

环介导等温扩增技术的临床应用进展^{*}

汤 潜¹综述, 刘晓斐², 胡成进^{2△} 审核

(1. 辽宁医学院, 辽宁锦州 121001; 2. 济南军区总医院实验诊断科, 山东济南 250031)

关键词: 环介导等温扩增技术; 实验室技术和方法; 综述**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.046**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2013)07-0856-02

环介导等温扩增技术(LAMP)是由日本荣研株式会社的纳富继宣博士带领团队建立的,其基本原理是在具有置换活性的 DNA 聚合酶作用下,利用特别设计的 4 段引物识别靶基因的 6 个区域,以达到对目的基因的高效、特异复制的目的^[1]。传统 PCR 反应需要经过反复热变性从而获得单链模板,而 LAMP 大大节省了反复升降温的时间,实现对核酸的恒温扩增。其结果可以根据反应的副产物白色沉淀焦磷酸镁来判断是否发生扩增,也可以在反应管中加入荧光染料,反应后观察是否变色来进行鉴别^[2]。该检测技术较常规 PCR 和 RT-PCR 来说不需要昂贵的设施,特殊的实验室环境和经过专业培训的技术人员^[3]。该方法操作简便,耗时少,且特异性好、灵敏度高。因而 LAMP 技术在临床得到越来越广泛地应用。

1 感染性疾病的诊断

感染性疾病多由病原微生物引起,快速、准确的检测病原体,对于疾病的治疗与预后十分关键。传统病原微生物的分离、培养、鉴定往往操作程序繁琐,等待结果时间较长,个别致病菌受培养条件的限制不易检出。环介导等温扩增技术的出现解决了以上问题,并广泛应用于检测各种病原体^[4-8]。沈会平等^[9]利用环介导等温扩增技术建立了一种快速准确检测结核分枝杆菌的方法。通过对 100 例疑似结核患者的痰样本的检测方法比对,发现该方法特异性强,仅扩增结核分枝杆菌复合群核酸,并且灵敏度大大高于普通的镜检法(约 11%)。解决了镜检法灵敏度低、培养法耗时长等问题。聂凯等^[10]利用 RT-LAMP 应用于人甲型 H1N1 流感病毒基因检测。结果显示 RT-LAMP 方法特异性高,临床标本的检出率与常规 RT-PCR 法一致。因此基于颜色判定的环介导逆转录等温扩增方法可用于人甲型 H1N1 流感病毒感染的快速筛查,具有在基层疾病预防控制中心流感监测实验室和哨点医院广泛应用的潜力。

2 人类白细胞抗原基因分型

很多致命性的药物过敏,特别是抗癫痫类药物引起的药物过敏是需要引起重视的。最近有证据表明药物副作用的发生率和人类白细胞抗原(HLA)等位基因型有密切关系^[11]。为了提高用药安全性,美国食药监管局和英国药管局共同推荐 HLA-B*1502 作为治疗癫痫类药物(卡马西平)使用前的筛查项目。Cheng 等^[12]利用环介导等温扩增技术鉴定 HLA-B*1502,取得了良好的效果。分别用 LAMP、基底序列(SBT)和 PCR 的方法检测 450 例样本(其中 DNA 样本 50 例,血液样本 400 例)的 B*1502 状态。最终 LAMP 与 SBT 和 PCR 符合率为 100%。研究证实,LAMP 可以用于检测 HLA 基因分型,且成本低、时间短,能够有效解决临床实际困难。

3 肿瘤鉴定

现行肿瘤切除术中的冰冻切片及常规病理检测方法报告

时间长,这对尚在手术台上的患者是极其不利的。因此,建立淋巴结转移灶的快速准确的鉴定方法是亟待解决的问题。Osako 等^[13]利用 RT-LAMP 的原理设计了针对乳腺癌患者淋巴瘤中细胞角蛋白 19 片段(CK-19 mRNA)的一步核酸扩增法(OSNA),来检测乳腺癌前哨淋巴结(SLN)的转移灶。比较 OSNA 法诊断和病理冰冻切片诊断转移灶的阳性率,发现诊断大转移灶的两种方法无差异,但对于绝经或停经患者的转移灶和原有发瘤少量浸润的转移灶,OSNA 法则更具有优势。Csérni^[14]经过研究认为,检测术中淋巴结转移灶 OSNA 法的假阳性率和假阴性率均较低,与常规方法的不符合可能是因为微小转移灶取材部位不同而造成的,认为该方法用时短更能满足外科手术的需要。

4 多重检测

LAMP 技术往往一次仅能检测一种细菌,近来 Huy 等^[15]学者针对脑膜炎的 4 种致病菌金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、猪链球菌、无乳链球菌的保守 16S rRNA 设计引物,观察扩增结果。如果为阴性,可一下排除四种致病菌。若为阳性,再利用限制性内切酶 Dde I 和 Hae III 降解 LAMP 产物后进行电泳,通过片段大小不同来确定是四种细菌中的哪一种或哪几种。该反应保持了 LAMP 的优良特性,敏感性高,特异性强。且经实验证实与脑膜炎其他常见菌如脑膜炎奈瑟菌、大肠杆菌、流感嗜血杆菌等无交叉反应。该实验可以有效排除及鉴定脑膜炎感染细菌,大大提高了检测效率,同时也为利用 LAMP 技术检测多种病原体拓宽了思路。

5 联合其他技术

为了更好地满足临床的需要,研究人员将 LAMP 与其他技术相结合。Fang 等^[16]在 2010 年将 LAMP 技术和微孔道芯片整合,判定结果既可通过肉眼观察浊度也可通过光纤传感器检测吸光度。该实验利用集成芯片内的光导纤维,可直接对 LAMP 扩增产物进行吸光度测定,达到对靶基因实时定量的目的。实验组人员利用该技术成功检测了假性狂犬病病毒,并认为该技术可成为随时随地进行 DNA 定量的检测手段。2011 年 Wang 等^[17]将磁珠芯片与 LAMP 整合,在 1 h 内成功检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。该技术将 DNA 的抽提与靶基因的扩增建立在一块基于小磁珠的微孔芯片上。扩增其原理是经 95 °C 高温使 MRSA 释放 DNA,特殊标记的磁珠探针便与 MRSA 的 DNA 杂交。利用小磁珠净化和收集 MRSA 的 DNA 之后进行恒等温扩增,再用分光光度计测定 LAMP 产物的 OD 值。该方法灵敏度高,从样本预处理到结果判读均为自动化。这种微小设备的检测试验可能成为病原体床旁检测的最有力工具。2012 年 Prakrankamanant 等^[18]在石英晶体微平衡仪(QCM)中进行恒等温扩增,QCM 能够实时检

^{*} 基金项目:全军“十二五”重点基金资助项目(BWS12J014)。

作者简介:汤潜,女,在读研究生,主要从事分子生物与快速诊断研究。

[△] 通讯作者,E-mail:hcj6289@163.com。

测结合在其金电极表面的 LAMP 产物。该试验较常规 LAMP 灵敏度更高,耗时更少,并利用该技术成功测定 HPV-58。

6 展 望

环介导等温扩增技术,具有成本低、对样品处理要求低、对仪器和人员要求不高,灵敏、特异、快速、结果直观的优点^[19]。尽管 LAMP 的优势已被研究领域广泛接受,但仍认为该技术还有待完善的地方。

LAMP 引物设计过程是比较繁琐的^[20]。且 LAMP 实验中的关键步骤便是引物设计^[21]。即便有引物设计在线软件,对引物的筛选仍然是繁琐的工作。查磊等^[22]设计了一个用于环介导等温扩增的引物设计软件——BioSunLAMP,为 LAMP 技术的普及提供了更好的生物信息学支持。相信随着技术的进步,引物设计软件会进一步升级。

无论何种实验必须有可靠的质量控制。做好 LAMP 质量控制工作,可有效提高 LAMP 的准确度、可信度。应建立起 LAMP 分析前、分析中、分析后的质量控制工作。操作试验时,未使用的试剂用密封带仔细包裹,妥善置于-20℃冰箱。实验后用过的枪头、手套等要妥善处理,不可以随处丢弃^[23]。每次实验设定阴阳性对照,阴性对照一般添加去离子水,而阳性对照最好为非实验靶基因和引物组合,以免操作时对测定管污染。一旦出现污染,应立即停止实验,每天给实验室通风,超净台紫外灭菌并通风,一段时间后更换试剂再次实验^[24]。随着实验技术的完善,LAMP 室间质评和室内质评将建立起来,以便及时发现问题,找到问题的原因,解决问题,这样才能提供可靠的实验结果。

现已有 LAMP 试剂盒投放市场,部分试剂盒国产化,大大降低了实验成本。随着环介导等温扩增技术的继续推广,更多测定项目的试剂盒将被研发使用,仪器设备更加简洁。例如,Hatano 等^[25]研究者发明了不依赖于电的袖珍加热装置,只要将试验管保存于泡沫聚苯乙烯容器中,不论在 4℃还是 37℃的环境中均能有效扩增,其最低检测限与传统 LAMP 没有区别,且便于携带。相信环介导等温扩增技术不但会更适合于临床和基层,而且也逐渐会成为核酸研究的一种重要手段^[26]。

参考文献

- [1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12):63-69.
- [2] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(1):150-154.
- [3] Fu S, Qu G, Guo S, et al. Applications of Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 163(7):845-850.
- [4] 宋榴艳,陈守义. 环介导等温扩增技术研究进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(12):3550-3552.
- [5] 夏伟,李鹏. LAMP 技术诊断猪支原体肺炎的应用研究[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2012, 24(4):21-24.
- [6] 龚甜,熊英. LAMP 技术及在人类病毒性传染病检测中的应用[J]. *现代预防医学*, 2012(39):1204-1206.
- [7] 韩甦,张晓丽,凌虹,等. 环介导等温扩增技术在寄生虫检测中的应用研究[J]. *热带医学杂志*, 2011, 11(7):851-853.
- [8] Inácio J, Flores O, Spencer-Martins I. Efficient identification of clinically relevant *Candida* yeast species by use of an assay combining panfungal loop-mediated isothermal DNA amplification with

- hybridization to species-specific oligonucleotide probes[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(2):713-720.
- [9] 沈会平,张耀祺,杨坚,等. 环介导等温扩增技术快速检测结核分枝杆菌核酸[J]. *临床检验杂志*, 2011, 29(8):378-380.
- [10] 聂凯,王大燕,秦萌,等. 基于颜色判定的环介导逆转录等温扩增技术检测人甲型 H1N1 流感病毒基因[J]. *病毒学报*, 2010, 26(2):81-87.
- [11] Chung WH, Hung SI, Chen YT. Human leukocyte antigens and drug hypersensitivity[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2007, 7(4):317-323.
- [12] Cheng SH, Kwan P, Ng HK, et al. New testing approach in HLA genotyping helps overcome barriers in effective clinical practice[J]. *Clin Chem*, 2009, 55(8):1568-1572.
- [13] Osako T, Iwase T, Kimura K, et al. Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer: a comparative analysis between one-step nucleic acid amplification whole node assay and routine frozen section histology[J]. *Cancer*, 2011, 117(19):4365-4374.
- [14] Cserni G. Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one-step nucleic acid amplification[J]. *J Clin Pathol*, 2012, 65(3):193-199.
- [15] Huy NT, Hang le TT, Boamah D, et al. Development of a single-tube loop-mediated isothermal amplification assay for detection of four pathogens of bacterial meningitis[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 337(1):25-30.
- [16] Fang X, Liu Y, Kong J, et al. Loop-mediated isothermal amplification integrated on microfluidic chips for point-of-care quantitative detection of pathogens[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(7):3002-3006.
- [17] Wang CH, Lien KY, Wu JJ, et al. A magnetic bead-based assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a microfluidic system with integrated loop-mediated isothermal amplification[J]. *Lab Chip*, 2011, 11(8):1521-1531.
- [18] Prakrankamanant P, Leelayuwat C, Promptmas C, et al. The development of DNA-based quartz crystal microbalance integrated with isothermal DNA amplification system for human papilloma-virus type 58 detection[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 40(1):252-257.
- [19] 贺尔娜,蔡挺,张顺. 环介导等温扩增技术在致病菌检测中的应用[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(7):739-744.
- [20] 刘宝山. 环介导等温扩增技术的改进和发展[J]. *畜牧与兽医*, 2009(7):98-100.
- [21] Kimura Y, de Hoon MJ, Aoki S, et al. Optimization of turn-back primers in isothermal amplification[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(9):e59.
- [22] 查磊,蔡欣,应晓敏,等. BioSunLAMP:一个用于环介导等温扩增的引物设计软件[J]. *军事医学*, 2012, 36(3):230-233.
- [23] 路超,王长印,董振芳,等. 环介导等温扩增技术的应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(2):138-144.
- [24] 马艳平,刘振兴,郝乐,等. 环介导等温扩增技术的研究进展[J]. *河北科技师范学院学报*, 2011, 25(1):77-80.
- [25] Hatano B, Maki T, Obara T, et al. LAMP using a disposable pocket warmer for anthrax detection, a highly mobile and reliable method for anti-bioterrorism[J]. *Jpn J Infect Dis*, 2010, 63(1):36-40.
- [26] 唐海丰,熊鹿言,李勇,等. 环介导等温扩增技术在疾控机构微生物检测中的应用[J]. *海南医学*, 2012, 23(1):103-109.

(收稿日期:2012-11-07)