

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.24.002

文章编号: 1005-8982(2016)24-0006-05

论著

基于环介导等温扩增技术建立的 假丝酵母菌快速检测方法*

林江,温先勇,林雁,邓正华,黄远帅
(西南医科大学附属医院 检验科,四川 泸州 646000)

摘要:目的 基于环介导等温扩增技术(LAMP)建立一种假丝酵母菌的快速检测方法。**方法** 依据假丝酵母属 18 S rDNA 基因保守序列,采用 Primer Explorer V4 软件设计引物,建立 LAMP 扩增方法和反应体系,对体系的 4 种关键参数和 3 项性能指标进行优化和探讨,并用临床样本进行方法验证。**结果** 6 种常见假丝酵母菌 LAMP 法检测均为阳性;最适扩增条件为:温度 63~65℃、Bst 酶活性 4 IU、Mg²⁺ 浓度 4 mol/L、扩增时间 1 h;7 种对照菌种及人全血 DNA 样本 LAMP 扩增结果均为阴性;检测限为 10²~10⁷ CFU/ml。经 52 例临床样本验证,该法敏感性为 100%,特异性为 95%。**结论** 该研究建立的 LAMP 假丝酵母菌检测方法具有实用、简便、快速、特异和敏感的特点,可为临床提供一种新的假丝酵母菌诊断方法。

关键词: 假丝酵母菌;环介导等温扩增;检测方法

中图分类号: R-331

文献标识码: A

Establishment of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of candida spp*

Jiang Lin, Xian-yong Wen, Yan Lin, Zheng-hua Deng, Yuan-shuai Huang
(Department of Laboratory Medicine, the Affiliated Hospital of Southwest Medical
University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To establish a rapid detection of candida spp on the basis of loop-mediated isothermal method. **Methods** According to the gene bank, 18 S rDNA gene sequence was provided. Primer Explorer V4 online design software design for the Candida genus-specific primers was used, and LAMP expansion method and the reaction system was set up. Four key parameters for the system and three performance were optimized and discussed, and then verified by clinical samples. **Results** Six kinds of candida were all positive, and the optimum temperature was 63℃ - 65℃, the activity of Bst was 4 u, concentration of Mg²⁺ was 4 mM, time was 1 h. All 7 kinds of clinical reference strains and Human whole blood DNA samples amplification results were negative. The detection limit was 10²-10⁷ CFU/ml. A total of 52 cases of clinical samples proved that the method sensitivity was 100%, and the specificity was 95%. **Conclusions** The method of the genus candida established by LAMP technology is significantly practical, simple, rapid, specific and sensitive.

Keywords: candida; loop-mediated isothermal amplification; detection methods

近年来,由于广谱抗生素的使用、侵袭性技术广泛开展及免疫力低下人群的不断增多,真菌感染的发病率呈逐年上升趋势,其中常见假丝酵母菌(白色假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、克柔假丝酵母菌及季假丝酵母菌)

感染已占了真菌感染的 85%-91%^[1]。实验室常用诊断方法为培养和组织病理学方法,该类方法耗时长、阳性率低、有创性,远不能满足临床需要。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新型的核酸扩增技术,近期在细菌和

收稿日期:2016-06-21

* 基金项目:西南医科大学青年科技基金(No:2014QN-102)

病毒研究领域中发展迅速,但真菌研究方面的资料却不多见。为此,本研究根据 LAMP 基本原理建立假丝酵母菌快速检测方法,旨在为临床快速检测假丝酵母菌提供一种手段。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株及对照菌株

实验菌株:白色假丝酵母菌(2.4159)、热带假丝酵母菌(2.1028)、近平滑假丝酵母菌(2.4312)、克柔假丝酵母菌(2.3196)、光滑假丝酵母菌(2.3983)、季也蒙假丝酵母菌(2.3204);对照菌株:大肠埃希菌(1.8732)、金黄色葡萄球菌(1.8721)、铜绿假单胞菌(1.10712)、肺炎克雷伯菌(1.10617),以上菌株由中科院微生物研究所提供;隐球菌、毛霉菌、青霉菌由西南医科大学微生物室提供。

临床样本:共 52 份(假丝酵母菌感染样本 32 份,非假丝酵母菌感染样本 20 份),标本包括为血液、脓液、脑脊液、分泌物等,选取 2015 年 2 月-2016 年 5 月西南医科大学附属医院血液内科、肿瘤科、感染科、ICU 病房、新生儿科急诊患者,感染菌种经镜检、细菌培养、组织病理学、影像学、血清学及临床资

料证实。

1.2 主要试剂与仪器

DNA 提取试剂盒(深圳凯杰生物有限公司公司),朗报脱氧核糖核酸扩增试剂盒、朗报荧光目视检测试剂盒[荣研生物科技(中国)有限公司],血琼脂培养基、巧克力选择培养基、沙保弱培养基(重庆庞通医疗器械有限公司),恒温水浴锅(成都赛可隆机械设备有限公司),1300 series A2 生物安全柜(苏州赛摩飞世尔仪器有限公司),高速冷冻台式离心机(美国 THERMO 公司),HB-100 恒温金属浴锅(杭州博目科技有限公司),C1000 梯度 PCR 扩增仪(美国白乐有限公司),WD-9403L 紫外分析仪、DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂)。

1.3 引物设计

针对 6 种临床常见假丝酵母菌(白色假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、克柔假丝酵母菌、季也蒙假丝酵母菌),依据其 18 SrDNA 基因序列,使用 primerexplorer.jp/elamp 4.0 软件在线设计 LAMP 引物,并由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 假丝酵母菌属 LAMP 引物序列

引物名	引物序列(5'-3')	引物长度 /bp
外引物 F3	5'-AGGGTTCGATCCGGAGAG-3'	19
外引物 B3	5'-GAATTACCGCGGCTGCTG-3'	18
内引物 FIP	5'-ACCTCCCCGTGTCGGGATTG-TGAGAAACGGCTACCACATC-3'	40
内引物 BIP	5'-CGATACAGGGCCCTTTTGGGT-CTTGCCCTCCAATTGTTCT-3'	41

1.4 菌株 DNA 提取

活化冷冻保存(-80℃)菌株恢复培养,将菌株接种至沙保若培养基(血平板),非假丝酵母菌属源真菌于 28℃、假丝酵母(或细菌)于 37℃,培养 2~5 d。挑取一定量的单个纯菌落至 1.0 ml 的无菌生理盐水 EP 管中。将上述 EP 管中的菌悬液按 10 倍倍比稀释至所需浓度(以平板倾注培养法验证稀释后各管浓度并进行浓度调整)。采用凯杰公司 DNA 提取试剂盒对模板 DNA 进行提取,操作步骤按说明书严格进行。

1.5 LAMP 方法的建立及验证

1.5.1 LAMP 扩增体系组成 参照荣研产品试剂盒说明书,建立 LAMP 反应体系(26.0 μl):2 × LAMP 反应缓冲液 12.5 μl,4 种设计引物(25.0 μmol/L 的 FIP 和 BIP 各 1.6 μl,5 μmol/L 的 F3 和 B3 各 1.0 μl),Bst DNA 聚合酶 1.0 μl,荧光染料 1.0 μl,纯水补至

24.0 μl。阴阳性对照反应体系:2 × LAMP 反应缓冲液 12.5 μl,Bst DNA 聚合酶 1.0 μl,荧光染料 1.0 μl,2.5 μl 模板,纯水补至 24.0 μl。实验组加入已制备的 DNA 模板液 2.0 μl,阴阳对照组各加入去离子水和阳性对照液各 2.0 μl。扩增条件:65℃水浴 1 h,80℃、5 min 灭活 Bst DNA 聚合酶终止反应。反应结果用紫外线观察(或肉眼),阳性显示为亮绿色荧光,阴性无荧光(橙红色)。

1.5.2 LAMP 方法的验证 利用 1.5.1 建立的方法对 6 种假丝酵母菌属常见菌种进行 LAMP 扩增后肉眼观察结果。

1.6 反应体系优化

根据设计引物的理论退火温度值,选择温度(56、59、62、65、68、71、74 和 77℃)、Bst 酶活性(8 IU、4 IU)、Mg²⁺ 浓度(2、4 和 6 mmol/L)及反应时间(30、

45、60 和 90 min)等参数,以白色假丝酵母 DNA 为模板进行 LAMP 扩增,以确定最佳反应条件。

1.7 LAMP 方法特异性、敏感性 & 检测限的检测

1.7.1 LAMP 方法特异性 利用建立的 LAMP 方法对 1.1 中的 6 种实验菌株、4 种对照菌株、3 种非假丝酵母真菌菌株以及人全血 DNA 进行 LAMP 扩增,以评估建立 LAMP 方法的特异性。

1.7.2 LAMP 方法的敏感性 & 检测限 将白色假丝酵母菌培养,按 1.4 方法稀释,制备 $10^0 \sim 10^7$ CFU/ml 浓度的菌悬液,以建立的 LAMP 体系进行扩增,观察检测敏感性和检测限。

1.8 LAMP 方法的临床样本验证

对临床证实的假丝酵母菌感染样品 32 份及其他细菌感染样品 20 份进行传统培养和 LAMP 扩增检测,比较其阳性率、敏感性 & 特异性的差异。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件行统计学分析,计数资料以率 (%) 表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。LAMP 快速检测方法采用敏感性、特异性等指标加以评价。

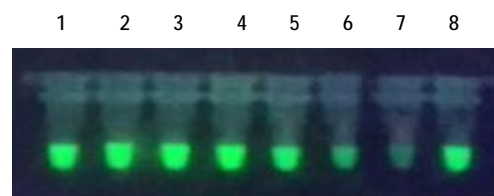
2 结果

2.1 6 种常见假丝酵母菌 LAMP 检测结果

利用建立的 LAMP 扩增体系对白色假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、克柔假丝酵母菌、季也蒙假丝酵母菌等 6 种假丝酵母菌扩增,荧光观察见图 1,结果见表 2 所示,6 种常见假丝酵母菌均呈阳性。

2.2 LAMP 反应体系优化

反应温度、Bst 酶浓度、 Mg^{2+} 浓度、反应时间等参数优化结果见图 2~5。图 2 显示,在 $71 \sim 77^\circ\text{C}$ 内产物



1:白色假丝酵母菌;2:热带假丝酵母菌;3:近平滑假丝酵母菌;4:光滑假丝酵母菌;5:克柔假丝酵母菌;6:季也蒙假丝酵母菌;7:阴性对照;8:阳性对照

图 1 6 种常见假丝酵母菌 LAMP 扩增荧光效果图

表 2 6 种假丝酵母菌 LAMP 扩增结果

菌株	白色假丝酵母菌	热带假丝酵母菌	近平滑假丝酵母菌	光滑假丝酵母菌	克柔假丝酵母菌	季也蒙假丝酵母菌	阴性对照	阳性对照
LAMP 结果	+	+	+	+	+	+	-	+

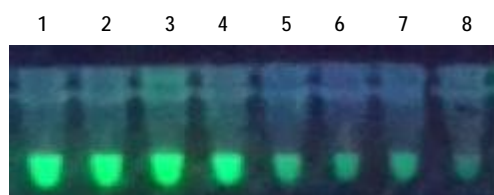
荧光极弱;在 $56 \sim 68^\circ\text{C}$ 温度范围内荧光明亮,其中在 $63 \sim 65^\circ\text{C}$ 荧光强度最强,故确定 LAMP 扩增适宜温度为 $63 \sim 65^\circ\text{C}$ 。图 3 显示,在最适 65°C 温度条件下,Bst 酶浓度分别为 8 IU、4 IU LAMP 扩增荧光观察结果差异无统计学意义,因成本因素,确定 LAMP 扩增采用 4 IU Bst 酶。图 4 显示,在 65°C 退火温度和 4 IU Bst 酶活性条件下, Mg^{2+} 浓度分别为 2、4 和 6 mmol/L 时,以 Mg^{2+} 浓度为 4 mmol/L 时荧光强度最强。图 5 显示,在 65°C 、4 IU Bst 酶活性、4 mmol/L 的 Mg^{2+} 浓度条件下,反应时间分别为 30、45、60 和 90 min 时,60 和 90 min 荧光强度均强,为缩短反应时间,故选择 60 min 为适宜扩增反应时间。

2.3 LAMP 方法的特异性、敏感性和检测限

2.3.1 LAMP 方法特异性 6 种假丝酵母菌和 7 种对照菌株及人全血 DNA LAMP 扩增结果见图 6,其电泳结果见图 7,结果显示,6 种假丝酵母菌及阳性对照均呈阳性;对照菌株、人全血 DNA 及阴性对照均呈阴性;由于 LAMP 扩增产物是由多种大小不同片

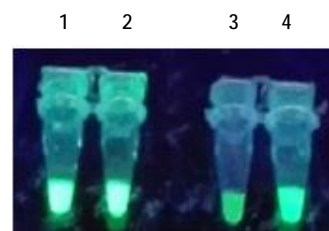
段组成,电泳结果显示,扩增结果符合 LAMP 扩增产物特征。

2.3.2 LAMP 方法敏感性 & 检测限



1: 56°C ; 2: 59°C ; 3: 62°C ; 4: 65°C ; 5: 68°C ; 6: 71°C ; 7: 74°C ; 8: 77°C

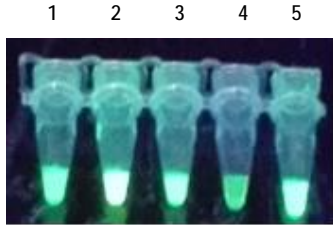
图 2 温度对 LAMP 扩增影响荧光效果图



1: 8U; 2: 4U; 3: 阴性对照; 4: 阳性对照

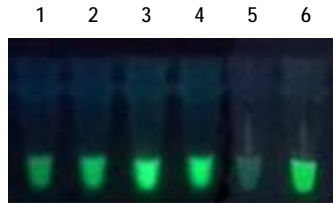
图 3 Bst 酶活性对 LAMP 扩增影响荧光效果图

稀释、提取的白色假丝酵母菌模板进 LAMP 扩增,荧光结果(见图 8)显示,10² ~ 10⁷ CFU/ml 浓度的模板均表达为强荧光,检测范围为 10² ~ 10⁷ CFU/ml。见表 3。



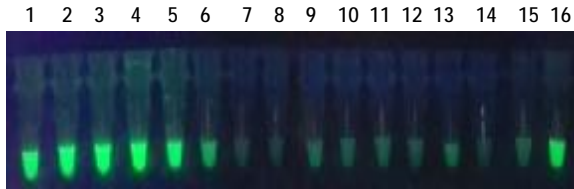
1: 6 mmol/L; 2: 4 mmol/L; 3: 2 mmol/L; 4: 阴性对照; 5: 阳性对照

图 4 Mg²⁺ 浓度对 LAMP 扩增影响荧光效果图



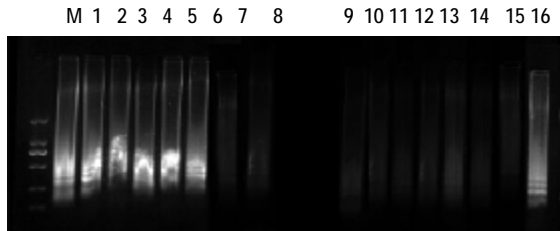
1: 30 min; 2: 45 min; 3: 60 min; 4: 90 min; 5: 阴性对照; 6: 阳性对照

图 5 反应时间对 LAMP 扩增影响荧光效果图



1: 白色假丝酵母菌; 2: 热带假丝酵母菌; 3: 近平滑假丝酵母菌; 4: 光滑假丝酵母菌; 5: 克柔假丝酵母菌; 6: 季也蒙假丝酵母菌; 7: 金黄葡萄球菌; 8: 铜绿假单胞菌; 9: 大肠杆菌; 10: 肺炎克雷伯菌; 11: 毛霉菌; 12: 青霉菌; 13: 隐球菌; 14: 人全血 DNA; 15: 阴性对照; 16: 阳性对照

图 6 假丝酵母菌对照菌株及人全血 DNA LAMP 扩增结果



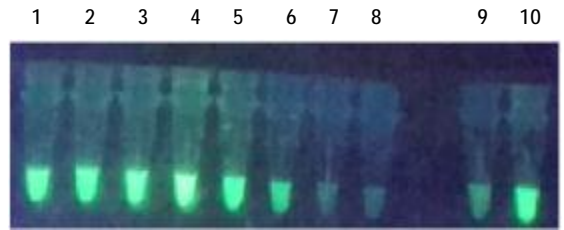
M: Marker; 1: 白色假丝酵母菌; 2: 热带假丝酵母菌; 3: 近平滑假丝酵母菌; 4: 光滑假丝酵母菌; 5: 克柔假丝酵母菌; 6: 季也蒙假丝酵母菌; 7: 金黄葡萄球菌; 8: 铜绿假单胞菌; 9: 大肠杆菌; 10: 肺炎克雷伯菌; 11: 毛霉菌; 12: 青霉菌; 13: 隐球菌; 14: 人全血 DNA; 15: 阴性对照; 16: 阳性对照

图 7 LAMP 特异性检测电泳效果图

2.4 LAMP 方法的临床样本验证

对经临床证实的 32 份假丝酵母菌及 20 份非假丝酵母菌感染样品分别进行培养和 LAMP 检测,其结果见表 4。

表 4 显示,与传统培养法比较,LAMP 检测法阳性率 ($\chi^2=9.861, P=0.000$) 和敏感性均有提高 ($\chi^2=19.591, P=0.000$), 检测时间为 1.5 ~ 2.0 h,也远远短于培养法的 24 ~ 48 h。



1: 10⁷; 2: 10⁶; 3: 10⁵; 4: 10⁴; 5: 10³; 6: 10²; 7: 10¹; 8: 10⁰; 9: 阴性对照; 10: 阳性对照

图 8 LAMP 敏感性检测荧光效果图

表 3 LAMP 扩增不同浓度梯度 DNA 模板检测结果

模板细菌浓度(CFU/ml)	LAMP 检测结果
10 ⁰	-
10 ¹	-
10 ²	+
10 ³	+
10 ⁴	+
10 ⁵	+
10 ⁶	+
10 ⁷	+

表 4 临床样品培养与 LAMP 检测结果比较 (n=52)

组别	真菌阳性例数	真菌阴性例数	阳性率/%	敏感性/%	特异性/%
培养法	17	35	32.7	53.1	100.0
LAMP 检测	33	19	63.5	100.0	95.0

3 讨论

真菌属于人体正常菌群,当人免疫力降低时容易造成感染,而其中假丝酵母菌占绝大部分^[2]。由于该病起病隐匿,早期诊断困难,病情进展迅速,死亡率高^[3],所以临床上迫切需要一种早期、快速的真菌检测方法。

LAMP 技术是近年来迅速发展起来的一种分子诊断技术,它依赖于链置换酶(Bst 酶)在恒温水浴锅条件下快速、高效的扩增核酸,具有广泛的应用前景^[4]。

LAMP 扩增技术成败的关键是引物设计。由于真核生物核糖体 DNA (rDNA) 的不同基因和区段 (18 S、28 S、5.8 S、ITS) 具有高度保守性, 常用于真菌菌属的鉴定^[5-6]。笔者依据 Genbank 提供的假丝酵母 18 S 基因保守序列, 采用 LAMP 在线引物设计软件设计针对假丝酵母属的外引物 F3、B3 和内引物 FIP、BIP 等 4 种特异性引物, 经过本实验 6 种常见假丝酵母菌均能呈现 LAMP 特异性扩增, 而其他细菌如金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌及 3 种非假丝酵母菌属的真菌 (新型隐球菌、毛霉菌) 及人全血 DNA 样本均未见 LAMP 特异扩增。

LAMP 反应体系中温度、Bst DNA 聚合酶、Mg²⁺ 浓度、扩增时间等, 对扩增都有重要影响: 温度通过影响反应体系酶的活性来影响扩增效率, 笔者根据 4 种引物的退火温度范围, 设计了涵盖 56~77℃ 范围内 8 个温度在 C1000 梯度 PCR 扩增仪上进行温度梯度实验。结果显示, 反应在退火温度高于 70℃ 时扩增产量低, 在退火温度为 63~65℃ 时扩增产物量最大。由于 Bst 酶的最佳活性温度范围为 60~65℃, 温度过高或相对过低都可能影响链置换酶活性使扩增产量下降, 所以最适温度应以 63~65℃ 为宜。酶活性的高低可决定反应时间和扩增产物量。Mg²⁺ 以 dNTP-Mg 形式参与核酸骨架相互作用, 并且可在一定程度上影响 Bst 酶的活性, 两者常常相互作用。实验中根据 Bst 酶、Mg²⁺ 浓度对扩增效率的影响分别设计 8 IU、4 IU 和 2、4 和 6 mmol/L 的浓度梯度, 当 Bst 酶浓度减半至 4 IU 后与 Bst 酶 8 IU 的扩增效果差异无统计学意义, Mg²⁺ 浓度设置为 4 mmol/L 时, LAMP 扩增效率最高。考虑到 Bst 酶成本, 选用 Bst 酶 4 IU、Mg²⁺ 4 mmol/L 为反应体系适宜浓度。时间对反应产物量有较大影响。本实验中设置的 4 个时间梯度内, 扩增显示在 30 和 45 min 已有较明显的扩增产物出现, 60 和 90 min 2 个时间段内 LAMP 均出现较强荧光, 为了缩短检测时间, 确定适宜扩增时间为 60 min。

由于 4 种 LAMP 引物是针对靶序列 6 个区域设计的, 在 6 个区域中任何区域与引物不匹配时均不能进行核酸扩增, 本实验显示假丝酵母菌各菌种均能进行特异的 LAMP 反应, 敏感性达到 10² CFU/ml, 与国

内文献略有差异^[7], 为 PCR 的 10 倍。

通过对 52 份临床样品的培养和 LAMP 检测证实, 除 6 种实验假丝酵母菌菌种外, 产朊假丝酵母、清酒假丝酵母、马铃薯假丝酵母等 3 种少见的假丝酵母菌菌种也能检出, 而临床标本中, 除 7 种对照菌种外, 其他细菌对检测干扰很小 (仅 1 例真菌有扩增, 与假丝酵母菌基因同源性高), LAMP 方法在阳性率、敏感性明显优于培养法。

与其他核酸扩增技术相比, LAMP 技术特异、敏感, 仪器设备要求低, 操作简单, 肉眼可直接观察, 更适合基层医疗机构开展^[8-9]。但由于敏感性高, 防污染极为关键, 否则, 可能出现假阳性^[6]。其不足之处是只能鉴定到假丝酵母菌属, 但已可及时指导临床对患者的针对性治疗。LAMP 技术的应用和推广, 为进一步临床研究和临床早期确诊真菌感染和降低患者死亡率、提高患者预后提供了新的检测手段。

参 考 文 献:

- [1] 张文, 柏彩英, 周强, 等. 血培养真菌的菌种分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(15): 1889-1990.
- [2] 孔丹莉, 周浩, 王茜, 等. 环介导等温扩增技术快速检测血液中白色念珠菌[J]. 广东医学院学报, 2011, 29(6): 600-601.
- [3] 廖万清, 陈敏. 侵袭性真菌病的诊断: 现状与展望[J]. 菌物学报, 2011, 30(1): 5-11.
- [4] 张宇, 郭良栋. 真菌 DNA 条形码研究进展[J]. 菌物学报, 2012, 31(6): 809-820.
- [5] 周均亮, 赵瑞琳. 真菌 DNA 条形码技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(8): 1468-1477.
- [6] 鲁勇, 王一萍, 应建飞, 等. 环介导等温扩增快速检测临床假丝酵母菌属方法建立与应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(6): 1204-1206.
- [7] GHOSH R, NAGAVARDHINI A, SENGUPTA A, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum*, f. sp. *ciceris*, -wilt pathogen of chickpea[J]. Bmc Research Notes, 2015, 8(1): 1-10.
- [8] 路超, 王长印, 董振芳, 等. 环介导等温扩增技术的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(2): 138-144.
- [9] DUAN Y B, GE C Y, ZHANG X K, et al. Development and evaluation of a novel and rapid detection assay for *Botrytis cinerea* based on loop-mediated isothermal amplification[J]. Plos One, 2014, 9(10): e111094.

(张蕾 编辑)