

环介导等温扩增技术检测铜绿假单胞菌的研究

曹科峰^{1,2}, 沈继录³, 汪学龙¹

摘要 用环介导等温扩增技术(LAMP)快速、灵敏地检测铜绿假单胞菌。利用铜绿假单胞菌 *gbca* 基因, 特异性设计 3 对 LAMP 引物, 在反应体系中添加羟基萘酚蓝(HNB) 荧光染料, 通过反应前后颜色的变化肉眼观察结果, 并用琼脂糖凝胶电泳加以验证。对临床标本利用 LAMP 和 PCR 法平行检测, 验证该法灵敏度、特异性。针对铜绿假单胞菌 DNA 特异性引物的 LAMP 法可以扩增, 其他无扩增产物。本实验建立的 LAMP 法具备简便、快速、特异性强和灵敏度高的特点, 适于实际应用。

关键词 铜绿假单胞菌; 环介导等温扩增; 检测

中图分类号 R 378.991

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0450-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.033

铜绿假单胞菌是一种普遍存在于水、植物、土壤以及养分较为稀缺的环境中的革兰阴性菌^[1-2], 是医院里较为常见的感染菌。因此铜绿假单胞菌感染的早期、快速、敏感的诊断对于临床来说尤为重要。传统的细菌分离培养、镜下观察与生化鉴定耗时太长, 聚合酶链反应(PCR) 技术又因需要的仪器较为贵重且易受外界的干扰, 均不能够满足临床快速鉴定需求。环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术最早是由日本科学家 Notomi et al^[3] 用来鉴定特异基因的方法, 该法加快整个检测过程, 具有操作简单、特异性强的特点^[4-5]。该研究旨在建立一种简单、快速的基于颜色判定的铜绿假单胞菌检测方法, 并同时进行 PCR 法检测, 对比两者之间的特异性和灵敏性。

1 材料与方

1.1 参考菌株及标本来源 铜绿假单胞菌参考菌株来自安徽医科大学第一附属医院检验科。实验菌株分别来自于 2015 年 6 月~10 月由安徽医科大学

第一附属医院检验科以及太和县中医院检验科微生物室分离的铜绿假单胞菌 21 例, 其他对照菌株 10 例, 已分离纯化的菌株置于 -80 °C 冰箱保存。

1.2 仪器和试剂 恒温水浴箱(上海跃进医疗器械有限公司); PCR 扩增仪、凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司); Vitek-32 全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司); Bst 大片段 DNA 聚合酶(美国 New England Biolabs 公司); DNA Marker、dNTP(大连宝生物工程有限公司); 无水乙醇、甜菜碱、培养基牛肉膏、酵母膏、羟基萘酚蓝(hydroxynaphthol blue, HNB)、蛋白胨、硫酸镁、氯化锰等(北京奥博星生物技术有限公司)。

1.3 LAMP 特异性引物的设计与合成 根据 GenBank 中收录的铜绿假单胞菌 *gbca* 基因序列, 利用软件设计特异性引物, 网址: http://primerexplorer.jp/e/。选其中 *gbca* 基因中的一段设计 LAMP 特异性引物, 设计的 3 对特异性引物分别针对扩增 DNA 的 6 个不同对应区域, 其中含 2 条环状引物 LF、LB, 2 条外引物 F3、B3 以及内引物 FIP、BIP, 见表 1。特异性引物合成由上海生工生物有限公司合肥分公司代为完成。

表 1 LAMP 引物序列

| 引物名称 | 类型 | 序列(5'→3') |
|------|-----|--|
| F3 | 外引物 | GAAGGATCCAGTAACAGAACT |
| B3 | 外引物 | TTCTTTACGCTTTTGAGAGG |
| FIP | 内引物 | AAGGTATCCCTTTCACACTATGGACCTAT- AGCGAATTTATTATGCATGTC |
| BIP | 内引物 | TCTCCAAGACTATAAACATCTGCAC-GTGCAAAAG- TAAGAATAATCACAGA |
| LF | 环引物 | AAGGTATCCCTTTCACACTATGGAC |
| LB | 环引物 | TCTCCAAGACTATAAACATCTGCAC |

1.4 菌株 DNA 的提取 于营养琼脂平板上接种实验菌株, 37 °C 过夜。挑取一菌环量的细菌菌落于 0.5 ml 的含有 10 mmol/L 的 Tris-EDTA 缓冲液中 (pH 7.5), 然后取 0.1 ml 的悬浮液在沸水中煮 10 min, 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 80 μl, 作为 LAMP 扩增及 PCR 扩增反应的模板。

1.5 模板的 LAMP 扩增 LAMP 反应体系为 25

2016-12-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81171618)

作者单位: ¹安徽医科大学病原生物学教研室, 合肥 230032

²安徽省太和县中医院检验科, 太和 236600

³安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

作者简介: 曹科峰, 男, 硕士研究生;

汪学龙, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wan-

gxl1964@163.com

μl , 包括: 0.8 mmol/L LF, 0.8 mmol/L LB, 0.4 mmol/L F3, 0.4 mmol/L B3, 1.6 mmol/L FIP, 1.6 mmol/L BIP, 1.0 mmol/L dNTPs, 0.8 mmol/L beta-ine, 8 mmol/L MgSO_4 , 8 U BstDNA 聚合酶, 2.5 μl 的 10 \times Bst DNA 聚合酶 Buffer, 1 μl DNA 模板, 再加入荧光染料 3 mmol/L HNB 混匀。将反应体系置于 60 ~ 65 $^{\circ}\text{C}$ 等温反应 60 min, 80 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 2 min。阴性对照为无菌去离子水, 实验产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳观察, 作为模板。

1.6 LAMP 法特异性及灵敏度分析 实验组为实验室收集的铜绿假单胞菌, 阴性对照组为收集的其他对照菌株, 用上述方法扩增检测, 结果用琼脂糖电泳观察。同时将铜绿假单胞菌 DNA 模板液以 10 倍梯度稀释, 最终稀释浓度分别为 870 ng/ μl 、87 ng/ μl 、8.7 ng/ μl 、870 pg/ μl 、87 pg/ μl 、8.7 pg/ μl 、0.87 pg/ μl 、0.087 pg/ μl 。用 LAMP 法和 PCR 法同时检测。PCR 反应体系中包括 2.0 μl 的 10 \times Taq 酶 Buffer、0.5 U Taq 酶、0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的正反向引物、0.2 mmol/L 的 dNTPs 和 1 μl 的 DNA 模板, 最后补双蒸水至 20 μl , 96 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 再按 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 61 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 55 s, 总共 36 个循环, 取 5 μl 产物做琼脂糖电泳观察实验结果。

1.7 统计学处理 将 LAMP 法和 PCR 法检测结果应用 SPSS 17.0 软件进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LAMP 方法的建立 本研究在阴性对照组中加入无菌水, 而在实验组中, 由于 *gbca* 基因的存在, 因此可以发生 LAMP 扩增, 产生沉淀, 反应的浊度也随之上升。而由于在实验前加入了 1.0 μl 的 HNB (3 mmol/L), 因此整个反应体系会发生颜色变化 (图 1A), 用凝胶电泳验证该结果 (图 1B)。通过对电泳结果与颜色变化的结果进行比较, 两者结果一致, 因此建立了铜绿假单胞菌的 LAMP 检测方法。

2.2 LAMP 方法的特异性分析 为了进一步验证所建立 LAMP 的特异性, 采用建立的 LAMP 方法对收集得到的 9 例假单胞菌及阴性对照进行了检测。实验前在各组中分别加入了 1.0 μl 的 HNB (3 mmol/L), 各反应体系的颜色变化如图 2A 所示。从图 2A 中可以看出, 除了实验组以外, 其他各组均为深蓝色, 而实验组则由深蓝色变为天蓝色; 凝胶电泳实验验证结果如图 2B 所示: 实验组可见明显的条带, 而其余各组菌种则未出现条带, 结果与反应管中

的颜色变化相符合。

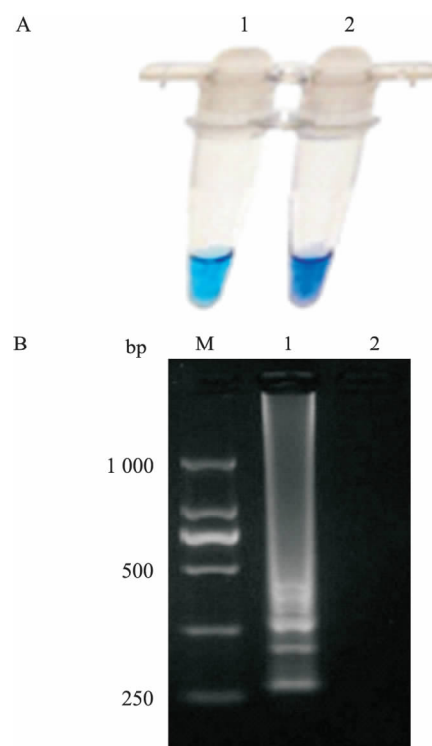


图 1 设计引物的检测结果鉴定

A: HNB 染料组颜色反应结果; B: 电泳结果; M: 1 000 bp Marker; 1: 阳性标本; 2: 不含 DNA 阴性对照

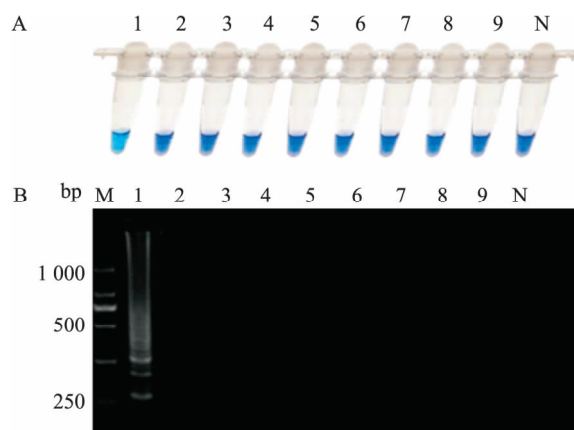


图 2 LAMP 法检测铜绿假单胞菌 DNA 的特异性分析

A: HNB 染料; B: 电泳结果; 1: 铜绿假单胞菌; 2: 琼氏不动杆菌; 3: 睾丸酮丛毛单胞菌; 4: 嗜麦芽单胞菌; 5: 非发酵摩梭菌; 6: 肺炎克雷伯杆菌; 7: 非脱梭类杆菌; 8: 弗劳地柠檬酸杆菌; 9: 金黄色葡萄球菌; N: 阴性对照组; M: 1 000 bp Marker

2.3 LAMP 法与 PCR 法检测的灵敏度 采用加入倍比稀释铜绿假单胞菌 DNA 量的方法分别用 LAMP 法和 PCR 法来检测以进行灵敏度分析 (图 3)。图 3A 示当铜绿假单胞菌 DNA 的浓度为 8.7 pg/ μl 时, 反应管中仍有相应的颜色变化, 而当 DNA

的浓度降低至 0.87 pg/ μ l 时,反应管中则无颜色变化,图 3B 中泳道的变化趋势与颜色变化一致,因此采用 LAMP 法的最低检测浓度在 0.87 ~ 8.7 pg/ μ l。图 3C 为 PCR 产物凝胶电泳条带观察,图示 PCR 的最低检测 DNA 浓度在 8.7 ~ 87 pg/ μ l,表明 LAMP 的检测灵敏度是 PCR 的 10 倍左右。

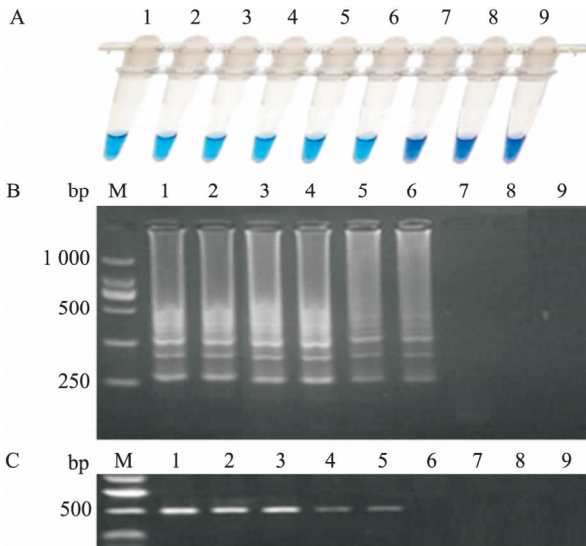


图 3 LAMP 法和 PCR 法检测铜绿假单胞菌的灵敏度

A: HNB 染料显色; B: LAMP 电泳; C: PCR 电泳; M: 1 000 bp Marker; 1: 870 ng/ μ l; 2: 87 ng/ μ l; 3: 8.7 ng/ μ l; 4: 870 pg/ μ l; 5: 87 pg/ μ l; 6: 8.7 pg/ μ l; 7: 0.87 pg/ μ l; 8: 0.087 pg/ μ l; 9: 0.0087 pg/ μ l

2.4 LAMP 法和 PCR 法临床标本的检测 从分离收集的 21 份铜绿假单胞菌株以及 10 例其他对照菌株中分别提取其 DNA,分别用 LAMP 和 PCR 法进行平行检测。LAMP 法对 10 例其他细菌呈阴性反应,而 LAMP 法与 PCR 法对 21 例铜绿假单胞菌标本的检出率(21/21)一致,将两者的检测结果进行配对卡方检验,说明 LAMP 法与 PCR 法对于临床标本的检测差异无统计学意义。

3 讨论

LAMP 技术是一种快速、灵敏度高、特异性强的基于核酸扩增的检测方法。目前 LAMP 技术在医学领域获得了研究与应用,主要包括病毒、细菌、寄生虫的鉴定以及临床疾病的诊断等。对于 LAMP 检测的结果通常有 3 种不同的显示方法:浊度检测、凝胶电泳以及最为直观的颜色变化^[6]。LAMP 技术的颜色变化可以在紫外灯或者日光下肉眼观察,因此

LAMP 技术可以在大部分实验室里进行快速检测。而在实际实验过程中,由于 LAMP 技术在反应结束后需要打开盖子,使得反应非常容易受到污染,因此在反应体系中添加染料,同时观察反应的颜色变化可以很好地改善 LAMP 污染的问题。

本实验设计、合成了针对铜绿假单胞菌特异 *gbcA* 基因的 LAMP 特异性引物,并用 LAMP 法得以灵敏、快速地检测铜绿假单胞菌。但不可否认,LAMP 技术也有一定的缺陷,例如相对于 PCR 而言,LAMP 技术需要设计 4 条引物,其设计要求相对较高;同时,一旦有非特异性扩增的出现,会直观地反映在梯度条带上,误导样本的鉴别;而对于 LAMP 较为灵敏的特点,实验过程中较容易受到污染。

本研究在 LAMP 体系中加入 HNB 染料,通过观察体系颜色变化判定实验结果,从中可以得出:① LAMP 法和 PCR 法两者均只对铜绿假单胞菌 DNA 发生阳性扩增反应,而对其他参考菌株的 DNA 无反应,特异性好;② LAMP 法检测的灵敏度高于 PCR 法的 10 倍左右;③ 采用 PCR 和 LAMP 平行检测临床标本的结果表明两法检出率保持一致。

综上所述,LAMP 方法操作更简便,实验所需时间更短,实验灵敏度更高、特异性强,检测结果可用肉眼观察颜色变化来判定,而无需进行琼脂糖凝胶电泳,所以适用于基层单位的检测应用。针对该技术的反应参数、如何优化整个反应体系以及更大数量样本的验证等,将是下一步研究的重点。

参考文献

- [1] 刘伟,侯丽萍,赵良娟,等.环介导等温扩增技术检测食品中的铜绿假单胞菌[J].食品研究与开发,2012,33(5):140-2.
- [2] Khan S,Rasheed F,Zahra R. Genetic polymorphism of agr locus and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* at two hospitals in Pakistan [J]. Pak J Med Sci,2014,30(1):172-6.
- [3] Notomi T,Okayama H,Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acid Res,2000,28:E63.
- [4] 王欢,黄庆,史大川,等.基于颜色判定的环介导恒温扩增技术快速检测铜绿假单胞菌的研究[J].第三军医大学学报,2012,34(22):2264-8.
- [5] 孟双,王毅,王艳,等.环介导等温扩增技术在嗜水气单胞菌检测中的应用[J].中国人兽共患病学报,2016,32(1):1-6.
- [6] 任春阳,田杰.环介导扩增法直接检测阳性血培养瓶中的大肠埃希氏菌[J].重庆医学,2015,44(11):1514-8.

网络出版时间: 2017-3-13 18:10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170313.1810.068.html>

EnCor 微创手术与传统手术治疗乳腺脓肿的对比

陶丹丹, 任敏, 裴静, 杨筱崑, 陈樱, 岳健, 王本忠

摘要 收集乳腺脓肿直径 ≥ 30 mm的患者327例,其中193例选择安珂(EnCor)微创手术(观察组),134例选择传统切开引流术(对照组)。依据影像学资料,根据脓腔分隔情况,将患者分为单腔组和多腔组,分别对观察组和对照组的手术情况、美容效果、满意度等进行对比研究。结果显示观察组较对照组的手术用时少、愈合时间短、美容度和满意度高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在单腔组中,观察组的治愈率均高于对照组,但仅在脓腔直径30~69 mm内的差异有统计学意义($P < 0.05$)。在多腔组中,观察组的治愈率也高于对照组,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。随访数据中,观察组和对照组的复发率差异无统计学意义($P > 0.05$)。对于脓腔较大、有美容需求又拥有一定经济能力的患者,EnCor微创手术可以作为安全、可靠、有效的手术方式选择之一。

关键词 微创手术; 引流; 乳腺脓肿

中图分类号 R 655.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0453-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.034

在发展中国家,乳腺脓肿是比较常见的乳腺良性疾病。多数患者为哺乳期妇女,少数为非哺乳期女性。近年来,细针穿刺抽吸被推荐为乳腺脓肿的一线治疗方案^[1-2],但对于体积大,分隔多以及脓液粘稠的患者,细针穿刺的效果欠佳^[3]。有研究者认为细针穿刺抽吸仅适用于直径 < 5 cm的脓肿,直径 > 5 cm的仍需选用传统切开引流术^[3-4]。也有研究者将脓肿直径3 cm作为分界点^[5]。因传统手术在治疗乳房脓肿时,存在痛苦大、治愈时间长、美容效果差、术后复发率高等弊端,故患者满意度不高。近几年,微创旋切技术被用于乳腺脓肿的治疗。该研究对比研究了安珂(EnCor)微创手术与传统手术治疗乳腺脓肿的临床疗效,探讨EnCor微创手术在体积较大的复杂性乳腺脓肿中的应用价值。

2016-12-12 接收

基金项目: 安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(编号: 15011d04037)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院乳腺外科,合肥 230022

作者简介: 陶丹丹,女,硕士研究生;

王本忠,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: wangbenzhong2459@126.com

Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by loop-mediated isothermal amplification

Cao Kefeng^{1,2}, Shen Jilu³, Wang Xuelong¹

(¹Dept of Parasitology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Clinical Laboratory, The Chinese Hospital of Taihe, Taihe 236600;

³Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract A rapid and sensitive method of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was established to detect *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Three pairs of LAMP primers (inner, outer and ring primers) were designed according to the *gbca* gene of *P. aeruginosa*. Since adding hydroxy naphthol blue (HNB) to the reaction system, a positive reaction was indicated by a color change before and after the reaction, and was verified by agarose gel electrophoresis. Both LAMP and PCR were applied to detect clinical specimens, the sensitivity and specificity of the detection method were evaluated, and were compared with those of conventional PCR. A LAMP method for detecting *P. aeruginosa* was successfully established. The LAMP method showed specificity for *P. aeruginosa* without other bacteria amplification. The established LAMP method in this study enables rapid, sensitive and specific detection of *P. aeruginosa*, and can be applied for grass roots and small scale laboratories as well as field surveillance.

Key words *Pseudomonas aeruginosa*; loop-mediated isothermal amplification; detection