

和生物相容性而广泛应用于各种生物医学材料^[10]。本研究将丝素蛋白和明胶接枝于聚氨酯表面,与对照组相比,支架的亲水性明显提高。丝素蛋白还能提高支架的抗拉压能力和弹性,从而更好地模拟骨骼肌的收缩和舒张。此外,丝素蛋白比明胶降解慢,这也适应了成肌细胞增殖慢的特点。

传统的体外细胞培养使用的是二维生长表面,这有利于识别细胞结构和分化状况。但体内肌细胞的细胞外基质是三维的,这种二维的环境迫使细胞以非自然的形态生长,因此二维环境对三维的骨骼肌来说是不合适的。此外,三维支架还可以增强成肌细胞的增殖和分化。应用“密纹”技术可以获得平息排列的纤维。密纹就是用模具制造有纹路的三维支架,从而促进细胞的定向生长。Huang 等用聚二甲基硅氧烷(PDMS)制成一种带纹路的薄膜,他们发现骨骼肌卫星细胞在带纹路的支架上沿着纹路融合成肌管,且肌管比在不带纹路支架上的长。本研究应用聚氨酯制成三维支架,促进了细胞的增殖和定向排列,接枝丝素蛋白和明胶后,促进了成肌细胞的相互融合和肌管的形成。

表面改性后的三维聚氨酯生物支架,其亲水性和生物相容性有明显提高,促进了体外成肌细胞的增殖和肌管的融合及定向排列。然而体内肌细胞生长于复杂的微环境中,其增殖和分化受到各种生物因子的调节和理化因素的影响。移植后的工程化骨骼肌组织其神经血管化的建立也是亟待解决的问题。因此,我们课题组接下来将着重在动物实验方面进行研究。

参考文献

- 1 Yusuf F, Brand - Saberi B. Myogenesis and muscle regeneration[J]. *Histochem Cell Biol*, 2012, 138(2): 187 - 199
- 2 Patel D, Kuriakose MA, Iyer S, et al. Reconstruction of the laryngopharynx[J]. *Indian J Plast Surg*, 2007, 40(12): 44 - 51
- 3 Hsiao HT, Leu YS, Chang YC, et al. Voice and swallowing after laryngopharyngectomy and free ileocolic flap reconstruction for hypopharyngeal cancer[J]. *Ann Plast Surg*, 2009, 62(4): 390 - 394
- 4 Yamawaki S, Sawabe K, Kataoka K, et al. The combined use of hyoid bone flap and radial forearm free flap for reconstruction following partial laryngopharyngectomy[J]. *Ann Plast Surg*, 2011, 66(3): 257 - 260
- 5 Liu HW, Li ZD, Dong HL, et al. Application of free anterolateral thigh flap in head and neck surgery[J]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2011, 46(5): 378 - 381
- 6 Wang WH, Hwang TZ, Chang CH, et al. Reconstruction of pharyngeal defects with a submental island flap after hypopharyngeal carcinoma ablation[J]. *ORL*, 2012, 74(6): 304 - 309
- 7 Khan MMR, Tsukada M, Gotoh Y, et al. Physical properties and dyeability of silk fibers degummed with citric acid[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(21): 8439 - 8445
- 8 de Mulder ELW, Hannink G, Koens MJW, et al. Characterization of polyurethane scaffold surface functionalization with diamines and heparin[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013, 101:919 - 922
- 9 Stachelek SJ, Alferiev I, Fulmer J, et al. Biological stability of polyurethane modified with covalent attachment of di - tert - butyl - phenol [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, 82(4): 1004 - 1011
- 10 Fan S, Zhang Y, Shao H, et al. Electrospun regenerated silk fibroin mats with enhanced mechanical properties[J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 56:83 - 88

(收稿日期:2013 - 03 - 23)

(修回日期:2013 - 04 - 01)

利用环介导恒温扩增法快速检测空肠弯曲菌

刘孝波 蒋栋能 蒲晓允

摘要 目的 利用环介导恒温扩增技术,以空肠弯曲菌的 VS1 基因设计引物,建立快速检测空肠弯曲菌的方法,以期能应用于急性腹泻和肠炎等疾病的快速检验。**方法** ①通过基因比对与引物设计,设计针对空肠弯曲菌的环介导恒温扩增检测(LAMP)方法;②用钙黄绿素、亚甲基蓝、结晶紫、溴化乙锭 4 种 DNA 染料对扩增产物进行染色,评价各染料染色效果;③检测该 LAMP 方法对空肠弯曲菌及其他干扰菌的扩增情况,评价其特异性;④将该 LAMP 方法与培养法比较,进行统计学分析。**结果** ①设计出针对空肠弯曲菌的 LAMP 检测方法;②钙黄绿素与扩增产物结合后颜色变化明显,是该 LAMP 方法中较好的 DNA 染料物质;③本 LAMP 检测方法只针对空肠弯曲菌有扩增,对其他干扰菌不扩增,显示出良好的特异性;④试验共检测了 60 株临床和标准菌株,对于菌株的培养物,LAMP 检测结果与培养鉴定法比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.3333, P > 0.05$)。**结论** 本试验设

作者单位:400037 重庆,第三军医大学第二附属医院检验科

通讯作者:蒲晓允,电子邮箱:puxiaoyun@yahoo.cn

计出了针对空肠弯曲菌 LAMP 检测方法,该 LAMP 法较好的 DNA 染料物质是钙黄绿素,该方法具有良好的特异性,与培养鉴定法比较具有较高的阳性、阴性及总体符合率,能够用于空肠弯曲菌的快速检验。

关键词 环介导恒温扩增 空肠弯曲菌 DNA 染料 钙黄绿素 快速检验

Rapid Detection of *Campylobacter Jejuni* Basing on Loop - mediated Isothermal Amplification. Liu Xiaobo, Jiang Dongneng, Pu Xiaoyun. Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, China

Abstract Objective Basing on the loop - mediated isothermal amplification (LAMP) technology, to design a rapid detection method of *Campylobacter jejuni*, so as to be applied in clinical inspection of *C. jejuni* in acute diarrhea and gastroenteritis. **Methods** By gene alignment and primer design, a set of loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *C. jejuni* was designed. Four kinds of DNA dye, calcein, methylene blue, crystal violet and EB, were used to stain amplification products, then the dyeing effect could be evaluated. The LAMP method of detecting *C. jejuni* and other interference bacteria was tested on their specific evaluation. LAMP was Compared with the culture method of identification, and statistics analysis was performed. **Results** We had designed a LAMP method for detection of *C. jejuni*. The color changed obviously after combining with amplification products. Calcein was a better DNA dye substance of LAMP method. The LAMP method could only amplify *C. jejuni*, not amplify the other interference bacteria, showing a good specificity. Tests were detected in 60 clinical strains and standard strains. The results of LAMP showed no statistical significance compared with the culture method of identification ($\chi^2 = 0.3333, P > 0.05$). **Conclusion** The test designed a LAMP detection method of *C. jejuni*. Better DNA dye of the method is the calcein, and this method has a good specificity. Compared with the culture identification, this method has a higher positive, negative and overall coincidence rate, and can be used as a rapid test for *C. jejuni*.

Key words Loop - mediated isothermal amplification (LAMP); *Campylobacter jejuni*; DNA dye; Calcein; Rapid detection

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)具有很强的致病性,是世界上公认的引起急性腹泻和胃肠炎的主要病原菌之一,被世界卫生组织(WHO)列为最常见的食源性疾病,严重时可引起周围神经自身免疫性疾病——吉林-巴雷综合征(Guillain - barre syndrome, GBS)^[1,2]。流行病学调查表明,该菌作为肠炎的病因仅次于沙门菌和志贺菌,在很多地区甚至有超过沙门菌而居首位的趋势^[3]。人普遍易感,被污染的水和鲜奶是人类感染的主要来源,发展中国家感染主要以儿童为主^[4]。空肠弯曲菌进入人体后,借助鞭毛和特异性蛋白与空、回肠上皮细胞结合、繁殖,并产生肠毒素、细胞毒素和内毒素等物质,引起肠炎和肠道外感染。目前,空肠弯曲菌的检测主要是传统微需氧培养法及改良培养法,直接涂片染色检查法,免疫学方法和 PCR 及有关方法等^[5]。传统微需氧培养法及改良培养法条件苛刻,直接涂片染色检测对检测人员素质要求甚高,免疫学方法由于需洗涤和抗原包被等原因,易出现假阳性,敏感度非常依赖抗体的质量,PCR 及有关方法技术条件要求高,操作复杂,仪器繁多,且较为耗时。故上述方法不适合在基层医疗单位进行快速检验。而近来发展起来的环介导等温扩增法(loop - mediated isothermal amplification, LAMP)具有简单、快速、特异性强、敏感度高的特点。本研究的目的在于设计一种利用环介导恒温扩增法快速检测空肠弯曲菌的

方法,现将结果报告如下。

材料与方法

1. 标准菌株及研究对象:标准菌株:均购自于上海天呈医流有限公司,包括:空肠弯曲菌(ATCC33291);产气荚膜梭菌(ATCC13124);粪肠球菌(ATCC14506);大肠杆菌(ATCC25922);金黄色葡萄球菌(ATCC25923);铜绿假单胞菌(ATCC27853);福氏志贺菌(ATCC12022);伤寒沙门菌(ATCC14028);白色念珠菌(ATCC12031);奇异变形杆菌(ATCC12453);产酸克雷伯菌(ATCC49131);霍乱弧菌(ATCC14035)。选取笔者医院儿科急性腹泻患者大便标本 59 例。其中男性 33 例,患儿年龄 0~11 岁,平均年龄 3.4 岁;女性 26 例,患儿年龄 0~12 岁,平均年龄 3.1 岁。

2. 主要仪器:VITEK-2 全自动细菌培养鉴定仪,法国生物梅里埃公司生产;LA320C 实时动态浊度仪:日本荣研化学生产。

3. 主要试剂:DNA - LAMP 扩增试剂,日本荣研化学生产;ANI 细菌鉴定卡,法国生物梅里埃公司生产;细菌 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司生产;哥伦比亚血液琼脂血平板,重庆庞通公司生产;钙黄绿素、亚甲基蓝、结晶紫、溴化乙锭,购于美国 Sigma 公司。

4. LAMP 引物的设计:基因序列检索自 NCBI(National Center for Biotechnology Information);引物设计软件,日本荣研化学公司网络在线 LAMP 设计软件 Primerexplorer 4.0。方法:通过软件比对,筛选出空肠弯曲菌相对特异的区段;再在选出的区段中,设计 LAMP 引物;设计出的引物交由上海生工生物工程技术有限公司合成。

5. 细菌 DNA 提取:细菌 DNA 提取试剂盒由天根生化科

技(北京)有限公司生产。取待测菌液0.5ml置于EP管中,按照细菌DNA提取试剂盒操作步骤提取DNA。

6. LAMP 扩增方法:向 LAMP 扩增反应管加入 2 μ l 细菌 DNA,12.5 μ l 反应液,1.0 μ l BstDNA 聚合酶;2.5 μ l 引物(含 80 μ mol/L FIP,80 μ mol/L BIP,10 μ mol/L F3,10 μ mol/L B3 4 种引物),6 μ l 双蒸水,混匀。LA320C 实时动态浊度仪上 65 $^{\circ}$ C 恒温扩增 60min。

7. 常见 DNA 染料的评价:在用于扩增的反应管加入上述扩增所需物质后,再分别加入 1mg/L 钙黄绿素^[6]、2mg/L 和 4mg/L 亚甲基蓝^[7]、2mg/L 和 4mg/L 结晶紫^[8]、1mg/L 溴化乙锭^[9]各 1 μ l。LA320C 实时动态浊度仪上扩增 60min,每 20min 通过肉眼观察颜色的改变,并用相机拍摄照片,根据颜色是否变化明显,评价各染料染色效果。

8. LAMP 特异性试验:挑取生长良好的单个菌落,用生理盐水溶解,取各稀释度样本 1ml,做倾注培养,42 $^{\circ}$ C 过夜,计数菌落数(CFU),可确定菌液浓度,然后稀释菌液至 1 \times 10⁵CFU/ml。取已稀释好的待测菌液 1ml 置于 EP 管中,按照细菌 DNA 提取试剂盒操作步骤提取 DNA,然后进行 LAMP 扩增,用 LA320C 实时动态浊度仪检测扩增产物的浊度,通过浊度的变化得出空肠弯曲菌 LAMP 的特异性曲线。

9. LAMP 法与培养法对比试验:将粪便或肛拭子标本接种于哥伦比亚血液琼脂平板上,氧浓度控制在 5%~8%,置于 42 $^{\circ}$ C 培养 24h。然后挑取单个菌落,一半进行细菌 DNA 提取、LAMP 扩增,条件同前。另一半接种 ANI 鉴定卡,通过 VITEK-2 全自动细菌培养仪进行鉴定。以细菌鉴定仪为参考方法,将 LAMP 法检测结果与培养法检测结果对比,评价该 LAMP 法的阳性符合率、阴性符合率及总体符合率。

10. 统计学方法:计数资料采用阴阳性例数表示,采用 SPSS 10.0 软件包进行统计学分析。组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. LAMP 引物设计:通过基因比对与筛选,最终选择空肠弯曲菌 VS1 基因(*Campylobacter jejuni* VS1 gene;GenBank: X71603.1)为靶基因,设计 LAMP 引物。经美国 NCBI 网站 BLAST 软件验证,针对该段基因设计的引物具有良好的特异性。引物序列见表 1。

表 1 空肠弯曲菌 LAMP 引物的设计

| |
|---|
| Primers: (5'→3') |
| F3: AAATGTATGCCAAATTAGGTCT |
| B3: TCCACACATTTTTTACTCACTT |
| FIP: GCTGCACATAAAACAAGTTC AAGT - AGCAAGTTTAATGGCGTATT |
| BIP: AACCAT AAGACAAAGGACGCG - ACTTTTGCTCGCTATGTTCT |

2. 常见 DNA 染料的评价:染色结果见图 1。通过与阴性、阳性对照组比较,常见染料均能对 LAMP 产物进行染色,钙黄绿素通过肉眼能观察到较为明显

的颜色变化,而亚甲基蓝、结晶紫、EB 肉眼不能观察到明显的颜色变化,故钙黄绿素是 LAMP 产物较好的染料物质。

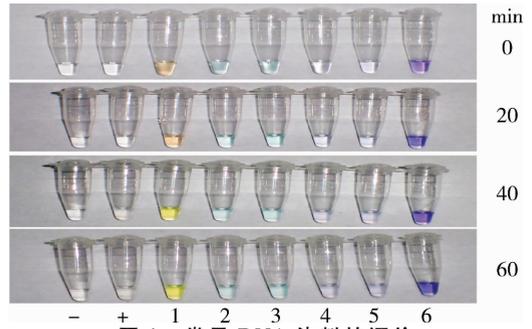


图 1 常见 DNA 染料的评价

- 阴性对照;+ 阳性对照;1.1mg/L 钙黄绿素;2.2mg/L 亚甲基蓝;3.4mg/L 亚甲基蓝;4.2mg/L 结晶紫;5.4mg/L 结晶紫;6.1mg/L EB

3. LAMP 特异性试验:LAMP 特异性试验见图 2。本 LAMP 检测方法能够对空肠弯曲菌进行特异性扩增,对其他肠道中常见的干扰菌均无扩增。说明本空肠弯曲菌 LAMP 检测方法有较好的特异性。

4. LAMP 检测与金标法的比较:以培养法为金标准,将本研究所述 LAMP 检测法与细菌培养鉴定法相比较,结果见表 2。该 LAMP 法与培养鉴定法差异无统计学意义, $(\chi^2 = 0.333, P > 0.05)$ 该 LAMP 法与培养鉴定法相比,阳性符合率为 91.67%、阴性符合率为 95.83%、总体符合率为 95.00%,可以作为基层医院检测快速空肠弯曲菌的检测方法。

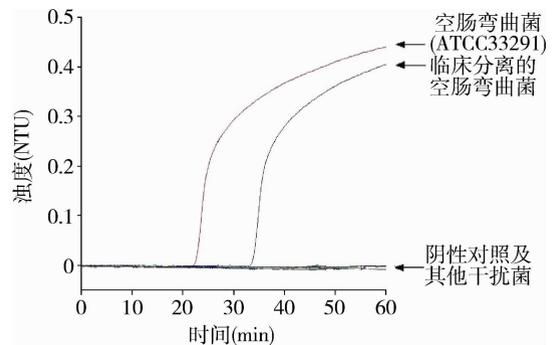


图 2 空肠弯曲菌 LAMP 特异性试验

其他干扰菌:产气荚膜梭菌、粪肠球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、福氏志贺菌、伤寒沙门菌、白色念珠菌、奇异变形杆菌、产酸克雷伯菌、霍乱弧菌

表 2 空肠弯曲菌 LAMP 检测法与细菌培养鉴定法的比较

| 项目 | 培养鉴定法(金标准) | |
|------------|------------|------|
| | 空肠弯曲菌 | 其他细菌 |
| LAMP 检测(+) | 11 | 2 |
| LAMP 检测(-) | 1 | 46 |
| 合计 | 12 | 48 |

讨 论

空肠弯曲菌具有很强的致病性,是引起腹泻的一种人畜共患致病菌。空肠弯曲菌革兰染色阴性,为微需氧菌,最适生长温度为 42 ~ 43℃。被污染的水和鲜奶是人类感染的主要来源。空肠弯曲菌进入人体后,借助鞭毛和特异性蛋白与空、回肠上皮细胞结合、繁殖,并产生肠毒素、细胞毒素和内毒素等物质,引起肠炎和肠道外感染。目前,空肠弯曲菌的检测主要是传统微需氧培养法及改良培养法,直接涂片染色检查法,免疫学方法和 PCR 及有关方法等。传统微需氧培养法及改良培养法条件苛刻,检测周期长,仪器昂贵,基层医院不具备条件,且易出现假阴性。直接涂片染色检测对检测人员素质要求甚高,也易出现假阴性。免疫学方法虽快速,操作简单、特异性较强,但由于需洗涤和抗原包被等原因,易出现假阳性,实验敏感度非常依赖抗体的质量,且抗体的制备较为耗时。PCR 及有关方法虽有较好的特异性,但现行的 PCR 技术条件要求高,操作复杂,仪器繁多,且检测时间长。种种原因制约了上述方法在基层医疗单位快速检验的应用。

随着分子诊断技术的不断进步,环介导恒温扩增技术(LAMP)越来越广泛的用于生命科学领域及相关诸多领域中。LAMP 技术是在传统的 PCR 基础上创建的一种理想的手段,其特点是:设备简单、特异性强、敏感度高、操作简便、反应迅速。本法扩增产物可以通过肉眼观察、检测浊度或电阻、电泳方法进行检测^[10]。目前,LAMP 检测技术研究得到了广泛的应用。如对沙门菌、霍乱毒素、虾中的白斑综合征病毒、志贺菌属、大肠杆菌 O157: H7、结核分枝杆菌等,都实现了快速检测^[11-16]。通过进一步改进 LAMP 设计,还可以对目标 DNA 实现定量测定,从而准确辅助临床治疗。

本研究所述方法依据环介导恒温扩增技术的基本原理,采用空肠弯曲菌 VS1 基因为靶基因,设计 LAMP 引物,基因序列来源于美国 NCBI 基因数据库。对其进行了基因比对,找到相对保守的区段。再应用日本荣研公司 Primerexplorer4.0 在线设计软件,在保守区段上设计 LAMP 引物,再配合美国 NCBI BLAST 软件验证了设计引物与空肠弯曲菌的特异性较高,与其他菌的特异性则较低,在此基础上建立空肠弯曲菌的 LAMP 检测方法。通过实验发现,4 种 DNA 荧光染料中,钙黄绿素通过肉眼能观察到较为明显的颜色变化,而亚甲基蓝、结晶紫、EB 肉眼不能观察到明显

的颜色变化。故钙黄绿素是 LAMP 法中较好的 DNA 染料物质。空肠弯曲菌 LAMP 检测方法只针对空肠弯曲菌扩增,对其他干扰菌不扩增,显示出良好的特异性。结果表明,本试验设计的空肠弯曲菌 LAMP 检测方法与现有的培养鉴定空肠弯曲菌的方法相比,具有较高的阳性率、阴性率及总体符合率,而且操作简便、快速,有望用于急性腹泻和肠炎等疾病的快速检验。

参 考 文 献

- 林超,梁成珠,徐彪.空肠弯曲菌 LAMP 快速检测方法的建立[J].微生物学通报,2009,36(6):923-924
- 李焯,史峰,王小元.空肠弯曲菌致病分子机制研究进展[J].食品与生物技术学报,2009,28(3):294-295
- Sahin O, Kobalka P, Zhang Q. Detection and survival of *Campylobacter jejuni* in chicken eggs[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(5): 1070-1079
- 阳成波,蒋原,黄克和.空肠弯曲菌感染流行病学研究进展[J].动物医学进展,2002,23(6):10-12
- 王艳玲.空肠弯曲菌检测方法研究进展[J].职业与健康,2010,26(14):1638-1639
- 张跃伟,李旭妮,郭盼盼.荧光显色在环介导等温扩增(LAMP)检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的应用[J].农业生物技术学报,2010,18(3):508-513
- 吴海霞,康敬万,李志峰.亚甲基蓝与 DNA 相互作用的电化学研究[J].分析测试学报,2006,25(4):1-5
- 王振永,焦奎,孙伟.结晶紫与 DNA 相互作用的电化学研究[J].青岛科技大学学报,2004,25(6):480-483
- 江一帆,郭潮潭.环介导等温扩增技术及在感染病诊断中的应用[J].中国卫生检验杂志,2008,18(9):1933-1935
- 高芳,曹明富.环介导的核酸恒温扩增技术概述[J].生物学教学,2011,36(5):5-7
- Kayoko O, Keiko Y, Kosuke T, et al. Detection of salmonella entericain naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of salmonella isolates[J]. *Applied And Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 6730-6735
- 燕勇,曹家穗,高雯洁.利用环介导等温核酸扩增技术(LAMP)快速检测霍乱弧菌[J].中国卫生检验杂志,2011,21(5):1158-1162
- Kono T, Savan R, Sakai M, et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Virology*, 2004, 321: 59-65
- Song T, Toma C, Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of shigella and enteroinvasive escherichiacoli by a loopmediated isothermal amplification method[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 243(1): 259-263
- Kawasaki S, Horikoshi N, Okada Y, et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples[J]. *Journal of Food Protection*, 2005, 68: 551-556

(收稿日期:2013-01-21)

(修回日期:2013-03-07)