

论著

使用环介导等温扩增技术快速检测食品中
肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的初步研究易海华¹ 赵金伟¹ 徐波¹ 吴萍兰¹ 宋阳威¹ 房超¹ 徐政¹ 徐继承²

(1. 徐州出入境检验检疫局, 江苏 徐州 221006; 2. 徐州医学院全科医学系, 江苏 徐州 221001)

摘要:目的 探索建立一种快速、简单的食品中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的检测方法。方法 针对编码 O157:H7 脂多糖的 *rfbE* 基因 (GenBank S83460) 和编码 H7 鞭毛抗原的 *fliC* 基因 (GenBank L07388) 特征性保守序列, 利用环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 核酸扩增基因技术, 对 21 株 O157:H7 和非 O157:H7 菌株进行特异性检测, 并与聚合酶链式反应方法进行比较。同时使用部分食品样品对 LAMP 法检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的实际运用价值进行评估。结果 LAMP 法可以在 1 h 内完成检测工作。LAMP 法检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的灵敏度为 96.72%, 特异度为 85.71%, 准确性为 93.26%。结论 LAMP 检测技术的灵敏度较聚合酶链式反应技术高。LAMP 是一种简单、快速的检测技术, 适用于筛选可疑大肠杆菌 O157:H7 样本。

关键词: 肠出血性大肠杆菌 O157:H7; 环介导等温扩增; *rfbE* 基因; *fliC* 基因

中图分类号: R117; R155.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2010)03-0206-08

Rapid Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Food by Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay

YI Hai-hua, ZHAO Jin-wei, XU Bo, WU Ping-lan, SONG Yang-wei, FANG Chao, XU Zheng, XU Ji-cheng
(Xuzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of P. R. C., Jiangsu Xuzhou 221006, China)

Abstract: Objective To develop a rapid and simple method of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detecting *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 in foods. **Method** Based on the characteristic conserved sequence of lipopolysaccharide gene (*rfbE*, GenBank S83460) of O157 antigen and flagellin gene (*fliC*, GenBank L07388) of H7 antigen, the loop-mediated isothermal amplification method was developed to detect the specificity of twenty-one *E. coli* O157:H7 strains and non *E. coli* O157:H7 strains. The results of LAMP were compared with polymerase chain reaction (PCR). The feasibility of LAMP was evaluated by detecting *E. coli* O157:H7 in food samples. **Results** The detection could be finished by LAMP within 1 h; The sensitivity was 96.72%, the specificity was 85.71% and the accuracy was 93.26%. **Conclusion** The sensitivity of LAMP was higher than that of PCR. LAMP is a simple, rapid method suitable for screening *E. coli* O157:H7 in suspicious samples.

Key words: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7; Loop-Mediated Isothermal Amplification; *rfbE* Gene; *fliC* Gene

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 是正常寄生于人和动物肠道的革兰氏阴性菌, 多数不致病。其中产志贺毒素大肠杆菌 (*Shiga Toxin-producing E. coli*, STEC) 是重要的食源性病原菌, 在人类可引起严重的胃肠道和循环系统疾病, 如出血性结肠炎 (hemorrhagic colitis, HC)、溶血尿毒综合征 (hemolytic uremic syndrome, HUS) 等甚至死亡。肠

出血性大肠杆菌 (*Enterohemorrhagic E. coli*, EHEC) O157:H7 是 STEC 中最主要的血清型。自 1982 年美国首次分离该菌以来, 世界各地不断有 O157 所致疾病散发和暴发的报告, 已构成严重的公共卫生问题。因此, 快速、敏感、特异的检测方法对于临床诊断和保障食品安全是必不可少的。

传统微生物学方法从临床和环境标本分离、鉴定 *E. coli* O157:H7 包括选择性培养^[1]、生化和免疫^[2]、毒素的细胞学试验^[3]等, 需要时间较长。而针对 *E. coli* O157:H7 特异靶基因的分子生物学方法在检测时限、特异性和敏感性上有着自身优势^[4]。环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是一种新型 DNA 扩增技术^[5]。

收稿日期: 2009-06-18

基金项目: 江苏出入境检验检疫局科研专项基金项目 (2007KJ29)

作者简介: 易海华 男 主管医师 研究方向为病原微生物诊断

E-mail: yihaihua88@126.com

通信作者: 赵金伟 男 研究员 E-mail: zhaojw@jsciq.gov.cn

它依赖于一套针对靶基因的 4~6 条引物(包括一组内引物 FIP 和 BIP, 一组外引物 F3 和 B3 或加一组环状引物), 利用具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶, 在 60~65 °C 左右的恒温条件下即可完成对靶基因的特异性扩增。LAMP 反应的引物是针对一个目标基因的 6~8 个区段进行设计的, 特异性高; 其反应温度恒定, 不需要基因扩增仪; 反应只需要 8~10 个拷贝的模板 DNA, 在 60 min 以内就能扩增 $10^9 \sim 10^{10}$ 倍的产物, 快速高效^[6]。在 LAMP 反应过程中, 从 dNTPs 中析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的镁离子结合, 能产生焦磷酸镁的沉淀物, 出现浑浊沉淀, 因此在进行离心后用肉眼就可判定扩增结果, 无需电泳^[7]。也可加入荧光染料在紫外灯下进行显影判断^[8]。所有这些特性都为其在快速检测食品及临床样品中 *E. coli* O157: H7 的应用奠定了基础。

本文针对编码 O157: H7 脂多糖的 *rfbE* 基因 (GenBank S83460) 和编码 H7 鞭毛抗原的 *fliC* 基因 (GenBank L07388) 特征性保守序列设计 2 套各 3 对引物对食品中的 *E. coli* O157: H7 相关保守序列进行检测, 并优化了其反应条件, 建立了快速、特异、灵敏的检测 *E. coli* O157: H7 的 LAMP 方法。并着重对 LAMP 技术与 PCR 技术在检测 *E. coli* O157: H7 的灵敏度方面做了比较, 验证该方法的可靠性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 部分常见的食源性病原菌菌株, 共 21 株, 用于分析 LAMP 反应体系引物的特异性, 它

们的编号及来源见表 1。其中, *E. coli* O157: H7 (菌株编号: 44113) 用于 LAMP 条件优化及其灵敏度分析的实验。

1.1.2 主要试剂 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (上海生工生物工程技术有限公司); BstDNA 聚合酶大片段, 以下简称为 BstDNA 聚合酶 (New England Biolab 公司); dNTP (美国 Genview 公司); DNA Marker (大连宝生物工程有限公司); 琼脂糖 (西班牙 Biowest 公司); 溴化乙锭 (Sigma 公司); 甜菜碱 (Sigma 公司); Smartgreen 荧光染料 (北京美莱博公司); Buffer (北京美莱博公司)。

1.1.3 仪器 核酸蛋白质分析仪 (德国 Whatman Biometra 公司); DYY-8C 电泳仪 (北京六一仪器厂); 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); GL200 凝胶成像系统 (美国 Eastman Kodak 公司); Centrifuge 5415R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 数显恒温水浴锅 HH-2 (国华电器有限公司); 恒温摇床 (武汉瑞华仪器设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 采用引物设计软件 Primer Explorer 4.0, 针对编码 O157: H7 脂多糖的 *rfbE* 基因 (GenBank S83460) 和编码 H7 鞭毛抗原的 *fliC* 基因 (GenBank L07388) 特征性保守序列设计 2 套各 3 对引物, 分别包括外引物 F3 (forward primer) 和 B3 (backward primer)、内引物 FIP (forward inner primer) 和 BIP (backward inner primer) 以及环引物 LF (loopF) 和 LB (loopB) (见图 1、表 2 和表 3)。引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 实验所用菌株及其 LAMP 反应特异性

序号	菌株编号	名称	来源	<i>rfbE</i> 基因 LAMP 反应	<i>fliC</i> 基因 LAMP 反应
1	44113	肠出血性大肠杆菌 (EHEC) O157: H7	中国药品生物制品检定所	+	+
2	8009	大肠杆菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
3	ATCC25922	大肠埃希菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
4	6538	金黄色葡萄球菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
5	ATCC25923	金黄色葡萄球菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
6	ATCC27853	铜绿假单胞菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
7	ATCC9372	枯草杆菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
8	49102	普通变形杆菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
9	50013	鼠伤寒沙门菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
10	51302	福氏志贺菌 II a	江苏省疾病预防控制中心	-	-
11	51334	宋内氏志贺菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
12	92001	非 O-1 群霍乱弧菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
13	50071	伤寒沙门菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
14	63301	腊样芽孢菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
15	44814	产毒大肠杆菌 (LT+)	江苏省疾病预防控制中心	-	-
16	32209	甲型溶血性链球菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
17	32210	乙型溶血性链球菌	江苏省疾病预防控制中心	-	-
18	89001	副溶血性弧菌	中国药品生物制品检定所	-	-
19	44824	致病性大肠杆菌	中国药品生物制品检定所	-	-
20	10231	白色念珠菌	中国药品生物制品检定所	-	-
21	54001	单核细胞增生李斯特菌	中国药品生物制品检定所	-	-

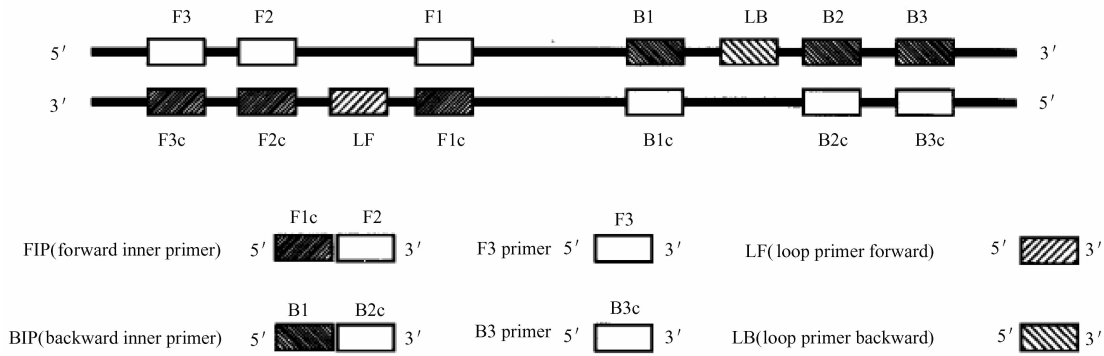


图 1 LAMP 反应引物设计示例

表 2 针对编码 O157: H7 脂多糖的 *rfbE* 基因(GenBank S83460) 的 LAMP 反应引物序列组成

引物	类别	序列组成
F3	前外引物	5'-AGTCCACAAGGAAAGTAAAGATG-3'
B3	后外引物	5'-ATTCCACGCCAACCAAGAT-3'
FIP	前内引物	5'-GCAAGGTGATTCTTAATTCTCTCTCT TTCACACTTATTGGATGGTCTC-3'
BIP	后内引物	5'-CATCGAAACAAGGCCAGTTTTTTACCTTCTCTCAGCTATAGGGTGTCTT-3'
LoopF	环状引物	5'-CCTCTGCGGTCTAGTTAG-3'
LoopB	环状引物	5'-CACACGATGCCAATGTACTC-3'

表 3 针对编码 H7 鞭毛抗原的 *fliC* 基因(GenBank L07388) 的 LAMP 反应引物序列组成

引物	类别	序列组成
F3	前外引物	5'-GCGCTGTCGAGTTCTATCG-3'
B3	后外引物	5'-TTAGTTCGGGTAGAAGCCTGA-3'
FIP	前内引物	5'-AAACGGTTAGCAATCGCCTGAC TT CTGTCTTCTGGCTTGCCTA-3'
BIP	后内引物	5'-CTGACTCAGGCTGCACGTAACG TTT TCACGGATACGCTGTAAGTTG-3'
LoopF	环状引物	5'-GTCATCCTTCGCGCTGTA-3'
LoopB	环状引物	5'-TGTTGCACAGACCACCGA-3'

1.2.2 细菌 DNA 提取 将营养琼脂斜面上的细菌接种乳糖肉汤(LB),37℃培养 18 h。取细菌培养物 1 ml 于 12 000 r/min 离心 5 min;沉淀用 0.8 ml 1 × TE(100 mmol/L Tris-HCl,10 mmol/L EDTA,pH 8.0)洗涤,12 000 r/min 离心 5 min,沉淀加入 100 μl 无菌水,混匀后,于 100℃沸水浴 15 min,立即冰浴 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,上清液即为 DNA 模板。

1.2.3 LAMP 反应体系步骤反应产物的分析 配制反应体系 25 μl,根据预试验拟定体系组成初步定位为:1 × Bst 缓冲液,6 mmol/L 氯化镁,0.8 mol/L 甜菜碱,2 mmol/L dNTP,0.2 μmol/L F3 和 B3 引物,1.6 μmol/L FIP 和 BIP 引物,0.8 μmol/L LF 和 LB 引物,8U DNA 大片段聚合酶及一定量的 DNA 提取物,反应步骤为:60℃1 h,80℃5 min 终止反应,LAMP 扩增产物取 5 μl,在 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析,同时 LAMP 扩增的每个管中加入 1.0 μl 20 × Smartgreen 荧光染料混匀,在紫外灯(302 nm)下显影。

由于 LAMP 反应最终产生白色混浊焦磷酸镁沉淀,故本实验可在 5 000 r/min 离心 5 min 后通过肉眼或实时浊度计进行结果观察,同时添加 1 μl

Smartgreen 荧光染料,在紫外灯的照射下(302 nm 波长),阳性反应体系呈绿色。使用琼脂糖凝胶电泳技术对反应过程及产物进行分析。

1.2.4 PCR 反应 使用针对编码 O157: H7 脂多糖的 *rfbE* 基因及编码 H7 鞭毛抗原的 *fliC* 基因的各自引物中的 F3、B3 引物在同一反应体积中共同进行 PCR 反应,反应体积 50 μl,包括 10 × buffer 5 μl、0.2 mmol/L dNTPs、2.0 mmol/L 氯化镁及模板 5 μl。引物各 1 μl (反应终浓度 0.15 pmol/μl),Taq 酶 115 U,反应程序为 94℃7 min 预变性 DNA 后,按 94℃30 s、57℃45 s、72℃1 min 进行 35 个循环,然后 72℃延伸 7 min,4℃保存。PCR 产物检测用含 0.5 μg/ml 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶电泳,分子量 100 ~ 2000 bp Marker 作参照,紫外灯下观察实验结果。

1.2.5 LAMP 方法有效性的验证 用建立的 LAMP 方法分别对 21 株实验菌株进行扩增,电泳观察扩增结果,验证方法特异性。

将过夜培养的 *E. coli* O157: H7 (菌株编号: 44113) 菌液稀释至 10⁻¹ ~ 10⁻¹⁰,取各稀释度菌液 100 μl 进行平板计数。同时,取各稀释度菌液 1 ml,用煮沸法提取 DNA,取 2 μl 上清液作为模板分别进行 LAMP 及 PCR 扩增。

LAMP 法在食品样品中 *E. coli* O157: H7 的检测应用评估选择 89 份食品样品,分别使用细菌培养鉴定和 LAMP 进行检测并对结果进行比较。

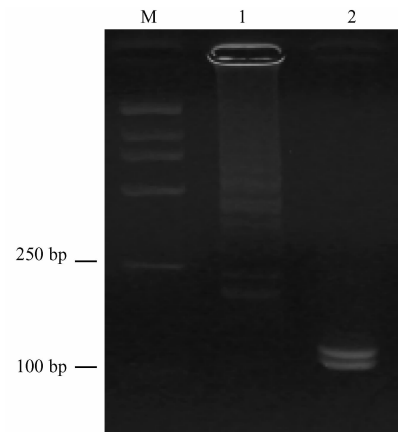
2 结果

2.1 LAMP 检测方法的建立

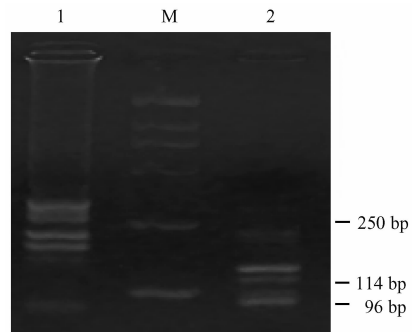
电泳检测结果见图 2 和图 3。*E. coli* O157: H7 基因组 DNA 泳道产生阶梯状条带,以水作为模板的阴性对照无条带出现;另外,肉眼观察反应管,发现阳性反应管中反应体系较反应前混浊,而阴性对照管未见混浊。5 000 r/min 离心数秒,可见阳性管底部有少量白色沉淀,而阴性对照管未出现,结果见图 4,结果表明此套 LAMP 引物能够有效扩增 *E. coli* O157: H7 中的 *rfbE* 基因及 *fliC* 基因。

2.2 LAMP 法与 PCR 法扩增灵敏度的比较

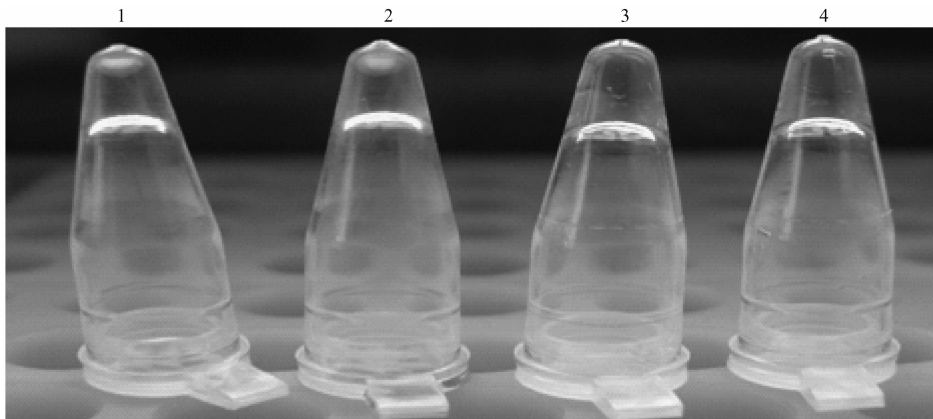
将标准菌株 *E. coli* O157: H7 DNA 经 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 倍梯度稀释,比较两者的灵敏度后发现,在检测 *rfbE* 基因时待测标本稀释至 10^{-3} 倍时 PCR 法就难以进行准确的检测了,而 LAMP 法在标本稀释至 10^{-6} 倍时仍然能够获得较好的扩增结果,沉淀法检测可以达到相同的效果(见图 5 和图 6)。在检测 *fliC* 基因时待测标本稀释至 10^{-5} 倍时 PCR 法就难于进行准确的检测了,而 LAMP 法在标本稀释至 10^{-7} 时仍然能够获得较好的扩增结果,沉淀法检测可达到相同的效果(见图 7 和图 8)。从反应管(条)



注:M 为 1 kb Plus DNA Ladder;1. 标准菌株;2. 阴性对照
图 2 LAMP 扩增 *E. coli* O157: H7 中的 *rfbE* 基因的产物电泳图



注:M 为 1 kb Plus DNA Ladder;1. 标准菌株;2. 阴性对照
图 3 LAMP 扩增 *E. coli* O157: H7 中的 *fliC* 基因的产物电泳图



注:管 1、管 2 分别为 *E. coli* O157: H7 中的 *rfbE* 基因及 *fliC* 基因 LAMP 产物沉淀图;管 3、管 4 分别为其阴性对照图。

图 4 *E. coli* O157: H7 LAMP 产物沉淀图

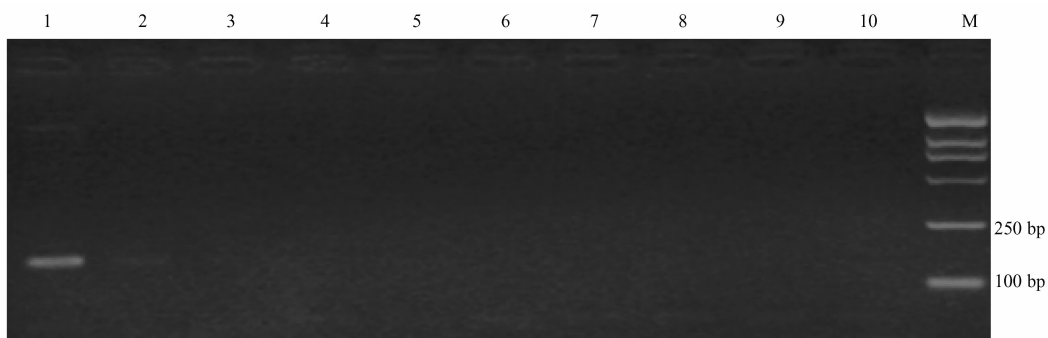


图 5a 倍比稀释的 *rfbE* 基因 PCR 产物电泳图

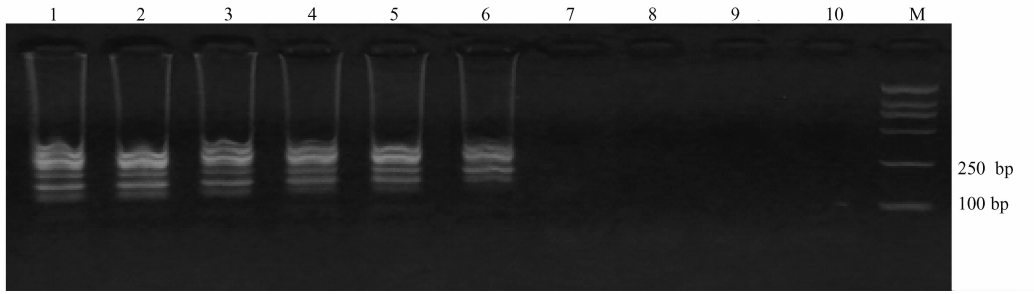


图5b 倍比稀释的 *rfbE* 基因 LAMP 产物电泳图

注:图5a、b中1~10分别为 $10^4 \sim 10^{-4}$ CFU/ml *E. coli* O157:H7的核酸 *rfbE* 基因扩增电泳图;
M为1 kb Plus DNA Ladder。

图5 LAMP法和PCR法在检测 *E. coli* O157:H7中 *rfbE* 基因的灵敏度比较

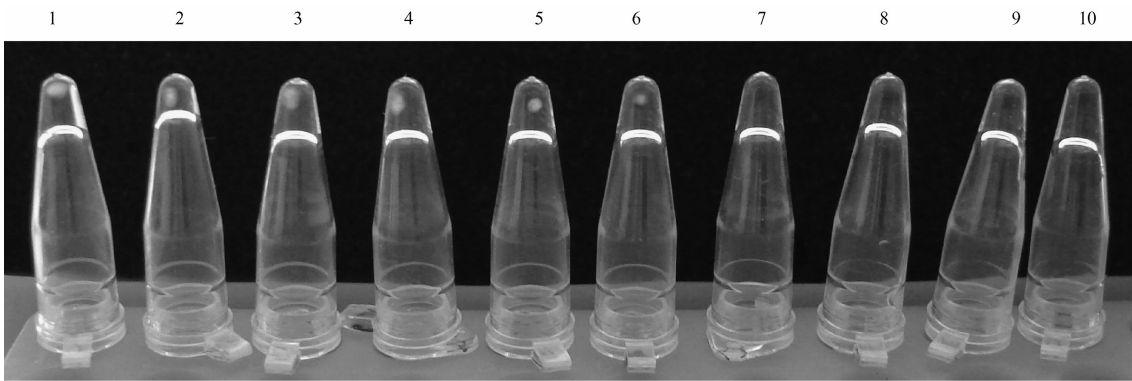


图6 倍比稀释的 *rfbE* 基因 LAMP 产物沉淀图

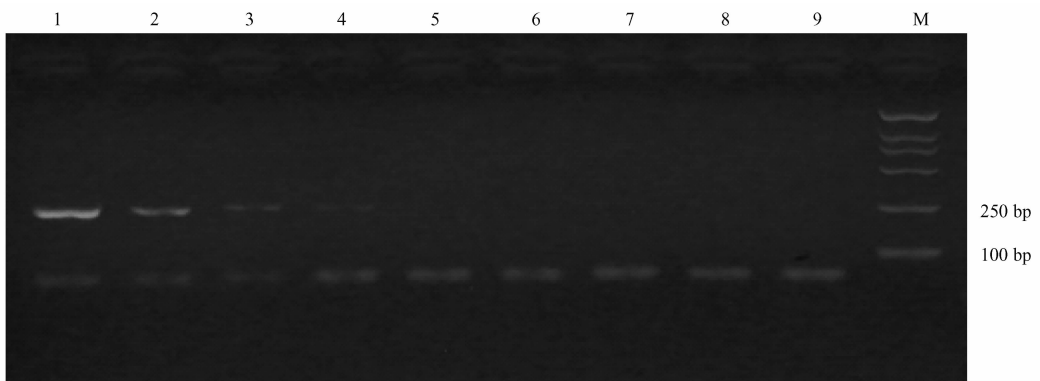


图7a 倍比稀释的 *fliC* 基因 PCR 产物电泳图

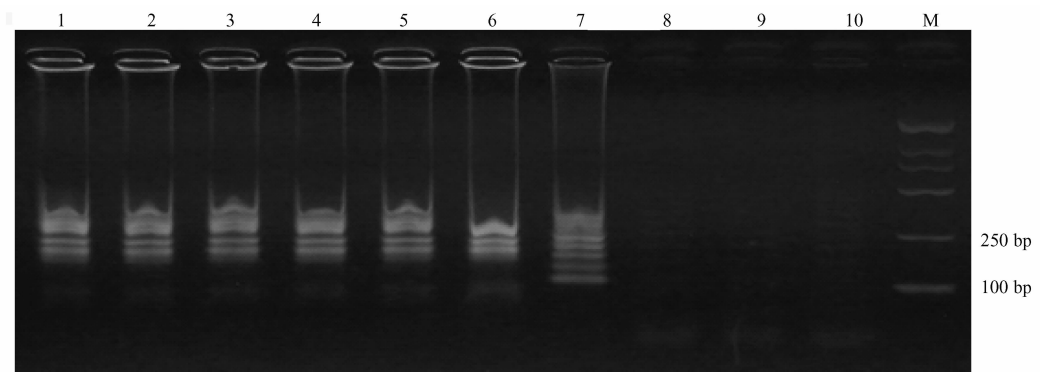
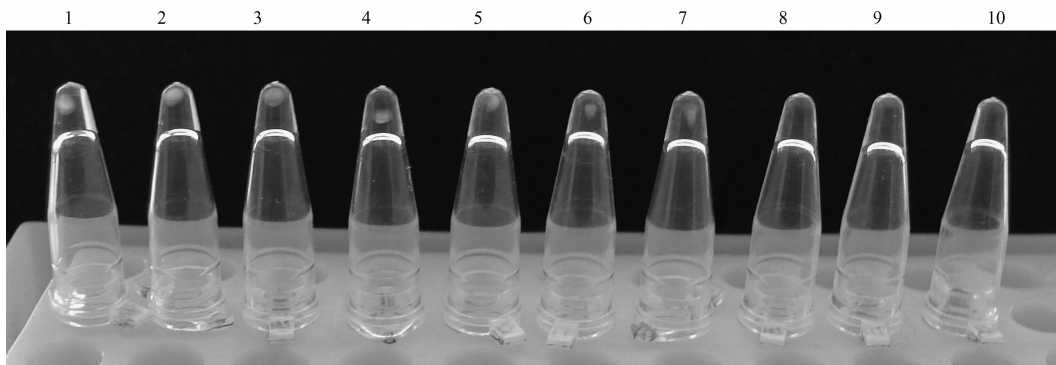


图7b 倍比稀释的 *fliC* 基因 LAMP 产物电泳图

注:图7a、b中1~10分别为 $10^4 \sim 10^{-4}$ CFU/ml *E. coli* O157:H7的核酸 *rfbE* 基因扩增电泳图;M为1 kb Plus DNA Ladder。

图7 LAMP法和PCR法在检测 *E. coli* O157:H7中 *fliC* 基因的灵敏度比较

图8 倍比稀释的 *fliC* 基因 LAMP 产物沉淀图

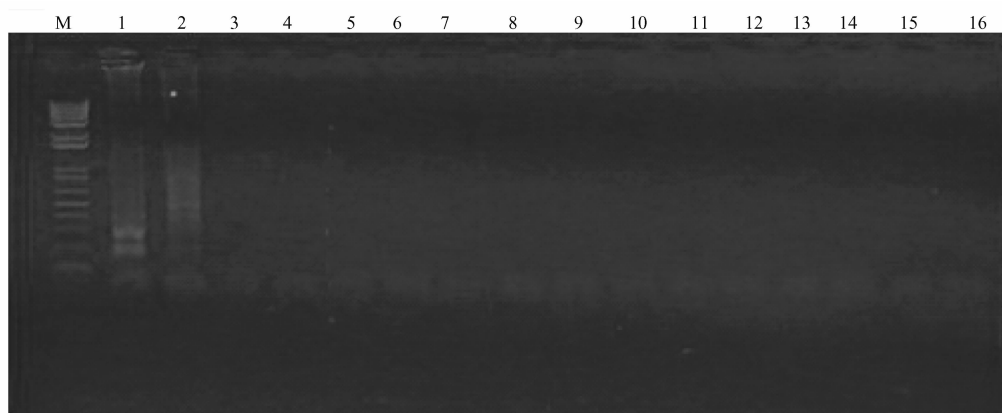
1 号到 10 号原细菌浓度分别为 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} CFU/ml。结果表明, LAMP 检测灵敏度比 PCR 高 10^3 倍以上, 检测最低浓度可达到 10^{-1} CFU/ml。

2.3 LAMP 检测 *E. coli* O157: H7 的特异性结果

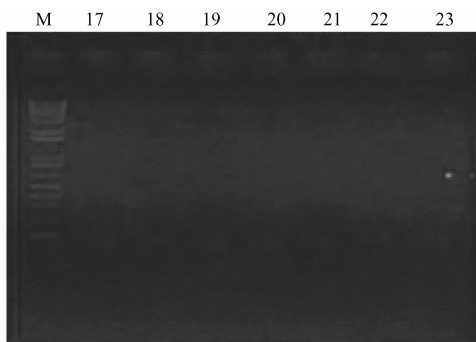
用建立的 LAMP 方法分别对 21 株实验菌株进行扩增, 电泳观察扩增结果, 验证方法特异性。结果表明, 只有 *E. coli* O157: H7 同时对 *rfbE* 基因及 *fliC* 基因的 LAMP 反应呈阳性, 其他细菌均没有表现此类阳性反应, 见表 1 及图 9 和图 10。

2.4 LAMP 法在食品样品的检测应用

取传统方法和 LAMP 方法预检 *E. coli* O157: H7 阴性的牛肉 10 g 加入到 90 ml 磷酸盐缓冲液中, 于组织捣碎机中匀浆约 60 s, 制成牛肉匀浆。取 10 ml 牛肉匀浆接入 1 ml 已知浓度的 *E. coli* O157: H7 标准菌株, 混匀作为食品样品原样, 分别模拟含 *E. coli* O157: H7 及不含 *E. coli* O157: H7 的样品共 89 份。将样品用普通营养肉汤增菌, 37 °C 培养 24 h, 分别按照 1.2.2 法进行 DNA 提取后, 再进行 LAMP 扩增及细菌培养鉴定, 具体结果见表 3。

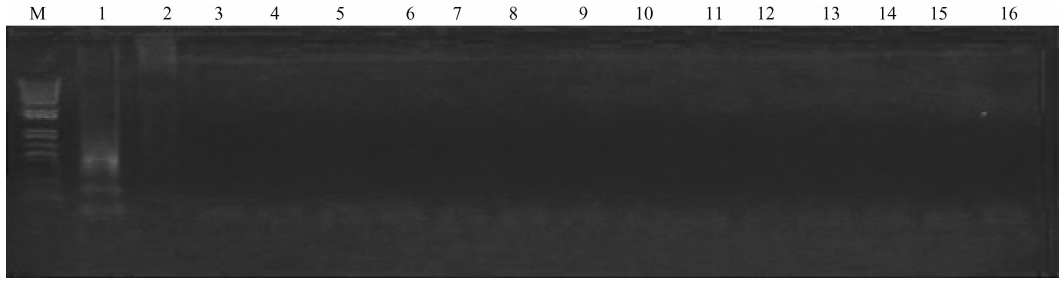


注: M 为 1 kb Plus DNA Ladder; 1. 标准菌株; 2. 阳性菌株; 3. 49102; 4. 27853; 5. 44814; 6. 50071; 7. 32210; 8. 51302; 9. 8009; 10. 10231; 11. 25923; 12. 89001; 13. 63301; 14. 9372; 15. 50013; 16. 51334。

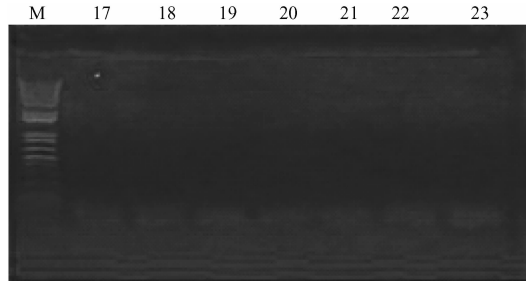


注: M 为 1 kb Plus DNA Ladder; 17. 32209; 18. 25922; 19. 92001; 20. 6538; 21. 97001; 22. 44149; 23. 空白对照。

图9 *E. coli* O157: H7 及相关致病菌 *rfbE* 基因 LAMP 产物电泳图



注: M 为 1 kb Plus DNA Ladder; 1. 标准菌株; 2. 阳性菌株; 3. 49102; 4. 27853; 5. 44814; 6. 50071; 7. 32210; 8. 51302; 9. 8009; 10. 10231; 11. 25923; 12. 89001; 13. 63301; 14. 9372; 15. 50013; 16. 51334。



注: M 为 1 kb Plus DNA Ladder; 17. 32209; 18. 25922; 19. 92001; 20. 6538; 21. 97001; 22. 44149; 23. 空白对照。

图 10 *E. coli* O157: H7 及相关致病菌 *fliC* 基因 LAMP 产物电泳图

表 3 LAMP 法与培养法检测食品样品中 *E. coli* O157: H7 结果比较

LAMP 法	培养法		合计
	阳性	阴性	
阳性	59	4	63
阴性	2	24	26
合计	61	28	89

结果分析: 灵敏度 = $59/59 + 2 = 96.72\%$; 特异度 = $24/4 + 24 = 85.71\%$; 准确性 = $(59 + 24)/(61 + 28) = 93.26\%$ 。

3 讨论

1977 年 Spesri 等^[9] 提出某些大肠杆菌能引起人类出血性腹泻。1982 年美国俄勒冈和密执安州分别发生了一些出血性肠炎的暴发流行, 并从 1 例患者粪便中分离出 *E. coli* O157: H7^[10]。随之, 加拿大、英国、日本和美国其他州也报道了 *E. coli* O157: H7 所致的暴发和散发病例^[11,12]。据 WHO 资料^[13], 1996 年 6-8 月在日本大阪地区发生至今最大的一起 O157: H7 大肠杆菌暴发流行, 感病 9 000 多人, 11 例死亡^[14]。1987 年我国首次在江苏检出 *E. coli* O157: H7^[15], 此后在河南^[16]、上海^[17]、天津^[18] 等地区都有检出。O157: H7 的感染剂量极低^[19,20], 毒性较强, 因此筛选 *E. coli* O157: H7 的方法是否灵敏、特异及快速至关重要^[21]。

传统的 PCR 技术是目前检测 *E. coli* O157: H7 的基因诊断技术中最常用的方法之一, 该方法能将微量标本进行快速扩增, 但在特异性、简便程度、温度和试剂仪器要求等方面有缺点^[22]。本文中的

LAMP 技术一定程度解决了目前基因检测的不足^[23]。LAMP 技术利用 BstDNA 聚合酶和根据不同靶序列设计的两对特殊的内、外、环状引物, 特异性识别靶序列上的 8 个独立区域, 启动循环链置换反应。LAMP 反应中, 内引物杂交在目标 DNA 区, 启动互补链合成, 导致哑铃状 DNA 产生。这种结构很快以自身为模板, 进行 DNA 合成延伸, 形成茎-环 DNA 结构, 这个茎-环 DNA 结构作为 LAMP 循环的起始结构。由于内引物杂交在茎-环的环上, 引物链置换合成的 DNA 产生一个有缺口的茎-环 DNA 中间媒介, 在茎上附有目标序列。再通过外引物, 在茎的末端形成环状结构, 结果在同一链上互补序列周而复始形成有很多环的花椰菜结构的茎-环 DNA 混合物^[23,24]。在 LAMP 反应过程中, 从 dNTP 析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg^{2+} 结合, 产生副产物-焦磷酸镁乳白色沉淀或加入荧光染料, 即可通过肉眼观察判定结果。LAMP 反应是在恒温 (63 °C 左右) 进行的。这种比较温和的温度条件以及没有温度循环使得仪器简单化。

研究表明, 使用本文方法检测 *E. coli* O157: H7 的灵敏度较高, 在待测 DNA 稀释到 10^2 CFU/ml 时 PCR 法就难以进行准确的检测了, 而

LAMP 法在标本稀释到 10^{-1} CFU/ml 时仍然能够获得较好的扩增结果,同时使用 21 株相关致病菌进行检测特异性评估,只有 *E. coli* O157: H7 同时对 *rfbE* 基因及 *fliC* 基因的 LAMP 反应呈阳性,其他细菌均没有表现此类阳性反应。LAMP 可以简化操作步骤,节省试剂,并节省时间和费用,但实验过程中也发现对于细菌量较少的检测标本,如果不经过增菌,特别是对于较少的菌量即可致病的 O157: H7 时,采用 LAMP 检测也可能出现假阴性结果。因此如果条件和时间允许,建议应尽量采取增菌步骤,增菌时间需在 2 h 以上,如果是成分比较复杂的标本,还应考虑其中非致病菌的 DNA 及其他抑制因子对 LAMP 灵敏度的影响,应适当增加增菌时间,为提高 *E. coli*O157: H7 的检测灵敏度,还可采取一些细菌富集技术如免疫磁珠捕获浓缩再进行检测,同时由于在方法评价时使用的阳性菌株较少,有必要在方法的适用性方面进行更深入的探索。因此,可以认为 LAMP 法是一种简便、快速、高度特异性的细菌基因扩增检测法,该方法适用于大量样品的快速筛选。

参考文献

- [1] 潘跃顺, 阚方琦, 赵克义, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157: H7 增菌培养基的研制及模拟标本增菌效果观察[J]. 预防医学文献信息, 2001, 7(5): 524-526.
- [2] PARK C H, VANDEL N M, HIXON D L, et al. Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157: H7 directly from stool specimens[J]. Clin Microbiol, 1996, 34: 988-990.
- [3] CLARK C G, JOHNSON S, JOHNSON R P, et al. Further characterisation of a monoclonal antibody reactive with *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Clin Microbiol, 1995, 43(4): 262-269.
- [4] HOLLAND J L, LOUIE L, SIMOR A E, et al. PCR detection of *Escherichia coli* O157: H7 directly from stools: Evaluation of commercial extraction method for purifying fecal DNA [J]. Clin Microbiol, 2000, 38(11): 4108 - 4113.
- [5] NAGAMINE K, KUZUHARA Y, NOTOMI T. Isolation of Single-Stranded DNA from Loop-Mediated Isothermal Amplification Products [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(4): 1195-1198.
- [6] NAGAMINE K K, WATANABE K. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template [J]. Clin Chem, 2001, 47: 1742-1743.
- [7] ISPEIRS J, STAVRIC S, KONOWLCHUK J, et al. Assay of *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin with Vero cells [J]. Infect Immun, 1977, 16: 617-622.
- [8] RILEY L W, RE MIS R S, HELGERSON S D, et al. Outbreaks of hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype [J]. N Engl J Med, 1983, 308: 681-685.
- [9] MARTINA B, HERBERT S, ALMUT C, et al. Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157: H-strains and a source of human diseases [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(9): 3470.
- [10] 徐兆炜. 英国(苏格兰)O157 大肠杆菌干扰爆发流行 [J]. 预防医学情报杂志, 1997, 13(1): 61.
- [11] WHO. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan [J]. Wkly Epid Rec, 1996, 30: 229.
- [12] Infections Agents Surveillance Center. National Institute of Health and Infections Diseases Control Division, Ministry of Health and welfare. Japan. Outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 infection [J]. Japan ISAR, 1996, 17(8): 122.
- [13] 权太淑, 徐建国, 范天锐, 等. 首次从出血性肠炎病人中分离到 O157: H7 大肠杆菌 [J]. 中华流行病学杂志, 1985, 9(特刊 4 号): 24-27.
- [14] 张锦. 河南豫东地区产志贺毒素 *E. coli* O157: H7 感染病例的流行病学调查研究 [J]. 海峡预防医学杂志, 2003, 9(5): 51-57.
- [15] 顾宝柯. 上海地区家畜、家禽及肉制品大肠杆菌 O157: H7 监测 [J]. 疾病监测, 2003, 18(1): 5-8.
- [16] 井良义. 天津地区环境样品中首次检出大肠杆菌 O157: H7 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(5): 123-124.
- [17] 孟昭赫. 食品卫生检验方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 57-76.
- [18] KERR P, CHART H, FINLAY D, et al. Development of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of animal and human *Escherichia coli* O157: H7 strains [J]. J APPI Microbiol, 2001, 90: 534-549.
- [19] 夏涵, 府伟灵, 陈鸣, 等. 快速提取细菌 DNA 方法的研究 [J]. 现代预防医学, 2005, 32(3): 571-573.
- [20] MARUYAMA F, KENZAKA T, YAMAGUCHI N, et al. Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(8): 5023-5028.
- [21] 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.
- [22] HIRAYAMA H, KAGEYAMA S, MORIYASU S, et al. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification [J]. Theriogenology, 2004, 62(5): 887-896.
- [23] THEKISOE O M, INOUE N, KUBOKI N, et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and parasitological tests for detection of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs [J]. Vet Parasitol, 2005, 130(3-4): 327-330.
- [24] SOLIMAN H, El-Matbouli M. Reverse transcription loop mediated isothermal amplification (RTLAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHS) [J]. Vet Microbiol, 2005, 102(8): 309-311.