·论　著·

快速检测金黄色葡萄球菌环介导等温扩增方法的建立与评价*

欧红玲,陈凤华,王　岩,张巧云,贾连玲,李雪丽,孙建华,王欣茹△(第二炮兵总医院检验科,北京　100088)

【摘要】 目的　探讨环介导等温扩增技术(LAMP)作为快速检测方法对金黄色葡萄球菌快速检测的可行性和可靠性。**方法**　建立 LAMP 反应体系,优化反应条件,进行灵敏度和特异度试验。**结果**　筛选出了 LAMP 反应检测金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因的最佳引物组,最佳反应温度为 62 ℃,LAMP 和 PCR 检测 *nuc* 基因的最低检测限分别为 1.47、14.7 pg/μL,检测金黄色葡萄球菌的特异度为 100%。**结论**　LAMP 具有操作简单、敏感度高、特异性强的特点,能够满足基层实验室、应急检测或现场检测等方面的使用需求。

【关键词】 环介导等温扩增技术;　金黄色葡萄球菌;　快速检测

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.20.016　**文献标志码:**A　**文章编号:**1672-9455(2015)20-3012-03

Establishment and evaluation of a rapid method for detection of Staphylococcus aureus by loop-mediated isothermal amplification*

OU Hong-ling, CHEN Feng-hua, WANG Yan, ZHANG Qiao-yun, JIA Lian-ling, LI Xue-li, SUN Jian-hua, WANG Xin-ru△(*Department of Clinical Laboratory, Second Artillery General Hospital of PLA, Beijing* 100088, *China*)

【Abstract】 Objective　To investigate the feasibility and reliability of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in rapid detection of Staphylococcus aureus as a rapid detection method. **Methods**　LAMP reaction system was established, the reaction conditions was optimized, the sensitivity and specificity experiments were carried out. **Results**　The best primer set was selected to detect staphylococcus aureus for *nuc* genes through LAMP reaction. The best reaction temperature selected was 62 ℃, and the lowest detectable limits of LAMP and PCR for *nuc* genes were 1.47, 14.7 pg/μL respectively. The specificities of two methods to detect Staphylococcus aureus were 100%. **Conclusion**　LAMP detection method is simple, safe operation, with high sensitivity and high specificity, which can meet the need of grassroots laboratory, emergency detection and on-site testing and other aspects.

【Key words】 loop-mediated isothermal amplification (LAMP);　Staphylococcus aureus;　rapid detection

金黄色葡萄球菌属于葡萄球菌属,广泛分布于空气和水中,是一种条件致病菌,也是引起院内感染的常见微生物,可引起化脓、败血症、脓毒症等严重并发症[1-2]。但是目前对于怀疑金黄色葡萄球菌的患者,检测标本以明确病原菌和耐药性的所需时间一般为 3～5 d,在此之前的抗菌药物治疗只能凭经验用药,所以迫切地需要一种能快速、准确地确定是否为金黄色葡萄球菌的检测方法。环介导等温扩增技术(LAMP)是 2000 年日本荣研会社的 Notomi 等[3]开发出来的一种 DNA 恒温扩增方法,具有高特异性、高灵敏性、简便、快速和低成本的特点,被广泛应用于包括微生物、寄生虫检测在内的诸多领域。金黄色葡萄球菌的特异性基因为 *nuc* 基因,本研究旨在建立一种快速检测金黄色葡萄球菌的 LAMP 方法,优化反应条件并对该方法进行评价。

1　材料与方法

1.1　菌株来源　标准菌株 ATCC25923,采集 2014 年 1～3 月本院送检的痰液、尿液、血液、胆汁和腹水等标本进行细菌培养。用法国梅里埃全自动细菌分析仪鉴定之后,留取菌种备用。

1.2　仪器与试剂　LRH-250 细菌培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、朗普 DNA 扩增试剂盒(批号 3Z007,荣研生物科技有限公司),LA-320 朗普浊度实时分析仪(荣研生物科技有限公司),细菌 DNA 提取试剂盒(批号 DP302,天根生化科技有限公司),PCR 扩增试剂盒(批号 KT201,天根生化科技有限公司),170-8170 凝胶成像仪(美国 Bio-rad 公司)。

1.3　方法

1.3.1　引物设计　从 NCBI 基因库下载 *nuc* 基因序列,使用蓝谱公司 Primer Explorer Version 4 软件设计金黄色葡萄球菌特异基因 *nuc* 的 5 组引物,每组引物均包括外引物(F3 和 B3)和内引物(FIP 和 BIP),另外为了提高扩增效率,对引物组还设计了多对环引物(LB 和 LF),引物由北京奥科生物技术有限公司合成。

1.3.2　菌液制备　将标准菌株及冻存金黄色葡萄球菌菌株用牛肉汤培养增菌,转种于血平板上,置于 37 ℃孵箱中孵育18～24 h。取 2～4 个复苏菌落溶于 1 mL 去离子水中制成菌液。

1.3.3　DNA 模板制备及 LAMP 扩增　按照天根试剂盒说明书离心菌液后收集沉淀加溶菌酶与蛋白酶 K 消化(37 ℃,30

*　**基金项目:**全军"十二五"面上课题资助项目(CWS11J205);军队"十二五"重大专项子课题资助项目(424135S)。

作者简介:欧红玲,女,硕士,主管技师,主要从事分子生物学研究。　△　**通讯作者**,E-mail:wangxinru@126.com。

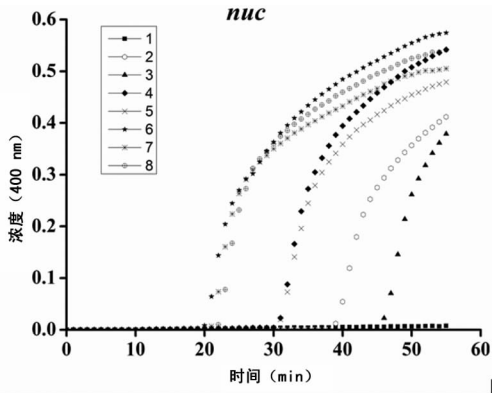
min)，然后加入无水乙醇和各种缓冲液抽提，洗脱沉淀得到纯化的 DNA，提取的 DNA 保存于－20 ℃冰箱备用。LAMP 反应条件优化试验及敏感度试验选用标准菌株 DNA 作为模板，特异度试验用临床标本菌株 DNA 作为模板。LAMP 反应体系：根据试剂盒要求，FIP 和 BIP 各 40 pmol，F3 和 B3 各 5 pmol，LF 和 LB 各 20 pmol，Bst DNA 聚合酶 1.0 μL，加入去离子水，加入 2.0 μL 模板配成 25 μL 反应体系。将已配制好、分装完毕的反应管置于 Loopamp 浊度实时分析仪装置中，在 62 ℃下恒温 55 min，80 ℃下恒温 5 min 灭活酶终止反应。Loopamp 浊度实时分析仪记录反应中由于扩增产生的浊度(400 nm)，并绘制浊度曲线。另外，如果需要目测反应结果，在反应混合液中加入 1.0 μL 目测荧光试剂，同样配成 25 μL 反应体系，反应结束后管内液体呈绿色，判为阳性；液体仍为橙色则为阴性。

1.3.4　反应条件的优化　(1)最佳引物组的筛选：将针对 *nuc* 基因设计的 5 组引物分别进行等温扩增，观察反应中的浊度曲线，以最先出现指数增加的反应为最优。确定最佳引物组后，再将最佳引物组和不同环引物进行等温扩增，观察浊度曲线确定最佳环引物。(2)最佳反应温度的筛选：反应混合液在不同反应温度(66～65 ℃)反应 55 min，然后 80 ℃灭活 5 min，观察 LAMP 反应中的浊度曲线，以最先出现指数增加的反应为最优，确定最佳反应温度。

1.3.5　LAMP 反应的敏感度　使用 LAMP 对标准菌株经倍比稀释的 DNA 进行等温扩增，反应前在反应液内加入 1 μL 目测荧光试剂，反应 55 min 后 80 ℃灭活 5 min，肉眼观察其检测效果。采用 PCR 对倍比稀释的标准菌株 DNA 进行扩增，取 5 μL 扩增产物进行 2%凝胶电泳，凝胶成像仪观察结果。

2　结　　果

2.1　金黄色葡萄球菌最佳 LAMP 反应引物　由反应曲线(图 1)可见，在 5 组引物组中，单独使用引物组 4 效果最好，所以引物组 4 为最佳引物组，另外，使用软件对引物组 4 设计出 3 对不同的环引物，将引物组 4 和环引物组合进行等温扩增，发现环引物 1 为最优。*nuc* 基因的最佳引物为引物组 4＋环引物 1，见表 1。



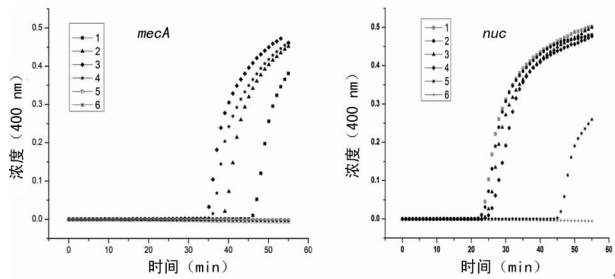
注：1～7 为 *nuc* 基因的不同引物组，分别表示引物组 1、引物组 2、引物组 3、引物组 4、引物组 5、引物组 4＋环引物 1、引物组 4＋环引物 2、引物组 4＋环引物 3。

图 1　*nuc* 基因的不同引物组的反应曲线

2.2　最佳反应温度的筛选　采用不同的反应温度，进行等温扩增，扩增反应中的浊度曲线见图 2，可见 60 ℃反应最好，62 ℃和 60 ℃相比差别不是很大。在临床工作中，常需要同时检测 *nuc* 和 *mecA*，在同时开展的检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌实验中，筛选出的 *mecA* 的最佳反应温度为 62 ℃，因此，本研究在 *nuc* 基因检测中也选了 62 ℃作为最佳反应温度。

表 1　*nuc* 的最佳引物序列

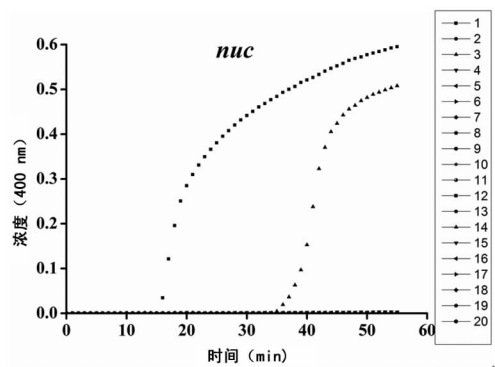
引物名称	引物序列(5′～3′)
*nuc*F3	AAC AGT ATA TAG TGC AAC TTC AA
*nuc*B3	CTT TGT CAA ACT CGA CTT CAA
*nuc*FIP	ATG TCA TTG GTT GAC CTT TGT ACA T-AAA TTA CAT AAA GAA CCT GCG A
*nuc*BIP	GTT GAT ACA CCT GAA ACA AAG CAT C-ATT TTT TTC GTA AAT GCA CTT GC
*nuc*LF	GTA TCA CCA TCA ATC GCT TT
*nuc*LB	GGT GTA GAG AAA TAT GGT CC



注：1～6 分别表示 60、61、62、63、64、65 ℃条件下的浊度曲线。

图 2　不同反应温度下的扩增曲线

2.3　LAMP 反应的特异度　为了观察 LAMP 反应检测金黄色葡萄球菌的特异度，对 20 例菌株提取的 DNA 进行 LAMP 检测，由 LAMP 检测结果(如图 3)可见，使用 LAMP 方法检测菌株 *nuc* 基因，只有金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株扩增阳性，其余的均为阴性，因此使用 LAMP 方法检测 *nuc* 基因来检测金黄色葡萄球菌的特异度为 100%。

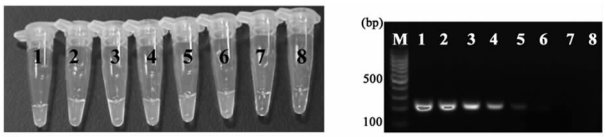


注：1～20 分别表示耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌、头葡萄球菌、粪肠球菌、耐甲氧西林溶血葡萄球菌、鹑鸡肠球菌、鲍曼不动杆菌、阴沟肠杆菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、黏质沙雷菌、金黄色葡萄球菌、嗜麦芽假单胞菌、溶血性葡萄球菌、耐甲氧西林表面葡萄球菌、路邓葡萄球菌、溶血性葡萄球菌、表皮葡萄球菌。

图 3　LAMP 反应检测 *nuc* 基因的特异性

2.4　LAMP 反应的敏感度　使用 LAMP 及 PCR 方法分别对倍比稀释的金黄色葡萄球菌 DNA 进行扩增，LAMP 反应前在每份反应液内加入 1 μL 荧光试剂羟基萘酚蓝(HNB)，反应完

毕后肉眼观察其检测效果(图 3A);PCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像(图 3B)。PCR 的最低检测限为14.7 pg/μL,LAMP 的最低检测限为 1.47 pg/μL。



A　　B

注:A 为 PCR 扩增产物的凝胶成像结果;B 为 LAMP 扩增产物肉眼观察结果;M 为 DNA 标志物;1～7 分别表示浓度为 147 ng/μL、14.7 ng/μL、1.47 ng/μL、147 pg/μL、14.7 pg/μL、1.47 pg/μL、0.147 pg/μL 的金黄色葡萄球菌 DNA;8 为未加入金黄色葡萄球菌 DNA 的阴性对照。

图 4　PCR 及 LAMP 的敏感度

3　讨　　论

金黄色葡萄球菌是医院感染的重要致病菌,可以产生多种致病因子,引起肌体局部缺血和坏死或急性胃肠炎等多种机体病变。近年来随着广谱抗菌药物的大量使用,金黄色葡萄球菌引起的医院感染及社区获得性感染的比例不断增多[4]。LAMP 是一种新型的快速、特异性强和灵敏度高的核酸扩增技术,利用 4 种相异的特异性引物识别目标基因的 6 个特定区域,在 Bst DNA 聚合酶的作用下,60～65 ℃恒温条件下进行扩增,30～60 min 后目标基因的数量能达到 10^9～10^{10} 个拷贝数量级[5-6],实现快速检测目标基因的目的。因其特异度强、敏感度高、方法简便,现已被应用于很多领域,如微生物、病毒、寄生虫的检测及动物胚胎的性别鉴定等[7-12]。

本研究针对金黄色葡萄球菌特异 *nuc* 基因设计 LAMP 引物,并用该引物灵敏、快速地检测到金黄色葡萄球菌。整个反应过程快捷,只需要将反应混合液在恒温水浴锅或金属恒温仪 62 ℃条件下保持 60 min 即可完成反应。另外,结果判定简便,既可通过直接观察反应管内有无沉淀生成,也可在反应液中加入荧光染料,肉眼观察直接判断结果。在验证 LAMP 反应的特异度中,只有金黄色葡萄球菌可扩增出 *nuc* 基因,其他葡萄球菌及非葡萄球菌均没有扩增出来,说明 LAMP 反应通过扩增 *nuc* 基因检测金黄色葡萄球菌的特异度为 100%。PCR 和 LAMP 检测 *nuc* 基因的最低检测限分别为 14.7、1.47 pg/μL,说明 LAMP 的敏感度较 PCR 更高。

现在国内大多数研究者在采用 LAMP 进行检测时,往往选择对反应结果进行电泳或者在反应完成后添加 SYBR Green Ⅰ荧光染料,这两种方法都使反应产物暴露于空气中,既污染了环境,还极易造成假阳性,而且电泳法检测 LAMP 反应产物并不能实时反映 LAMP 反应过程。本研究采用实时浊度仪和 HNB 检测,反应完成后不开盖,很好地杜绝了污染,有效防止了假阳性。但此次研究主要是对金黄色葡萄球菌 DNA 进行 LAMP 扩增,没有使用 LAMP 对临床标本进行检测,有待开展进一步的实验对临床标本进行研究。

总之,LAMP 方法虽然扩增原理复杂,但其操作简便、用时少、灵敏度高、特异性强,再加上不需要复杂的仪器设备,能够很好地满足基层实验室、应急检测或现场检测等方面的使用需求,有望成为简易的常规检测手段。

参考文献

[1] Khan S,Rasheed F,Zahra R. Genetic polymorphism of agr locus and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus at two hospitals in Pakistan[J]. Pak J Med Sci,2014,30(1):172-176.

[2] Morell EA,Balkin DM. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus:a pervasive pathogen highlights the need for new antimicrobial development[J]. Yale J Biol Med,2010,83(4):223-233.

[3] Notomi T,Okayama H,Masubuchi H,et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res,2000,28(12):e63.

[4] 潘云军,刘慧,郭卫红,等. 医院感染金黄色葡萄球菌的临床特征及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(4):482-484.

[5] Koide Y,Maeda H,Yamabe K,et al. Rapid detection of mecA and spa by the loop-mediated isothermal amplification(LAMP) method[J]. Lett Appl Microbiol,2010,50(4):386-392.

[6] Lim KT,Teh CS,Thong KL. Loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of Staphylococcus aureus[J]. Biomed Res Int,2013,2013:895816.

[7] 李文桂,陈雅棠. 环介导等温扩增技术用于消化道和呼吸道病毒检测的研究进展[J]. 重庆医学,2014,43(20):2662-2665.

[8] Nie K,Zhang Y,Luo L,et al. Visual detection of human enterovirus 71 subgenotype C4 and coxsackievirus A16 by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with the hydroxynaphthol blue eye[J]. J Virol Method,2011,175(2):283-286.

[9] Ma XJ,Shu YL,Nie K,et al. Visual detection of pandemic influenza A H1N1 virus 2009 by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye[J]. J Virol Method,2010,167(2):214-217.

[10] 李永刚,王德国,武建刚,等. 环介导恒温扩增法(LAMP)检测金黄色葡萄球菌[J]. 食品工业科技,2010,31(1):388-391.

[11] Su J,Liu X,Cui H,et al. Rapid and simple detection of methicillin-resistance staphylococcus aureus by orfX loop-mediated isothermal amplification assay[J]. BMC Biotechnol,2014,14(1):8.

[12] Zhao XH,Park MS,Zhang YH. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the femA gene for rapid detection of Staphylococcus aureus from clinical and food samples[J]. J Microbiol Biotechnol,2013,23(2):246-250.

(收稿日期:2015-03-12　修回日期:2015-06-15)