

快速 LAMP 法检测海产品中副溶血弧菌的方法研究

卢京光,裴琳,李欣荣,楚敏,赵鲁青

(青岛市药品检验所,山东青岛 266071)

[摘要] 目的:建立 LAMP 法快速检测海产品中副溶血弧菌的方法。方法:选取副溶血弧菌阳性对照菌和阴性对照菌共 13 株进行方法的特异性、灵敏度试验,并确定即符合快检要求又有较高检出灵敏度的最短培养时间。选取 108 批海产品,分别用快速 LAMP 法和国标方法进行测定,对结果进行统计比较分析。结果:快速 LAMP 法检测副溶血弧菌专属性强,不受其他细菌的干扰;灵敏度高,当菌液浓度为 10 cfu/ml 时可直接检出,含菌量 <1 cfu/ml 时,增菌培养 4 h 后即可检出。108 批海产品快速 LAMP 法的检出率略高于国标法,两种方法无显著性差异。结论:快速 LAMP 法检测副溶血弧菌准确、灵敏,同时操作简便、检测成本低,可用目测比色判断结果;检测时间短,有望成为快速检测副溶血弧菌的有效手段。

[关键词] 副溶血弧菌;快速检测;环介导等温扩增技术(LAMP)

[中图分类号] R446.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2010)12-3283-03

Study on rapid LAMP method for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products

LU Jing-guang, PEI Lin, LI Xin-rong, CHU Min, ZHAO Lu-qing

(Qingdao Institute for Drug Control, Qingdao 266071, China)

[Abstract] **Objective:** To establish LAMP method to detect *V. parahaemolyticus* in aquatic products rapidly. **Methods:** The specificity and sensitivity of the method were detected by 13 positive and negative reference strains. 108 batches of aquatic product were detected separately by LAMP and national standard, and statistic was performed to analyze the results. **Results:** LAMP detecting *V. parahaemolyticus* in aquatic products has high specificity, cannot be interfered by the existence of other strains. Has high sensitivity, and can detect 10 cfu/ml of *V. parahaemolyticus*. When the amount of *V. parahaemolyticus* is less than 1 cfu/ml, can be detected after 4 h enrichment. The detection ratio of LAMP is slightly higher than GB to 108 aquatic products. Two methods show no distinctive difference. **Conclusion:** LAMP method is suitable for rapid detection *V. parahaemolyticus* in aquatic products.

[Key words] *Vibrio parahaemolyticus*; Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP); Rapid detection

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一种食源性病原菌,主要存在于近海的海水、海水沉积物和鱼类、贝类等海产品中,可引起食物中毒、反应性关节炎和心脏疾病等,发病呈世界性分布,尤其在沿海地区发病较高。在近年来沿海地区的食物中毒病例中,该菌已成为首要病原^[1]。

国家标准^[2]对该菌的检验鉴定方法以常规分离鉴定为主,一般需要 5 d~7 d 的时间,虽然检出灵敏度较高,但不能满足水产品快速检验的要求,因此寻求一种快速简便而特异的检测方法是十分必要的。

目前,海产品中副溶血弧菌的快速检测方法主要有荧光定量 PCR 法^[3]、显色培养基法(包括试纸片法)^[4]、环介导等温扩增技术(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)

法等。LAMP 法是一种新颖的恒温核酸扩增方法,其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物,利用一种链置换 DNA 聚合酶(Bst DNA polymerase)在等温条件下(65℃左右)保温几十分钟,即可完成核酸扩增反应^[5]。LAMP 法用于副溶血弧菌的快速检测在国内起步较晚,2007 年由上海水产大学食品学院开始研究^[6],目前该方法应用于海产品中副溶血弧菌的快速检测尚未见报道。本研究使用 LAMP 法对 108 批海产品进行副溶血弧菌检测,同时用国标法测定,对结果进行统计比较分析。

1 材料和方法

1.1 菌株

副溶血弧菌 4 株,非 O1 霍乱弧菌、河流弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、猪霍乱沙门菌、肠出血性大肠埃希菌 O157、大肠埃希菌、乙型副伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌各 1 株,共 13 株标准和参考菌株,分别来自中国医学微生物菌种保藏中心、中国

[基金项目] 国家 863 计划(2008AA100805)

[作者简介] 卢京光(1968-),女,硕士,副主任药师,主要从事微生物、抗生素检验工作。

海洋微生物菌种保藏管理中心以及青岛市疾病控制中心。

1.2 设备

JS-400A 恒温金属浴由上海培清科有限公司生产; AnkeTGL-16B 高速离心机由上海安亭科学仪器厂生产; 麦氏比浊仪、全自动微生物鉴定系统 Vitex 32 由法国生物梅里埃公司生产。

1.3 试剂和培养基

副溶血弧菌 LAMP 基因检测试剂盒, 包括 DNA 提取液、HF 管 [LAMP 反应管, 内含工作液 (包括反应液及 Bst DNA 聚合酶)、显色液、稳定液]、阳性对照管、阴性对照管, 以及引物设计均由广州华峰生物科技有限公司生产和完成。

计数琼脂由北京陆桥技术有限公司生产, 3% 氯化钠碱性蛋白胨水、TCBS 培养基 (pH8.6)、副溶血弧菌显色培养基由青岛海博生物技术有限公司生产。

1.4 样品

本实验所使用 108 批海产品分别购自青岛市各大超市和农贸市场。

1.5 实验方法

1.5.1 样品的处理 以无菌操作取鱼类表面组织、肠或腮, 贝类全部内容物包括贝肉和体液 25 g, 加 225 ml 3% NaCl 碱性蛋白胨水, 用均质器打碎。将该增菌液置于 37℃ 培养后进行检测。

1.5.2 LAMP 检验方法

1.5.2.1 模板 DNA 的制备 将样品增菌液混匀, 取 1 ml 加到 1.5 ml 无菌离心管中, 10000 rpm/min 离心 2 min, 弃上清。加入 80 μ l DNA 提取液, 混匀后沸水浴 10 min, 置冰上 10 min。10000 rpm/min 离心 2 min, 上清即为 DNA 模板, 可于 -20℃ 长期保存备用。

1.5.2.2 核酸扩增 向 HF 管样品腔内加入 2.5 μ l 待检模板, 盖紧管盖, 移至 65℃ 恒温反应 60 min。

1.5.2.3 结果判断 反应结束后, 将 HF 管倒置、正置各甩动 2 次, 使工作液与显色液混合均匀, HF 管液体呈绿色判为阳性, 橙色为阴性。

1.5.3 国标法测定副溶血弧菌 按国标法^[2]法进行。

1.5.4 特异性试验 选择 9 株非副溶血弧菌作为阴性对照菌, 分别用生理盐水稀释成不同稀释级别的菌液, 各取 1 ml 置于 9 ml 增菌液中增菌, 同时将四株弧菌属阴性对照菌以及其它菌属五株致病菌分别合并增菌培养, 于 0、2 h、6 h、20 h 分别用 LAMP 法进行检测, 观察各单一菌和合并菌对 LAMP 法的干扰情况。

1.5.5 纯菌和人工染菌样品的灵敏度试验 选副溶血弧菌阳性菌用生理盐水稀释至不同的稀释级别, 各取 1 ml 加入到样品均质液中, 混匀, 分别用 LAMP 法对纯菌和人工染菌样品测定, 同时进行平板计数, 考察纯菌和人工染菌样品的 LAMP 法最低检出限。

1.5.6 LAMP 法快速检测培养时间的确定 分别取三株副溶血弧菌进行 10 倍稀释, 于 37℃ 培养 2 h、4 h、6 h 后进行平板计数, 并绘制生长曲线。同时进行 LAMP 实验, 确定 LAMP 快速检测所需的最佳培养时间。

2 结果

2.1 特异性试验结果

阴性对照单一菌和混合菌在增菌 0、2 h、6 h、20 h LAMP 法检测结果均呈阴性, 说明 LAMP 法对副溶血弧菌的检测具有很高的专属性, 其它细菌的存在对 LAMP 法测定无干扰。

2.2 灵敏度试验结果

表 1 纯菌和人工染菌样品的最低检出浓度

增菌时间 (h)	0	4	6	20
纯菌菌液浓度 (cfu/ml)	10	800	14000	多不可计
人工染菌样品菌液浓度 (cfu/ml)	9	750	13000	多不可计
LAMP 结果	+	+	+	+

注: “+”表示检出, “-”表示未检出。

由表 1 可以看出, LAMP 法对于纯菌的检测灵敏度可达到 10 cfu/ml; 对于人工染菌样品, LAMP 检测灵敏度可达到为 9 cfu/ml 时即可检出, 与纯菌检测灵敏度基本一致。

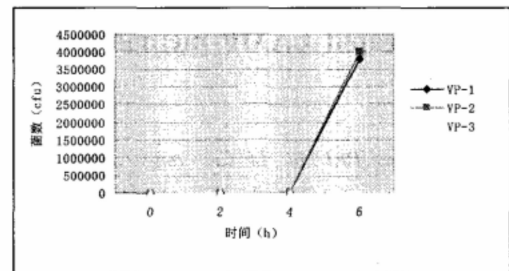


图 1 三株副溶血弧菌 0~6 h 生长曲线

2.3 三株副溶血弧菌生长曲线

由图 1 可以看出, 副溶血弧菌增菌 0~2 h 处于缓慢增长期, 2 h~6 h 处于快速增长期, 增菌至 4 h 增长近 1000 倍, 如果样品本身污染情况严重, 含菌量较多, 处理后可达到 10 cfu/ml, 可直接进行检测; 如果样品本身含菌量较少, 处理后 < 10 cfu/ml, 增菌 4 h 后的菌量完全能达到检出的要求。

2.4 三株副溶血弧菌 LAMP 法检测结果及 LAMP 法快速检测培养时间的确定

表 2 三株阳性菌经 2 h、4 h、6 h 培养后 LAMP 试验结果

增菌时间 (h)	菌液浓度 (cfu/ml)								
	VP-1			VP-2			VP-3		
	51	3	<1	9	1	<1	6	2	<1
0	+	+	-	+	+	-	+	+	-
2	+	+	+	+	+	-	+	+	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: “+”表示检出, “-”表示未检出。

由表 2 可以看出, 当菌液浓度 < 1 cfu/ml 时, 增菌培养 4 h 后均可检出。故样品测定均采用增菌培养 4 h 后检测。

2.5 108 批海产品中副溶血弧菌检出情况及统计分析

表 3 LAMP 法和国标法对 108 批海产品中副溶血弧菌检出情况

方法	阳性数(份)	阴性数(份)	合计(份)	阳性率(%)
国标法	59	49	108	54.6
LAMP 法	64	44	108	59.3
合计	123	93	216	56.9

由表 3 可以看出,108 份样品中,国标法阳性检出率为 54.6%,LAMP 法增菌 4 h 阳性检出率为 59.3%,对两组数据进行卡方检验, $P < 0.05$,两种方法没有显著性差异。

3 结论与讨论

测定结果表明,LAMP 法检测副溶血弧菌专属性强,通过特异性试验发现检测不受其他细菌的干扰;灵敏度高,当菌液浓度为 10 cfu/ml 时可直接检出,含菌量 < 1 cfu/ml 时,增菌培养 4 h 后即可检出。

对 108 批海产品分别用 LAMP 法测定和国标方法进行测定,样品增菌 4 h LAMP 法的检出率高于国标法,阳性检出率 LAMP 法为 59.3%,国标法为 54.6%,对两组数据进行统计分析,两种方法无显著性差异。实验中发现 12.0% 的样品用 LAMP 法检出阳性而国标法检出阴性,说明 LAMP 与国标法相比具有更高的灵敏度,也可能存在假阳性结果,但作为快检初筛,可以允许一定比例的假阳性结果,以利于严格监管,同时

实验室进一步确认。

LAMP 法检测副溶血弧菌快速、准确、操作简便、检测成本低,通过加入核酸染料可直接用目测比色判断结果;检测时间短,增菌 4 h 进行测定,检测完成仅需要 5 个多小时,即符合快速检测的要求,又能确保方法的灵敏度,大大提高了检测效率,有望发展成为快速检测副溶血弧菌的有效手段。

【参考文献】

- [1] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 3-9.
- [2] GB/T 4789.07-2008. 食品安全国家标准 食品微生物学检验副溶血性弧菌检验[S].
- [3] 焦红,翁文川,王方金,等. 食品中副溶血弧菌 FQ-PCR 快速检测方法的研究[J]. 卫生研究, 2005, 34(4): 457-460.
- [4] 许如苏,林彩华,黄桂荣,等. 副溶血性弧菌快速测试片检测性能研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(12): 2621-2622.
- [5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): 63.
- [6] 徐芊,孙晓红,赵勇,等. 副溶血弧菌 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(12): 66-72.

(收稿日期:2010-09-21)

(上接第 3282 页)

红细胞 CR1 基因的 HH 型比例明显高于健康对照组,而 HL 型、LL 型高于对照组, $P < 0.05$,提示结肠癌患者可能存在着红细胞 CR1 密度基因的突变。

本研究还发现,结肠癌组与对照组相同的基因型患者相同基因型的 RBC-C3bRR 经比较无显著性差异,而结肠癌组每种基因型的 RBC-CICRR 均明显高于对照组, $P < 0.05$,可能的原因是红细胞 C3b 受体活性与 CR1 分子密度基因多态性、机体内循环免疫复合物及其他免疫调节因子有关。

综上所述,红细胞 CR1 密度基因中、低表达可能是造成结肠癌患者红细胞免疫功能低下的原因之一,但还可能与机体其他因素有关,有待于进一步研究探讨。

【参考文献】

- [1] 何庭宇,郭景涛,杨进,等. 原发性肾病综合征患者红细胞 CR1 密度相关基因及数量表达与黏附活性的测定及意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(12): 1500-1501.
- [2] 郭峰,虞紫茜,赵中平. 红细胞免疫功能初步研究[J]. 中华麻醉学杂志, 1982, 62(12): 715-716.

- [3] 王海滨,张景萍,沈茜,等. 红细胞补体受体 1 型分子定量测定方法[J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22(6): 342-343.
- [4] 王程,杨运高. 不同红细胞免疫功能状态下的大肠癌肝转移小鼠模型的建立[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(9): 1145-1147.
- [5] 蒋玉红,王亚秋,孙宽周. 支气管哮喘患儿红细胞 CR1 基因组密度多态性分布及对红细胞免疫功能影响[J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(10): 1206-1207.
- [6] 刘丽宏,单保恩,高玉环,等. 非霍奇金淋巴瘤患者红细胞 CR1 基因多态性、表达数量及免疫功能的相关性[J]. 癌变畸变突变, 2007, 19(5): 351-354.
- [7] 江厚象,潘凯,李芳芳,等. 乌司他丁对老年腹腔镜结肠癌根治术患者红细胞免疫功能的保护[J]. 放射免疫学杂志, 2009, 22(3): 270-272.
- [8] 魏忠华,刘光美. 结肠癌患者红细胞免疫功能检测及其临床意义[J]. 四川省卫生管理干部学院学报, 2001, 20(1): 43.
- [9] 李海林,金萍,黄永坤,等. 反复呼吸道感染患儿红细胞 CR1 数量基因多态性及其红细胞免疫功能[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(4): 423-426.

(收稿日期:2010-04-16)