

基于毛细管电泳的环介导恒温扩增技术 检测方法研究

李振庆^{1*}, 吴到检¹, 张大伟¹, 山口佳则^{2,3}

(1. 上海理工大学 光电信息与计算机工程学院, 上海 200093; 2. 华东理工大学
理学院 物理系, 上海 200237; 3. 大阪大学 应用物理系, 大阪 565-0871)

摘要: 以大肠杆菌(*E. coli*)为对象, 采用环介导恒温扩增技术(LAMP)对其扩增, 在实验室自制的毛细管电泳-诱导荧光平台上建立了 LAMP 产物的检测新方法。引物 F3, B3, FIP, BIP 扩增的 *E. coli* LAMP 产物大小为 240 bp。优化的毛细管电泳条件为: 毛细管有效长度/总长度(10 cm/15 cm), 筛分介质溶液为 0.5% 羧甲基纤维素(1 300 K), 电场强度(100 V/cm), 进样条件(100 V/cm, 1.0 s)。毛细管电泳时, DNA 长度在 100 ~ 500 bp 范围内与其迁移时间呈线性关系, 相关系数为 0.996。在相同毛细管电泳条件下对 *E. coli* LAMP 产物进行分析, 并利用这种线性关系在电泳图中对 *E. coli* LAMP 产物与假阳性产物做区分, 结果表明, 毛细管电泳技术不仅可在 15 min 内实现 LAMP 产物及附加产物的快速检测, 而且可快速区分 LAMP 阳性及假阳性实验产物。采用建立的毛细管电泳快速检测 LAMP 产物的方法, 对 AB0174 *E. coli* 基因实施了 LAMP, 结果表明该方法适合 DNA LAMP 产物的快速检测。

关键词: 环介导恒温扩增反应; 毛细管电泳; 假阳性

中图分类号: O657.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2016)06-0758-04

Detection of Loop-mediated Isothermal Amplification Products by Capillary Electrophoresis

LI Zhen-qing^{1*}, WU Dao-jian¹, ZHANG Da-wei¹, YAMAGUCHI Yoshinori^{2,3}

(1. School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. Department of Physics Faculty of Science, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 3. Department of Applied Physics, Osaka University, Yamadaoka Suita-city, Osaka 565-0871, Japan)

Abstract: A novel method was proposed for the detection of loop mediated isothermal amplification (LAMP) products of *Escherichia coli* (*E. coli*) based on self-built capillary electrophoresis (CE) with lamp induced fluorescence system. Four primers were designed for the target DNA, and the sizes of the LAMP products of *E. coli* corresponding to the primers of F3, B3, FIP and BIP were 240 bp. The best result was achieved with the sieving polymer of 0.5% HEC (1 300 K), an electric field strength of 100 V/cm and an injection time of 1.0 s at the electric field strength of 100 V/cm. The migration time of DNA from 100 bp to 500 bp is linearly related with DNA size, and the correlation coefficient is 0.996. The LAMP products of *E. coli* were resolved under the same electrophoretic conditions. The sizes of the LAMP products were calculated based on the linear relationship, and the positive products was distinguished from the false-positive products. The results demonstrated that CE could not only rapidly separate the LAMP products of *E. coli* within 15 min, but also distinguish the positive from false-positive products. The proposed method was successfully applied in the separation of the LAMP products of AB0174 *E. coli*. Therefore, it is suitable for the rapid detection of LAMP products of DNA.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; capillary electrophoresis; false-positive product

收稿日期: 2015-10-28; 修回日期: 2016-01-08

基金项目: 国家自然科学基金(21205078); 高等学校博士学科点专项科研基金博导类资助课题(20123120110002); 上海高校青年教师培养资助计划(51-13-302-102)

* 通讯作者: 李振庆, 博士, 讲师, 研究方向: 色谱分析, Tel: 021-55276023, E-mail: zhenqingli@163.com

环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新型的核酸扩增方法,对目标基因片段的6个区域设计4种特异的引物,采用一种链置换DNA聚合酶在恒温条件(约65℃)短时间静置,即可完成核酸扩增反应。与常规聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)相比,LAMP具有简便、快速、精确以及成本低的特点^[1-3]。

目前LAMP产物的检测方法主要有琼脂糖平板凝胶电泳和观察法^[4]。前者实验流程主要包括制胶、进样、跑胶和染色4个过程,操作繁琐,耗时较长,且DNA(电泳结果)分辨率较低。后者是在LAMP产物中加入SYBR Green I,肉眼观察颜色反应:呈绿色为阳性反应,橙红色为阴性反应。2001年,Mori等^[5-6]发现,在LAMP反应产物中加入Mg²⁺试剂,反应副产物焦磷酸离子可与Mg²⁺反应生成焦磷酸镁沉淀,若管内液体混浊,离心或静置后白色沉淀集于管底则为阳性,否则为阴性。观察法虽然操作简单,但受观察者个体影响较大。此外,由于DNA LAMP产物较多,采用观察法鉴别LAMP产物的误差较大。

毛细管电泳(Capillary electrophoresis, CE)是一种以毛细管作为分离通道、高压直流电场为驱动力的新型液相分离技术,具有高效、快速、环保等特点,已被广泛用于食品卫生安全和生物学检测^[7-13]。大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是栖居于人和动物肠道内数量最多的细菌,会导致痢疾、尿道感染、败血症、脑膜炎等疾病^[14]。此外,大肠杆菌不断随粪便排出体外,也可作为周围环境及水源污染的指标。本文以*E. coli*为研究对象,采用CE技术研究了LAMP产物检测的新方法。

1 实验部分

1.1 试剂

羟乙基纤维素(HEC, Sigma公司,美国); SYBR Green I(Invitrogen公司,美国); 10×Trisborate-EDTA(TBE)(Bio-RAD公司,美国); 100 bp DNA ladder(Takara公司,日本), LAMP反应试剂盒(上海延拓公司),其主要成分包括LAMP Mix(2×), Bst DNA聚合酶(8 U/μL), 25 mmol/L MgCl₂, 超纯水, 大肠杆菌 GATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAAACAAGCAACAGTATTAACCTTTACTACCGCACTGCTGG CAGGAGGCGCAACTCAAGCTTTTGCCGTTGTATACACCGACTGTACTGAATCCGGACAAAACCTGTGTTTGTG GAGGGTTCTAACGTCTGTGGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGGTTCCGACGGTGAAAAGAACCAATGTGTC ACTGTTGAAGTACCCCAAAGCCGAGTCCCA(生工生物工程(上海)公司)。

1.2 引物设计

引物设计使用Primer Explore V4工具。依据引物之间的距离、引物退火温度(T_m值)、引物末端的稳定性、DNA序列的GC含量以及二级结构,优化出样本的LAMP引物。*E. coli*的LAMP扩增引物(生工生物工程(上海)公司)如下: F3: CATCAAAAAGTTTGCAAAAACAAG; B3: CTTACCCAGTGACACAT-TG; FIP: CGGCAAAAAGCTTGAGTTGCG-CAACAGTATTAACCTTTACTACCG; BIP: GGACAAAACCTGT-GTTTGTGTGAG-GTTCTTTTACCGTCCGA。

1.3 毛细管电泳检测系统

实验室自制毛细管电泳系统核心部件^[15-16]如下:石英毛细管(Polymicro Technologies,美国),毛细管总长度/有效长度(15 cm/10 cm);倒置显微镜IX71(奥林巴斯,日本);MODEL 610E高压电源(Trek公司,美国);汞灯光源发出的光经U-MWIB-3滤光片(奥林巴斯,日本)过滤后产生波长为460~495 nm的激发光,荧光经60×物镜Plan Apo/IR(奥林巴斯,日本)之后收集于光电倍增管R928(滨松光子学株式会社,日本)。为降低电渗流,采用线性聚丙烯酰胺对毛细管内壁镀膜处理。电泳过程在25℃恒温下的暗室中完成。

1.4 LAMP环介导恒温扩增

F3和B3引物终浓度均为0.2 μmol/L, FIP和BIP引物终浓度均为0.8 μmol/L。20 μL的阴性对照反应液体构成:LAMP Mix(2×)10 μL, Bst DNA聚合酶(8 U/μL)1.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μL, 超纯水1.5 μL, 引物混合物4 μL。

20 μL的阳性对照反应液体构成:LAMP Mix(2×)10 μL, Bst DNA聚合酶(8 U/μL)1.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μL, 超纯水0.5 μL, 引物混合物4 μL, 目标样本1 μL。

LAMP实验在65℃恒温环境中反应90 min。

1.5 B3/F3 验证

采用传统 PCR 方法对 B3/F3 做验证, 反应步骤如下: 将 $10 \times$ Fast Buffer I $5 \mu\text{L}$ 、dNTP Mixture $4 \mu\text{L}$ 、大肠杆菌 DNA $1 \mu\text{L}$ 、F3/B3 分别 $1 \mu\text{L}$ 、Speed STARS $0.25 \mu\text{L}$ 、灭菌水 $37.75 \mu\text{L}$ 于离心管内配成 $50 \mu\text{L}$ 反应液。细菌 DNA 的扩增和检测在 T100 Thermal Cycler PCR 仪上进行, 采用两步法 PCR 扩增标准程序, 循环参数为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 2.0 min 后, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s , $64 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s 。

2 结果与讨论

2.1 毛细管电泳条件的优化

2.1.1 筛分介质浓度 以 HEC(1 300 K) 为筛分介质, 在电场强度 100 V/cm 下, 考察了不同浓度 (0.2% , 0.4% , 0.5% , 0.6% , 0.8%) HEC 对 DNA 分离的影响 (见图 1)。实验表明, 随着 HEC 浓度的增加, DNA 的分离时间也随之增大。当 HEC 浓度较低时, 虽然 DNA ladder 分离速度较快, 可在 8 min 实现 DNA 分离, 但与相邻 DNA 片段间的分离度较低。当 HEC 浓度高于 0.6% 时, 相邻 DNA 片段间的分离度较高, 但分离时间明显较长, 且分离度随浓度提高改善不明显。为此, 本实验采用浓度 0.5% HEC(1 300 K) 溶液作为筛分介质。

2.1.2 电场强度 以 0.5% HEC(1 300 K) 为筛分介质, 考察了不同电场强度 ($60 \sim 140 \text{ V/cm}$) 对 DNA ladder 分离效率的影响。结果表明, 电场强度越高, DNA 的分离时间越短。当电场强度为 60 V/cm 时, 相邻 DNA 片段间的分离度较大, 但电泳时间较长 ($>30 \text{ min}$)。当电场强度大于 100 V/cm 时, 分离时间明显缩短, 但相邻 DNA 片段间的分离度较差。因此, 采用 100 V/cm 作为毛细管电泳分离 DNA 的电场强度, 此时分离度和分离时间最佳。

2.2 LAMP 引物的特异性检测

在上述优化毛细管电泳条件下, 考察了 LAMP 反应液中不添加 DNA 模板时 LAMP 阴性对照的结果。实验表明, 当试液中不添加大肠杆菌模板时, 毛细管电泳图谱中仅包含引物对应的电泳峰 (图 2a)。为验证 B3 和 F3 是否正确, 采用传统 PCR 热循环仪对大肠杆菌模板实施了 PCR 反应, 结果表明, 在 7.9 min 处, 出现了较高峰值 (图 2b)。而毛细管电泳 100 bp DNA ladder 的结果 (图 2c) 显示, 500 bp 以内 DNA 的毛细管内迁移时间与片段大小呈线性关系 (图 2 插图), 据此可计算出图 2d 电泳峰对应的 DNA 片段大小约 240 bp 。当 LAMP 反应液中存在 B3, F3, BIP, FIP 4 种引物时, LAMP 产物中存在 $100 \sim 1500 \text{ bp}$ 多个不同的 DNA 片段, 其中包括 7.9 min 处对应的 240 bp 的电泳峰。

2.3 LAMP 阳性与假阳性产物的区分

LAMP 反应比较灵敏, 反应过程中极易受到污染, 从而出现假阳性结果。由于 LAMP 实验结果产物种类较多, 采用观察法无法实现假阳性与阳性结果的区分。在优化的毛细管电泳条件下, 对照分析了 LAMP 过程中装有反应试液的离心管开盖放置与不开盖时的 LAMP 产物。实验表明, 相对于阳性结

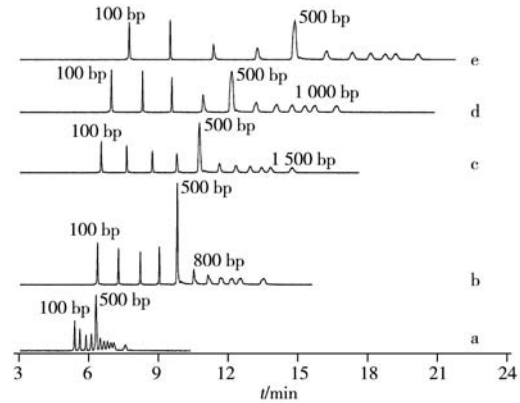


图 1 不同浓度 HEC(1 300 K) 下 100 bp DNA ladder 的电泳图谱

Fig. 1 Electropherograms of 100 bp DNA ladder in different concentrations of HEC(1 300 K) concentrations of HEC(a-e): 0.2% , 0.4% , 0.5% , 0.6% , 0.8%

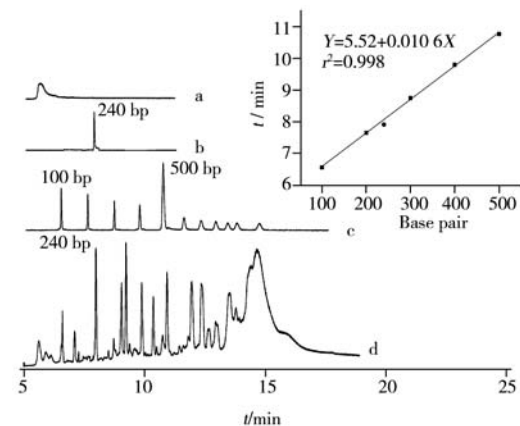


图 2 不同样品的毛细管电泳分离结果

Fig. 2 Capillary electrophoresis of different samples a. negative LAMP products, b. PCR products of *E. coli*, c. DNA Ladder, d. positive LAMP products of *E. coli*; condition: total and effective length of the capillary; $15/10 \text{ cm}$; polymer: 0.5% HEC(1 300 K); loadings: 100 V/cm , 1.0 s ; electric field strength: 100 V/cm ; insert: relationship between DNA size and migration time

果(图 3a), 当离心管开盖放置时, LAMP 试剂与空气接触导致 LAMP 反应产物较多, 即 LAMP 反应产生假阳性产物(图 3b)。为此, 相同电泳条件下, 电泳峰的数目明显增多。

2.4 LAMP 产物的检测

根据建立的毛细管电泳检测 LAMP 产物的方法, 基于 AB0174 *E. coli* 基因(编号 150327PR3647 - 3R28, 载体 pUC57, 点位 SmaI)选取了一段 200 bp 基因片段, 并设计了 LAMP 引物 F3(ATCGTCTT-GAGTCCAACC), B3(AAGGTAAGTGGCTTCAGC), FIP(CCTCGCTCTGCTAATCCTGT - GGTAAGACACGAC TTATCGC), BIP(CTAGGCGGTGCTACAGAGTT - AGA GCGCAGATACCAAAT)。以大肠杆菌为检测样本, 进行 LAMP 扩增, 毛细管电泳检测, 结果如图 4 所示。结果表明, 其 LAMP 产物可以在 6.5 min 内被检出。

3 结论

本文提出了一种基于毛细管电泳技术的 LAMP 产物检测方法, 实现了目标基因的快速检测。结果表明, 在优化电泳条件下该方法可在 15 min 内完成扩增 LAMP 产物的检测, 而且可以实现 LAMP 阳性产物与假阳性产物的区分。毛细管电泳极大地提高了 LAMP 产物的检测效率, 为 LAMP - CE 集成一体化装置的开发提供了重要的实验基础。

参考文献:

- [1] Das A, Babiuk S, McIntosh M T. *J. Clin. Microbiol.*, **2012**, 50(5): 1613 - 1617.
- [2] Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti E, Boehme C C, Notomi T, Perkins M D, Schrenzel J. *FEMS. Immunol. Med. Mic.*, **2011**, 62(1): 41.
- [3] Yamazaki W, Seto K, Taguchi M, Ishibashi M, Inoue K. *BMC. Microbiol.*, **2008**, 8: 94.
- [4] Hong M, Zha L, Fu W L, Zou M J, Li W J, Xu D G. *World. J. Microb. Biot.*, **2012**, 28(2): 523 - 524.
- [5] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, **2001**, 289(1): 150 - 154.
- [6] Aryan E, Makvandi M, Farajzadeh A, Huygen K, Bifani P, Mousavi S, Fateh A, Jelodar A, Gouya M, Romano M. *Microbiol. Res.*, **2010**, 165(3): 211 - 213.
- [7] Zhao H Y, Cai C, Wang Y C. *J. Instrum. Anal.* (赵红岩, 蔡诚, 王园朝. 分析测试学报), **2015**, 34(5): 576 - 581.
- [8] Li Y, Cen Z F, Li X T. *Opt. Instrum.* (李艳, 岑兆丰, 李晓彤. 光学仪器), **2003**, 25(1): 8 - 13.
- [9] Chen L P, Huang Y. *J. Instrum. Anal.* (陈亮平, 黄颖. 分析测试学报), **2015**, 34(7): 836 - 839.
- [10] Shi Z B, Ma W L, Liang B, Zheng W L. *Opt. Instrum.* (施志波, 马文丽, 梁斌, 郑文岭. 光学仪器), **2005**, 27(2): 67 - 68.
- [11] Peng C, Wang P, Lou Y, Tan H R. *J. Instrum. Anal.* (彭超, 王萍, 楼玥, 檀华蓉. 分析测试学报), **2014**, 33(10): 1129 - 1135.
- [12] Qian K, Chen X, Chen Q. *J. Instrum. Anal.* (钱凯, 陈旭, 陈沁. 分析测试学报), **2015**, 34(9): 1061 - 1065.
- [13] Zhao L G, You J, Liang Z H, Li K, Qiu F, Zeng S B. *J. Instrum. Anal.* (赵凌国, 尤俊, 梁肇海, 李可, 丘汾, 曾胜波. 分析测试学报), **2014**, 33(3): 339 - 343.
- [14] Olivier C, Stéphane B, Edouard B. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2000**, 66(10): 4555 - 4558.
- [15] Liu C C, Li Z Q, Meng F M, Ni Y, Dou X M, Yoshinori Y. *Acta Chim. Sin.* (刘晨晨, 李振庆, 孟凡明, 倪一, 窦晓鸣, 山口佳则. 化学学报), **2013**, 71(2): 265 - 266.
- [16] Li Z Q, Meng F M, Liu C C, Zhang D W, Yoshinori Y. *Chin. J. Anal. Lab.* (李振庆, 孟凡明, 刘晨晨, 张大伟, 山口佳则. 分析实验室), **2014**, 33(9): 1009 - 1017.

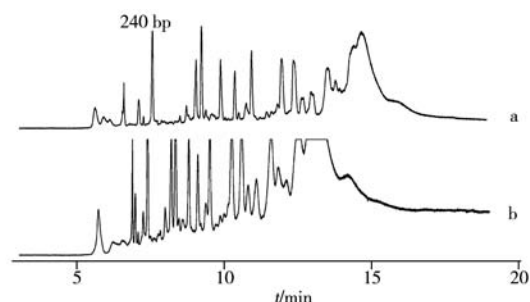


图3 LAMP 阳性扩增产物(a)与 LAMP 假阳性扩增产物(b)的毛细管电泳分离结果

Fig. 3 Capillary electrophoresis of positive LAMP products of *E. coli*(a) and false positive LAMP products of *E. coli*(b) the conditions were the same as those in Fig. 2

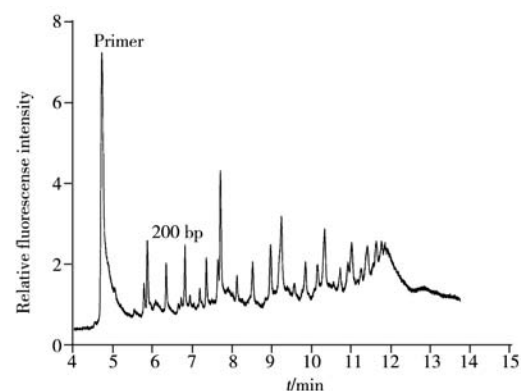


图4 LAMP 阳性对照样品的毛细管电泳分离图

Fig. 4 Capillary electrophoresis of an positive LAMP product of *E. coli* total and effective length of the capillary: 12/7 cm, other conditions were the same as those in Fig. 2