

不同加热方式对嗜肺军团菌环介导等温扩增检测法的影响 *

吕沁风 吴忠华 郑伟 徐琦 孟军 李禾

(浙江国际旅行卫生保健中心 江苏 杭州 310003)

摘要 目的:研究不同的加热方式对嗜肺军团菌环介导等温扩增检测法的影响 **方法:**用已知的 13 株嗜肺军团菌样本,采用空气浴、水浴和 PCR 仪同时进行环介导等温扩增,观察沉淀反应、荧光反应以及产物电泳结果。**结果:**水浴和 PCR 仪加热 LAMP 反应的沉淀产物较多,荧光反应较强,电泳检测结果较为明显。空气浴的 3 种检测结果均较弱。**结论:**采用水浴和 PCR 仪进行环介导等温扩增反应的效果较好,从仪器设备的成本及实验条件考虑,采用水浴是环介导等温扩增反应首选的加热方式。

关键词:环介导等温检测;加热方式;嗜肺军团菌;水浴

中图分类号:R446, R372 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-6273(2011)03-493-04

Effect of Different Heating Methods on Legionella Pneumophila Loop-mediated Isothermal Amplification Detection*

LU Qing-feng, WU Zhong-hua, ZHENG Wei, XU Qi, MENG Jun, LI He

(Zhejiang international travel health centre, Hangzhou, Jiangsu 310003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of the three heating methods on loop-mediated isothermal amplification(LAMP) detection of Legionella pneumophila.. **Methods:** DNA of 13 strains of Legionella pneumophila were amplified by LAMP based on air bath, water bath, and PCR instrument. The results were observed by precipitation, fluorescent reaction and electrophoresis. **Results:** The product of LAMP based on water-bath-heating method and PCR-instrument-heating presented more obvious precipitation, stronger fluorescence reaction, lighter gel electrophoresis. However, the air-bath-heating method showed much more weak results. **Conclusion:** The LAMP amplifications performed by water-bath-heating and PCR-instrument-heating, water bath heating were more economical choice for LAMP. Considering the cost of equipment and experimental conditions, water-bath was the preferred heating method.

Key words: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP); Heating method; Legionella pneumophila; Water bath

Chinese Library Classification(CLC): R446, R372 **Document code:** B

Article ID:1673-6273(2011)03-493-04

前言

LAMP(loop-mediated isothermal amplification)是一种崭新的核酸扩增技术,是当前分子生物学的研究热点,Notom T 等在 2000 年建立了这种体外扩增特异核酸片段的分子生物学技术^[1,2],其原理是针对靶基因序列设计一对内引物和一对外引物,在 Bst DNA 聚合酶的作用下高效扩增目的片段,1 小时左右即可完成,其产物是由多重复靶序列的茎环状 DNA 和花椰菜状 DNA 所组成的混合物。该方法具有很高特异性和灵敏度,操作也十分简便。目前 LAMP 技术发展迅速,并已广泛应用于食品安全,传染病检测,疾病诊断等^[3-8],而研究 LAMP 检测法最适宜的加热方式并使其适合现场检测操作,并快速获得检测结果,具有十分重要的现实意义。本文以革兰氏阴性条件致病菌 - 嗜肺军团菌为例,研究水浴、PCR 仪及空气浴对环介导等温检测法的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 ATCC33152, ATCC33154 嗜肺军团菌标准株购自上海宝录生物科技有限公司,11 株环境分离嗜肺军团菌为下城区疾病预防控制中心惠赠。

1.1.2 试剂 TIANGEN 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自上海位点生物技术有限公司,BCYE 培养基购自英国 OXOID 公司,BstDNA 聚合酶、MgSO₄、dNTP 以及引物购自上海生工生物工程有限公司。甜菜碱购自 sigma 公司,SYBR Green I 购自 Invitrogen 公司。核酸电泳分子量标准 DL2000 购于北京美莱博医学科技有限公司,琼脂糖购自西班牙 Biowest 公司。

1.1.3 仪器 2720 型 PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司,DK600 水浴锅和电热恒温培养箱购自上海申贤恒温设备厂。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 genbank 公布的嗜肺军团菌 mip 基因序列 (NC_002942),用 Primer Explorer IV 软件分析设计一套引物 (F3,B3,FIP,BIP),分别是前外引物 B3、后外引物 F3、前内引物 FIP、后内引物 BIP,其中 FIP 是由 F1C 的互补序列和 F2 序列

* 基金项目:浙江出入境检验检疫局科技计划项目(ZK2008012)

△通讯作者:吕沁风(1981-),女,硕士,主管技师,从事传染病检测工作。

电话:0571-87850075, E-mail:lqf@zjq.gov.cn

(收稿日期:2010-11-06 接受日期:2010-11-30)

组成,BIP 是由 B1C 序列和 B2 的互补序列组成,见图 1 和表 1。



图 1 嗜肺军团菌 mip 基因的引物设计

Fig1 the primers design for the mip gene of Legionella pneumophila

表 1 LAMP 引物

Table1 LAMP primers

Primer	Sequence(5'to3')
F3	AGATGAAATTGGTGACTGCAG
B3	AGAACGTCTTTCATTTGCTGTT
FIP	TCCCCAAATCGGCACCAATGTTT CTGTTATGGGGCT TGCAATG
BIP	CCGGAAGCAATGGCTAAAGGCTTTTGTTAAAGCCAA TTAGCGC

1.2.2 DNA 模板制备 采用 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒,按说明书操作。

1.2.3 LAMP 扩增反应 LAMP 反应体系为 25 μ l, 组分包括

10 $\times$ buffer 2.5 μ l,引物混合物 1 μ l(体系中引物终浓度分别如下:F3、B3 各 0.2 μ mol/L,FIP、BIP 各 0.75 μ mol/L), 模板 DNA1 μ l,8U BstDNA 聚合酶 1 μ l,Mg²⁺(100 mM)1.2 μ l, dNTP Mix(10 mM)2 μ l, 甜菜碱(8 M)2 μ l,ddH₂O 7.2 μ l。每个样品并阴性对照做 3 个重复,分别放置于 PCR 仪、电热恒温培养箱和循环水浴锅中(其中,电热恒温培养箱和循环水浴锅提前预热至 60 $^{\circ}$ C)60 $^{\circ}$ C 反应 60min。

1.2.4 结果判断 LAMP 反应结束后,通过沉淀反应、荧光反应以及电泳判断实验结果。

(1) 沉淀反应 将反应后的 PCR 管放置于小离心机(6000 rpm)中,离心 5 min,观察副产物焦磷酸镁沉淀并照相。

(2) 荧光反应 反应结束后在每管中加入 1 μ l 的 1/300 稀释的 SYBR Green I 并震荡离心,放置于凝胶成像系统中拍照。

(3) 电泳结果 取扩增产物各 6 μ l,DL2000 分子量标准 6 μ l/泳道。1.5 %琼脂糖凝胶 80V 电压下电泳 26min。用凝胶紫外分析仪观察。

2 结果

2.1 沉淀反应

LAMP 反应过程中会产生大量的副产物焦磷酸镁白色沉淀,根据图 2、图 3、图 4 可以看出,3 种不同的加热方式环境分离株和标准株反应后均产生白生沉淀,其中水浴和 PCR 仪产生的沉淀较多,空气浴产生的沉淀较少。由于水浴和 PCR 仪加热传导性较好,受热比较均匀,反应产物量比较大,空气浴导热不稳定,孵箱内不同位置温度差异较大,反应产量较小。

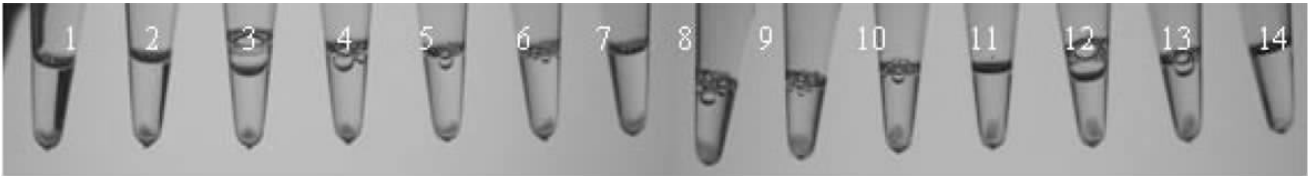


图 2 PCR 仪中 LAMP 反应沉淀图:1-11 为环境分离的嗜肺军团菌,12 为标准株 ATCC33152,13 为标准株 ATCC33154,14 为阴性对照
Fig2 LAMP precipitation of PCR-instrument-heating:1-11 Legionella pneumophila from environment, 12 ATCC33152, 13 ATCC33154, 14 negative control

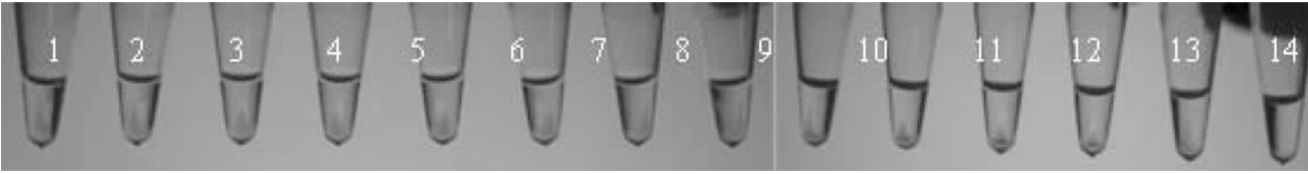


图 3 水浴中 LAMP 反应沉淀图:1-11 为环境分离的嗜肺军团菌,12 为标准株 ATCC33152,13 为标准株 ATCC33154,14 为阴性对照
Fig3 LAMP precipitation of water-bath-heating:1-11 Legionella pneumophila from environment, 12 ATCC33152, 13 ATCC33154, 14 negative control

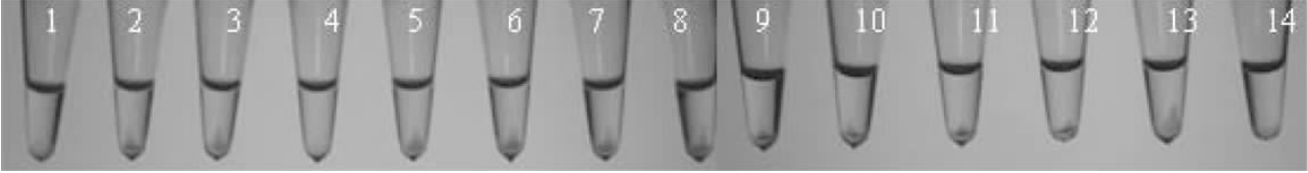


图 4 空气浴中 LAMP 反应沉淀图:1-11 为环境分离的嗜肺军团菌,12 为标准株 ATCC33152,13 为标准株 ATCC33154,14 为阴性对照
Fig4 LAMP precipitation of air-bath-heating:1-11 Legionella pneumophila from environment, 12 ATCC33152, 13 ATCC33154, 14 negative control

2.2 荧光反应

加入荧光染料后,染料嵌入入产物 DNA 双链中的小沟,发

出强烈的荧光。如图 5、图 6、图 7 所见,水浴和 PCR 仪的产物荧光较强,空气浴中最弱。

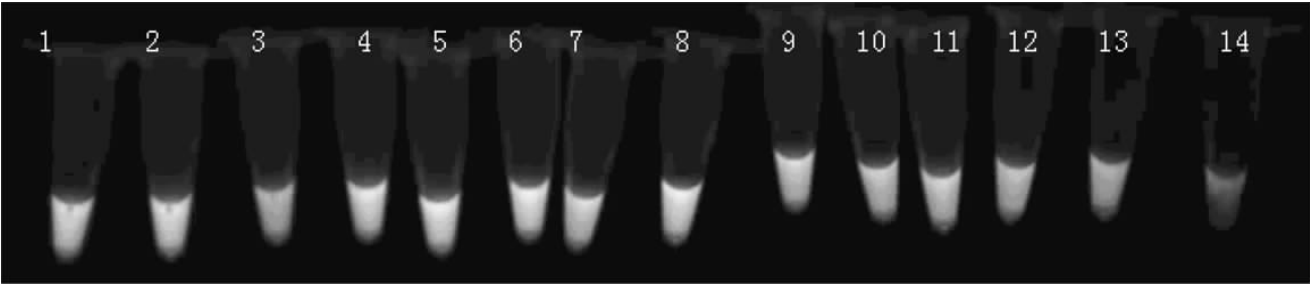


图 5 PCR 仪中 LAMP 反应荧光图:1-11 为环境分离的嗜肺军团菌,12 为标准株 ATCC33152,13 为标准株 ATCC33154,14 为阴性对照
Fig5 LAMP fluorescent reaction of PCR-instrument-heating:1-11 Legionella pneumophila from environment, 12 ATCC33152, 13 ATCC33154, 14 negative control

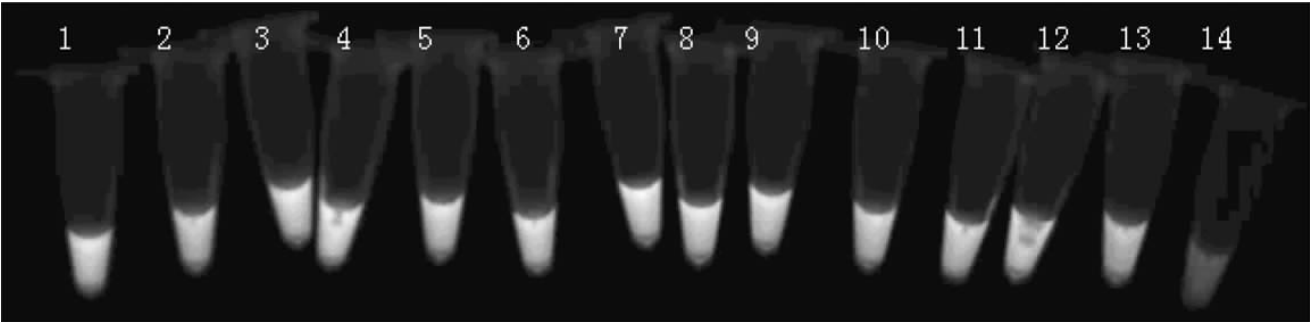


图 6 水浴中 LAMP 反应荧光图: 1-11 为环境分离的嗜肺军团菌,12 为标准株 ATCC33152,13 为标准株 ATCC33154,14 为阴性对照
Fig6 LAMP fluorescent reaction of water-bath-heating:1-11 Legionella pneumophila from environment, 12 ATCC33152, 13 ATCC33154, 14 negative control

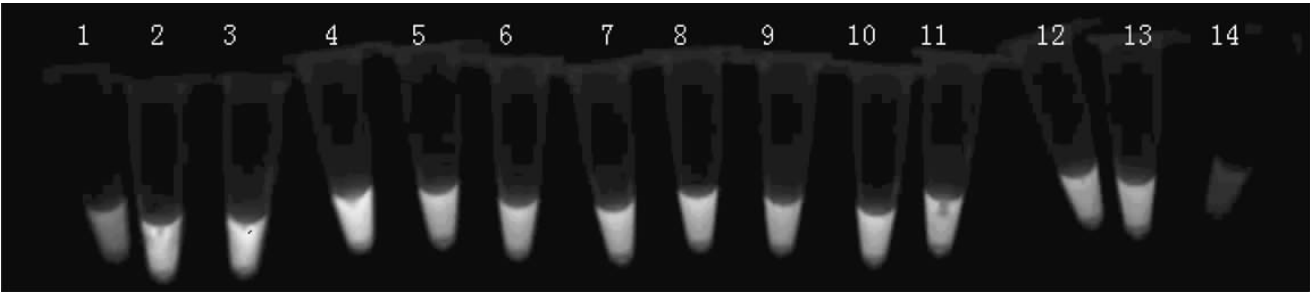


图 7 空气浴中 LAMP 反应荧光图:1-11 为环境分离的嗜肺军团菌,12 为标准株 ATCC33152,13 为标准株 ATCC33154,14 为阴性对照
Fig7 LAMP fluorescent reaction of air-bath-heating:1-11 Legionella pneumophila from environment, 12 ATCC33152, 13 ATCC33154, 14 negative control

2.3 电泳结果

图 8、图 9、图 10 可见嗜肺军团菌环介导等温扩增检测的产物与以上两种观察结果的方式对比基本一致,水浴和 PCR

仪的加热效果稳定,反应的产物较多,空气浴加热温度波动较大,产物较少。

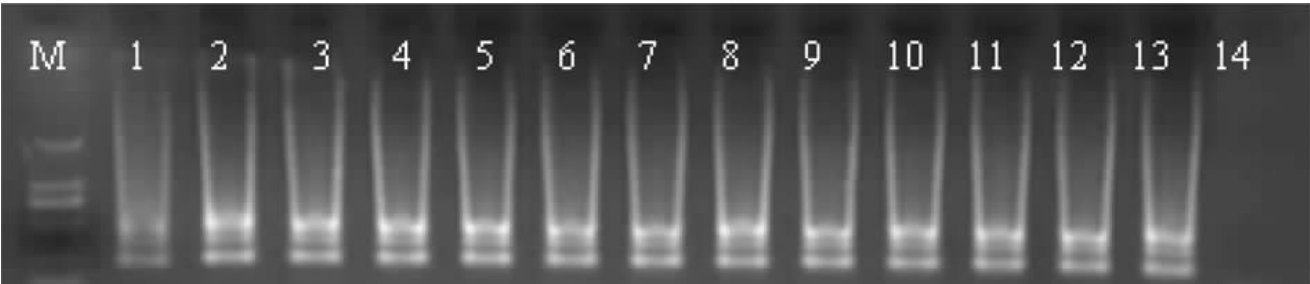


图 8 PCR 仪中 LAMP 反应电泳图:1-11 为环境分离的嗜肺军团菌,12 为标准株 ATCC33152,13 为标准株 ATCC33154,14 为阴性对照
Fig8 LAMP electrophoresis of PCR-instrument-heating:1-11 Legionella pneumophila from environment, 12 ATCC33152, 13 ATCC33154, 14 negative control

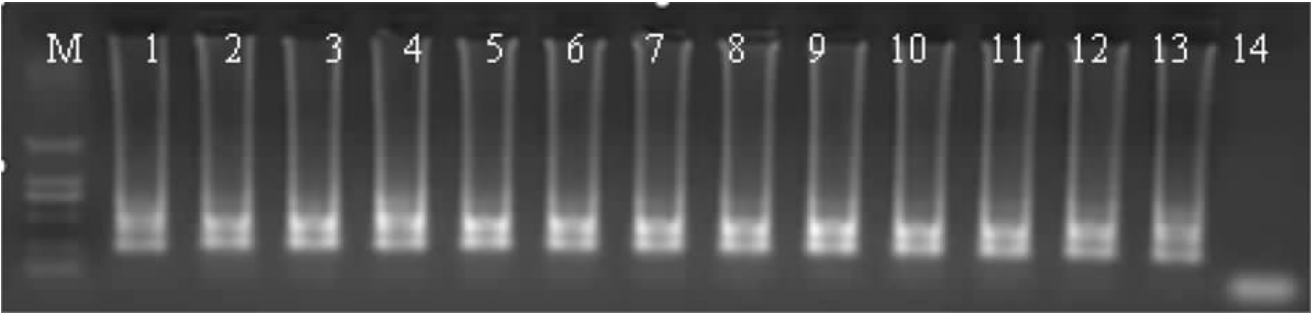


图9 水浴中 LAMP 反应电泳图:1—11 为环境分离的嗜肺军团菌,12 为标准株 ATCC33152,13 为标准株 ATCC33154,14 为阴性对照
Fig9 LAMP electrophoresis of water-bath-heating: 1-11 Legionella pneumophila from environment, 12 ATCC33152, 13 ATCC33154, 14 negative control

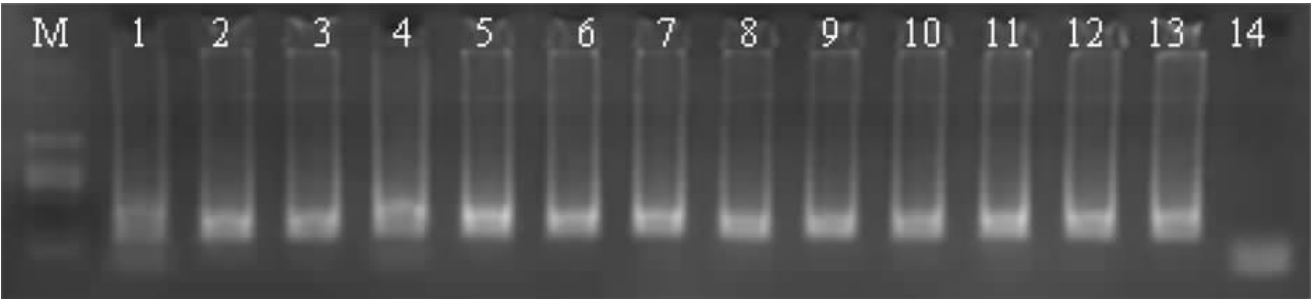


图10 空气浴中 LAMP 反应电泳图:1—11 为环境分离的嗜肺军团菌,12 为标准株 ATCC33152,13 为标准株 ATCC33154,14 为阴性对照
Fig10 LAMP electrophoresis of air-bath-heating: 1-11 Legionella pneumophila from environment, 12 ATCC33152, 13 ATCC33154, 14 negative control

3 讨论

LAMP 技术作为一种新近发展的分子生物学检测技术,有别于普通 PCR 技术,它省略了传统 PCR 方法变性、退火、延伸的过程,因此无需特殊的分子生物学仪器设备和严格的实验条件,在简易的环境中即可实现快速检测,同时操作简便,成本低廉,大大节约了反应时间,特别适用于现场检测,为基层小型实验室、出入境口岸等机构提供了一种新型的核酸检测技术。

目前 LAMP 技术的研究多数停留在实验室阶段,研究摸索适宜 LAMP 反应的反应条件具有重要现实意义。选择合适的加热方式对扩增效率以及反应时间都具有重要的影响。本试验以 LAMP 技术检测嗜肺军团菌为例,用水浴、空气浴和 PCR 仪进行 LAMP 反应,根据嗜肺军团菌 LAMP 检测的沉淀反应,荧光反应及电泳结果观察产物的量。从沉淀反应结果可以看出,在 PCR 仪和水浴中,LAMP 的扩增的产物量较大,而在相同的时间内空气浴的 LAMP 的扩增效果会差一些,特别是当模板量低时,从沉淀反应中很难判断出 LAMP 是不是有扩增。所以,当在空气浴中做 LAMP 反应时,建议适当延长反应时间。从荧光反应的图片可以看出,包括阴性对照在内,所有反应管都会发出荧光,只是荧光的强弱相对较大的差别。分析其原因可能为 LAMP 的反应体系中引物的浓度较高,故而反应体系存在一定的本底荧光干扰。因此不建议把荧光检测作为判断反应结果的单一方法。不同的反应方法所得到的电泳图的产物特点有所不同:PCR 仪中的 LAMP 反应产物量大,且片段集中的中下部;空气浴中的产物相对较少,且有大片段的产物,中间

片段比较均匀;水浴中的产物特点和空气浴较为相似,但扩增产物较多。综上所述,水浴进行 LAMP 反应成本低,反应产物量大,容易鉴定。但由于 PCR 管的管盖处可能接触到水,有造成相互间污染的风险,故实际操作中应注意不要让管盖接触到水面。

本实验研究发现在相同的时间内水浴和 PCR 仪加热的实验结果较为理想,空气浴的实验产物较少。水浴加热反应管受热比较均匀,热传导性较好,对实验影响最小,空气浴导热不够稳定,有可能对核酸模板含量较低的样本扩增产生影响,应适当增加扩增时间。查阅文献,目前国内外 LAMP 技术尚未有不同加热方式的比较。基于本研究实验结果并结合成本考虑,水浴是最为经济实用的 LAMP 反应加热方式,且效果较好,适用于基层实验室、口岸现场等检测。

参考文献(References)

[1] Notom T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000,28(12):E63
[2] Nagamine K, Hase T, Notomi T, et al. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [J]. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16:223-229
[3] 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
Xu Qian, Sun Xiao-hon g, Zhao Yong, et al. Development o f Loopmediated Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) Method for Detection of Vibrio para haemolyticus [J]. China Biotechnology, 2007, 27(12): 66-72 (下转第 501 页)

- 物干预的影响[J].中华内科杂志,2000,39(8):556-557
- Song yi-ping, Cui De-jian, Mao-peiyang, et al. The established of Rat model of chronic obstructive pulmonary disease and the intervention of drugs[J]. Journal of Internal Medicine, 2000,39,(8):556-557
- [6] 陈红梅,罗百灵,屈满英,等.红霉素对慢性阻塞性肺疾病大鼠基质金属蛋白酶-9的影响.中华结核与呼吸杂志,2008,31(9):352-355
- Chen hong-mei, Luo bai-ling, Qu man-ying, et al. The impact of Erythromycin on matrix metalloproteinases -9 in chronic obstructive pulmonary disease rats, Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2008,31(9): 352-355
- [7] Chen Y, Zhao J, Li D, Lu H, Wan X, Peng X, Lei S, Zhou D. Study of the function of leukocyte adhesion molecules in chronic respiratory diseases[J]. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2002 Feb;25(2):94-7
- [8] Grzelewska-Rzymowska I, Pietrkowicz M. Role of intra cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and its soluble form (sICAM) in chronic airway inflammation, [J], Pol Merkur Lekarski. 2004 Feb;16 (92): 179-82
- [9] Lagente V, Manoury B, Né nan S, etc. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling[J]. Braz J Med Biol Res. 2005 Oct;38(10):1521-30. Epub 2005 Sep 6
- [10] Beeh KM, Beier J, Kornmann O, et al. Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. [J]. Respir Med, 2003,97(6): 634-639
- [11] 施焕中,慢性阻塞性肺疾病.初版.北京:人民卫生出版社,2006.129
- Shi huan-zhong, Chronic obstructive pulmonary disease., First edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006,129
- [12] Ghislain Opdenakker, Philippe E, Van den Steen, et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology [J]. Leukoc Biol, 2001,69(6):851-859
- [13] Birrell MA, Wong S, Dekkarak A, et al. Role of matrix metalloproteinases in the inflammatory response in human airway cell-based assays and in rodent models of airway disease. [J]. Pharmacol Exp Ther, 2006 Aug;318(2):741-50

(上接第 496 页)

- [4] Mori Y, M Kitao, N Tomita, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA [J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2004, 59(2): 145-157
- [5] Suzuki R, T Yoshikawa, M Ihira, et al. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA [J]. Journal of Virological Methods, 2006, 132: 216-221
- [6] 胡连霞,张伟,张先舟,等.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[J].微生物学报[J]. 2009, 49(3):378-382
- Hu Lian-xia, Zhang Wei, Zhang Xian-zhou, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Enterobacter sakazakii in powdered infant formula [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009,49(3):378-382
- [7] 匡燕云,李思光,罗玉萍.环介导等温扩增核酸技术及其应用[J].微生物学通报, 2007,34(3):557-560
- Kuang Yan-yun, Li Si-guang, Luo Yu-ping. Loop-mediated isothermal amplification Method for Detection of Nucleic Acids and its Application [J]. Microbiology, 2007,34(3):557-560
- [8] 吕沁风,郑伟,罗鹏,等.嗜肺军团菌环介导等温扩增检测法的建立[J]浙江大学学报医学版, 2010,39(3): 305-310
- Lv Qin-feng, Zheng Wei, Luo Peng et al, Establishment of loop-mediated isothermal amplification method for detection of Legionella pneumophila [J]. Journal of zhejiang university (medical sciences, 2010,39(3): 305-310