

## 技术与方法

## 副溶血弧菌 LAMP 检测方法的建立\*

徐 芊 孙晓红 赵 勇 潘迎捷\*\*

(上海水产大学食品学院 上海 200090)

**摘要** 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种能引起食源性疾病的重要病原菌。首次将一种新颖的核酸扩增技术-环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)应用于副溶血弧菌的快速检测。针对副溶血弧菌不耐热溶血毒素基因(*tlh*)设计4条特异性引物(两条内引物和两条外引物)进行LAMP扩增,对扩增反应进行优化,最佳反应时间为60min,反应温度为60℃。对12种细菌共28株菌进行LAMP扩增,仅14株副溶血弧菌得到阳性扩增结果,证明引物具有很高的特异性。副溶血弧菌基因组DNA和纯培养物的检测灵敏度分别约为90fg和24cfu/ml。对模拟食品样品进行直接检测,检测限为89cfu/g。结果表明,该方法检测副溶血弧菌特异性强、灵敏度高,并且操作简便、检测成本低,1小时即可完成,有望发展成为快速检测副溶血弧菌的有效手段。

**关键词** 副溶血弧菌 环介导等温扩增技术(LAMP) 不耐热溶血毒素基因(*tlh*) 检测

**中图分类号** Q93

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种重要的食源性致病菌,发病呈世界性分布,人们食用受该菌污染的食物后会引发腹泻、肠痉挛、呕吐等,重症患者还会脱水、休克昏迷,甚至死亡。目前,副溶血弧菌引起食物中毒的发生规模以及人群暴露规模呈明显上升趋势,已成为我国首要的食源性致病菌<sup>[1]</sup>。副溶血弧菌是进出口水产品检测的重要项目,在饮用水、食品检测和食品中毒源调查、传染病源调查等工作中,也经常需要对该菌进行检测。因此,发展快速准确、操作简便的检测与鉴定副溶血弧菌的方法一直是相关研究的热点。目前,副溶血弧菌快速检测方法主要有ELISA、DNA探针、常规PCR、Real-time PCR等<sup>[2-5]</sup>。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新颖的核酸扩增技术,它依赖于能够识

别靶DNA上6个特定区域的4条引物和一种具有链置换活性的DNA聚合酶,在恒温条件下高效扩增核酸,具有高特异性、快速灵敏、高效、操作简便等特点<sup>[6]</sup>。自2000年开发以来,LAMP技术在临床疾病的诊断<sup>[7-9]</sup>、流行性细菌或病毒的定性定量检测<sup>[10-15]</sup>以及动物胚胎性别鉴定<sup>[16]</sup>等方面应用广泛。LAMP技术在国内起步较晚,相关研究报道不多,而应用LAMP技术检测副溶血弧菌国内外均未见文献报道。本研究针对副溶血弧菌不耐热溶血毒素基因(*tlh*)设计一套LAMP引物,对副溶血弧菌进行检测,优化反应条件,验证检测特异性和灵敏度,并应用于食品样品的直接检测,尝试建立副溶血弧菌LAMP检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33846, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33847, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802)、坎普氏弧菌(*Vibrio campbellii* ATCC 33864)、河流弧菌(*Vibrio fluvialis* ATCC

收稿日期:2007-09-17 修回日期:2007-10-18

\*上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字2005第4-2号),上海市重点学科建设项目(T1102),上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金资助项目(K07-25)

\*\*通讯作者,电子信箱:yjpan@shfu.edu.cn

33809)、哈氏弧菌(*Vibrio harveyi* ATCC 33842)、沙门氏菌(*Salmonella* sp. 1. 1552)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 1. 1361)购自中国科学院微生物研究所,英诺克李斯特菌(*Listeria innocua* GIM 1. 230)、威尔氏李斯特菌(*Listeria welshimeri* GIM 1. 231)、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes* GIM 1. 228,*Listeria monocytogenes* GIM 1. 229)购自广东微生物研究所。其余副溶血弧菌 11 株(xq 1~11),大肠杆菌 1 株,霍乱弧菌 3 株(zhy 1~3),志贺氏菌 1 株为本实验室保存菌株。

1.1.2 主要试剂和仪器 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),*Bst* DNA 聚合酶大片段(New England Biolabs),betaine (Sigma-Aldrich),agarose (Promega)。DK-8D 型电热恒温水槽

表 1 扩增 *tth* 基因的 LAMP 引物序列

Table 1 Sequence of LAMP primers for specific amplification of the *tth* gene

名称	引物序列	位置
FIP	5'-GCCCATTCCTCCGATCGGTCG-TTTT-CTATGTTTCGCTGTTGGTATCG-3'	(323~305)~(258~278)
BIP	5'-GTTCTACACCAACACGTCGCA-TTTT-TCGCCAAATCTAATGTTGCTTC-3'	(393~413)~(457~436)
F3	5'-CAGCACGCAAGAAAACCA-3'	231~248
B3	5'-ATTGTCAGCGGCGAAGAA-3'	495~478

1.4 LAMP 反应及条件的优化

1.4.1 LMAP 反应 配制反应体系 25μl,包括:MgSO<sub>4</sub>、dNTPs、betaine、内引物、外引物、*Bst* DNA 聚合酶大片段、1×ThermoPol buffer 以及适量的 DNA 模板;混匀,于 65℃ 温育 60min,80℃ 灭活 10min;产物于 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析,同时肉眼观察反应体系的浊度变化。

1.4.2 反应条件的优化 选择不同浓度梯度的 Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、betaine 以及不同浓度比例的内外引物,改变反应时间和温度进行 LAMP 反应,电泳观察扩增效果,确定最佳反应条件。

1.5 特异性试验

用建立的 LAMP 方法分别对 28 株实验菌株进行扩增,电泳观察扩增结果,验证方法特异性。

1.6 灵敏度试验

1.6.1 基因组 DNA 检测灵敏度 用试剂盒提取副溶血弧菌 ATCC 33846 基因组 DNA 并测定浓度,10 倍倍比稀释 DNA 原液至 10<sup>-1</sup>~10<sup>-9</sup>,各取 2μl 作为模板进行 LAMP 扩增。

1.6.2 细菌纯培养物检测灵敏度 将过夜培养的副

(上海一恒科技有限公司),DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2 DNA 模板的制备

1.2.1 试剂盒法 按照试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA。

1.2.2 煮沸法 细菌纯培养物 1ml 于 12000r/min 离心 5min,加入 100μl 无菌水,混匀后,于 100℃ 水浴 10min,冰浴 2min,12000r/min 离心 5min,上清液备用。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 公布的副溶血弧菌 *tth* 基因序列(Accession number:M36437)中的保守序列,设计一套特异性的 LAMP 引物,包括两条外引物 F3、B3 和两条内引物 FIP、BIP。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列见表 1。

溶血弧菌 ATCC 33846 菌液 10 倍倍比稀释至 10<sup>-1</sup>~10<sup>-8</sup>,取各稀释度菌液 100μl 进行平板计数。同时,取各稀释度菌液 1ml,用煮沸法提取 DNA,取 2μl 上清液作为模板进行 LAMP 扩增。

1.7 食品样品的检测应用

取经传统方法和常规 PCR 方法预检副溶血弧菌阴性的对虾肉 10g 加入到 90ml 碱性蛋白胨水中,于组织捣碎机中匀浆约 60s,制成虾肉匀浆。取 10ml 虾肉匀浆接入 1ml 已知浓度的副溶血弧菌标准菌株,混匀作为食品样品原样,之后以虾肉匀浆为稀释液 10 倍倍比稀释原样至 10<sup>-1</sup>~10<sup>-8</sup>,各取 1ml 用试剂盒法提取 DNA,进行 LAMP 扩增。

2 结 果

2.1 LAMP 检测方法的建立

以本研究设计的一套特异性引物对副溶血弧菌 ATCC 33846 基因组 DNA 进行 LAMP 扩增。电泳检测结果如图 1a,副溶血弧菌基因组 DNA 泳道产生阶梯状条带,以水作为模板的阴性对照未有条带出现;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,5000r/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,结果如图 1b,结果表明此套 LAMP 引物能够有效扩增副溶血弧菌 *ih* 基因。

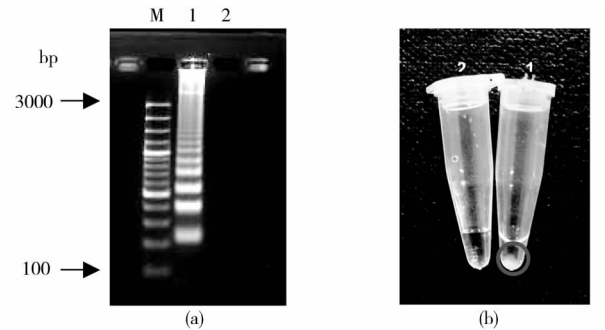


图 1 副溶血弧菌标准菌株 LAMP 检测结果

M: 100bp marker; 1: 副溶血弧菌 ATCC 33846; 2: 阴性对照

Fig.1 The LAMP result of *V. parahaemolyticus* standard strain

2.2 反应条件的优化

2.2.1  $Mg^{2+}$  浓度 选择  $Mg^{2+}$  浓度为 2mmol/L ~ 18mmol/L 进行 LAMP 反应,如图 2,  $Mg^{2+}$  浓度为 8mmol/L 时扩增效果最佳。

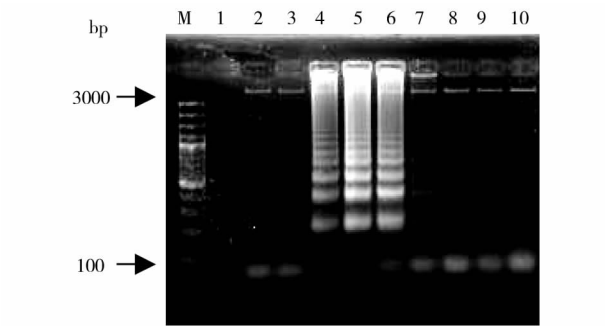


图 2  $Mg^{2+}$  浓度对 LAMP 反应的影响

M:100bp marker; 1: 阴性对照; 2: 2 mmol/L; 3: 4 mmol/L; 4: 6 mmol/L; 5: 8 mmol/L; 6: 10 mmol/L; 7: 12 mmol/L; 8: 14 mmol/L; 9: 16 mmol/L; 10: 18 mmol/L

Fig.2 Effect of  $Mg^{2+}$  concentrations on the LAMP reaction

2.2.2 dNTPs 浓度 选择 dNTPs 浓度为 0 mmol/L ~ 1.8mmol/L 进行 LAMP 反应,如图 3, dNTPs 浓度为 1.0mmol/L 时达到最佳扩增效果。

2.2.3 betaine 浓度 选择 betaine 浓度范围 0mol/L ~ 1.2mol/L 进行 LAMP 反应,如图 4, betaine 浓度为 0.8mol/L 时达到最优的扩增效果。

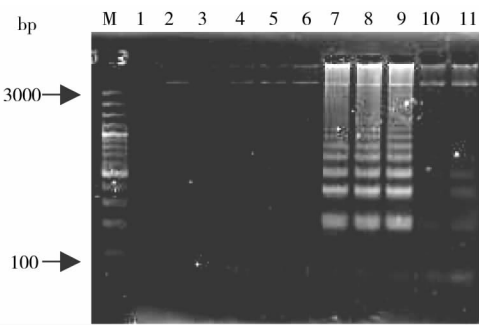


图 3 dNTPs 浓度对 LAMP 反应的影响

M: 100bp marker; 1: 阴性对照; 2: 0mmol/L; 3: 0.2mmol/L; 4: 0.4mmol/L; 5: 0.6mmol/L; 6: 0.8mmol/L; 7: 1.0mmol/L; 8: 1.2mmol/L; 9: 1.4mmol/L; 10: 1.6mmol/L; 11: 1.8mmol/L

Fig.3 Effect of dNTPs concentrations on the LAMP reaction

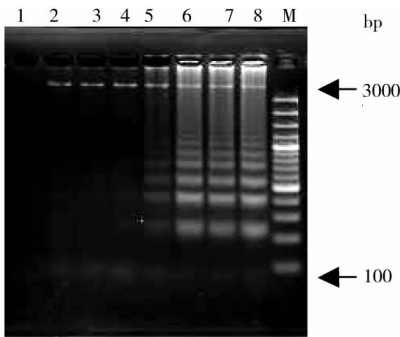


图 4 betaine 浓度对 LAMP 反应的影响

M: 100bp marker; 1: 阴性对照; 2: 0mol/L; 3: 0.2mol/L; 4: 0.4mol/L; 5: 0.6mol/L; 6: 0.8mol/L; 7: 1.0mol/L; 8: 1.2mol/L

Fig.4 Effect of betaine concentrations on the LAMP reaction

2.2.4 内外引物浓度比 分析体系中不同浓度比例的内外引物对于扩增反应的影响,结果如图 5,外引物与内引物的浓度比 1:6 时达到最佳扩增效果。

2.2.5 反应温度 比较不同温度对于反应的影响,如图 6,当反应温度达到 58℃ 出现阶梯状条带,反应温度为 60℃ 达到最佳扩增效果。

2.2.6 反应时间 选择反应时间 30 ~ 60min,对副溶血弧菌 ATCC 33846、ATCC 33847 进行扩增,以保证结果的可靠性,如图 7,当反应进行到 45min 时,两株菌都出现较为明显的阶梯状条带,但在之后的扩增反应中发现反应时间 60min 比 45min 能保持更好的扩增稳定性和一致性,因此最佳反应时间为 60min。

综上,经优化之后的 LAMP 反应体系(25μl)包括:

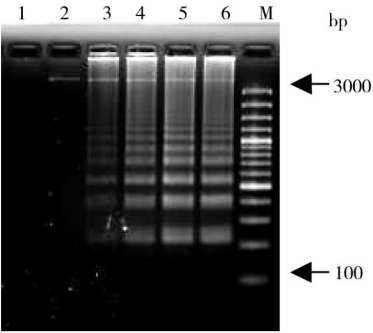


图5 外引物与内引物的浓度比对 LAMP 反应的影响  
M:100bp marker; 1:阴性对照; 2:1:1; 3:1:2; 4:1:4; 5:1:6; 6:1:8

Fig.5 Effect of ratio of outer and inner primers on the LAMP reaction

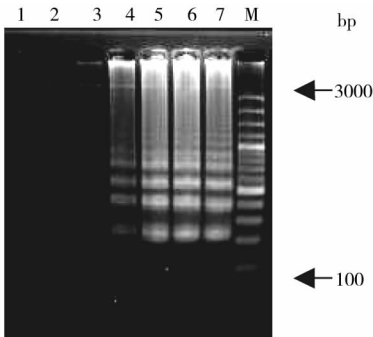


图6 反应温度对 LAMP 反应的影响  
M: 100bp marker; 1: 阴性对照; 2: 53℃; 3: 55℃; 4: 58℃; 5: 60℃; 6: 63℃; 7: 65℃

Fig.6 Effect of temperature on the LAMP reaction

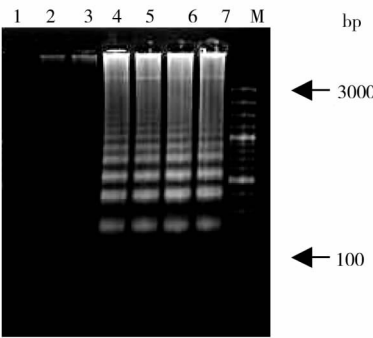


图7 反应时间对 LAMP 反应的影响  
M: 100bp marker; 1: 阴性对照; 2、4、6: 以副溶血弧菌 ATCC 33846 基因组 DNA 为模板分别扩增 30min、45min、60min; 3、5、7: 以副溶血弧菌 ATCC 33847 基因组 DNA 为模板分别扩增 30min、45min、60min

Fig.7 Effect of reaction length on the LAMP reaction

8mmol/L MgSO<sub>4</sub>、1.0mmol/L dNTPs、0.8mol/L betaine、

1.2μmol/L 内引物、0.2μmol/L 外引物、1 U *Bst* DNA 聚合酶大片、1 × ThermoPol buffer 以及适量的 DNA 模板。最佳反应温度 60℃,反应时间 60min。

2.3 特异性试验

特异性试验结果如图 8 所示,仅 14 株副溶血弧菌出现 LAMP 特有的阶梯状扩增条带,其他 14 株非副溶血弧菌均未出现阶梯状条带,特异性强。

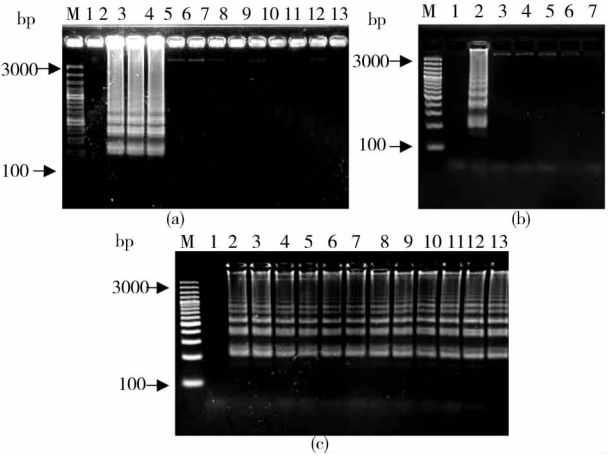


图8 LAMP 特异性试验结果

(a)标准菌株 LAMP 检测结果 M: 100 bp marker; 1: 阴性对照; 2: 副溶血弧菌 ATCC 33846; 3: 副溶血弧菌 ATCC 33847; 4: 副溶血弧菌 ATCC 17802; 5: 坎普氏弧菌 ATCC 33864; 6: 河流弧菌 ATCC 33809; 7: 哈氏弧菌 ATCC 33842; 8: 金黄色葡萄球菌 1.1361; 9: 沙门氏菌 1.1552; 10: 英诺克李斯特菌 GIM 1.230; 11: 威尔氏李斯特菌 GIM 1.231; 12: 单增李斯特菌 GIM 1.228; 13: 单增李斯特菌 GIM 1.229 (b)自备阴性对照菌株 LAMP 检测结果 M: 100 bp marker; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3: 霍乱弧菌 zhy1; 4: 霍乱弧菌 zhy2; 5: 霍乱弧菌 zhy3; 6: 大肠杆菌; 7: 志贺氏菌 (c)自备副溶血弧菌 LAMP 检测结果 M: 100 bp marker; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3: 副溶血弧菌 xq1; 4: 副溶血弧菌 xq2; 5: 副溶血弧菌 xq3; 6: 副溶血弧菌 xq4; 7: 副溶血弧菌 xq5; 8: 副溶血弧菌 xq6; 9: 副溶血弧菌 xq7; 10: 副溶血弧菌 xq8; 11: 副溶血弧菌 xq9; 12: 副溶血弧菌 xq10; 13: 副溶血弧菌 xq11

Fig.8 The result of LAMP specificity test

2.4 灵敏度试验

2.4.1 基因组 DNA 检测灵敏度 副溶血弧菌 ATCC 33846 基因组 DNA 浓度为 449ng/μl。10 倍倍比稀释 DNA 原液进行 LAMP 检测,结果显示基因组 DNA 检测限约为 90fg,见图 9。

2.4.2 细菌纯培养物检测灵敏度 经平板计数,原始菌液浓度为 2.39 × 10<sup>7</sup> cfu/ml。10 倍倍比稀释菌液进

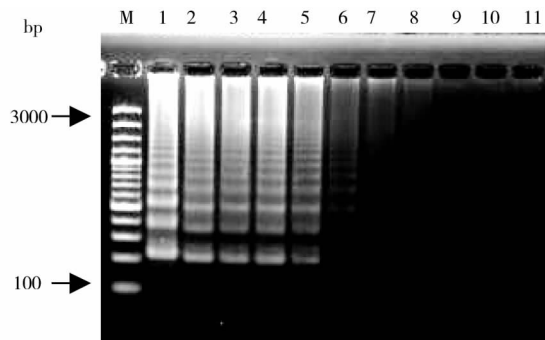


图9 LAMP 检测副溶血弧菌基因组 DNA 的灵敏度试验结果

M: 100bp marker; 1: 阳性对照; 2: 90ng; 3: 9ng; 4: 900pg; 5: 90pg; 6: 9pg; 7: 900fg; 8: 90fg; 9: 9fg; 10: 0.9fg; 11: 阴性对照

Fig. 9 Detection limit of LAMP for *V. parahaemolyticus* genomic DNA

行 LAMP 检测,结果显示该法细菌纯培养物检测限约为 24cfu/ml,见图 10。

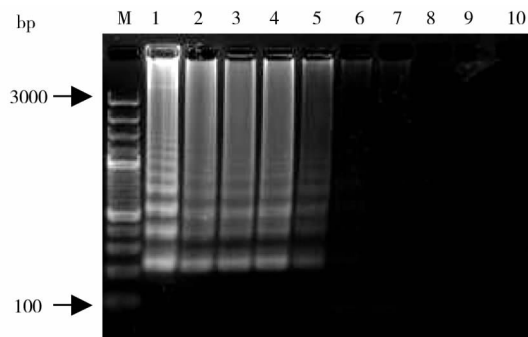


图10 LAMP 检测副溶血弧菌纯培养物的灵敏度试验结果

M: 100bp marker; 1: 阳性对照; 2:  $2.39 \times 10^6$  cfu/ml; 3:  $2.39 \times 10^5$  cfu/ml; 4:  $2.39 \times 10^4$  cfu/ml; 5:  $2.39 \times 10^3$  cfu/ml; 6:  $2.39 \times 10^2$  cfu/ml; 7:  $2.39 \times 10^1$  cfu/ml; 8:  $2.39 \times 10^0$  cfu/ml; 9:  $2.39 \times 10^{-1}$  cfu/ml; 10: 阴性对照

Fig. 10 Detection limit of LAMP for *V. parahaemolyticus* culture

## 2.5 食品样品的检测应用

经平板计数副溶血弧菌浓度为  $8.9 \times 10^7$  cfu/ml, 亦即模拟食品原样中副溶血弧菌浓度为  $8.9 \times 10^7$  cfu/g (10ml 虾肉匀浆相当于 1g 虾肉)。食品样品 LAMP 检测结果如图 11 所示, 染菌的食品样品出现阶梯状条带, 而未染菌的虾肉匀浆作为模板的阴性对照未有条带出现, 另外梯度扩增试验表明该法直接检测食品

样品的检测限为 89cfu/g。

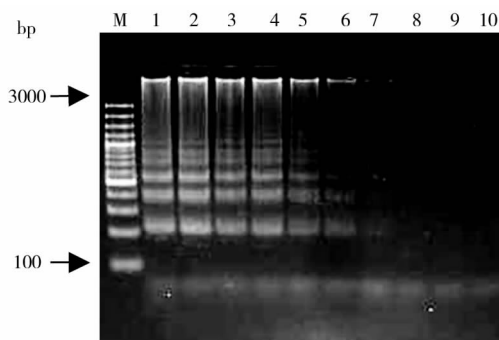


图11 模拟食品样品中副溶血弧菌 LAMP 检测结果

M: 100bp marker; 1: 阳性对照; 2:  $8.9 \times 10^6$  cfu/g; 3:  $8.9 \times 10^5$  cfu/g; 4:  $8.9 \times 10^4$  cfu/g; 5:  $8.9 \times 10^3$  cfu/g; 6:  $8.9 \times 10^2$  cfu/g; 7:  $8.9 \times 10^1$  cfu/g; 8:  $8.9 \times 10^0$  cfu/g; 9:  $8.9 \times 10^{-1}$  cfu/g; 10: 阴性对照

Fig. 11 The LAMP result of *V. parahaemolyticus* in artificially contaminated food samples

## 3 讨论

以往有关副溶血弧菌快速检测的文献多数选择副溶血弧菌的耐热溶血毒素基因 *tdh* 和耐热相关溶血毒素基因 *trh* 为靶基因进行检测<sup>[17-19]</sup>, 但是 *tdh* 和 *trh* 基因都不是单一基因, 它们与其他细菌毒素基因具有很高的同源性, 而且不含 *tdh*、*trh* 基因但尿素酶阳性的副溶血弧菌的致病性也不可忽视。Hatsumi 等于 1985 年发现无论是临床分离株还是环境分离株都含有 *tlh* 基因, 具有种特异性<sup>[3]</sup>, 因此, 本研究选择副溶血弧菌 *tlh* 基因为靶基因建立 LAMP 检测方法。

LAMP 技术依赖于能够识别靶 DNA 上 6 个特定区域的 4 条引物和一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶, 在恒温条件下扩增核酸, 保证了扩增的高特异性和高效率, 能从仅相差一个核苷酸的基因标本中找出相应靶序列进行扩增, 根据扩增与否即可判断目的基因是否存在。由于 LAMP 独特的核酸扩增机制, 它的产物是由多重靶序列的茎-环状 DNA 和花椰菜状 DNA 所组成的混合物, 在琼脂糖凝胶电泳上会呈现出 LAMP 所特有的阶梯状条带。另外, LAMP 扩增效率很高, 在反应过程中, 核酸大量合成, 从 dNTPs 析出的焦磷酸根离子与反应体系中的镁离子结合, 产生扩增反应副产物-焦磷酸镁白色沉淀, 反应体系浊度发生变化, 肉眼可见, 这是判断 LAMP 反应进行与否的最直接参照因素<sup>[20]</sup>, 因此, LAMP 可以实现反应及产物检测一步完

成,可以直接根据反应体系的浊度变化来判断反应是否发生,进而判断目的基因存在与否。

本研究针对副溶血弧菌种特异性基因 *tlh* 基因设计一套 LAMP 引物进行扩增,并对各反应条件进行优化,保证了方法的可靠性和特异性;对哈氏弧菌等弧菌属细菌以及单增李斯特菌等非弧菌属细菌共 14 株进行 LAMP 扩增,均未出现阳性结果,特异性强,另外,在某些非副溶血弧菌泳道出现分子量较大的 DNA 条带可能是由于模板 DNA 浓度较高而引起,并非出现非特异扩增。本方法灵敏度高,对于基因组 DNA 的检测限约为 90fg,对于细菌纯培养物检测限约为 24cfu/ml,这一结果与文献<sup>[12~14]</sup>报道的检测限 76fg 细菌基因组 DNA 以及 20cfu/ml 细菌纯培养物基本相符,同时,该法的检测限也明显低于文献<sup>[3~5]</sup>报道的 PCR 法检测副溶血弧菌的检测限  $2.4 \times 10^2$  cfu/ml 细菌纯培养物、Real-time PCR 法检测副溶血弧菌的检测限 200pg 基因组 DNA 以及  $10^4$  cfu/ml 细菌纯培养物。本方法能直接对食品样品中的副溶血弧菌进行检测,与传统培养方法相比,大大缩短了检测周期,直接对食品样品中的副溶血弧菌进行检测的灵敏度为 89cfu/g,低于文献[21]报道的  $10^3$  cfu/g 的检测限。此外,本方法在恒温条件下进行反应,1 小时即可完成,耗时短,同时,使用恒温水浴装置即可完成反应,不需要使用昂贵、精密的仪器设备,而且可目测反应体系浊度变化进行产物检测,实现反应及产物检测一步完成,操作简便,检测成本低。

综上所述,本研究建立的副溶血弧菌 LAMP 检测方法具有特异性强、灵敏度高,方便快捷、成本低等特点,为副溶血弧菌的检测提供了新的发展方向,有望成为简易的常规检测手段,尤其适用于基层检验检疫机构,对于提高食品卫生水平、保证食品安全和推动食品国际贸易发展具有重要的意义。

## 参考文献

- [1] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 3~9
- Liu X M. Chinese Journal of Food Hygiene, 2004, 16(1): 3~9
- [2] Gooch J A, Depaola A, Kaysner C A, et al. Evaluation of two direct plating methods using nonradioactive probes for enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(2): 721~724
- [3] 李志峰, 聂军, 陈义忠, 等. 一种快速检测副溶血弧菌的 PCR 方法. 解放军预防医学杂志, 2004, 22(6): 443~444
- Li Z F, Nie J, Chen Y ZH, et al. Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army, 2004, 22(6): 443~444
- [4] 钟凯, 田静, 李业鹏, 等. 食品中副溶血弧菌 PCR 快速检测方法的研究. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(4): 317~320
- Zhong K, Tian J, Li Y P, et al. Chinese Journal of Food Hygiene, 2004, 16(4): 317~320
- [5] Ward N, Bej A K. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(3): 2031~2042
- [6] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): 63
- [7] Endo S, Komori T, Ricci G, et al. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. FEMS Microbiol Lett, 2004, 234(1): 93~97
- [8] Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, et al. Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol, 2005, 43(4): 1625~1631
- [9] Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y, et al. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol, 2004, 42: 140~145
- [10] Poon L L, Leung C S, Tashiro M, et al. Rapid detection of the severe acute respiratory syndrome (SARS) corona virus by a loop-mediated isothermal amplification assay. Clin Chem, 2004, 50: 1050~1052
- [11] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, et al. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. Vaccine, 2006, 24(44): 6679~6682
- [12] Yeh H Y, Shoemaker C A, Klesius P H, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel fish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri*. J Microbiol Methods, 2005, 63: 36~44
- [13] Hara-Kudo Y, Yoshino M, Kojima T, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. FEMS Microbiol Lett, 2005, 253: 155~161
- [14] Song T, Toma C, Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. FEMS Microbiol Lett, 2005, 243: 259~263

- [15] Ohtsuka K, Yanagawa K, Takatori K, et al. Detecton of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11): 6730 ~ 6735
- [16] Hirayama H, Kageyama S, Takahashi Y, et al. Rapid sexing of water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*, 2006, 66: 1249 ~ 1256
- [17] Blackstone G M, Nordstrom L J, Vickery M C, et al. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *J Microbiol Methods*, 2003, 53: 149 ~ 155
- [18] 扈庆华, 郑薇薇, 石晓路, 等. 改良分子信标-实时 PCR 快速检测副溶血弧菌. *现代预防医学*, 2004, 31(3): 441 ~ 443
- Hu Q H, Zheng W W, Shi X L, et al. *Modern Preventive Medicine*, 2004, 31(3): 441 ~ 443
- [19] Rorbert-Pillot A, Guenole A, Lesne J, et al. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *International J Food Microbiol*, 2004, 91: 319 ~ 325
- [20] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289: 150 ~ 154
- [21] 翁文川, 焦红, 王方金, 等. 食品中副溶血弧菌荧光定量 PCR 方法快速检测. *中国公共卫生*, 2005, 21(11): 1359 ~ 1361
- Weng W CH, Jiao H, Wang F J, et al. *Chinese Journal of Public Health*, 2005, 21(11): 1359 ~ 1361

## Development of Loop-mediated Isothermal Amplification ( LAMP ) Method for Detection of *Vibrio parahaemolyticus*

XU Qian SUN Xiao-hong ZHAO Yong PAN Ying-jie

( College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China )

**Abstract** *Vibrio parahaemolyticus* has been considered as one of the most important foodborne bacterial pathogens. The loop-mediated isothermal amplification ( LAMP ) that amplifies DNA with high specificity and rapidity under an isothermal condition was applied for rapid detection of this pathogen for the first time. A set of four primers, two outer and two inner primers, was designed specifically to recognize the thermolabile hemolysin gene ( *tlh* ) of *V. parahaemolyticus*. The LAMP reaction mix was optimized. The most optimal reaction temperature and time of the LAMP assay for the *tlh* gene were 60°C and 60min, respectively. Genomic DNAs from 28 bacterial strains including 14 *V. parahaemolyticus* strains were amplified using LAMP, and no amplicon was observed in other bacterial strains. The detection limit of this LAMP assay was around 90 fg of *V. parahaemolyticus* genomic DNA and 24 colonies forming units for pure cultures. In addition, this method was applied to detect artificially contaminated food samples, and the detection limit was 89 cfu/g for non-cultured artificially contaminated food samples. These results suggested that detection of *V. parahaemolyticus* by LAMP is an effective and low-cost procedure with high specificity and sensitivity that requires no specialized equipment. This assay is expected to become a valuable tool for rapid detection and identification of *V. parahaemolyticus*.

**Key words** *Vibrio parahaemolyticus* Loop-mediated isothermal amplification ( LAMP ) Thermolabile hemolysin gene ( *tlh* ) Detection