

奶牛乳房炎两种主要链球菌可视化 LAMP 检测方法的建立

马香,王雯雯,邓光存,吴晓玲

(宁夏大学 生命科学院 西部特色资源保护与利用教育部重点实验室,宁夏 银川 750021)

【摘要】【目的】分别建立无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)和停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)的可视化环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)检测方法,为快速准确诊断和有效防控奶牛乳房炎提供技术支撑。【方法】以无乳链球菌 *cfb* 基因和停乳链球菌 16S rRNA 基因作为检测靶标,设计并筛选特异性 LAMP 引物组合,通过优化 Mg^{2+} 、甜菜碱和 dNTPs 浓度以及反应温度和反应时间,构建最佳 LAMP 检测体系。在体系中加入钙黄绿素荧光染料实现结果可视化。对建立方法的特异性和灵敏度进行评价。采用建立的方法与常规 PCR 法对宁夏地区 300 份临床乳样进行平行检测,比较二者的检出率。【结果】无乳链球菌和停乳链球菌 LAMP 检测的最优引物组分别为 Sa-LAMP-2 和 Sd-LAMP-3。无乳链球菌和停乳链球菌检测体系的最佳 Mg^{2+} 浓度均为 5 mmol/L,dNTPs 浓度均为 1.6 mmol/L,甜菜碱均无需添加,反应温度均为 65 °C,反应时间分别为 50 和 40 min。优化后的方法仅对目标菌产生特异性扩增信号,检测灵敏度均为 5.0×10^1 拷贝/ μ L,较 PCR 法提高了 100 倍。可视化 LAMP 对临床乳样的检测结果显示,无乳链球菌和停乳链球菌的检出率分别为 42.0% 和 32.3%,均高于 PCR 法的 31.0% 和 24.3%。【结论】建立了 2 种链球菌的可视化 LAMP 检测方法,该方法具有灵敏度高、特异性强、快速简便且结果可视等特点,可用于奶牛乳房炎主要链球菌的现场即时检测与流行病学调查。

【关键词】 奶牛乳房炎;链球菌;环介导等温扩增技术(LAMP);可视化检测

【中图分类号】 S852.61⁺¹

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2027)03-0082-12

Establishment of a visual LAMP assay for two major Streptococci associated with bovine mastitis

Ma Xiang, Wang Wenwen, Deng Guangcun, Wu Xiaoling

(Key Laboratory of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: 【Objective】The study aims to establish visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detecting *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus dysgalactiae*, thereby providing technical support for rapid and accurate diagnosis, and effective prevention and control of bovine mastitis. 【Method】*cfb* gene of *S. agalactiae* and 16S rRNA genes of *S. dysgalactiae* were selected as target sequences. Specific LAMP primer sets were designed and screened. The optimal LAMP reaction system was established by optimizing the concentrations of Mg^{2+} , betaine, and dNTPs, and the reaction temperature and time. Calcein fluorescent dye was added to the reaction system for visual detection. The specificity and sensitivity of the established assays were

【收稿日期】 2026-01-31 【修回日期】 2026-04-13

【基金项目】 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2023BEG03053, 2026BBF02008);宁夏回族自治区自然科学基金项目(2025AAC020018, 2026AAC020016);国家自然科学基金项目(32460172)

【作者简介】 马香(1998—),女(回族),宁夏吴忠人,在读硕士,主要从事病原生物学与宿主免疫研究。E-mail:18709589737@163.com

【通信作者】 吴晓玲(1972—),女,宁夏银川人,教授,博士,博士生导师,主要从事病原微生物与宿主相互作用调控、细胞程序性死亡规律及机制研究。E-mail:wuxiaol@nxu.edu.cn

evaluated. The developed LAMP assays and conventional PCR assays were used in parallel to detect 300 clinical milk samples from Ningxia, China, and the detection rates of the two methods were compared. 【Result】 The optimal primer sets for the LAMP detection of *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* were Sa-LAMP-2 and Sd-LAMP-3, respectively. For both LAMP systems, the optimal Mg^{2+} concentration was 5 mmol/L, the optimal dNTPs concentration was 1.6 mmol/L, and no betaine supplement was required. The optimal reaction temperature for both assays was 65 °C, while the optimal reaction time was 50 min for *S. agalactiae* and 40 min for *S. dysgalactiae*. The optimized method generated specific amplification signals only for the target bacteria, with a detection sensitivity of 5.0×10^1 copies/ μ L, which was 100-fold higher than that of conventional PCR. Clinical milk sample detection results revealed that the positive detection rates of *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* were 42.0% and 32.3%, respectively, which were higher than the corresponding rates of 31.0% and 24.3% obtained by conventional PCR. 【Conclusion】 Visual LAMP assays for the detection of *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* were successfully established. The developed assays possess high sensitivity, excellent specificity, rapidity, simplicity, and visualized readout. Therefore, they are suitable for on-site point-of-care detection and epidemiological investigation of mastitis-associated streptococci in dairy cows.

Key words: bovine mastitis; *Streptococcus*; loop-mediated isothermal amplification (LAMP); visual detection

奶牛乳房炎是一种严重威胁奶牛健康和牧场经济效益的常见疾病,其发生通常与乳房组织受损、环境应激以及病原微生物的侵入等密切相关。乳房炎可破坏乳房结构和功能,引起泌乳能力下降及乳汁品质改变,给奶牛养殖业和乳制品生产带来严重的经济损失^[1]。相关调查显示,我国奶牛乳房炎发病率为20%~70%,每年由此导致的经济损失高达150亿~450亿元,约占奶牛常见生产疾病造成总损失的38%^[2]。在奶牛乳房炎的多种致病菌中,链球菌属细菌具有较高的分离率,其中无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)和停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)是最为常见的2种链球菌病原^[3-4]。无乳链球菌属于典型的传染性病原,易在牛群中持续传播并引起乳房慢性感染^[5];停乳链球菌兼具传染性和环境性病原的特性,感染后常出现乳房红肿及血奶等症状^[6-7]。因此,针对上述链球菌建立高效、可靠的检测方法,对于乳房炎的早期诊断和防控具有重要意义。目前,针对无乳链球菌和停乳链球菌的检测方法主要包括传统的病原分离鉴定、免疫学检测、分子生物学检测等。传统的病原分离鉴定法能够实现病原菌的直接鉴定,但培养周期较长、操作繁杂,难以满足现场快速检测的需求^[8]。免疫学检测主要基于抗原抗体反应的原理,操作相对简单,但其检测灵敏度和特异性在复杂样品检测中效果不佳,易出现假阳性结果^[9]。分子生物学方法准确性和灵敏度较高,但该方法操作流程复杂,对试验条件和仪器设备要求较高,不适用于

基层和现场检测^[10]。因此,开发一种适合于现场快速、准确的乳房炎检测方法迫在眉睫。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是Notomi等^[11]在2000年提出的一种等温核酸扩增方法,该方法在60~65 °C的恒温条件下,通过4~6条引物协同识别靶基因的6~8个特定区域位点,并依赖具有高链置换活性的*Bst* DNA聚合酶实现快速自引发扩增,无需DNA变性步骤,可在30~60 min内实现靶基因单拷贝模板的 10^9 倍扩增^[12]。Nagamine等^[13]引入2条环引物,将LAMP反应速率提升了2~3倍,相较于常规PCR法,显著提高了反应效率与灵敏度,并大幅缩短反应时间。此外,LAMP扩增产物可通过荧光染料、侧流试纸条及浊度法等多种方式实现结果的可视化判读^[14-15]。近年来,LAMP技术凭借操作简化、快速、成本低、灵敏度高及单管反应等特点,已广泛应用于食品安全、动植物病害以及生物医药等多个领域^[16-18],并成功用于新型冠状病毒^[19-20]、结核分枝杆菌^[21-22]、乙型肝炎病毒^[23]及猪圆环病毒^[24]等病原微生物的检测。然而,针对奶牛乳房炎主要致病链球菌的可视化LAMP检测研究不足,尤其是同时面向无乳链球菌和停乳链球菌的系统研究报道较少。

基于此,本研究分别以无乳链球菌*cfb*基因和停乳链球菌16S rRNA保守基因为检测靶标,通过设计并筛选特异性引物,优化反应温度、反应时间、 Mg^{2+} 浓度、甜菜碱浓度和dNTPs浓度,建立稳定可靠的LAMP反应体系,同时引入钙黄绿素荧光染料

实现结果的可视化判读,使检测过程无需依赖复杂仪器即可通过肉眼观察完成,以期为奶牛乳房炎主要链球菌的基层现场即时检测和流行病学调查提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株和乳样 乳房炎相关的 20 株细菌,来源于美国菌种保藏中心(ATCC)和中国医学细菌菌种保藏中心(CMCC),其基本信息见表 1。从宁夏银川市周边 3 家规模化奶牛养殖场采集疑似乳房炎奶牛的乳样 300 份,备用。

1.1.2 主要试剂 *Bst* 2.0 DNA Polymerase、

MgSO₄ 及 10× Isothermal Amplification buffer, 购于美国 New England BioLabs 公司;甜菜碱,由美国 Sigma 和 Biotium 公司提供;DNeasy PowerFood Microbial kit,购于德国 QIAGEN 公司;钙黄绿素,购于中国荣研生物科技有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,购于北京庄盟国际生物基因科技有限公司;dNTP Mix、质粒小提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒以及大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,购于北京天根生化科技有限公司;50×TAE、pUC57 载体及 Premix Taq,购于北京 TaKaRa 生物有限公司;氨苄青霉素,购于北京全式金生物技术有限公司。

表 1 试验菌株的基本信息

Table 1 Basic information of the experimental strains

菌株名称 Strain name	菌株号 Strain No.
无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 12836
停乳链球菌 <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	ATCC 9542、ATCC 35666
乳房链球菌 <i>Streptococcus uberis</i>	ATCC 700407
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538、ATCC 29213、ATCC 25923
肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883、CMCC 46117
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739、ATCC 35150、ATCC 25922
表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 35984、ATCC 49134、ATCC 14990
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442
产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124
单核细胞增生李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19114

1.2 方法

1.2.1 DNA 模板的提取 采用细菌基因组提取试剂盒提取供试 20 株菌的 DNA,使用 Nanodrop 8000 测定 DNA 浓度与纯度。取 1.8 mL 乳样于 2 mL EP 管中,于 13 000 r/min 条件下离心 1 min,弃上清,加入 1 mL 生理盐水重悬后再次离心,重复洗涤 2 次以去除乳样中的杂质成分,随后依据 Deasy PowerFood Microbial Kit 操作说明提取乳样 DNA。试验所得的 DNA 样品均于 -20 °C 保存,备用。

1.2.2 靶基因筛选与引物设计 从 NCBI 数据库获取无乳链球菌 *cfb* 基因 (GenBank ID: HQ148672.1) 和停乳链球菌 16S rRNA 基因 (GenBank ID: EF121447.1) 序列,用 BLAST 比对分析其保守性与特异性。利用 Primer Explore V5 软件设计 *cfb* 和 16S rRNA 的 LAMP 引物,每个基因均设计 3 组引物,各组引物均包含外引物 F3 和 B3、环引物 LF 和 LB 以及由 F1c-F2 和 B1c-B2 区域组成的内引物 FIP 与 BIP。同时,针对无乳链球菌 *cfb* 和停乳链

球菌 16S rRNA 基因各设计 1 对 PCR 引物,其扩增片段长度分别为 293 和 551 bp。无乳链球菌 LAMP 和 PCR 引物分别命名为 Sa-LAMP、Sa-PCR,停乳链球菌 LAMP 和 PCR 引物分别命名为 Sd-LAMP 和 Sd-PCR。所有引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,序列见表 2。

1.2.3 质粒标准品的制备 以无乳链球菌和停乳链球菌基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *cfb* 和 16S rRNA 基因,反应体系为 50 μ L,包括 Premix Taq 25 μ L,正反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L,ddH₂O 22 μ L。反应程序:95 °C 5 min;95 °C 30 s,65 °C 1 min,共 32 个循环;72 °C 7 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行胶回收与纯化,连接至 pUC57 载体,构建 pUC57-*cfb*、pUC57-16S rRNA,并转化到大肠杆菌 DH-5 α 感受态细胞,在含氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆,提取质粒并测定浓度与纯度,部分样品送至上海生工生物工程有限公司进行测序验证,其余样品 -20 °C 保存备用。

表 2 LAMP 与 PCR 引物序列
Table 2 LAMP and PCR primer sequences

引物名称 Primer name		引物序列(5'→ 3') Primer sequence(5'→ 3')
Sa-LAMP-1	F3-1	TGACATCGACAATGGCAGC
	B3-1	CTGTCAGTGTGTCTCAGGATAAAT
	FIP-1	TCTGAAACAGTACGTGCTGTCCACTTTTTCGCTATTATCAGTCGCAAGTGT
	BIP-1	AGGCTGATTTGGTAAAGCAAGACATTTTCATATCAATTGACATTGCTTCTGAA
	LF-1	GTCGTATCTGTTTCTTGTGCTTGA
	LB-1	TGAAATATGGTGATACACTAAGCGT
Sa-LAMP-2	F3-2	GTGGCTGGTGCATTGTTATTT
	B3-2	AAGGCTTCTACACGACTACCAATA
	FIP-2	ATTTCTCAACTGAATGCTATCTTGATCTTTTAAGTGACAACCTCCACAAGTGGTAA
	BIP-2	AGATAATGTTTCAGGGAACAGATTATGATTTTGTGGCAGCAATGAAGTCT
	LF-2	CATTTGCTGGGCTTGATTATTACT
	LB-2	AMCGGTAAATGAGGCTATTACTAG
Sa-LAMP-3	F3-3	AGTAGCTGCACATCCTGAAAAT
	B3-3	TACGTGAACRTGGTCATARTGGT
	FIP-3	CTGCTAAACCTTTACCATGATCACCAAAAGCTTATAAAGAAAAAGTAGCGTCAAC
	BIP-3	ACATTTTCATATGTTATCTGGCAACAAAAAGCAGTAACGCCACCACGAT
	LF-3	CGGTATGTACTGAATTCATTAAGTCC
	LB-3	GCTAATACTTGGAATGCAATGCC
Sd-LAMP-1	F3-1	ATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA
	B3-1	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAG
	FIP-1	GCCACTGCCTTTAACTTCAGACTTATTTTCCACCATGTGACGGTAACTAAC
	BIP-1	CGCTTTGGAAACTGGAGAAGTGTGTTTGTGTTCCCTCCATATATCTACGCA
	LF-1	GCCCAATAAAATCCGGACAA
	LB-1	TTCCATGTGTAGCGGTGAAAT
Sd-LAMP-2	F3-2	ATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA
	B3-2	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAG
	FIP-2	TGAGCCACTGCCTTTAACTTCAGATTTTCCACCATGTGACGGTAACTAAC
	BIP-2	CGCTTTGGAAACTGGAGAAGTGTGTTTGTGTTCCCTCCATATATCTACGCA
	LF-2	CCAATAAAATCCGGACAACGCT
	LB-2	GAGAACTTGAGTGCAGAAGGGGA
Sd-LAMP-3	F3-3	ATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA
	B3-3	ATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA
	FIP-3	GCCACTGCCTTTAACTTCAGACTTATTTTCCACCATGTGACGGTAACTAAC
	BIP-3	CGCTTTGGAAACTGGAGAAGTGTGTTTGTGTTCCCTCCATATATCTACGCA
	LF-3	CCAATAAAATCCGGACAACGCT
	LB-3	GAGAACTTGAGTGCAGAAGGGGA
Sa-PCR	F	GTGGCTGGTGCATTGTTATTT
	R	AAGGCTTCTACACGACTACCAATA
Sd-PCR	F	CACATGTTAACCATTTAAAAGGTGC
	R	AGCCGCTTTCGCCACC

1.2.4 LAMP 引物的筛选 以质粒标准品 pUC57-cfb、pUC57-16S rRNA 为阳性对照,ddH₂O 为阴性对照,对 3 组 LAMP 引物进行筛选。初始反应体系包括 Isothermal Amplification Buffer 2.5 μL, Bst 2.0 DNA Polymerase(8 U/μL)1 μL,甜菜碱(5 mol/L)2.4 μL,dNTPs(10 mmol/L)2.8 μL,MgSO₄ (100 mmol/L)2 μL,F3/B3 引物(10 μmol/L)各 0.25 μL,FIP/BIP 引物(10 μmol/L)各 0.8 μL,LF/LB 引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,EvaGreen(20×)

1 μL,模板 DNA 1 μL,ddH₂O 9.2 μL。反应在 Roche Light Cycler® 480 II 实时荧光定量 PCR 仪中于 65 ℃扩增 1 h,通过荧光扩增曲线综合评价引物的扩增性能与特异性。

1.2.5 LAMP 反应体系和条件的优化 以质粒标准品 pUC57-cfb、pUC57-16S rRNA 为阳性对照,ddH₂O 为阴性对照(N),采用单因素试验对 LAMP 反应体系和条件进行优化。试验设置 Mg²⁺ 浓度分别为 2,3,4,5,6,7,8,9 和 10 mmol/L;甜菜碱浓度

分别为 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mol/L; dNTPs 浓度分别为 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2 和 2.4 mmol/L; 反应温度分别为 61, 62, 63, 64, 65 和 66 °C; 反应时间分别为 20, 30, 40, 50, 60 min。通过比较不同条件下的扩增效果确定最佳检测体系和条件。

1.2.6 可视化 LAMP 反应的建立 在优化后的反应体系中加入 1 μ L 钙黄绿素荧光染料, 将反应管放入恒温金属浴中 65 °C 反应相应时间, 肉眼观察颜色变化, 若反应体系呈黄绿色则为阳性, 若呈浅橙色则为阴性。

1.2.7 特异性评价 以质粒标准品 pUC57-cfb、pUC57-16S rRNA 作为阳性对照, ddH₂O 为阴性对照, 目标菌株(无乳链球菌和停乳链球菌)为阳性样本, 非目标菌株为阴性样本, 在优化好的条件下进行可视化 LAMP 扩增。同时进行 PCR 扩增, 扩增引物序列见表 2, 反应体系和程序见 1.2.3 节, 对扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。结合实时荧光扩增曲线、可视化结果及 PCR 电泳对所建立 LAMP 方法的特异性进行评价。

1.2.8 灵敏度评价 测得质粒标准品 pUC57-cfb、pUC57-16S rRNA 的质量浓度分别为 89.36 和 65.8 ng/ μ L, 依据拷贝数(拷贝/ μ L)= $6.02 \times 10^{23} \times$ 质粒浓度(ng/ μ L) $\times 10^{-9}/$ (质粒长度 $\times 660$), 计算可得 2 种质粒含量分别为 2.4×10^{10} 和 1.5×10^{10} 拷贝/ μ L。将 2 种质粒含量统一调整至 5×10^{10} 拷贝/ μ L 后进行 10 倍梯度稀释, 制备(5×10^6)~(5×10^0) 拷贝/ μ L 的 7 个梯度标准品, 分别进行可视化 LAMP 检测和 PCR 检测, 比较 2 种方法的灵敏度。试验以 ddH₂O 为阴性对照。

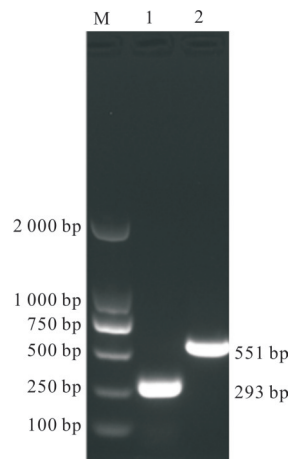
1.2.9 临床样本的检测 采用建立的可视化 LAMP 检测方法对 300 份奶牛乳样进行检测, 同时用 PCR 方法进行平行检测(对照), 比较二者的检出率, 评价所建立方法在实际样本检测中的应用效果和可靠性。

2 结果与分析

2.1 质粒标准品的构建

采用表 2 所示的 Sa-PCR 与 Sd-PCR 引物, 分别对无乳链球菌 *cfb* 与停乳链球菌 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, 目的条带大小分别约为 293 和 551 bp, 与预期片段长度一致(图 1)。对构建的 pUC57-cfb 和 pUC57-16S rRNA 进行测序验证, 序列比对分

析结果表明, 扩增序列与无乳链球菌 *cfb* 基因及停乳链球菌 16S rRNA 基因的保守区域序列完全一致, 表明质粒标准品 pUC57-cfb 和 pUC57-16S rRNA 构建成功, 可用于后续试验。



M. MDA Marker; 1. 无乳链球菌 *cfb* 基因; 2. 停乳链球菌 16S rRNA。
M. DNA Marker; 1. *cfb* gene of *S. agalactiae*; 2. 16S rRNA of *S. dysgalactiae*.

图 1 无乳链球菌 *cfb* 基因和停乳链球菌 16S rRNA 的 PCR 扩增

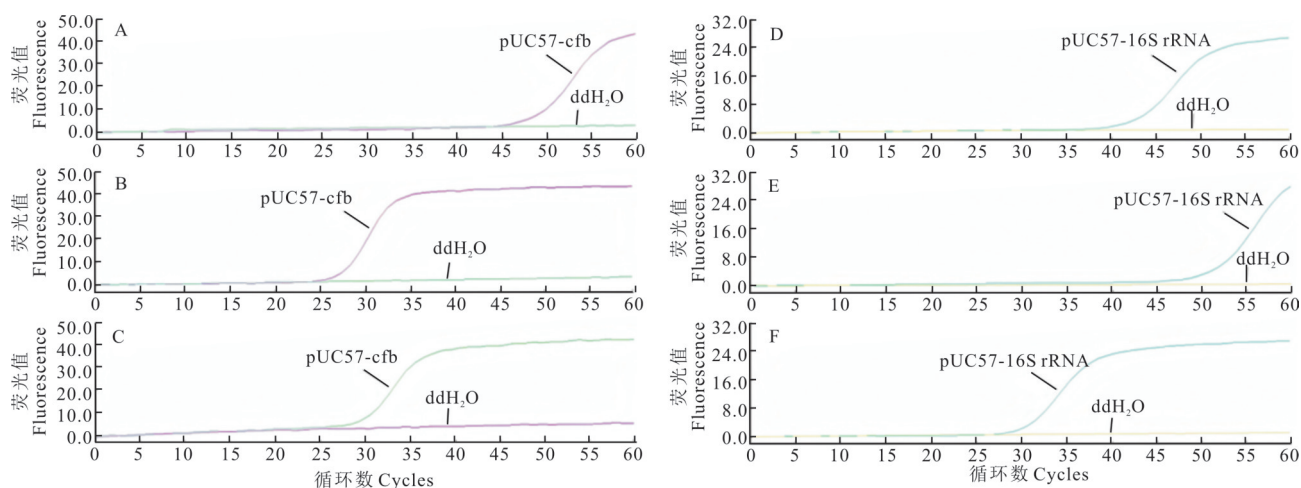
Fig. 1 PCR amplification of *cfb* gene of *S. agalactiae* and 16S rRNA gene of *S. dysgalactiae*

2.2 LAMP 引物筛选

2 种链球菌不同 LAMP 引物组的扩增结果如图 2 所示。由图 2 可知, 以 pUC57-cfb 和 pUC57-16S rRNA 为模板, 引物 Sa-LAMP-2(图 2-B)和 Sd-LAMP-3(图 2-F)分别在反应开始后 27 和 29 min 出现明显扩增信号, 与其他组相比, 这两组引物的扩增曲线均呈现典型的“S”型, 能更早进入平台期; 同时各组阴性对照均未观察到非特异性扩增信号, 表明背景干扰较小。因此, 试验最终选用 Sa-LAMP-2 和 Sd-LAMP-3 引物分别作为无乳链球菌和停乳链球菌的最优 LAMP 引物。

2.3 LAMP 反应体系的优化

2.3.1 Mg²⁺、甜菜碱及 dNTPs 浓度的优化 在其他条件保持不变的情况下, 对 Mg²⁺、甜菜碱及 dNTPs 的浓度进行优化。结果(图 3~5)显示, 当 Mg²⁺ 浓度为 5 mmol/L、不添加甜菜碱(0 mol/L)且 dNTPs 浓度为 1.6 mmol/L 时, 2 种链球菌的扩增效率最优, 表现为出峰最早、荧光值最大, Mg²⁺ 低于或高于此浓度时均会导致出峰延迟或荧光值减小。因此, 确定 2 种链球菌 LAMP 检测体系中无需添加甜菜碱且 Mg²⁺ 和 dNTPs 最适浓度分别为 5 和 1.6 mmol/L。

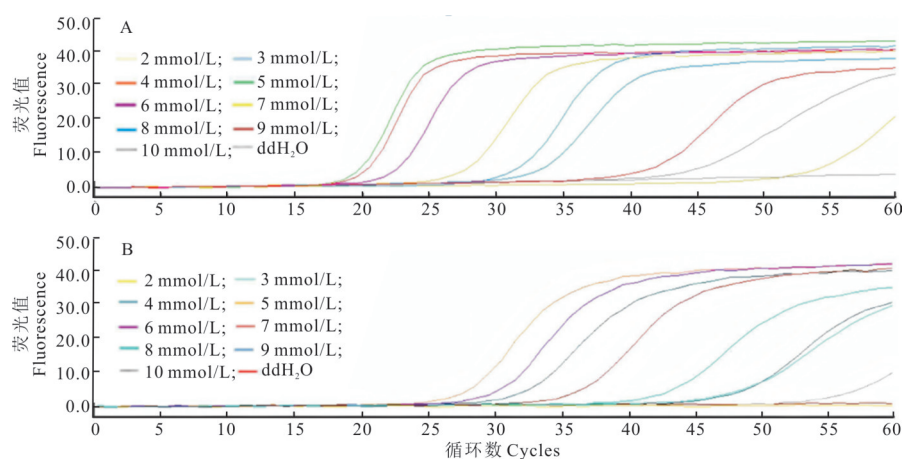


A~C. 分别为引物Sa-LAMP-1、Sa-LAMP-2和Sa-LAMP-3扩增结果;D~F. 分别为引物Sd-LAMP-1、Sd-LAMP-2和Sd-LAMP-3扩增结果。

A—C. Amplification results of Sa-LAMP-1, Sa-LAMP-2, and Sa-LAMP-3, respectively. D—F. Amplification results of Sd-LAMP-1, Sd-LAMP-2, and Sd-LAMP-3, respectively.

图2 无乳链球菌和停乳链球菌LAMP检测引物筛选

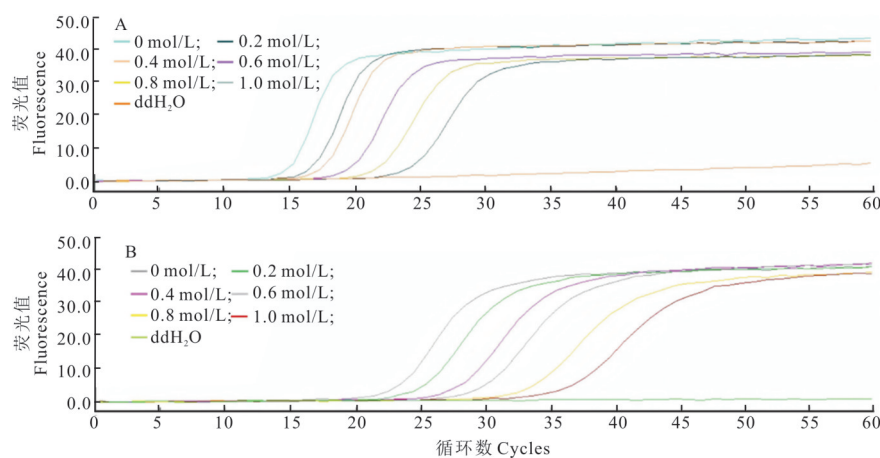
Fig. 2 Screening of LAMP primers for *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*



A. 无乳链球菌;B. 停乳链球菌。A. *S. agalactiae*;B. *S. dysgalactiae*。

图3 Mg^{2+} 浓度对无乳链球菌和停乳链球菌LAMP扩增反应的影响

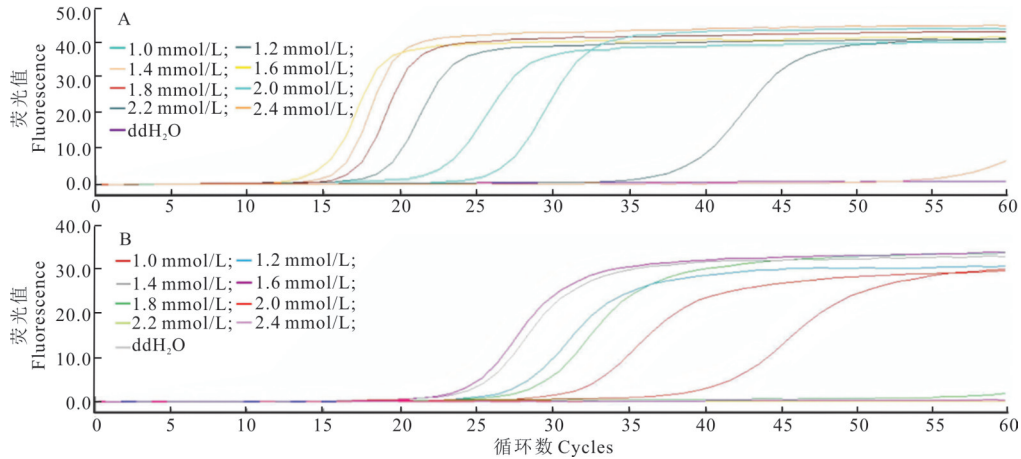
Fig. 3 Effects of Mg^{2+} concentration on LAMP amplification results of *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*



A. 无乳链球菌;B. 停乳链球菌。A. *S. agalactiae*;B. *S. dysgalactiae*。

图4 甜菜碱浓度对无乳链球菌和停乳链球菌LAMP扩增反应的影响

Fig. 4 Effects of betaine concentration on LAMP amplification results of *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*



A. 无乳链球菌; B. 停乳链球菌。A. *S. agalactiae*; B. *S. dysgalactiae*。

图5 dNTPs浓度对无乳链球菌和停乳链球菌LAMP扩增反应的影响

Fig. 5 Effects of concentration of dNTPs on LAMP amplification results of *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*

2.3.2 反应温度的优化 在保持其他条件不变的情况下,对反应温度进行筛选,结果(图6,7)显示,在65℃时,2种链球菌的扩增曲线均表现为出峰最

早且荧光信号最强;温度低于或高于65℃时,LAMP扩增延迟或效率下降。因此,确定65℃为2种链球菌LAMP检测的最适反应温度。

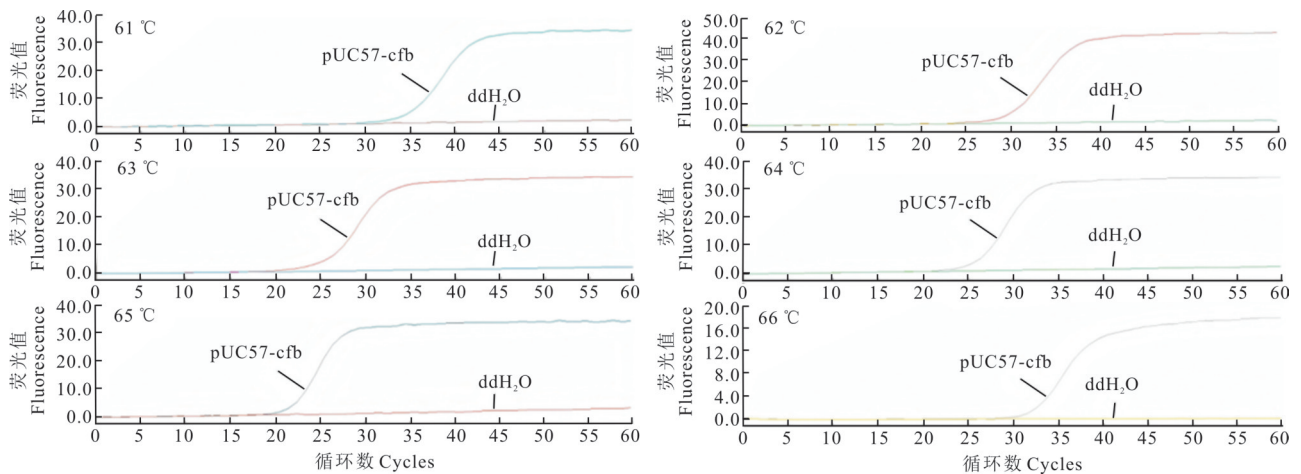


图6 反应温度对无乳链球菌LAMP扩增的影响

Fig. 6 Effects of reaction temperature on LAMP amplification of *S. agalactiae*

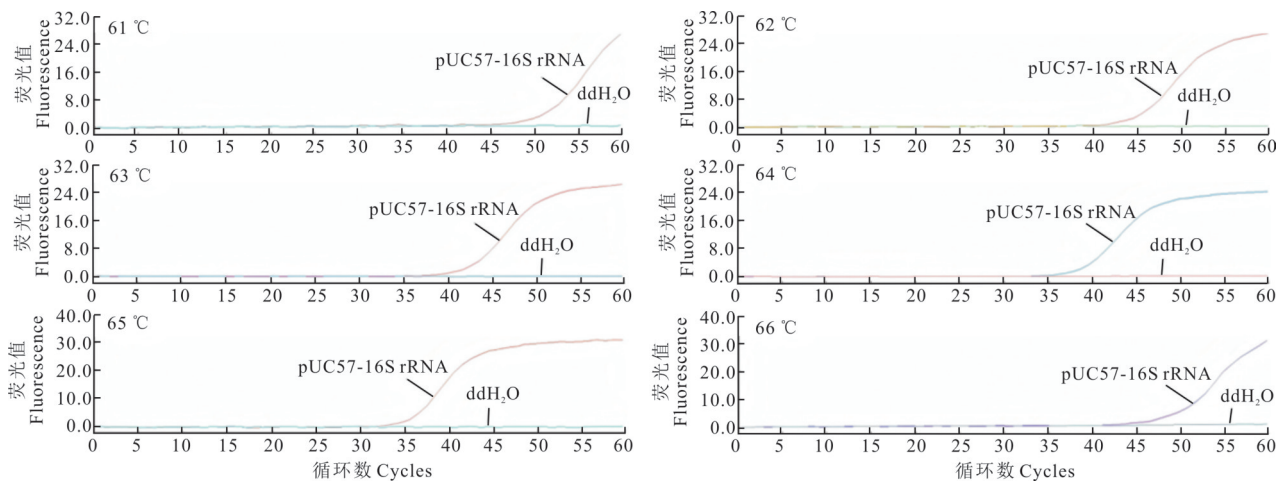


图7 反应温度对停乳链球菌LAMP扩增的影响

Fig. 7 Effects of reaction temperature on LAMP amplification of *S. dysgalactiae*

2.3.3 反应时间的优化 在确定最适反应温度为65℃后,对反应时间进行优化,结果(图8,9)显示,2种链球菌均在20 min内未观察到有效扩增,而在30~60 min均可观察到扩增信号,其中无乳链球菌

在50 min、停乳链球菌在40 min时扩增出峰最早且荧光信号最强,继续延长反应时间并未显著提高扩增效率。因此,确定无乳链球菌和停乳链球菌LAMP检测的最适反应时间分别为50和40 min。

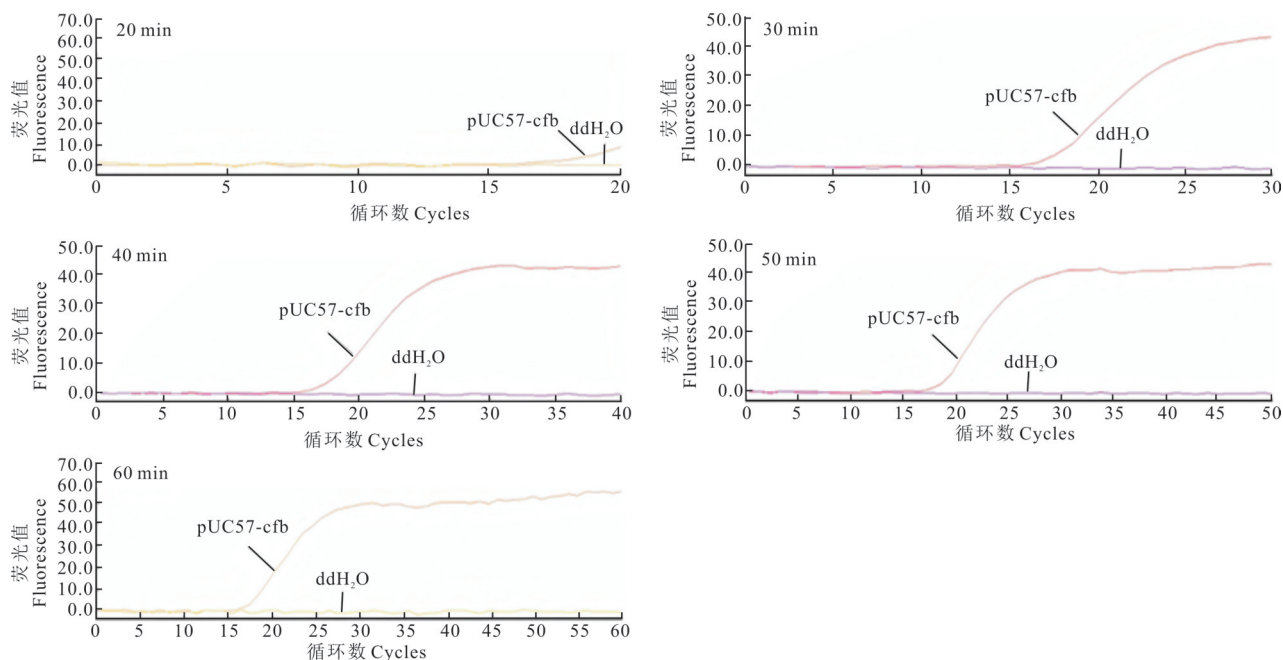


图8 反应时间对无乳链球菌LAMP扩增的影响

Fig. 8 Effects of reaction time on LAMP amplification of *S. agalactiae*

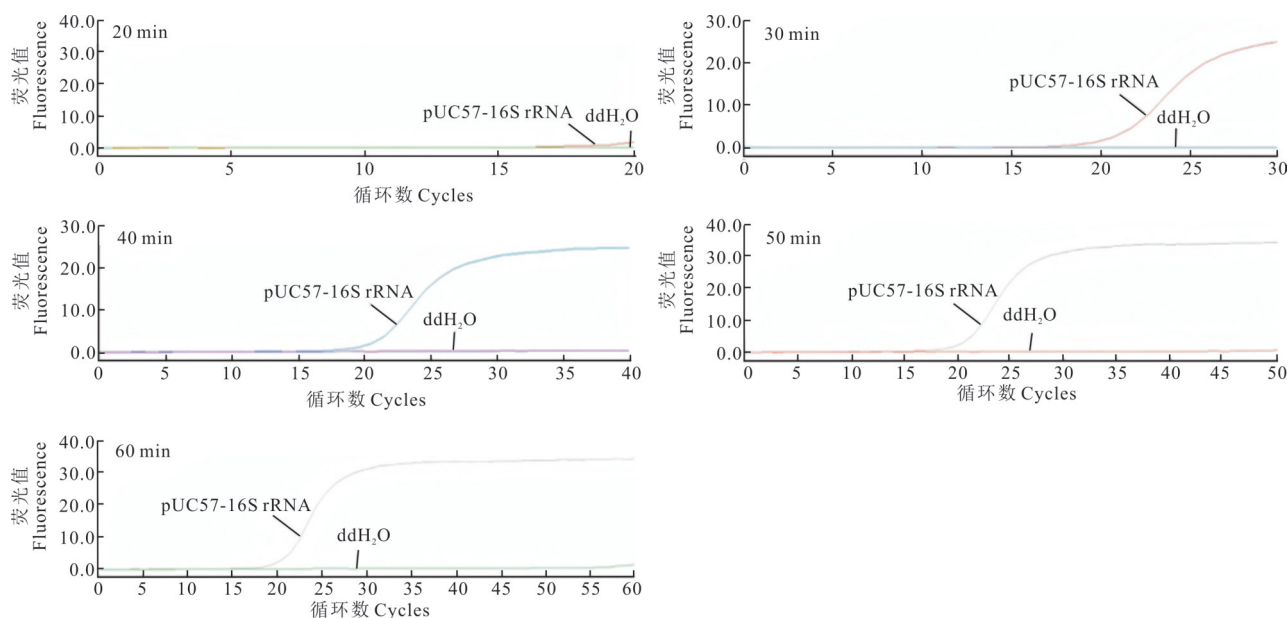


图9 反应时间对停乳链球菌LAMP扩增的影响

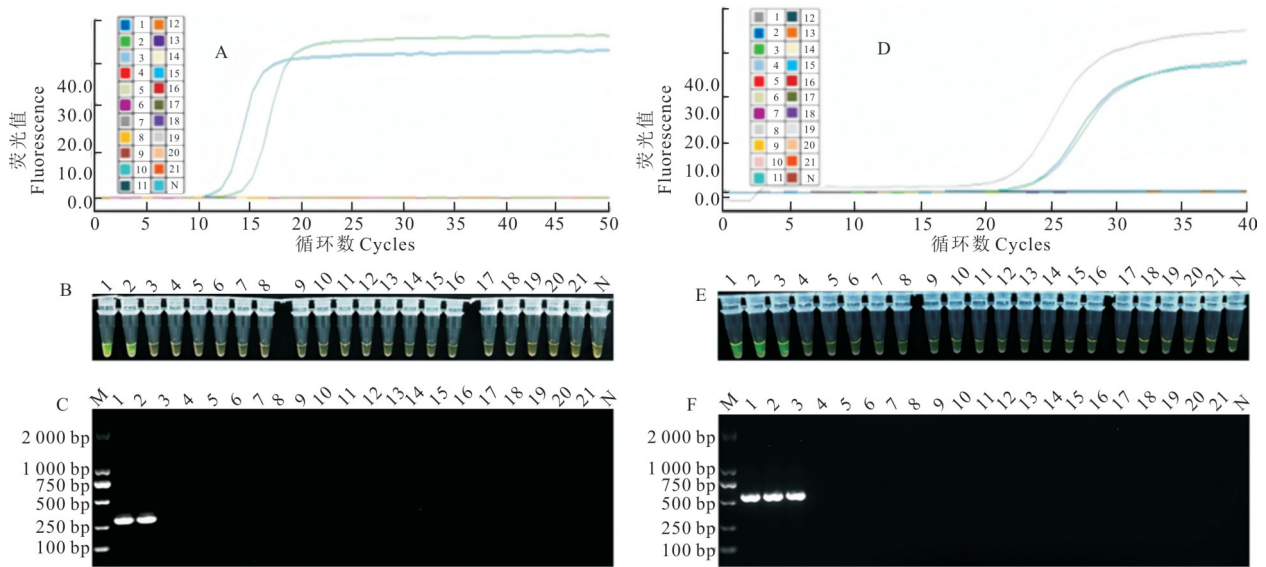
Fig. 9 Effects of reaction time on LAMP amplification of *S. dysgalactiae*

2.4 可视化LAMP检测方法特异性评价

实时荧光LAMP检测结果显示,仅目标菌株及其对应阳性质粒出现典型的“S”型扩增曲线,非目标菌株和阴性对照均无扩增信号(图10-A、D)。可视化LAMP检测结果显示,只有目标菌株与其对应

的阳性质粒DNA结果为黄绿色,其余处理均为浅橙色(图10-B、E);PCR结果进一步证实,仅目标菌扩增出现符合预期大小的特异性条带(图10-C、F)。以上结果表明,所建立的可视化LAMP检测方法对这2种链球菌均具有高度特异性,可准确区分目标

菌与非目标菌。



A~C. 分别为无乳链球菌实时荧光LAMP检测结果、可视化LAMP检测结果和PCR检测结果;D~F. 分别为停乳链球菌实时荧光LAMP检测结果、可视化LAMP检测结果和PCR检测结果。A~C中,1~2. 分别为质粒标准品pUC57-cfb和无乳链球菌ATCC 12836;3~4. 分别为停乳链球菌ATCC 9542和ATCC 35666。D~F中,1~3. 分别为质粒标准品pUC57-16S rRNA及停乳链球菌ATCC 35666和ATCC 9542;4. 无乳链球菌ATCC 12836。A~F中,5. 乳房链球菌ATCC 700407;6~7. 分别为肺炎克雷伯菌ATCC 13883和CMCC 46117;8. 铜绿假单胞菌ATCC 15442;9. 鼠伤寒沙门氏菌ATCC 14028;10. 粪肠球菌ATCC 29212;11~13. 分别为大肠杆菌ATCC 8739、ATCC 35150和ATCC 25922;14~16. 分别为金黄色葡萄球菌ATCC 29213、ATCC 6538和ATCC 25923;17~19. 分别为表皮葡萄球菌ATCC 49134、ATCC 35984和ATCC 14990;20. 产气荚膜梭菌ATCC 13124;21. 单核细胞增生李斯特菌ATCC 19114;M. DL 2000 Marker;N. 阴性对照。

A~C. Detection results of *S. agalactiae* by real-time fluorescent LAMP, visual LAMP, and PCR, respectively; D~F. Detection results of *S. dysgalactiae* by real-time fluorescent LAMP, visual LAMP, and PCR, respectively. In figures A~C, 1~2. Plasmid standard pUC57-cfb, *S. agalactiae* ATCC 12836; 3~4. *S. dysgalactiae* ATCC 9542 and ATCC 35666. In figures D~F, 1~3. Plasmid standard pUC57-16S rRNA, *S. dysgalactiae* ATCC 35666 and ATCC 9542; 4. *S. agalactiae* ATCC 12836. In figures A~F, 5. *S. uberis* ATCC 700407; 6~7. *K. pneumoniae* ATCC 13883, CMCC 46117; 8. *P. aeruginosa* ATCC 15442; 9. *S. typhimurium* ATCC 14028; 10. *E. faecalis* ATCC 29212; 11~13. *E. coli* ATCC 8739, ATCC 35150, ATCC 25922; 14~16. *S. aureus* ATCC 29213, ATCC 6538, ATCC 25923; 17~19. *S. epidermidis* ATCC 49134, ATCC 35984, ATCC 14990; 20. *C. perfringens* ATCC 13124; 21. *L. monocytogenes* ATCC 19114; M. DL 2000 Marker; N. Negative control.

图10 无乳链球菌和停乳链球菌可视化LAMP与PCR检测方法的特异性比较

Fig. 10 Comparison of specificity of visual LAMP and PCR assays for detecting *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*

2.5 可视化LAMP检测方法灵敏度评价

为评价所建立方法的灵敏度,以 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^0$ 拷贝/ μL 的2种链球菌重组质粒为模板,同步进行可视化LAMP和PCR检测。实时荧光与可视化结果显示,当重组质粒含量低至 5×10^1 拷贝/ μL 时,2种链球菌均出现典型的扩增曲线(图11-A、D),且反应管呈黄绿色,低于此浓度则保持浅橙色(图11-B、E),因此确定2种链球菌可视化LAMP检测限均为 5×10^1 拷贝/ μL 。与常规PCR的最低检测限(5×10^3 拷贝/ μL ,图11-C、F)相比,本研究建立的可视化LAMP方法的灵敏度提高了100倍,在低拷贝目标核酸检测方面具有明显优势。

2.6 可视化LAMP方法对临床样本的检测

为评估本研究建立的可视化LAMP方法在实际样品检测中的可行性与准确性,用该方法对宁夏地区300份奶牛乳样进行检测,并以PCR法进行平

行检测(对照),结果(表3)表明,无乳链球菌和停乳链球菌可视化LAMP法的检出率分别为42.0%和32.3%,均高于PCR方法的31.0%和24.3%。结果表明,可视化LAMP方法在实际样本检测中具有更高的阳性检出能力,显示出良好的应用潜力。

3 讨论

奶牛乳房炎严重制约着奶牛养殖业的健康发展,导致奶牛产奶量下降,治疗与淘汰成本增加,经济损失严重。无乳链球菌和停乳链球菌是引发该病的关键致病性链球菌,感染早期多呈隐性感染或亚临床状态,临床症状不明显,易造成病原的持续传播。因此,建立一种适用于基层现场的快速、灵敏、特异的检测方法,对奶牛乳房炎的早期诊断和防控具有重要意义。

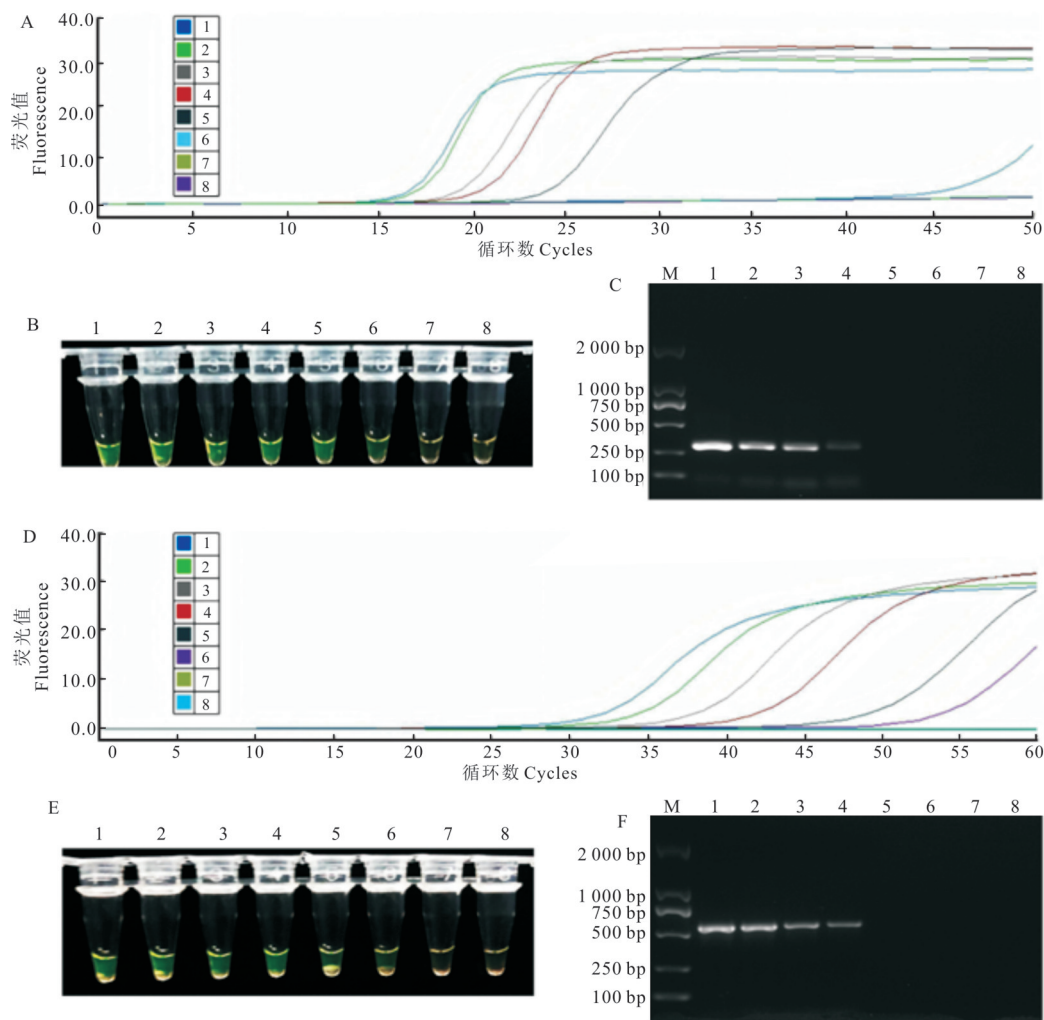


图 11 无乳链球菌和停乳链球菌可视化 LAMP 与 PCR 检测方法的灵敏度比较

Fig. 11 Comparison of sensitivity of visual LAMP and PCR assays for detecting *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*

A~C. 分别为无乳链球菌实时荧光 LAMP 检测结果、可视化 LAMP 检测结果和 PCR 检测结果;D~F. 分别为停乳链球菌实时荧光 LAMP 检测结果、可视化 LAMP 检测结果和 PCR 检测结果。1~7. 质粒浓度分别为 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 5×10^1 , 5×10^0 拷贝/ μ L;8. 阴性对照。

A~C. Detection results of *S. agalactiae* by real-time fluorescent LAMP, visual LAMP, and PCR, respectively;D~F. Detection results of *S. dysgalactiae* by real-time fluorescent LAMP, visual LAMP, and PCR, respectively. 1~7. Plasmid concentrations were 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 5×10^1 , and 5×10^0 copies/ μ L;8. Negative control.

图 11 无乳链球菌和停乳链球菌可视化 LAMP 与 PCR 检测方法的灵敏度比较

Fig. 11 Comparison of sensitivity of visual LAMP and PCR assays for detecting *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*

表 3 无乳链球菌与停乳链球菌可视化 LAMP 检测方法对临床样本的检测结果

Table 3 Detection results of clinical samples by visual LAMP assay for *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*

名称 Name	检测方法 Detection method	阳性样本数 Positive samples	阴性样本数 Negative samples	检出率/% Detection rate
无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>	可视化 LAMP Visual LAMP	126	174	42.0
	PCR	93	207	31.0
停乳链球菌 <i>S. dysgalactiae</i>	可视化 LAMP Visual LAMP	97	203	32.3
	PCR	73	227	24.3

本研究以无乳链球菌 *cfb* 基因和停乳链球菌 16S rRNA 的特异性区域为靶标,设计 LAMP 引物组合,通过对反应体系和反应条件的系统优化,成功建立了 2 种链球菌的可视化 LAMP 检测方法。用该方法对宁夏地区 300 份临床乳样进行检测,结果显示,2 种链球菌的检出率均高于常规 PCR 法,灵敏

度提高了 100 倍,扩增反应时间仅需 50 min,整体检测周期明显短于 PCR 方法,且较 Guo 等^[25]基于 *fbsB* 基因建立的无乳链球菌 RT-LAMP 方法的反应时间缩短了 10 min。本试验建立的方法在反应前将钙黄绿素荧光染料直接加入到反应体系中,实现扩增结果的可视化判读,避免了扩增后开盖添加染料及

凝胶电泳步骤,既简化了检测流程,也有效降低了气溶胶污染与假阳性风险。综上,与常规PCR法相比,本研究建立的LAMP检测方法具有操作简便、检测快速、结果可视化且灵敏度高等特点,适用于无乳链球菌和停乳链球菌感染所致奶牛乳房炎的基层现场快速检测。

特异性是 LAMP 检测技术区分不同病原菌的前提,而高度特异性引物的设计是保证检测结果准确性的核心。在奶牛乳房炎病原菌分子检测中,常以 16S rRNA、23S rRNA、*scpB*、*tuf*、*cylE*、*gapC*、*nuc*、*pauA*、*lmb*、*napr* 和 *uidA* 等基因为靶标^[26-29],设计引物进行检测。16S rRNA 基因是细菌分类鉴定的经典分子标记,其序列在不同细菌间具有较高的保守性,同时包含多个可变区,因而被广泛用于细菌的分类鉴定与检测研究^[30]。*cfb* 基因编码具有协同溶血活性 CAMP 因子,是无乳链球菌的重要毒力因子,可作为快速检测的重要分子靶标^[9],有研究显示,基于 *cfb* 基因的检测方法在灵敏度方面优于以 *scpB* 基因为靶标的检测方法^[31]。因此,本研究选取无乳链球菌 *cfb* 基因和停乳链球菌 16S rRNA 基因作为靶标设计特异性引物,从而保证了所建立 LAMP 检测方法具有较强的特异性。

灵敏度高是实现目标病原菌早期检测的关键。Banerjee 等^[32]基于无乳链球菌 *cfb* 基因构建了 LAMP 检测体系,用于新生儿败血症血样检测,该方法最低检测限为 2 CFU/mL,灵敏度是 PCR 法的 100 倍;Jang 等^[33]以 *sodA* 基因为靶标开发的人工关节周围感染无乳链球菌 LAMP 检测方法的最低检测限为 1×10^2 拷贝/ μ L;余艳玲等^[34]针对罗非鱼无乳链球菌 *Sip* 基因建立了 LAMP 检测方法,其可检测的 DNA 最低含量为 2.5×10^4 拷贝/ μ L。本研究所建立的方法对目标菌 DNA 的最低检测限达到 5×10^1 拷贝/ μ L,其灵敏度略低于 Miao 等^[35]联合 LAMP 技术与分裂酶生物传感器建立的针对链球菌 16S rRNA 的检测方法,但高于 Griffioen 等^[36]以乳房炎链球菌 16S rRNA 基因为靶标建立的 LAMP 检测方法。

4 结 论

本研究以无乳链球菌 *cfb* 基因和停乳链球菌 16S rRNA 基因为靶标,建立了奶牛乳房炎 2 种主要链球菌可视化 LAMP 检测方法。该方法具有特异性强、灵敏度高、快速简便、对仪器设备要求低以及

结果可视化等特点,为奶牛乳房炎主要链球菌的基层现场快速检测提供了可靠的技术支持,具有良好的临床应用潜力。

[参考文献]

- [1] Ferronato G, Simonetto A, Gilioli G, et al. Modeling mastitis risk management effects on dairy milk yield and global warming potential[J]. *Animals*, 2024, 15(1):50.
- [2] 叶雯,麻柱,俞英,等. 我国奶牛乳房炎发病现状及防治措施[J]. *中国畜牧杂志*, 2023, 59(9):343-348.
Ye W, Ma Z, Yu Y, et al. Incidence status of mastitis in dairy cows and its prevention and treatment measures in China[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2023, 59(9):343-348.
- [3] Zouharova M, Rysanek D. Multiplex PCR and RPLA identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains from bulk tank milk [J]. *Zoonoses and Public Health*, 2008, 55(6):313-319.
- [4] 陈遥. 无乳链球菌性奶牛乳房炎及其防治研究进展[J]. *中国奶牛*, 2025(9):26-31.
Chen Y. Research progress of agalactial streptococcal mastitis of dairy cows and its prevention and treatment[J]. *China Dairy Cattle*, 2025(9):26-31.
- [5] Liang T Y, Huo G G, Chen L L, et al. Antibacterial activity and metabolomic analysis of linalool against bovine mastitis pathogen *Streptococcus agalactiae*[J]. *Life Sciences*, 2023, 313:121299.
- [6] 牟小青,杨峰,武小虎,等. 牛源停乳链球菌研究进展[J]. *中兽医医药杂志*, 2023, 42(1):34-40.
Mou X Q, Yang F, Wu X H, et al. Research progress on *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine mastitis[J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2023, 42(1):34-40.
- [7] Shah A U, Ali Khan J, Avais M, et al. Prevalence and chemotherapy of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle [J]. *PLoS One*, 2025, 20(2):e315480.
- [8] 宋祥彬,刘莎莎,魏茂莲,等. 奶牛乳房炎防治技术研究进展[J]. *中国奶牛*, 2025(9):22-26.
Song X B, Liu S S, Wei M L, et al. Research advances in prevention and control technologies for bovine mastitis[J]. *China Dairy Cattle*, 2025(9):22-26.
- [9] 张晗涵,朱金鲁,吴宗福. 无乳链球菌检测技术研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2025, 57(6):128-134.
Zhang H H, Zhu J L, Wu Z F. Advances in research on techniques for detection of *Streptococcus agalactiae* [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2025, 57(6):128-134.
- [10] 叶方钰,刘爽,王权,等. 奶牛乳房炎三种主要链球菌多重PCR检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2023, 53(2):182-188.
Ye F Y, Liu S, Wang Q, et al. Development of multiplex PCR for detection of *Streptococcus* in bovine mastitis[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2023, 53(2):182-188.

- [11] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12):e63.
- [12] 吴泽勇, 欧阳松应, 王冬梅. 环介导等温扩增检测特异性与准确性的改善方法[J]. *微生物学报*, 2025, 65(10):4326-4339.
- Wu Z Y, Ouyang S Y, Wang D M. Methods to improve the detection specificity and accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(10):4326-4339.
- [13] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16(3):223-229.
- [14] Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR?[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1931.
- [15] 杨帆, 胡章薇, 严浩浩, 等. 青稞黑穗病菌LAMP检测体系的建立[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2021, 49(9):67-76.
- Yang F, Hu Z W, Yan H H, et al. Establishment of LAMP detection system for barley smut[J]. *Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition)*, 2021, 49(9):67-76.
- [16] 安红玉, 陶泽, 陈晨, 等. 环介导等温扩增技术在食品安全检测领域的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(21):388-396.
- An H Y, Tao Z, Chen C, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification in the detection of food safety[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(21):388-396.
- [17] 禹兰平, 王楷宸, 潘俊慧, 等. 等温扩增技术概述及其在动物病原检测中的应用[J]. *中国动物检疫*, 2022, 39(12):96-103.
- Yu L P, Wang K C, Pan J H, et al. Overview of isothermal amplification technology and its application in animal pathogen detection[J]. *China Animal Health Inspection*, 2022, 39(12):96-103.
- [18] 陈文静, 董章勇, 宋汉达, 等. 环介导等温扩增技术在植物病原物检测中的应用[J]. *仲恺农业工程学院学报*, 2024, 37(4):48-54.
- Chen W J, Dong Z Y, Song H D, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification technology in plant pathogen detection[J]. *Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering*, 2024, 37(4):48-54.
- [19] Yan C, Cui J, Huang L, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2020, 26(6):773-779.
- [20] Huang W E, Lim B, Hsu C C, et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(4):950-961.
- [21] Khan A, Kamra E, Singh R, et al. Diagnosis of osteoarticular tuberculosis: multi-targeted loop-mediated isothermal amplification assay versus multiplex PCR[J]. *Future Microbiology*, 2021, 16(13):935-948.
- [22] Chen X, Huang J F, Xiao Z Y, et al. Highly specific and sensitive detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using multiplex loop-mediated isothermal amplification combined with a nanoparticle-based lateral flow biosensor[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2021, 52(3):1315-1325.
- [23] Maity S N, Poonati R, Punati R D, et al. Development of sensitive and specific loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow device for the rapid detection of hepatitis B virus infection[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2022, 53(2):615-623.
- [24] 祁钊, 余相宇, 陈魏圆, 等. 猪圆环病毒3型LAMP-PfAgo检测方法的建立[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2025, 53(2):1-9.
- Qi Z, Yu X Y, Chen W Y, et al. Establishment of LAMP-PfAgo detection method for porcine circovirus 3[J]. *Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition)*, 2025, 53(2):1-9.
- [25] Guo X, Zhuang Y, Wen J, et al. Evaluation of the real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Streptococcus agalactiae*[J]. *Bioscience Reports*, 2019, 39(5):BSR20190383-20190387.
- [26] Parasana D K, Javia B B, Fefar D T, et al. Detection of virulence associated genes in *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis[J]. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 2022, 23(3):275-279.
- [27] Shen J R, WU X H, Yang Y Y, et al. Antimicrobial resistance and virulence factor of *Streptococcus dysgalactiae* isolated from clinical bovine mastitis cases in northwest China[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2021, 14:3519-3530.
- [28] Zouharova M, Nedbalcova K, Slama P, et al. Occurrence of virulence-associated genes in *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine mastitis[J]. *Veterinární Medicína*, 2022, 67(3):123-130.
- [29] Torres G, Macias D, Reyes-Vélez J, et al. *Streptococcus agalactiae* virulence factors isolated from bovine mastitis and antibiotic treatment response[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2023, 134(6):lxad116.
- [30] Johnson J S, Spakowicz D J, Hong B Y, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis[J]. *Nature Communications*, 2019, 10:5029.
- [31] 罗娅莎, 张矣桐, 张亮, 等. 基于 *cfb* 和 *scpb* 基因的无乳链球菌PCR检测方法比较及临床应用[J]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2021, 9(1):38-41.
- Luo Y S, Zhang Y T, Zhang L, et al. Comparison and clinical application of *cfb* and *scpb* genes in PCR assays to detect *Streptococcus agalactiae*[J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Management (Electronic Edition)*, 2021, 9(1):38-41.
- [32] Banerjee S, K M H, Shastry R P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for early on-site detection of Group B *Streptococcus* infection in neonatal sepsis blood sample[J]. *Molecular Biology Reports*, 2024, 51(1):811.