

• 论 著 •

乙型脑炎和登革热病毒的环介导等温扩增基因定量检测技术研究

张 阳¹, 周 冲², 孙 涛¹, 易海华¹

(1. 江苏省徐州出入境检验检疫局 221000; 2. 江苏省徐州市 73089 部队卫生队 221004)

摘要:目的 建立一种适合口岸现场快速检测乙型脑炎和登革热病毒的环介导等温扩增(LAMP)定量技术。方法 根据 LAMP 方法的原理,设计 LAMP 检测引物和反应体系,建立 LAMP 检测方法,同时综合评估初始拷贝数值与方法中的灵敏度、特异性、重复性及荧光信号值反应时间(1×10^4)之间的线性关联。结果 检测选用 1 套 LAMP 引物,完成时间为 0.5 h,传统 PCR 检测与 LAMP 对比,差异明显,LAMP 检测可有效提高灵敏度,是 PCR 检测技术的 10 倍。循环阈值和模版浓度具有良好的线性联系,实验室变异系数为小于 5%。结论 该方法是特异性与灵敏度较高,操作简单、结果判断容易、设备要求低的快速检测方法,适合基层医疗卫生机构和现场查验机构的广泛应用。

关键词:乙型脑炎; 登革热; 环介导等温扩增; 基因定量; 快速检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.14.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)14-1931-04

Quantitative detection of the loop mediated isothermal amplification gene in the loop mediated isothermal amplification of Japanese encephalitis and dengue fever

ZHANG Yang¹, ZHOU Chong², SUN Tao¹, YI Haihua¹

(1. Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of Xuzhou, Xuzhou, Jiangsu 221000, China; 2. Medical Team of 73089 Regiment, Xuzhou, Jiangsu 221004, China)

Abstract: Objective To establish a loop-mediated isothermal amplification(LAMP) quantitative method for rapid detection of Japanese encephalitis and dengue fever virus. **Methods** According to the LAMP principle, design primers for LAMP detection and reaction system, establish LAMP detection method, and to evaluate the linear relationship between initial copy number and the specificity, sensitivity, repeatability and the reaction time (fluorescence signal value of 1×10^4 corresponding time). **Results** One sets of LAMP primers could be used to complete the detection work in 0.5 h. The sensitivity of LAMP detection technology was 10 times higher than that of the classical PCR technology, and no cross reaction with other viruses, and the coefficient of variation of the average test was less than 5%. There was a good linear relationship between cycle threshold and template concentration. **Conclusion** This method has high specificity, sensitivity, simple operation, which is easy to get the results, low equipment requirements and rapid, suitable for primary health institutions and the field inspection agencies for wide applications.

Key words: Japanese encephalitis; dengue fever; loop-mediated isothermal amplification; gene quantitative; rapid detection

目前,乙型脑炎在临床中是较为常见的疾病之一,此类疾病主要由蚊子等昆虫进行传播,主要分布于亚洲地区及东南亚地区^[1]。临床显示乙型脑炎发病症状为痉挛、高热、意识障碍等,严重者会导致后期出现后遗症。据世界卫生组织数据显示,每年约有 50 000 例患者患有乙型脑炎,病死率为 1/3,给社会及家庭带来了严重影响。登革出血热(DHF)与登革热均由登革热病毒引发,主要引发的原因为昆虫及蚊子叮咬通过血液进行传播。此类疾病分布较广,登革热病毒是危害较重的一种昆虫类病毒。近几年每年都有数百万病例报告,全球实际感染人数远超过报告人数^[2]。由于世界人口每年不断增加,且流动性较大,缺乏治疗此类疾病的有效疫苗,登革热目前已被世界划为严重影响日常生活及公共卫生的问题。本研究采用荧光定量环介导等温扩增(LAMP)的技术和设备研究乙型脑炎和登革热病毒。此方法相比病毒分离培养,简便易行,相比聚合酶链反应(PCR)方法其灵敏度高,更适合基层医疗防疫机构及现场快速测定。

1 材料与方法

1.1 样品来源 乙型脑炎病毒株来源于江苏省疾控中心,登革热病毒株来源于中国检科院和江苏国际旅行卫生保健中心媒介生物实验室,其他的对照病毒如甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒和呼吸道合胞病毒的病毒株来自辽宁国际旅行保健中心媒介生物实验室。

1.2 仪器与试剂 本次扩增仪 PCR(ABI7300)由美国 ABI 技术公司提供;紫外凝胶成像系统为美国 Bio-RAD 公司提供;高速离心机由德国 SIGMA 公司提供;空气浴振荡箱 HZQ-C 由中国金坛友联仪器研究所提供;恒温混匀器购自德国 Eppendorf 技术公司;低温离心机由美国 BECKMAN 公司提供;专用微量有机超纯净水机购自中国重庆利迪实验仪器设备有限公司;pH 计购自美国 BECKMAN 公司;振荡器购自美国 Thermo 公司;恒温水浴锅购自广州康恒仪器有限公司。PCR 试剂由上海生工生物技术有限公司提供;DNA 提取试剂盒由北京博奥生物科技有限公司提供;pGEM-T easy 购自 Promega 公

司;质粒 DNA 提取试剂盒购自 Axygen 公司;胶回收试剂盒购自 Axygen 公司;100 bp ladder DNA-Maker 购自北京全式金生物技术有限公司;LAMP 引物购自通用生物系统(安徽)有限公司;Pico Green 染料购自 Molecular Probes 公司;SYBR Green I 染料购自南京诺维赞生物科技有限公司;Bst DNA 大片段聚合酶购自上海研拓生物科技有限公司;甜菜碱购自西宝生物科技上海股份有限公司;其他试剂如国产分析纯。

1.2 检测方法

1.2.1 引物的设计与合成 选择乙型脑炎 Genebank 登录号为 AB231465.1 的乙型脑炎病毒基因作为目标基因,登革热病毒 Genebank 登录号为 FW366602.1 的 dengue fever 基因作为目标基因,对比数据库(GeneBank)中引物序列,数据显示,引物序列保守性较好。引物设计采用 Primer 软件进行,分别设计引物 F3 与 B3 两对引物,内引物为 BIP 与 FIP 见表 1、2。

表 1 针对乙型脑炎病毒基因序列设计的 LAMP 反应引物

引物名称	序列组成(5'-3')
F3	TGG GTA GAT GTG GTA CTG GA
B3	ACA CAC AAA GTT CGC GTC TT
FIP	GGC AGG GTT TGT GAC TTC CGT CTC ACC ACC ATG GCA AAA GAC
BIP	CCT GCG CAA ACT GTG CAT TGA TGT GGC TTC TCC TTG TGT TG

表 2 针对登革热病毒基因序列设计的 LAMP 反应引物

引物名称	序列组成(5'-3')
F3	TGA GGA CAC GAT GAC CTA CA
B3	ACC TTC AGA GGA CAT CCA CG
FIP	GCA CGT TCC ATA GGT CAC CCA TCG GAT CAC TGA GGC GGA A
BIP	AAC TGG CGA ACA CCG ACG AGC GGC TCT TGT TTC TAG GCC

1.2.2 病毒基因组 cDNA 提取 取 2 mL 病毒液,利用 RNA 提取试剂盒提取病毒 RNA。经反转录得到 cDNA 样品,-20 °C 保存。

1.2.3 采用 F3、B3 进行引物扩增 扩增目的片段 cDNA 由胶回进行纯化观察 pGEM-T easy 的链接反应状态,转化至大肠杆菌观察 DH5 α 态细胞有无明显变化,过夜培养,PCR 检测菌落选取阳性克隆因子。鉴定后的阳性克隆因子扩增,提取质粒,酶切,测序鉴定,将测序后的质粒放置于-20 °C 箱中存放。选用南京拜睿生物技术有限公司进行质粒重组与构建。

1.2.4 LAMP 创建定性检测方案 LAMP 反应体 25 μ L, 包含成分为:10 \times Bst buffer 200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8, 25 °C) 2.5 μ L, Betaine (4 mol/L) 5 μ L, 序列引物 1 μ L, F3 : B3 : FIP : BIP = 5 μ mol/L : 5 μ mol/L : 40 μ mol/L : 40 μ mol/L, 酶(8 U) 1 μ L, dNTPs(10 mmol/L) 3.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 6 μ L, 模板 1 μ L, 灭菌去离子水 5 μ L。配制反应体后,放置于 65 °C 后反应观察 60 min,再置于 80 °C 进行反应

观察 10 min,灭活 Bst DNA 聚合酶终止反应试验。反应结束后,加入反应管 1 μ L Pico Green 染料,观察反应管颜色与之前有无明显变化。抽取 55 L LAMP 反应产物,放置于 2% 的琼脂糖凝胶上,选用电泳进行检测,观察有无明显梯状条带出现。

1.2.5 采用标准曲线检测 LAMP 荧光定量的建立 扩增反应仪器选用 ABI7300,加入 LAMP 反应体 1 μ L 10 \times SYBR Green I,进行温扩增检测。以 pGEM-T-JEV 为模板进行检测重组的质粒,曲线绘制以初始模版与反应阈值为基础进行。以定量重组质粒 pGEM-T-JEV 为模板,观察荧光曲线数据与扩增反应体(ABI 7300)。曲线绘制以反应结束后根据反应阈值中荧光定量 1 \times 10⁴ 的对应时间扣模版初始拷贝数对数值绘制标准曲线。

1.2.6 特异性水平评价 采用 LAMP 进行扩增 DNA 病毒基因与阳性质粒 pGEM-T-DEN,以荧光曲线与琼脂糖凝胶电泳或加入 Pico Green 进行染色,观察试验结果,检验 LAMP 检测后病毒的特异性。

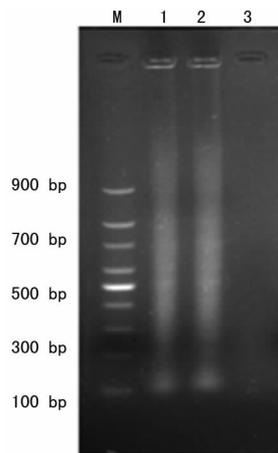
1.2.7 灵敏度综合评价 以 LAMP 进行对重组质粒模版的定量检测,以 10 倍稀释法稀释 pGEM-T-DEN 进行扩增,LAMP 与 PCR 进行扩增结果对比。采用琼脂糖凝胶电泳法观察实验结果。

1.2.8 重复性评价 采用实时荧光 LAMP 法在 5 个梯度进行 10 批次水平试验,观察试验结果并计算变异系数。荧光信号值为 1 \times 10⁴ 时进行数据统计分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计分析。

2 结果

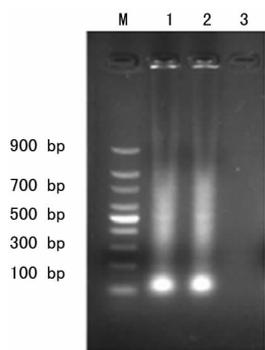
2.1 LAMP 检测结果 阳性对照管、乙型脑炎病毒和登革热病毒管显色为阳性。阳性对照管、乙型脑炎病毒和登革热病毒管有明显梯状条带出现,见图 1、2。实验说明 LAMP 凝胶电泳和染料染色的结果是一致的。



注:M 为 100 bp ladder 标记物;1 为阳性对照 pGEM-T-DEN;2 为乙型脑炎病毒 DNA 样品;3 为阴性对照。

图 1 乙型脑炎 LAMP 扩增产物凝胶电泳图

2.2 荧光定量 LAMP 检测方法标准曲线 反应时间与初始模版拷贝数对数值有良好的线性关系(乙型脑炎病毒 R² = 0.996 5,登革热病毒 R² = 0.989 5)。见图 3、4。



注: M 为 100 bp ladder 标记物; 1 为阳性对照 pGEM-T-DEN; 2 为登革热病毒 DNA 样品; 3 为阴性对照。

图 2 登革热病毒 LAMP 扩增产物凝胶电泳图

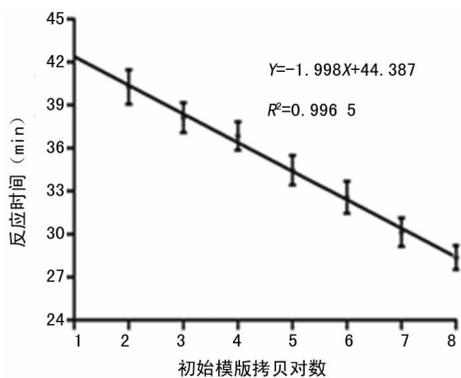


图 3 乙型脑炎病毒实时荧光定量 LAMP 检测方法标准曲线

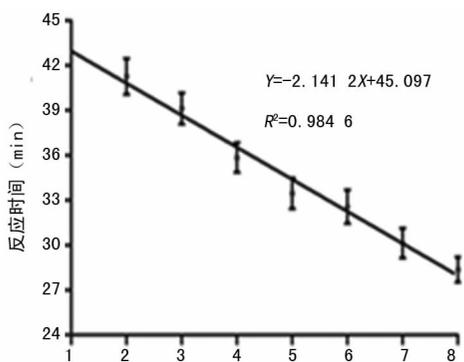
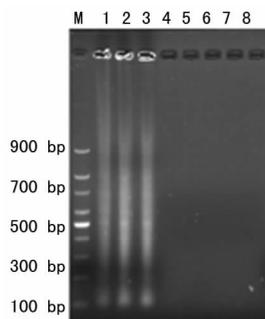


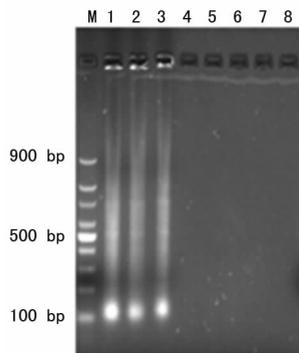
图 4 乙型脑炎病毒实时荧光定量 LAMP 检测方法标准曲线



注: M 为 100 bp ladder 标记物; 1 为阳性对照 pGEM-T-DEN; 2 为乙型脑炎样品 1; 3 为乙型脑炎病毒样品 2; 4 为甲型流感病毒; 5 为乙型流感病毒; 6 为副流感病毒; 7 为呼吸道合胞病毒; 8 为阴性对照。

图 5 乙型脑炎及相关病毒 LAMP 扩增产物凝胶电泳图

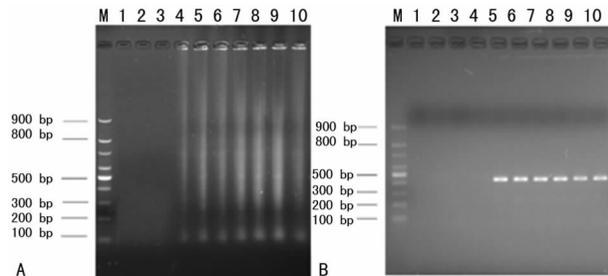
2.3 特异性水平评价 通过染色和凝胶电泳两种方法的研究显示,阳性质粒(pGEM-T-DEN)与乙型脑炎或登革热病毒组 DNA 为模板的反应管呈阳性,其他致病毒均为阴性,见图 5、6。



注: M 为 100 bp ladder 标记物; 1 为阳性对照 pGEM-T-DEN; 2 为登革热病毒 1; 3 为登革热病毒 2; 4 为甲型流感病毒; 5 为乙型流感病毒; 6 为副流感病毒; 7 为呼吸道合胞病毒; 8 为阴性对照。

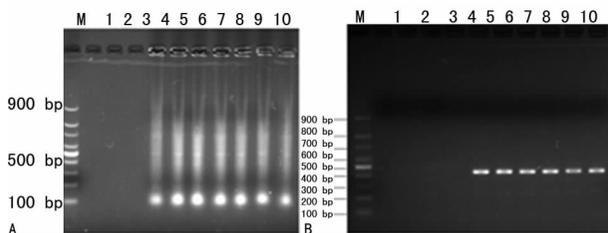
图 6 登革热及相关病毒 LAMP 扩增产物凝胶电泳图

2.4 LAMP 与 PCR 灵敏度比较 所建立的乙型脑炎病毒和登革热病毒 LAMP 检测方法的灵敏度是 PCR 方法的 10 倍,检测限达到 2×10^2 copies,见图 7、8。



注: A 为乙型脑炎病毒 LAMP 检测法琼脂糖凝胶电泳图; B 为乙型脑炎 PCR 检测方法琼脂糖凝胶电泳图。M 为 100 bp Ladder DNA 标记物; 1 模板为 Ocopy; 2~10 模板为 $(2 \times 10^0 \sim 2 \times 10^8)$ copies, 10 倍梯度递增。

图 7 乙型脑炎病毒 LAMP 检测法与 PCR 法灵敏度实验对比结果



注: A 为登革热病毒 LAMP 检测法琼脂糖凝胶电泳图; B 为登革热病毒 PCR 检测方法琼脂糖凝胶电泳图。M 为 100 bp Ladder DNA Marker; 1 模板为 Ocopy; 2~10 模板为 $(2 \times 10^0 \sim 2 \times 10^8)$ copies, 10 倍梯度递增。

图 8 登革热 LAMP 检测法与 PCR 法灵敏度实验对比结果

2.5 重复性评价 对反应荧光信号值达到 1×10^4 所需的时间进行统计分析,变异系数均小于 5%,试验的稳定性和重复性较好,见表 3、4。

表 3 乙型脑炎病毒 5 个梯度水平进行 10 批次重复试验结果

梯度(copies)	平均值($\bar{x} \pm s$, min)	变异系数(%)
2×10^3	38.342 7 \pm 1.126 3	2.88
2×10^4	38.013 7 \pm 1.038 7	2.48
2×10^5	37.243 7 \pm 0.987 3	2.97
2×10^6	35.674 3 \pm 1.013 8	2.41
2×10^7	32.413 5 \pm 0.923 4	2.34

表 4 登革热病毒 5 个梯度水平进行 10 批次重复试验结果

梯度(copies)	平均值($\bar{x} \pm s$, min)	变异系数(%)
2×10^3	39.412 8 \pm 1.236 9	3.14
2×10^4	38.341 8 \pm 1.139 6	3.08
2×10^5	37.342 8 \pm 1.038 7	2.79
2×10^6	35.532 4 \pm 0.963 7	2.53
2×10^7	33.358 7 \pm 0.879 4	2.68

3 讨 论

随着全球疫情形势的增加,检测乙型脑炎的方法应选择一种快速检测且特异度与灵敏度较高的方案,为控制和预防由乙型脑炎和登革热病毒引起的疾病提供客观、可信的量化资料。传统的 PCR 技术是目前检测乙型脑炎和登革热病毒技术中最常用的方法之一^[3],但在特异性、简便程度、温度、试剂和仪器要求等方面有缺陷^[4-5],不利于基层医疗及现场查验机构的广泛应用。随着分子生物学的发展和不断对传统核酸扩增技术的改进,一种新的 LAMP 技术解决了目前基因检测的弊端^[6-7]。通过本课题的研究可以看出,LAMP 技术检测乙型脑炎和登革热技术灵敏度高,耗时短,特异性强,重复性好,比目前普遍采用的 PCR 方法检测时间缩短一倍,说明 LAMP 方法对条件要求并不苛刻,仪器要求简单,适用于基层推广。

本研究按照 LAMP 反应的原理,将乙型脑炎和登革热病毒特异性基因检测结果作为基础进行 LAMP 引物序列的设计,通过优化 LAMP 进行试验确定一套有效的反应检测体系与方案。

本研究在定性 LAMP 的基础上,利用荧光 PCR 的原理,通过检测 LAMP 反应过程荧光物质强度的变化进行了 LAMP 产物分析。与生物检测技术相比,荧光定量 LAMP 的主要技术优点在于:(1)动态实时监测,能在反应结束后得到 LAMP 扩增动力学曲线图,可直观地观察 LAMP 反应过程及其动态变化;(2)实验过程中除加样开盖外,全程采取封闭式操作试验,封闭操作可有效防止扩增产物被污染,避免出现假阳性率;(3)由于 LAMP 反应需采用 4 条引物进行针对不同的 6 个区域进行检测,如果每一个区域出现不匹配情况试验则无法进行,非特异性的出现率极低,特异性较高;(4)操作简单、快速,更为关键的是由于 LAMP 方法仅需要在恒温状态下进行反

应,不需要昂贵的生化检测设备,且反应程序简单,定性方法仅需一台水浴锅即可,且检测限高于 PCR 法的 10 倍以上;定量方法也仅需要一台具有简单温控功能的荧光光度计即可,结果简单,同时国外已经成功研制了实时浊度计,设备要求更为简单^[8-9]。本研究数据显示,采用 LAMP 检测乙型脑炎与登革热病毒具有较高的灵敏度与特异度,扩增反应达到了 2×10^2 copies,效果明显高于 PCR 检测法。PCR 与 LAMP 对比研究中发现,LAMP 特异性与稳定性高于 PCR,且无假阳性出现和较大的结果波动,根据重组质粒 LAMP 反应制作的标准曲线表明:当荧光阈值为 1×10^4 时所取的 Ct 值与模板拷贝数的对数呈良好的线性关系^[10]。

综上所述,LAMP 具有快速检测的优势,方便与基层医疗防疫站使用。随着对乙型脑炎和登革热研究的深入,迫切需要建立一种能简单、快速定量检测的方法广泛用于基层医疗机构和现场疾病检查机构,荧光定量 LAMP 技术的出现为这方面的研究提供了新的思路。

参考文献

- [1] Monath TP. Japanese encephalitis-aplague of the orient [J]. N Engl J Med,1988,319(10):641-643.
- [2] 张海林. 登革热和登革出血热国际会议简介[J]. 国外医学流行病学传染病学分册,2001,28(2):73-75.
- [3] 陶娅琳,周红宁. 我国乙型脑炎病毒血清学 ELISA 诊断技术研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2012,7(9):709-712.
- [4] 向浩,聂绍发. 登革热实验诊断技术进展[J]. 临床检验杂志,2006,24(2):156-157.
- [5] 谭翰清,陈华,谭海芳. 乙型脑炎病毒检测技术研究进展[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(11):1402-1404.
- [6] Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, et al. Detection of bacteria carrying the stx2 gene by insitu loop-mediated isothermal amplification [J]. Appl Environ Microbiol, 2003,69(8):5023-5028.
- [7] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template[J]. Clin Chem,2001,47(9):1742-1743.
- [8] Eun-Taek H, Risa W. Detection of four plasmodium species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis[J]. Clinical Microb,2007,45(8):2521-2528.
- [9] Shirato K, Nishimura H, Saijo M, et al. Diagnosis of human respiratory syncytial virus infection using reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. J Virol Methods,2007,139(1):78-84.
- [10] 李启明,马学军,周蕊,等. 环介导等温扩增技术(RT-LAMP)在丙型肝炎病毒基因检测中的应用[J]. 病毒学报,2006,22(5):334-338.