

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00590

· 论 著 ·

利用环介导等温扩增技术检测西尼罗病毒

李淑华, 鹿文英, 曹广文*

第二军医大学基础部流行病学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 建立一种早期快速检测西尼罗病毒的方法。**方法** 以人工合成西尼罗病毒基因(1 021~1 240, NY99)作为模板, 利用环介导等温扩增技术(LAMP)原理, 设计合成3套6对引物, 特异性识别人工合成西尼罗病毒基因的8个位点, 在恒温63℃ 60 min条件下扩增, 80℃ 2 min终止反应, 通过real-time PCR仪实时监测反应过程, 最终产物经凝胶电泳观察。同时将该方法的灵敏度及特异性与常规PCR进行比较。**结果** LAMP反应在20 min内即可完成, 最终产物经电泳观察可见大小片段不等的呈梯度扩增条带, 而同为黄病毒属的登革热病毒、流行性乙型脑炎病毒及阴性对照等均无扩增。灵敏性是常规PCR的10倍, 可以检测到9.23 copies/ μ l的病毒。**结论** 该方法具有灵敏、特异、快速、简便、成本低等优点, 适合基层和现场检测使用, 对西尼罗病的早期诊断和流行病学筛查具有重要意义。

[关键词] 西尼罗病毒; 环介导等温扩增; 聚合酶链反应

[中图分类号] R 373.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)06-0590-05

Loop-mediated isothermal amplification in detection of West Nile virus genome

LI Shu-hua, LU Wen-ying, CAO Guang-wen*

Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To establish a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of the West Nile virus (WNV). **Methods** WNV genome (position nt 1 021 to nt 1 240) was synthesized by a PCR-based gene synthesis method. The synthetic fragments included 6 pairs of LAMP primer recognizing 8 primer sites of WNV genome. The LAMP gene amplification was carried out using a real-time PCR system at 63℃ for 60 min, then the amplification was terminated at 80℃ after 2 min. The amplification products were observed by agarose gel electrophoresis. The sensitivity and specificity of LAMP assay were compared with those of conventional PCR. **Results** The LAMP assay took less than 20 min, and the amplification product took on a ladder-like electrophoresis pattern. The sensitivity of LAMP assay was 10-fold higher than that of conventional PCR, and the detection limit of LAMP was 9.23 copies/ μ l. The specificity of WNV-specific LAMP assay was demonstrated by the negative amplification results from dengue virus and Japanese encephalitis virus, both were closely related members of the Flavivirus family. **Conclusion** LAMP assay is rapid, cost-effective, highly sensitive and specific in detecting genes of interest, and is of great significance for WNV surveillance, especially for grass root units and on-sport surveillance.

[Key words] West Nile virus; loop-mediated isothermal amplification; polymerase chain reaction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(6):590-594]

西尼罗病毒(West Nile virus, WNV)属黄病毒科(Flaviviridae)、黄病毒属(Flavivirus), 因1937年从乌干达西尼罗地区的一位女性发热患者体内被首次分离而得名, 与登革热病毒、日本脑炎病毒及黄热病病毒等属于同一病毒属, 均为虫媒病毒。西尼罗病毒感染是一种经蚊虫传播, 以鸟类为主要动物宿

主的自然疫源性疾。人被携带病毒的蚊虫叮咬后感染, 轻者出现发热、头痛等流感样症状(西尼罗热), 重者可引起中枢神经系统症状(西尼罗脑炎), 甚至死亡。该病毒以往仅在非洲、西亚、中东地区流行, 20世纪60年代初传入欧洲, 自1999年起在西半球登陆, 特别是美国自1999年发现首例患者以来,

[收稿日期] 2009-12-01 **[接受日期]** 2010-04-01

[基金项目] 第43批中国博士后科学基金(20080431367), 军队“十一五”科技攻关计划课题基金(06G65), 上海市自然科学基金(07ZR14141)。Supported by Post-doctoral Science Foundation of China(20080431367), General Logistics of the People's Liberation Army(06G65), and Natural Science Foundation of Shanghai(07ZR14141)。

[作者简介] 李淑华, 博士后。E-mail: hsl167@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871060, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

西尼罗脑炎已在美国连续流行, 发病人数逐年攀升, 截止 2003 年, 美国共有 9 800 人感染, 262 人死亡, 而 2005 年 1 月 1 日至 12 月 1 日期间, 美国共报告西尼罗病毒疾病 2 744 例, 与 2004 年同期的 2 359 例相比有所增加, 其中 1 165 例是西尼罗病毒性神经疾病(WNND)^[1], 10 年间已由美国的西半球迅速扩展到东半球^[2]。近年随着国际恐怖活动的加剧, WNV 亦引起美国军方的高度重视。迄今为止, 我国尚未发现 WNV 感染的临床病例, 但是我国的气候、地理环境复杂, 蚊虫种类繁多, 具备西尼罗病流行所需的生态学条件, 随着国际交流的日益频繁, WNV 传入我国境内的可能性非常大, 中国急需加强对西尼罗病的研究^[3]。由于目前针对西尼罗病尚无有效的治疗和预防措施, 开展 WNV 监测, 建立 WNV 快速检测方法, 对于 WNV 控制流行意义重大。

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术^[4-6]最早起源于日本, 其特点是针对靶基因的 6 个部位设定 3 对引物, 利用链置换反应在恒温下使靶基因高效扩增, 最终产物形成不同柄-环结构的 DNA 和不同相对分子质量的如菜花样的多环产物。该法具有特异性强、灵敏度高、快速且成本低等优点。本研究利用基因组合成技术合成西尼罗病毒的部分基因, 利用 LAMP 技术扩增目的基因, 以期为西尼罗病毒的快速检测提供新方法, 为突发传染病的预防提供技术储备。

1 材料和方法

1.1 西尼罗病毒基因组部分基因合成及病毒来源

参考 GenBank 中 WNV strain NY99(accession number: AF196835) 序列, 由上海生物工程研究所合成基因组 1 021~1 240 区域的 220 bp 序列, 克隆到载体 pUC57 上, 插入位点为 *Sma* I, 受体菌为大肠杆菌 DH5 α 菌株。提取纯化质粒 DNA, 紫外分光光度法定量, 制备阳性质粒 DNA 模板。登革热病毒株由广东省疾病预防控制中心馈赠, 流行性乙型脑炎(乙脑)病毒株由福建省疾病预防控制中心馈赠。

1.2 引物设计

LAMP 反应 3 对引物设计的模拟图如图 1A 所示。3 对引物分别为外引物 F3 和 B3; 内引物 FIP、BIP 和环引物 FLP、BLP, 其中 FIP 由 F1C+TTTT+F2 组成, BIP 由 B1C+TTTT+B2 组成。F1C、B1C 分别为 F1、B1 的互补序列。2 个环引物 FLP、BLP 分别为 F1 和 F1、B1 和 B2 之间的互补序列。鉴于以上原理按参考文献[7]方法合成

LAMP 反应引物, 各引物在扩增目的基因中的位置及合成序列如图 1B、1C 所示。引物合成由上海生物工程研究所完成。

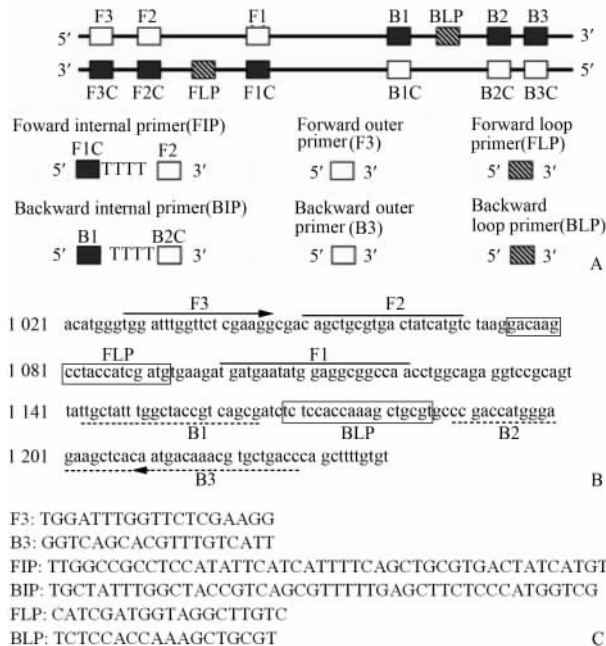


图 1 LAMP 引物设计原理

Fig 1 Primer design for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of synthetic West Nile virus genome

A: Diagram of LAMP primer design; B: Sequence of position 1 021 to 1 240 of West Nile virus genome; C: The primer sequence

1.3 PCR 反应

以插入目的基因序列的 pUC57 阳性质粒为模板, 以 F3、B3 为引物进行 PCR 扩增 201 bp 目的片段。反应体系: 阳性质粒模板 2 μ l, 上游引物 F3(10 μ mol/L) 和下游引物 B3(10 μ mol/L) 各 2 μ l, 10 mmol/L dNTP (Promega) 1 μ l, 10 \times Buffer 5 μ l, *Taq* 酶 1 μ l, 加 DEPC 处理水至总体积 50 μ l。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 2 min 预变性, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共计 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后取 10 μ l 上样于含 EB 染料的 3% 琼脂糖凝胶电泳观察。分别以不同稀释度的阳性质粒为模板按上述构建 PCR 反应, 检测反应的灵敏度。同时分别以登革热病毒、乙脑病毒的 cDNA 为模板, 按同样方法构建 PCR 反应, 观察引物特异性。

1.4 LAMP 反应

反应体系总计 25 μ l, 以插入目的基因序列的 pUC57 阳性质粒为模板, 反应体系组成: 1.0 μ l 50 μ mol/L FIP 和 1.0 μ l 50 μ mol/L BIP, 0.5 μ l 10 μ mol/L F3 和 0.5 μ l 10 μ mol/L B3, 1.0 μ l 25 μ mol/L FLP 和 1.0 μ l 25 μ mol/L BLP,

3.5 μl 10 mmol/L dNTP (Promega), 4 μl 5 mol/L betaine, 2.5 μl 10 \times Buffer [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mmol/L MgSO_4 , 0.1% Triton X-100], 6 μl 25 mmol/L MgSO_4 , 2 μl (8 U/ μl) *Bst* DNA polymerase (large fragment, New England Biolabs), 2 μl 模板质粒。恒温 63 $^\circ\text{C}$ 60 min, 80 $^\circ\text{C}$ 2 min 终止反应。取 10 μl LAMP 反应结果上样于含 EB 染料的 3% 琼脂糖凝胶电泳观察。分别以不同稀释度的阳性质粒为模板按上述构建反应, 检测 LAMP 反应的灵敏度。分别以登革热病毒、乙脑病毒的 cDNA 为模板, 按上述方法构建 LAMP 反应, 观察 LAMP 方法的特异性。

1.5 Real-time quantitative PCR 分别以不同稀释度的阳性质粒、登革热病毒、乙脑病毒的 cDNA 为模板, 以 F3、B3 为引物, 优化 real-time PCR 反应条件, 构建总体积为 20 μl 的反应体系, 包括 SYBR[®] Premix *Ex Taq*[™] (2 \times , TaKaRa) 10 μl , 上游引物 F3 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和下游引物 B3 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μl , 不同稀释浓度阳性质粒模板 2 μl , 水 7.2 μl 。置于 real-time PCR 仪 (LightCycler480, Roche), 95 $^\circ\text{C}$ 10 s, 然后 95 $^\circ\text{C}$ 5 s, 60 $^\circ\text{C}$ 20 s, 72 $^\circ\text{C}$ 10 s 共计 35 个循环, 观察荧光信号强度, 扩增结束后进行 60~95 $^\circ\text{C}$ 的熔解曲线分析。

1.6 Real-time LAMP 为了能实时监测 LAMP 反应, 同样以不同稀释度的阳性质粒及登革热病毒、乙脑病毒的 cDNA 为模板, 按上述方法构建 LAMP 反应体系, 同时向每个反应体系中分别加入 1 μl 20 \times SYBR Green I 荧光染料, 63 $^\circ\text{C}$ 60 min 置于 real-time PCR 仪中, 每 40 s 为 1 个循环, 观察荧光信号强度。扩增结束后进行 60~95 $^\circ\text{C}$ 的熔解曲线分析。

1.7 LAMP 反应的敏感性和特异性分析 为了观察 LAMP 反应的敏感性与特异性, 将上述构建的不同稀释度阳性质粒模板 LAMP 反应结果分别与 PCR 反应进行比较。

2 结果

2.1 阳性质粒模板制备 通过测序证实所合成基因的碱基序列完全与 GenBank 公布的基因序列一致。质粒提取纯化后, 经紫外分光光度计定量, 所制备阳性质粒 DNA 总量为 9.23×10^{10} copies/ μl 。按 10 倍比进行稀释, 获得 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 稀释度的阳性质粒 DNA 模板, 理论上推算各稀释度阳性质粒 DNA 模板浓度为 $(9.23 \times 10^0 \sim 9.23 \times 10^9)$ copies/ μl 。

2.2 PCR 结果 以阳性质粒为模板, 以 F3、B3 为引物进行 PCR 扩增, 结果经 EB 染色的 3% 琼脂糖凝胶电泳观察可见 201 bp 目的片段 (图 2)。敏感性检测结果表明 PCR 反应可检测至 10^{-9} 稀释度的质粒 DNA 模板, 即 9.23×10^1 copies/ μl 样品。登革热病毒、乙脑病毒未见扩增 (图 3B)。

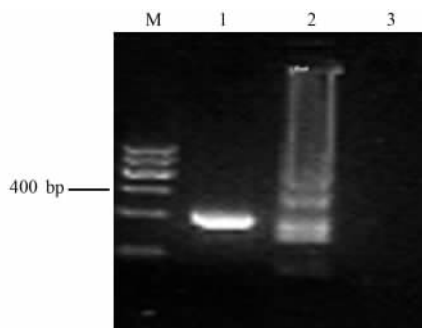


图 2 西尼罗病毒基因片段凝胶电泳

Fig 2 Agarose gel electrophoresis of WNV gene fragments M: Marker; 1: PCR product WNV positive plasmid (201 bp); 2: LAMP product with WNV positive plasmid (ladder DNA); 3: LAMP without target

2.3 LAMP 反应结果 图 2 可见, 电泳带中可见片段大小不等的 DNA 条带, 这些条带是 LAMP 反应中所特有, 由 6 条引物共同作用扩增生成的不同柄-环结构的 DNA 组成。敏感性检测可检测至 10^{-10} 稀释度的质粒 DNA 模板, 即 9.23×10^0 copies/ μl 样品, 登革热病毒、乙脑病毒未见扩增 (图 3A)。

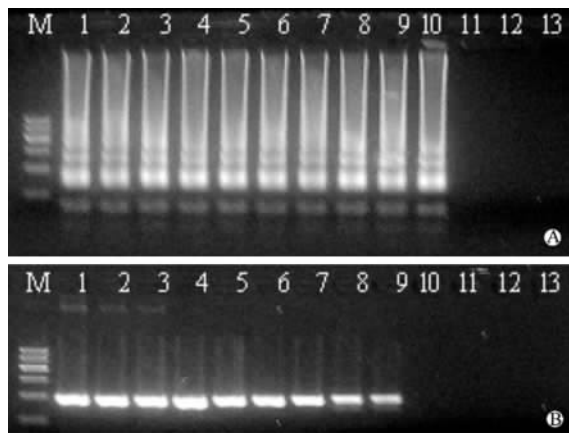


图 3 PCR 与 LAMP 敏感性比较

Fig 3 Sensitivity comparison of LAMP and PCR in detecting WNV positive plasmid

The amplification by LAMP (A) shows a ladder-like pattern, whereas that by RT-PCR (B) shows a 201 bp amplification product. M: Marker; 1-10: $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}$; 11: Negative control without target DNA; 12: JEV control; 13: Dengue control. JEV: Japanese encephalitis virus

2.4 Real-time 检测 F3、B3 为引物的 real-time PCR 检测结果表明,不同拷贝数样品在反应开始 5 个循环后,均可见阳性扩增的 S 形扩增曲线。35 个循环内基本完成扩增,各拐点的 Ct 值与模板的起始浓度成正比,可检测至 10^{-6} 稀释度的阳性质粒。阴性对照、乙脑病毒及登革热病毒未见阳性荧光曲线(图 4A)。熔解曲线分析表明 WNV 阳性模板的特异熔解曲线峰位于 $83\sim 87^{\circ}\text{C}$,没有非特异扩增,而阴性对照、乙脑病毒及登革热病毒的熔解曲线是一条低平无峰曲线(图 4B)。

不同拷贝数样品的 real-time LAMP 检测结果表明,在反应开始约 5 个循环后均见到阳性扩增曲线,浓度最低的样品也在 30 个循环后基本完成扩

增,可检测至 10^{-7} 稀释度的阳性质粒。阴性对照、乙脑病毒及登革热病毒均未见到阳性扩增曲线(图 5A),熔解曲线表明 WNV 阳性模板的特异熔解曲线峰位于 $80\sim 85^{\circ}\text{C}$,阴性对照、乙脑病毒及登革热病毒的熔解曲线是一条低平无峰曲线见(图 5B)。反应结束后将反应体系各取 $10\ \mu\text{l}$ 进行电泳观察,可见与图 4 相一致的电泳结果。

2.5 LAMP 反应的敏感性和特异性分析 LAMP 反应敏感性检测表明,可检测至 10^{-10} 稀释度即 $9.23\times 10^0\ \text{copies}/\mu\text{l}$ 样品,与 PCR 相比,敏感性提高 10 倍。特异性结果表明,LAMP 反应与 PCR 相比具有较好的特异性,阴性对照、乙脑病毒及登革热病毒未见扩增条带。

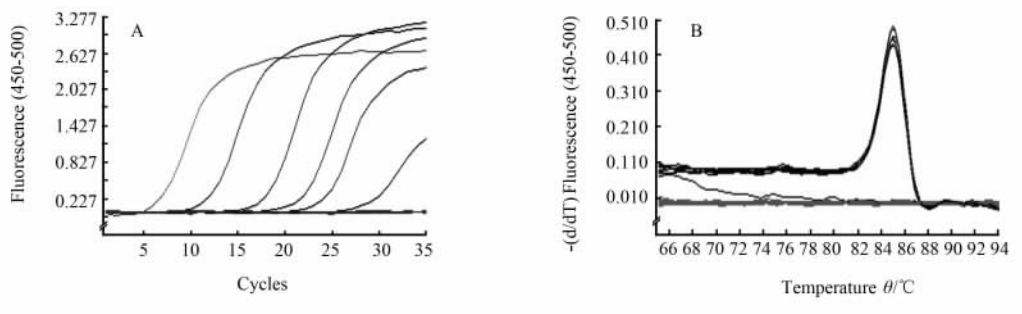


图 4 西尼罗病毒合成质粒模板 real-time PCR 反应结果

Fig 4 Real-time PCR results of WNV

A: Amplification plot based on real-time PCR assay in testing a series of diluted DNA positive standard plasmid ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$); B: The high resolution melting curve obtained based on real-time PCR assay

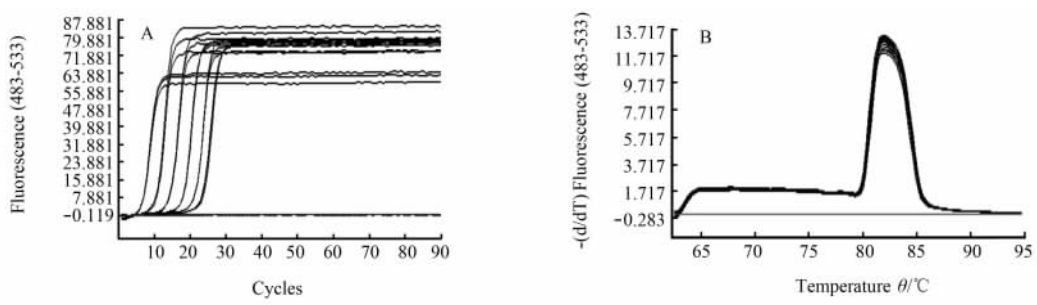


图 5 西尼罗病毒合成质粒模板 real-time LAMP 反应结果

Fig 5 Real-time LAMP results of WNV

A: Amplification plot based on real-time LAMP assay in testing of a series of diluted DNA positive standard plasmid ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$); B: The high resolution melting curve based on real-time LAMP assay

3 讨论

目前,对西尼罗病毒的检测方法主要有 RT-PCR、SYBR Green RT-PCR^[8]、TaqMan real-time PCR^[9]、NASBA (nucleic acid sequence-based amplification)^[10]等核酸检测及病毒分离、血清学分析

等。这些方法虽然较成熟,但耗时较长,不能在短时间内进行快速检测和大范围筛查;另外所需仪器设备装备精良,更不适合在基层和现场使用,使 WNV 的早期检测受到了影响^[11]。

本研究利用 LAMP 反应的原理,恒温条件下, 63°C 60 min,对西尼罗病毒的合成目的基因进行扩

增,结果可见呈梯度的大小不等的阳性电泳带,检测敏感性可达 9.23×10^0 copies/ μ l,是常规 PCR 方法的 10 倍。特异性检测结果表明,同属的登革热病毒、乙脑病毒及阴性对照均未见扩增,证实了我们建立的 LAMP 方法具有较好的特异性。

为了更好地监测 LAMP 整个反应过程中 DNA 扩增情况,我们采用 SYBR Green I 荧光 PCR 技术,对 LAMP 反应体系进行实时监测,同时与 real-time 荧光 PCR 反应进行比较,结果表明 LAMP 反应具有以下特点:(1)LAMP 反应 DNA 扩增曲线与荧光 PCR 扩增曲线的扩增趋势没有不同,也分为起始期、扩增期和平台期,曲线呈 S 形,Ct 值与起始模板量成正比。(2)LAMP 反应所用时间短,30 个循环内约 20 min 即可完成扩增。(3)检测敏感性是 real-time 荧光 PCR 的 10 倍。(4)2 种方法中,乙脑病毒、登革热病毒及阴性对照均未见扩增曲线;熔解曲线分析均未见非特异扩增,说明反应体系具有良好的特异性。(5)LAMP 方法的熔解曲线峰较荧光 PCR 方法略低 2~3℃,虽然都是扩增 201 bp 的目的基因,但由于反应的原理和使用的引物不同,生成的产物也不同,LAMP 反应生成不同柄-环结构的 DNA 和不同相对分子质量的如菜花样的多环产物,这可能是影响熔解曲线温度差异的原因。(6)与 PCR 相比,LAMP 反应在恒温水浴箱内便可完成,不需要装备精良的实验室,因此实验成本低、操作方便。

本实验为西尼罗病的早期诊断提供了一种新方法。该方法具有敏感、特异、快速简便、成本低等特点,尤其是在实验室条件较差的基层及现场更具有较高的应用价值,值得推广应用。该方法的建立对于西尼罗病毒的早期快筛检、病源追踪及控制传播流行等方面具有重要的意义。

[参考文献]

- [1] Soverow J E, Wellenius G A, Fisman D N, Mittleman M A. Infectious disease in a warming world: how weather influenced West Nile virus in the United States (2001-2005)[J]. *Environ Health Perspect*, 2009, 117: 1049-1052.
- [2] Gardner C. West Nile virus 2009: from emerging to endemic in 10 short years[J]. *MLO Med Lab Obs*, 2009, 41: 16-17.
- [3] 梁国栋. 中国急需加强对西尼罗病的研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2006, 20: 285-286.
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: e63.
- [5] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16: 223-229.
- [6] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289: 150-154.
- [7] Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of west nile virus[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 257-263.
- [8] Papin J F, Vahrson W, Dittmer D P. SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile virus circumvents false negative results due to strain variability[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 1511-1518.
- [9] Lanciotti R S, Kerst A J, Nasci R S, Godsey M S, Mitchell C J, Savage H M, et al. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 4066-4071.
- [10] Lanciotti R S, Kerst A J. Nucleic acid sequence based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 4506-4513.
- [11] 佟颖, 曾晓, 刘婷, 肖萧, 朱俊伟, Tucker B. 两种快速检测西尼罗病毒方法的研究[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2006, 17: 307-309.

[本文编辑] 尹茶