·综　　述·

环介导等温扩增技术用于疱疹病毒和黄病毒等检测的研究现状*

李文桂△ 综述

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所,重庆 400016)

关键词:环介导等温扩增技术;　疱疹病毒;　黄病毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.045　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1673-4130(2013)22-3040-03

疱疹病毒和黄病毒是多种病毒性疾病的病原体。2000 年,日本科学家 Notomi 等[1]首先提出了环介导等温扩增技术(LAMP),利用一种具有链置换反应的 DNA 聚合酶和 2 对特殊引物,对靶序列上的 6 个特异序列进行特异扩增,在 65 ℃的等温条件下反应 1 h 即可将靶序列 DNA 扩增 10^9～10^{10} 倍,产生肉眼可见的白色焦磷酸镁沉淀,具有敏感性高、特异性强、简便、快速和结果易于鉴定等优点。随后,国内外学者迅速开展了 LAMP 技术检测疱疹病毒和黄病毒等的研究,本文拟就这方面的进展进行综述。

1　LAMP 技术原理

1.1　引物设计　Notomi 等[1]选择 1 段 200 bp 左右的靶基因保守区域,针对该区的 6 个特异序列(3′端的 F3C、F2C 和 F1C 以及 5′端的 B1、B2 和 B3 区)设计 4 条引物,即上游内部引物(FIP)、下游内部引物(BIP)、上游外部引物(F3)和下游外部引物(B3)。引物设计时要保持引物的退火温度为 55～65 ℃,F2 与 B2 之间相距 120～180 bp,F2 与 F3 以及 B2 与 B3 之间相距 0～20 bp,F2 与 F1 以及 B2 与 B1 之间相距 40～60 bp,从而避免引物之间形成二级结构。其中 FIP 包含 F1C-F2,它利用 F1C 与 F1 互补自动成环进行正向扩增,BIP 包含 B1C-B2,它利用 B1C 与 B1 互补自动成环进行反向扩增。F3 和 B3 在 Bst DNA 聚合酶的作用下可分别置换 F1C-F2 引导合成的正向链以及 B1C-B2 引导合成的反向链。Bst DNA 聚合酶在 60～65 ℃时具有解旋功能和瀑布式扩增功能,在等温条件下即可实现核酸扩增。为了提高扩增效率,Nagamine 等[2]在 F1C 和 F2 之间增加了上游环状引物(FLP),在 B1C 和 B2 之间增加了下游环状引物(BLP)。FLP 和 BLP 既可与内引物杂交,也可与茎环杂交,从而加快反应速度,缩短反应时间,在 30～45 min 即可实现目的基因的扩增。

1.2　模板　Nagamine 等[3]发现变性或非变性的 DNA 模板均可介导良好的 LAMP 反应,提示 LAMP 反应可不需要变性的 DNA 作为模板;进一步研究表明变性 DNA 的扩增效率比非变性 DNA 高出 10～100 倍,表明用变性 DNA 进行 LAMP 反应的敏感性要高于非变性 DNA。RNA 通过逆转录合成 cDNA,该 cDNA 也可作为 LAMP 的模板,因而可将逆转录与 LAMP 结合起来进行 RT-LAMP 反应。

1.3　反应过程　LAMP 反应过程包括哑铃状模板合成阶段、循环扩增阶段以及伸长和再循环 3 个阶段。首先由外部引物扩增出内部引物扩增所需的模板,然后由内部引物引导合成靶基因 DNA 片段。由于内部引物扩增的 DNA 片段含有与该引物 5′端 DNA 片段的反向互补序列,因而这些反向互补序列之间通过杂交形成茎环结构,另外一条内部引物与其互补链退火杂交后引导链置换合成反应,在扩增的 DNA 片段的另一端产生了新的茎环结构,形成哑铃结构。其次在 LAMP 循环扩增阶段,这种哑铃状结构的 DNA 为循环反应提供原料,哑铃结构的 DNA 通过自我引导延伸,生成双链茎环结构,该结构为循环反应的起始结构。最后在延伸和再循环阶段,由于内引物杂交在茎环的环上,引物链置换合成的 DNA 产生一个有缺口的茎环 DNA 中间媒介,在茎上附有目标序列,在茎的末端通过外引物形成环状结构。由于内引物引导链置换延伸反应,茎环个数逐渐增加,最后扩增产物是一系列反向重复的靶序列构成的茎环结构和多环花椰菜结构的 DNA 片段混合物。

1.4　产物检测

1.4.1　琼脂糖凝胶电泳　LAMP 产物是不同 DNA 片段的混合物,琼脂糖凝胶电泳后呈现特异的梯状条带,经限制性内切酶酶切后可出现单一的靶序列条带。

1.4.2　浊度检测　Mori 等[4-5]发现 LAMP 反应在合成 DNA 时,从 dNTP 析出的焦磷酸根离子($P_2O_7^{-4}$)可与反应液中的 Mg^{2+} 结合,产生大量白色的焦磷酸镁沉淀,该沉淀具有高度的特异性,扩增完成后肉眼观察反应管底的白色沉淀即可判断是否扩增。当模板 DNA 为 2×10^3 copy(0.01 pg/tube)至 2×10^9 copy(0.01 ng/tube)时,浊度与合成的 DNA 呈线性关系,可达到对合成的 DNA 进行实时定量检测的目的。

1.4.3　荧光检测　可加用 SYBR GreenⅠ、钙黄绿素和羟基萘酚蓝(HNB)等试剂进行检测。SYBR GreenⅠ是一种荧光染料,它与 DNA 结合后,颜色由橘黄色变为绿色,肉眼即可观察。钙黄绿素是一种螯合剂,可与试剂中的 Mn^{2+} 结合处于淬灭状态。当 LAMP 反应的副产物 $P_2O_7^{-4}$ 与 Mn^{2+} 结合后可使钙黄绿素释放,使其淬灭状态解除,从而发出黄绿色荧光,肉眼即可观察。羟基萘酚蓝(HNB)是一种 Mg^{2+} 指示剂,由于 LAMP 反应的副产物 $P_2O_7^{-4}$ 与 Mg^{2+} 形成大量焦磷酸镁沉淀,大量消耗 Mg^{2+},因而反应结束后颜色发生变化,颜色显为蓝色的为阳性反应,而颜色显为紫色的为阴性反应。由于 HNB 是反应前加入,反应结束后无需开盖,可大大减少反应后的交叉污染。

2　疱疹病毒 LAMP 检测

2.1　单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2)　HSV-2 是生殖器疱疹和新生儿疱疹的主要病原体。Kaneko 等[6]针对该病毒的 US4 序列设计 3 对引物进行 LAMP,发现 50 例 HSV-2 反应管为阳

*　基金项目:国家自然科学基金资助项目(30801052、30671835、30500423、30200239)。　作者简介:李文桂,男,博士,研究员,主要从事病原微生物的分子生物学和分子免疫学研究。　△　通讯作者,E-mail:cqliwengui@163.com。

性;其检测该病毒的敏感性为10 copy/tube,而PCR为100 copy/tube;将其用于30例生殖器疱疹患者的样本检测,发现其阳性率为43.3%(13/30),与PCR相当。Enomoto等[7]针对该病毒的糖蛋白G(gG)编码基因设计了3对引物进行LAMP,发现HSV-2反应管为阳性,而HCMV、HHV-6B、HHV-7和VZV对照为阴性;其检测该病毒的敏感性为100 copy/tube;将其用于5例生殖器疱疹患者样本的检测,发现其阳性率为100%(5/5)。Sugiyama等[8]用gG-LAMP检测50例生殖器疱疹患者的样本,发现其阳性率为28%(14/50),而病毒分离和实时PCR分别为24%(12/50)和36%(18/50)。周支香等[9]利用gG-LAMP检测发现HSV-2反应管为阳性,而无菌水对照为阴性;其检测该病毒的敏感性为0.01 ng/μL。

2.2 带状疱疹病毒(VZV)　VZV是水痘和带状疱疹的病原体。Okamoto等[10]针对该病毒的ORF62基因设计3对引物进行LAMP,发现VZV反应管为阳性,而HSV-1、HSV-2、HHV-6、HH-7和HCMV对照为阴性;其检测该病毒的敏感性为500～1 000 copy/tube;将其用于32份患者的标本检测,发现其阳性率为59.4%(19/32),而实时PCR为71.9%(23/32)。

2.3 EB病毒　EB病毒是传染性单核细胞增多症和多克隆B淋巴细胞淋巴瘤的病原体。Iwata等[11]针对该病毒的W基因设计了3对引物进行LAMP,发现EB病毒反应管为阳性,而HSV-1、HSV-2、VZV、CMV和HHV-8对照为阴性;其检测的敏感性为5copy/tube;将其用于108例EB感染患者血清标本和51例喉拭子的标本检测,发现其阳性率分别为35.2%(38/108)和29.4%(15/51),与实时PCR相当。

2.4 巨细胞病毒(CMV)　CMV感染非常广泛,常呈隐性感染,好发于免疫功能受损或免疫功能缺陷等人群。Suzuki等[12]针对该病毒的糖蛋白B编码基因设计2对引物进行LAMP,发现CMV反应管为阳性,而HSV-1/2、HHV-6/7和VZV对照为阴性;其检测该病毒的敏感性为500 copy/tube;将其用于180例患者标本的检测,发现其阳性率为80.0%(144/180)。Reddy等[13]用gB-LAMP检测发现CMV反应管为阳性,而VZV和腺病毒对照为阴性;将其用于40个病毒性视网膜炎患者的玻璃体样本检测,发现其阳性率为25%(10/40),与实时PCR相当。

2.5 人疱疹病毒6和7型　人疱疹病毒6和7型(HHV-6/7)是幼儿急疹的病原体,进一步研究表明HHV-6A与多发性硬化有关,而HHV-6B与幼儿急疹相关。Yoshikawa等[14]针对该病毒的U38基因设计3对引物进行LAMP,发现HHV-7反应管为阳性,而HHV-6A、HHV-6B和HCMV对照为阴性。其检测该病毒的敏感性为250 copy/tube;将其用于2例幼儿急疹患者的标本检测,发现急性期血清(1 d)为阳性,而恢复期血清(13～16 d)为阴性。Ihira等[15-16]针对该病毒的U31基因设计3对引物进行LAMP,发现HHV-6反应管为阳性,而HHV-7和HCMV对照为阴性;其检测该病毒的敏感性为25 copy/tube;将其用于13例HHV-6患者的血清检测,发现急性期(1～3 d)血浆的阳性率为61.5%(8/13),而恢复期血浆(5～10 d)为0.0%。随后他针对HHV-6B的U31基因设计3对引物进行LAMP,发现HHV-6B反应管为阳性,而HHV-6A对照为阴性;其检测20例幼儿急疹患者血清的阳性率为100%。

2.6 人疱疹病毒8型(HHV-8)　HHV-8与卡波氏肉瘤密切相关。Kuhara等[17]针对该病毒的ORF26序列设计3对引物进行LAMP,发现HHV-8反应管为阳性,而HSV-1、HSV-2、VZV和EBV对照为阴性;其检测该病毒的敏感性为100 copy/tube;将其用于19例卡波氏肉瘤组织的检测,发现其阳性率为84.2%(16/19),与实时PCR相当。

3　黄病毒LAMP检测

3.1 日本脑炎病毒(JEV)　JEV是流行性乙型脑炎的病原体。Toriniwa等[18]针对该病毒的env基因序列设计3对引物进行RT-LAMP,发现JEV反应管为阳性,而西尼罗河病毒和登革病毒对照为阴性;其检测该病毒的敏感性为1 PFU/tube,与PCR相当。Parida等[19]同样针对该病毒的env基因序列设计3对引物进行RT-LAMP,发现JEV反应管为阳性,而西尼罗河病毒、登革病毒和圣路易斯脑炎病毒对照为阴性;其检测该病毒的敏感性为0.1 PFU/tube,而RT-PCR为10 PFU/tube;将其用于60例患者脑脊液标本的检测,发现其阳性率为22%(13/60),而RT-PCR和病毒分离分别为7%(4/60)和12%(7/60)。杜鹃等[20]针对该病毒的结构基因设计3对引物进行RT-LAMP,发现JEV反应管为阳性,而猪细小病毒、猪圆环病毒、伪狂犬病毒和猪瘟病毒对照为阴性;其检测该病毒的敏感性为10^3 $TCID_{50}$,而RT-PCR为10^4 $TCID_{50}$;将其用于8份人工感染JEV的鼠脑组织的检测,发现其阳性率为100%(8/8)。

3.2 登革病毒　登革病毒是登革热的病原体。Parida等[21]针对该病毒的3′端非编码区设计3对引物进行RT-PCR,发现登革病毒反应管为阳性,而日本脑炎病毒、西尼罗病毒和圣路易斯脑炎病毒对照为阴性;其检测该病毒的敏感性为0.1～1 PFU/tube,比RT-PCR敏感10～100倍;将其用于38例疑似患者的血清检测,发现其阳性率为15.8%(6/38),而RT-PCR为5.3%(2/38)。

3.3 西尼罗病毒　西尼罗病毒是一种蚊传病毒,可引起人类和鸟类感染。Parida等[22]针对该病毒的包膜蛋白编码基因设计3对引物进行RT-LAMP,发现西尼罗病毒NY 99株和Eg 101株反应管为阳性,而日本脑炎病毒、登革病毒和圣路易斯脑炎病毒对照为阴性;其检测该病毒的敏感性为0.1 PFU/tube,比RT-PCR敏感10倍。

4　其他病毒LAMP检测

4.1 人乳头状瘤病毒(HPV)　HPV与宫颈癌和生殖器感染密切相关,其中低危型HPV-6与生殖器感染相关,而高危型HPV-16和HPV-18与宫颈癌相关。Hagiwara等[23]分别针对HPV-6、HPV-11和HPV-18的E6区以及HPV-16的E7区设计2对引物进行LAMP,发现HPV-6、HPV-11、HPV-16和HPV-18反应管均为阳性;其检测这些病毒的敏感性均为100 copy/tube;将其用于27例患者的标本检测,发现其阳性率为81.5%(22/27),而PCR为77.8%(21/27)。芦春斌等[24]同样针对HPV-6的E6基因以及HPV-16的E7基因设计2对引物进行RT-LAMP,发现HPV-6和HPV-16反应管为阳性,而HPV-11、HPV-18和HPV-31对照为阴性;其检测这些病毒的敏感性为1 000 copy/tube,而实时RT-PCR为100 copy/tube;将其用于62份宫颈刮片组织的检测,发现HPV-6和HPV-16的阳性率分别为21.0%(13/62)和29.0%(18/62),与凯普HPV分型法相一致。

4.2 人类免疫缺陷病毒1　人类免疫缺陷病毒1(HIV-1)是

获得性免疫缺陷综合征的病原体。Curtis 等[25]针对该病毒的蛋白酶编码基因和 P24 蛋白编码基因分别设计 3 对引物进行 RT-LAMP,发现 HIV-1 反应管为阳性,而 HIV-2 对照为阴性;蛋白酶-RT-LAMP 和 P24-RT-LAMP 检测该病毒的敏感性分别为 100 copy/tube 和 10 copy/tube;将其用于 5 个 HIV-1 患者的血清检测,发现其阳性率为 80%(4/5)。

4.3　埃博拉病毒　埃博拉病毒是致病性出血热的病原体。Kurosaki 等[26]针对该病毒的 5′-非编码区设计 2 对引物进行 RT-LAMP,发现 2 株扎伊尔埃博拉病毒反应管为阳性,而 3 种其他埃博拉病毒对照为阴性;其检测该病毒的敏感性为 20 copy/tube。

5　结　　语

将 LAMP 技术用于疱疹病毒和黄病毒等的检测具有特异性强、灵敏度高、结果易于鉴定、操作便利、适宜在基层推广等优点。筛选物引物工作量大,易出现假阳性,不能进行克隆、测序和表达,不能进行长链 DNA 扩增等。但随着 LAMP 技术的不断完善,将其用于疱疹病毒和黄病毒等的临床检测具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] Notomi T,Okayama H,Masubuchi H,et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acid Res,2000,28(12):E63.

[2] Nagamine K,Hase T,Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Mol Cellular Probes,2002,16(2):223-229.

[3] Nagamine K,Watanabe K,Ohtduka K,et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template[J]. Clin Chem,2001,47(9):1742-1743.

[4] 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.

[5] Mori Y,Kitao M,Tomita N,et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. J Biochem Biophys Methods,2004,59(1):145-157.

[6] Kaneko H,Iida T,Aoki K,et al. Sensitive and detection of Herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol,2005,43(7):3290-3296.

[7] Enomoto Y,Yoshikawa T,Ihira M,et al. Rapid diagnosis of Herpes simplex virus infection by loop-mediated isothermal amplification method[J]. J Clin Microbiol,2005,43(2):951-955.

[8] Sugiyama H,Yoshikawa T,Ihira M,et al. Comparison of loop-mediated isothermal amplification real-time PCR,and virus isolation for the detection of Herpes simplex virus in genital lesions[J]. J Med Virol,2005,75(3):583-587.

[9] 周文晋,姜华,王际平,等. LAMP 技术检测单纯疱疹病毒-2 型的初步应用[J]. 南华大学学报:医学版,2010,38(2):180-182.

[10] Okamoto S,Yoshikawa T,Ihira M,et al. Rapid detection of Varicella-zoster virus infection by loop-mediated isothermal amplification method[J]. J Med Virol,2004,74(4):677-682.

[11] Iwata S,Shibata Y,Kawada J,et al. Rapid detection of Epstein-Barr virus DNA by loop-mediated isothermal amplification method[J]. J Clin Virol,2006,37(1):128-133.

[12] Suzuki R,Yoshikawa T,Ihira M,et al. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of Cytomegalovirus DNA[J]. J Virol Methods,2006,132(2):216-221.

[13] Reddy AK,Balne PK,Reddy PK,et al. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and inexpensive detection of Cytomegalovirus DNA in vitreous specimens from suspected case of viral retinitis[J]. J Clin Microbiol,2010,48(6):2050-2052.

[14] Yoshikawa T,Ihira M,Akimoto S,et al. Detection of Human herpes virus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol,2004,42(3):1348-1352.

[15] Ihira M,Yoshikawa T,Enomoto Y,et al. Rapid diagnosis of Human herpes virus 6 infection by a novel DNA amplification method,loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol,2004,42(1):140-145.

[16] Ihira M,Ohta A,Sugata K,et al. Loop-mediated isothermal amplification for discriminating between Human herpes virus 6A and B[J]. J Virol Methods,2008,154(2):223-225.

[17] Kuhara T,Yoshikawa T,Ihira M,et al. Rapid detection of Human herpes virus 8 DNA using loop-mediated isothermal amplification[J]. J Virol Methods,2007,144(1):79-85.

[18] Toriniwa H,Komiya T. Rapid detection and quantification of Japanese encephalitis virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Microbiol Immunol,2006,50(5):379-387.

[19] Parida MM,Santhosh SR,Dash PK,et al. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus[J]. J Clin Microbiol,2006,44(11):4172-4178.

[20] 杜鹃,宋永,刘立科,等. 流行性乙型病毒一步法 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报,2010,32(10):773-776.

[21] Parida M,Horioke K,Ishida H,et al. Rapid detection and differentiation of Dengue virus serotypes by a real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay[J]. J Clin Microbiol,2005,43(6):2895-2903.

[22] Parida M,Posadas G,Inoue S,et al. Real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus[J]. J Clin Microbiol,2004,42(1):257-263.

[23] Hagiwara M,Sasaki H,Matsuo K,et al. Loop-mediated isothermal amplification method for detection of Human papillomavirus type 6,11,16 and 18[J]. J Med Virol,2007,79(4):605-615.

[24] 芦春斌,罗乐,杨梦婕,等. 基于颜色判定的环介导等温扩增技术检测 HPV-6 和 HPV16[J]. 病毒学报,2011,27(1):64-70.

[25] Curtis KA,Rudollph DL,Owen SM. Rapid detection of HIV-1 by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification(RT-LAMP)[J]. J Virol Methods,2008,151(2):264-270.

[26] Kurosaki Y,Takada A,Ebihara H,et al. Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. J Virol Methods,2007,141(1):78-83.

(收稿日期:2013-05-30)