

刘宁宁, 易萍, 郭爱珍, 等. 牛溶血性曼氏杆菌可视化LAMP检测方法的建立[J]. 华中农业大学学报, 2023, 42(2): 32-37.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.02.005

牛溶血性曼氏杆菌可视化LAMP检测方法的建立

刘宁宁¹, 易萍¹, 郭爱珍^{1,2,3}, 胡长敏¹, 陈颖钰^{1,2}

1. 华中农业大学动物医学院/农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 武汉 430070;
2. 湖北省兽医流行病学国际科技合作基地, 武汉 430070; 3. 湖北洪山实验室, 武汉 430070

摘要 为建立一种能够快速、高效检测牛溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*)的可视化LAMP检测方法, 利用LAMP引物设计软件, 以溶血性曼氏杆菌保守基因*lktC*序列设计内引物、外引物及环引物, 对其反应温度、Mg²⁺浓度、dNTPs浓度等条件进行优化, 并检测了方法的敏感性、特异性及实用性。结果显示, 该方法在68.2℃、6 mmol/L Mg²⁺、1.6 mmol/L dNTPs条件下达到最佳, 40 min内完成检测并可通过肉眼判定结果, 对细菌的最低检测限为6.7×10⁻¹ cfu/μL, 对*lktC*重组质粒的最低检测限为7.9×10² copies/μL, 敏感性高; 与15种病原均不发生交叉反应, 特异性好; 对背景清晰小鼠肺组织样本检测结果显示该方法实用性良好, 且优于普通PCR方法。表明该方法可快速、高效检测牛溶血性曼氏杆菌。

关键词 环介导等温扩增 (LAMP); *lktC*基因; 溶血性曼氏杆菌; 可视化检测; 综合防控
中图分类号 S852.61 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)02-0032-06

溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*)是引起牛呼吸道疾病综合征的机会性病原, 在运输等应激环境或其他病原混合感染情况下, 可侵袭动物肺部引起呼吸道疾病, 主要表现为呼吸困难、食欲下降、精神沉郁、发热和流鼻涕等, 严重的感染48 h后死亡^[1]。由该菌感染导致的疾病已在全球广泛分布, 引起的死亡损失仅在北美就已超10亿美元^[2]。快速准确地对感染动物进行诊断, 是采取积极和有效措施防控溶血性曼氏杆菌病的关键。

目前, 用于溶血性曼氏杆菌病诊断的方法主要包括普通PCR^[3]、多重PCR^[4-5]、荧光定量PCR^[6]和PCR-ELISA^[7]等。但应用这些方法进行检测时需要昂贵的仪器设备, 耗费时间长, 不利于临床推广使用。LAMP方法因灵敏度高、特异性强、成本低等优点而广泛应用于临床检测^[8], 但常规LAMP方法易污染, 荧光LAMP方法又费用高昂, 很大程度上限制了这些方法的推广使用。

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种类似于PCR的核酸扩增方法, 可以在恒温条件下(65℃左右)快速扩增靶基

因, 具有灵敏、便捷等优点, 能够满足普通农场检测的需要^[9]。

lktC(leukotoxin C)基因是由溶血性曼氏杆菌产生的一种具有酰化作用的钙依赖性细胞毒素, 属于重复子毒素(repeat in toxin, RTX)家族, 高度保守, 能够作为溶血性曼氏杆菌较好的诊断靶点。因此, 本研究以*lktC*基因为基础, 建立了一套能够用于牛溶血性曼氏杆菌检测的可视化LAMP方法, 以期为我国牛溶血性曼氏杆菌病的防控提供新的技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试病原和质粒

本研究中所用到的牛溶血性曼氏杆菌(A1、A2、A6型)菌株、牛多杀性巴氏杆菌(A型、B型、F型)、牛支原体、牛鼠伤寒沙门氏菌、牛产肠毒素型大肠杆菌、牛副流感3型病毒、牛呼吸道合胞体病毒、牛病毒性腹泻病毒1型、牛轮状病毒、牛冠状病毒和牛传染性鼻气管炎病毒等均由华中农业大学农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室反刍动物疾病研究室

收稿日期: 2022-10-11

基金项目: 湖北省重点研发计划项目(2020BBA055); 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2021BEF02028); 国家现代农业(肉牛/牦牛)产业技术体系专项(CARS-37)

刘宁宁, E-mail: 673005224@qq.com

通信作者: 陈颖钰, E-mail: chenyingyu@mail.hzau.edu.cn

分离并保存。

lktC 重组质粒及溶血曼氏杆菌灭活疫苗由华中农业大学农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室反刍动物疾病研究室构建、制备并保存。

1.2 培养基和主要试剂

本研究所使用的LB/Amp培养基、LB/Amp平板培养基和TSB培养基均按说明书常规配制。主要试剂Bst 2.0 DNA Polymerase、MgSO₄、dNTPs购自Bio-Rad Laboratories;Eva Green20×染料购自Biotium;SYBR Green I染料、6×Loading buffer购自南京诺唯赞生物有限公司。

1.3 引物的设计与合成

依据溶血性曼氏杆菌*lktC*基因序列(GenBank登录号:CP017484.1)进行引物设计。包含2条内引物(FIP/BIP),2条外引物(F3/B3)和1条环引物(LB),引物信息如表1所示,引物由武汉擎科生物有限公司合成。

表1 本研究中所用引物信息
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
上游内部引物 Forward inner primer (FIP)	TTGTTGCAGCAGGGCAGGAGC-GACCAGTTAGATAACCATAGCG
下游内部引物 Backward inner primer (BIP)	AACCAGAGCGGTGGCCTCTA-AGGTGGTGTGTTACGACTG
F3引物 Forward 3 (F3)	CAATCGCATCCGGGCTAA
B3引物 Backward 3 (B3)	TCCGGTACGGTTCAGCAA
环状引物 Loop backward (LB)	CATCGTCTTCCGGCACAA

1.4 阳性对照的制备

1)含有*lktC*基因的重组质粒的制备。在pUC 57载体上插入*lktC*基因(GenBank登录号:CP017484.1)238 bp片段,构成*lktC*基因重组质粒。将含有*lktC*质粒的菌液在LB/Amp液体培养基中37℃、180 r/min培养12 h,用Omega D6943-02质粒小提试剂盒提取DNA作为阳性对照(提取步骤参照试剂盒说明书),-20℃保存备用。

2)溶血性曼氏杆菌DNA的制备。将溶血性曼氏杆菌接种于TSB培养基中,37℃、180 r/min培养6 h;依照参考文献[3]所述方法,挑取单菌落置于20 μL无菌水中,煮沸10 min后冰浴1 min,于10 000 r/min离心2 min后吸取上清作为阳性对照,-20℃保存备用。

1.5 可视化LAMP检测方法的建立

1)反应条件和反应体系的优化。本方法的初始反

应体系为10× Isothermal Amplification Buffer 2.5 μL、MgSO₄(100 mmol/L) 1.5 μL、dNTPs(10 mmol/L) 3.5 μL、LB(10 μmol/L)1.0 μL、FIP(10 μmol/L)4.0 μL、BIP(10 μmol/L)4.0 μL、F3(10 μmol/L)0.5 μL、B3(10 μmol/L)0.5 μL、Bst 2.0 DNA 聚合酶(8 000 U/mL)1 μL、DNA模板1 μL以及ddH₂O 5.5 μL。采用控制变量法对反应条件和反应体系进行优化,温度分别以60.6、62.5、65.0、67.0、和68.2℃进行反应;Mg²⁺浓度分别以0、2、4、6、8和10 mmol/L进行反应;dNTPs浓度分别以0.6、0.8、1.0、1.2、1.4和1.6 mmol/L进行反应;环引物分别以0、0.2、0.4、0.6、0.8和1.0 μmol/L进行反应,反应结束后Ct值越小说明反应速度越快。荧光定量PCR中Ct值最小的组对应的反应体系即为可视化LAMP的反应条件。

依据荧光定量PCR所确立的各项体系完成反应液的配制。随后在反应液上方滴加30 μL液体石蜡进行封闭,并在反应管管盖上滴加0.2 μL SYBR Green I染料。将反应管置于68.2℃恒温水浴锅中水浴40 min,反应结束后轻甩反应管,使染料与反应液充分混合,在自然光下观察颜色变化。如反应管中溶液由无色变为荧光绿色则判为阳性,由无色变为橙黄色则判为阴性。

2)特异性检测。采用本文“材料与方法1.1”所述的15种病原进行特异性检测。提取该15种病原的DNA作为模板,用最终优化后的反应体系分别对这15种病原进行检测,根据反应管中颜色的变化判断可视化LAMP的特异性。牛溶血性曼氏杆菌(A1、A2、A6型)菌株检测为阳性,其他病原检测为阴性即为特异性良好。

3)灵敏度检测。分别以 $7.9 \times 10^9 \sim 7.9 \times 10^{-1}$ copies/μL质粒DNA以及 $6.7 \times 10^5 \sim 6.7 \times 10^{-4}$ cfu/μL的细菌DNA为模板,双蒸水为阴性对照,进行基于*lktC*重组质粒检测的可视化LAMP和普通PCR的灵敏度分析,根据反应管中颜色的变化判断可视化LAMP能检测质粒和细菌DNA的灵敏度。检测出来的质粒拷贝数越低,或细菌菌量越低,则表明灵敏度越高。

1.6 可视化LAMP的实用性检测

对15只小鼠人工感染溶血性曼氏杆菌,7 d后剖杀取肺脏样本,作为实用性检测的阳性样本。另10只小鼠免疫溶血性曼氏杆菌灭活疫苗。各取5只分

别于免疫后7 d及21 d剖杀,另5只空白小鼠,均取肺组织作为实用性检测的阴性样本。分别剪取阴性和阳性小块肺组织,用TIANamp Genomic DNA Kit (DP304)试剂盒提取DNA,然后进行普通PCR和可视化LAMP检测对比实用性效果。

2 结果与分析

2.1 可视化LAMP检测方法的建立

1) 反应条件的优化。在25 μL 体系中,对温度、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、环引物浓度分别进行优化,

根据扩增曲线和Ct值进行判断最终优化条件。不同温度下的荧光扩增结果、不同 Mg^{2+} 浓度下的荧光扩增结果、不同浓度下的荧光扩增结果、不同环引物浓度下的荧光扩增结果分别如图1A~D所示,分别在扩增温度为68.2 $^{\circ}\text{C}$ 时、在 Mg^{2+} 浓度为6 mmol/L时、在dNTPs为1.6 mmol/L时、在环引物浓度为0.4 $\mu\text{mol/L}$ 时,Ct值最小,扩增效率最高,故选择68.2 $^{\circ}\text{C}$ 、6 mmol/L Mg^{2+} 浓度、1.6 mmol/L dNTPs 浓度、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 环引物浓度为可视化LAMP方法的优化条件。

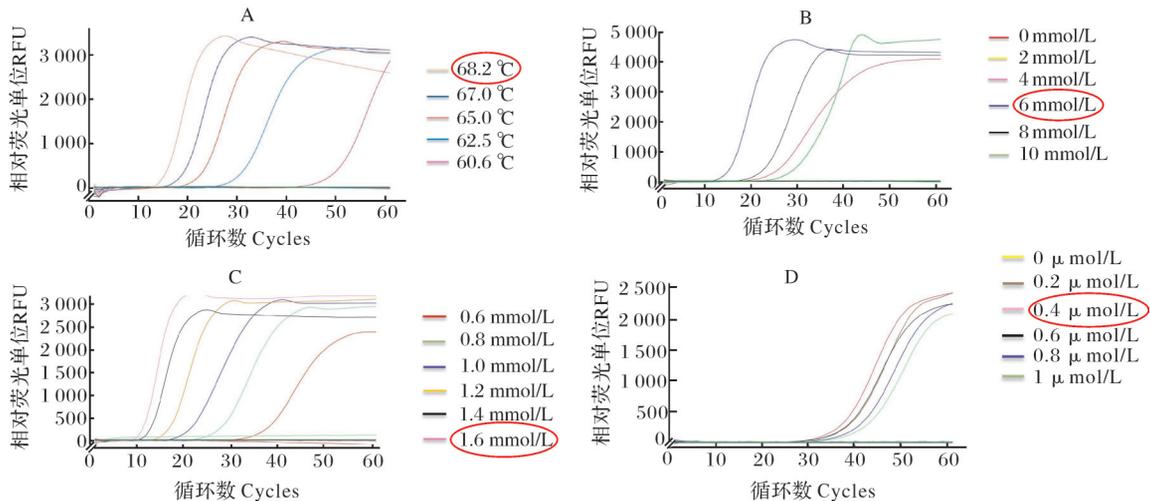


图1 可视化LAMP方法的温度(A), Mg^{2+} 浓度(B),dNTPs 浓度(C)和环引物浓度(D)优化

Fig.1 Temperature (A), Mg^{2+} concentration(B), dNTPs concentration(C) and loop primers concentration(D) optimization of visual LAMP

即优化后最适反应体系(25 μL)及条件为:2.5 μL 10 \times Isothermal Amplification Buffer、6 mmol/L MgSO_4 (1.5 μL 、100 mmol/L 的 MgSO_4)、1.6 mmol/L dNTPs (4.0 μL 、10 mmol/L 的dNTPs)、0.4 $\mu\text{mol/L}$ LB (1.0 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 的LB)、4.0 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的FIP、4.0 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的BIP、0.5 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的F3、0.5 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的B3、1 μL Bst 2.0 (8 000 U/mL)、1 μL 重组质粒或细菌模板、5 μL ddH₂O。

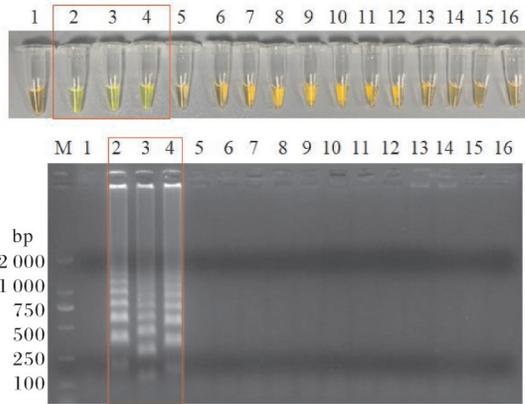
2) 特异性检测。用所建立的可视化LAMP方法对“材料与方法1.1”所述的15种病原进行检测,结果显示,仅溶血性曼氏杆菌A1、A2和A6所对应的2~4号反应管中出现可视化颜色变化,呈荧光绿色,判为阳性,其他病原所对应的反应管均为橙黄色,判定为阴性;在琼脂糖凝胶图像中,仅2~4泳道有典型的梯状条带。结果表明,所建立的可视化LAMP方法具有较高的特异性,且能够检测溶血性曼氏杆菌A1、A2和A6型,与其他病原不发生交叉反应(图2)。

3) 灵敏度检测。将制备的溶血性曼氏杆菌A6-ZMD菌液和*lktC*重组质粒分别以10倍稀释检测可视化LAMP的灵敏度,同时检测PCR方法的灵敏度用作对照。结果显示,所建立的可视化LAMP方法检测菌液的检测限为 6.7×10^{-1} CFU/ μL (图3),检测质粒的检测限为 7.9×10^2 copies/ μL (图4)。

普通PCR方法检测菌液的检测限为 6.7×10^0 CFU/ μL (图5),检测质粒的检测限为 7.9×10^3 copies/ μL (图6)。结果显示,所建立的可视化LAMP方法用以检测溶血性曼氏杆菌的菌液和质粒,其灵敏度均高于普通PCR方法。

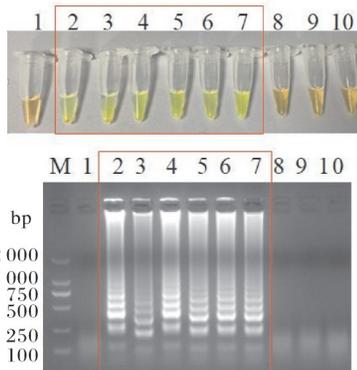
2.2 可视化LAMP的实用性检测

同时采用可视化LAMP和PCR方法对已知背景的小鼠肺组织进行检测。结果显示,2种方法均能够准确检测出15份阴性(图7),表明2种方法的特异性良好,均为100% (95% CI: 78.2%, 100.0%)。且可视化LAMP能够准确检测出所有的15份阳性,敏感性达到100% (95% CI: 78.2%, 100.0%),而普通



M: DL 2000 DNA marker; 1: 阴性对照; 2~4: 溶血性曼氏杆菌 A1 型、A2 型、A6 型; 5~7: 多杀性巴氏杆菌 A 型、B 型、F 型; 8: 牛支原体; 9: 鼠伤寒沙门氏菌; 10: 产肠毒素型大肠杆菌; 11: 副流感病毒 3 型; 12: 牛呼吸道合胞体病毒; 13: 牛病毒性腹泻病毒 1 型; 14: 牛轮状病毒; 15: 牛冠状病毒; 16: 牛传染性气管炎病毒。M: DL 2000 DNA marker; 1: Negative control; 2-4: *M. haemolytica* A1, A2 and A6; 5-7: *P. multocida* A, B and F; 8: *M. bovis*; 9: *Salmonella typhimurium*; 10: Enterotoxigenic *E. coli*; 11: BPIV-3; 12: BRSV; 13: BVDV-1; 14: BRV; 15: BCoV; 16: IBRV.

图2 可视化 LAMP 的特异性检测
Fig.2 Specificity of visual LAMP



M: DL 2000 DNA marker; 1: 阴性对照 Negative control; 2-10: $6.7 \times 10^4 - 6.7 \times 10^{-4}$ cfu/ μ L.

图3 可视化 LAMP 检测 A6-ZMD 菌液灵敏度

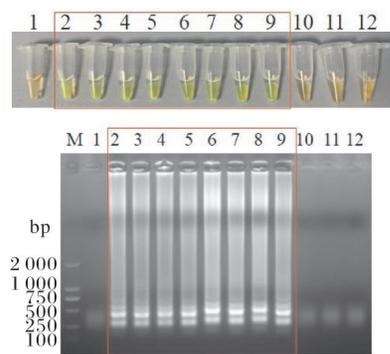
Fig.3 Sensitivity of visual LAMP to detect bacterium

PCR 仅能正确检出 10 份阳性, 敏感性为 66.7% (95% CI: 38.4%, 88.2%) (图 8), 2 种方法的检测敏感性差异显著 ($P < 0.05$)。

可视化 LAMP 相较普通 PCR 法, 敏感性和特异性均更高, 表明该方法用作溶血性曼氏杆菌更为准确, 在现场快速检测领域具有很好的应用前景。

3 讨论

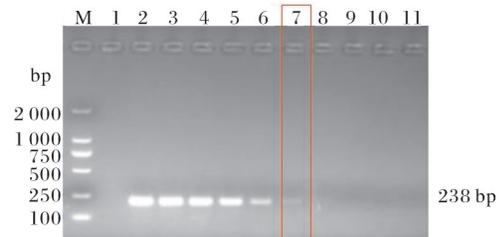
可视化 LAMP 通过添加染料观察颜色变化进行结果的判定, 目前常用的染料包括 SYBR Green I、



M: DL 2000 DNA marker; 1: 阴性对照 Negative control; 2-12: $7.9 \times 10^9 - 7.9 \times 10^{-1}$ copies/ μ L.

图4 可视化 LAMP 检测 lktC 质粒灵敏度

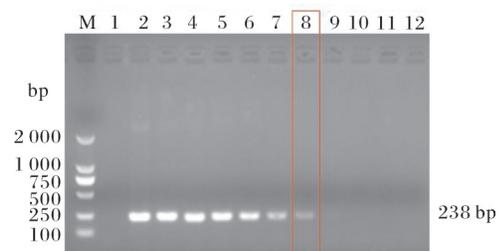
Fig.4 Sensitivity of visual LAMP to detect lktC plasmid



M: DL 2000 DNA marker; 1: 阴性对照 Negative control; 2-11: $6.7 \times 10^5 - 6.7 \times 10^{-4}$ cfu/ μ L.

图5 PCR 检测 A6-ZMD 菌液的灵敏度

Fig.5 Sensitivity of PCR to detect A6-ZMD bacterium



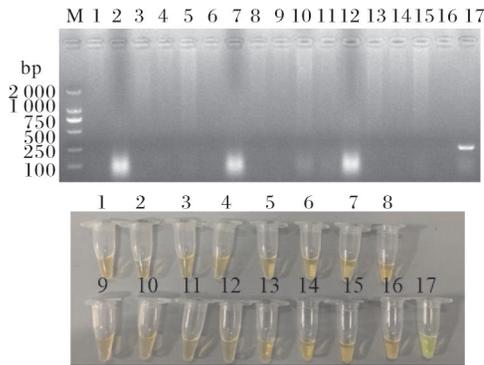
M: DL 2000 DNA marker; 1: 阴性对照 Negative control; 2-12: $7.9 \times 10^9 - 7.9 \times 10^{-1}$ copies/ μ L.

图6 PCR 检测 lktC 基因的灵敏度

Fig.6 Sensitivity of PCR to detect lktC

HNB 等。SYBR Green I 一般在反应结束后加入, 否则影响 LAMP 反应的效应^[10], 反应后阳性反应液颜色变为荧光绿, 在白色背景下观察效果明显, 而 HNB 与 *Bst* 聚合酶亲和力较好, 在反应前加入不影响反应速率, 发生阳性反应的溶液由紫色变为天蓝色^[11-12]。通过对不同可视化染料的对比, 本研究在普通 LAMP 方法的基础上添加 SYBR Green I 染料显色, 在反应前提前滴在反应管管盖上, 减少反应结束因开盖可能造成的污染, 有效提高了此方法的可行性, 使可视化 LAMP 更适合临床应用。

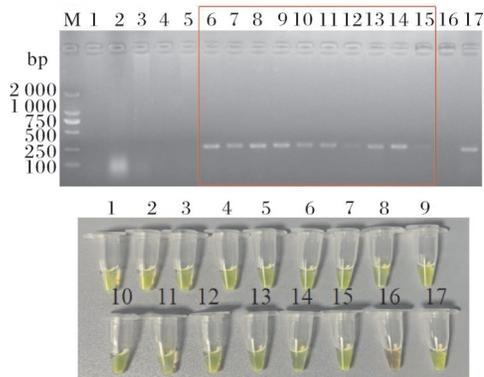
本研究建立的可视化 LAMP 方法检测溶血性曼



M: DL2000 DNA marker; 1~5: 不同正常小鼠的肺组织; 6~10: 免疫后 7 d 的不同小鼠肺组织; 11~15: 免疫后 21 d 的不同小鼠肺组织; 16: 阴性对照; 17: 阳性对照。M: DL2000 DNA marker; 1-5: Different lung tissues of normal mice; 6-10: Lung tissues of mice 7 d after immunization; 11-15: Lung tissues of mice 21 d after immunization; 16: Negative control; 17: Positive control.

图7 可视化 lktC-LAMP 方法和普通 PCR 方法检测阴性小鼠肺组织

Fig.7 Comparison of visual LAMP and PCR to detect negative mice tissues



M: DL2000 DNA marker; 1~5: 攻毒后未死亡的不同小鼠肺组织; 6~15: 攻毒后死亡的不同小鼠肺组织; 16: 阴性对照; 17: 阳性对照。M: DL2000 DNA marker; 1-5: Different lung tissues of mice that did not die after challenged; 6-15: Different lung tissues of dead mice after challenged; 16: Negative control; 17: Positive control.

图8 可视化 LAMP 方法和普通 PCR 方法检测阳性小鼠肺组织

Fig.8 Comparison of visual LAMP and PCR to detect positive mice tissues

氏杆菌 A6-ZMD 菌液的灵敏度下限为 6.7×10^{-1} cfu/ μ L, lktC 质粒的灵敏度检测限为 7.9×10^2 copies/ μ L, 相较于普通 PCR 检测菌液的灵敏度检测限 6.7×10^0 cfu/ μ L 和质粒灵敏度检测限 7.9×10^3 copies/ μ L 有显著的提高。有研究表明, 溶血性曼氏杆菌 gcp-LAMP 实时浊度法检测质粒的灵敏度为 0.855×10^{-4} ng/ μ L, 灵敏度大约是 gcp-LAMP 实时浊度法的 1 000 倍^[13]。另外, 在便捷性上, LAMP 方法

的反应时间 30~60 min, 而 PCR 方法需要 1~2 h, LAMP 方法耗时较短; PCR 方法需要专门的仪器设备, 仪器成本高、操作步骤繁琐等, 而 LAMP 方法需要的设备简易、操作简单, 可视化检测更是可肉眼直接观察试验结果, 大大提升了临床的应用价值。

参考文献 References

- [1] 谢倩茹, 姜鹏, 彭清洁, 等. 牛溶血性曼氏杆菌和多杀性巴氏杆菌 A 型、B 型的比较鉴定研究[J]. 中国奶牛, 2015(14): 48-54. XIE Q R, JIANG P, PENG Q J, et al. Study on comparative identification for cattle *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* type A and B strains[J]. China dairy cattle, 2015(14): 48-54 (in Chinese with English abstract).
- [2] NOYES N R, BENEDICT K M, GOW S P, et al. *Mannheimia haemolytica* in feedlot cattle: prevalence of recovery and associations with antimicrobial use, resistance, and health outcomes[J]. Journal of veterinary internal medicine, 2015, 29(2): 705-713.
- [3] 刘心, 彭清洁, 彭永崇, 等. 牛溶血曼氏杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(6): 1131-1135. LIU X, PENG Q J, PENG Y C, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Mannheimia haemolytica* in cattle[J]. Chinese journal of veterinary science, 2020, 40(6): 1131-1135 (in Chinese with English abstract).
- [4] KLIMA C L, ZAHEER R, BRIGGS R E, et al. A multiplex PCR assay for molecular capsular serotyping of *Mannheimia haemolytica* serotypes 1, 2, and 6[J]. Journal of microbiological methods, 2017, 139: 155-160.
- [5] 刘晓丹. 六种牛源致病性细菌多重 PCR 检测方法的建立[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013. LIU X D. Development of multiplex PCR for detection of pathogenic bacteria[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [6] 李富祥, 李华春, 洪琼花, 等. 溶血性曼氏杆菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(10): 1213-1218. LI F X, LI H C, HONG Q H, et al. Development and application of TaqMan real-time PCR assay for the detection of *Mannheimia haemolytica* [J]. Chinese veterinary science, 2016, 46(10): 1213-1218 (in Chinese with English abstract).
- [7] 许淑玉. 牛支原体、多杀性巴氏杆菌、溶血曼氏杆菌多重 PCR-ELISA 检测方法的建立及初步应用[D]. 长春: 吉林农业大学, 2018. XU S Y. Development and primary application of a multiplex PCR-ELISA for the identification of *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [8] 谢佳芮, 寇美玲, 苗海生. 环介导等温扩增技术的最新研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(2): 119-125. XIE J R, KOU M L, MIAO H S. Latest progress in research on loop-mediated isother-

- mal amplification[J]. Animal husbandry & veterinary medicine, 2021, 53(2): 119-125(in Chinese with English abstract).
- [9] 李占鸿,朱沛,宋子昂,等.蓝舌病毒群特异性 RT-LAMP 检测方法的建立与初步应用[J].畜牧兽医学报,2021,52(8): 2244-2253.LI Z H, ZHU P, SONG Z A, et al. Establishment and application of a group specific reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification method of bluetongue virus[J]. Acta veterinaria et zootechnica sinica, 2021, 52(8): 2244-2253(in Chinese with English abstract).
- [10] 白榕,白琳琳,汪少芸,等.LAMP扩增产物检测方法研究进展及基因编辑技术在其中的应用[J].农业生物技术学报,2021, 29(10): 2016-2030. BAI R, BAI L L, WANG S Y, et al. Research progress of LAMP amplicons detection method and the application of gene editing technology[J]. Journal of agricultural biotechnology, 2021, 29(10): 2016-2030(in Chinese with English abstract).
- [11] SINGH R, SINGH D P, SAVARGAONKAR D, et al. Evaluation of SYBR green I based visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for genus and species-specific diagnosis of malaria in *P. vivax* and *P. falciparum* endemic regions[J]. Journal of vector borne diseases, 2017, 54(1): 54-60.
- [12] ZHANG Y Q, SHAN X X, SHI L, et al. Development of a *fimY*-based loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Salmonella* in food[J]. Food research international, 2012, 45(2): 1011-1015.
- [13] 李军,吴翠兰,彭昊,等.一种快速检测溶血性曼氏杆菌的 LAMP 引物组及其应用:CN108660192A[P].2018-10-16.LI J, WU C L, PENG H, et al. LAMP (loop-mediated isothermal amplification) primer group for quickly detecting mannheimia haemolytica and application thereof:CN108660192A[P].2018-10-16(in Chinese).

Establishment of visual LAMP method for detecting *Mannheimia haemolytica* in cattle

LIU Ningning¹, YI Ping¹, GUO Aizhen^{1,2,3}, HU Changmin¹, CHEN Yingyu^{1,2}

1. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University/
State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China;

2. Hubei International Scientific and Technological Cooperation Base of Veterinary Epidemiology
(Huazhong Agricultural University), Wuhan 430070, China;

3. Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China

Abstract In order to establish a quick and efficient visual LAMP (loop-mediated isothermal amplification) molecular method for detecting *Mannheimia haemolytica* in cattle, specific software tool was used to design LAMP primers including inner primers, external primers and loop primers targeting *M. haemolytica* conservative gene *lktC*. The reaction temperature, Mg²⁺ concentration, dNTPs concentration and other conditions were optimized. Both bacteria and recombinant plasmids were used to evaluate sensitivity, and 15 related pathogens were used to evaluate specificity. The applicability was evaluated using mice lung tissue samples with clear background. The results showed that the developed LAMP assay achieved the best results under the conditions of 68.2 °C, 6 mmol/L Mg²⁺, 1.6 mmol/L dNTPs for 40 min and could be judged by naked eyes. The minimum detection limits were 6.7×10⁻¹ CFU/μL for bacteria and 7.9×10² copies/μL for *lktC* recombinant plasmid, and there was no cross reaction with 15 other pathogens, indicating high sensitivity and specificity. The results of lung tissue samples from mice with clear background showed that the method was better than ordinary PCR method. The above results indicate that this method was successfully constructed and could be used for rapid and efficient detection of *M. haemolytica* in cattle.

Keywords loop-mediated isothermal amplification; *lktC* gene; *Mannheimia haemolytica*; visualization detection; comprehensive prevention and control

(责任编辑:边书京)