

· 论 著 ·

炭疽杆菌双重可视化 LAMP 检测方法的建立

刘 玉¹, 陈文琦², 王 平¹, 操 敏¹, 韩一芳¹, 张 琪¹, 张锦海¹, 王长军¹

[摘要] 目的 建立同时检测炭疽杆菌 capA 基因、PA 基因的双重环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 方法, 用于防范生物恐怖威胁。方法 设计和合成分别针对炭疽杆菌 capA 基因、PA 基因的引物对, 通过优化参数, 建立可同时检测 capA 基因、PA 基因的双重 LAMP 方法, 测试敏感性和特异性, 并应用于模拟样本和实战检测。结果 双重 LAMP 的检测 capA 基因、PA 基因的敏感性均可达到 50 模板拷贝每反应, 并具有良好的特异性, 在重大保障活动中得到检验。结论 双重 LAMP 方法具有可以同时筛查、简单快速、灵敏度高优点, 在炭疽杆菌检测方面有良好应用前景。

[关键词] 炭疽杆菌; 环介导等温扩增; 检测

[中图分类号] R378.72 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2016.04.002

Development of a duplex loop-mediated isothermal amplification assay for detection of bacillus anthracis

LIU Yu¹, CHEN Wen-qi², WANG Ping¹, CAO ming¹, HAN Yi-fang¹, ZHANG Qi¹, ZHANG Jin-hai¹, WANG Chang-jun¹. 1. Center for Disease Control and Prevention of Nanjing Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 2. Department of Dermatology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210016, China

[Abstract] **Objective** To develop a duplex loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of specific structural genes and virulence genes in bacillus anthracis. **Methods** Two sets of specific primers were designed and synthesized according to CapA and PA genes of bacillus anthracis. The reaction parameters were optimized to develop the duplex LAMP assay for the rapid detection of bacillus anthracis. This study also tested the sensitivity and specificity of the LAMP assay, and applied it to test simulated and actual samples. **Results** A double LAMP assay for rapid detection of bacillus anthracis PA gene (plasmid pX01) and capA gene (pX02 plasmid) on visualization methods had been established. The detectable sensitivity of the duplex LAMP was 50 template copy per reaction, and it had good specificity, stability and reproducibility. **Conclusion** Considering LAMP's simplicity in operation and high sensitivity, there is potential use in clinical diagnosis and surveillance of bacillus anthracis.

[Key words] bacillus anthracis; loop-mediated isothermal amplification assay; detection

炭疽杆菌是人畜共患致病菌, 具有高度致病性, 其芽胞可存活十年以上, 可形成气溶胶, 且除易引发突发公共卫生事件外, 还被认为是最有效的生物武器之一, 以及最可能被用于制造生物恐怖的主要病原之一^[1]。

目前的炭疽检测方法还面临两个关键问题: 一是如何在条件较简陋的事发现场快速确定是否存在

在炭疽杆菌; 二是如何快速鉴定出炭疽强毒株, 以挽救吸入性感染炭疽强毒株的病人生命, 同时确定针对目标人群的强制性隔离防疫措施等。炭疽杆菌与枯草芽胞杆菌等其它蜡样菌群的序列有很高的同源性, 但重要区别在于它有 2 个与毒力密切相关的特异性质粒 (pX01 和 pX02)。pX01 质粒上包含分别编码保护性抗原 PA、致死因子、水肿因子的基因, 为炭疽杆菌侵袭及毒力所必需; pX02 质粒上则包含与荚膜、芽胞形成有关的基因如 capA、capB、capC 等, 为炭疽杆菌在体内抗吞噬、繁殖扩散相关。如炭疽杆菌丢失 pX01 质粒、pX02 质粒中任何一个质粒, 也就失去了相应的毒力因素, 将成为难以致病的弱毒株^[2]。

本研究选择炭疽杆菌的编码保护性抗原的 PA 基因 (在 pX01 毒力质粒上), 以及与荚膜合成相关的 capA 基因 (在 pX02 毒力质粒上) 作为检测靶基因, 建立了一种能实现不开盖, 无需浊度仪即能实现肉眼可视化检测, 又同时能区分强毒株、弱毒株

基金项目: 国家科技重大专项 (2013ZX10004103004); 全军十二五重点项目 (AWS11C001, AWS11C009); 军队后勤科研重点项目 (BWS14J025); 国家自然科学基金青年基金 (81402619); 江苏省科技支撑计划社会发展项目 (BE2013603); 江苏省自然科学基金青年基金 (BK20130083)

作者单位: 1. 210002 江苏南京, 南京军区疾病预防控制中心疾控所; 2. 210006 江苏南京, 南京医科大学附属南京第一医院皮肤科

通讯作者: 王长军, E-mail: science2008@hotmail.com; 张锦海, E-mail: ahoi@163.com

引用格式: 刘 玉, 陈文琦, 王 平, 等. 炭疽杆菌双重可视化 LAMP 检测方法的建立 [J]. 东南国防医药, 2016, 18(4): 341-345.

或无毒株(即可初步判定毒力)的双重环介导恒温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株与样本 本研究使用了 26 株菌株来建立、优化 LAMP 反应,以及评估 LAMP 反应的灵敏性和特异性。其中 8 株炭疽杆菌强毒株核酸,还有 4 株仅含 pX01 质粒的炭疽弱毒株,1 株仅含 pX02 质粒的炭疽弱毒株,以及鼠疫耶尔森菌核酸由(解放军军事医学科学院微生物检验中心)提供。部分非致病或机会致病的芽胞杆菌由本实验室保存。模拟样本为选择奶粉、面粉、小苏打粉、配制培养基的蛋白粉,与培养的炭疽杆菌混合。实毒实样:1 株含 pX02 质粒的炭疽杆菌弱毒株,为第三方机构提供的盲样实毒标本。

1.2 主要试剂及设备 LAMP 扩增所需的 Bst DNA 聚合酶购自美国 NEB(New England Biolabs)公司。羟基萘酚蓝(hydroxy naphthol blue, HNB),甜菜碱(Glycine betaine),为美国 Sigma 公司产品。炭疽杆菌培养所需的 PLET 琼脂基础、溶菌酶、乙酸亚铵购自青岛海博生物公司。Premix Ex Taq (Probe qPCR)和 MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0 购自大连宝生物(Takara)公司。所用其它试剂均为进口或国产分析纯试剂;实验用水均为超纯水(MilliPore Direct-Q 5 超纯水系统)。主要设备为:迷你型 SC25 恒温金属浴(美国 Torrey Pines 公司)、ABI 7500 FAST 型实时荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔公司)、Loopamp 实时浊度仪 LA-320C(日本 EIKEN 公司)。

1.3 引物设计 根据炭疽杆菌 pX01 质粒上 PA 基因、pX02 质粒上 capA 基因保守序列,利用 Primer Explorer V4 software (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>)进行设计。为了加快反应速度,额外设计了环(Loop)引物 LB 和 LF^[3]。设计 10 组引物,经实验筛选出扩增速率快、起峰时间早、未见非特异扩增的 1 组引物作为优选^[4]。

1.4 LAMP 反应对镁离子浓度、反应温度、反应时间、引物配比等参数进行优化^[5] 最终确定的反应温度为 60 °C,PA-LAMP 和 capA-LAMP 反应体系总体积均为 25 μL,包括 20 mmol/L Tris-HCl (pH8.8), 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L 的 (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100, 8 mmol/L MgSO₄, 0.8 mmol/L betaine, 1.4 mmol/L dNTPs, 8U Bst DNA polymerase, 对应的引物 FIP 和 BIP 各 1.6 μM, F3 和 B3 各 0.2 μM, LF 或

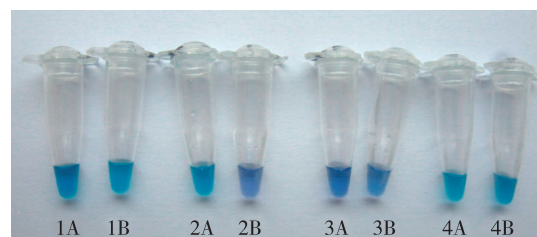
LB 为 0.8 μM,以及模板 2 μL。反应条件均为 60 °C 30 min,最后 85 °C 2 min 终止反应。每次反应均设定以蒸馏水为模板,其它条件一致的阴性对照。

1.5 LAMP 产物检测 使用可视化 HNB 法(Hydroxynaphthol blue)进行终点检测^[6]。恒温孵育前在 LAMP 体系中加入终浓度为 120 mM 的 HNB,即加入 HNB 溶液(3 mM)1 μL,总体积仍为 25 μL,然后进行恒温扩增。反应结束后观察反应管溶液颜色变化,显天蓝色提示有扩增反应,为阳性判定;而紫罗兰色为阴性判定。以实时荧光定量 PCR 方法作为参比方法,参见文献^[7]。

2 结果

2.1 优选引物 为优化 LAMP 反应,使用 LA-320c 浊度仪(Eiken Chemical)对加入不同引物组的 LAMP 反应进行了测试。在合成的 10 套引物中,针对 PA 基因的引物的扩增速率最快,出峰时间最早(17 min);而针对 capA 基因的引物出峰时间最早为 19 min。见表 1。

2.2 炭疽杆菌双重 LAMP 检测体系的建立 对炭疽强毒株(株编号 17003-10)、炭疽弱毒株(株编号 17003-42)、蜡状芽胞杆菌(编号 CMCC63301)、质粒标准品的可视化检测结果如图 1 所示,每套体系共 A、B 两管,分别检测炭疽杆菌的 pX01 质粒、pX02 质粒。反应液颜色紫罗兰色为阴性,天蓝色为阳性。反应时间 30 min。从图 1 中,可直接根据颜色判断是否炭疽杆菌及其毒力,如 1A 阳性(提示含炭疽杆菌 pX01 质粒)、1B 阳性(提示含炭疽杆菌 pX02 质粒),根据“炭疽杆菌毒力与其菌内特异性的 pX01、pX02 质粒相关,缺一即为弱毒或无毒株”^[1]的判定规则,可判断 1 号样本为同时含 pX01 质粒和 pX02 质粒的炭疽杆菌强毒株。而 2A 阳性(提示含炭疽杆菌 pX01 质粒),2B 阴性(提示不含炭疽杆菌 pX02 质粒),可判断 2 号样本为含 pX01 质粒,不含 pX02 质粒的炭疽杆菌弱毒株。



1 为炭疽强毒株,2 为炭疽弱毒株,3 为阴性对照(蜡状芽胞杆菌),4 为标准品阳性对照(构建质粒)

图 1 炭疽杆菌双重可视化 LAMP 检测体系

2.3 双重 LAMP 反应特异性 为测试 LAMP 方法

表 1 本研究测试优选的 LAMP 引物

引物组及名称	位置	长度 (bp)	序列 (5'-3')	靶基因
<i>PA</i> -LAMP				
B3	1126-1145	20	CGGTTATGTCCTTTCCCTTGA	炭疽杆菌 pX01 质粒的 <i>PA</i> 基因
F3	909-926	18	GGGTGGATACAGGCTCGA	
BIP	1087-1108	47	TCCTAGTGATCCATTAGAAACGACT-CGGT-	
	1027-1051		TCGTAAATCCAAATGCT	
FIP	930-949	45	CCGCCTTTCTACCAGATTTAAATCT-GGAGT-	
	988-1012		GAAGTGTTACCGCAA	
LB	1056-1079	24	CGGATATGACATTAAAAGAAGCCC	炭疽杆菌 pX02 质粒的 <i>capA</i> 基因
LF	952-973	22	GATACGTGCAGTTGTTTCTTGA	
<i>capA</i> -LAMPB3	256-276	21	CCCCTTACGTAATCTGAGTT	
F3	45-66	22	TGTAGCAATCGTATTACCTCTT	
BIP	213-235	47	CGATGACGATGGTTGGTGACATTA-	
	152-175		GACGAAAAACATAATCTGTACCG	
FIP	71-94	47	CGATGACGATGGTTGGTGACATTA-	
	112-134		GACGAAAAACATAATCTGTACCG	
LB	176-191	16	TGATGGGACGTCACGT	

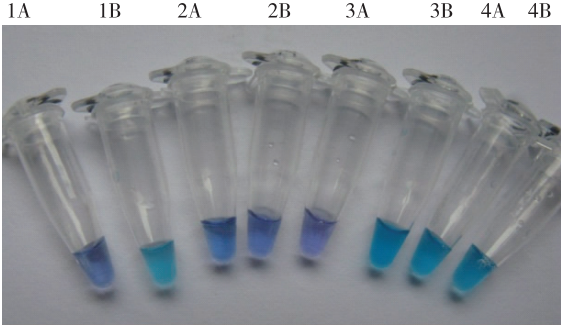
特异性,使用建立的炭疽杆菌双重 LAMP 反应体系,检测了 26 株实毒菌株,包括 11 株炭疽杆菌,9 株其它芽胞杆菌,6 株其它细菌,并使用实时荧光定量 PCR 进行复核。在检测的 11 株炭疽芽胞杆菌中,均准确鉴定出强毒株和弱毒株,在其它芽胞杆菌中和其它细菌中,均未检出任何目的片段,表明特异性良好(见表 2)。在对已知毒株检测方面,炭疽杆菌双重 LAMP 的检测结果与相应的双重实时荧光定量 PCR 检测结果一致。

2.4 LAMP 检测方法灵敏度 分别使用双重 LAMP 法、双重实时荧光定量 PCR 方法,对同一套梯度稀释的炭疽杆菌强毒株核酸(菌株编号“17003-10”)进行测试。双重 LAMP 方法对 *PA* 基因、*capA* 基因检出限均为 50 拷贝每反应,而双重实时荧光定量 PCR 方法对 *PA* 基因、*capA* 基因检出限分别为 50 拷贝每反应和 5 拷贝每反应,即荧光定量 PCR 对 *capA* 基因的检测相对较敏感些,见表 2。

2.5 模拟样本检测 本研究选择奶粉、面粉、小苏打粉、配制培养基的蛋白胨粉,作为模拟样本的白色粉末,以及土壤细粉作为环境样品,混入 50、100、200、300,直至 1000 CFU 的炭疽杆菌芽胞,使用 DNA 简易提取液^[8]提取核酸,然后进行双重 LAMP 的可视化检测,并用实时荧光定量 PCR 进行对比。检测结果如表 3 所示,在约 3 mg 混合样品(约单管抽提量)中,双重 LAMP 法对土壤细粉或面粉为模拟实际样品的检出率分别为 500 CFU、300 CFU/每管样品,而对其余模拟实际样品更为灵敏,达到 100 或 200 CFU/每管样品。实时荧光定量 PCR 对模拟

样品的检查,在同样使用简易核酸抽提法时,灵敏度相对较差,特别是对于土壤细粉的混合物,为 800-900 CFU/每管样品时。

2.6 实毒实样检测 在某次重大保障任务中,对一份“可疑白色粉末”(实毒实样的考核样本)进行现场快速检测(人员“三级防护”,检测后进行现场可疑污染区域的消杀灭以及人员自我洗消工作)。检测实验的每测试分为 A、B 两管,A 管为 *PA*-LAMP, B 管为 *capA*-LAMP。编号 1 为未知标本(即 1A 管为未知标本的 *PA*-LAMP,1B 管为该未知标本的 *capA*-LAMP),编号 2 为阴性对照,编号 3 为已知的炭疽弱毒株核酸对照,4 号为质粒标准品。30 min 内判定结果,见图 2,由颜色变化可判定该未知样品检测出炭疽杆菌 *capA* 基因(阳性),但未测出 *PA* 基因(阴性),因此判断为炭疽杆菌弱毒株或疫苗株。上报此次实战侦检的结果后,最后得到的反馈信息为正确无误。



未知样品检测 1A、1B;阴性对照检测 2A、2B;已知质控对照检测 3A、3B;阳性对照标准品检测 4A、4B;其中 A 管对应 *PA*-LAMP 检测,B 管对应 *capA*-LAMP 检测

图 2 双重可视化 LAMP 方法检测白色粉末标本

表 2 炭疽杆菌双重 LAMP 特异性测试

菌株(亚型)	菌株信息	LAMP 方法		Real time PCR	
		PA	capA	PA	capA
炭疽杆菌					
17003-10	强毒株,含 pX01 和 pX02 质粒	+	+	+	+
17003-11	强毒株,含 pX01 和 pX02 质粒	+	+	+	+
17003-19	强毒株,含 pX01 和 pX02 质粒	+	+	+	+
17003-28	强毒株,含 pX01 和 pX02 质粒	+	+	+	+
17003-32	强毒株,含 pX01 和 pX02 质粒	+	+	+	+
17003-54	强毒株,含 pX01 和 pX02 质粒	+	+	+	+
17003-42	弱毒株,含 pX01 质粒	+	-	+	-
170044	弱毒株,含 pX01 质粒	+	-	+	-
170045	弱毒株,含 pX01 质粒	+	-	+	-
170046	弱毒株,含 pX02 质粒	-	+	-	+
未编号	某考核菌株,含 pX02 质粒	-	+	-	+
蜡样芽胞杆菌					
CMCC63301	-	-	-	-	-
CMCC63303	-	-	-	-	-
CMCC63305	-	-	-	-	-
ATCC 11778	-	-	-	-	-
苏云金芽胞杆菌 ATCC10792	-	-	-	-	-
巨大芽胞杆菌 ATCC14581	-	-	-	-	-
枯草芽胞杆菌 ATCC663	-	-	-	-	-
嗜碱芽胞杆菌 ATCC BAA-125	-	-	-	-	-
鼠疫耶尔森菌	-	-	-	-	-
嗜肺军团菌	-	-	-	-	-
恶臭假单胞菌	-	-	-	-	-
铜绿假单胞菌	-	-	-	-	-
大肠杆菌 O157:H7	-	-	-	-	-
大肠杆菌 ATCC25922	-	-	-	-	-

注:“+”为检测阳性;“-”为检测阴性;LAMP 终点判定方法为 HNB 可视法;Real time PCR 的 Ct 值在 39 以内且扩增曲线呈 S 型判定为阳性

表 3 LAMP 方法检测灵敏度

每反应拷贝数	LAMP		Real time PCR(Ct)	
	PA-LAMP	capA-LAMP	PA-QPCR	capA-QPCR
5×10 ⁵ copy	+	+	24.32	20.87
5×10 ⁴ copy	+	+	27.78	24.35
5×10 ³ copy	+	+	31.17	27.68
5×10 ² copy	+	+	34.55	31.01
5×10 ¹ copy	+	+	37.91	34.32
5×10 ⁰ copy	-	-	undetectable	37.69
5×10 ⁻¹ copy	-	-	undetectable	undetectable

注:1. QPCR 的阳性判定标准为 Ct 值小于 39,且曲线呈典型的 S 型;2.双重 LAMP 的终点检测法为 HNB 可视化检测

表 4 LAMP 方法对模拟粉末标本中混入炭疽芽胞杆菌的检出限(CFU)

模拟样品	重量 (mg)	LAMP 检出限		Real time PCR 检出限	
		PA-LAMP	capA-LAMP	PA-QPCR	capA-QPCR
奶粉	3	200	200	300	200
面粉	3	300	300	400	300
小苏打粉	3	100	100	100	100
蛋白胨粉	3	200	200	300	300
土壤细粉	3	500	500	900	800

3 讨 论

我国自然疫源地分布广泛,炭疽病时有发生,严重威胁人类健康和生命安全;此外,炭疽粉末等生物恐怖已成为我国社会安全和群众健康的巨大威胁之一,其现场检测和防御一直倍受重视。快速有效的炭疽杆菌的现场检测,对炭疽疫情的预防、控制及应急反应决策中起着极其关键的作用^[9]。LAMP 法具有特异、敏感、快速及不需要特殊仪器的优点^[10],可为炭疽杆菌的核酸检测提供一个更简便、更快速、更有效的手段,尤其适用于疫情现场、野外工作、临时备勤地点及基层单位等条件相对简陋的环境,在对炭疽杆菌的现场快速检测方面,具有良好的应用前景。

本研究建立了一种能实现不开盖,无需浊度仪即能实现肉眼可视化检测,又同时能区分强毒株、弱毒株或无毒株(即可初步判定毒力)的双重环介导恒温扩增检测方法。双重 LAMP 方法通过炭疽杆菌所特有的 2 个毒力质粒,可将其与近源的蜡样芽胞杆菌等区分开来,并准确鉴定出了 26 株菌株中的炭疽杆菌强毒株、弱毒株,表明所建立的检测方法具有良好特异性。对实验室制备的标准株核酸的检测中,对 *PA* 基因、*capA* 基因检出限均为 50 拷贝每反应,比实时荧光定量 PCR(对 *PA* 基因、*capA* 基因检出限分别为 50 拷贝每反应和 5 拷贝每反应)相似或略低,对于病原检测来说,灵敏度已经足够。而炭疽杆菌的 LAMP 方法扩增时间更短,最多只需要 30 min,且只需一个普通水浴箱或者一台小型的迷你恒温金属浴,甚至是一杯开水即可,无需贵重精密的设备,对于现场应急检测更有优势^[11]。

在对于模拟现场样品的检测中,使用简易核酸抽提法时,LAMP 的检测敏感性为 100~300 CFU/管抽提量,却比实时荧光定量 PCR 具有更好的敏感性,特别是对于土壤细粉混合物等,这可能是由于 LAMP 反应的抗干扰能力更强,多数学者认为 LAMP 对于样品中原有或污染的其它无关或干扰片段不敏感,而其他核酸检测方法则无法做到这一点,甚至有人认为,LAMP 扩增使用的样品可以是未

经提纯处理的,即一定程度上可以省略核酸抽提步骤,并不影响检测的灵敏度和特异性^[12]。

本研究建立了快速检测炭疽杆菌 *PA* 基因、*capA* 基因的双重 LAMP 方法,具有快速准确、高灵敏度的特点,可提高检测速度和效率,尤其适合野外、现场检测,对于应对反生物恐怖袭击预警、突发传染病疫情或突发公共卫生事件应急处置和流行病学调查等具有一定的意义,可能为野外现场检测或基层单位应用提供更良好的平台。

【参考文献】

- [1] 中国疾病预防控制中心,全国炭疽监测方案(试行)(2005 年 7 月 26 日), <http://www.chinacdc.cn/n272442/n272530/n3479265/n3479308/31023.html>.
- [2] 谈忠鸣,张忠献,董晨,等.一起皮肤炭疽疫情中炭疽杆菌分子特征分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2015,35(3):436-438.
- [3] Zhang JH, Zhu J, Ren H, et al. Rapid visual detection of highly pathogenic streptococcus suis serotype 2 isolates by use of Loop-Mediated Isothermal Amplification [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(10): 3250-3256.
- [4] Zhang JH, Feng YJ, Hu D, et al. Rapid and sensitive detection of H7N9 avian influenza virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(11): 3760-3764.
- [5] 吕恒,钟璟浩,张锦海,等.新型布尼亚病毒环介导等温扩增可视化检测方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志,2016,11(3): 225-228.
- [6] Goto M, Honda E, Ogura A, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue [J]. Biotechniques, 2009, 46(3): 167-172.
- [7] 谭维国,陈文琦,吕恒,等.炭疽杆菌双重实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 东南国防医药, 2013, 15(6): 556-559.
- [8] 张锦海,王忠灿,王长军.用于检测炭疽杆菌的重组标准质粒、试剂盒及该质粒的构建方法[P]. ZL201110114469.4.
- [9] 刘炬,徐俊杰,陈薇.炭疽芽孢杆菌建立感染的过程及其机制[J]. 军事医学,2014(8): 651-654.
- [10] 吕恒,张锦海,顾海涛,等.肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的快速可视化检测[J]. 东南国防医药, 2013, 15(4): 321-324.
- [11] Njiru ZK. Loop-Mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics [J]. PloS Negl Trop Dis, 2012, 6(6): 692-694.
- [12] Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products [J]. Nat Protoc 2008, 3(5): 877-882

(收稿日期:2016-05-30;修回日期:2016-06-20)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)