

一种检测 溶血性链球菌的荧光环介导等温扩增方法的建立

周 勇^{1,2*}, 周臣清^{1,2}, 张 娟^{1,2}, 赵 玲^{1,2}, 黄宝莹^{1,2}, 杨纯佳^{1,2}, 余之蕴^{1,2}

(1. 广东产品质量监督检验研究院, 佛山 528300; 2. 广东省食品生物危害因素监测工程技术研究中心, 佛山 528300)

摘要: **目的** 建立荧光环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法用于 β 溶血性链球菌的快速检测。**方法** 针对 β 溶血性链球菌 $spy1258$ 基因设计4对特异性引物,对建立的LAMP体系优化其反应扩增条件,对该方法特异性和灵敏度评价,并将该方法和国标法分别应用于10份牛奶样品的检测。**结果** 该方法特异性强,内外引物比为3:1,反应温度为63℃时达到最佳反应条件,检测灵敏度达100 fg/ μ L,检出限低至9.8 CFU/mL,且10种样品的LAMP法与传统国标法检测结果一致。**结论** 本研究建立的荧光LAMP法具有快速、直观、灵敏度高和特异性强等优点,可应用于食品 β 溶血性链球菌的初步筛选。**关键词:** β 溶血性链球菌; 环介导等温扩增法; 荧光

Establishment of a fluorescent loop-mediated isothermal amplification method for detection of β *Streptococcus hemolyticus*

ZHOU Yong^{1,2*}, ZHOU Chen-Qing^{1,2}, ZHANG Juan^{1,2}, ZHAO Ling^{1,2}, HUANG Bao-Ying^{1,2}, YANG Chun-Jia^{1,2}, SHE Zhi-Yun^{1,2}

(1. Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China; 2. Guangdong Engineering Technology Research Center for Food Biohazard Monitoring, Foshan 528300, China)

ABSTRACT: Objective To develop a fluorescent loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for the detection of β *Streptococcus hemolyticus*. **Methods** Four pairs of specific primers were designed for $spy1258$ gene of β *Streptococcus hemolyticus*. The amplification conditions of LAMP system were optimized, and the specificity and sensitivity of the method were evaluated. At the same time, this method and the traditional national standard method were used to detect 10 kinds of milk powder samples. **Results** The method was specific and intuitive, the best reaction conditions were obtained when the ratio of inner and outer primers was 3:1 and the reaction temperature was 63 °C, the sensitivity of the method could reach 100 fg/ μ L, the detection limit was as low as 9.8 CFU/mL, and the results of LAMP method were consistent with those of traditional national standard method for 10 kinds of milk samples. **Conclusion** The fluorescent LAMP method established in this study is rapid, intuitive, sensitive and specific, and can be used for the preliminary screening of β *Streptococcus hemolyticus* in food.

KEY WORDS: β *Streptococcus hemolyticus*; loop-mediated isothermal amplification; fluorescent

基金项目: 广州市科技计划项目(201804010244、201904010102)

Fund: Supported by the Guangzhou Science and Technology Project (201804010244, 201904010102)

*通信作者: 周勇, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与质量分析。E-mail: 413788082@qq.com

*Corresponding author: ZHOU Yong, Master, Engineer, Guangdong Product Quality Supervision and Inspection Institute, No.1, Desheng East Road, Shunde District, Foshan 528300, China. E-mail: 413788082@qq.com

0 引言

β 溶血性链球菌(*Streptococcus hemolyticus*, BHS)在自然界分布广泛, 在水、尘埃、动物体表、口腔黏膜、消化道、乳汁中等都有存在, 具有较强的致病性, 具有多种致病因子(如 M 蛋白、外毒素、溶血素等), 可导致咽炎、呼吸道感染、皮肤感染、关节炎、脑膜炎等疾病, 产毒素菌株还可引起猩红热、严重时还可导致患者休克^[1-4]。

快速检测和鉴定食品中的病原菌是有效预防病原菌传播和食物中毒的重要前提。用于鉴定 β 溶血性链球菌的主要基因靶点包括 *spy1258*、*dnaseB*、*speB* 和 *sof* 基因^[5-7], 后 3 种为强毒力因子编码基因。*sof* 基因为血清不透明度因子编码基因, 仅在 40%~50% 的 A 族链球菌中表达; *DnaseB* 基因的特异性不是很高, 因为除了化脓性链球菌外, 它在 BHS 中的表达量较低; *SpeB* 基因是一种染色体编码的结构基因, 几乎存在于所有 A 族链球菌中^[8]。*Spy1258* 是一个假定的转录调节基因, 对 β 溶血性链球菌具有特异性, 可能参与物种特异性的维持或适应^[5,9-10]。最近, 许多研究使用这几类特殊的基因从各种临床样本中快速检测 β 溶血性链球菌。LANGLOIS 等^[8]比较了 *spy1258* PCR 和 *dnaseB* PCR 与常规检测的敏感性和特异性, *spy1258* PCR 的敏感性和特异性为 100%。另一项研究报告指出, *spy1258* qPCR 直接从咽拭子中检测 β 溶血性链球菌的敏感性比 *speB* qPCR 低, 这可能是由于 PCR 出现了内部抑制^[11], 而荧光环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测 β 溶血性链球菌尚无人建立。LAMP 技术作为一种近年来发展起来的快速检测技术, 具有耗时少、灵敏度高、特异性强、操作简单, 对设备要求简单等优势, 可以为病原菌的快速检测及食品安全的保障提供有力的支持^[12-15]。LAMP 的结果判定一般有以下方法: 浊度法-焦磷酸镁的浊度检测、电泳法、颜色反应、实时荧光法等^[16]。实时荧光法是一种新兴的利用荧光染料只与双链 DNA 结合, 发出较原先强 800~1000 倍荧光的原理, 通过体系内荧光信号强度与生成双链 DNA 分子的数量之间的关系对反应的起始拷贝数进行定量^[17-18], 该方法比实时浊度监测更加灵敏, 判读产物的时间更快, 能够进一步体现 RT-LAMP 的优势。本研究旨在针对转录调节基因 *spy1258* 建立 β 溶血性链球菌的特异荧光 LAMP 法, 以便实现对食品中溶血性链球菌的快速检测。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

标准菌株金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、大肠杆菌 ATCC 25922、单核细胞增生李斯特氏菌 CMCC(B) 54002、伤寒沙门氏菌 CMCC(B) 50071、乙型溶血性链球菌

CMCC(B) 32210、副溶血性弧菌 ATCC17802、福氏志贺氏菌 FSCC 219005(广东环凯微生物科技有限公司)。Bst DNA 聚合酶、2×反应缓冲液、密封液、荧光染料(广州双螺旋生物有限公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(美国 OMEGA 公司)。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 仪器与设备

5415D 小型高速离心机、Mastercycler ep gradient PCR 扩增仪(德国艾本德公司); NANODROP2000 微量紫外分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司); Deaou-16A 恒温荧光检测仪(广州迪澳生物技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 模板的制备

用 OMEGA 公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 β 溶血性链球菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、单核细胞增生李斯特氏菌、伤寒沙门氏菌、副溶血性弧菌标准菌株的 DNA, 并用微量紫外分光光度计检测细菌的 DNA 浓度及纯度。

1.3.2 引物设计与合成

根据 GenBank 公布的溶血性链球菌 *spy1258* 基因序列, 利用 Primer Explorer V5 软件设计 4 对 LAMP 特异性引物, 包括 2 条外引物 F3、B3 和 2 条内引物 FIP、BIP。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 LAMP 引物序列
Table 1 LAMP primer sequence

名称	序列(5'-3')
F3	CCTTACTAAAAAGGCTGGTATC
B3	GAGTTGCGGAAATTTGAGG
FIP	TCCAGAGTGTCAATTTTTGAAGTGAT-AATA GAGGAACCTTCTACCTCC
BIP	TCAGGCTGAAATCTACACAGACAC-GCGGT TATAAATCTCTATGTTCT

1.3.3 LAMP 反应体系及条件的建立

采用 25 μ L 的 LAMP 反应体系, 标准的 LAMP 反应体系包括内引物 *spy1258*-FIP 和 *spy1258*-BIP 各 1.6 μ mol/L, *spy1258*-F3 和 *spy1258*-B3 各 0.2 μ mol/L, 2×反应缓冲液 12.5 μ L, DNA 聚合酶 8 U, 荧光染料为 0.5 μ L, 2 μ L 样品, 加超纯水至 25 μ L。混匀后, 加入 1 滴密封液。

将上述反应体系混匀后用 Deaou-16A 恒温荧光检测仪对浓度为 1 ng/ μ L 的模板及空白对照进行检测, 反应温度分别设定为 60、63、65 $^{\circ}$ C 反应 45 min, 观察 LAMP 反应结果, 确定最佳反应温度。内外引物比分别设定为 1:1、1:2、1:3、1:4, 在 63 $^{\circ}$ C 反应 45 min, 观察 LAMP 反应结果,

确定最佳内外引物比。

1.3.4 LAMP 特异性检测

选取7种常见细菌作为实验对照,进行溶血性链球菌的特异性实验,并设置灭菌双蒸水为阴性对照。实验菌株分别为 β 溶血性链球菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、单核细胞增生李斯特氏菌、伤寒沙门氏菌、副溶血性弧菌,验证LAMP引物的特异性。

1.3.5 LAMP 灵敏度及检出限

将溶血性链球菌DNA模板按照10倍列稀释法稀释为6个浓度梯度。获得DNA浓度分别为1 ng/ μ L、100 pg/ μ L、10 pg/ μ L、1 pg/ μ L、100 fg/ μ L、10 fg/ μ L,各取2 μ L进行LAMP反应,确定LAMP反应的灵敏度。

将培养24 h的溶血性链球菌BHI溶液,以无菌水10倍梯度逐步稀释菌液,分别取各稀释菌液100 μ L进行平板计数,并提取DNA,取2 μ L含各稀释梯度菌液DNA进行LAMP扩增,确定LAMP反应的检测限。

1.3.6 LAMP 法及传统培养法分别检测10份牛奶中 β 溶血性链球菌

分别采用LAMP法和GB 4789.11—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 β 型溶血性链球菌检验》检测10份预包装的牛奶样品中溶血性链球菌,并将其中1份样品人工污染样品,即取隔夜培养的 β 溶血性链球菌1环(约5 μ L)加入25 mL牛奶样品中,比较2种方法的时效性及稳定性,验证LAMP在实际检测时的可行性。

2 结果与分析

2.1 β 溶血性链球菌荧光-LAMP方法的建立与反应条件优化

LAMP特异性引物使 β 溶血性链球菌基因组DNA扩增出“S”型曲线,而无阴性对照没有“S”型曲线出现。通过相同浓度标准菌株DNA分别在60、63和65 $^{\circ}$ C反应45 min发现,63 $^{\circ}$ C时反应 T_t 值比65 $^{\circ}$ C和60 $^{\circ}$ C小大约6 min,而60、65 $^{\circ}$ C的 T_t 值相当,且3个温度下反应均未发现非特异扩增,其比较如图1所示。为保证反应灵敏度和时效性,本实验选择63 $^{\circ}$ C作为最佳扩增温度。当其他条件不变时,内外引物的浓度比为3:1时扩增效果最佳(图2)。

2.2 β 溶血性链球菌荧光-LAMP的特异性

选取7种常见细菌作为实验对照,进行溶血性链球菌的特异性实验,并设置灭菌双蒸水为阴性对照,实验结果如图3所示。只有 β 溶血性链球菌出现“S”形扩增曲线,为阳性结果,而其他菌株在60 min反应时间内均未出现“S”形曲线,说明该套引物只对 β 溶血性链球菌具有特异性。

2.3 β 溶血性链球菌荧光-LAMP反应的灵敏度

将 β 溶血性链球菌DNA模板按照10倍列稀释法稀释为7个浓度梯度。获得DNA浓度分别为1 ng/ μ L、

100 pg/ μ L、10 pg/ μ L、1 pg/ μ L、100 fg/ μ L、10 fg/ μ L、1 fg/ μ L进行LAMP反应,由图4可知,阳性模板DNA浓度为1 ng/ μ L、100 pg/ μ L、10 pg/ μ L、1 pg/ μ L、100 fg/ μ L时,LAMP均能扩增,且 C_t 值随阳性模板浓度的减小而逐渐增加,当浓度太低时(<100 fg/ μ L),检测不出“S”形扩增曲线,所以LAMP反应所需模板的最低浓度为100 fg/ μ L,即LAMP法对 β 溶血性链球菌的最低检测浓度可至100 fg/ μ L。

以无菌水将溶血性链球菌系列稀释后,分别取样LAMP检测(图5),并通过平板培养菌落计数,结果显示,检出限为9.8 CFU/mL。

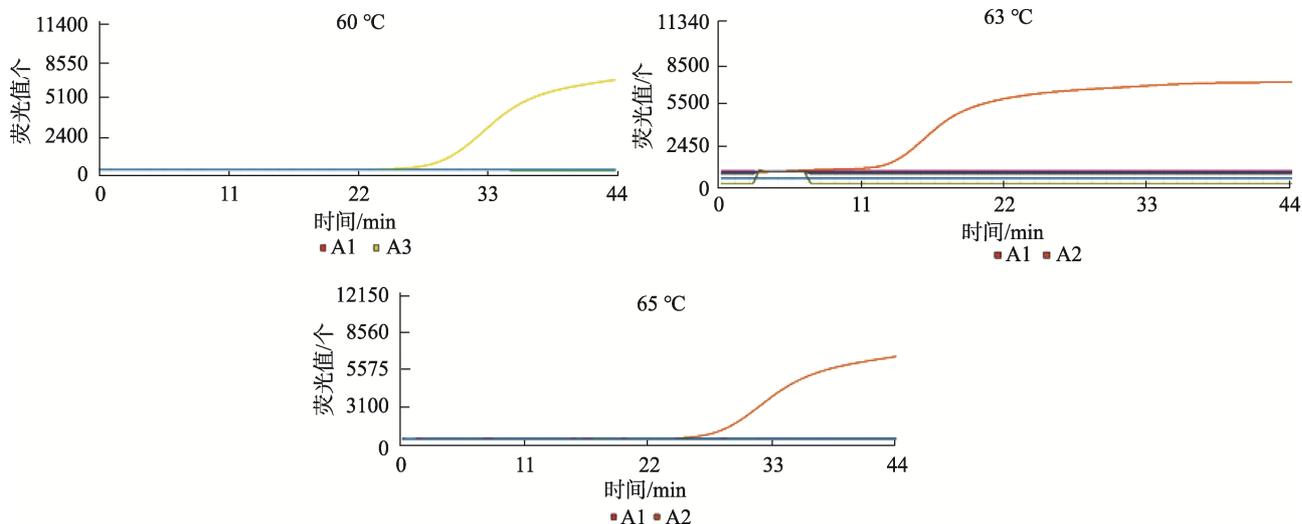
2.4 荧光LAMP法检测牛奶中的 β 溶血性链球菌

分别采用LAMP法和GB 4789.11—2014方法检测10份牛奶中溶血性链球菌,并将其中1份样品人工污染样品,LAMP结果见图6, sample7检出 β 溶血性链球菌,其余样品未检出 β 溶血性链球菌,LAMP结果与传统国标法一致,说明本研究研发的荧光LAMP反应体系能够快速有效、准确的检出 β 溶血性链球菌,而传统国标法需经过分离培养、形态观察、生化鉴定等烦琐工作,这些步骤操作复杂、检测周期较长,至少需要4 d才能获得结果,而本研究开发的方法能大大缩短检测周期(1 d左右)。

3 结论与讨论

采用 β 溶血性链球菌的 $spy1258$ 基因序列中的一段特异序列作为LAMP扩增的靶序列,针对6个不同区域,设计内外两对引物,保证了LAMP反应的特异性扩增,并成功检测出溶血性链球菌菌株,而其他菌的基因不能扩增出来,表明该引物针对溶血性链球菌的 $spy1258$ 基因特异序列有很高的特异性。

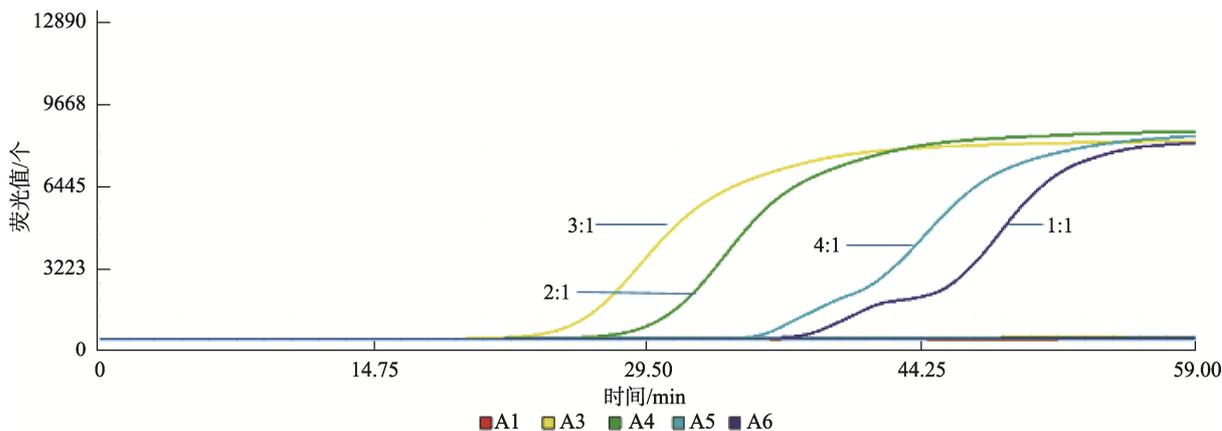
本研究成功建立了针对 β 溶血性链球菌 $spy1258$ 基因设计的荧光LAMP反应体系,并对该方法的引物比、反应温度、特异性和检测限进行了实验。结果表明荧光LAMP方法均有较好的特异性,最佳引物比为3:1, β 溶血性链球菌LAMP反应最佳温度为63 $^{\circ}$ C, β 溶血性链球菌DNA的最低检测浓度为100 pg/ μ L,菌检测限低至9.8 CFU/mL。采用建立的荧光LAMP法对10份实际样品进行检测 β 溶血性链球菌,成功检出1份预污染的牛奶样品,结果与传统国标法一致,且大大缩短了检测时间。对比国内其他研究,尹欢等^[19]针对溶血链球菌的 $scpA$ 基因设计LAMP引物,检出限为16.7 CFU/mL,赵青等^[20]针对溶血链球菌的 $Dnase B$ 基因设计PCR引物,检出限为83.8 pg/ μ L,本次研究所建立的LAMP体系,具有灵敏度更强的特点。综上所述,本研究建立的溶血性链球菌荧光LAMP检测方法具有快速、直观、灵敏度高和特异性强等优点,可应用于食品中 β 溶血性链球菌的初步筛选。



注: A1 为阴性对照, A2 为 β 溶血性链球菌标准菌株, A3 为 β 溶血性链球菌标准菌株。

图 1 LAMP 反应温度的确立

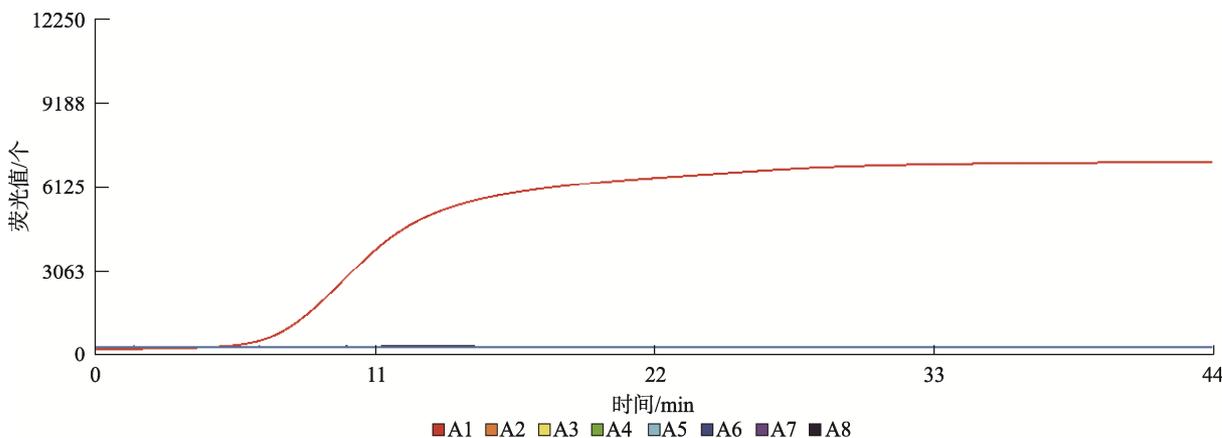
Fig.1 Establishment of LAMP reaction temperature



注: A1 为阴性对照, A3 为引物比 3:1, A4 为引物比 2:1, A5 为引物比 4:1, A6 为引物比 1:1。

图 2 LAMP 反应内外引物浓度比的确立

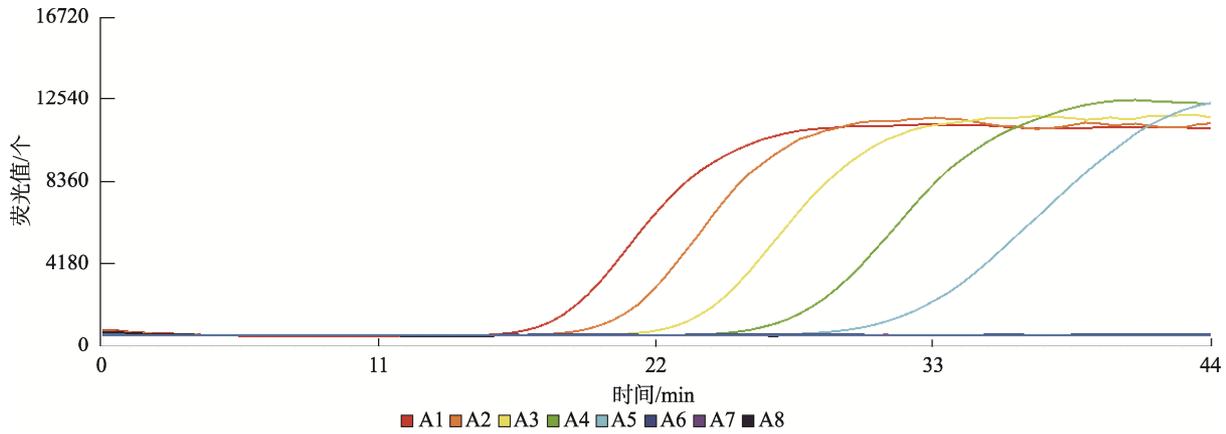
Fig.2 Establishment of the concentration ratio of internal and external primers in LAMP reaction



注: A1 为 β 溶血性链球菌; A2 为沙门氏菌; A3 为金黄色葡萄球菌; A4 为大肠埃希氏菌; A5 为志贺氏菌; A6 为单核细胞增生李斯特氏菌; A7 为副溶血性弧菌; A8 为阴性对照。

图 3 LAMP 反应的特异性实验

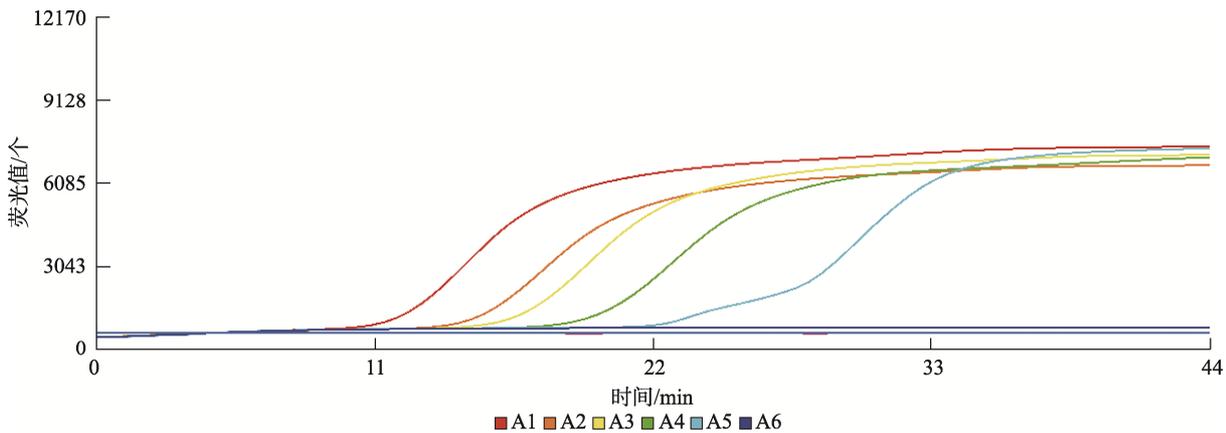
Fig.3 Specificity test of LAMP reaction



注: A1 为 1 ng/μL; A2 为 100 pg/μL; A3 为 10 pg/μL; A4 为 1 pg/μL; A5 为 100 fg/μL; A6 为 10 fg/μL; A7 为 1 fg/μL; A8 为阴性对照。

图 4 LAMP 反应的灵敏度实验

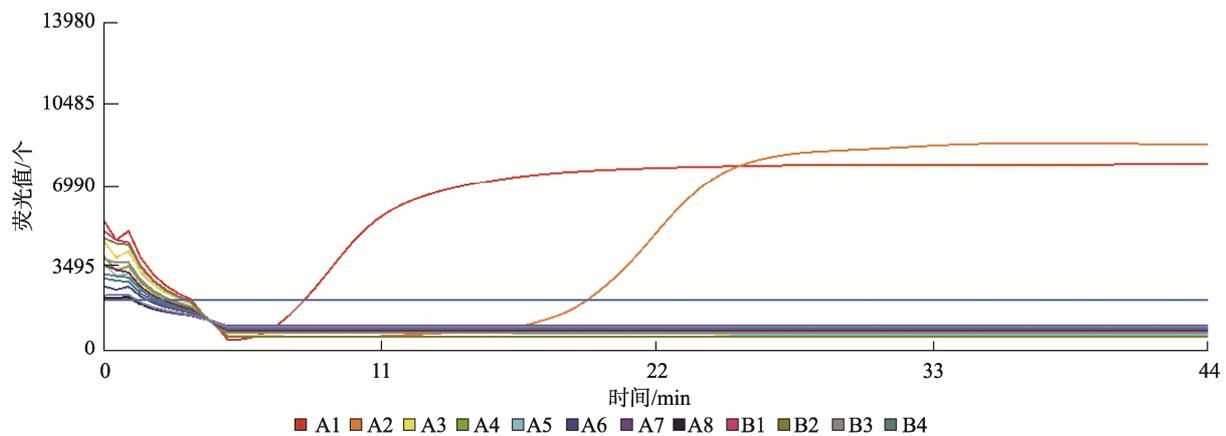
Fig.4 Sensitivity test of LAMP reaction



注: A1 ~ A5 分别为稀释溶血性链球菌 10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ 倍后 LAMP 扩增曲线; A6 为阴性对照。

图 5 LAMP 反应的检出限

Fig.5 Detection limit of LAMP reaction



注: A1 为阳性对照; A2 为阴性对照; A3 为 sample1; A4 为 sample2; A5 为 sample3; A6 为 sample4; A7 为 sample5; A8 为 sample6; B1 为 sample7; B2 为 sample8; B3 为 sample9; B4 为 sample10。

图 6 10 份牛奶 β 溶血性链球菌 LAMP 反应结果

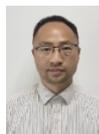
Fig.6 LAMP reaction results of β Streptococcus hemolyticus in 10 milk samples

参考文献

- [1] 高铁铮. 新生儿 B 组溶血性链球菌感染(综述)[J]. 国际儿科学杂志, 1979, (6): 294-299.
- GAO TZ. Group B hemolytic streptococcal infection in neonates (review) [J]. Int J Pedi, 1979, (6): 294-299.
- [2] SONG X, HUANG X, XU H, *et al.* The prevalence of pathogens causing bovine mastitis and their associated risk factors in 15 large dairy farms in China: An observational study [J]. Veter Microbiol, 2020: 108757. DOI: 10.1016/j.vetmic.2020.108757.
- [3] RETCHLESS AC, KRETZ CB, RODRIGUEZ-RIVERA LD, *et al.* Oropharyngeal microbiome of a college population following a meningococcal disease outbreak [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 632.
- [4] WROTEK A, CZAJKOWSKA M, JACKOWSKA T. Bacteremia in children hospitalized due to respiratory syncytial virus infection [J]. Adv Experi Med Biol, 2020, 1271. DOI: 10.1371/journal.pone.0146599.
- [5] KUMAR A, BHATNAGAR A, GUPTA S, *et al.* Sof gene as a specific genetic marker for detection of *Streptococcus pyogenes* causing pharyngitis and rheumatic heart disease [J]. Cell Mol Biol, 2011, 57: 26-30.
- [6] DUNNE EM, MARSHALL JL, BAKER CA. Detection of group A *Streptococcal* pharyngitis by quantitative PCR [J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 312-318.
- [7] SLINGER R, GOLDFARB D, RAJAKUMAR D, *et al.* Rapid PCR detection of group A *streptococcus* from flocked throat swabs: A retrospective clinical study [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2011, 10: 33-37.
- [8] LANGLOIS DM, ANDREAE M. Group A *Streptococcal* infections [J]. Pediatr Rev, 2011, 32: 423-429.
- [9] ABRAHAM T. Identification of *streptococcus pyogenes* phenotypic tests vs molecular assay (*spy*1258 PCR): A comparative study [J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(7): 1-3.
- [10] ZAINAB DD, ESRAA DT, MOHAMMED JM, *et al.* Molecular study of *spy*1258 and *smeZ* genes in Group A *Streptococcal tonsillitis* [J]. J Pure Appl Microbiol, 2019, 13(1): 1-5.
- [11] LOUIE L, SIMOR AE, LOUIE M. Diagnosis of group A streptococcal necrotizing fasciitis by using PCR to amplify the *Streptococcal pyrogenic exotoxin B* gene [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36: 1769-1771.
- [12] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acid Res, 2000, 28(12): 63.
- [13] 朱凯, 康怀彬, 王德国. 可视化 LAMP 检测常见肉制品中猪肉成分[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 296-302.
- ZHU K, KANG HB, WANG DG. Visual detection of pork components in common meat products by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method [J]. Food Sci, 2019, 40(12): 296-302.
- [14] 龚哈悦, 曹炜伟, 石磊, 等. 猪瘟病毒实时荧光 LAMP 检测方法的建立 [J]. 现代食品科技, 2019, 35(10): 261-267.
- GONG HY, CAO WW, SHI L, *et al.* Establishment of real-time fluorescence loop-mediated isothermal assay for detection of classical swine fever virus [J]. Mod Food Sci Technol, 2019, 35(10): 261-267.
- [15] CHEN YF, LI H, YANG L, *et al.* Rapid detection of clostridium botulinum in food using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. Int J Environ Res Pub Health, 2021, 18(9): 110999.
- [16] MANMOHAN PSS. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases [J]. Rev Med Virol, 2008, 18: 407-421.
- [17] MORI Y, NAGAMINE K, TOMITA N, *et al.* Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 23: 5.
- [18] HAO XG, WANG LC, ZHANG XD, *et al.* A real-time loop-mediated isothermal amplification for detection of the wheat dwarf virus in wheat and the insect vector *Psammotettix alienus*. [J]. Plant Disea, 2021, 1: 15.
- [19] 尹欢, 李琦, 陈江源, 等. 溶血性链球菌 LAMP 检测方法的建立[J]. 食品科学, 2010, (22): 318-321.
- YI H, LI Q, CHEN JY, *et al.* Establishment of loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Streptococcus hemolyticus* [J]. Food Sci, 2010, (22): 318-321.
- [20] 赵青, 凤晓博. 食品中 A 族乙型溶血性链球菌的 PCR 检测[J]. 四川畜牧兽医, 2015, (7): 32-33.
- ZHAO Q, FENG XB. Establishment of detection method of group A *Streptococcus pyogens* in foods by PCR [J]. Sichuan Anim Veter Sci, 2015, (7): 32-33.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



周 勇, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与质量分析。
E-mail: 413788082@qq.com