

实时荧光环介导恒温扩增技术检测布鲁菌方法的建立与评价

郝春花¹, 刘晔华², 刘亚敏³, 李颖³, 崔军文^{4△}

1. 天津市第二人民医院检验科, 天津 300192; 2. 天津市第一中心医院检验科, 天津 300192;

3. 天津市第二人民医院感染科, 天津 300192; 4. 天津农学院基础科学学院, 天津 300384

摘要:目的 建立布鲁菌的实时荧光环介导恒温扩增(RealAmp)快速检测方法。方法 针对布鲁菌属保守基因 OMP 25, 设计 4 套引物。通过引物筛选建立 RealAmp 检测布鲁菌的方法, 并对此方法的灵敏度、特异性进行评价。结果 该方法对非布鲁菌属标准菌株 DNA 扩增结果呈阴性, 表明实验具有良好的特异性。RealAmp 法检测布鲁菌 DNA 在 30 min 内即可完成, 该方法检测灵敏度可达到 1.2×10^{-5} ng/ μ L。结论 该研究建立的 RealAmp 测定方法简便、快速、灵敏, 并且不依赖任何特殊设备, 有望成为快速检测布鲁菌的新方法。

关键词: 环介导恒温扩增; 布鲁菌属; 快速检测; 特异性; 灵敏度

中图法分类号: R446

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)18-2610-03

Establishment and evaluation of real-time fluorescence LAMP method for detecting Brucella spp

QIE Chunhua¹, LIU Yehua², LIU Yamin³, LI Ying³, CUI Junwen^{4△}

1. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Municipal Second People's Hospital, Tianjin 300192, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Municipal First Central Hospital, Tianjin 300192, China;

3. Department of Infection, Tianjin Municipal Second People's Hospital, Tianjin 300192, China;

4. College of Basic Sciences, Tianjin Agriculture College, Tianjin 300384, China

Abstract: **Objective** To establish a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) assay for rapidly detecting Brucella spp. **Methods** Four sets of primers aiming to the conserved target gene OMP 25 of Brucella spp were designed. The RealAmp method for detecting Brucella spp was established via primers screening. The specificity and sensitivity of the RealAmp method were evaluated. **Results** The DNA amplification results of non-Brucella standard strains were negative by using the RealAmp method, indicating that the experiment had good specificity. Detecting DNA of Brucella spp by using the RealAmp method was completed within 30 min. The sensitivity of this method reached to 1.2×10^{-5} ng/ μ L. **Conclusion** The RealAmp determination method established by this study is simple, fast and sensitive, and does not rely upon any special equipment, and can be expected to become a new method for the fast detection of Brucella spp.

Key words: LAMP; Brucella; rapid detection; specificity; sensitivity

布鲁菌病是一种人畜共患病, 已成为一个重要的公共卫生问题。为了控制和减少疾病在动物之间的传播以及传染给人类的风险, 需要对病原体进行快速、准确的检测。临床上用于确诊布鲁菌病的方法主要依靠血液及骨髓的细菌培养和血清学检查, 由于布鲁菌生长缓慢, 细菌培养耗时长, 且受血清中抑菌物质及抗生素的影响, 难以达到早期诊断的目的^[1]。环介导恒温扩增技术(LAMP)是 NOTOMI 等^[2]开发的一种新型核酸体外扩增技术。LAMP 不仅广泛应用于病原微生物检测, 而且具有灵敏度高、特异性好、反应时间短、操作简单等优点, 特别适合病原微生物的现场即时检测^[3]。本研究针对布鲁菌属保守基因 OMP 25 设计 LAMP 引物, 建立了一种实时荧光环介

导恒温扩增(RealAmp)方法, 该方法简便、快速, 以期实现布鲁菌的现场即时检测。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 实验用菌株如下: 布鲁菌标准菌株猪种布鲁菌 S2 由天津市动物疫病控制中心李秀梅老师赠送。16 株布鲁菌临床分离株由天津市第二人民医院微生物室保存。金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、大肠埃希菌 ATCC 25922、大肠埃希菌 ATCC 35218、肺炎克雷伯菌 ATCC 70060、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、粪肠球菌 ATCC 29212 购自天津市临床检验中心。

1.2 仪器与试剂 恒温荧光检测仪 Fluo-Gene 为北京弗罗朗生物科技有限公司产品; RealAmp 试剂盒购

自北京弗罗朗生物科技有限公司;细菌基因组提取试剂盒购自北京天根生化科技公司;人血液基因组提取试剂盒购自 Qiagen 公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计与合成 根据 GenBank 中布鲁菌序列(No. AM694198. 2), 针对布鲁菌属保守基因 OMP 25, 利用 LAMP 引物设计软件设计 4 套引物, 每套引物由 F3、B3、FIP、BIP、FB 和 LB 组成。引物序列由北京三博远志生物技术有限公司合成。LAMP 引物的序列为 F3: 5'-CGT CGG CTA CGA CCT GAA-3'; B3: 5'-ACC GGC CAG ATC ATA GTT CT-3'; FIP: 5'-TCG TCC AAG CCG TTG TTA AGC TCC CGG TTA TGC CGT ACC T-3'; BIP: 5'-GTG CCG GTC TCG AAG CCA AGT GTT GCC GTA CTG GGT GTA-3'; FB1: 5'-GCG AAC CGG CAA TAC CAG CC-3'; LB1: 5'-GCC GCG TTG AGT ACC GT-3'; FB2: 5'-GCG AAC CGG CAA TAC CAG C-3'; LB2: 5'-GCC GCG TTG AGT ACC GT-3'; FB3: 5'-TGC GAA CCG GCA ATA CCA GC-3'; LB3: 5'-GCC GCG TTG AGT ACC GT-3'; FB4: 5'-CTG CGA ACC GGC AAT ACC AGC-3'; LB4: 5'-GCC GCG TTG AGT ACC GT-3'。

1.3.2 细菌 DNA 模板的制备 向 1.5 mL EP 管中加入 0.5 mL 生理盐水, 然后用接种环在管壁上研磨成菌悬液, 于 80~90 °C 灭活 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min 后去掉上清液, 按照细菌 DNA 提取试剂盒操作步骤提取 DNA, 保存在 -20 °C 备用。

1.3.3 RealAmp 反应体系 首先, 将各引物分别配成工作液, FIP、BIP、F3、B3、FB、LB 按照 8 : 8 : 1 : 1 : 4 : 4 水平比混合成引物混合液。按照 RealAmp 试剂盒说明书配制 RealAmp 反应体系。反应过程在恒温荧光检测仪 Fluo-Gene 中进行, 反应温度为 65 °C, 反应时间为 60 min。以 2 μ L 无菌蒸馏水为模板设置阴性对照。以提取的标准菌株猪种布鲁菌 S2 的 DNA 为模板, 按照 RealAmp 试剂盒说明书的要求设置反应条件, 比较 4 套引物的扩增效率, 选择扩增效率最高的引物进行后续实验。

1.3.4 RealAmp 检测布鲁菌的特异性验证 提取过夜培养的标准菌株猪种布鲁菌 S2、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、大肠埃希菌 ATCC 25922、大肠埃希菌 ATCC 35218、肺炎克雷伯菌 ATCC 70060、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、粪肠球菌 ATCC 29212 的细菌 DNA, 取 2 μ L 作为模板, 分别进行 RealAmp 反应, 验证该方法的特异性。

1.3.5 RealAmp 检测布鲁菌的灵敏度实验 提取过夜培养的标准菌株猪种布鲁菌 S2 的细菌 DNA, 调整模板 DNA 水平为 120 ng/ μ L, 用无菌蒸馏水进行

1 : 10、1 : 10²、1 : 10³ 连续倍比稀释直到 1 : 10⁹, 分别取稀释后的 DNA 2 μ L 作为反应模板, 用于 RealAmp 反应, 验证方法的灵敏度。

1.3.6 临床应用 提取培养的布鲁菌临床分离株的 DNA, 用 RealAmp 进行检测。抽取疑似布鲁菌病患者外周血 2~3 mL, 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂) 抗凝, 患者同时抽取 5~10 mL 外周血做血培养。按照人血液基因组提取试剂盒的要求提取人全血基因组 DNA, 用已建立的 RealAmp 方法进行患者外周血微量布鲁菌 DNA 检测。

2 结 果

2.1 最佳引物的筛选 当反应进行至 10 min 左右时, 实验管的荧光强度大幅度增加, 直至反应结束, 仪器判定为阳性结果。阴性对照管荧光曲线一直处于平滑的状态, 直到反应终止也没有发生大幅度的曲线斜率的变化, 仪器判定为阴性结果, 说明没有发生扩增反应。实时荧光曲线表明, 所有实验管都在 10 min 左右扩增出目的基因。比较 4 套引物的扩增效率, 选择扩增效率最高的第 2 套引物进行后续实验。

2.2 特异性实验 以非布鲁菌标准菌株 DNA 为模板, 本实验均未出现扩增反应, 只有猪种布鲁菌 S2 的 DNA 发生特异性扩增并被检测出来。说明本研究的 RealAmp 方法对布鲁菌检测的特异性好, 与非目标菌不存在扩增反应。

2.3 灵敏度实验 布鲁菌标准菌株 DNA 1 : 10~1 : 10⁷ 各水平检测结果均为阳性, 而 1 : 10⁸、1 : 10⁹ 为阴性。RealAmp 检测布鲁菌的灵敏度为 1.2 $\times$ 10⁻⁵ ng/ μ L。

2.4 临床应用 用 RealAmp 方法检测 16 株布鲁菌临床分离株的 DNA 后, 扩增结果均呈阳性, 表明该方法可用于布鲁菌 DNA 的检测。抽取 28 例疑似布鲁菌病患者外周血 2~3 mL, EDTA-K₂ 抗凝, 患者同时抽取 5~10 mL 外周血做血培养。提取 EDTA-K₂ 抗凝血中的血液基因组 DNA, 用已建立的 RealAmp 方法进行患者外周血微量布鲁菌 DNA 检测。其中 12 份标本 RealAmp 检测为阳性结果, 阳性率为 42.9%; 28 份标本血培养结果显示, 11 份标本为血培养阳性, 阳性率为 39.3%。新建的 RealAmp 方法与血培养的符合率为 96.4%(27/28)。

3 讨 论

布鲁菌病是由布鲁菌引起的一种传染变态反应性疾病, 家畜和野生动物被认为是传染源^[4]。因为布鲁菌病是一种全身性感染, 可以影响任何器官或系统。布鲁菌病具有独特的流行病学和致病特征, 其中一个独有的特征是菌血症在疾病发生、发展过程中的作用非常重要^[5]。布鲁菌病诊断的金标准是从血液或骨髓等培养物中分离出布鲁菌^[6]。目前布鲁菌血

症的实验室诊断依赖于血培养,因此建立快速检验布鲁菌血症的 RealAmp 方法,对布鲁菌血症的诊断和治疗具有重要的意义。

LAMP 通过设计的引物和置换 DNA 扩增技术,在 30~60 min 的恒温条件下(通常为 60~65 ℃),利用高活性链置换 Bst DNA 聚合酶,使得链置换 DNA 合成在不停地自我循环,产生大量茎环状扩增产物,从而实现了对目的基因的快速检测。LAMP 自开发以来,已广泛应用于细菌、病毒和寄生虫的检测^[7-9]。LAMP 方法不仅对核酸提取要求低,而且灵敏度高,可从极微量的标本中扩增出目的基因,其灵敏度是传统 PCR 的 10~100 倍^[10]。LAMP 反应最重要的优点是可以在恒定温度下进行,不需要依赖特殊设备^[11]。LAMP 产物检测最初应用琼脂糖凝胶电泳,后来开发了基于反应过程中的副产物(白色焦磷酸镁沉淀)浊度的肉眼或浊度仪检测来判定扩增与否。最近,使用实时监测荧光信号提高了扩增信号的可靠性^[12]。

本研究建立的针对布鲁菌 OMP25 基因的 RealAmp 方法只针对布鲁菌扩增,对其他干扰菌不扩增,显示出良好的特异性。本实验选用的恒温荧光检测仪 Fluo-Gene 及配套的 RealAmp 试剂盒,操作简便、结果可视化,整个实验在 30 min 内即可完成。恒温荧光检测仪 Fluo-Gene 的应用,不仅使操作者远离了溴化乙锭、紫外灯等对身体的危害,而且实现了对病原菌从始到终全封闭式检测。目前,市场上常见的 LAMP 平台主要有 Eiken 公司生产的 LA-200, Lumora 公司生产的 BART 和 Optigene 公司生产的 Genie II^[13]。本实验中应用的检测平台 Fluo-Gene 所需要的时间最短,整个扩增过程仅需 20 min。

本研究建立了特异、灵敏和可靠的 RealAmp 方法用于布鲁菌 DNA 检测。该方法能够从布鲁菌血症患者外周血提取的 DNA 样品中扩增出微量的布鲁菌 DNA,灵敏度可达 1.2×10^{-5} ng/ μ L。来自疑似布鲁菌病患者的 28 份临床标本,虽然 RealAmp 检测阳性率与传统的血培养(39.3%)阳性率基本持平,但是 RealAmp 仅需要外周血 2~3 mL,且当天即可得出结果,而血培养时间至少需要 5 d,甚至 20 多天。与血培养相比,RealAmp 简便、快捷,可以方便地实现布鲁菌血症的现场即时检测。

综上所述,本研究针对布鲁菌 OMP25 基因建立的 RealAmp 方法具有特异性强、灵敏度高、简便高效等特点,为布鲁菌的快速检测提供了新的发展方向,具有良好的发展前景。

参考文献

[1] 何晶晶,张雁,周珣,等.布鲁菌感染的实验室检测方法对

比[J].中华地方病学杂志,2016,35(3):228-230.

- [2] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H A, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): e63-e71.
- [3] WONG Y P, OTHMAN S, LAU Y L, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms[J]. *J Appl Microbiol*, 2018, 124(3): 626-643.
- [4] KESLI R, BILGIN H, YILMAZ H. Determination of in vitro susceptibilities of *Brucella* spp. strains against 11 different antibacterial agents isolated from blood cultures [J]. *Mikrobiyol Bul*, 2017, 51(3): 260-268.
- [5] PAPPAS G, PAPADIMITRIOU P. Challenges in brucella bacteraemia[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2007, 30(Suppl 1): S29-S31.
- [6] LIU J, ZHAO X. Clinical features and serum profile of inflammatory biomarkers in patients with brucellosis [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2017, 11(11): 840-846.
- [7] YU L S, RODRIGUEZ-MANZANO J, MALPARTIDA-CARDENAS K, et al. Rapid and sensitive detection of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* by tandem repeat loop-mediated isothermal amplification[J]. *J Mol Diagn*, 2019, 21(2): 286-295.
- [8] MUDHIGETI N, KALAWAT U, HULIKAL N, et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detection and typing of human papilloma virus 16 and 18 from endocervical samples[J]. *Indian J Med Microbiol*, 2019, 37(2): 241-247.
- [9] SOTIRIADOU I, KARANIS P. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT) [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 62(4): 357-365.
- [10] ZHAO J, FENG R. Sensitive and rapid detection of Zika virus by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Virus Genes*, 2019, 55(1): 43-50.
- [11] MORI Y, NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage [J]. *J Infect Chemother*, 2020, 26(1): 13-17.
- [12] SHIRATO K. Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification [J]. *Microbiol Immunol*, 2019, 63(10): 407-412.
- [13] NIEMZ A, FERGUSON T M, BOYLE D S. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases[J]. *Trends Biotechnol*, 2011, 29(5): 240-250.

(收稿日期:2019-12-29 修回日期:2020-07-15)