

余艳玲, 彭 昊, 冯世文, 等. 罗非鱼无乳链球菌环介导等温扩增(LAMP)检测技术的建立及应用[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(13): 200–203. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.13.049

# 罗非鱼无乳链球菌环介导等温扩增(LAMP) 检测技术的建立及应用

余艳玲<sup>1</sup>, 彭 昊<sup>2</sup>, 冯世文<sup>2</sup>, 张永德<sup>1</sup>, 罗洪林<sup>1</sup>, 李 军<sup>2</sup>

(1. 广西水产科学研究院/广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021;

2. 广西兽医研究所/广西兽医生物技术重点实验室, 广西南宁 530001)

**摘要:**针对罗非鱼无乳链球菌 *Sip* 基因建立了 LAMP 检测方法, 并对野外样本进行了无乳链球菌的调查研究。结果表明, 目标 *Sip* 基因可在 63 ℃ 40 min 内被 LAMP 检测到, 比 PCR 快约 2 h, 其 DNA 检测最低浓度为  $3.55 \times 10^{-5}$  ng/μL, 灵敏度比 PCR 高 100 倍, 且对参考细菌无扩增。野外样品检测结果表明, 运用 LAMP 检测技术对 GBS 的检出率为 81.3%, 比 PCR 高约 20.0%。应用 LAMP 和 PCR 分别检测健康罗非鱼 GBS 检出率 4.4% 和 2.2%, 检测池塘水样品 GBS 检出率分别为 10.0% 和 6.7%。

**关键词:** 罗非鱼; 无乳链球菌(GBS); 环介导等温扩增(LAMP)

**中图分类号:** S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)13-0200-04

链球菌已成为全球罗非鱼最严重的疾病之一<sup>[1]</sup>, 每年造成的经济损失达 4 000 多万美元<sup>[2-3]</sup>。过去数十年, 我国罗非鱼链球菌逐年增长, 其优势种类已经从海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)转变为无乳链球菌(*S. agalactiae*, 也称 B 族链球菌或 GBS)。过去 5 年, 由链球菌导致的罗非鱼死亡率达 15%~95%<sup>[2]</sup>。GBS 不仅会引起水生或半水生生物<sup>[4-5]</sup>, 包括野生鱼类<sup>[6-7]</sup>和养殖鱼类<sup>[8-9]</sup>严重的疾病, 也可导致新生儿严重的脑膜炎<sup>[10]</sup>和成人败血症<sup>[11-12]</sup>。人类或牲畜的 GBS 对罗非鱼具有潜在的感染性<sup>[13]</sup>, 而来自罗非鱼的 GBS 也可能导致人类感染<sup>[14]</sup>。因此, 罗非鱼和/或水环境中 GBS 菌株的存在增加了公共卫生安全的风 险, 这就需要研发采取一种快速、灵敏和可靠的污染链球菌检测方法, 通过采取适当的防控措施, 保护易感染群体免受这种人畜共患病原体的侵袭。

环介导等温扩增技术(LAMP)是一种敏感、快速和低成本 的检测方法, 在等温条件下扩增靶基因核苷酸, 通常在 1 h 内完成<sup>[15-16]</sup>, 扩增产物可通过浊度或荧光染料监测。此外, LAMP 检测可在野外进行, 因此可用于现场测定<sup>[16]</sup>。基于 LAMP 的优点, 本研究开发了一种针对 GBS *Sip* 基因可用于野外现场检测的单步 LAMP 法, 并对其特异性和灵敏性进行评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 细菌菌株 罗非鱼 GBS 菌株、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)、爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)、哈氏弧菌(*Briohatveyi*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)与海豚链球菌(*S. iniae*), 均由广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室鉴定和保存。

1.1.2 主要试剂 细菌全基因组 DNA 提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; Loopamp DNA 扩增试剂盒购自日本荣研生物科技有限公司; PCR Master Mix、DNA Marker、钙黄绿素等, 购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.3 待检样品 2014 年 7—9 月, 从野外共收集样品 490

收稿日期: 2018-04-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 31372553); 广西自然科学基金(编号: 2015GXNSFAA139068)。

作者简介: 余艳玲(1976—), 女, 陕西咸阳人, 硕士, 工程师, 主要从事水产动物分子生物学研究。E-mail: yaeling@126.com。

通信作者: 李 军, 副研究员, 主要从事动物疫病防控与病原分子生物学研究工作。E-mail: jlee9981@163.com。

重庆: 西南大学, 2015。

[16] Talaiekhazani A, Rezania S. Application of photosynthetic bacteria for removal of heavy metals, macro-pollutants and dye from wastewater: a review[J]. Journal of Water Process Engineering, 2017, 19: 312–321.

[17] Li L X, Yang X M, Li A, et al. Research progress of photosynthetic bacteria in wastewater treatment[J]. Applied Mechanics & Materials, 2011, 71/72/73/74/75/76/77/78: 2831–2835.

[18] 涂玉佩, 陈玉凤, 韩贤菁, 等. 筛选高效光合细菌菌株处理猪场污水试验[J]. 环境工程, 2016, 34(增刊 1): 358–361.

[19] 宋协法, 潘玉兰, 马 真, 等. 单菌种和混合菌处理养殖污水的效果[J]. 环境工程学报, 2015, 9(7): 3281–3287.

[20] Zhou Q, Zhang G M, Lu Y F, et al. Feasibility study and process optimization of citric acid wastewater treatment and biomass production by photosynthetic bacteria[J]. Desalination & Water Treatment, 2015, 57(14): 1–7.

[21] 陈尚智, 胡勇有. 枯草芽孢杆菌对微污染水体的净化作用[J]. 环境科学学报, 2011, 31(8): 1594–1601.

[22] 何剑丹. 光合细菌处理生活污水和垃圾渗滤液的研究[D]. 成都: 四川师范大学, 2005.

份,其中健康罗非鱼样品 45 份,患病罗非鱼样品 415 份及养殖罗非鱼的池塘水样品 30 份(表 1)。

表 1 本研究收集的野外样品

来源	健康状况	组织	体质量 (kg)	来源 (地点)	数量 (份)
罗非鱼	健康	脑	10~100	广西北海	45
罗非鱼	患病	脑	30~250	广西钦州	69
罗非鱼	患病	脑	30~200	广西玉林	89
罗非鱼	患病	脑	30~200	广西南宁	113
罗非鱼	患病	脑	30~150	广东惠州	66
罗非鱼	患病	脑	30~250	广东湛江	78
池塘水				广东和广西	30

## 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备 将 GBS 接种到胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)中,28℃下培养 18 h,12 000 r/min 离心 10 min,沉淀重悬于 200 μL PBS 中,采用基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA。取 10 mg 罗非鱼脑组织于 0.9 mL PBS 中清洗,无菌研钵研磨,采用基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。池塘水经离心沉淀后提取 DNA。

1.2.2 引物设计与合成 根据 GBS *Sip* 基因序列(GenBank: HQ878436.1、DQ914255.1—DQ914274.1),采用 Primer Explorer version 4(<http://primerexplorer.jp/lamp>)设计 GBS 的 LAMP 引物。外部正向引物(F3)引物和反向引物(B3)序列分别为 F3:5′-GTAGCAGCCCCTAGAGTG-3′,B3:5′-GTTGTGCTACCGGTGTTG-3′;内部正向引物(FIP)和反向引物(BIP)序列分别为 FIP:5′-AGCTGATACATGCTCTGGTGATG GCAAGTGTAAAGTACTCACTC-3′,BIP:5′-GTTCTGTGACT ACGACTTCAACTTTTGTGCTACCGGAAGG-3′。NCBI BLAST 程序检查引物序列的特异性。引物 F3 和 B3 用于 PCR 扩增,以对比 LAMP 的灵敏性和特异性。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.3 LAMP 反应检测 采用 Loopamp DNA 扩增试剂盒进行 LAMP 反应,反应体系为 25 μL,其中 FIP 和 BIP 各 40 pmol,F3 和 B3 各 5 pmol,2×Reaction Mix 12.5 μL,钙黄绿

素 25 μmol/L,Bst DNA 聚合酶 1 μL,以及  $3.55 \times 10^1$  ng/μL 基因组 DNA 2 μL。LAMP 反应在 LA-320C 实时浊度计中进行,在 63℃测定 60 min,然后在 80℃灭活 5 min。以蒸馏水代替 DNA 模板作为阴性对照。

1.2.4 PCR 扩增检测 采用 F3 和 B3 为扩增引物进行 GBS 的 PCR 检测,扩增长度为 196 bp。PCR 反应总体积为 25 μL,包括 PCR Master Mix 12.5 μL,引物 F3 和 B3 各 1 μmol/L、 $3.55 \times 10^1$  ng/μL 基因组 DNA 2 μL。反应条件为:94℃预变性 2 min;94℃变性 20 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,30 次循环;72℃最终延伸 10 min。采用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,溴化乙锭染色,Bio-Rad Gel Doc EQ 凝胶成像系统成像分析。

1.2.5 LAMP 检测的特异性 以 GBS 菌株作为阳性对照,以蒸馏水作为阴性对照,以大肠杆菌、沙门氏菌、嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、爱德华氏菌、哈氏弧菌、创伤弧菌和与海豚链球菌作为参考细菌,进行 LAMP 的特异性检测。

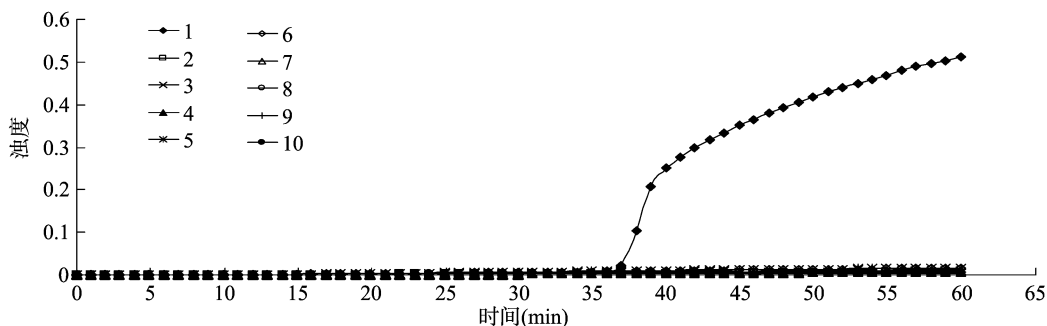
1.2.6 LAMP 和 PCR 检测灵敏度比较 将罗非鱼 GBS DNA 连续 10 倍稀释,稀释后的浓度范围为  $3.55 \times 10^1 \sim 3.55 \times 10^{-7}$  ng/μL。应用 LAMP 和 PCR 方法分别对其进行检测,比较 2 种检测技术对 GBS DNA 的最低检测浓度。同时,采用直接目视检测法,LAMP 反应在水浴中进行,当 LAMP 反应终止约 1 h 后,加入钙黄绿素染料进行终止反应,利用紫外光照射观察反应结果。

1.2.7 野外样本的检测 采用 LAMP 和 PCR 检测技术,分别对收集的 490 个野外样本进行了 GBS 检测。

## 2 结果

### 2.1 LAMP 检测的特异性

以 GBS 为阳性菌株,蒸馏水为阴性对照,8 株罗非鱼养殖池塘中常见的细菌为参考菌株,对 LAMP 引物进行特异性检测,结果发现,仅 GBS 能检测到扩增产物,其他 8 种参考细菌及阴性对照均无扩增产物(图 1),表明该引物组可用于无乳链球菌 *Sip* 基因的扩增,因此将引物 FIP 和 BIP 用作 LAMP 反应的引物。



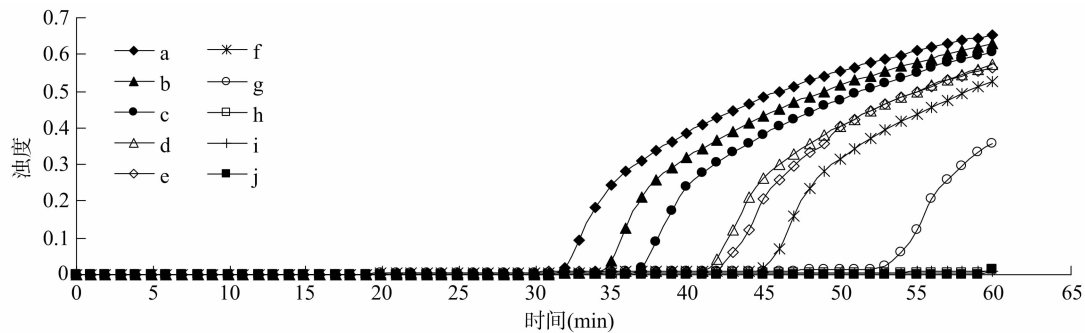
1—无乳链球菌;2—大肠杆菌;3—沙门氏菌;4—嗜水气单胞菌;5—维氏气单胞菌;6—爱德华氏菌;7—哈氏弧菌;8—创伤弧菌;9—海豚链球菌;10—蒸馏水

图1 无乳链球菌 *Sip* 基因引物特异性检测结果

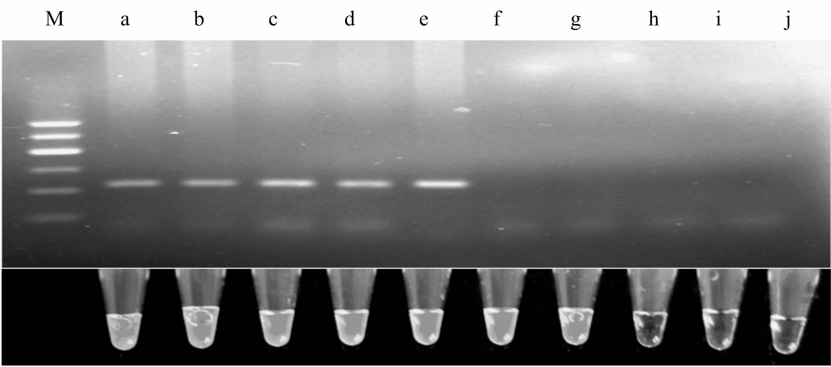
### 2.2 LAMP 检测的灵敏度

由图 2 可知,LAMP 和 PCR 对罗非鱼 GBS DNA 的最低检测浓度分别为  $3.55 \times 10^{-5}$  ng/μL 和  $3.55 \times 10^{-3}$  ng/μL,即 LAMP 检测灵敏度为 PCR 的 100 倍。罗非鱼 GBS DNA 浓度在  $3.55 \times 10^1 \sim 3.55 \times 10^{-5}$  ng/μL 间的 7 个浓度,LAMP 反应

孵育期分别为 33、35、37、41、42、45、53 min(图 2A),可检测 GBS 存在的最早时间点小于 40 min。通过直接目视检测法研究发现,LAMP 检测 GBS DNA 的最低检测浓度也为  $3.55 \times 10^{-5}$  ng/μL。



A. LAMP 检测罗非鱼 GBS *Sip* 基因的灵敏度结果



B. PCR 检测罗非鱼 GBS *Sip* 基因的灵敏度结果

a— $3.55 \times 10^1$  ng/ $\mu$ L; b— $3.55 \times 10^0$  ng/ $\mu$ L; c— $3.55 \times 10^{-1}$  ng/ $\mu$ L; d— $3.55 \times 10^{-2}$  ng/ $\mu$ L; e— $3.55 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L; f— $3.55 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L; g— $3.55 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L; h— $3.55 \times 10^{-6}$  ng/ $\mu$ L; i— $3.55 \times 10^{-7}$  ng/ $\mu$ L; j—蒸馏水; M—分子量标准

图2 LAMP 与 PCR 检测罗非鱼 GBS *Sip* 基因的灵敏度比较结果

2.3 野外样本的检测和测序

采用 LAMP 和 PCR 检测技术,分别对收集的 490 个野外样本进行了 GBS 检测,结果发现,患病罗非鱼样品中,LAMP 检测技术对 GBS 的检出率为 81.3%,而 PCR 对 GBS 的检出率为 60.72%,LAMP 方法对 GBS 的检测比 PCR 更敏感。同时,健康罗非鱼样本中也检测到 GBS,LAMP 和 PCR 技术的检

出率分别为 4.4% 和 2.2%,其检测差异较小。利用 LAMP 和 PCR 检测技术分别对罗非鱼养殖池塘水样品进行检测,结果显示,池塘水的 GBS 检出率分别为 10.0%、6.7% (表 2)。对 20 个 LAMP 检测阳性样品进行了测序,经序列比对发现,样品序列与 GBS *Sip* 基因部分序列的相似性为 100%。

表 2 LAMP 和 PCR 方法检测罗非鱼 GBS 的结果

来源	健康状况	组织	数量	LAMP 检出率 (%) (数量)	PCR 检出率 (%) (数量)
罗非鱼	健康	脑	45	4.4(2)	2.2(1)
罗非鱼	患病	脑	69	76.8(53)	57.9(40)
罗非鱼	患病	脑	89	89.8(80)	65.2(58)
罗非鱼	患病	脑	113	81.4(92)	60.2(68)
罗非鱼	患病	脑	66	80.3(53)	65.2(43)
罗非鱼	患病	脑	78	78.2(61)	55.1(43)
池塘水	无	无	30	10.0(3)	6.7(2)

3 讨论

目前,已建立了核糖体基因分型、随机扩增多态性 DNA (RAPD)<sup>[17-18]</sup> 和脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 等多种 GBS 检测方法<sup>[19]</sup>,然而仅通过表型检测 GBS 可能会有误导性。一些实验室将 CAMP(Christie-Atkins-Munch-Peterson)作为检测 GBS 的一种方法,但 CAMP 需要连续 2 d 过夜培养,非常耗时。PCR 或实时荧光定量 PCR 也被用于 GBS 检测<sup>[20-21]</sup>,同时 PCR 方法需要昂贵的专业仪器设备和试剂消耗,不适用于

野外检测,而且本研究建立的 LAMP 方法较 PCR 方法敏感性提高 100 倍,更适用于 GBS 的检测。尽管有关罗非鱼 GBS 的 LAMP 检测方法也有相关报道<sup>[22]</sup>,但本研究针对鱼类和哺乳动物 GBS 中高度保守 *Sip* 基因序列开发 LAMP 检测方法,与前人建立的比色 LAMP 测定方法相比,更能进行实时 LAMP 测定,不需要打开反应管即可获得检测结果,降低了阳性产物污染实验室的风险。

本研究分别采用 LAMP 和 PCR 法检测了罗非鱼和池塘水中的 GBS,发现 LAMP 检测灵敏度高于 PCR,同样的样品,

LAMP 对罗非鱼 GBS 的检出率为 81.3%, 而 PCR 仅为 60.7%, 提示 LAMP 法更适用于实地检测 GBS, 也意味着先前采用 PCR 检测罗非鱼 GBS 可能低估了 GBS 的传播范围或 GBS 引起的死亡率。另一方面, 本研究中罗非鱼 GBS 的平均检出率为 81.3%, 低于 Chen 等报道 GBS 的平均检出率 (97.7%)<sup>[2]</sup>, 这可能是由于 2 项研究所收集样品的时间段不同造成的。Chen 等收集样品的时间段为 2009—2011 年<sup>[2]</sup>, 是我国罗非鱼链球菌发病的高峰期, 而本研究样品收集时间为 2014 年, 与其相比, 罗非鱼链球菌病的发病率较低, 故检出率较低, 此外还可能是 2 项研究中样本量的差异导致的。

Li 等研究发现, 无典型临床症状或死亡的罗非鱼或为 GBS 的载体<sup>[23]</sup>。本研究的野外样品检测结果显示, 应用 LAMP 和 PCR 在健康无症状的罗非鱼大脑样品检测到 GBS, 与 Li 等研究的结果<sup>[23]</sup>一致, 表明罗非鱼可能为 GBS 病原体的无症状携带者。此外, 采用 LAMP 和 PCR 分别从池塘水中检测到 GBS, 表明 GBS 可能在野生环境中正常生长, 当罗非鱼的免疫反应较弱时才可能感染。虽然目前尚无罗非鱼源 GBS 菌株对人类感染性的研究报道, 但应高度关注野生环境中 GBS 能在罗非鱼与人类之间传播, 并采取一些切实可行的措施以防止该病发生。

#### 参考文献:

- [1] Klesius 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(1/2/3/4): 180 – 186.
- [2] Chen M, Li L P, Wang R, et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China [J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 159(3/4): 526 – 530.
- [3] Mian G F, Godoy D T, Leal C G, et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia [J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 136(1): 180 – 183.
- [4] Evans J J, Bohnsack J F, Klesius P H, et al. Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2008, 57(11): 1369 – 1376.
- [5] Evans J J, Klesius P H, Pasnik D J. Human streptococcus agalactiae isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15(5): 774 – 776.
- [6] Bowater R O, Forbes – Faulkner J, Anderson I G, et al. Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland Australia [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2012, 35(3): 173 – 186.
- [7] Jafar Q A, Sameer A Z, Salwa A M, et al. Molecular investigation of *Streptococcus agalactiae* isolates from environmental samples and fish specimens during a massive fish kill in Kuwait Bay [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, 3(1): 22 – 26.
- [8] Pereira U P, Mian G F, Oliveira I M, et al. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(1): 186 – 192.
- [9] Ye X, Li J, Lu M X, et al. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond – cultured tilapia in China [J]. *Fisheries Science*, 2011, 77(4): 623 – 632.
- [10] Manning S D, Springman A C, Lehotzky E, et al. Multilocus sequence types associated with neonatal group B streptococcal sepsis and meningitis in Canada [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(4): 1143 – 1148.
- [11] Chaiwarith R, Jullakiet W, Bunchoo M, et al. *Streptococcus agalactiae* in adults at Chiang Mai University Hospital: a retrospective study [J]. *BMC Infectious Diseases*, 2011, 11(1): 149.
- [12] Lambertsen L, Ekelund K, Skovsted I C, et al. Characterisation of invasive group B streptococci from adults in Denmark 1999 to 2004 [J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2010, 29(9): 1071 – 1077.
- [13] Herbst K, Bujara M, Heroven A K, et al. Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of yersinia virulence regulator RovA [J]. *PLOS Pathogens*, 2009, 5(5): e1000435.
- [14] Delannoy C M, Crumlish M, Fontaine M C, et al. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish [J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13(1): 41.
- [15] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop – mediated isothermal amplification using loop primers [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16(3): 223 – 229.
- [16] Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop – mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(5): 877 – 882.
- [17] 王健胜, 侯桂玲, 谢永凤. 国内外苜蓿品种遗传多样性 RAPD 分析 [J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(13): 35 – 38.
- [18] 李红, 李超, 张敏. 金针菇菌株遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(1): 19 – 22.
- [19] Toranzo A E, Magariños B, Romalde J L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems [J]. *Aquaculture*, 2005, 246(1/4): 37 – 61.
- [20] Emaneini M, Mirsalehian A, Beigvierdi R, et al. High incidence of macrolide and tetracycline resistance among *Streptococcus agalactiae* strains isolated from clinical samples in Tehran [J]. *Maedica*, 2014, 9(2): 157 – 161.
- [21] Poncetlet – Jasserand E, Forges F, Varlet M N, et al. Reduction of the use of antimicrobial drugs following the rapid detection of *Streptococcus agalactiae* in the vagina at delivery by real – time PCR assay [J]. *BJOG*, 2013, 120(9): 1098 – 1109.
- [22] 郑磊, 樊海平, 吴斌, 等. 罗非鱼无乳链球菌 LAMP 快速检测方法的建立 [J]. *福州大学学报 (自然科学版)*, 2015, 43(4): 572 – 576.
- [23] Li Y W, Liu L, Huang P R, et al. Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *Streptococcus agalactiae* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2014, 37(8): 757 – 763.