

• 综 述 •

# 微流控 LAMP 技术在呼吸道病原体检测中的临床应用进展\*

杨家树<sup>1</sup>, 戚丽华<sup>2</sup>, 吴 方<sup>1</sup>, 袁永阳<sup>3</sup>综述, 刘 杰<sup>1,2△</sup>审校

(1. 南方医科大学第二临床医学院, 广东广州 510280; 2. 中国人民解放军总医院第七医学中心检验科, 北京 100700; 3. 陆军第九五七医院检验科, 西藏阿里 859000)

**摘 要:** 环介导等温扩增(LAMP)技术的恒温、快速、高效等扩增特点,使它在致病微生物的快速检测方面具有较高的临床应用价值。微流控的应用使得分析过程更加简约化、易操作和微型化。LAMP 技术改变了传统核酸扩增方式,它与微流控技术的结合进一步增加其实用性。该文就其在呼吸道病原体细菌、病毒和真菌快速检测中的应用及其优缺点和核酸提取新技术作简述;分析表明微流控 LAMP 技术在呼吸道感染快速检测方面,具有较大的应用前景。

**关键词:** 环介导等温扩增技术; 呼吸道感染; 病原体检测; 核酸提取

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2020.13.026

**中图法分类号:**R446.5

**文章编号:**1673-4130(2020)13-1645-04

**文献标识码:**A

## Progress in clinical application of microfluidic LAMP technology in the detection of respiratory pathogens\*

YANG Jiashu<sup>1</sup>, QI Lihua<sup>2</sup>, WU Fang<sup>1</sup>, YUAN Yongyang<sup>3</sup>, LIU Jie<sup>1,2△</sup>

(1. The Second Clinical Medical College, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510280, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Seventh Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100700, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the 957th Army Hospital of Chinese PLA, Ali, Xizang 859000, China)

**Abstract:** The constant temperature, rapid and high-efficiency amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology has high clinical value in the rapid detection of pathogenic microorganisms. The application of microfluidics makes the analysis process more simple, easy to operate and miniaturized. LAMP changes the way traditional nucleic acid is amplified, and its combination with microfluidic technology further increases its utility. This article briefly describes its application in the rapid detection of respiratory pathogens bacteria, viruses and fungi, its advantages and disadvantages, and new nucleic acid extraction techniques. The analysis shows that microfluidic LAMP technology has a great application prospect in the rapid detection of respiratory infection.

**Key words:** loop-mediated isothermal amplification; respiratory infection; pathogen detection; nucleic acid extraction

呼吸道感染是一种呼吸系统的常见病,在季节变换期间更容易发生。流感病毒也极易感染人群,从而引起流感的暴发。目前病原微生物从鉴定到药物敏感性检测,其过程一般是 2~3 d,结核杆菌的培养检测通常要 14~35 d,这很难满足临床对致病菌快速诊断的要求<sup>[1]</sup>。由于核酸分子检测的高特异度和高灵敏度的特点,近年来随着核酸扩增技术的快速发展,越来越多的新型扩增技术也发展起来。微流控技术和环介导等温扩增(LAMP)技术的结合,使得微流控 LAMP 技术不仅具有 PCR 技术的高灵敏度和高特异度,同时操作过程变得十分简单,特别适用于基层医

院和偏远地区。但核酸提取速度是制约微流控 LAMP 技术发展的重要因素,快速核酸提取的发展会进一步提高微流控 LAMP 技术的发展前景。

### 1 微流控芯片和 LAMP 技术原理

**1.1 微流控技术** 20 世纪末微流控技术研究开始发展,它是由微结构和微通道组成,运用了微电机系统、微流体技术、生物、化学等多方面技术。它可以在微纳级别的空间内精确操控微尺度流体。微流控芯片又叫“微流控芯片实验室”,它可以巧妙地把整个分析过程的基本操作集成到一片微米尺寸的芯片上,自动完成分析的全过程,具有规模集成、仪器微小化,节

\* 基金项目:陆军后勤部科研面上项目(CLJ17J021)。

△ 通信作者, E-mail: fhaalj@163.com。

本文引用格式:杨家树,戚丽华,吴方,等.微流控 LAMP 技术在呼吸道病原体检测中的临床应用进展[J].国际检验医学杂志,2020,41(13):1645-1648.

约试剂等众多优点,特别适用于即时诊断(POCT)和基层工作单位<sup>[2]</sup>。

**1.2 LAMP 技术** 自日本学者 NOTOMI 等<sup>[3]</sup>首次发布了 LAMP 技术以来,该技术发展迅速,其原理是通过目标基因的 6 个特异区域设定 4 种引物,在恒温条件下依赖一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶,生成自我循环扩增的颈环结构,使得目标基因在短时间内大量、高效地扩增。该技术具有较高的灵敏度和特异性,且速度快,只需要 1 h 左右即可检测出病原菌,比传统 PCR 技术节约时间,可以满足临床上快速检查病原菌感染的要求;同时它所需要的设备比较简单,只需要一个恒温箱,这大大减低了对大型实验室仪器的依赖,更易于在基层医院开展分子检测。

**1.3 微流控芯片和 LAMP 技术的结合检测** 微流控芯片可以减少对实验场地和大型实验仪器的依赖性。LAMP 技术则可以从分子方面更加准确地诊断呼吸道感染的病原体。微流控和 LAMP 技术的结合,增加了仪器的便携性,可以节约时间和试剂,同时对病原体的快速检测有助于临床诊断和指导临床医生针对性用药,也避免了 LAMP 技术气溶胶的污染<sup>[1,4]</sup>。在金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌和沙门氏菌的检测中,有研究证明微流控 LAMP 技术均有较高的灵敏度<sup>[5-6]</sup>。在儿童感染性呼吸道病原体方面,与应用较多的传统痰培养和血清学方法相比,微流控 LAMP 芯片法具有较高的检出率<sup>[7]</sup>。

## 2 微流控 LAMP 技术在呼吸道感染疾病病原诊断的临床应用

呼吸道感染在临床呼吸内科中的发病率总是居高不下,呼吸道感染疾病按致病菌分为 3 类:细菌性感染、真菌性感染和病毒性感染。微流控 LAMP 技术作为一种快速核酸扩增技术,特别适用于临床病原菌的快速诊断<sup>[8]</sup>。

**2.1 微流控 LAMP 技术在细菌感染中的应用** LAMP 技术较早地应用于结核分枝杆菌的诊断,传统结核分枝杆菌的鉴定通常依赖于罗氏培养基,但是其培养时间较长,不利于临床的早期诊断。SEKI 等<sup>[9]</sup>利用 LAMP 技术检测结核分枝杆菌的共有基因 hspX 诊断其感染。大部分微流控 LAMP 技术只能证明病原体的存在,不能区分菌体是否存活及反映病原体感染性强弱<sup>[10]</sup>,因为即使细菌死亡,其 DNA 依然存在于人体内,因此对临床用药剂量指导和判断是否为急性感染有一定的限制。WU 等<sup>[10]</sup>认为可以通过 RT-LAMP 检测结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因,区分出存活状态的结核分枝杆菌。支原体肺炎是社区感染性肺炎的常见病原菌,研究表明检测支原体时,LAMP 技术的灵敏度和特异性分别为 100.0%、94.3%<sup>[11]</sup>。有学者证实了 LAMP 技术在金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和流感嗜血杆菌检测中的应用<sup>[12-15]</sup>。

**2.2 微流控 LAMP 技术在呼吸道感染中的应用** LAMP 技术通过逆转录形成的 RT-LAMP 技术可以用于呼吸道病毒的快速检测。高杰等<sup>[16]</sup>利用 RT-LAMP 技术检测了甲型 H1N1、季节性 H1N1 和季节性 H3N2 亚型流感病毒及乙型流感病毒,结果显示 RT-LAMP 技术在流感病毒检测中与荧光定量 PCR 技术具有相当的灵敏度和特异性。MU 等<sup>[17]</sup>利用人类呼吸道合胞病毒(HRSV)A 组和 B 组特异的引物,分别扩增 HRSV 的 N 和 L 基因,设计出逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)测定法,1 h 内可以同时检测 A 和 B 两组 HRSV,较为快速方便。

**2.3 微流控 LAMP 技术在真菌感染中的应用** 侵袭性真菌感染大多是继发性,临床对其缺乏可靠性的病原学诊断<sup>[18]</sup>。LAMP 技术作为一种分子诊断技术,在侵袭性真菌的快速诊断方面有着广阔的应用前景。肖晶晶等<sup>[19]</sup>针对白色念珠菌的 RPS0 基因,利用 LAMP 技术建立了检测白色念珠菌的诊断方法,其检测的灵敏度和特异性分别为 87.62% 和 88.33%,均高于 PCR 法。

## 3 微流控 LAMP 技术的技术缺陷及快速核酸提取改进技术

微流控和 LAMP 技术的结合大大简化了操作步骤,提高了该技术的应用范围。但微流控和 LAMP 本身的技术缺陷制约了该项技术发展,同时不能有效简化核酸提取技术也限制了其应用<sup>[20]</sup>。

**3.1 微流控 LAMP 技术的技术缺陷** LAMP 技术自发明以来因其具有较高的灵敏度和特异性、检测速度快的优点而备受欢迎,但因其引物设计复杂,扩增需要多对引物容易引起非特异性扩增,使得假阳性率较高<sup>[20-22]</sup>。在检测致病菌 DNA 或者 RNA 时,大部分微流控 LAMP 技术检测结果多为定性而不能定量,所以目前不能有效反映病原体感染性强弱<sup>[10]</sup>。微流控 LAMP 技术多以微流控芯片为基础进行巧妙结合,一定程度上增加了其实用性。目前微流控技术因其精确的微型流体控制技术而被广泛应用,但在制备过程中由于技术受限、芯片对生化试剂有吸附作用等因素在一定程度上限制了其推广范围<sup>[4,23]</sup>,而且在集成样本核酸提取方面,由于难以精确控制气压使得样本的核酸提取仍然是一个难以解决的关键问题。不过微流控技术依然是最有希望将核酸提取、扩增和检测集成为一体的技术<sup>[1,4,22]</sup>。

**3.2 微流控 LAMP 的快速核酸提取技术** LAMP 作为新型核酸扩增技术,依赖其检测特点在呼吸道致病菌快速检测中发挥重要作用。在下呼吸道感染中检出率和灵敏度均高于普通痰培养<sup>[24]</sup>。目前 LAMP 技术主要困难在于病原体核酸的快速提取。在进行病原体检测时,不能简化核酸提取,也限制了 LAMP 技术在病原体检测中的应用<sup>[4]</sup>。常用的核酸提取方法包括:煮沸法、细胞裂解法、柱式过滤法和磁珠法。

进行提取 DNA 时,煮沸法和细胞裂解法方便、经济、操作简单,提取过程中没有 DNA 的损失;柱式过滤法和磁珠法可以有效清除干扰 PCR 扩增的物质,同时提取核酸纯度高,但是过滤法在 DNA 损失方面比磁珠法更严重,同时在不同浓度、不同菌种的条件下,细胞裂解法的 Ct 值更小<sup>[25]</sup>。近些年有学者对这几种核酸提取技术进行简化,一定程度上提高了微流控 LAMP 技术的实用性。

赵升等<sup>[26]</sup>通过一种快速核酸提取试剂检测流感病毒时得到较高的提取效率,与离心柱法和磁珠法相比 PCR 结果相似。该提取试剂所有成分均在一管中,通过加热裂解液破坏病毒外壳,释放核酸,核酸稳定剂防止核酸降解,裂解成分降解后,核酸分布于提取液上层,整个过程只需加热和震荡 2 个步骤,时间为 4 min。KAWANO 等<sup>[27]</sup>采用超快速提取(PURE)试剂盒,它的作用方式是使用一种吸附粉末,移除样品中的 DNA 抑制剂,达到保护样品 DNA 的目的,不需要复杂的设备即可在临床样品中分离 DNA。孙魁<sup>[28]</sup>利用碱裂解法与纸基核酸提取技术,建立了碱裂解法结合纸基核酸纯化的样本处理体系(ALP FINA),原理是利用强碱使核蛋白、核酸酶变性,使得 DNA 释放,利用过滤膜进行过滤得到核酸提取液,15 min 左右即可得到提取液,整个过程不依赖电力、加热和离心,可以方便地达到核酸提取,可用于恒温扩增技术。

#### 4 小结与展望

LAMP 技术因其恒温扩增,操作简单,高灵敏度和高特异度的优点而被越来越广泛地应用。微流控的应用减少了常规检测对大型仪器和场地的依赖性。微流控 LAMP 技术鉴定致病菌因具有快速、高灵敏度和特异度的特点在临床呼吸道感染中拥有较大的应用前景。微流控 LAMP 技术的结合不仅简化了操作步骤,使得核酸分子检测技术易于操作,同时也解决了 LAMP 技术的一些弊端。但是快速提取核酸仍然是目前限制微流控 LAMP 技术发展的因素,其次微流控和 LAMP 法的本身技术缺陷以及结果不能定量也限制了其临床应用。随着科学研究的不断深入,微流控 LAMP 技术不断地改善和发展,它在病原体检测方面将会发挥更大的作用。

#### 参考文献

- [1] 舒博文,林冬果,雷秀霞,等.微流控体外诊断技术应对临床检验医学的挑战[J].中华检验医学杂志,2018,41(9):696-699.
- [2] 邵奕霖,徐小平,高菊逸.多种基于微流控芯片的检测方法用于细菌检测[J].临床检验杂志,2017,35(4):296-297.
- [3] NOTOMI T,HIROTO O,HARUMI M,et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids

- Res,2000,28(12):63-66.
- [4] 苏华,陈琛.微流控环介导等温扩增集成诊断技术最新研究进展[J].临床和实验医学杂志,2018,17(2):220-223.
- [5] SAYAD A A,IBRAHIM F,UDDIN S M,et al. A microfluidic lab-on-a-disc integrated loop mediated isothermal amplification for foodborne pathogen detection[J]. Sens Actuat B:Chem,2016,227(3):600-609.
- [6] PANG B,FU K,LIU Y,et al. Development of a self-priming PDMS/paper hybrid microfluidic chip using mixed-dye-loaded loop-mediated isothermal amplification assay for multiplex foodborne pathogens detection[J]. Anal Chim Acta,2018,1040(6):81-89.
- [7] 王咏红,郭雅洁,陈玉莹,等.恒温扩增芯片法在儿童下呼吸道感染性疾病中的应用价值评估[J].中国循证儿科杂志,2018,13(3):176-179.
- [8] HOU J,WU H,ZENG X,et al. Clinical evaluation of the loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of common lower respiratory pathogens in patients with respiratory symptoms[J]. Medicine,2018,97(51):e13660.
- [9] SEKI M,KIM D W,MITARAI S,et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in sputum specimens using a loop-mediated isothermal amplification assay in Korea[J]. J Med Microbiol,2015,64(11):1335-1340.
- [10] WU D,KANG J,LI B,et al. Evaluation of the RT-LAMP and LAMP methods for detection of Mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Lab Anal,2018,32(4):e22326.
- [11] 严春霞,陆伟宏,何国产,等.环介导等温扩增在检测肺炎支原体中的临床应用[J].中国医学科学院学报,2019,41(2):203-207.
- [12] CHEN C,ZHAO Q,GUO J,et al. Identification of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) using simultaneous detection of mecA, nuc, and femB by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Cur Microbiol,2017,74(8):965-971.
- [13] TAKANO C,SEKI M,KIM D W,et al. Molecular serotype-specific identification of non-type b haemophilus influenzae by loop-mediated isothermal amplification[J]. Front Microbiol,2017,8(4):1877-1880.
- [14] 徐云明,魏利斌,周弇扬,等.肺炎克雷伯菌环介导等温扩增技术检测方法的建立[J].中国畜牧兽医,2018,45(11):3003-3010.
- [15] 曹科峰.环介导等温扩增技术检测铜绿假单胞菌方法的建立及其应用[D].合肥:安徽医科大学,2017.
- [16] 高杰,王伟,郭斌,等.环介导技术在流感检测中的应用与研究[J].中国卫生检验杂志,2015,25(10):1552-1554.
- [17] MU Y,ZENG J,CHEN Q,et al. New method for the visual detection of human respiratory syncytial virus using reverse transcription loop-mediated amplification [J]. J Virol Methods,2014,206(6):84-88.
- [18] 居阳,钟雪峰,方芳,等.侵袭性肺真菌感染的临床分析[J].中华医院感染学杂志,2017,27(8):1762-1765.
- [19] 肖晶晶,王丽娟,孔继烈,等.白念珠菌环介导等温扩增法的建立及其应用价值[J].临床检验杂志,2019,37(1):5-



10.  
[20] 郭绮,杨魁庆. LAMP 在临床微生物检测中的应用及进展[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(1): 111-114.  
[21] 王德国, 刘海英, 王爱萍. 环介导等温扩增技术的应用研究进展[J]. 许昌学院学报, 2016, 35(2): 69-72.  
[22] 何祥鹏, 邹秉杰, 齐谢敏, 等. 基于核酸等温扩增的病原微生物微流控检测技术进展[J]. 遗传, 2019, 41(7): 1-16.  
[23] 沈韧, 万谅, 贾艳伟. 微流控技术在临床检测中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 31(5): 289-294.  
[24] 杨雪飞, 彭攀, 焦长锁, 等. 环介导等温扩增检测在下呼吸道感染病原菌检查中应用价值[J]. 实用预防医学, 2019, 26(6): 759-761.  
[25] 闻子钰, 梁昊, 顾一心, 等. 细菌核酸提取方法对荧光定量 PCR 检测差异分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(6): 621-624.  
[26] 赵升, 姬艳芳, 张璐, 等. 一种快速核酸提取试剂在流感病毒检测中的应用评价[J]. 中国病毒病杂志, 2019, 9(2): 135-138.  
[27] KAWANO S, MAEDA T, SUZUKI T, et al. Loop-mediated isothermal amplification with the procedure for ultra rapid extraction kit for the diagnosis of pneumocystis pneumonia[J]. J Infect Chemoth, 2015, 21(3): 224-226.  
[28] 孙魁. 基于 LFD-RPA 的核酸可视化检测技术的建立及应用[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.  
(收稿日期: 2019-10-18 修回日期: 2020-01-25)

• 综 述 •

肠道菌群与 2 型糖尿病的相关性研究

劳 一, 李 萍, 宁兴旺, 张 贞 综述, 谢小兵<sup>△</sup>审校  
(湖南中医药大学第一附属医院医学检验与病理中心, 湖南长沙 410007)

**摘 要:** 流行病学研究显示, 近年来 2 型糖尿病的发病率逐年升高。因其高发病率与致残率, 2 型糖尿病已严重影响人类健康, 威胁人类的生命安全。研究人员通过动物实验与临床观察发现, 肠道菌群可通过调整人体脂类物质的代谢、葡萄糖的吸收水平、胆汁酸受体的表达以及体内炎症反应的程度来影响人体糖类、脂类物质的代谢, 进而诱发或控制糖尿病的发生。进一步研究发现, 若通过某些治疗手段, 比如移植健康人群肠道菌群、各类减肥手术、使用抗菌药物、益生元与益生菌等, 调整了肠道菌群的结构, 不但能够预防, 甚至可以治疗 2 型糖尿病。由此证明, 肠道菌群作为影响 2 型糖尿病治疗效果的新靶点, 是有现实意义的。

**关键词:** 肠道菌群; 2 型糖尿病  
**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2020. 13. 027 **中图法分类号:** R587. 1  
**文章编号:** 1673-4130(2020)13-1648-05 **文献标识码:** A

Study on the relationship between intestinal flora and type 2 diabetes mellitus

LAO Yi, LI Ping, NING Xingwang, ZHANG Zhen, XIE Xiaobing<sup>△</sup>  
(Medical Laboratory and Pathology Center, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

**Abstract:** Epidemiological studies show that the incidence rate of type 2 diabetes mellitus has increased year by year in recent years. Because of its high incidence rate and disability rate, type 2 diabetes mellitus has seriously affected human health and threatened human life safety. Through animal experiments and clinical observation, the researchers found that the intestinal flora can induce or control the occurrence of diabetes by regulating the metabolism of lipid, the absorption level of glucose, the expression of bile acid receptor and the level of inflammatory reaction in vivo. Further research found that if some treatment methods, such as transplantation of intestinal flora of healthy people, various weight-loss operations, use of antibiotics, prebiotics and probiotics, etc. can adjust the structure of intestinal flora, it can prevent or even treat type 2 diabetes mellitus. Therefore, it is of practical significance to use intestinal flora as a new target for the treatment of type 2 diabetes mellitus.

**Key words:** intestinal flora; type 2 diabetes mellitus

2 型糖尿病的主要特征是由于人体内胰岛素分泌缺陷或胰岛素抵抗而引发血糖水平升高。随着病情进展可引发眼、肾、心脏、血管及神经组织慢性损害, 给患者精神和身体造成双重损害, 降低其生活质量。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: xxiaobing888@163. com。  
本文引用格式: 劳一, 李萍, 宁兴旺, 等. 肠道菌群与 2 型糖尿病的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(13): 1648-1651.