

检测鸡蛋中沙门氏菌的 LAMP 方法的建立及初步应用

唐梦君^{1,2}, 周生², 张小燕^{1,2}, 顾荣^{1,2}, 蒲俊华^{1,2}, 葛庆联^{1,2}, 高玉时^{1,2*}

(1. 农业部家禽品质监督检验测试中心, 扬州 225003; 2. 中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225003)

摘要: 根据 GenBank 上公布的沙门氏菌 *invA* 基因序列中的保守区域, 设计一套环介导等温扩增 (LAMP) 引物, 将其用于沙门氏菌的检测, 结果成功地扩增出特异性的梯形条带。LAMP 方法检测沙门氏菌纯培养的灵敏度为 1.04×10^2 cfu·mL⁻¹, 对 11 株不同细菌进行 LAMP 检测, 仅沙门氏菌获得阳性结果。应用该方法对扬州市场上销售的鸡蛋进行沙门氏菌检测, 检测结果与传统培养方法相符合。因此, LAMP 方法检测沙门氏菌具有灵敏度高, 特异性强, 耗时短, 方法简便等特点, 有望发展成为快速检测鸡蛋中沙门氏菌的有效手段。

关键词: 沙门氏菌; 环介导等温扩增技术; 鸡蛋

中图分类号: S851.347.202

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)01-0043-05

Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Salmonella* spp.

TANG Meng-jun^{1,2}, ZHOU Sheng², ZHANG Xiao-yan^{1,2}, GU Rong^{1,2},
PU Jun-hua^{1,2}, GE Qing-lian^{1,2}, GAO Yu-shi^{1,2}

(1. Quality Inspection Center for Poultry of Ministry of Agriculture, Yangzhou 225003;

2. Poultry Insitute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225003)

Abstract: *Salmonella* spp. is an important kind of food-borne pathogenic bacteria which can cause human and animal disease. *Salmonella* *invA* gene is known as a major virulence gene. According to published *Salmonella* *invA* gene sequence in GenBank, we designed one sets of specific loop-mediated isothermal amplification primers and developed a novel and highly specific loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid detection of *Salmonella* spp. The assay correctly identified *Salmonella* spp., but did not detect 7 non-*Salmonella* spp. strains. Sensitivity of the LAMP assay for direct detection of *Salmonella* spp. in pure cultures was 1.04×10^2 cfu·mL⁻¹. The results of LAMP detection of 100 eggs were consistent with the traditional method. The LAMP assay is a sensitive, rapid and simple tool for the detection of *Salmonella* spp. and will facilitate the surveillance for control of contamination of *Salmonella* spp. in egg.

Key words: *Salmonella* spp.; Loop-mediated isothermal amplification; egg

随着近年来世界范围内的食品安全恶性事件屡屡发生, 食品污染与食源性疾病构成了一个巨大且不断扩大的世界性公共卫生问题, 直接关系到人们的身体健康和社会稳定, 并且正成为阻碍国际食品贸易发展的重要因素。在动物源性食品中, 细菌性食物中毒最为常见, 而由沙门氏菌(*Salmonella* spp.)引起的食物中毒病例在食物中毒中居于前列。在引起的沙门氏菌中毒的食品中, 约 90%是蛋、肉、奶等畜产品^[1]。因此, 建立一种快速、有效的检测方

法对动物性食品进行质量监督, 及时检测出食品中是否含有该菌是减少人类沙门氏菌食物中毒, 保护人民群众身体健康的重要措施。

目前, 沙门氏菌的检测方法主要依赖于传统的细菌分离鉴定方法, 一般需要 4~5 d, 比较费时费力。而各种 PCR 方法^[2-5]敏感、快速, 但由于需要昂贵的仪器设备、繁琐的电泳过程等缺点, 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)是一种新颖

收稿日期: 2010-06-21

基金项目: 江苏省科技创新与成果转化专项引导资金(NO.BM2009908)和国家蛋鸡产业体系(NYCYTX-41-2B)共同资助。

作者简介: 唐梦君, 女, 助理研究员。E-mail: tangmengjun1980@163.com

* 通讯作者: 高玉时, 男, 研究员。

的核酸扩增技术,其原理是针对目的基因的6个区域设计4条特异性引物,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^[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。目前已经有越来越多的相关文献报道,且研究的领域也越来越广泛和深入。至今,国内外已有较多的研究者报道采用LAMP技术检测病原微生物^[8-11]。因此,本试验以*invA*基因为靶基因建立LAMP方法检测鸡蛋中的沙门氏菌,为食品安全检测提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器设备和试剂

电热恒温水浴锅、高速冷冻离心机(HITACHI)、PCR扩增仪(eppendorf)、凝胶成像系统、恒温培养箱、电泳仪等;Bst DNA聚合酶购自New England Biolab公司;甜菜碱(Betain),购自

Sigma公司;Taq DNA酶、dNTP、DNA Marker、Hae III酶等分子生物学试剂购自大连宝生物试剂有限公司。

1.2 菌种

单增李斯特菌(GIM1.229)、金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、痢疾志贺氏菌(CMCC51252)、福氏志贺氏菌(CMCC51572)、宋氏志贺氏菌(CMCC51592)、鼠伤寒沙门氏菌(CMCC50115)、猪霍乱沙门氏菌(ATCC13312)均购自广东省微生物菌种保藏中心;副溶血性弧菌(ATCC17802)、大肠杆菌(ATCC8739)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心;鸡白痢沙门氏菌(C79-13)购自中国兽医药品监察所;肠炎沙门氏菌(50041)购自中国医学细菌保藏中心。

1.3 引物设计与合成

根据GenBank公布的沙门氏菌*invA*基因序列中的保守序列,采用引物设计软件Primer Explorer4.0进行设计,得到一套特异性的LAMP引物,包括内引物FIP、BIP和外引物F3、B3,引物序列见表1。引物委托上海生工生物技术有限公司合成。

表1 扩增*invA*基因的LAMP引物序列
Table 1 Sequence of LAMP primers for specific amplification of the *invA* gene

引物 Primer	引物序列 Sequence	位置/bp Gene location
FIP	GCATACCATCCAGAGAAAATCGGTTTT TTTATCGTTATTACCAAAGGTTTCAG	(423-445)~(376-400)
BIP	GACGGTGCATGAAGTTTATCAATTTT CCGCCAATAAAGTTCACAAAG	(559-581)~(612-632)
F3	CGTTATTGGCGATAGCCTG	315~333
B3	CTGGGCGACAAGACCATC	709~726

1.4 DNA 模版的制备

细菌基因组DNA提取方法参照文献^[12],其具体步骤如下:取一接种环的细菌培养物(约10 μL)于1.5 mL离心管中,加入50 μL NaOH(25 mmol·L⁻¹)混匀,100℃水浴10 min,加入4 μL Tris-HCl(1 mol·L⁻¹, pH8.0)进行中和,混悬液4℃20 000 g离心5 min,去沉淀,上清作为LAMP和PCR的DNA模板。

1.5 LAMP 扩增

配制LAMP反应体系25 μL,包括:10×bst buffer 2.5 μL, MgSO₄(25 mmol·L⁻¹) 4 μL、dNTP(10 mmol·L⁻¹) 4 μL、betaine(5 mol·L⁻¹) 4 μL、内引物(20 μmol·L⁻¹)各1.5 μL、外引物(10 μmol·L⁻¹)各0.5 μL、Bst DNA聚合酶大片段(8 U·L⁻¹)1 μL、DNA模板2 μL以及ddH₂O 2.5 μL。混匀,于65℃温育30 min,80℃灭活10 min中止反应。产物于2.0%琼脂糖凝

胶电泳分析,同时通过向扩增产物中加入1 μL SYBR GREEN I,观察颜色变化判断扩增与否。

1.6 LAMP 产物的酶切鉴定

取2 μL LAMP扩增产物,加入1 μL HaeIII、2 μL缓冲液及ddH₂O 15 μL,轻轻地混合后离心,在37℃酶切1 h,2.0%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.7 LAMP 方法特异性试验

以11株试验菌株的基因组DNA为模板,用建立的LAMP方法进行扩增,电泳观察扩增结果,验证方法特异性。

1.8 LAMP 方法灵敏度试验

沙门氏菌接种于新鲜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。采用稀释平板法,测定其纯培养物活菌数;同时从每稀释度菌液中取100 μL菌液离心去上清,参照1.4进行菌液处理进行LAMP扩增。

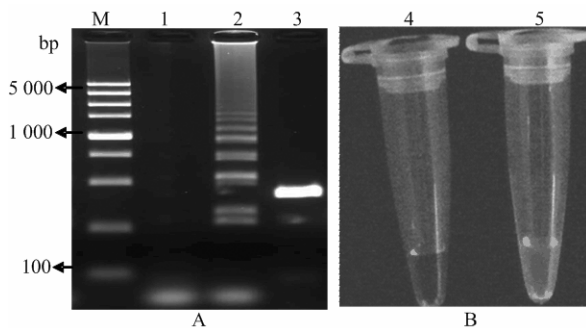
1.9 鸡蛋样品的检测

采用试验建立的 LAMP 方法对从某超市购入的 100 枚鸡蛋进行检测, 同时采用沙门氏菌国标 GB/T4789.4-2008 对样品进行检测, 两种方法进行对比, 确定 LAMP 检测鸡蛋中沙门氏菌的特异性、灵敏度。

2 结果与分析

2.1 LAMP 检测方法的建立

以设计的一套特异性引物对沙门氏菌基因组 DNA 进行 LAMP 扩增。电泳检测结果如图 1A, 沙门氏菌基因组 DNA 泳道产生阶梯状条带, 以水作为模板的阴性对照未有带出现; 另外, 向扩增产物中加入 1 μ L SYBR GREEN I, 沙门氏菌扩增产物与染料混合后颜色由橙色变为绿色, 而阴性对照仍为橙色。结果如图 1B, 结果表明此套 LAMP 引物能够有效扩增沙门氏菌 *invA* 基因。



A: LAMP 产物电泳结果; B: LAMP 产物 SYBR Green I 染色结果; M: 核酸分子量标准 DL5000; 1: 阴性对照; 2: 沙门氏菌 LAMP 扩增产物; 3: 沙门氏菌 PCR 扩增产物; 4: 阴性样品加入 SYBR GREEN I; 5: 阳性样品加入 SYBR GREEN I
A: The LAMP result of agarose electrophoresis; B: The LAMP results of visual; M: DNA Marker DL5000; lane 1: Negative control; lane 2: LAMP product of *Salmonella* spp.; lane 3: PCR product of *Salmonella* spp.; lane 4: Negative control; lane 5: LAMP product of *Salmonella* spp.

图 1 沙门氏菌标准菌株 LAMP 检测结果

Figure 1 The LAMP result of *Salmonella* spp. standard strain

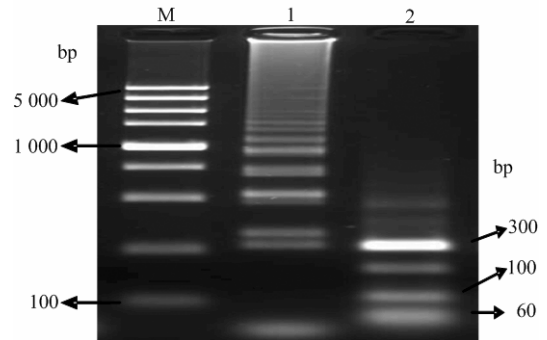
2.2 LAMP 扩增产物的酶切鉴定

图 2 显示了沙门氏菌 LAMP 扩增产物经 *Hae*III 酶切消化后的结果。理论计算, 扩增产物经内切酶 *Hae*III 消化后应为 3 条分子量约为 300、100 和 60 bp 的条带。图中结果与理论值基本相符。

2.3 LAMP 检测沙门氏菌的特异性结果

用建立的 LAMP 方法分别对 11 株试验菌株进行扩增, 特异性试验结果如图 3 所示, LAMP 法具

有高特异性, 4 株沙门氏菌得到阳性结果, 其它 7 株非沙门氏菌均为阴性。

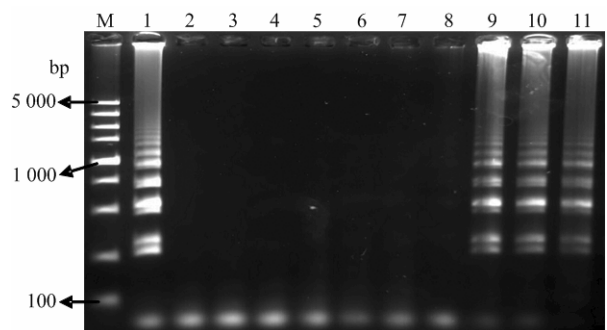


M: 核酸分子量标准 DL5000; 1: 沙门氏菌 LAMP 扩增产物; 2: 沙门氏菌 LAMP 扩增产物酶切结果

M: DNA Marker DL5000; lane 1: LAMP product of *Salmonella* spp.; lane 2: The enzyme cutting analysis result of LAMP products

图 2 LAMP 扩增产物酶切电泳结果

Figure 2 The enzyme cutting analysis result of LAMP products



M: 核酸分子量标准 DL5000; 1: 鸡白痢沙门氏菌; 2-8: 分别为单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌、痢疾志贺氏菌、福氏志贺氏菌、宋氏志贺氏菌、副溶血性弧菌、大肠杆菌的 LAMP 扩增结果; 9-11: 分别为猪霍乱沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌的 LAMP 扩增结果

M: DNA Marker DL5000; lane 1: *S. pullorum*; lane 2-8: The results of LAMP for *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *Song Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, respectively; lane 9-11: The results of LAMP for *S. Cholerae-suis*, *S. typhimurium*, *S. enterica*

图 3 LAMP 检测沙门氏菌的特异性试验

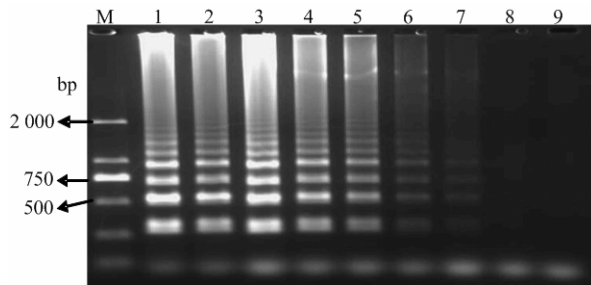
Figure 3 The specific results of LAMP for *Salmonella* spp.

2.4 LAMP 检测沙门氏菌的灵敏度结果

经平板计数, 原始菌液浓度为 1.04×10^9 cfu·mL⁻¹。10 倍倍比稀释菌液进行检测, 结果显示, LAMP 法细菌纯培养物检测限约为 1.04×10^2 cfu·mL⁻¹ (图 4)。

2.5 对鸡蛋样品的检测结果

对某超市购入的 100 枚鸡蛋进行检测。结果表明鸡蛋内容物 LAMP 和国标 GB/T4789.4-2008 均未检测出沙门氏菌。



M: 核酸分子量标准 DL2000; 1-9: 分别为细菌浓度分别为 1.04×10^8 、 1.04×10^7 、 1.04×10^6 、 1.04×10^5 、 1.04×10^4 、 1.04×10^3 、 1.04×10^2 、 1.04×10^1 和 1.04×10^0 $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LAMP 反应结果
M: DNA marker DL2000; lane1-9: The results of LAMP for 1.04×10^8 、 1.04×10^7 、 1.04×10^6 、 1.04×10^5 、 1.04×10^4 、 1.04×10^3 、 1.04×10^2 、 1.04×10^1 and 1.04×10^0 $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively

图 4 LAMP 检测沙门氏菌的灵敏度

Figure 4 The sensitive of LAMP detection for *Salmonella* spp.

3 讨论

沙门氏菌是近期最流行的食源性病原菌，对儿童、体弱者、老人或免疫系统较弱的人产生十分严重甚至致命的危害。感染沙门氏菌后会导致病原体进入血液，引起动脉疾病、心内膜炎、关节炎等疾病。鸡蛋富含人体所需的优良蛋白质和丰富的氨基酸、矿物质、维生素等营养物质，一直是广大消费者喜爱的质优价廉的产品。而报道很多感染沙门氏菌病例都是由于鸡蛋引起。其主要原因是鸡体健康状况较差时，沙门氏菌等病原微生物将通过卵巢污染鸡蛋，鸡蛋产出时将通过鸡泄殖腔，鸡蛋外表或内容物不可避免地会污染有粪便细菌或致病菌。因此，鸡蛋的质量安全问题已经引起世界各国的广泛关注。在 31 个国家的食品微生物限量标准中，已有 18 个国家规定鸡蛋中不得检出沙门氏菌。沙门氏菌的基因序列分析表明，该菌属的不同沙门氏菌株的 *invA* 基因核苷酸序列存在较高同源性^[13]，是与其毒力及其侵袭作用相关的高度保守的一段序列，可作为基因检测和鉴定的依据^[14-15]，因此，本研究选择与动物医学、公共卫生及食品安全有密切关系的鸡白痢沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌为研究对象，对其 *invA* 基因进行 LAMP 扩增，均得到了阳性结果，而非沙门氏菌属类则为阴性结果，因此该方法具有良好的特

异性。

本研究利用沙门氏菌 *invA* 基因序列设计了一套 LAMP 引物，建立了鸡蛋中沙门氏菌检测的 LAMP 方法。试验表明本文所建立的 LAMP 方法不仅特异性强，而且灵敏度高，可达到 1.04×10^2 $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，这一结果与文献报道^[12,16]的检测限基本相符。LAMP 的扩增效率超强，产物量巨大，扩增产物在开盖后很容易形成气溶胶污染工作台面等地方，使得 LAMP 及其容易污染，假阳性率会很高而且难于去除，因此 LAMP 最终的应用方向应该是不开盖的检测。而本研究应用 LAMP 方法检测从市场上采集回来的 100 枚鸡蛋内容物未检出沙门氏菌，提示沙门氏菌在扬州市鸡蛋中污染率较低。

综上所述，本研究建立的沙门氏菌 LAMP 检测方法具有特异性强、灵敏度高、方便快捷、成本低等特点，为沙门氏菌的检测提供了新的发展方向，有望成为简易的常规检测手段。

参考文献:

- [1] Riemann H, Himathongkham S, Willoughby D, et al. A survey for Salmonella by drag swabbing manure piles in California egg ranches[J]. Avian Dis, 1998, 42(1): 67-71.
- [2] O'Regan E, McCabe E, Burgess C, et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple Salmonella serotypes in chicken samples[J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 156.
- [3] Park H J, Kim H J, Park S H, et al. Direct and quantitative analysis of Salmonella enterica serovar Typhimurium using real-time PCR from artificially contaminated chicken meat[J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(8): 1453-1458.
- [4] Nath G, Maurya P, Gulati A K. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of Salmonella Typhi strains isolated over a period of two decades[J]. Infect Genet Evol, 2010, 10(4): 530-536.
- [5] Chen J, Zhang L, Paoli G C, et al. A real-time PCR method for the detection of Salmonella enterica from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis[J]. Int J Food Microbiol, 2010, 137(2/3): 168-174.
- [6] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [7] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template[J]. Clin Chem, 2001, 47(9): 1742-1743.
- [8] Thekisoe O M, Omolo J D, Swai E S, et al. Preliminary application and evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of bovine theileriosis and trypanosomosis in Tanzania[J]. Onderstepoort J Vet Res, 2007, 74(4): 339-342.
- [9] Ji J, Du L Q, Xie Q M, et al. Rapid diagnosis of duck plagues virus infection by loop-mediated isothermal am-

- plification[J]. Res Vet Sci, 2009, 87(1): 53-58.
- [10] Zhang Q, Shi C, Huang J, et al. Rapid diagnosis of turbot reddish body iridovirus in turbot using the loop-mediated isothermal amplification method[J]. J Virol Methods, 2009, 158(1/2): 18-23.
- [11] Li Y, Jiang M, Liu W, et al. Loop-mediated isothermal amplification method targets to the *phoP* gene for detection of *Yersinia enterocolitica*[J]. Mol Cell Probes, 2010, 24(2): 68-71.
- [12] Yamazaki W, Taguchi M, Ishibashi M, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*[J]. J Med Microbiol, 2008, 57(Pt 4): 444-451.
- [13] 陈金顶, 索青利, 廖明, 等. 沙门氏菌的 *invA* 基因序列分析与分子检测[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(10): 868-871.
- [14] Darwin K H, Miller V L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa[J]. Clin Microbiol Rev, 1999, 12(3): 405-428.
- [15] 刘艳环, 苗利光, 刘晓颖, 等. 沙门氏菌入侵因子基因保守序列的克隆与分析[J]. 特产研究, 2005, 27(4): 1-3.
- [16] Yamazaki W, Ishibashi M, Kawahara R, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 163.
- [13] 陈金顶, 索青利, 廖明, 等. 沙门氏菌的 *invA* 基因序列

本刊顾问 李家洋院士

李家洋, 植物分子遗传学家, 中国科学院院士, 研究员。1956年7月出生于安徽肥西。1982年毕业于安徽农学院(现安徽农业大学), 1991年获美国布兰代斯(Brandeis)大学博士学位, 1991-1994年在美国康乃尔大学汤普逊(Boyce Thompson)植物研究所进行博士后研究工作。历任中国科学院遗传研究所所长助理、所长, 遗传与发育生物学研究所所长。

李家洋主要从事植物分子遗传学研究, 他利用模式植物拟南芥与重要粮食作物水稻探索植物生长发育的调控机理。近年来的主要研究工作包括: 采用图位法克隆了水稻分蘖控制基因 *MOC1*, 开拓了水稻分蘖控制分子机理研究的新领域; 利用水稻脆秆突变体分离了 *BC1* 基因, 阐述了水稻机械强度的控制机理; 通过获得的拟南芥胆碱生物合成突变体, 初步明确了胆碱合成与植物温度敏感雄性不育性的关系; 通过图位克隆法分离出导致细胞死亡的基因 *MOD1*, 明确了初级代谢途径的缺陷会导致植物细胞凋亡; 利用转基因技术, 创制出色氨酸与吲哚乙酸合成量改变的转基因植物, 从而提出植物生长素吲哚乙酸生物合成途径的新模式; 建立了一种简易的基因芯片体系, 鉴定出一批油菜素内酯的应答基因, 并证实了油菜素内酯对植物细胞分裂的促进作用; 发展了系统鉴定植物功能基因的植物表达文库转化法, 分离出一批株型与育性等生长发育性状改变的拟南芥突变体, 克隆了相关的基因。

自1999年担任遗传研究所所长以来, 通过加强与所领导班子成员团结、积极引进和培养优秀科研人才、强化规章制度建设与行政管理工作的公开公平公正、创造出一种宽松和谐与人人奋发进取的科研环境, 促进了研究所的迅速发展。

2004年1月, 李家洋任中国科学院副院长、党组成员。