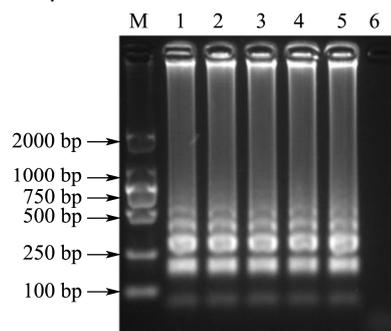


图 4 Bst 聚合酶浓度的优化结果

Fig.4 Optimization of the concentration of Bst DNA polymerase

注：M 为 2000 bp Marker；1~5 泳道反应体系中 Bst 聚合酶的浓度分别为 0.192 U/μL、0.256 U/μL、0.320 U/μL、0.384 U/μL 和 0.448 U/μL，以 S2 标准菌株的 DNA 为反应模板进行 LAMP 扩增后的琼脂糖凝胶电泳结果；6 泳道为空白对照。

### 2.1.5 甜菜碱浓度的优化结果

甜菜碱浓度对 LAMP 反应的影响结果如图 5 所示。由图可见，在设置的甜菜碱浓度范围内，不同浓度的甜菜碱对 LAMP 反应的影响无显著差异。

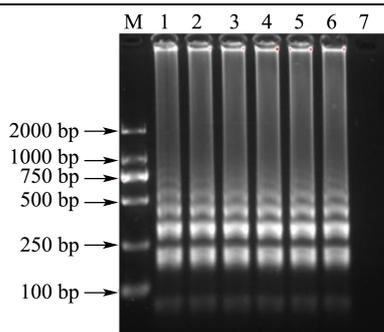


图5 甜菜碱浓度的优化结果

Fig.5 Optimization of the concentration of betaine

注: M 为 2000 bp Marker; 1~6 泳道反应体系中甜菜碱的浓度分别为 0 M、0.2 M、0.4 M、0.6 M、0.8 M 和 1.0 M, 以 S2 标准菌株的 DNA 为反应模板进行 LAMP 扩增后的琼脂糖凝胶电泳结果; 7 泳道为空白对照。

### 2.1.6 dNTPs 浓度的优化结果

dNTPs 浓度对 LAMP 反应的影响结果如图 6 所示。由图可见, dNTPs 浓度在 1.0~2.0 mM 范围内, LAMP 反应均扩增出清晰的电泳条带。因此, 选择条带最为清晰明亮的 1.4 mM 为最适 dNTPs 浓度。

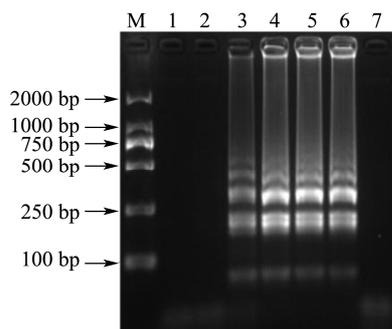


图6 dNTPs 浓度的优化结果

Fig.6 Optimization of the concentration of dNTPs

注: M 为 2000 bp Marker; 1~6 泳道反应体系中 dNTPs 的浓度分别为 0 mM、0.6 mM、1.0 mM、1.4 mM、1.8 mM 和 2.2 mM, 以 S2 标准菌株的 DNA 为反应模板进行 LAMP 扩增后的琼脂糖凝胶电泳结果; 7 泳道为空白对照。

### 2.1.7 内外引物浓度比的优化结果

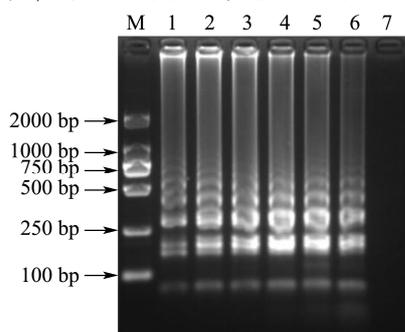


图7 内外引物浓度比的优化结果

Fig.7 Optimization of the concentration ratio of internal and external primers

注: M 为 2000 bp Marker; 1~6 泳道反应体系中内外引物浓度比分别为 2:1、4:1、6:1、8:1、10:1 和 12:1, 以 S2 标准菌株的 DNA 为反应模板进行 LAMP 扩增后的琼脂糖凝胶电泳结果; 7 泳道为空白对照。

内外引物浓度比对 LAMP 反应的影响结果如图 7 所示。由图可见, 在设置的内外引物浓度比范围内, LAMP 反应均扩增出梯状条带。其中内外引物浓度比为 8:1 时, 电泳条带最为清晰明亮。因此, 选择 8:1 为最佳内外引物浓度比。

### 2.1.8 可视化染料 HNB 浓度的优化结果

HNB 浓度比对 LAMP 反应的影响结果如图所示。由图 8a 可见, 在设置的 HNB 浓度范围内, LAMP 反应均扩增出明亮的梯状条带, 说明 HNB 对 LAMP 反应无抑制作用。由图 8b 可见, HNB 浓度为 180  $\mu$ M 时, 阳性对照与空白对照之间的颜色差异最为明显。因此, 选择 180  $\mu$ M 为最佳 HNB 浓度。

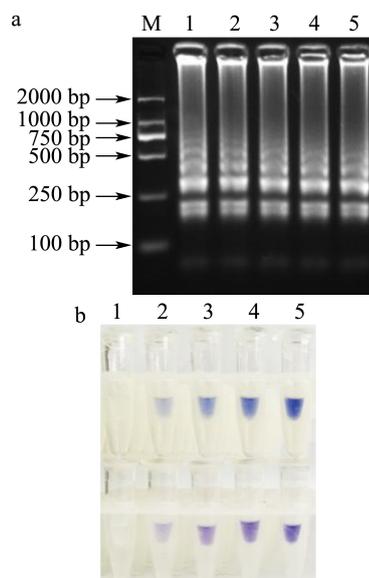


图8 LAMP 反应 HNB 浓度的优化结果

Fig.8 Optimization of the concentration of HNB

注: M 为 2000 bp Marker; a 图为电泳结果图; b 图为可视化效果图, 其中上层为阳性模板, 下层为空白对照; 编号 1~5 反应体系中 HNB 浓度分别为 0、60、120、180 和 240  $\mu$ M。

## 2.2 LAMP 特异性检测结果

用 7 种非布鲁氏菌的 DNA 以及 3 种布鲁氏菌的 DNA 为模板, 采用前面优化过的 LAMP 体系, 在 62  $^{\circ}$ C 恒温反应 45 min, 在自然光下观察反应管颜色。同时, 取 2  $\mu$ L 反应产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析。如图 9 所示, 加入 3 种布鲁氏菌模板的反应管颜色均由紫罗兰色变为蓝色, 与电泳结果一致。表明设计引物的特异性良好, 能准确区分布鲁氏菌与非布鲁氏菌。

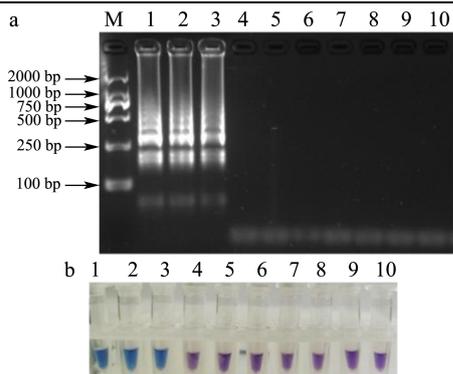


图9 LAMP 特异性检测结果

Fig.9 Specificity of LAMP assays

注: M 为 2000 Marker; a 图为电泳结果图; b 图为可视化效果图; 编号 1~10 分别为羊种布鲁氏菌 M5、猪种布鲁氏菌 S2、牛种布鲁氏菌 A19、大肠杆菌 ATCC25922、沙门氏菌 H9812、金黄色葡萄球菌 ATCC29213、单核细胞增生李斯特菌 CMCC 54004、蜡样芽孢杆菌 ATCC14579、小肠结肠炎耶尔森菌、福氏志贺杆菌。

### 2.3 LAMP 灵敏度检测结果

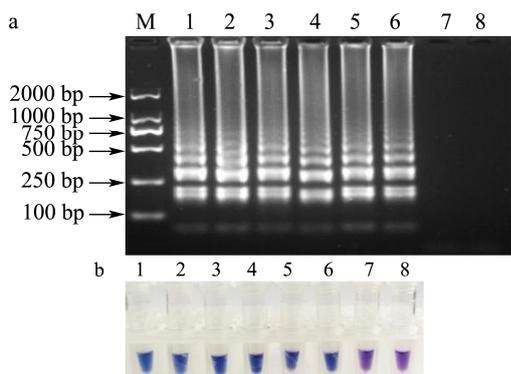


图10 LAMP 灵敏度检测结果

Fig.10 Sensitivity of LAMP assays

注: M 为 2000 bp Marker; a 图为电泳结果图; b 图为可视化效果图。编号 1~8 的 DNA 模板浓度依次为  $2.56 \times 10^0$  ng/ $\mu$ L、 $2.56$  ng/ $\mu$ L、 $2.56 \times 10^{-1}$  ng/ $\mu$ L、 $2.56 \times 10^{-2}$  ng/ $\mu$ L、 $2.56 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L、 $2.56 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L、 $2.56 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L 和  $2.56 \times 10^{-6}$  ng/ $\mu$ L。

将浓度为 256 ng/ $\mu$ L 的 DNA 模板 10 倍梯度稀释, 并取 1  $\mu$ L 加到 LAMP 反应体系中。62  $^{\circ}$ C 反应 45 min 后, 灵敏度检测结果如图 10。结果表明, 建立的 LAMP 方法检测限为  $2.56 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L, 且可视化结果与凝胶电泳结果一致。

### 2.4 PCR 结果分析

如图 11 所示, PCR 反应的检测限为  $2.56 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L, 灵敏度低于建立好的 LAMP 检测方法。

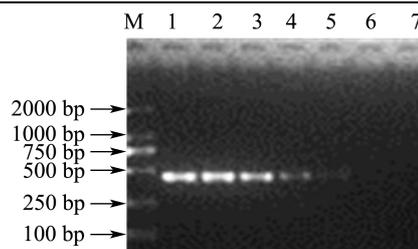


图11 PCR 灵敏度检测结果

Fig.11 Sensitivity of PCR assays

注: M 为 2000 bp Marker; 编号 1~7 的 DNA 模板浓度依次为  $2.56 \times 10^0$  ng/ $\mu$ L、 $2.56$  ng/ $\mu$ L、 $2.56 \times 10^{-1}$  ng/ $\mu$ L、 $2.56 \times 10^{-2}$  ng/ $\mu$ L、 $2.56 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L、 $2.56 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L 和  $2.56 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L。

### 2.5 LAMP 进行阳性布鲁氏菌 DNA 和阴性对照菌 DNA 的验证检测结果

将构建成功的 LAMP 方法用于检测某疾病预防控制中心实验室提供 9 份阳性布鲁氏菌 DNA 和 4 份阴性对照菌 DNA 进行验证检测, 结果发现, LAMP 法相对 9 份阳性布鲁氏菌 DNA 和 4 份阴性对照菌 DNA (包括大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、伤寒沙门菌和蜡样芽孢杆菌) 的敏感性和特异性均为 100%, 无统计学差异 (见图 12,  $p > 0.05$ )。

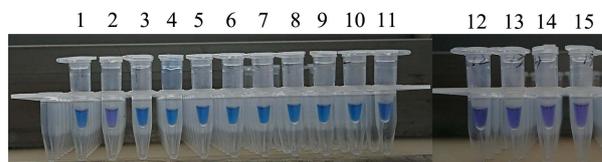


图12 LAMP 检测 9 份阳性布鲁氏菌 DNA 和 4 份阴性对照菌 DNA 的验证检测结果

Fig.12 Detection results of 9 DNA samples of *Brucella* spp. and 4 DNA samples of control bacteria by LAMP

注: 1~2: 分别为试剂盒提供的阳性对照和空白对照 (水); 3~11: 阳性布鲁氏菌 DNA 样本; 12~15: 阴性对照菌株的 DNA 样本。

### 2.6 讨论

布鲁氏菌的寄主具有多样性, 动物与人类普遍易感<sup>[25]</sup>。近年来, 消费者们越来越关注食品安全问题, 同时食品行业和政府部门也表达了快速简便检验布鲁氏菌的迫切需求。目前, 常用于检测布鲁氏菌的病原学检测方法、免疫学检测方法、PCR 和 RT-PCR 检测方法都具有一定的局限性, 并不适用于资源匮乏的基层检验与野外现场检验<sup>[26,27]</sup>。作为一种新型的分子检验技术, LAMP 是一种特异性强、灵敏度高、操作简

单、反应快速的检测方法,且它不需要昂贵的仪器只要一台稳定的水浴锅即可满足试验条件<sup>[28]</sup>。

自 LAMP 方法建立以来,经过数年的发展,该方法已经较为成熟。其结果的判定方法从一开始的浊度检测和凝胶电泳检测发展为现在的添加染料检测方法。浊度仪机器昂贵且使用范围小,凝胶检测耗时长且容易造成污染,而添加染料检测结果方便观察且不易污染<sup>[29]</sup>。与其他研究采用 SYBR Green、钙黄绿素、SYTO-82 等染料相比,本研究采用 HNB 染料作为指示剂,经过浓度优化后具有不影响 LAMP 扩增、能准确灵敏的反应结果、颜色对比明显、价格低廉且无需荧光即肉眼可见等优点。这种不需要开盖检测结果的方法大大减少了气溶胶的形成与扩散,降低了 LAMP 发生假阳性的概率。

### 3 结论

为了建立一种快速、高效、特异性好的基于 LAMP 检测布鲁氏菌的方法,本研究针对布鲁氏菌的保守基因 *Omp2a* 设计了一套六个引物,包括两条外引物(F3、B3)、两条内引物(FIP、BIP)和两条环引物(LF、LB)。为了检验 LAMP 方法的特异性,本研究对 10 种菌株纯培养物(包括 3 种布鲁氏菌和 7 种非布鲁氏菌)和 9 个实际样本进行了检测,并与常规病原学检测方法进行了比较。结果表明,本研究优化好的 LAMP 方法可以准确区分布鲁氏菌与非布鲁氏菌,在所用实际样本检测中的敏感性与特异性均为 100%。同时,灵敏度检验结果表明优化好的 LAMP 检测方法的灵敏度(检测限为  $2.56 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L)是传统 PCR 的 10 倍。并且在环引物的作用下,本研究的 LAMP 扩增仅需 45 min 即可完成,较通常所需的 60 min 节省了时间。总而言之,本研究建立的 LAMP 方法可以准确、快速的检验布鲁氏菌且适用于基层检验和现场检验。

### 参考文献

- [1] Clark Stephanie, Mora García, María Bárbara. A 100-year review: advances in goat milk research [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(12): 10026-10044
- [2] 陈宝宝,孙养信,范锁平,等.陕西省 2018 年布鲁氏菌病突发公共卫生事件流行病学特征[J].现代预防医学,2019,46(19): 3557-3560  
CHEN Bao-bao, SUN Yang-xin, FAN Suo-ping, et al. Epidemiological characteristics of public health emergencies caused by Brucellosis, Shaanxi, 2018 [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 46(19): 3557-3560
- [3] Tonna I, Tonna A. Brucellosis [J]. New England Journal of Medicine, 2005, 353(10): 1071-1072
- [4] Ficht T. *Brucella* taxonomy and evolution [J]. Future Microbiology, 2010, 5(6): 859-866
- [5] Głowacka P, Żakowska D, Naylor K, et al. *Brucella*-virulence factors, pathogenesis and treatment [J]. Polish Journal of Microbiology, 2018, 67(2): 151-161
- [6] Alton G G, Jones L M, Pietz D E. Laboratory Techniques in Brucellosis [M]. World Health Organ, 1975
- [7] Yagupsky P, Morata P, Colmenero J D. Laboratory diagnosis of human brucellosis [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2019, 33(1): e00073-19
- [8] Rongjiong Z, Songsong X, Xiaobo L, et al. A systematic review and meta-analysis of epidemiology and clinical manifestations of human brucellosis in China [J]. BioMed Research International, 2018, 1-10
- [9] 赵志兵,冯娜,杜佳攀,等.基于 *Omp25* 基因和环介导等温扩增技术检测布鲁氏菌方法的建立[J].实验动物科学,2017, 34(6):10-17  
ZHAO Zhi-bing, FENG Na, DU Jia-pan, et al. Establishment of a detection method for *Brucella* based on *Omp25* gene and loop-mediated isothermal amplification [J]. Laboratory Animal Science, 2017, 34(6): 10-17
- [10] Prusty B R, Chaudhuri P, Chaturvedi V K, et al. Visual detection of *Brucella* spp. in spiked bovine semen using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay [J]. Indian Journal of Microbiology, 2016, 56(2): 142-147
- [11] Bastos C R, Mathias L A, Jusi, Márcia Mariza Gomes, et al. Evaluation of dot-blot test for serological diagnosis of bovine brucellosis [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2018, 49(3): 564-568
- [12] Borsa B A, Aldag M E, Yilmaz M, et al. Comparison of a novel test (ODAK *Brucella* Coombs Gel Test) with commonly used serological tests in human brucellosis [J]. Clinical Laboratory, 2016, 62(9): 1671-1674
- [13] 刘玉梅,古丽扎尔·阿不都纳斯尔,丁剑冰,等.环介导等温扩增与实时 RT 定量 PCR 检测布鲁氏菌的比较[J].中国病原生物学杂志,2016,11(12):1070-1073  
LIU Yu-mei, GULIZHAER Abudounasier, DING Jian-bing, et al. Comparison of the detection of *Brucella* by loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR [J]. Journal of Pathogen Biology, 2016, 11(12): 1070-1073
- [14] Khan Muhammad Zahoor, Zahoor Muhammad. An overview of brucellosis in cattle and humans, and its serological and molecular diagnosis in control strategies [J]. Tropical Medicine and Infectious Disease, 2018, 3(2): 65

- [15] Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63
- [16] 姜侃,吕沁风,汪新,等.三重 LAMP 法检测食品中沙门氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌[J]. *食品科学*,2013,34(24): 182-187  
JIANG Kan, LYU Qin-feng, WANG Xin, et al. Development of multiplex LAMP method for the detection of *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in foods [J]. *Food Science*, 2013, 34(24): 182-187
- [17] Wang L, Li Y, Chu J, et al. Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Listeria monocytogenes* Trains [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(1): 445-449
- [18] Mashooq M, Kumar D, Niranjana A K, et al. Development and evaluation of probe based real time loop mediated isothermal amplification for *Salmonella*: a new tool for DNA quantification [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, 126: 24-9
- [19] Gomes J, Santos M, Amaro A, et al. A field evaluation of an isothermal DNA amplification assay for the detection of *Theileria annulata* infection in cattle [J]. *Molecular & Cellular Probes*, 2016, 31: 61
- [20] Chen C, Zhao Q, Guo J, et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using simultaneous detection of *mecA*, *nuc*, and *femB* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(8): 965-971
- [21] Tirloni E, Bernardi C, Drago S, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Listeria monocytogenes* in dairy food [J]. *Italian Journal of Food Safety*, 2017, 6(4): 6890
- [22] Ranjbar R, Afshar D. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Yersinia enterocolitica* via targeting a conserved locus [J]. *Iranian Journal of Microbiology*, 2015, 7(4): 185-190
- [23] Liding Z, Qiujiang W, Qinqin H, et al. Detection of *Shigella* in milk and clinical samples by magnetic immunocaptured-loop-mediated isothermal amplification assay [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 94
- [24] Prusty B R, Chaudhuri P, Chaturvedi V K, et al. Visual detection of *Brucella* spp. in spiked bovine semen using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay [J]. *Iranian Journal of Microbiology*. 2016, 56(2): 142-147
- [25] 肖妍,李蓉蓉,霍蕾,等.一种检测奶样中布鲁氏菌抗体免疫层析方法的建立[J]. *中国动物检疫*,2019,36(5):74-79  
XIAO Yan, LI Rong-rong, HUO Lei, et al. Establishment of an immunochromatography for detection of *Brucella* antibodies in milk samples [J]. *China Animal Health Inspection*, 2019, 36(5): 74-79
- [26] Mateu-De-Antonio E M, Martin M, Casal J. Comparison of serologic tests used in canine brucellosis diagnosis [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1994, 6(2): 257-259
- [27] Wen H, Hao Z, Jingsheng X, et al. Loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Ralstonia solanacearum* phylogroup I mulberry strains in China [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 76
- [28] 郭建平,万佳佳,陆兆新,等.基于可视化环介导等温扩增技术快速检测金黄色葡萄球菌[J]. *食品科学*,2019,40(20):325-331  
GUO Jian-ping, WAN Jia-jia, LU Zhao-xin, et al. Rapid visual detection of *Staphylococcus aureus* using loop-mediated isothermal amplification [J]. *Food Science*, 2019, 40(20): 325-331
- [29] 朱凯,康怀彬,王德国.可视化 LAMP 检测常见肉制品中猪肉成分[J]. *食品科学*,2019,40(12):296-302  
ZHU Kai, KANG Huai-bin, WANG De-guo. Visual detection of pork components in common meat products by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method [J]. *Food Science*, 2019, 40(12): 296-302