

基于 *cpsA* 基因的海豚链球菌 LAMP 检测方法的建立

孙国荣, 马少鸿, 林桂香, 万小菊, 黄郁葱, 简纪常, 蔡双虎

Establishment of LAMP detection method for *Streptococcus iniae* based on *cpsA* gene

SUN Guorong, MA Shaohong, LIN Guixiang, WAN Xiaojie, HUANG Yucong, JIAN Jichang, CAI Shuanghu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210803543>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

尼罗罗非鱼 *TIRAP* 基因克隆、组织表达及其在无乳链球菌、脂多糖和聚肌胞苷酸刺激下的免疫应答

Cloning and expression of *TIRAP* gene and immune response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*, lipopolysaccharides and polyinosinic polycytidylic acid stress

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 857 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-318>

整合子相关元件多重 PCR 检测技术建立及其在弧菌中应用

Development of multiplex PCR detection of integron-related elements and its application in *Vibrio* spp.

上海海洋大学学报. 2016, 25(6): 814 <https://doi.org/10.12024/jsou.20160301675>

乳酸链球菌素与乳酸对维氏气单胞菌的协同抑制和损伤作用

Synergistic inhibition and damage effects of nisin and lactic acid against pathogen *Aeromonas veronii*

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 830 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-301>

草鱼鳞酶解物的制备及其促嗜热链球菌生长作用

Preparation of grass fish scale hydrolysate and its proliferation effect on *Streptococcus thermophilus* growth

上海海洋大学学报. 2021, 30(6): 1132 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200703094>

基于脱氧核酶-等温级联放大耦合的传感体系高灵敏检测水样中铅离子

A DNzyme-isothermal cascade amplification sensing system for ultrasensitive detection of Pb^{2+} in water samples

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 840 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190502664>

文章编号: 1674-5566(2023)01-0031-09

DOI:10.12024/jsou.20210803543

基于 *cpsA* 基因的海豚链球菌 LAMP 检测方法的建立

孙国荣^{1,2}, 马少鸿^{1,2}, 林桂香^{1,2}, 万小菊^{1,2}, 黄郁葱^{1,2}, 简纪常^{1,2}, 蔡双虎^{1,2}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088; 2. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 基于荚膜多糖 *cpsA* 基因设计引物, 建立海豚链球菌可视化环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术, 以快速检测鱼类养殖中的海豚链球菌。结果表明, LAMP 最佳反应条件为 65 °C 反应 20 min, 镁离子浓度为 1.2 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.64 mmol/L、内外引物比例为 16:1。特异性检测结果表明, 该方法能特异性检出海豚链球菌, 对无乳链球菌和其他 14 种菌检测结果均呈阴性; 灵敏度检测结果表明, 该 LAMP 方法灵敏度为 2.12×10^{-5} ng/ μ L, 比 PCR 检测方法灵敏度高 100 倍; 适用性分析结果表明, 该 LAMP 方法在模板中存在鱼类基因组干扰下也能正确完成检测。研究中建立的 LAMP 检测方法为海豚链球菌的检测提供一种可视化、灵敏、成本低的快速检测技术。

关键词: 海豚链球菌 *cpsA*; LAMP; 可视化检测

中图分类号: S 941.4 **文献标志码:** A

20 世纪 80 年代以来, 已有多个国家报道了鱼类链球菌病的暴发, 包括卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*)^[1]、尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*)^[2] 和尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)^[3] 等。2016 年在西澳大利亚金伯利海岸线观察到大约 17 000 尾鱼受到链球菌感染死亡, 受影响的鱼包括长须狮子鱼 (*Pterois volitans*)、鲈鱼 (*Psammoperca waigiensis*) 和黄尾鱼 (*Carangidae*) 等, 造成巨大的经济损失^[4]。

海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 是我国南方鱼类养殖中链球菌的主要病原。该病原为革兰氏阳性细菌, 在 BHI 固体培养基上形态呈圆形或近圆形并呈链状或双排列, 无鞭毛, 不形成芽孢^[5]。研究^[6]表明该病原至少能感染 27 种淡水和海水鱼, 已成为水产养殖最严重的致病菌之一。被感染的鱼类经常发生脑膜炎和败血症, 死亡率高达 50%。同时, 该病原还是一种重要的人兽共患的病原菌, 人类受到细菌感染后会导致菌血症、蜂窝织炎、脑膜炎和关节炎等, 尤其原本患有心脏病、肾病、糖尿病和关节炎的老年人更易感染^[7]。

环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 主要是利用两对特殊引物和 Bst DNA 聚合酶, 使反应中模板两端引物结合处循环出现环状单链结构, 从而保证引物可以在等温条件下顺利与模板结合并进行链置换扩增反应^[8]。该技术只需将模板、引物、酶等混合后在水浴锅 (60 ~ 65 °C) 经过 1 h 反应就可将数个拷贝的 DNA 模板完成 10^9 个拷贝, 与普通 PCR 方法相比克服了 PCR 反应需要反复的热变性、复性、延伸过程获得单链模板的缺点, 实现了恒温条件下的连续快速扩增, 具有更高的灵敏度和扩增效率, 从而实现快速、特异、灵敏、简便的检测。该技术反应产物可以通过常规的荧光定量和电泳检测, 也可以通过简易直观的荧光目视比色法如 SYBR Green I、钙黄绿素、羟基萘酚蓝 (HNB)、Pico Green 和焦磷酸镁浊度检测^[9]。目前该技术已广泛应用于病毒及其他病原体的检测, 如: 袁耀武等^[10]利用 LAMP 法检测单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*), 纯培养的单增李斯特菌的和细菌等病原体的检测灵敏度为 $7.3 \times$

收稿日期: 2021-08-27 修回日期: 2022-01-09

基金项目: 国家自然科学基金 (U20A2065); 南方海洋科学与工程广东省实验室 (湛江) 项目 (ZJW-2019-06)

作者简介: 孙国荣 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水生动物病害防控。E-mail: s1812889524@163.com

通信作者: 蔡双虎, E-mail: caish@gdou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

10^1 cfu/mL; 张伟等^[11]建立了鸭坦布苏病毒 LAMP 检测方法, 该法测定模板浓度的灵敏度为 1×10 拷贝数/ μL , 而 PCR 的灵敏度为 1×10^3 拷贝数/ μL ; THEKISOE 等^[12]根据布鲁氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*) 的 18S rRNA 基因建立了锥虫的 LAMP 检测技术, 可以检测出锥虫 DNA 的最低限度是 $1 \text{ fg}/\mu\text{L}$, 为预防和控制锥虫病提供了有效的技术方案。

有研究^[13-14]指出细菌逃避噬菌作用最有效的方式是产生荚膜多糖 (CPS), 有荚膜多糖的菌株比非荚膜菌株的毒力更强。对 GenBank 中已有的海豚链球菌菌株的全基因组序列进行分析, 发现所有测过全基因组序列的菌株都有表达荚膜多糖的 *cpsA* 基因, 且经 BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析表明 *cpsA* 的预测氨基酸序列高度保守。本研究基于海豚链球菌荚膜多糖 *cpsA* 基因设计引物, 采取环介导等温扩增技术建立海豚链球菌检测方法, 经条件优化后可通过少量的样本检测即可高效、灵敏的检测出海豚链球菌, 研究结果为海豚链球菌引发的细菌病的快速诊断和早期检测提供更加可靠、便捷的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

海豚链球菌 (*Streptococcus iniae* ZJ0801)、无乳链球菌 (*S. agalactiae* ZQ0901)、猪链球菌 (*S.*

suis GD02)、停乳链球菌 (*S. dysgalactiae* ATCC12394)、化脓链球菌 (*S. pyogenes* ATCC19615)、哈维弧菌 (*Vibrio harveyi* ZJ1603)、霍乱弧菌 (*V. cholerae* nonO1-ZJ0910)、创伤弧菌 (*V. vulnificus* ZJ1007)、副溶血弧菌 (*V. Parahaemolyticus* ZJ1502)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus* HY9901)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC6538)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis* ZJ1906)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis* ATCC6633)、蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus* ATCC14579)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* ATCC8014) 等 15 株菌株均由广东省水产经济动物病原生物学与流行病学重点实验室保存。

1.2 试剂

TSB 培养基、BHI 培养基购自广东环凯微生物科技有限公司; MgSO_4 、Betaine 购自上海钦诚生物科技有限公司; dNTPs、Bst DNA 聚合酶、DEPC 处理水购自生工生物工程(上海)股份有限公司; SYBR Green I 购自北京索莱宝科技有限公司; 细菌全基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 引物设计与合成

选择 GenBank 中公布的海豚链球菌荚膜多糖 (*cpsA*, GenBank 登录号: AAY17293.1) 基因, 通过序列比对分析后, 选择高度保守的基因区段设计特异性引物(表 1), 并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 LAMP 扩增引物序列
Tab. 1 LAMP amplification primer sequence

引物 Primers	引物类型 Primer type	长度 Length/bp	序列 (5'-3') Sequences (5'-3')
<i>cpsA</i> -FIP	上游内引物	50	CTTTTAGCCGCTTTAATGTGCTTTTTTTAAGCACCTCTAAAAAATGACT
<i>cpsA</i> -BIP	下游内引物	48	TTGAAGAAGAGTTGCTTCTTATCCATTTTAAACCATTGCTTGAGACTGA
<i>cpsA</i> -F3	上游外引物	25	TCTATATCAGAATTAGACAGATTC
<i>cpsA</i> -B3	下游外引物	22	ATGACATATAAGCACTGTTTCAT
β -actin-F	上游引物	23	CGAGAGGGAAATCGTGCGTGACA
β -actin-R	下游引物	23	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGGGC

1.4 LAMP 反应体系建立及条件优化

1.4.1 LAMP 反应体系的建立

固体培养基划线培养, 挑取单菌落扩大培养, 用细菌全基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA 作为 LAMP 特异性实验中反应体系模板。

以海豚链球菌基因组 DNA 作为模板, 建立 LAMP 反应体系。反应体系共 $25 \mu\text{L}$, 包括 $10 \times$ Bst Buffer $2.5 \mu\text{L}$, MgSO_4 (25 mmol/L) $1.2 \mu\text{L}$, dNTPs (10 mmol/L) $1.6 \mu\text{L}$, 内引物各 $1.6 \mu\text{L}$, 外引物各 $0.2 \mu\text{L}$, Bst DNA 聚合酶 (8 U) $1 \mu\text{L}$, DNA 模板 $1 \mu\text{L}$, DEPC 处理水补齐^[15]。LAMP 反

应体系在 60 °C 保持 60 min 后 80 °C 灭活 2 min, 2% 的琼脂糖凝胶电泳判断实验结果。

1.4.2 LAMP 反应体系优化

为优化 LAMP 方法扩增条件,设计不同的反应温度(50、55、60、65 和 70 °C)^[16]、不同的反应时间(10、20、30、40、50 和 60 min)^[17]、不同的 Mg^{2+} 浓度(0、1.2、2.4、3.6、4.8、6.0、8.0 mmol/L)、不同的 dNTPs 浓度(0、0.32、0.64、1.28、2.56 mmol/L)、不同的内外引物比例(1:1、2:1、4:1、8:1、16:1)进行 LAMP 反应,反应结束后取 5 μ L 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,观察条带亮度,以确定 LAMP 最佳反应时间、温度、 Mg^{2+} 、dNTPs、内外引物比例。为研究本 LAMP 方法反应体系中是否需要添加甜菜碱,分别在 LAMP 反应体系中添加 0、0.25、1、1.5 和 2 mmol/L 的甜菜碱,反应结束后取 5 μ L 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.4.3 LAMP 防污染体系的建立

使用 UDG-dUTP 系统建立防污染 LAMP 体系可以有效控制假阳性结果。反应前向反应体系中加入 1 μ L 的 100 mmol/L dUTP 和 1 U 的 UDG,然后在 37 °C 预处理 5 ~ 10 min 后进行 LAMP 反应,对照组不做处理。为进一步确保实验防污染体系可靠性用不开盖检测的钙黄绿素-锰离子方法^[15]作对照。反应结果用 2% 凝胶电泳分析。

1.5 LAMP 方法的特异性分析

用 1.1 节中不同菌株基因组 DNA 为模板,进行 LAMP 反应,产物经 SYBR Green I 检测;同时利用 2% 的琼脂糖凝胶电泳判断实验结果,以分析本实验中建立的 LAMP 方法是否对海豚链球菌具有特异性。

1.6 LAMP 方法灵敏度分析

将海豚链球菌 DNA 初始质量浓度确定为 21.2 ng/ μ L,对其进行 10 倍梯度稀释至 2.12×10^{-9} ng/ μ L。以各梯度 DNA 作为模板利用优化后的反应体系进行 LAMP 检测,取 5 μ L 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳和 SYBR Green I 检测。

同时,取上述梯度稀释的 DNA 为模板并以表 1 中引物^[18]进行 PCR 反应,反应程序为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环,72 °C 延伸 10 min,取 5 μ L

反应产物进行琼脂糖凝胶电泳。

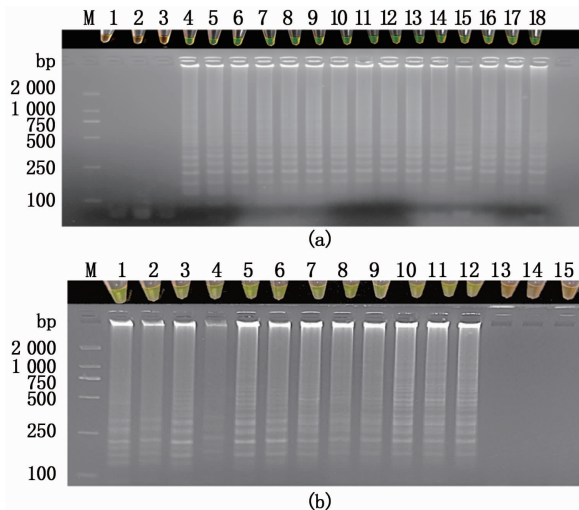
1.7 LAMP 检测方法适用性分析

取罗非鱼脑、鳃、肝、脾、头肾等 5 个组织各 0.1 g^[19],加入 1 mL 无菌水,充分匀浆,加入新鲜培养的海豚链球菌(1.8×10^9 cfu/mL),30 °C 培养然后取 1 mL 培养液,应用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA 作为模板,并用鱼的 β -actin 管家基因进行 PCR 确保鱼的 DNA 质量,随后进行 LAMP 检测,以未加海豚链球菌的鱼组织作为对照,判断鱼基因组 DNA 是否会对 LAMP 检测方法造成污染。同时,用 LAMP 方法对实验室收集的 14 例由海豚链球菌感染的尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)、卵形鲳鲈(*Trachinotus ovatus*)链球菌病样、5 例由无乳链球菌感染的尼罗罗非鱼链球菌病样和 2 例由哈维弧菌感染的弧菌病病样进行检测,从而验证本方法的临床应用效果。具体方法为取鱼肝脏组织约 0.1 g,置于采样管内研磨至浆状,应用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA 作为模板进行 LAMP 检测,同时用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取健康罗非鱼和卵形鲳鲈肝脏组织作为对照组,分析应用 LAMP 方法在临床应用检测中的准确性^[20]。

2 结果

2.1 LAMP 检测方法的建立和优化

应用 LAMP 技术建立海豚链球菌 LAMP 检测方法,该检测方法结果可以通过琼脂糖凝胶电泳或 SYBR Green I 显色肉眼判读结果。进一步对 LAMP 检测方法的反应条件进行优化。结果表明:当反应时间超过 20 min 时,反应产物即可通过琼脂糖凝胶电泳或 SYBR Green I 显色肉眼判读(图 1a);当反应温度为 65 °C 时,琼脂糖凝胶电泳形成的条带最亮(图 1b)。因此,本 LAMP 检测方法的最佳反应条件为 65 °C 反应 20 min,并根据条带亮度确定 Mg^{2+} (图 2a)和 dNTPs(图 2b)最佳反应浓度分别为 1.2 mmol/L 和 0.64 mmol/L,且最佳内外引物比例为 16:1(图 2c)。对 LAMP 反应体系中的甜菜碱浓度在最佳反应条件下进行优化,实验结果表明,是否添加甜菜碱不会影响到 LAMP 反应产物的电泳结果,说明甜菜碱不是本 LAMP 检测方法反应必需因子^[21](图 2d)。



(a)泳道 M. 2 000 bp marker; 1 ~ 3. 10 min; 4 ~ 6. 20 min; 7 ~ 9. 30 min; 10 ~ 12. 40 min; 13 ~ 15. 50 min; 16 ~ 18. 60 min; (b)泳道 M. 2 000 bp marker; 1 ~ 3. 50 °C; 4 ~ 6. 55 °C; 7 ~ 9. 60 °C; 10 ~ 12. 65 °C; 13 ~ 15. 70 °C。

(a) Lane M. 2 000 bp marker; 1 - 3. 10 min; 4 - 6. 20 min; 7 - 9. 30 min; 10 - 12. 40 min; 13 - 15. 50 min; 16 - 18. 60 min; (b) Lane M. 2 000 bp marker; 1 - 3. 50 °C; 4 - 6. 55 °C; 7 - 9. 60 °C; 10 - 12. 65 °C; 13 - 15. 70 °C。

图1 不同反应时间、温度的 LAMP 扩增结果

Fig. 1 LAMP amplification results at different reaction time and temperatures

2.2 LAMP 防污染体系的建立

SYBR Green I 检测开盖容易造成气溶胶污染,所以本实验使用 UDG-dUTP 系统建立了防污染 LAMP 体系,并用不开盖检测的钙黄绿素-锰离子法作对照^[22],结果一致证明 UDG-dUTP 污染体系可有效避免气溶胶污染如图 3。

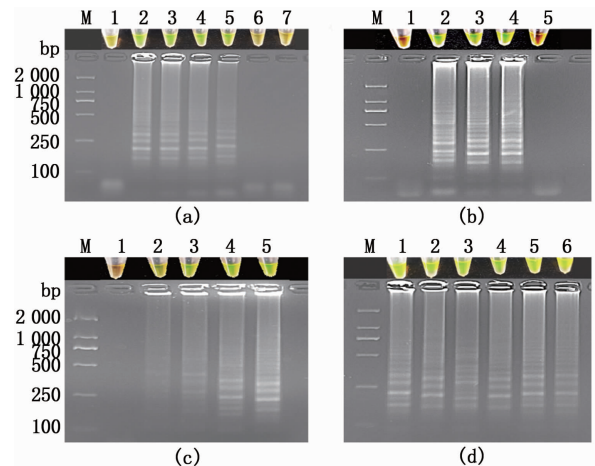
2.3 LAMP 特异性结果

用上述不同菌株基因组 DNA 为模板,进行 LAMP 反应,产物经琼脂糖凝胶电泳和 SYBR Green I 检测。结果表明,LAMP 反应对无乳链球菌、化脓链球菌、猪链球菌、停乳链球菌、哈维弧菌、霍乱弧菌、创伤弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、金黄色葡萄球菌、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌和植物乳杆菌均呈现阴性,仅对海豚链球菌呈阳性反应(图 4)。

2.4 LAMP 检测方法灵敏度分析

用不同稀释倍数的海豚链球菌基因组 DNA 为模板进行 LAMP 扩增和 PCR 反应,结果表明:当模板质量浓度高于 $2.12 \times 10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 时,琼脂糖凝胶电泳或 SYBR Green I 显色能检测出

LAMP 反应产物,即本 LAMP 检测方法的灵敏度为 $2.12 \times 10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$ (图 5a);而在 PCR 反应中,模板质量浓度需达到 $2.12 \times 10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 才能利用琼脂糖凝胶电泳在反应产物中检测到条带(图 5b)。



(a) Mg^{2+} 浓度:泳道 M. 2 000 bp marker; 1. 0 mmol/L; 2. 1. 2 mmol/L; 3. 2. 4 mmol/L; 4. 3. 6 mmol/L; 5. 4. 8 mmol/L; 6. 8 mmol/L; (b) dNTPs 浓度:泳道 M. 2 000 bp marker; 1. 0 mmol/L; 2. 0. 32 mmol/L; 3. 0. 64 mmol/L; 4. 1. 28 mmol/L; 5. 2. 56 mmol/L; (c) 内外引物比例:泳道 M. 2 000 bp marker; 1. 0 mmol/L; 2. 0. 32 mmol/L; 3. 0. 64 mmol/L; 4. 1. 28 mmol/L; 5. 2. 56 mmol/L; (d) 甜菜碱浓度:泳道 M. 2 000 bp marker; 1. 0 mmol/L; 2. 0. 25 mmol/L; 3. 1 mmol/L; 4. 1. 5 mmol/L; 5. 2 mmol/L。

(a) Mg^{2+} concentration: Lane M. 2 000 bp marker; 1. 0mmol/L; 2. 1. 2 mmol/L; 3. 2. 4 mmol/L; 4. 3. 6 mmol/L; 5. 4. 8 mmol/L; 6. 8 mmol/L; (b) dNTPs concentration: Lane M. 2 000 bp marker; 1. 0 mmol/L; 2. 0. 32 mmol/L 3. 0. 64 mmol/L; 4. 1. 28 mmol/L; 5. 2. 56 mmol/L; (c) Ratios of internal and external primers): Lane M. 2 000 bp marker; 1. 0 mmol/L; 2. 0. 32 mmol/L; 3. 0. 64 mmol/L; 4. 1. 28 mmol/L; 5. 2. 56 mmol/L; (d) Betaine concentration: Lane M. 2 000 bp marker; 1. 0 mmol/L; 2. 0. 25 mmol/L; 3. 1 mmol/L; 4. 1. 5 mmol/L; 5. 2 mmol/L。

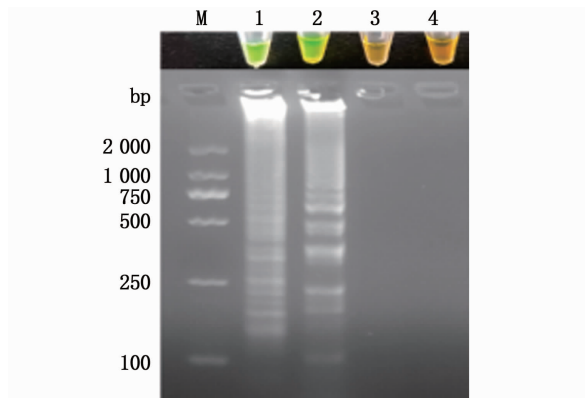
图2 不同 Mg^{2+} 、dNTPs、内外引物比例、甜菜碱浓度的 LAMP 扩增结果

Fig. 2 LAMP amplification results of different Mg^{2+} , dNTPs, ratios of internal and external primers, and betaine concentrations

2.5 LAMP 检测方法适用性分析

取新鲜的海豚链球菌($1.8 \times 10^9 \text{ cfu}/\text{mL}$)人工污染罗非鱼脑、鳃、肝、脾和头肾组织,提取基因组 DNA 对 $\beta\text{-actin}$ 管家基因检测和进行 LAMP 检测。结果表明即使模板 DNA 样品中有鱼组织的基因组干扰,本实验建立的 LAMP 检测方法仍

能显示正确的实验结果,不会呈现出假阳性或假阴性(图6)。



泳道 M. 2 000 bp marker; 1. UDG-dUTP 污染体系结合 SYBR Green I 检测 (阳性); 2. 钙黄绿素-锰离子检测 (阳性); 3. UDG-dUTP 污染体系结合 SYBR Green I 检测 (阴性对照); 4. 钙黄绿素-锰离子检测 (阴性对照)。
Lane M. 2 000 bp marker; 1. UDG-dUTP pollution system combined with SYBR Green I detection (positive); 2. Calcein-Mn²⁺ test (positive); 3. UDG-dUTP pollution system combined with SYBR Green I detection (negative control); 4. Calcein-Mn²⁺ test (negative control).

图3 UDG-dUTP 污染体系检测

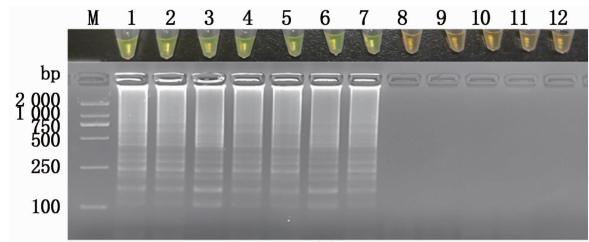
Fig.3 UDG-dUTP pollution system detection



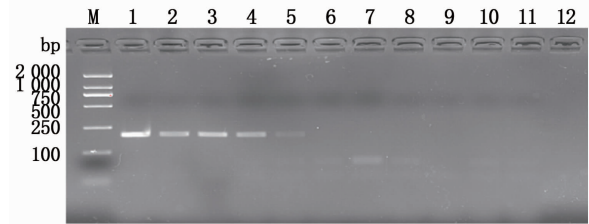
泳道 M. 2 000 bp marker; 1. 海豚链球菌; 2. 无乳链球菌; 3. 猪链球菌; 4. 停乳链球菌; 5. 化脓链球菌; 6. 哈维弧菌; 7. 霍乱弧菌; 8. 创伤弧菌; 9. 副溶血弧菌; 10. 溶藻弧菌; 11. 金黄色葡萄球菌; 12. 地衣芽孢杆菌; 13. 枯草芽孢杆菌; 14. 蜡状芽孢杆菌; 15. 植物乳杆菌; 16. 阴性对照。
Lane M. 2 000 bp marker; 1. *S. iniae*; 2. *S. agalactiae*; 3. *S. pyogenes*; 4. *S. suis*; 5. *S. pyogenes*; 6. *V. harveyi*; 7. *V. cholerae*; 8. *V. vulnificus*; 9. *V. parahaemolyticus*; 10. *V. alginolyticus*; 11. *S. aureus*; 12. *B. licheniformis*; 13. *B. subtilis*; 14. *B. cereus*; 15. *L. plantarum*; 16. Negative control.

图4 不同菌种的 LAMP 扩增结果

Fig.4 LAMP amplification results of different strains



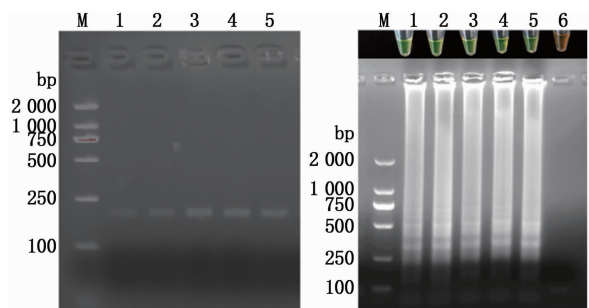
(a)



(b)

泳道 M. 2 000 bp marker; 1. 模板质量浓度为 21.2 ng/μL; 2. 模板质量浓度为 2.12 ng/μL; 3. 模板质量浓度为 2.12 × 10⁻¹ ng/μL; 4. 模板质量浓度为 2.12 × 10⁻² ng/μL; 5. 模板质量浓度为 2.12 × 10⁻³ ng/μL; 6. 模板质量浓度为 2.12 × 10⁻⁴ ng/μL; 7. 模板质量浓度为 2.12 × 10⁻⁵ ng/μL; 8. 模板质量浓度为 2.12 × 10⁻⁶ ng/μL; 9. 模板质量浓度为 2.12 × 10⁻⁷ ng/μL; 10. 模板质量浓度为 2.12 × 10⁻⁸ ng/μL; 11. 模板质量浓度为 2.12 × 10⁻⁹ ng/μL; 12. 阴性对照。
Lane M. 2 000 bp marker; 1. Template mass concentration is 21.2 ng/μL; 2. Template mass concentration is 2.12 ng/μL; 3. Template mass concentration is 2.12 × 10⁻¹ ng/μL; 4. Template mass concentration is 2.12 × 10⁻² ng/μL; 5. Template mass concentration is 2.12 × 10⁻³ ng/μL; 6. Template mass concentration is 2.12 × 10⁻⁴ ng/μL; 7. Template mass concentration is 2.12 × 10⁻⁵ ng/μL; 8. Template mass concentration is 2.12 × 10⁻⁶ ng/μL; 9. Template mass concentration is 2.12 × 10⁻⁷ ng/μL; 10. Template mass concentration is 2.12 × 10⁻⁸ ng/μL; 11. Template mass concentration is 2.12 × 10⁻⁹ ng/μL; 12. Negative control.

图5 不同质量浓度 DNA LAMP 和 PCR 扩增结果
Fig.5 Different mass concentrations of DNA LAMP and PCR amplification results



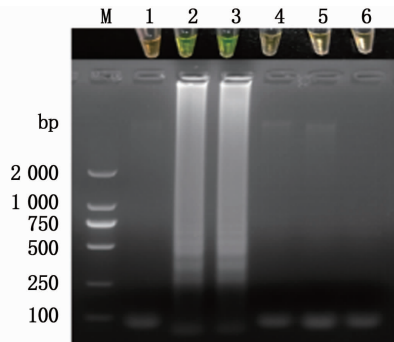
(a)

(b)

泳道 M. 2 000 bp marker; 1. 头肾; 2. 脑; 3. 脾; 4. 肝; 5. 鳃; 6. 阴性对照。
Lane M. 2 000 bp marker; 1. Head kidney; 2. Brain; 3. Spleen; 4. Liver; 5. Gill; 6. Negative Control.

图6 鱼不同组织与海豚链球菌共培养后提取 DNA 作为模板的 LAMP 和 PCR 检测结果
Fig.6 LAMP and PCR detection results of DNA extracted from different fish tissues and *Streptococcus iniae* co-cultured as a template

用本研究中建立的 LAMP 检测方法对临床病例进行检测,结果表明,本 LAMP 检测结果与取样进行的细菌分离鉴定结果完全一致(图 7)。



泳道 M. 2 000 bp marker; 1. ddH₂O; 2. 海豚链球菌感染的罗非鱼链球菌病病例; 3. 海豚链球菌感染的卵形鲳鲹链球菌病病例; 4. 哈维弧菌感染的卵形鲳鲹弧菌病病例; 5. 健康的卵形鲳鲹; 6. 健康的罗非鱼。

Lane M. 2 000 bp marker; 1. ddH₂O; 2. *Tilapia* Infected by *Streptococcus iniae*; 3. *Trachinotus ovatus* infected by *Streptococcus iniae*; 4. *Trachinotus ovatus* infected by *Vibrio harveyi*; 5. Healthy *Trachinotus ovatus*; 6. Healthy *Tilapia*.

图 7 LAMP 法检测临床病例结果
Fig. 7 LAMP method to detect the results of clinical cases

3 讨论

由海豚链球菌引起的链球菌病是近几年严重危害养殖鱼类健康的一种细菌性疾病,在我国南方水产养殖中主要危害罗非鱼和卵形鲳鲹。目前针对海豚链球菌的检测方法主要包括传统的细菌学方法、免疫学检测和分子生物学检测方法^[5]。传统的方法包含选择培养基筛选和生理生化指标的测定,如:NGUYEN 等^[23]设计了醋酸铊-草酸和黏菌素硫酸盐-草酸两种选择性培养基应用于牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)海豚链球菌的分离;AMRI 等^[24]对海豚链球菌的接触酶阴、阳性等生理生化指标进行分析。免疫学检测方法如 KLESIOUS 等^[25]建立了一种基于针对海豚链球菌的高度特异性单克隆抗体的间接荧光抗体技术(IFA-T)。分子生物学检测技术方法如 PCR 法和多重 PCR 法,如:ZLOTKIN 等^[26]对海豚链球菌 16S rRNA 设计引物产生约 300 bp 的特异条带,而无乳链球菌无扩增条带;PARK 等^[27]针对 *gyrB* 和 16S rRNA 基因设计引物,使用多重 PCR 法检测出使牙鲆患病的迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)和海豚链球菌,最低检出限分别为 0.01

ng/ μ L 和 0.1 ng/ μ L。

本研究建立的 LAMP 检测方法与其他方法相比,有以下优势:操作简单,LAMP 法在普通水浴锅或金属浴就可以完成^[28],而 PCR 技术在操作性、使用成本等方面都有一定的局限性^[29];特异性良好:LAMP 技术应用 4 条引物对靶序列的 6 个特异序列区进行识别,保证了扩增特异性^[30],本研究的结果也表明本 LAMP 检测方法 15 种菌中仅在海豚链球菌作为模板时呈阳性结果;灵敏度高:HAN 等^[31]建立的 LAMP 技术检测的灵敏度为 100 fg/ μ L,KLESIOUS 等^[25]建立的间接免疫荧光抗体方法灵敏度可达 10 cells/反应,本 LAMP 体系检测的灵敏度为 2.12×10^{-5} ng/ μ L,比 PCR 反应高出 100 倍;检测时间短:HAN 等^[31]建立的 LAMP 技术在 90 min 之内完成,KLESIOUS 等^[25]建立的间接免疫荧光抗体方法需要 4 h 才能完成,甘西等^[32]建立的 PCR 检测方法中需要 3 h 才能完成,本 LAMP 检测方法反应时间仅需要 20 min,从取样、DNA 提取到最终获得检测结果的时间可控制在 1 h 内完成;结果易于判定:只需向 LAMP 产物中添加 SYBR Green I 等核酸染料即可肉眼观察检测结果^[33],缩短了电泳检测所需时间,简化了 LAMP 检测程序,建立的 UDG-dUTP 防污染体系能有效避免气溶胶污染,结果可信更能满足现场检测的需要。综上,本研究方法与前人实验相比有检测灵敏度高,时间短的优势。

本实验针对海豚链球菌的 *cpsA* 基因进行 LAMP 反应,该体系显示包括无乳链球菌等在内的 14 株对照菌检测结果均为阴性,显示出良好的特异性;然后对反应体系的温度、时间 Mg^{2+} 、dNTPs、内外引物比例进行了优化,2% 凝胶电泳和 SYBR Green I 结果都显示 65 °C 20 min, Mg^{2+} 浓度为 1.2 mmol/L、dNTPs 浓度为 0.64 mmol/L、内外引物比例为 16:1 时条带清晰,效率较高。随后对该方法的敏感度进行了评估,在敏感度检测中当海豚链球菌模板质量浓度降低到 2.12×10^{-6} ng/ μ L 时未出现阳性条带,说明该 LAMP 体系检测的灵敏度为 2.12×10^{-5} ng/ μ L,比 PCR 法灵敏度高出两个数量级,因此该方法更适用于链球菌感染初期的检测。有学者指出甜菜碱可以使靶基因序列上富含 GC 的区域作用力改变,键能减弱,影响了 DNA 分子结构,增强 DNA 聚合酶的稳定性,本研究对甜菜碱浓度优化发现是否添

加不会影响到 LAMP 反应产物的电泳结果,说明甜菜碱不是本 LAMP 检测方法反应必需因子^[34-35]。最后对弧菌感染样本和海豚链球菌感染样本进行检测,可稳定的检测出海豚链球菌充分证明引物的特异性和可行性,加之该方法操作简单、检测成本低,不需要特殊的仪器设备和实验条件等优势,通过少量的样本检测即可高效、灵敏的检测出海豚链球菌,为其引发的细菌病的快速诊断和早期检测提供更加可靠、便捷的技术手段。

参考文献:

- [1] 熊向英,蔡小辉,彭银辉,等. 卵形鲳鲹主要致病链球菌多重 PCR 诊断技术的建立[J]. 广西科学, 2016, 23(1): 35-40.
XIONG X Y, CAI X H, PENG Y H, et al. Development of multiplex PCR assay for detection of main streptococcosis pathogens in *Trachinotus ovatus* [J]. Guangxi Sciences, 2016, 23(1): 34-40.
- [2] AL-HARBI A H. First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) in Saudi Arabia[J]. Aquaculture, 1994, 128(3/4): 195-201.
- [3] BROMAGE E S, THOMAS A, OWENS L. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1999, 36(3): 177-181.
- [4] YOUNG E J, BANNISTER J, BULLER N B, et al. *Streptococcus iniae* associated mass marine fish kill off Western Australia [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2020, 142: 197-201.
- [5] 罗晓雯,李莉,朱永肖,等. 鱼类海豚链球菌病研究进展[J]. 水产科学, 2018, 37(6): 847-854.
LUO X W, LI L, ZHU Y X, et al. Research progress on diseases caused by pathogen *Streptococcus iniae* in fishes; a review[J]. Fisheries Science, 2018, 37(6): 847-854.
- [6] 张永德,冯世文,李军,等. 海豚链球菌 LAMP 方法的建立及初步应用[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(15): 99-104.
ZHANG Y D, FENG S W, LI J, et al. Development and preliminary application of Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Streptococcus iniae* [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2018, 57(15): 99-104.
- [7] AGNEW W, BARNES A C. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 122(1/2): 1-15.
- [8] 谢佳芮,寇美玲,苗海生. 环介导等温扩增技术的最新研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(2): 119-125.
- [9] XIE J R, KOU M L, MIAO H S. Latest progress in research on loop-mediated isothermal amplification [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(2): 119-125.
徐敬潇. 印第安纳沙门菌快速检测方法的建立[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
XU J X. Establishment of a rapid detection method for *salmonella* Indiana [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020.
- [10] 袁耀武,张亚爽,马晓燕,等. LAMP 检测单核细胞增生性李斯特氏菌的研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(3): 168-173.
YUAN Y W, ZHANG Y S, MA X Y, et al. The study on the detection of *Listeria monocytogenes* by LAMP [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(3): 168-173.
- [11] 张伟,逯茂洋,黄庆华,等. 荧光显色技术在鸭坦布苏病毒 LAMP 检测方法中的应用及比较[J]. 中国兽医科学, 2014, 44(4): 406-411.
ZHANG W, LU M Y, HUANG Q H, et al. Application and comparison of fluorescent reagents in detection of duck Tembusu virus by loop-mediated isothermal amplification [J]. Chinese Veterinary Science, 2014, 44(4): 406-411.
- [12] THEKISOE O M M, KUBOKI N, NAMBOTA A, et al. Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomiasis [J]. Acta Tropica, 2007, 102(3): 182-189.
- [13] MILLER J D, NEELY M N. Large-scale screen highlights the importance of capsule for virulence in the zoonotic pathogen *Streptococcus iniae* [J]. Infection and Immunity, 2005, 73(2): 921-934.
- [14] GRIFFIN A M, MORRIS V J, GASSON M J. The *cpsABCDE* genes involved in polysaccharide production in *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* strain NCBF 2393 [J]. Gene, 1996, 183(1/2): 23-27.
- [15] 陈昌国,陈秋圆,侯兵兵,等. 基于 LAMP 技术针对溶藻弧菌 *gyrB* 基因快速检测方法的建立[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(6): 6-9.
CHEN C G, CHEN Q Y, HOU B B, et al. Establishment of the rapid detection method targeting to *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* based on LAMP technology [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(6): 6-9.
- [16] 蒋金秦,张白玉,杨锐,等. 大熊猫轮状病毒可视化 LAMP 检测技术的建立及应用[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(1): 49-54.
JIANG J Z, ZHANG B Y, YANG R, et al. Establishment and application of visual LAMP detection technology for giant panda rotavirus [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2021, 47(1): 49-54.
- [17] 张琳,马利,丁雅苓,等. 基于荧光显色的 IBV LAMP 检测方法研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(10): 38-44.
ZHANG L, MA L, DING Y L, et al. Research of fluorescent

- reagent in detection of IBV by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2012, 40(10): 38-44.
- [18] 孙秀娟. 环介导等温扩增(LAMP)技术快速检测灿烂弧菌的研究[D]: 青岛: 青岛科技大学, 2013.
SUN X J. Study on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the fast detection of *Vibrio splendidus* [D]. Qingdao: Qingdao University of Science & Technology, 2013.
- [19] 王瑞娜, 周前进, 陈炯. 环介导等温扩增联合横向流动试纸条可视化检测海豚链球菌方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(12): 1584-1594.
WANG R N, ZHOU Q J, CHEN J. Visual detection of *Streptococcus iniae* based on loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(12): 1584-1594.
- [20] 相兴伟, 郑斌, 顾丽霞, 等. 双重 LAMP 技术快速检测水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌的方法学研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(1): 253-260.
XIANG X W, ZHENG B, GU L X, et al. Study on simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in aquatic products by loop-mediated isothermal amplification method [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(1): 253-260.
- [21] 王一凡. 双链 DNA 恒温检测新技术及其在海洋弧菌中检测的研究[D]: 青岛: 青岛科技大学, 2017.
WANG Y F. Study on new technology of the isothermal detection for double-stranded DNA and its application in marine vibrio detection research [D]. Qingdao: Qingdao University of Science & Technology, 2017.
- [22] HSIEH K, MAGE P L, CSORDAS A T, et al. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP) [J]. Chemical Communications, 2014, 50(28): 3747-3749.
- [23] NGUYEN H T, KANAI K. Selective agars for the isolation of *Streptococcus iniae* from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and its cultural environment [J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 86(5): 769-776.
- [24] AMRI F E, PADILLA D, ACOSTA F, et al. First report of *Streptococcus iniae* in red porgy (*Pagrus pagrus*, L.) [J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 33(11): 901-905.
- [25] KLESZIUS P, EVANS J, SHOEMAKER C, et al. Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique [J]. Aquaculture, 2006, 258(1/4): 180-186.
- [26] ZLOTKIN A, HERSHKO H, EL DAR A. Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 4065-4067.
- [27] PARK S B, KWON K, CHA I S, et al. Development of a multiplex PCR assay to detect *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus parauberis*, and *Streptococcus iniae* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Journal of Veterinary Science, 2014, 15(1): 163-166.
- [28] 唐毕锋, 马立业, 曹广文. 环介导等温扩增技术的应用和发展[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(22): 3972-3974.
TANG B F, MA L Y, CAO G W. Application and development of loop-mediated isothermal amplification technology [J]. The Journal of Practical Medicine, 2008, 24(22): 3972-3974.
- [29] 刘晓菲, 陈睿元, 郑宇. 基于环介导等温扩增技术的玫瑰色棒束孢可视化检测[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(5): 795-801.
LIU X F, CHEN R Y, ZHENG Y. Visual detection of entomogenous fungi *Isaria fumosorosea* by loop-mediated isothermal amplification technology [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(5): 795-801.
- [30] 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 Y Y, LI S G, LUO Y P. Loop-mediated isothermal amplification method for detection of nucleic acids and its application [J]. Microbiology China, 2007, 34(3): 557-560.
- [31] HAN H J, JUNG S J, OH M J, et al. Rapid and sensitive detection of *Streptococcus iniae* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. Journal of Fish Diseases, 2011, 34(5): 395-398.
- [32] 甘西, 陈明, 余晓丽, 等. 罗非鱼海豚链球菌 PCR 检测方法的建立[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(1): 40-46.
GAN X, CHEN M, YU X L, et al. Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* in Tilapia [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(1): 40-46.
- [33] 申培立, 王羽, 李志辉, 等. 变形杆菌环介导等温扩增检测法的可视化方法的比较[J]. 河北农业大学学报, 2016, 39(3): 73-77, 82.
SHEN P L, WANG Y, LI Z H, et al. Comparison of the visualization methods of loop-mediated isothermal amplification for detecting *Proteus* [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2016, 39(3): 73-77, 82.
- [34] HENKE W, HERDEL K, JUNG K, et al. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(19): 3957-3958.
- [35] WEISSENSTEINER T, LANCHBURY J S. Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing [J]. Biotechniques, 1996, 21(6): 1102-1108.

Establishment of LAMP detection method for *Streptococcus iniae* based on *cpsA* gene

SUN Guorong^{1,2}, MA Shaohong^{1,2}, LIN Guixiang^{1,2}, WAN Xiaojun^{1,2}, HUANG Yucong^{1,2}, JIAN Jichang^{1,2}, CAI Shuanghu^{1,2}

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 2. Guangdong Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088, Guangdong, China)

Abstract: *Streptococcus iniae* is bacterial pathogen that cause streptococcosis in many fish species. Rapid, low-cost, and user-friendly strategies are urgently needed for early disease diagnosis and timely treatment, particularly for on-site screening of pathogens in aquaculture. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique is an established diagnostic tool that can be conveniently used to screen pathogens in routine or field station laboratories. In this study, primers were designed based on the capsular polysaccharide *cpsA* gene to establish a visual LAMP technique for rapidly detecting *S. iniae* in fish culture. The results showed that the best reaction condition for LAMP is 65 °C for 20 min, the concentration of Mg^{2+} is 1.2 mmol/L, the concentration of dNTPs is 0.64 mmol/L, and the ratio of internal to external primers is 16:1. The specific detection results showed that this method could specifically detect *S. iniae* and could not detect *S. agalactiae* and other 14 kinds of bacteria. The sensitivity test results showed that the sensitivity of the LAMP method is 2.12×10^{-5} ng/ μ L, which is 100 times higher than the PCR method. The result of applicability analysis showed that the LAMP method could also correctly complete the detection in the presence of fish genome interference in the template. The LAMP detection method established in this study provides a visual, sensitive, and low cost rapid detection technique to detect *S. iniae*. It could be such preliminary data provided for the screening broodstock before breeding and/or the specific-pathogen-free production.

Key words: *Streptococcus iniae cpsA*; LAMP; visual detection