

环介导等温核酸扩增技术快速检测产毒亚历山大藻

刘芳, 王丽, 李琳, 山崎伸二, 石磊

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: DNA环介导等温扩增(LAMP)方法是一种新型的核酸扩增技术,该方法是在等温的条件下进行的,具有反应时间短、灵敏度高、特异性强的特点。本文以产麻痹性贝毒(PSP)的亚历山大藻为研究对象,采用简易法提取DNA模板,设计特异性LAMP引物,利用LAMP技术进行产毒藻种的快速检测,同时,着重对LAMP技术与PCR技术在检测微小亚历山大藻细胞的灵敏度方面做了比较。向LAMP终产物中加入SYBR Green I染料后可直接用肉眼观察结果而不需要通过凝胶电泳来观察。结果表明,LAMP技术在恒温65℃,1h内就可以检测到产毒藻种;LAMP技术检测微小亚历山大藻的最低检测限为200个/ml,而PCR技术的最低检测限为1000个/ml,LAMP扩增方法比PCR扩增方法的程序简单、反应时间短、灵敏度高;LAMP技术不需要精密的温度循环装置,有恒温加热设备就可以满足检测条件,可用于野外检测。

关键词: 环介导等温核酸扩增技术(LAMP); 亚历山大藻; 快速检测

中图分类号: TS201.6; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)11-0071-04

Rapid Detection of toxic *Alexandrium* by Loop-Mediated Isothermal Amplification Method

LIU Fang, WANG Li, LI Lin, Shinji Yamasaki, SHI Lei

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) is a novel nucleic acid amplification technology. The LAMP method amplifies DNA with rapidity, high specificity and sensitivity under isothermal conditions. This thesis took toxic *Alexandrium* as the major research object. DNA template was extracted by boiling method and specific primer was designed for LAMP assays. Toxic *Alexandrium* were quickly detected by LAMP technology. LAMP and PCR were successfully compared in the sensitivity of detecting *Alexandrium minutum*. Without gel electrophoresis, the LAMP amplification was directly visualized in the reaction tube by addition of SYBR Green I for a naked-eye inspection. The result indicated that toxic *Alexandrium* was detected by LAMP technology within 1 h under isothermal condition at 65 °C. The lower detection limit of the LAMP reaction was 200 cell/ml, while that of the PCR was 1000 cell/ml. The LAMP assay is more simple, rapid and sensitive than the PCR. Furthermore, as LAMP technology does not require sophisticated instrumentation, it is very suitable for diagnosis in the fields.

Key words: LAMP; *Alexandrium*; quick detection

在对赤潮的研究中发现,由单细胞微藻产生的海洋毒素能通过食物链传递到鱼和贝类,食用这种被感染的鱼和贝类后会直接威胁人类的健康,因此深入研究有毒藻类对于由海洋毒素所导致的食物中毒的防治工作是非常有必要的,这有利于阻止有毒藻进入食物链中,从而在源头上杜绝赤潮毒素对公众健康、水环境及自然资源的危害。本文就产麻痹性贝毒(PSP)的亚历山大藻为主要研究对象进行研究。目前,在有

收稿日期: 2007-07-18

基金项目: 广东省科技厅农业攻关计划(2005A11601101)

作者简介: 刘芳(1982-),女,硕士研究生,主要从事分子生物学方面的研

通讯作者: 石磊教授

毒藻的检测方面还是采用PCR方法^[1~2]。由于简易法所制备的赤潮藻DNA模版中含有的多糖、蛋白质等浓度较高,会抑制PCR反应,往往其检测结果并不理想,在PSP防治工作方面很难采取及时而准确的措施。因此,发展一种简便、灵敏度高的检测方法对有毒藻检测与控制尤为重要。

本文介绍了一种新型的DNA环介导等温扩增(Loop-Mediated Isothermal Amplification Method, LAMP)方法,该方法最初由Notomi等人设计并应用于病原微生物的检测^[3]。LAMP反应的特点是:在恒温(60℃~65℃)条件下进行,省去了PCR反应中温度循环所需要的时间;反应中使用了六条特异性引物,

只有在六条引物均与特异的靶序列结合时扩增反应才能进行,因此这种检测方法的特异性很高,其反应原理如图1所示^[4]。LAMP产物的检测方法:LAMP反应产生副产物—白色焦磷酸镁沉淀,因此肉眼也可观察到阳性反应管中的白色混浊物;向LAMP终产物中加入SYBR Green I染料后可直接用肉眼观察结果^[5];LAMP产物也可用2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。目前,国外已有较多文献报道了该技术在病原微生物检测方面的应用,如检测番茄黄曲叶病毒^[6]、虾中的白斑综合症病毒^[7]、志贺氏菌属和肠侵袭性埃希(氏)大肠杆菌^[8]等。日本已利用这种特性研制出专门用于LAMP检测的实时监控浊度仪,可以实现对LAMP扩增过程的全程实时监控^[9-10]。而在国内关于LAMP方法的报道比较少。本文采用LAMP技术快速检测产毒亚历山大藻,并着重对LAMP技术与PCR技术在微小亚历山大藻的灵敏度方面做了比较,验证了该方法的可靠性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

藻种: *Alexandrium andersoni*, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium catenella* Balech, *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium.spp*, *Prorocentrum donghaiense*, *Karenia mikimotoi* Hansen (由厦门大学海洋研究所、暨南大学水生生物研究所馈赠)。

培养条件: 室温20 ℃, 光照3500~3800 lx, 12 h 光暗交替培养, f/2 培养液。

Bst DNA聚合酶购自BioLabs公司, rTaq DNA聚合酶购自TaKaRa公司, Betaine购自Sigma。

1.2 引 物

LAMP反应是以亚历山大藻属内保守区域设计引物。FIP、BIP为内引物,以F3、B3为外引物进行扩增;PCR反应是以LAMP反应的外引物即F3、B3进行扩增。

1.3 DNA模板制备

取15 mL对数生长期的7种赤潮藻—*Alexandrium andersoni*, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium catenella* Balech, *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium.spp*, *Prorocentrum donghaiense*, *Karenia mikimotoi* Hansen (已知藻细胞浓度)于离心管中,9000 r/min离心4 min,弃去上清;向藻细胞沉淀中加入灭菌蒸馏水,将离心管转移至95 ℃水浴中加热20 min后迅速置于冰上约10 min;将藻液于10000 r/min离心2 min后取上清液直接作为LAMP扩增及PCR扩增反应的DNA模板。

1.4 LAMP 扩增及 PCR 扩增

25 μL LAMP反应体系含有1.6 μmol/L FIP、1.6 μmol/L BIP、0.4 μmol/L F3、0.4 μmol/L B3、1 mol/L Betaine、6 mmol/L MgSO₄、8 U Bst DNA聚合酶、1.6 mmol/L dNTP、2.5 μL 10×Thermopol Buffer及DNA模板1 μL。

反应条件: 65 ℃反应1 h。

50 μL PCR反应体系含有40 μmol/L F3、40 μmol/L B3、10 mmol/L dNTP、5 μL 10×PCR Buffer、1.25 U rTaq DNA聚合酶及DNA模板1 μL。

反应条件: 94 ℃预变性5 min; 94 ℃变性30 s, 51 ℃退火30 s, 72 ℃延伸30 s, 30个循环; 72 ℃延伸7 min。

1.5 LAMP及PCR产物的检测

LAMP产物的检测方法: 向LAMP产物中加入1 μL稀释100倍后的SYBR Green I染料后通过肉眼来观测其颜色变化,如果颜色立刻变绿则是发生了特异性扩增,橙色为阴性。LAMP反应会产生焦磷酸镁白色沉淀,而焦磷酸镁会使混合液变混浊,通过肉眼观察反应物的外观变化并用2%的琼脂糖凝胶电泳进行分离,加样量3 μL上样孔;凝胶置于EB中染色然后在凝胶成像系统下观察。

PCR产物的检测方法: 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,加样量3 μL上样孔;凝胶置于EB中染色然后在凝胶成像系统下观察。

2 结果与分析

2.1 LAMP 反应特异性试验

取7种赤潮藻—*Alexandrium andersoni*, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium catenella* Balech, *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium.spp*, *Prorocentrum donghaiense*, *Karenia mikimotoi* Hansen的DNA模板进行LAMP扩增,结果如图1所示。

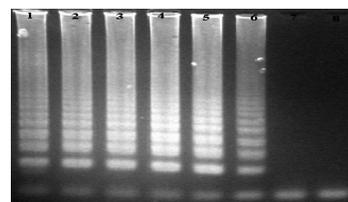


图1 LAMP 特异性试验

Fig.1 Specificity test of the LAMP reaction for detection

Note: lane1, positive control ;lane 2, *Alexandrium andersoni* DNA; lane 3, *Alexandrium minutum* DNA; lane 4, *Alexandrium catenella* Balech DNA; lane 5, *Alexandrium tamarense* DNA; lane 6, *Alexandrium.spp*; lane 7, *Prorocentrum donghaiense* DNA; lane

8, *Karenia mikimotoi* Hansen DNA.

由图 1 可以看出, 本实验引物是针对产毒亚历山大藻所设计的 LAMP 反应, 对于不产毒的非亚历山大藻是不具有特异性的。在相同的反应条件下, LAMP 反应能快速的检测到 *Alexandrium andersoni*, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium catenella* Balech, *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium.spp*, *Prorocentrum donghaiense*, *Karenia mikimotoi* Hansen, 而 *Prorocentrum donghaiense*, *Karenia mikimotoi* Hansen 不能被检测到。

2.2 LAMP 和 PCR 反应的产物灵敏度比较试验

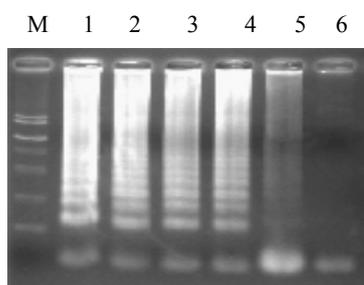


图 2 LAMP 灵敏度检测

Fig.2 Detection sensitivities of LAMP

Lane M, DGL 2000; lanes: 1 to 6, 500,100, 50, 10, 5, 1 cell/tube.

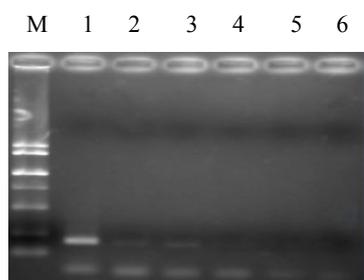


图 3 PCR 灵敏度检测

Fig 3 Detection sensitivities of PCR

Lanes: M, DGL 2000; Lanes: 1 to 6, 500,100, 50, 10, 5, 1 cell/tube.

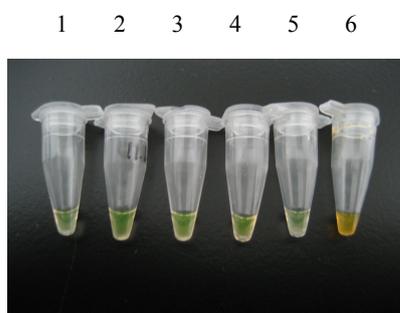


图 4 LAMP 产物的可视结果

Fig.4 Visual inspection of LAMP products detected using SYBR Green I

Tubes: 1 to 6, 500,100, 50, 10, 5, 1 cell/tube.

对 *Alexandrium minutum* 的藻细胞进行稀释, 调整稀释后的浓度分别为 500 个/ μ L、100 个/ μ L、50 个/ μ L、10 个/ μ L、5 个/ μ L, 同时分别对它们进行 LAMP 扩增, 结果如图 2、图 3 所示。由图 2 中可以看出, 泳道 2~4 中结果均呈现典型的 LAMP 扩增带型, 且扩增产物的量依次降低, LAMP 技术的最低检测限度为 200 个/ml; 由图 3 中可以看出, PCR 扩增得到 200 bp 左右的条带, PCR 技术的最低检测限度为 1000 个/ml; LAMP 技术的灵敏度是 PCR 技术的 5 倍。图 4 为向 LAMP 产物中加入 1 μ L 稀释 10 倍后的 SYBR Green I 染料后的可视结果, 阳性管中的反应液已明显变绿, 阴性管中的反应液仍为橙色; 用该方法来检测 LAMP 产物比常规的凝胶电泳方法简单、迅速、实用性强, 并且可用于实地检测。

3 讨论

常规的检测产毒亚历山大藻的方法依赖于细胞结构的显微观察, 这种方法需要鉴别者具有很好的专业背景, 而且有些藻种在形态上难以区别, 比如 *Alexandrium tamarense* 和 *Alexandrium catenella* Balech。所以, 依据观察细胞形态的检测已经不适合快速检测的要求。近年来, 有研究者将 PCR 方法应用于产毒藻检测, 该方法在灵敏度和特异性方面较常规方法有所提高, 但是, PCR 方法依赖精密的温度循环装置, 大部分操作必须在实验室内进行, 实地检测有局限。而我们所采用的 LAMP 方法很好的解决了以上问题, 在检测时间、检测成本、检测灵敏度方面较 PCR 有很大提高, 并且用于实地检测很方便。

本文采用简易法提取 *Alexandrium andersoni*, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium catenella* Balech, *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium.spp*, *Prorocentrum donghaiense*, *Karenia mikimotoi* Hansen 的 DNA 模板比传统的酚氯仿抽提 DNA 模板法^[11]更简单、方便, 实用性更强, 可直接用于实地检测。LAMP 方法是一种新型的 DNA 环介导等温扩增法, 扩增反应是在等温的条件下进行的, 没有核酸的变复性过程, 因此不需要特殊仪器设备, 只需用普通水浴锅就可以, 而 PCR 反应程序却较为复杂, 反应时间较 LAMP 反应时间长。LAMP 技术的最低检测浓度为 200 个/ml, PCR 技术的最低检测限度为 1000 个/ml, 证明 LAMP 方法的灵敏度比 PCR 的高。

总之, LAMP 方法是一种便携、特异性强、灵敏度高的检测方法, 其产物的检测方法比较多, 可通过肉眼观测其混浊度的变化, 也可通过加入稀释后的

SYBR Green I 染料来观察产物的颜色变化,还可以通过凝胶电泳来检测其产物。如果对 LAMP 方法进行进一步完善、优化和推广,该技术将会在有毒赤潮藻毒素的检测及各种疾病的诊断与预防有更广泛的应用。

参考文献

- [1] Anjos FM,Bittencourt-Oliveira MD,Zajac MP, et al. Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event[J].Toxicon,2006,48 (3):239-245
- [2] Galluzzi L,Penna A,Bertozzini E, et al. Development of a quality-ative PCR method for the Alexandrium spp. (Dinophyceae) detection in contaminated mussels (Mytilus galloprovincialis) [J].Harmful Algae,2005,4(6):973-983
- [3] [3]Notomi T,Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res,2000, 228(12):63
- [4] 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
- [5] Dukes JP,King DP,Alexandersen S.Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus[J]. Arch Virol,2006,151:1093 -1106
- [6] [6]Fukuta S,Kato S,Yoshida K, et al. Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction[J].Virol Meth,2003,112:35-40
- [7] Kono T,Savan R,Sakai M, et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification[J].Virol Meth,2004,115:59-65
- [8] Song T,Toma C,Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli by a loop-mediated isothermal amplification method[J].FEMS Microbiol Lett,2005,243(1):259-263
- [9] Mori Y,Kitao M,Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. J Biochem Biophys Meth,2004,59:145-157
- [10] Parida M,Posadas G,Inoue S, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus[J].J Clin Microbiol,2000,42:257-263
- [11] 陈月琴,屈良鹤,邱小忠,等.甲藻单个细胞 DNA 的制备及在赤潮藻类分子鉴定中的应用[J].中山大学学报(自然科学版),1997,36(4):66-69

(上接第 70 页)

(2) 自由基是具有高度化学活性的物质,人体内自由基过多或清除过慢,即会引发所谓的自由基链式反应,导致细胞膜的过氧化,是引起机体衰老的根本原因。从实验结果看,木瓜蛋白酶所得的肽其清除自由基和抗氧化能力都高于碱性蛋白酶所得肽,

(3) 从实验结果看,与两种酶作用的切入点不同有关系。由于木瓜蛋白酶属巯基蛋白酶,具有较宽的底物特异性,作用于蛋白质中 L-精氨酸、L-赖氨酸、甘氨酸和 L-瓜氨酸残基羧基参与形成的肽键。此酶属内肽酶,能切开全蛋白质分子内部肽链-CO-NH-生成分子量较小的多肽类。碱性蛋白酶也是内切酶,其作用点只是丝氨酸。通过切开梭基侧位的疏水性氨基酸(酪氨酸,苯丙氨酸)的肽键,破坏蛋白质的分子结构,从而使其功能性质得到改善。因此使用碱性蛋白酶水解,产物氮溶指数较高,使用木瓜蛋白酶水解,产物的清除自由基和抗氧化能力较高。

参考文献

- [1] 刘大川,钟方旭.酶水解法制备大豆肽的研究[J].中国油脂,1997,22(6):14-16;24
- [2] 薛照辉,吴谋成,尹经章.碱性蛋白酶(alkalase)水解菜籽清蛋白的工艺优化[J].农业工程学报,2003,19(5):176-180
- [3] Deng J C. Effect of temperature on fish alkaline protease, protein interaction and temperaction and texture quality[J]. J Food Sci,1981,46(1):62-65
- [4] 周晓云.酶技术[M].北京:石油工业出版社,1995
- [5] 杨建雄.生物化学与分子生物学实验技术教程[M].北京:科学出版社出版,2002,5
- [6] 赵新淮,冯志彪,于国华,等.酶促水解大豆分离蛋白的研究[J].食品与发酵工业,1994(5):5-10
- [7] Smirnoff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry,1998,28(4):1057-1060
- [8] 荣建华,李小定.大豆肽体外抗氧化效果的研究[J].食品科学,2002,23(11):118-120
- [9] 赵凡.花粉的抗氧化作用的探讨[J].食品科学,1988(12):13-17
- [10] 萧伟祥等.茶黄色素及其抗氧化活性的研究[J].安徽农学院学报,1991,18(2):95-100