

DOI: 10.5846/stxb201308112059

张柏烽, 朱鹏, 严小军, 党晨阳, 吕亚厅, 吴景华. 一种快速检测微囊藻毒素 *mcyG* 基因的新技术——环介导恒温扩增. 生态学报, 2015, 35(9): 3104-3112.

Zhang B F, Zhu P, Yan X J, Dang C Y, Lü Y T, Wu J H. A novel assay for rapid detection of microcystin *mcyG* gene: loop-mediated isothermal amplification. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(9): 3104-3112.

一种快速检测微囊藻毒素 *mcyG* 基因的新技术 ——环介导恒温扩增

张柏烽, 朱 鹏*, 严小军, 党晨阳, 吕亚厅, 吴景华

浙江省宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波 315211

摘要: 利用环介导恒温扩增 (LAMP) 技术, 以微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 合成基因簇中的 *mcyG* 基因为靶序列, 设计了 1 套 LAMP 引物, 建立了 LAMP 反应体系并进行灵敏度和特异性实验。结果表明 *mcyG* 基因的最低检测限为: 24 cfu/mL, 远低于常规 PCR (Polymerase Chain Reaction)。整个检测过程仅需 40 min, 且可直接目测结果。特异性实验中, 13 株淡水常见水华蓝藻分属: 色球藻属 (*Chroococcus*)、念珠藻属 (*Nostoc*)、鱼腥藻属 (*Anabaena*)、束丝藻属 (*Aphanizomenon*)、微囊藻属 (*Microcystis*), 其中 10 株呈阳性反应, 3 株为阴性。在野外样品检测中, 来自太湖与黄庆苗池塘的水样 PCR 检测显示阴性反应, 而 LAMP 检测均呈阳性反应, 提示此两处水样中可能含有产毒微囊藻, 显示出了 LAMP 检测方法良好的野外检测和预警能力。综合上述, LAMP 检测方法能够快速检测产微囊藻毒素的关键基因, 且结果可视化。该方法简便、快捷、不依赖特殊检测设备, 极具推广前景。

关键词: 微囊藻毒素; 环介导恒温扩增技术; 快速检测

A novel assay for rapid detection of microcystin *mcyG* gene: loop-mediated isothermal amplification

ZHANG Baifeng, ZHU Peng*, YAN Xiaojun, DANG Chenyang, LÜ Yating, WU Jinghua

Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: Microcystin-producing cyanobacteria blooms, as well as their increasing global occurrence, are of worldwide concern because they have been implicated in the death of animals and humans. Currently, many techniques are used to evaluate whether toxins are present in water samples, including high-performance liquid chromatography (HPLC), mouse bioassays, protein phosphatase inhibition assays (PPIA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and mass spectrometry. While some of these techniques are quite sensitive, they are of use only once the toxin is present in the water source. However, microcystins remain within cyanobacterial cells until being released in high concentrations during cell lysis. Hence, identifying potential microcystin-producing strains in the environment prior to the release of toxins into the water body is more useful than detection of toxins. Many microcystin-producing strains cannot be differentiated from non-toxic strains by traditional microscopy or with ribosomal gene sequences. Synthetase genes (*mcy*) are responsible for the biosynthesis of microcystin and are only present in the genome of toxic strains. Polymerase chain reaction (PCR) assays based on *mcy* gene sequences have been reported. Though these assays for rapid, sensitive, and specific detection appear to be promising, PCR applied as a rapid diagnostic test in the field has been seriously constrained owing to the complexity of the amplification conditions and the need for specialized high-cost instruments. Recently, loop-mediated isothermal

基金项目: 浙江省重大科技专项重点农业项目 (2012C12009-4); 宁波市海洋藻类资源高效开发利用创新团队项目 (2011B81007)

收稿日期: 2013-08-11; **网络出版日期:** 2014-08-01

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhupeng@nbu.edu.cn

amplification (LAMP), a new technology for amplifying DNA, has been developed. Unlike PCR, which requires special instruments to control reaction temperature, LAMP requires only a temperature-controlled water bath. In this manuscript, we designed a set of LAMP primers to target the sequence of the *mcyG* gene, which is responsible for the first step in the biosynthesis of Adda (3-amino-9-methoxy-2, 6, 8-trimethyl-10-phenyldeca-4, 6-dienoic acid), an important part of microcystin. The conditions of amplification were optimized to implement the sensitivity and specificity experiments. We found that 61 °C for 40 min was the most suitable reaction condition. We then selected thirteen cyanobacterial strains, including *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Chroococcus*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, and *Anabaena*, to determine the specificity and sensitivity of the primers in the LAMP reactions. The results of amplification were positive with ten microcystin-producing strains and negative with three non-toxic strains, which demonstrated that the primers had suitable levels of specificity. The sensitivity of LAMP, with a detection limit of 24 cfu/ml, was 1000-fold higher than that of PCR. For verifying the application of this LAMP assay in the aquatic ecosystem, seven environmental samples from ponds and lakes in Ningbo and one from Tai Lake were analyzed using both the LAMP assay targeting the *mcyG* gene and a PCR assay. The LAMP assay detected amplification in two water samples that the PCR assay did not detect, demonstrating that the LAMP assay is more effective and more suitable for field testing. The LAMP method is fast, simple, and low in cost making it advantageous for the detection of potential toxic cyanobacterial blooms. By employing the LAMP assay, workers at the Environmental Monitoring Station will be able to detect toxic cyanobacterial cells at low levels, before they reach an unsafe concentration. This will allow the workers, through routine monitoring of potential toxin status in the freshwater, to have enough time to implement a series of control strategies for avoiding human exposure to cyanobacterial hepatotoxins at dangerous levels.

Key Words: microcystin; loop-mediated isothermal amplification method; rapid detection

蓝藻水华是影响人类健康的重要水环境因素,其不仅严重污染环境和影响美观,且其释放出来的蓝藻毒素也具有致染色体断裂、基因诱变及较高的急性毒性^[1,2]。在自然水体中,蓝藻水华发生后易出现大量可造成环境危害的微囊藻毒素,这是一类具有生物活性的环七肽化合物,主要为微囊藻属(*Microcystis*)、鱼腥藻属(*Anabaena*)、念珠藻属(*Nostoc*)和阿氏浮丝藻属(*Planktothrix*)的种或株系产生^[2]。人与动物饮用或直接皮肤接触微囊藻毒素污染的水体后,会不同程度地出现腹泻、肠胃炎等症状,长期饮用会导致肝功能损伤甚至死亡,已有研究表明其与人类原发性肝癌发病率有很大相关性^[3-4]。1996年发生在巴西的导致至少50人死于藻毒素急性中毒的医疗事故中,证实了微囊藻毒素的危害^[5]。

微囊藻毒素检测方法分为直接检测和间接检测。常见的微囊藻毒素直接方法有:细胞毒性实验法、化学分析法^[6]、ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)^[7]及PPIA(Protein phosphatase inhibition assay)^[8]方法。这些方法对样品与检测环境的要求高,很难被广泛运用于基层的环境监测部门。同时,这些方法只能检测水体中已产生并累积到一定程度的微囊藻毒素,无法对微囊藻毒素的产生进行预判。随着微囊藻毒素生物合成基因簇的发现^[9],可以通过对水体中是否存在微囊藻毒素合成基因进行检测,间接地判断水体中是否存在微囊藻毒素。毒素合成基因检测的结果对于水体中微囊藻毒素的产生具有一定的超前性,能将微囊藻毒素的检测从发生期前移到累积期,从而大大提高对水体中微囊藻毒素的预防能力。同时许多学者成功地使用PCR技术对微囊藻毒素进行快速诊断和检测,但由于PCR技术本身固有的缺点,如需要整套用于核酸扩增检测的仪器设备以及繁琐的操作程序等,大大限制了其在微囊藻毒素诊断检测(尤其是快速现场诊断检测)中的应用。因此,迫切需要一种快速、简便、灵敏的微囊藻毒素检测方法。

新型的DNA环介导恒温扩增(LAMP)方法,最初由Notomi等人设计并应用于病原微生物的检测^[10]。该方法通过针对靶基因的6个区域而设计4种特异性引物,利用具有链置换活性的Bst DNA聚合酶,在恒温条件下(60—65 °C)高效(0.5—1 h)扩增目标DNA。该方法仅需要简单的水浴锅或者加热器,同时其在反应过程中产生的大量副产物-白色焦磷酸镁沉淀可以通过肉眼或者加入钙黄绿素染料观察结果,而且在灵敏度、特

异性和检测范围等指标上能媲美甚至优于 PCR 技术。目前,国内外已有较多文献报道了该技术的应用^[11-13],但是其大多数只应用于病原微生物检测方面,在微囊藻毒素基因检测方面的应用还未有先例。

本研究以微囊藻毒素合成簇中关键基因 *mcyG* 为基础,设计筛选了 1 套用于 LAMP 扩增的引物,首次尝试建立微囊藻毒素 LAMP 间接检测方法,并着重对 LAMP 技术与 PCR 技术在合成毒素基因的检测涉及到的检测效率、特异性、灵敏度等方面做了比较,验证了该方法在微囊藻毒素检测中的可行性和可靠性。

1 材料与方法

1.1 菌株和样品

通过查阅文献^[14-15],选取了淡水常见蓝藻水华的色球藻属(*Chroococcus*)、念珠藻属(*Nostoc*)、鱼腥藻属(*Anabaena*)、束丝藻属(*Aphanizomenon*)、微囊藻属(*Microcystis*)代表藻种 13 株,其中有毒藻 10 株,无毒藻 2 株,不确定产毒藻 1 株(表 1),均购自中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB Collection)。其中 *Microcystis wesenbergii* 908(无毒藻)、*Microcystis aeruginosa* 925(有毒藻)用于环介导等温扩增技术条件优化及其灵敏度分析的试验。

藻种采用 BG11 液体培养基培养^[16],培养温度 25 °C,光照强度 18—27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,光暗循环为 L:D=12 h:12 h,每天摇瓶 1—2 次,静置培养。

1.2 微囊藻基因组 DNA 的提取

实验室样品 采用上海生工的细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行样品的 DNA 抽提,DNA 样品经 1%凝胶检测后-20 °C 保存备用。

自然水样 采集 1 L 自然水样先用 500 目的不锈钢筛过滤,滤液再经 0.45 μm 滤膜抽滤后,收集滤膜用超纯水洗脱,收集洗脱液于 1.5 mL EP 管,12000 r/min 离心 2 min,弃上清,加入 40 μL 超纯水悬浮混匀,-70 °C 保存 3 min 后 40 °C 保持 1 min,反复冻融 3 次,离心取上清经 1%凝胶检测后-20 °C 保存备用。

表 1 本研究采用的藻种名称和 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)检测结果

Table 1 Cyanobacterial strains used in this study and LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) assay specificity of *mcyG*

藻属 Genus	藻种 Strains	微囊藻毒素 Microcystin	微囊藻毒素基因 LAMP 检测结果 Detection of <i>mcyG</i> gene by LAMP
色球藻属 <i>Chroococcus</i>	<i>Chroococcus</i> sp. FACHB-193	+	+
念珠藻属 <i>Nostoc</i>	<i>Nostoc</i> sp FACHB-596	+	+
束丝藻属 <i>Aphanizomenon</i>	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> FACHB-1039	+	+
微囊藻属 <i>Microcystis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB- 905	+	+
	<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB- 924	+	+
	<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB-925	+	+
	<i>Microcystis</i> sp.7806 FACHB-915	+	+
	<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB-942	+	+
	<i>Microcystis wesenbergii</i> FACHB-929	+	+
	<i>Microcystis viridis</i> 979	+	+
	<i>Microcystis-flos-aquae</i> 1028	+/-	-
	<i>Microcystis wesenbergii</i> 908	-	-
鱼腥藻属 <i>Anabaena</i>	<i>Anabaena f los-aquae</i> FACHB 245	-	-

+/- 表示是否产微囊藻毒素; +/-表示是否存在微囊藻毒素 *mcyG* 基因

1.3 引物设计与合成

根据 GeneBank 中微囊藻毒素合成簇中的负责合成微囊藻毒素生物活性表达所必须的 Adda(3-amino-9-methoxy- 2, 6, 8-trimethyl- 10-phenyldeca- 4, 6-dienoic acid) 的 *mcyG* 基因的已知序列(AF183408、CAIM01000217、AY212249),利用 ClustalW 比对软件寻找其保守区域,并按环介导恒温扩增技术引物设计原

则, 针对 *mcyG* 基因的保守区域设计外引物 (MCYG-F3、MCYG-B3)、内引物 (MCYG-FIP、MCYG-BIP)、环引物 (MCYG-LF、MCYG-LB) 一组共 6 条环介导恒温扩增技术扩增特异引物 (表 2)。引物在保守区上的相对位置见图 1。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 2 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 方法检测微囊藻毒素的引物序列
Table 2 Primers for LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) amplification of Microcystins

引物 Primer	类型 Type	长度 (碱基数) Length (bp)	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
MCYG-F3	Forward-outer primer	18-mer	CTGAAACTTGCTCGCCAG
MCYG-B3	Backward-outer primer	25-mer	CTATCGTATTTTATAGGAATTATGGC
MCYG-FIP	Forward-inner primer (F1c +TTTT +F2)	47-mer	GGTCTCCTAACTTTGCATTTTCCTT TTTT GAGGAGAGGTTATAAGAGACGT
MCYG-BIP	Backward-inner primer (B1c +TTTT +B2)	46-mer	GCTTACTTGATGCTTTTGAATGAGT TTTT AAATTCATGTTCCCATGGAAT
MCYG-LF	Loop-forward primer	21-mer	AACAGGCCGAAGAACTTAAGC
MCYG-LB	Loop-backward primer	20-mer	TAACCATTGCAGAGGTTGGC

1.4 微囊藻毒素基因 *mcyG* 的 PCR 检测

以 1.3 中设计的环介导恒温扩增引物的外引物 MCYG-F3、MCYG-B3 作为 PCR 引物对蓝藻模板 DNA 进行扩增, 反应各组分终浓度为: 10 μmol/L MCYG-F3 和 10 μmol/L MCYG-B3 各 1 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 5 U/μL Ex Taq 酶 (TaKaRa) 0.125 μL, 10×buffer 2.5 μL, 模板 2 μL, 双蒸水定容至 25 μL 体系。优化后的 PCR 反应条件: 预变性 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 45 s, 50 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物采用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.5 微囊藻毒素基因 *mcyG* 的环介导恒温扩增 (LAMP) 检测

以 *Microcystis wesenbergii* 908、*Microcystis aeruginosa* 925 的基因组 DNA 作为模板进行扩增条件的优化。本研究所使用的 LAMP 法 DNA 反应试剂盒与荧光染料钙黄绿素均购自日本荣研化学株式会社; 反应各组分终浓度为: 内引物 FIP 和 BIP 各 1.6 μmol/L, 外引物 F3 和 B3 各 0.2 μmol/L, 环引物 LF 和 LB 各 0.8 μmol/L, dNTPs 1.4 mmol/L, 甜菜碱 0.8 mol/L, Tris-HCl (pH 值 8.8) 20 mmol/L KCl 10 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 10 mmol/L, MgSO₄ 8 mmol/L, Tween20 0.1%, Bst DNA 聚合酶大片 8 U, DNA 模板 2 μL, 钙黄绿素 1 μL, 双蒸水定容至 25 μL。阴性对照管不加 DNA 模板。反应条件: 61 ℃ 恒温保持 40 min 后 80 ℃ 灭活 10 min。通过反应物中钙黄绿素的颜色变化以及后续的 3.0% 琼脂糖凝胶电泳进行扩增结果检测。

1.6 LAMP 与 PCR 的特异性验证

选取 *Chroococcus* sp. FACHB-193、*Nostoc* sp. FACHB-596、*Aphanizomenon flos-aquae* FACHB-1039、*Microcystis aeruginosa* 905、*Microcystis aeruginosa* 924、*Microcystis aeruginosa* 925、*Microcystis* sp. 7806 FACHB-915、*Microcystis aeruginosa* FACHB-942、*Microcystis wesenbergii* FACHB-929、*Microcystis viridis* 979、*Microcystis flos-aquae* 1028、*Microcystis wesenbergii* 908、*Anabaena flos-aquae* FACHB 245 共 13 株常见蓝藻用于 LAMP 和 PCR 的特异性验证试验。DNA 提取方法见 1.2, 环介导等温扩增技术与 PCR 技术反应体系和条件见 1.5 和 1.4。

1.7 LAMP-AGE 与 PCR-AGE 的灵敏度验证

取 *Microcystis aeruginosa* 925 基因组 DNA 原始模板 (2.4×10⁵ cfu/mL), 以 10 倍梯度稀释, 选取各个稀释度

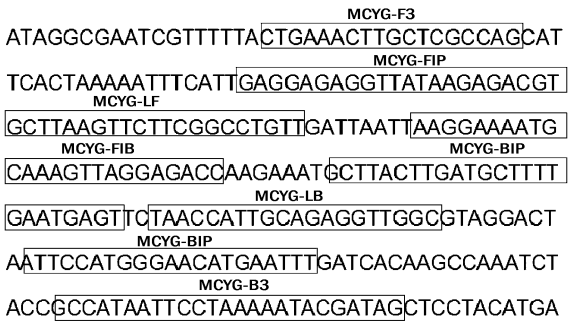


图 1 6 条引物在 *mcyG* 基因保守区域的相对位置
Fig.1 Nucleotide sequences of targets for primers in the LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) assay on *mcyG* gene

作为模板用于比较文中建立的环介导等温扩增技术和 PCR 扩增灵敏度差异。

1.8 藻毒素 LAMP 检测方法的野外应用

分别采集位于浙江省宁波的日湖、月湖、四明山水库和宁波大学校园的海运池塘、材化小河、教学楼前池塘、黄庆苗楼池塘及江苏省太湖 8 个不同地域的水样(表 3),按 1.2 方法提取 DNA 用于优化后的 PCR 和 LAMP 方法检测。

1.9 微囊藻产毒量计算

微囊藻产毒量计算公式如下式所示:

$$M=K\times N/1000$$
(1)

式中, M 为微囊藻毒素总含量($\mu\text{g/L}$), N 为单位体积内的藻细胞数量(cfu/mL), K 为单个藻细胞产微囊藻毒素量(μg)。

表 3 野外样品 GPS 分布区域

Table 3 GPS (Global Positioning System) of field samples

水样 Water samples	位置 Location		水样 Water samples	位置 Location	
	北纬 North Latitude	东经 East Latitude		北纬 North Latitude	东经 East Latitude
黄庆苗池塘	29°54'19.06"	121°38'5.76"	日湖	29°53'48.84"	121°33'38.72"
材化学院池塘	29°54'30.32"	121°37'53.28"	月湖	29°52'7.92"	121°32'19.67"
海运学院池塘	29°54'30.59"	121°37'50.02"	四明山水库	29°56'27.84"	121°3'48.68"
教学楼池塘	29°54'42.86"	121°37'57.62"	太湖	31°17'20.99"	120°12'9.55"

2 结果

2.1 环介导恒温扩增技术扩增条件的确立

选择 61、63、65 ℃ 3 个不同的反应温度进行环介导恒温扩增技术扩增 100 min,反应进行 30 min 后每隔 10 min 进行实时颜色变化记录。结果见表 4,反应进行 40 min 即通过反应管的颜色变化判断产物的有无,在同样的反应体系下,63 ℃时反应 40 min 后开始出现非特异性扩增现象,65 ℃时反应 50 min 后出现假阳性现象,61 ℃时反应现象正常,随着反应时间的延长在 3 种不同的扩增温度条件下均逐渐出现非特异性扩增。说明反应时间过长对扩增结果有影响,因此,最终选择 61 ℃、40 min 作为后续 LAMP 扩增的最佳反应条件。

表 4 3 个不同反应温度下的实时反应结果

Talbe 4 Real-time color change under three different amplification temperature

反应时间/min Amplification time	反应温度/℃ Amplification temperature	mcyG 基因 mcyG gene		
		<i>Microcystis aeruginosa</i> 925	<i>Microcystis wesenbergii</i> 908	NC
30	61	—	—	—
	63	—	—	—
	65	—	—	—
40	61	+	—	—
	63	+	+	—
	65	+	—	—
50	61	+	—	—
	63	+	+	—
	65	+	—	+
60	61	+	—	—
	63	+	+	—
	65	+	—	+
	61	+	—	—

续表

反应时间/min Amplification time	反应温度/℃ Amplification temperature	<i>mcyG</i> 基因 <i>mcyG</i> gene		
		<i>Microcystis aeruginosa</i> 925	<i>Microcystis wesenbergii</i> 908	NC
70	63	+	+	-
	65	+	-	+
80	61	+	-	-
	63	+	+	-
	65	+	-	+
	61	+	-	-
	63	+	+	-
90	65	+	-	+
	61	+	-	+
	63	+	+	-
100	65	+	-	+
	63	+	+	-
	65	+	-	+

+: 变成绿色即 LAMP 扩增产物生成;“-”: 保持黄色即未发生 LAMP 扩增;“NC”: 阴性对照

2.2 LAMP 与 PCR 的特异性验证

以文中建立的 LAMP 与 PCR 扩增方法对 13 株水华常见蓝藻进行检测。结果见表 1 和图 2。LAMP 扩增产物通过反应试剂的颜色变化判断(图 2a)和琼脂糖凝胶电泳检测显示(图 2b), 10 株产微囊藻毒素的 *Chroococcus* sp. FACHB-193、*Nostoc* sp. FACHB-596、*Aphanizomenon flos-aquae* FACHB-1039、*Microcystis aeruginosa* 905、*Microcystis aeruginosa* 924、*Microcystis aeruginosa* 925、*Microcystis* sp. 7806 FACHB-915、*Microcystis aeruginosa* FACHB-942、*Microcystis wesenbergii* FACHB-929、*Microcystis viridis* 979 均呈阳性反应, 2 株不产微囊藻毒素的 *Microcystis wesenbergii* 908、*Anabaena flos-aquae* FACHB-245 均为阴性, 产毒不确定的 *Microcystis-flos-aquae* 1028^[14-15] 也为阴性, 无菌水作为阴性对照也无扩增, 特异性良好。而 PCR 扩增结果显示(图 2c), *Chroococcus* sp. FACHB-193、*Microcystis wesenbergii* FACHB-929 扩增效率不高, *Nostoc* sp FACHB-596、*Aphanizomenon flos-aquae* FACHB-1039、*Microcystis wesenbergii* 908、*Anabaena flos-aquae* FACHB-245 出现非特异性扩增现象。这些表明对于微囊藻毒素基因 *mcyG* 的检测, LAMP 法相比于 PCR 方法具有更好的特异性, 且钙黄绿素的加入使得 LAMP 扩增结果直观可视。

2.3 LAMP-AGE 与 PCR-AGE 的灵敏度验证

对 *Microcystis aeruginosa* 925 基因组 DNA (2.4×10^5 cfu/mL) 进行 10 倍梯度稀释后作为模板用于 LAMP 和 PCR 扩增的灵敏度检测, 结果表明: *mcyG* 基因(图 3a 和 b) LAMP-AGE 检测的最低模板浓度为 24 cfu/mL, 而相应的 PCR-AGE 检测的最低模板浓度为 2.4×10^4 cfu/mL(图 3c), LAMP 比常规 PCR 方法灵敏 1000 倍。

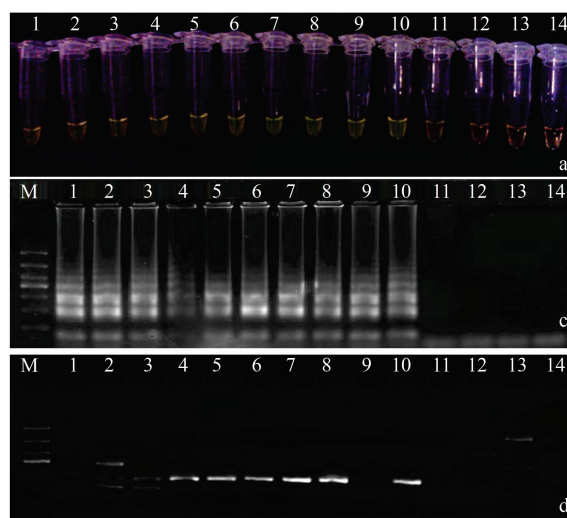


图 2 LAMP 与 PCR 的特异性验证结果

Fig.2 The specificity of microcystin gene shown in LAMP(a, b) and PCR(c) methods by using *mcyG* gene as the target sequence a, b, c 分别为 *mcyG* 基因的 LAMP 可视化结果图、LAMP 电泳图、PCR(Polymerase Chain Reaction)电泳图; 1-15: *Chroococcus* sp. FACHB-193, *Nostoc* sp FACHB-596, *Aphanizomenon flos-aquae* FACHB-1039, *Microcystis aeruginosa* 905, *Microcystis aeruginosa* 924, *Microcystis aeruginosa* 925, *Microcystis* sp. 7806 FACHB-915, *Microcystis aeruginosa* FACHB-942, *Microcystis wesenbergii* FACHB-929, *Microcystis viridis* 979, *Microcystis-flos-aquae* 1028, *Microcystis wesenbergii* 908, *Anabaena flos-aquae* FACHB-245 作为反应模板; 16: 蒸馏水为模板作阴性对照; M: DM1000 DNA Marker

2.4 LAMP 与 PCR 方法在野外应用的比较

对 8 个来自不同地域的自然水样中的微囊藻毒素基因 *mcyG* 分别进行 LAMP(图 4a)和 PCR(图 4b)检测结果显示:8 份野外样品中,来自四明山水库的水样 LAMP 与 PCR 检测均呈阳性反应,太湖水样、黄庆苗池塘水样 LAMP 均呈阳性反应而 PCR 呈阴性反应,其余 5 份野外样品两种检测方法均成阴性反应。该结果表明对于微囊藻毒素基因的检测,相对于传统的 PCR 方法, LAMP 具有更高的灵敏性。同时,由于钙黄绿素的添加使得 LAMP 结果直观可视更加利于野外的现场检测。

3 讨论

微囊藻毒素一般是由 Adda, D-Glu, Mdha, D-Ala, L-X, D-MeAsp, L-Z, 7 种氨基酸形成的环肽化合物, Sivonen, K 和 Botes, D.等人研究表明,对于已知的常见微囊藻毒素类型,其微囊藻毒素结构中的重要致毒部分是 Adda 氨基酸残基^[2,17]。Adda 合成过程中的第一步是由 *mcyG* 基因的 NRPS/PKS (Nonribosomal peptide-synthetase/Polyketide synthases) 杂合酶负责,且杂合酶中的腺苷酰化结构域(Adenylation domains)在 Adda 合成时起从底物中抓取氨基酸作用^[18],这对于微囊藻毒素活性表达是至关重要的,而目前的微囊藻毒素基因检测常见靶标 *mcyA*、*mcyB*、*mcyD* 等并不包括 *mcyG*^[19],本研究选择了 *mcyG* 基因中的 Adenylation domains 区域作为靶序列,用于微囊藻毒素基因检测。研究结果表明, *mcyG* 作为一个新的靶标在微囊藻毒素基因检测中效果良好。

本研究针对 *mcyG* 中负责特异性识别 Adda 侧链的腺苷酰化结构域(Adenylation domain)设计合成了 1 套适用于 LAMP 扩增检测的引物,并对 LAMP 扩增条件进行了优化。在此基础上,对 LAMP 和传统的 PCR 方法在特异性和灵敏度两个方面进行了比较。实验结果显示相对传统的 PCR 技术, LAMP 技术在恒温条件(61℃)下即可发生反应,且反应时间短,加入钙黄绿素染料后在反应开始 40 min 后即可通过肉眼观察颜色变化从而判断是否发生 LAMP 扩增。两种方法的特异性比较发现, LAMP 方法对 13 株自然水体常见蓝藻种类的检测结果与文献已报导的结果一致^[14-15]。而传统的 PCR 检测结果却有部分藻种出现扩增效率不高与非特异性扩增现象,这表明本研究所建立的 LAMP 方法具有比传统 PCR 更强的特异性。

以 *Microcystis aeruginosa* 925 作为研究对象比较了 LAMP 和 PCR 方法在检测微囊藻产毒基因 *mcyG* 中的灵敏度。结果发现目前 LAMP 最低检测限为 24 cfu/mL,而 PCR 方法则为 2.4×10^4 cfu/mL。LAMP 扩增灵敏度比传统 PCR 扩增方法提高了 3 个数量级。Chen 等^[14]人研究发现 *Microcystis aeruginosa* 925 的单个藻细胞产微囊藻毒素量为 1.37×10^{-7} μg,目前微囊藻毒素 ELISA 检测试剂盒与 LC-MS 等检测方法的定性检出限一般在 0.05 ppb 以上^[14,20-22],因此,如果以 *Microcystis aeruginosa* 925 作为检测对象,根据文中公式(1)可推算出其在理想状态下 ELISA 或 LC-MS 方法所需的最低细胞浓度应为 365 cfu/mL,而实际检测中,由于要考虑到各种环境因素的影响,实际所需的细胞浓度要远远大于 365 cfu/mL。因此,相对 ELISA 或 LC-MS 方法, LAMP 方

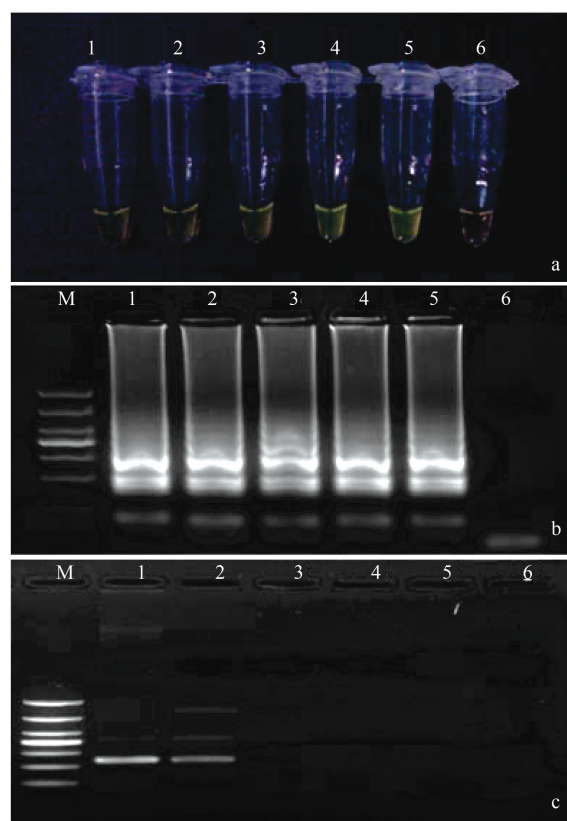


图 3 LAMP-AGE 与 PCR-AGE 检测 *Microcystis aeruginosa* 925 的灵敏度比较

Fig.3 The sensitivity of microcystin gene shown in LAMP and PCR methods

a 为加钙黄绿素的 LAMP 检测可视化图, b、c 分别为 *mcyG* 基因的 LAMP 和 PCR 检测结果电泳图; 1—5: 原始浓度为 2.4×10^5 cfu/mL 的 *Microcystis aeruginosa* 925 基因组 DNA 分别稀释 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 倍为反应模板. 6: 蒸馏水为模板作阴性对照; M: DM1000 DNA Marker

法同样也具有很高的灵敏度(表 5)。另外,中国与世界卫生组织规定的生活饮用水标准规定饮用水中该毒素含量上限为 1 μg/L,同样以有毒微囊藻 *Microcystis aeruginosa* 925 作为检测对象,根据文中公式(1)可推算出当水体中含有产毒藻细胞数为 7.30×10^3 cfu/mL 以上时,理论上对人体是有害的。由于 LAMP 方法检测的所需藻细胞数仅仅为 24 cfu/mL 远远低于蓝藻水华暴发并达到有害饮用水标准的藻细胞浓度,因此,这将使我们能更早的监测到水体中潜在的产毒微囊藻,将传统的微囊藻毒素检测从暴发期前移到累积期,从而大大提高自然水体尤其是饮用水体中微囊藻毒素的预警能力。

4 结论

本研究首次将 LAMP 技术应用于微囊藻毒素基因检测,建立了微囊藻毒素生物合成基因 *mcyG* 的 LAMP 检测方法。运用该方法可快速对水体中的微囊藻毒素生物合成基因进行检测,进而对水体中是否存在具体产毒能力的微囊藻藻株作出判断。众所周知,微囊藻毒素具有胞内合成、死亡释放的特性,这往往导致毒素在水体中的释放是暴发式的。本文所建立的 LAMP 方法由于具有高灵敏度、高特异性、操作简单、结果直观可视的特点十分便于野外现场检测。因此,运用本文所建立的 LAMP 方法可对自然水体中具有潜在产微囊藻毒素能力的蓝藻进行现场实时监测,将微囊藻毒素监测从暴发期前移到累积期,从而大大提高自然水体尤其是饮用水体中微囊藻毒素的预警能力,这对保障自然水体尤其是饮用水体的安全性有着重要的意义。

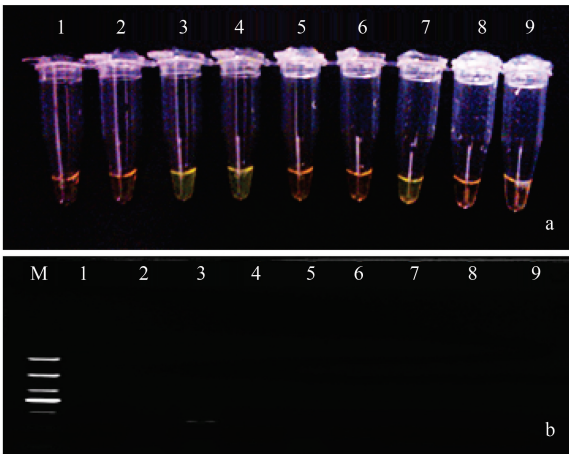


图 4 LAMP 与 PCR 检测自然水样的结果比较

Fig.4 Detection of the *mcyG* gene in water samples

a 为加钙黄绿素后的 LAMP 检测可视化图,b 为 PCR 检测结果电泳图;1—8:日湖、月湖、四明山水库、太湖、材化小河、海运池塘、黄庆苗池塘、教学楼池塘水样为模板;9:蒸馏水为模板作阴性对照;M: DM1000 DNA Marker

表 5 LAMP、PCR 与毒素检测模板数量级比较

Table 5 Limit of detection for LAMP, PCR and LC-MS/ELISA (Liquid chromatography-mass spectrometry/Enzyme linked immunosorbent)

藻细胞数/ (个/mL) Cells	聚合酶链反应 Polymerase Chain Reaction (PCR)	环介导等温扩增反应 Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)	间接竞争酶联免疫法/ 液相色谱-串联质谱法 Enzyme-linked immunosorbent assay/ Liquid chromatograph- mass spectrometer (ELISA/LC-MS)	饮用水标准(中国、 国际卫生组织) The standards of drinking water (China,World Health Organization)
10^1	-	+	-	-
10^2	-	+	-	-
10^3	-	+	+	+
10^4	+	+	+	+
10^5	+	+	+	+
10^6	+	+	+	+
$>10^6$	+	+	+	+

参考文献(References):

[1] 左金龙,崔福义,徐勇鹏,吴宝利. 饮用水源中藻毒素污染控制研究. 水资源保护, 2005, 21(5): 1-5.

[2] Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial toxins // Chorus I, Bartram J. Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management. London: E&FNSpon, 1999; 41-111.

[3] Mez K, Beattie K, Codd G, Hanselmann K, Hausere B, Naegeli H, Preisig H. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. European Journal of Phycology, 1997, 32(2): 111-117.

- [4] Codd G A, Morrison L F, Metcalf J S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 203(3): 264-272.
- [5] Pouria S, De Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti R L, Barreto V T S, Ward C J, Preiser W, Poon G K, Neild G H, Codd G A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*, 1998, 352(9121): 21-26.
- [6] Meriluoto J. Chromatography of microcystins. *Analytica Chimica Acta*, 1997, 352(1/3): 277-298.
- [7] Carmichael W W, An J. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Natural Toxins*, 1999, 7(6): 377-385.
- [8] Ward C J, Beattie K A, Lee E Y, Codd G A. Colorimetric protein phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high-performance liquid chromatographic analysis for microcystins. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 153(2): 465-473.
- [9] Tillett D, Dittmann E, Erhard M, Döhren H V, Börner T, Neilan B A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology*, 2000, 7(10): 753-764.
- [10] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): e63.
- [11] Fukuta S, Kato S, Yoshida K, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y. Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *Journal of Virological Methods*, 2003, 112(1/2): 35-40.
- [12] Ding W C, Chen J, Shi Y H, Lu X J, Li M Y. Rapid and sensitive detection of infectious spleen and kidney necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Archives of Virology*, 2010, 155(3): 385-389.
- [13] Puthawibool T, Senapin S, Kiatpathomchai W, Flegel T W. Detection of shrimp infectious myonecrosis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Journal of Virological Methods*, 2009, 156(1/2): 27-31.
- [14] Chen J, Yan T, Xu J, He S, Zhao P, Yan X J. Simultaneous determination of toxins in algae and water samples by high-performance liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 2012, 35(9): 1094-1101.
- [15] Zhu J P, Du S, Li X. Detection of microcystin-producing *Microcystis* in Guanqiao Lake using a sandwich hybridization assay. *Canadian Journal of Microbiology*, 2012, 58(4): 442-447.
- [16] Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B, Herdman M, Stanier R Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 1979, 111(1): 1-61.
- [17] Botes D P, Wessels P L, Kruger H, Runnegar M T C, Santikarn S, Smith R J, Barna J C J, Williams D H. Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1985, 1: 2747-2748.
- [18] Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs*, 2010, 8(5): 1650-1680.
- [19] Sivonen K. Emerging high throughput analyses of cyanobacterial toxins and toxic cyanobacteria // *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of The Science and Research Needs*. Springer New York: Advances in Experimental Medicine and Biology Press, 2008: 539-557.
- [20] 顾丽丽. ELISA 试剂盒法测定水中 LR 型微囊藻毒素. *化学分析计量*, 2013, 22(1): 97-99.
- [21] 吴伟文, 杨左军, 顾浩飞, 郑文丽, 徐嵘. 固相微萃取/高效液相色谱法测定水中的微囊藻毒素. *分析测试学报*, 2007, 26(4): 545-547.
- [22] 郭坚, 杨新磊, 叶明立. 全自动在线固相萃取-高效液相色谱法测定水体中痕量微囊藻毒素. *分析化学*, 2011, 39(8): 1256-1260.