



本栏目主持人: 胡藕祥

zgdwjy@sina.com

荧光环介导逆转录等温扩增(RT-LAMP)技术在病毒性出血性败血症(VHS)诊断中的应用

安元龙¹, 吴 斌², 林长军², 肇慧君²

(1.大连工业大学, 辽宁大连 116034; 2.辽宁出入境检验检疫局, 辽宁大连 116001)

摘 要:运用GenieII实时荧光等温扩增检测系统,以LAMP法荧光检测为基础,建立了对病毒性出血性败血症病毒进行荧光实时反转录环介导等温扩增检测方法。根据对VHSV病毒N基因序列的分析,针对病毒的高保守区域的6个特异性序列,设计了3对特异性引物,同时加入dsDNA混合染料,对核酸扩增过程进行实时荧光监控。该方法的特异性良好,与其他鱼类弹状病毒无交叉反应。敏感度高,检测限为20 fg RNA模板。实验结果表明该方法是一种操作简单、快速高效、高特异性高灵敏度的病毒检测方法。

关键词:病毒性出血性败血症病毒; 荧光逆转录LAMP法; 诊断

中图分类号: S941.413 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-944X(2012)12-0023-04

Application of Fluorescent Real-time Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Haemorrhagic Septicaemia

An Yuanlong¹, Wu Bin², Lin Changjun², Zhao Huijun²

(1.Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning, 116034;

2.Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian, Liaoning, 116001)

Abstract: Using GenieII real-time fluorescence isothermal amplification detection system and based on LAMP fluorescent detection, a fluorescent real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay was established for detection of haemorrhagic septicaemia. According to highly conserved regions of nucleoprotein gene of VHSV, three specific primers were designed and, the nucleic acid amplification process was monitored in real-time fluorescent by adding the dsDNA mixed dye. This method was of high specificity, and could not amplify other rhabdoviruses of fish. The detection limit of this assay was 20fg VHSV RNA. The experiment results showed that this method was simple in operation, characterised by rapidity and efficiency, high specificity and sensitivity.

Key words: viral haemorrhagic septicaemia virus, VHSV; fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification; detection

病毒性出血性败血症(viral haemorrhagic septicaemia, VHS)是由弹状病毒引起鲑、鳟、狗鱼和大菱鲆等数十种鱼类的一种烈性传染病,表现为出血性败血症,致死率达90%~100%。本病主要流行于北半球,是世界动物卫生组织(OIE)要求须申报的疫病,我国将其列为二类疫病。

目前国际上检测病毒性出血性败血症病毒通常采用的方法是细胞培养分离病毒法、血清学方法、反转录聚合酶链反应法^[1]以及酶联免疫吸附试验^[2]。细胞培养分离VHSV法结果可靠,但是检测周期长,不适用于快速鉴别诊断,普通PCR方法操作繁琐,不能满足快速、

敏感的检测要求。环介导等温扩增(LAMP)技术的问世解决了核酸诊断上出现的诸多难题^[3],以其高效性、高特异性和反应快速的特点被广泛应用于各种鱼类病原体。本文应用GENIE II等温扩增荧光检测系统对LAMP产物进行荧光检测,在扩增反应中加入特异性荧光双链集合染料,扩增产物可做熔解曲线分析特异性。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞系

病毒性出血性败血症病毒(VHSV)、传染性造血组织坏死病病毒(infectious haematopoietic necrosis virus, IHNV)、传染性胰脏坏死病毒(infectious

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技项目(2010IK003)

pancreatic necrosis virus, IPNV)和鲤春病毒(spring viraemia of carp virus, SVCV)及鲤鱼上皮瘤细胞系(EPC)均由辽宁出入境检验检疫局实验室保存。

1.2 试剂与仪器

OptiGene Limited Genie II等温扩增荧光检测系统;英国OptiGenie Limited 公司Isothermal Mastermix (IMM)等温扩增试剂;DL2000 DNA marker、dNTPs (dA TP, dGTP, dCTP , dTTP)、Taq DNA聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖购自美国Promega公司;Isothermal Mastermix购自英国OPTIHENE公司。

1.3 引物设计

选取病毒性出血性败血症病毒的糖蛋白基因序列,针对病毒的高保守区域的6个特异性序列(3'端的F3c、F2c、F1c以及5'端的B1、B2、B3),用 Primer Explorer V3 软件设计6条引物,分别为正向内引物(FIP)、反向内引物(BIP)、正向外引物(F3)、反向外引物(B3)、正向环引物(LF)及反向环引物(LB)。环引物的存在可以明显加快反应速度,其主要原理是LB的引物位置位于B1和B2之间,方向为B1→B2,环引物可以与茎2环结构杂交,启动DNA合成中的链置换过程,从而缩短反应时间^[4]。引物序列见表1。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 1 引物序列

引物名称	序列 (5'-3')
FIP	GCGGAGAGTGCATCCACAAGTGGAGCTCATCGTGTATG
BIP	TACAGGCGTTGTCCGTGCTTCTAGGTCTCCTGTGTG
F3	AGGGACGGGTACTTGTAC
B3	CATGTCTGTGAGGACCTTG
LF	CACCTTCCTGTCTTCCTCAC
LB	TCTCTCCTATGTACTCCAAGGG

1.4 RNA提取

用TRIZOL分别从感染IHN、IPNV、VHSV和SVCV的EPC细胞中提取各种病毒的RNA。

反应总体系25 μL, FIP/BIP(40 pmol/μL)、B3/F3(5 pmol/μL)、LF/LB(20 pmol/μL)各1 μL,模板5 μL,逆转录酶0.25 unit,英国OPTIHENE 公司等温扩增试剂Isothermal Mastermix 15 μL,将混合物在63 ℃进行扩增,并观察分析荧光检测系统绘出的扩增曲线。具有“S”型曲线者为阳性,不具“S”型曲线者为阴性。

1.5 特异性分析

分别提取VHSV、IPNV、IHN、SVCV的RNA,以其为模板进行荧光RT-LAMP反应,同时设立灭菌水为空白对照。对其扩增结果进行鉴定,观察是否有交叉反应,分析该方法的特异性。

1.6 灵敏性分析

将提取的VHSV的RNA用紫外分光光度计测其在

260 nm波长处的OD值,计算RNA的浓度为2×10⁷fg,将其进行10倍梯度系列稀释 ,得到模板质量浓度分别为: 2×10⁷fg、2×10⁶fg、2×10⁵fg、2×10⁴fg、2×10³fg、2×10²fg、2×10¹fg,进行LAMP 与常规RT-PCR反应,以确定并比较二者的检测限。

常规RT-PCR 采用OIE所推荐PCR用引物对(F1/R1)对10倍系列梯度稀释的VHSV的RNA模板进行扩增,该对引物可扩增出811 bp的核酸片段。常规RT-PCR反应体系包括:2 μL 5×M-MLV buffer(TaKaRa, 大连),5 μL 10 mmol/L dNTP(TaKaRa, 大连),0.5 μL 40 U Ribonuclease inhibitor(TaKaRa),0.5 μL 200 U Reverse Transcriptase M-MLV(TaKaRa, 大连),0.5 μL Taq DNA 聚合酶,0.5 μL上游引物F1,0.5 μL下游引物R1,5.0 μL RNA模板,补DEPC水至50 μL。PCR反应程序为:42 ℃ 60 min;95 ℃ 5 min ;之后95 ℃ 30 s ,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min共进行35个循环,最后72 ℃ 10 min终止反应。

2 结果与分析

2.1 荧光RT-LAMP检测

如图1所示,阳性的样品出现了“S”型扩增曲线,而阴性对照没有出现“S”型扩增曲线。

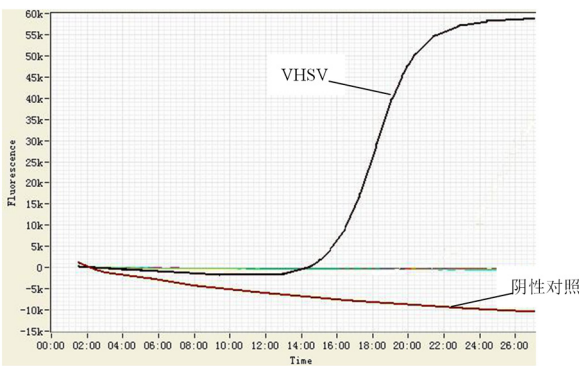


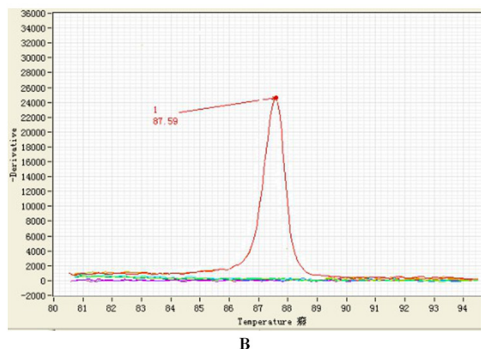
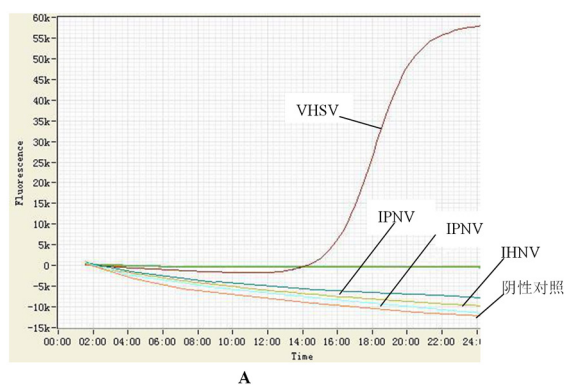
图 1 VHSV的荧光RT-LAMP扩增曲线

2.2 特异性试验

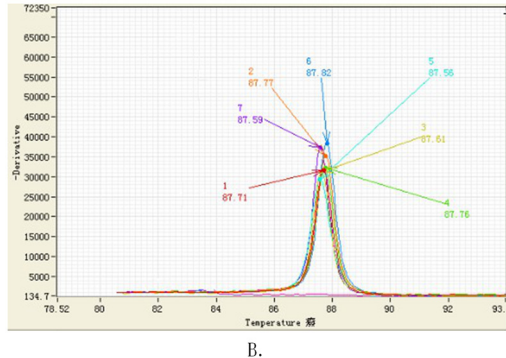
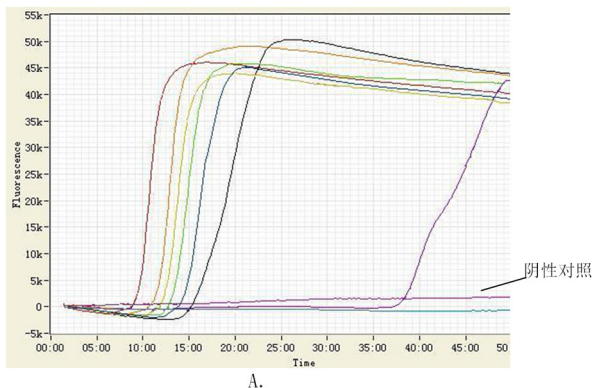
由图2A所示,VHSV、IPNV、IHN、SVCV 4种病毒样品的扩增结果,只有VHSV出现了“S”型曲线,而其它3种病毒都没有发生扩增,说明设计的LAMP引物具有良好的特异性。再通过熔解曲线对产物特异性进行分析(图2B),只有阳性样品产生特异的熔解曲线。

2.3 灵敏度试验

图3为荧光RT-LAMP的灵敏度检测结果,由图3A可见,单拷贝模板也出现“S”型扩增曲线;图3B为荧光RT-LAMP灵敏度检测中7个稀释度样品的熔解曲线,由于4种引物都是针对VHSV特有的保守序列设计的,因此发生扩增的产物的熔解温度(T_M)值应一致。结合扩增曲线和熔解曲线进行分析,可得出该方法能检测出20 fg的病毒RNA模板。

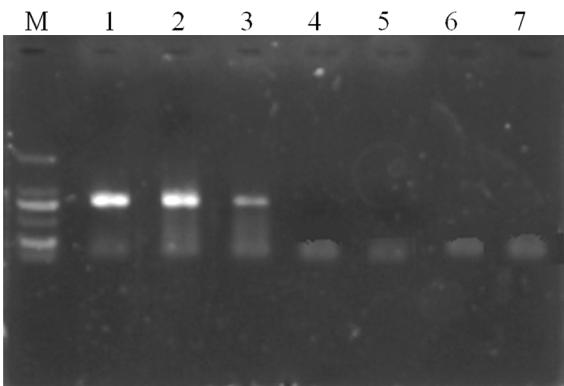


A. 特异性试验扩增曲线；B. 特异性试验溶解曲线。
图 2 VHSV 荧光LAMP的特异性试验



a. 灵敏度试验扩增曲线. 从左到右依次为 2×10^7 — 2×10^2 fg标准品模板
b. 灵敏度试验溶解曲线. 1-7: 分别为 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , $\times10^2$, 2×10^1 fg标准品模板
图 3 VHSV 荧光LAMP的灵敏度试验

图4为普通RT-PCR灵敏度检测结果, 根据引物的设计, 扩增的目的基因为811 bp, 通过电泳图可看出其最低可检测到 2×10^5 fg的病毒RNA模板。



M.DL2000 DNA marker; 1-6: 2×10^7 — 2×10^2 fg; 7. 阴性对照。
图 4 普通RT-PCR灵敏度检测结果

3 讨论

自2000年环介导等温扩增技术问世以来, 以其高效、高特异性、操作简单、反应快速准确等优势被广泛应用于对病毒, 细菌, 寄生虫以及环境中细菌等病原体的检测研究, 取得了可喜的成就^[5]。

该试验中应用实时荧光等温扩增检测系统建立对病毒性出血性败血症病毒(VHSV)的检测方法。该方法利用荧光染料插入双链DNA后即可产生荧光信号的特性, 使得扩增产物与荧光信号的实现同步, 更重要的是对样品的扩增结果可通过荧光信号直接读取, 不再需要电泳法、染料显色法以及浊度法进行判定, 使得操作者远离了溴化乙锭、紫外灯等对身体的危害, 简化了检测步骤也节省了一部分检测成本; 该试验运用GenieII实时荧光等温扩增检测仪, 实现了对病毒从始至终全封闭式的检测; 该研究还结合溶解曲线及TM值的分析, 由于扩增产物的序列长度和碱基中GC的含量等因素决定了溶解曲线的TM值, 特异性的扩增产物具有固定的TM值, 因此该方法在很大程度上弥补了普通LAMP由于人为操作过程中对样品造成污染以及非特异性扩增引物二聚体等产生的荧光信号而出现假阳性的现象。

该研究选取G基因序列设计引物, 建立的病毒性出血性败血症病毒的RT-LAMP荧光检测方法, 与IPNV、IHN和SVCV均没有出现交叉反应(IPNV、IHN、SVCV与病毒性出血性败血症病毒同属弹状病毒科, 亲缘关系较近), 表明设计的引物特异性好, 能够满足检测要求。在灵敏度试验中, 该方法最低能够检测出20 fg的RNA模板, 其检测限远远高于普通PCR检测方法。

综上所述, 该试验建立的VHSV的荧光环介导逆转录等温扩增检测方法具有便捷、灵敏、特异性高等优点, 不需要昂贵的仪器, 在短时间内便能完成检测, 适用于我国进出口岸进行快速检验检疫, 保护水生动物

(下转第 38 页)

病学调查,然而其不能与SAT相互替代。SAT自Wright建立以来一直是各国诊断布鲁氏菌病的常规血清学诊断方法,在布鲁氏菌病的检测和控制规划中发挥了巨大的作用。实践证明,SAT是比较稳定、特异,且较敏感的一种方法,可以检测人畜血清中的抗布鲁氏菌IgG、IgM和IgA3类免疫球蛋白抗体,但主要检测的是IgM和IgG2型抗体,且SAT检测IgM的敏感性显著高于IgG2,因此可作为人畜布病的早期诊断,同时可用于人畜布病疫苗免疫后机体最早出现血清抗体的检测,若多次做SAT,血清中凝集价不断升高,则诊断意义更大。

对于血清学诊断,虽说方法很多且各具特色,但都存在一定局限性,目前还没有一种单一方法能适用于任何情况下的布鲁氏菌病监测,而且各种血清学诊断技术也不能相互取代。因此关于布鲁氏菌病的诊断,采用综合诊断方法为宜,各国有所差异^[8]。澳大利亚牛布鲁氏菌病的诊断采用RPBT、平板凝集试验(PAT)作初步筛选,出现阳性动物则进一步用补体结合试验(CFT)和酶联免疫吸附试验(ELISA)试验进行确诊;美国通常用SAT、PAT,然后根据不同情况采用2-巯基乙醇试验(2-MET)、CFT等;而在我国,实际上也趋向于主张用RBPT初筛,然后用SAT或CFT作综合诊断。血清学诊断的最大缺陷是很难区分自然感染、人工免疫以及一些非布氏杆菌感染产生的抗体,这方面的研究有待于进一步深入。本研究利用RBPT和MRT用于筛选布病阳性的畜群和个体动物,尤其对于奶牛采集牛奶即可进行监测,省去了采血、分离血清等步骤,但由于特异性不高,受试验温度和凝集时间相对较短的影响,不易准确判定结果,故对RBPT和MRT阳性畜及可疑畜,还必须经SAT重复检测为阳性才能最终判定为阳性。实际工作中由于SAT可能出现假阳性或假阴性反应,并不是所有感染的动物都出现具有诊断意义的抗体水平,因而易造成误诊和漏诊,必须进行综合诊

断。青海是布病的高发地区,有效的监测是预防和控制布鲁氏菌病的重要手段,研究适合基层应用的检测方法也是海西州一直以来高度重视的问题,本实验三种检测方法的联合使用适合海西地区大样本的布鲁氏菌病的监测,为基层布鲁氏菌病监测方案的研究提供了技术支持和理论依据。

参考文献:

- [1] 林瑞炮,林冰影.人畜(兽)共患性疾病[M].浙江:浙江大学出版社,2007.
- [2] 宋翠平,徐辉,王志亮,等.检测布氏杆菌病的四种血清学方法比较及国际标准单位的应用[J].中国动物检疫,2003,20(2): 25-27.
- [3] Al Dahouk S, Tomaso H, Nockle rK, et al. Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature, Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp[J]. Clin Lab, 2003, 49(9/10): 487-505.
- [4] Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K, et al. Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature, Part II: serological tests for brucellosis[J]. Clin Lab, 2003, 49(9/10): 577-589.
- [5] Jacques I, Olivier-Bernardin V, Dubray G. Efficacy of ELISA compared to conventional tests(RBPT and CFT) for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep[J]. Vet microbiol, 1998, 64(1): 61-73.
- [6] Nielsen K H, Duncan J R, Stemshorn B W. Non-specific reactions to the *Brucella abortus* SAT[J]. Vet Rec, 1985, 116(20): 550-552.
- [7] 孟茹,陈创夫,张辉,等.布氏杆菌和结核杆菌二重实时荧光定量PCR检测方法的建立与初步应用[J].畜牧兽医学报,2010, 41(8): 1012-1017.
- [8] 王栋.布鲁氏菌常用血清学检测方法的评价[J].农业技术与装备,2010(6): 59-60.

被引格式:

胡双龙.青海海西州地区牛羊布鲁氏菌病监测方案的研究[J].中国动物检疫,2012,29(12): 36-38.

(上接第 25 页)

贸易和水产养殖业的可持续性发展。

参考文献:

- [1] 张永乐,潘克女,徐岱,等.手足口病病原体实时荧光RT-PCR反应体系的建立与临床应用[J].中华微生物学和免疫学杂志,2009,29(3): 276-278.
- [2] Kouma Vesely T, Psikal I, et al. Identification of spring viraemia of carp virus(SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR[J]. Dis Aquat Organ, 2003, 55(3): 229-235.
- [3] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.

- [4] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(1): 150-154.
- [5] 李琼,岳志芹,凌宗帅,等.淋巴囊肿瘤病毒环介导等温扩增检测方法的建立与应用[J].华中农业大学学报,2009,29(3): 341-345.

被引格式:

安元龙,吴 斌,林长军,等.荧光环介导逆转录等温扩增(RT-LAMP)技术在病毒性出血性败血症(VHS)诊断中的应用[J].中国动物检疫,2012,29(12): 23-25.