

改良环介导等温扩增技术快速检测婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌

胡连霞, 张伟*, 张先舟, 袁耀武, 张蕴哲, 张会彦, 马晓燕, 苏旭东

(河北农业大学食品科技学院, 保定 071001)

摘要 【目的】采用改良环介导等温扩增(LAMP)技术,快速检测婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌。【方法】以阪崎肠杆菌(ATCC29544)的16S-23S rRNA 间区序列作为靶序列,设计内、外引物和环引物,通过肉眼观察白色沉淀,判断检测结果。【结果】LAMP检测阪崎肠杆菌的灵敏度为0.101 CFU/mL,人工污染阪崎肠杆菌的婴儿配方奶粉的检出限为1.1 CFU/g。采用试剂盒提取DNA,从样品处理到报告结果,耗时1 h。而对照,PCR检测阪崎肠杆菌的灵敏度为101 CFU/mL,人工污染阪崎肠杆菌的婴儿配方奶粉的检出限为1100 CFU/g。采用同样方法提取DNA,从样品处理到报告结果,耗时3 h。【结论】因此,LAMP检测婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌灵敏度高,耗时短,方法简便。

关键词: 环介导等温扩增;LAMP;检测;阪崎肠杆菌;婴儿配方奶粉

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)03-0378-05

阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)是人和动物肠道内寄生的一种革兰氏阴性无芽孢杆菌,属肠杆菌科。阪崎肠杆菌是条件致病菌,在一定条件下对所有人群都有致病性,尤其对出生28天内,低体重儿或免疫力低下的婴幼儿,引起严重的新生儿脑膜炎、菌血症、小肠结肠炎,并可能引起神经功能紊乱,造成严重的后遗症,死亡率高达20%~50%以上,只有婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌与疾病的爆发相联系,已经引起世界范围内的广泛关注^[1-3]。目前对阪崎肠杆菌的检测方法主要有FDA推荐的传统检测方法,免疫学方法和各种PCR方法。传统检测方法操作繁琐,检测时间长,而且灵敏度较低;免疫学方法的特异性和灵敏度也不理想;PCR方法敏感、快速^[4],但由于需要昂贵的仪器设备、繁琐的电泳过程以及对检测人员较高的技术要求,而使其难以在基层普及和推广。

环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal

amplification,LAMP)是Notomi等在2000年开发的一种新颖的恒温核酸扩增方法,其原理是针对目的基因的6个区域设计4条特异引物,利用一种链置换DNA聚合酶(*Bst* DNA polymerase)在等温65℃左右,几十分钟,即可实现核酸的高效扩增^[5-6]。4条引物对靶序列的6个特异序列区域的识别,保证了LAMP扩增的高度特异性。LAMP不需要模板的热变性^[7],长时间温度循环,在等温条件下扩增,不会因温度改变而造成时间的浪费。有无肉眼可见的焦磷酸镁的白色沉淀^[8-9],成为判断核酸是否扩增的最简单的方法。LAMP将成为可以替代PCR的核酸扩增的新技术。增加环引物的环介导等温扩增方法,使反应速度可提高1/2~1/3^[10]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器设备和试剂:电热恒温水浴锅,高

基金项目 河北省自然科学基金(C2008000216)

*通信作者。Tel: +86-312-7528186; E-mail: zhangwei631126@yahoo.com.cn

作者简介 胡连霞(1972-)女,河北省献县,硕士,从事有害微生物检测及控制的研究。E-mail: huliianxia168@tom.com

收稿日期 2008-11-11;修回日期 2008-12-08

速冷冻离心机 (SIGMA3K30, 德国西格马公司), PCR 扩增仪 (Whatman T Gradient 基因扩增仪, 德国 Biometra 公司), 恒温培养箱, 凝胶成像系统 (Kodak EDAS290, 美国柯达公司), 电泳仪 (北京市六一厂生产 DXY-33A 型), 微量移液器 (0.1 ~ 1000 LIBIOHIT 芬兰) 等。DNA 试剂盒 (Bio Basic Inc. 160 Torbay Road, Markham Ontario L3R 1G6 Canada), BstDNA 聚合酶, Taq DNA 聚合酶, dNTP, 10 × Loading buffer, DNA Marker DL100, DL2000, LAMP 引物等购自或合成于上海生工生物工程有限公司, 营养肉汤培养基, 营养琼脂培养基等购自北京路桥公司。

1.1.2 菌株: 本实验室保存的阪崎肠杆菌 (ATCC29544, ATCC51007, ATCC51024), 由南开大学生命学院提供。

1.1.3 样品来源: 婴儿配方奶粉购自当地超市。

1.2 方法

1.2.1 纯菌培养: 阪崎肠杆菌接种于新鲜无菌的营养肉汤培养基中, 37℃ 培养 12 h。用生理盐水进行 10 倍系列稀释, 一直稀释到 10¹⁰。采用稀释平板法, 测定其纯培养物活菌数为 1.01 × 10⁸ CFU/mL; 同时从每稀释度菌液中取 1 mL 直接用试剂盒法提取阪崎肠杆菌基因组 DNA, 作为模板, 进行 LAMP 和 PCR 试验。

1.2.2 人工污染婴儿配方奶粉: 在人工污染阪崎肠杆菌前, 婴儿配方奶粉按 FDA 推荐的常规检验法和 PCR 法检测证实不含阪崎肠杆菌。然后将阪崎肠杆菌人工污染到婴儿配方奶粉中: 取 25 g 婴儿配方奶粉溶于 225 mL 灭菌生理盐水中, 然后对奶粉溶液人

工污染不同浓度的阪崎肠杆菌, 人工污染的奶粉溶液中阪崎肠杆菌的浓度为 1.10 × 10⁷ CFU/mL ~ 1.10 × 10⁻¹ CFU/mL。同时从每稀释度奶粉溶液中取 1 mL 分别加入 1 mL 无水乙醇、1 mL 氨水和 1 mL 石油醚, 混匀。混合物以 9562.5 × g, 离心 10 min。弃去上清液, 剩余的沉淀分别用 1 mL 10 mmol/L TE (pH7.8) 溶解。再用试剂盒法提取溶液中阪崎肠杆菌基因组 DNA, 直接进行 LAMP 和 PCR 检测, 确定检出限。

1.2.3 模板 DNA 的制备: 用 DNA 试剂盒提取阪崎肠杆菌 DNA, 按照制造商的说明所提取的 DNA, 溶解在 100 μL 的洗脱缓冲液中, 储存在 -20℃ 备用。

1.2.4 引物设计: 为了检测阪崎肠杆菌, 针对阪崎肠杆菌 (ATCC29544) GenBank 中 (基因号 AY702093) 16S-23S rRNA 间区序列, 运用引物设计软件 (<https://primerexplorer.jp/lamp3.0.0/index.html>) 在线进行 LAMP 引物设计。引物设计的原则如 notomi et al.^[5] 所述。设计的 6 条引物是 2 条外引物 (F3 和 B3), 2 条内引物 (FIP 和 BIP), 以及 2 条环引物 (LF 和 LB)。2 个外引物被描述为上游外引物 (F3) 和下游外引物 (B3)。2 个内引物被描述为上游内引物 (FIP) 和下游内引物 (BIP)。此外, 两个环引物被描述为上游环引物 (LF) 和下游环引物 (LB)。扩增基因组中的位置从 439 至 627 区域 189 bp 目的基因片断。引物的名称和具体序列见表 1。FIP 由 F1 的一个互补序列和正向序列 F2 构成。BIP 由 B1 的一个互补序列和正向序列 B2 构成。每条引物在基因组中具体的位置如图 1 所示。

表 1 LAMP 引物

Table 1 LAMP primers

Primer name	Sequence(5'→3')
Forward outer (F3)	AAATGCCGGGTGTGTCAG
Backward outer (B3)	GGFTTCCCCATTCGGACAT
Forward inner primer (FIP)	ACCGTGTACGCTTGTTCGCTTTCTCTCAAACCTCGCAGCAC
Backward inner primer (BIP)	GCCAGTCAGAGGCGATGCGCCGGTTATAACGGTTCA
Forward loop primer (LF)	AACCTCACAAACCGAAGA
Backward loop primer (LB)	AGCGCCGGTAAGGTGATA

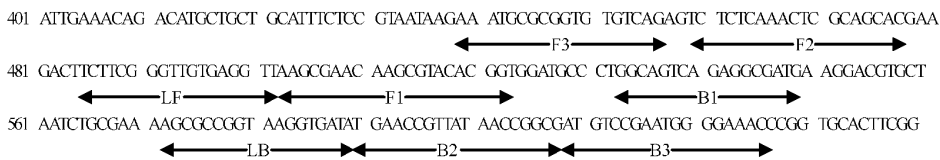


图 1 每条引物在基因组中的位置

Fig.1 Each primer in the genome of the location. Oligonucleotide primers used for LAMP assay of Enterobacter sakazaki from the GenBank database (accession No. AY702093) within the 16S-23S rRNA gene. Genome amplification from the position of 439-627 region 189 bp gene fragments. FIP consists of a complementary sequence of F1 and a sense sequence of F2. BIP consists of a complementary sequence of B1 and a sense sequence of B2.

1.2.4 LAMP 反应 25 μL 的反应体系由内引物 (FIP 和 BIP) 各 1.6 μm , 外引物 (F3 和 B3) 各 0.2 μm , 环引物 (LF 和 LB) 各 0.8 μm , 2.5 mmol/L dNTP, 1.6 mol/L 甜菜碱 (Sigma, St. Louis, Mo.), 4 mmol/L MgSO_4 , $10 \times$ Bst DNA 聚合酶反应缓冲液 (New England Biolabs, MA) 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mmol/L MgSO_4 , 0.1% Triton X-100) 8 U 的 Bst DNA 聚合酶大片段 (New England Biolabs, Beverly, MA), 3 μL DNA 模板和用灭菌双蒸水补足体系。LAMP 反应过程是首先在 64 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中反应 20 min, 然后将其放入 80 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中, 水浴 10 min 终止反应, 通过肉眼观察有无白色焦磷酸镁沉淀。此外, 取扩增产物 5 μL , 与 1 μL 的 loading buffer 混合均匀, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 观察梯形条带, 以证实是否发生了 LAMP 反应。

1.2.5 PCR 反应: 为了比较 LAMP 检测阪崎肠杆菌灵敏度和人工污染检出限, 进行了 PCR 反应, PCR 反应的引物是检测阪崎肠杆菌的 LAMP 反应的两条外引物 (F3 和 B3), 见表 1。PCR 扩增反应的 25 μL 反应体系包括 $10 \times$ 聚合酶链反应缓冲液 (Mg^{2+} Free) (100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 500 mmol/L KCl), 25 mmol/L MgCl_2 , 2.5 mmol/L dNTP, 上下游引物各 10 μm , 5 U 的 Taq DNA 聚合酶, 3 μL 的 DNA 模板和用灭菌双蒸水补足体系。PCR 反应体系在 PCR 仪中反应的程序是预变性 95 $^\circ\text{C}$, 5 min; 变性 95 $^\circ\text{C}$, 45 s; 退火 57 $^\circ\text{C}$, 30 s; 延伸 72 $^\circ\text{C}$, 30 s。进行 35 个循环。PCR 产物 5 μL , 与 1 μL 的 loading buffer 混合均匀, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

2.1 LAMP 反应的肉眼可视结果

在阪崎肠杆菌 16S-23S rRNA 间区序列, 即靶序列的高度保守的区域进行引物在线设计, 从 1000 对引物中筛选, 得到这套带有 2 条环引物的特异引物。成功地进行了 LAMP 检测婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌的试验。反应结果如图 2 所示, A 管未发生 LAMP 反应, 没有产生白色沉淀; 而 B 管发生了 LAMP 反应, 产生了白色沉淀。

2.2 LAMP 和 PCR 检测阪崎肠杆菌的纯培养物的灵敏度的比较

阪崎肠杆菌经培养, 采用稀释平板法, 测得原菌液浓度为 1.01×10^8 CFU/mL, 10 倍系列稀释, 进行 LAMP 和常规 PCR 检测阪崎肠杆菌的灵敏度试验如图 3 所示。LAMP 方法, 在稀释到 10^0 倍 (1.01×10^{-1}) 时出现沉淀, 电泳也有梯形条带。而稀释到

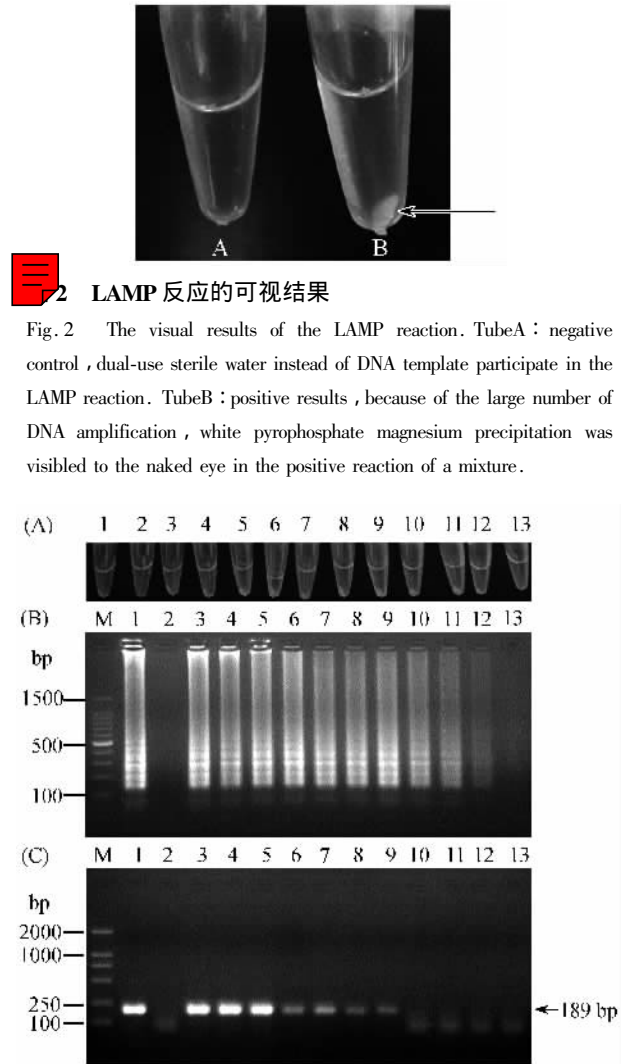


图 3 比较 LAMP 和常规 PCR 检测阪崎肠杆菌的灵敏度

Fig. 3 Comparative sensitivity of LAMP and conventional PCR for detection of *Enterobacter sakazakii*. A: The visual results of the LAMP reaction for 20 min. B: Electrophoretic analysis of LAMP reaction for 20 min. C: Electrophoretic analysis of corresponding PCR reaction for 90 min. Tubes and lanes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 and 13, 1.01×10^8 , 1.01×10^7 , 1.01×10^6 , 1.01×10^5 , 1.01×10^4 , 1.01×10^3 , 1.01×10^2 , 1.01×10^1 , 1.01×10^0 , 1.01×10^{-1} and 1.01×10^{-2} CFU/mL per reaction, respectively; tube and lane 1, positive reaction; tube and lane 2, negative control; lane M, (B) 100 bp DNA ladder marker (C) 2000 bp DNA ladder marker.

10^{10} 倍 (1.01×10^{-2}) 时未出现沉淀, 电泳也无梯形条带。即检测阪崎肠杆菌灵敏度达 0.101 CFU/mL, 相应的沉淀图如图 3-A 所示, 琼脂糖凝胶电泳图如图 3-B 所示。而常规 PCR 稀释到 10^6 倍 (1.01×10^2) 时能检测到阪崎肠杆菌, 稀释到 10^7 倍 (1.01×10^1) 时就不能检测到阪崎肠杆菌, 即灵敏度为 101 CFU/mL。其琼脂糖凝胶电泳图如图 3-C 所示。比较 LAMP 和常规 PCR 的灵敏度试验, LAMP 更加灵敏, 其灵敏度

是 PCR 的 1000 倍。

2.3 LAMP 和 PCR 检测人工污染样品中的阪崎肠杆菌的检出限的比较

人工污染的奶粉溶液的阪崎肠杆菌的浓度从 1.10×10^7 CFU/mL \sim 1.10×10^{-1} CFU/mL,按 1.2.2 方法处理样品提取 DNA,进行 LAMP 和常规 PCR 检测人工污染婴儿配方奶粉的阪崎肠杆菌的检出限试验如图 4 所示。LAMP 方法在稀释到 10^7 倍 (1.10×10^0) 时能出沉淀,电泳有梯形条带。稀释到 10^8 倍 (1.10×10^{-1}) 时不能检测到阪崎肠杆菌,不出沉淀,电泳无梯形条带。即检测人工污染婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌的检出限是 1.10 CFU/g,耗时约 1 h,其沉淀图如图 4-A 所示,琼脂糖凝胶电泳图如图 4-B 所示。而常规 PCR 稀释到 10^4 倍 (1.10×10^3) 时能检测到阪崎肠杆菌,稀释到 10^5 倍 (1.10×10^2) 时就不能检测到阪崎肠杆菌,即检出限是 1100 CFU/g,耗时 3 h,其琼脂糖凝胶电泳图如图 4-C 所示。比较

LAMP 和常规 PCR 反应的检出限试验,同样,LAMP 的检出限是 PCR 的 1000 倍。

3 讨论

阪崎肠杆菌在极其少量的情况下都有致病性^[11],即使是婴儿配方奶粉中大肠菌群污染水平符合相应的微生物学标准,也可能存在阪崎肠杆菌的污染^[12]。因此检测阪崎肠杆菌的方法是否灵敏、快速至关重要。近年来,阪崎肠杆菌的生化及分子检测方法取得重要进展,基于保守序列如 16S rRNA、23S rRNA 以及 16S-23S rRNA 间区序列(ITS)等的分子检测技术相继建立。最近研究表明 LAMP 法检测各种食源性致病菌方面具有良好潜力^[13-14]。本研究以阪崎肠杆菌的 16S-23S rRNA 间区序列作为靶序列,采用带有 2 条环引物的 LAMP 方法检测婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌,表现出较高的灵敏度。LAMP 法检测阪崎肠杆菌的研究至今未见报道,本研究探索了一种更为稳定、快捷的分子检测样品中阪崎肠杆菌的新技术。

LAMP 方法是一种新型的恒温核酸扩增技术。它依赖于能够识别靶 DNA 上 6 个特定区域的 4 条引物和一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶,在恒温条件下扩增核酸,保证了扩增的高特异性和高效率。由于 LAMP 独特的核酸扩增机制,它的产物是由多重靶序列的茎-环状 DNA 和花椰菜状 DNA 所组成的混合物,在琼脂糖凝胶电泳上会呈现出 LAMP 反应典型的阶梯状条带。另外,核酸大量生成时,从 dNTPs 中析出的焦磷酸根离子与反应体系中的 Mg^{2+} 结合,产生肉眼可见的扩增反应副产物-白色焦磷酸镁沉淀。结果鉴定简单,非常适合高通量的快速检测。

从研究结果中我们可以看到,改良的 LAMP 方法检测灵敏度是常规的 PCR 的 1000 倍,许多研究表明,LAMP 技术可检测到 10 个拷贝数甚至更低的靶标,在检测灵敏度上具有更大的优势^[15-16]。而且 LAMP 方法操作简单,反应快速,不需要昂贵的仪器设备、繁琐的电泳过程,尤其适合在基层医疗单位和食品检测部门推广和应用。

参考文献

- [1] I Himelright, E Harris, V Lorch, et al. Enterobacter sakazakii infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee, 2001. *The Journal Of the American Medical Association*, 2002, 287(17): 2204-2206.
- [2] FAO/WHO. Joint FAO-WHO workshop of Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant

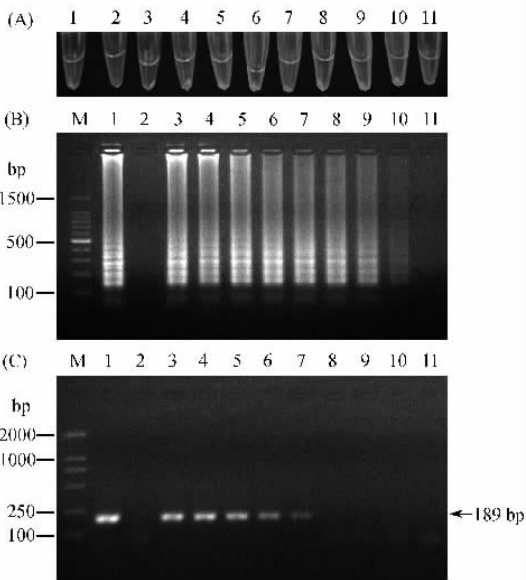


图4 比较 LAMP 和常规 PCR 检测婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌检出限

Fig.4 Comparative the detection limit of LAMP and conventional PCR for detection of Enterobacter sakazakii of powdered infant formula. A: The visual results of the LAMP reaction for 20 min. B: Electrophoretic analysis of LAMP reaction for 20 min. C: Electrophoretic analysis of corresponding PCR reaction for 90 min. Tubes and lanes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11, 1.10×10^7 , 1.10×10^6 , 1.10×10^5 , 1.10×10^4 , 1.10×10^3 , 1.10×10^2 , 1.10×10^1 , 1.10×10^0 and 1.10×10^{-1} CFU/mL per reaction, respectively; tube and lane 1, positive reaction; tube and lane 2, negative control; lane M, (B) 100 bp DNA ladder marker; (C) 2000 bp DNA ladder marker.

- formula, Geneva, Online report: <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/feb2004/en/>. 2004.
- [3] Joint FAO/WHO Workshop. Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula. Rome, Italy: FAO. 2006.
- [4] Palmer AO and Keith AL. Extraction -Free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. *Journal of Clinical Microbiology* 2000, 38(6):2271-2277.
- [5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12):E63-e63.
- [6] Eiken Chemical Co. Ltd. The principles of LAMP method. <http://loopamp.eiken.co.jp/e/tech/index.html>. 2003.
- [7] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clinical Chemistry*, 2001, 47(9):1742-1743.
- [8] Yasuyoshi Mori, Tsuyoshi Hirano, Tsugunori Notomi. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnology* 2006 6 3.
- [9] Mori Y, Nagamine K, Tomita, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 289(1):150-154.
- [10] Nagamine K, T Hase, T Notomi. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16(3):223-229.
- [11] Iversen C, Stephen F. Risk profile of Enterobacter sakazakii, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science and Technology* 2003, Vol (14):443-454.
- [12] FAO/WHO. Draft risk assessment for Enterobacter sakazakii. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6>. 2004.
- [13] Kato H, Yoshida A, Ansai T, et al. Loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of Enterococcus faecalis in infected root canals. *Oral Microbiology and Immunology* 2007, 22(2):131-135.
- [14] Yukiko HK, Nemoto J, Ohtsuka K, et al. Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing Escherichia coli using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Medical Microbiology*, 2007, 56:398-406.
- [15] Mori Y, M Kitao, N Tomita, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2004, 59(2):145-157.
- [16] Suzuki R, T Yoshikawa, M Ihira, et al. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA. *Journal of Virological Methods* 2006, 132:216-221.

Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula

Lianxia Hu, Wei Zhang*, Xianzhou Zhang, Yaowu Yuan, Yunzhe Zhang, Huiyan Zhang, Xiaoyan Ma, Xudong Su (Institute of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract [Objective] A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology with two loop primers was developed for rapidly detecting *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula. **[Methods]** Sequences of 16S-23S rRNA of *Enterobacter sakazakii* (ATCC29544) were used as target sequences, to design outer primers, inner primers and loop primers. We judged the results of detection, through visible to the naked eye of the white precipitate. **[Results]** The sensitivity of the LAMP assay was 0.101 CFU/mL; the detection limit of artificial contamination was 1.1 CFU/g. The detection could be finished about an hour from dealing with the sample to report the results with DNA kit. Compared with LAMP, the sensitivity of the PCR assay was 101 CFU/mL and the detection limit of artificial contamination was 1100 CFU/g in three hours. To apply the same method of extracting DNA, from dealing with the sample to report the results, it took about three hours. **[Conclusion]** Therefore, this LAMP-based assay is sensitive and fast. These results indicate that LAMP can provide a rapid yet simple test for the detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula.

Keywords: loop-mediated isothermal amplification; LAMP; detection; *Enterobacter sakazakii*; powdered infant formula

(本文责编 张晓丽)