

LAMP 技术在动物病毒病原检测中的应用进展

周广舟¹,徐苏丽¹,谭晓荣¹,陈小兵²

摘要:环介导等温扩增技术(LAMP)是一种具有简单、快速、特异性强和扩增效率高的核酸检测技术,目前已在食品、卫生及疾病预防控制检验等领域得到了诸多应用。本文主要介绍了LAMP技术在实验及临床过程中检测肝炎病毒、流感病毒、HIV-1、狂犬病毒、乙脑病毒、冠状病毒、登革病毒等病毒病原感染的应用进展。

关键词:核酸;环介导等温扩增;病毒;检测

中图分类号:R373

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)02-0179-04

Progress in medicinal viruses detection by loop-mediated isothermal amplification technology

ZHOU Guang-zhou¹, XU Su-li¹, TAN Xiao-rong¹, CHEN Xiao-bing²

(1. College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;
2. The Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a new and simple nucleic acid detection technology with high specificity and efficiency, which has been applied in diagnosis of food poisoning, hygiene issues and infectious diseases. This paper mainly focuses on the development of LAMP detection technology for medicinal viruses such as hepatitis virus, influenza virus, HIV-1, rabies virus, Japanese encephalitis virus, coronavirus, dengue virus and so on.

KEY WORDS: nucleotides; loop-mediated isothermal amplification; virus; detection

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31101931, No. 81172240), the Plan for Science Innovation Talent of Henan University of Technology (No. 11CXRC13), and the High-level Talents Fund from Henan University of Technology (No. 2010BS016)

1 引言

环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是日本学者 Notomomi 等^[1]于 2000 年首先报道的一种新的核酸扩增技术。LAMP 技术采用能特异识别靶序列上 6 个位点的 4 条引物及 1 种具有链置换活性的 DNA 聚合酶,在恒温条件下(一般为 60~65 °C 左右)下,1 h 内其扩增效率可达到 $10^9 \sim 10^{10}$ 个数量级。区别于传统的 PCR 方法,LAMP 技术不需要昂贵的 PCR 仪器,特异性强、等温灵敏、操作简单、扩增反应时间较短且易于观察结果,利于在基层实验室推广使用等优点,近来在各类医学病原包括病毒、细菌、真菌、支原体

和寄生虫等传染性疾病的检测等领域得到了广泛的应用,在疫病诊断领域显示了广阔的应用前景。目前在医学(食品)微生物和寄生虫等领域的检测鉴定等方面已有较多的总结,如对日本血吸虫、副溶血弧菌等的检测^[2-3]。本文主要就在临床和科研实践中利用基于 LAMP 的技术对各类医学病毒的检测及鉴定工作的报道做一综述。

2 LAMP 技术在常见病毒病的检测应用

2.1 肝炎病毒 常见的如乙肝病毒和丙型肝炎病毒等均为常见的 RNA 病毒,可以通过血液和母婴传播等方式感染人而造成肝炎流行。临幊上目前对这类病毒的针对往往采取传统的 ELISA 方法和套式 RT-PCR 等方法进行检测,但往往由于低特异性和易交叉污染,结果往往并不可靠,造成临幊上的错检或漏检。李启明等^[4]利用 Reverse Transcription-LAMP(RT-LAMP)技术对 60 份经 Real-time PCR

国家自然科学基金(No. 31101931, No. 81172240)、河南工业大学科技创新人才培育计划(No. 11CXRC13)和河南工业大学博士启动专项基金(No. 2010BS016)联合资助

作者单位:1. 河南工业大学生物工程学院,郑州 450001;

Email:zhougzhou@gmail.com

2. 郑州大学附属肿瘤医院,郑州 450008

或 RT-PCR 验证阳性的血清样品进行检测, 阳性符合率达 98%, 检测灵敏度可达到 10 个拷贝的 RNA 分子。Lan 等^[5]对 68 个包括粪便、血清、肝脏和胆汁等样品内的 HEV 病毒进行检测, 检出限为 0.045 fg, 比巢式(nest)RT-PCR 的灵敏度高 100 倍。近来, 不同研究小组在对肝炎病毒的 RT-LAMP 检测上做了更多的探索和实践, 使之检测更灵敏快速^[6-7]。

2.2 流感病毒 流感是人类目前最重要的病毒性疾病之一, 每年几乎全世界 10%-20% 的人口都会遭受到季节性流感的侵袭并造成大约 50~100 万人的死亡, 带来巨大的经济负担。有效的流感病毒检测和疫苗接种是迅速建立人群免疫屏障、阻断流感大流行蔓延、减少和降低其危害性的有效手段。针对 2009 年大流行的 H1N1 流感病毒血凝素(HA)基因, Kubo 等^[8]建立了 HA 基因的 RT-LAMP 检测方法, 检测限与 TaqMan RT-PCR 类似, 达到目标 RNA 的 10 个拷贝/反应体系, 260 个样品中 RT-LAMP 检测到 136 个阳性, 灵敏度和特异性分别达到 97.8% 和 100%。最近, Hatano 等^[9]对 H1N1 流感病毒的 RT-LAMP 检测技术进行了新的改进和尝试, 使之操作更方便, 结果更精确。除此之外, 一些科学家还相继建立了 H5N1、H3 型猪流感病毒等多株人兽(鸟)共感染病毒的 RT-LAMP 检测技术^[10-11], 大大推动了对这些病原的鉴定及致病机制研究的进程。

2.3 艾滋病毒 Curtis 等^[12]设计了针对 HIV-1 病毒的 6 个蛋白酶和 p24 基因的特异性引物, 利用 RT-LAMP 技术直接检测细胞内和血清样品里的 HIV-1 病毒, 结果显示在 30 min 内就可实现对 HIV-1 DNA 和 RNA 的检测, 在 60 min 时间内每个反应体系的检测限为 10 和 100 个拷贝, 并且不需要核酸提取步骤, 节约了整个检测时间。最近, 该研究小组又建立了针对 HIV-1 特异性序列片段检测的 RT-LAMP 技术^[13]。Hosaka 等^[14]也建立了类似的针对 HIV-1 病毒 pol 整合酶基因的快速一步 RT-LAMP 检测技术。

2.4 狂犬病毒 狂犬病是迄今为止人类唯一病死率高达 100% 的急性传染病, 由狂犬病病毒引发的人与温血动物的一种急性、致死性的自然疫源性疾病。但由于狂犬病毒往往是较长的潜伏感染状态, 易造成检测不及时而未采取治疗措施引起死亡。国外对狂犬病毒的 RT-LAMP 检测鉴定工作在 2009 年就已开始有报道^[15-16]。在国内, 许丹等^[17]针对狂犬病毒 I 型核蛋白(N)保守区设计了 4 条识别靶序

列上 6 个位点的特异性引物, 建立了该病毒的 LAMP 检测方法, 结果显示, 病毒基因的最低检出量可达到 10 个拷贝数, 反应特异性较强, 已用于狂犬病毒的实验室检测和临床初步诊断。最近, 黄元等^[18]就狂犬病毒大转录酶蛋白基因(L)的高度保守区设计引物, 同样成功建立了该病毒的快速一步式 RT-LAMP 检测方法, 灵敏度比 RT-nest PCR 高 10 倍以上, 取得了较好的检测效果。

2.5 单纯疱疹病毒 单纯疱疹病毒(HSV)是一类能引起皮肤病和性病的常见病原体, 常见的有 I 型和 II 型两个血清型, 其中 I 型 HSV 在成年人血清中阳性率高达 85% 以上, 感染后引起人的疱疹性角膜炎、口唇疱疹、皮肤疱疹等。常用的血清学检测、病毒分离培养或 PCR 检测方法往往费时繁琐或需昂贵的仪器而不能大规模推广, 限制了这些技术的应用。周支香等^[19]提取 HSV-2 病毒基因组后, 设计了 4 条针对病毒糖蛋白基因的 LAMP 引物, 建立了检测 HSV 病毒的 LAMP 技术, 检测 HSV-2 的敏感性可达到 0.01 ng/μL。彭丁晋等^[20]利用 LAMP 技术检测了 3 例具 HSV-1 感染的临床样本, 同样显示了较好的检测效果。

2.6 冠状病毒 最具代表性的例子是已建立的针对的严重急性呼吸综合征病毒 SARS-CoV 的 LAMP 检测技术。Hong 等^[21]在 2003 年 SARS 流行期间搜集的 49 个病人的口漱液、咽拭子和鼻咽拭子样品中, RT-LAMP 的检测限为 0.01PFU, 灵敏度比传统的 RT-PCR 高 100 倍, 并且大多在不到 1 h 内完成检测, 最快的只有 11 min。此后, Poon 等^[22]还建立了新的 Real-time LAMP 技术来检测 SARS-CoV, 比较了传统的荧光定量 PCR 技术同 LAMP 技术的检测灵敏度差异, 结果显示并没有明显的分别, 提示 LAMP 技术可以作为一个实用简便的检测手段进行大规模应用。目前, 其它一些冠状病毒的 LAMP 检测方法也相继建立起来^[23-24]。

2.7 登革病毒 登革病毒(Dengue virus, DEN)是登革热、登革出血热/登革休克综合征(DHF/DSS)的病原体, 广泛流行于全球热带及亚热带的国家和地区, 已造成这些地区严重的公共卫生问题。为了快速检测和区分登革病毒血清型, Parida 等^[25]建立了一步法实时定量血清型特异性 RT-LAMP 检测方法, 分别用实时浊度仪监测、琼脂糖凝胶电泳、自然光和紫外光下肉眼观察 SYBR GreenI 颜色变化判定结果。对总共 63 例临床诊断病人和疑似病例血清样本的检测中发现, RT-LAMP 的检测灵敏度为 100%, 同比 RT-PCR 和病毒培养法检测提高

13%和19%，而且特异性也较高，能够确定不同血清型的登革病毒。

2.8 乙脑病毒 流行性乙型脑炎病毒，简称为乙脑病毒，本病毒首先于1953年在日本从患者脑组织中分离获得，又称为日本乙型脑炎(Japanese encephalitis virus, JBE)属于虫媒病毒黄病毒科黄病毒属，蚊是其传播的媒介和贮存宿主。不同的研究小组早在2006年就分别独立地建立了针对JEV病毒的RT-LAMP检测方法，并显示有较好的诊断效果^[26-27]。最近，Chen等^[28]就RT-LAMP诊断方法同传统RT-PCR和荧光定量PCR检测方法进行了比较分析。结果显示RT-LAMP的检测灵敏度同荧光定量PCR相当，但是传统RT-PCR的10倍，检测限达到24拷贝/微升。交叉检测也表明RT-LAMP技术的特异性也较高，同登革2型病毒、狂犬病毒、诺如病毒、星状病毒和人肠道71型病毒均无交叉反应，表明RT-LAMP技术可以作为临床分子水平检测的重要工具用于乙脑病毒的诊断。而Perera等^[29]利用RT-LAMP技术筛查携带病毒的蚊虫也取得了很好的效果，以整个蚊体为模板在30min内就可以快速简便地鉴定是否为携毒蚊。

2.9 其它病毒 近年来，学者们对其它的一些不常见的医学病毒也陆续建立了类似的LAMP检测方法用于病毒的鉴定和病例的诊断，如风疹病毒^[30]、诺如病毒^[31]、嗜T淋巴细胞病毒(HTLV)^[32]、柯萨奇病毒^[33]等，在特异性和灵敏度上都具很高的水平。

3 展望

当前，诸如SARS、人感染高致病性禽流感、新型H1N1流感等一些新发病毒性传染病疫情不断出现，对社会公众健康造成了严重损害。对这些影响大的传染病疫情，快速、准确地做出病原学诊断是及时有效控制疫情，将损害降到最低限度的保证。作为一种快速、简便、灵敏、特异，无需贵重检测设备而易普及的检测技术，LAMP诊断方法将在很大程度上发挥重要的作用。它的整个过程均在恒温条件下进行，避免了常规PCR对于温度循环的特殊要求所带来的各种不便。虽然对于某些病毒的检验，LAMP的灵敏度和特异性尚未超越荧光定量PCR等方法，但在很大程度上LAMP已经符合了临床所需的要求。

但LAMP检测技术同样存在一些不足，主要体现在：LAMP检测阳性反应呈现梯度条带，不像PCR呈现单带，一旦产生非特异性扩增则不易鉴别。此外，由于反应灵敏度高，外界物质的介入很容

易造成假阳性，尤其要防止电泳过程中气溶胶的污染。但是，随着LAMP技术的不断发展完善，必将在检验检疫乃至整个生物学检测领域占有一席之地，特别是在一些基层实验室、床边检测和流行病学调查等领域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 Acids Res, 2000, 28: e63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
- [2]Wang C, Yu CY, Ji MJ, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay of *Schistosoma japonica* DNA[J]. J Pathog Biol, 2010, 5(10): 749-753. (in Chinese)
- 王岑, 余传信, 季曼珺, 等. 环介导同温扩增检测全血日本血吸虫DNA的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(10): 749-753.
- [3]Yamazaki W, Kumeda Y, Uemura R, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Vibrio parahaemolyticus* in naturally contaminated seafood samples[J]. Food Microbiol, 2011, 28: 1238-1241. DOI: 10.1016/j.fm.2011.04.007
- [4]Li QM, Ma XJ, Zhou R, et al. Detection of HCV gene by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method [J]. Chin J Virol, 2006, 22(5): 334-338. (in Chinese)
- 李启明, 马学军, 周蕊, 等. 环介导逆转录等温扩增技术(RT-LAMP)在丙型感染病毒基因检测中的应用[J]. 病毒学报, 2006, 22(5): 334-338.
- [5]Lan X, Yang B, Li BY, et al. Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of hepatitis E virus[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47: 2304-2306. DOI: 10.1128/JCM.00498-09
- [6]Cai T, Lou G, Yang J, et al. Development and evaluation of real-time loop-mediated isothermal amplification for hepatitis B virus DNA quantification: a new tool for HBV management[J]. J Clin Virol, 2008, 41: 270-276. DOI: 10.1016/j.jcv.2007.11.025
- [7]Yang J, Fang MX, Li J, et al. Detection of hepatitis C virus by an improved loop-mediated isothermal amplification assay[J]. Arch Virol, 2011, 156: 1387-1396. DOI: 10.1007/s00705-011-1001-4
- [8]Kubo T, Agoh M, Mai LQ, et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus as a novel molecular method for diagnosis of pandemic influenza in resource-limited settings[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48: 728-735. DOI: 10.1128/JCM.01481-09
- [9]Hatano B, Goto M, Fukumoto H, et al. Mobile and accurate detection system for infection by the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus with a pocket-warmer reverse-transcriptase loop-mediated isothermal amplification[J]. J Med Virol, 2011, 83: 568-573. DOI: 10.1002/jmv.22031
- [10]Gu H, Qi X, Li X, et al. Rapid and specific detection of H3 swine influenza virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method[J]. J Appl Microbiol, 2010, 108: 1145-1154. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04520.x
- [11]Li QM, Ma XJ, Gao HC, et al. Evaluation of reverse tran-

- scription loop-mediated isothermal amplification for detection of avian influenza A H5N1 virus[J]. Chin J Virol, 2008, 24: 178-184.
- [12]Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-PCR)[J]. J Virol Methods, 2008, 151: 264-270. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.04.011
- [13]Curtis KA, Rudolph S, Owen SM. Sequence-specific detection method for reverse transcription, loop-mediated isothermal amplification of HIV-1[J]. J Med Virol, 2009, 81: 966-972. DOI: 10.1002/jmv.21490
- [14]Hosaka N, Ndemb N, Ishizaki A, et al. Rapid detection of human immunodeficiency virus type 1 group M by a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay[J]. J Virol Methods, 2009, 157: 195-199. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.01.004
- [15]Boldbaatar B, Inoue S, Sugiura N, et al. Rapid detection of rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Jpn J Infect Dis, 2009, 62: 187-191.
- [16]Saitou Y, Kobayashi Y, Hirano S, et al. A method for simultaneous detection and identification of Brazilian dog- and vampire bat-related rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay[J]. J Virol Methods, 2010, 168: 13-17. DOI: 10.1016/j.jviromet
- [17]Xun D, Yang ST, Feng N, et al. Establishment and application of loop-mediated isothermal amplification for rabies virus[J]. Chin J Vet Sci, 2010, 30(11): 1476-1479. (in Chinese)
许丹, 杨松涛, 冯娜, 等. 狂犬病病毒 LAMP 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(11): 1476-1479.
- [18]Huang Y, Xiang H, Chen J, et al. Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of rabies virus[J]. Chin J Zoonoses, 2011, 27(2): 108-111. (in Chinese)
黄元, 向华, 陈晶, 等. 狂犬病病毒核酸 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(2): 108-111.
- [19]Zhou ZX, Jiang H, Wang JP, et al. Detection of herpes simplex virus type 2 DNA with loop-mediated isothermal amplification assay[J]. J Univ South China (Med ed), 2010, 38(2): 180-182. (in Chinese)
周支香, 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.
- [20]Peng DJ, Luo YF, Zhou ZX, et al. Detection of herpes simplex virus type 2 DNA with a loop-mediated isothermal amplification assay[J]. J Pathog Biol, 2011, 6(2): 101-103. (in Chinese)
彭丁晋, 罗永富, 周支香, 等. 环介导等温扩增技术检测单纯疱疹病毒 I 型的应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(2): 101-103.
- [21]Hong TC, Mai QL, Cuong DV, et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42: 1956-1961. DOI: 10.1128/JCM.42.5.1956-1961.2004
- [22]Poon LL, Wong BW, Chan KH, et al. Evaluation of real-time reverse transcriptase PCR and real-time loop-mediated amplification assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus detection[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43: 3457-3459. DOI: 10.1128/JCM.43.7.3457-3459.2005
- [23]Li P, Ren X. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of transmissible gastroenteritis virus[J]. Curr Microbiol, 2011, 62: 1074-1080. DOI: 10.1007/s00284-010-9825-9
- [24]Pyrc K, Milewska A, Potempa J. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of human coronaviruses-NL63[J]. J Virol Methods, 2011, 175: 133-136. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.04.024
- [25]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: 2895-2903. DOI: 10.1128/JCM.43.6.2895-2903.2005
- [26]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: 379-387.
- [27]Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, et al. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44: 4172-4178. DOI: 10.1128/JCM.01487-06
- [28]Chen Z, Liao Y, Ke X, et al. Comparison of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, conventional PCR and real-time PCR assays for Japanese encephalitis virus[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38: 4063-4070. DOI: 10.1007/s11033-010-0525-0
- [29]Perera N, Aonuma H, Yoshimura A, et al. Rapid identification of virus-carrying mosquitoes using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification[J]. J Virol Methods, 2009, 156: 32-36. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.10.023
- [30]Mori N, Motegi Y, Shimamura Y, et al. Development of a new method for diagnosis of Rubella virus infection by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44: 3268-3273. DOI: 10.1128/JCM.00803-06
- [31]Fukuda S, Takao S, Kuwayama M, et al. Rapid detection of Norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44: 1376-1381. DOI: 10.1128/JCM.44.4.1376-1381.2006
- [32]Bai ST, Zhang MY, Wei TZ, et al. Detection of human T-cell lymphotropic virus with loop-mediated isothermal amplification [J]. Chin J Blood Transfusion, 2008, 21(7): 516-518. (in Chinese)
白松涛, 张梦妍, 魏天佐, 等. 人类嗜 T 淋巴细胞病毒 LAMP 检测方法的应用研究[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(7): 516-518.
- [33]Nie K, Zhang K, Luo L, et al. Visual detection of human enterovirus 71 subgenotype C4 and Coxsackievirus A16 by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with the hydroxynaphthol blue dye[J]. J Virol Methods, 2011, 175: 283-286. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.05.020