

RT- LAMP 检测甲型 H1N1 病毒核酸 几种结果判定方法

付文亮 蔡欣 查磊 高杰 洪明 邹民吉 李伍举 徐东刚 吴奎武

摘要 目的 比较 RT- LAMP 检测甲型 H1N1 流感病毒核酸几种不同的结果判定方法的差异, 优化检测方法。方法 利用已知的阳性病毒样本, 对比电泳、直接观察、加入 SYBR GREEN N 核酸染料和优化后的预染核酸染料和的检测灵敏度。结果 电泳检测的灵敏度最高, 加入 SYBR GREEN N 染料的灵敏度略低, 而直接的肉眼观察灵敏度低约 2 个数量级。加入优化后的预染染料其检测灵敏度与加入 SYBR GREEN N 核酸染料相当。结论 电泳法检测的灵敏度最高, 可通过加入优化后的预染染料提高目测判定反应结果的灵敏度, 增强反应的特异性, 并可降低气溶胶污染。

关键词 甲型 H1N1 流感病毒 RT- LAMP 结果判定

Comparable Study on Determination Methods for Detection of Influenza A(H1N1) Virus Nucleic Acid by RT- LAMP. Fu Wenliang, Cai Xin, Zha Lei, Gao Jie, Hong Ming, Zou Minji, Li Wujun, Xu Donggang, Wu Kuiwu. Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract Objective Four different determination process were compared to optimize method of detection for influenza A(H1N1) virus nucleic acid by RT- LAMP. Methods With the confirmed positive samples, the detection sensitivity of specific nucleic acid by direct visual observation, adding dyes after reaction, electrophoresis, and adding optimized dye in reaction mixture before reaction were analyzed. Results Electrophoresis detection was the most sensitive among four detection methods, and the sensitivity of adding SYBR GREEN N dye after reaction was inferior to it. However, the sensitivity of direct visual observation was 100 fold lower than that of electrophoresis detection. The sensitivity of adding optimized dye in reaction mixture before reaction was comparable to that of adding dyes after reaction. Conclusion Electrophoresis is the most sensitive determination method of LAMP. The visual observation sensitivity of RT- LAMP can be improved by adding the optimized dye before reaction, while the specificity can be enhanced, and the aerosol contamination can also be diminished.

Key words A(H1N1) influenza virus, RT- LAMP, Result determination

甲型 H1N1 流感的暴发对人类健康造成严重威胁, 为了更好地进行传染病防控, 减少不必要的忧虑和社会恐慌, 建立和完善传染病预警体系至关重要。因此快速特异的病原体检测技术越来越受到各国的重视。核酸扩增技术是生命科学领域最具价值的工具之一, 已被广泛应用于病原微生物的检测。包括: PCR^[1]、RT- PCR、核酸序列扩增^[2] (nucleic acid sequence- based amplification, NASBA)、自序列复制^[3] (self- sustained sequence replication, 3SR)、链置换扩增^[4] (strand displacement amplification, SDA) 及环等温介导扩增 (Loop- Mediated Isothermal Amplification, LAMP) 等方法。LAMP 法是 2000 年 Notomi 等^[5] 开

发的一种新的核酸扩增方法, 它利用有链置换活性的 Bst 聚合酶, 可以在 1h 内在恒温条件下特异地扩增 DNA 到 10⁹ 个拷贝, 该方法以其操作简便, 灵敏度高, 特异性强, 不需要昂贵的仪器等特点备受推崇。由其衍生的 RT- LAMP 方法可以用于病毒 RNA 的检测, 扩大了其应用范围。由于该方法扩增效率高, 在反应完成后结果判定的操作中易造成气溶胶污染, 因此, 寻求更好的结果判定方法是一个亟待解决的问题。本研究就 RT- LAMP 不同的结果判定方法进行了对比分析。

材料与方法

1. 试剂: AMV 反转录酶, dNTPs 等购自 TaKaRa; Thermo Buffer, Bst 聚合酶购自 NEB 公司; SYBR Green I 染料购自 invitrogen; MgSO₄, Betaine 购自 Sigma; MnCl₂, 钙黄绿素等购自北京化学试剂公司。

2. 引物设计及合成: 使用 BioSun 软件对报道的首例甲型

作者单位: 100850 北京, 军事医学科学院基础医学研究所

通讯作者: 徐东刚, 电子信箱: xudg@nic.bmi.ac.cn 吴奎武, 电子

信箱: wkw@nic.bmi.ac.cn

H1N1病毒核酸序列与 GenBank病毒库中数据进行对比, 针对 HA 区设计特异的 LAMP 引物, 4条引物分别为: F1P: 5c- gtct2 ggggaatatctcaaacctttttatgatgaggagc taagagagc- 3c B1P: 5c- caaag2 ggtaacggcatttgaatttcctttttaac tagcca - 3c F3 5c - tcagacaatg2 gaacgtgtt- 3c B3: 5c- ctttcctttatca ttaatgttagga- 3c. 引物由合成 TaKaRa 公司合成。

3 检测模板及定量: 甲型 H1N1 病毒核酸样本由军事医学科学院疾病预防与控制研究所提供。对提取的 RNA 测定 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀, 通过公式计算 RNA 浓度与纯度, 将 RNA 进行 10 倍梯度稀释, 以 10、10²、10³、10⁴ 拷贝/微升做为模板用于检测不同结果判定方法的灵敏度。

4 RT- LAMP 反应体系的建立: 利用 LAMP 技术原理^[6], 同时添加 AMV 反转录酶, 使其在恒温条件 (62℃) 同时进行 RNA 反转录和 DNA 的扩增。其基本反应体系为: 反应缓冲液 13L (包含 Thermo Buffer, MgSO₄, Beta inc, dNTPs 等), 引物混合物 4L, 模版 1L, AMV 反转录酶 1L, Bst 酶 1L, 加除 RNase 无菌水至 25L 为防止污染, 可在反应液配好后用石蜡液封。

5 反应结果的判定: (1) 琼脂糖凝胶电泳判定结果: 取 RT- LAMP 产物 3L 加入上样孔中, 在 5V/cm 电压下进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶浓度为 1.3%。阳性结果可见梯状条带。(2) 观察沉淀判定结果: 反应完成后将反应管置于光线充足的环境中以黑色或深色背景观察溶液浑浊度, 出现白色沉淀为阳性, 清澈透明为阴性。(3) 加入核酸染料判定结果: 向反应产物中加入 1L 11000 @SYBR GREEN N, 将反应管置于光线充足并辅以深色背景观察, 若结果为阳性, 可见绿色荧光, 阴性则为橘色荧光。(4) 加入预染染料判定结果: 染料使用 MnCl₂ 和叶黄绿素分别按照 12.5mmol/L 和 0.625mmol/L 配制成 25 @染色液^[5], 经优化后, 反应前加入该染料 1L 待反应结束后取出反应管置于光线充足辅以深色背景观察结果, 橘红色为阴性, 绿色为阳性。

结 果

1 电泳检测法: 使用 1.3% 变性琼脂糖凝胶在 5~ 10V/cm 电压下电泳 20min 检测反应产物。从 10~ 10⁴ 拷贝均有阶梯状条带出现, 说明电泳方法灵敏度可低至 10 拷贝以下, 见图 1。

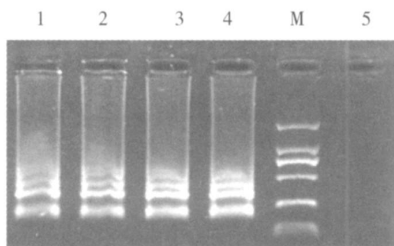


图 1 电泳检测不同模板浓度阳性模板
M DL2000 1 10 拷贝; 2 10² 拷贝; 3. 10³ 拷贝;
4. 10⁴ 拷贝; 5. 阴性对照

2 肉眼观察焦磷酸镁沉淀法: 反应完成后取出观察结果 (图 2), 可见 10 拷贝观察不到沉淀, 10² 拷贝有少量沉淀, 10³、10⁴ 拷贝可见沉淀出现。检测灵敏度与电泳法相比低 2~ 3 个数量级。

3 反应后加荧光染料法: 反应结束后加入荧光染料观察颜色变化 (图 3), 可见 10 拷贝染色结果为阴性, 10²~ 10⁴ 结果均为阳性, 检测灵敏度较观察焦磷酸镁沉淀法高约 1 个数量级。

4 反应前加染料法: 反应完成后取出观察结果见图 4, 可见 10 拷贝颜色出现变化但与阴性对照相比差异不明显。10²~ 10⁴ 拷贝均为阳性。其灵敏度与 SYBR Green N 相当。

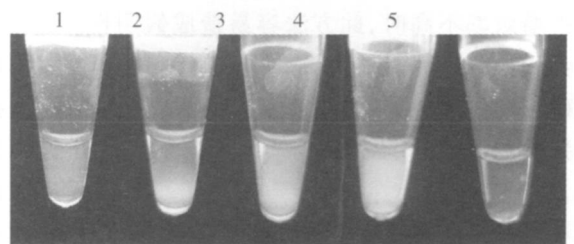


图 2 通过焦磷酸镁沉淀判定检测结果

1. 10 拷贝; 2. 10² 拷贝; 3. 10³ 拷贝; 4. 10⁴ 拷贝; 5. 阴性对照

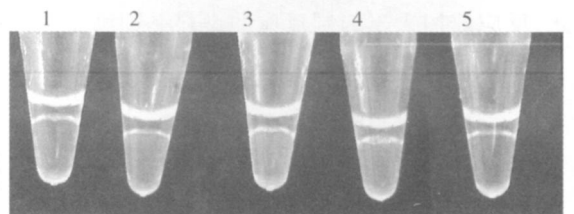


图 3 加入荧光染料染色后判定检测结果

1. 10 拷贝; 2. 10² 拷贝; 3. 10³ 拷贝; 4. 10⁴ 拷贝; 5. 阴性对照

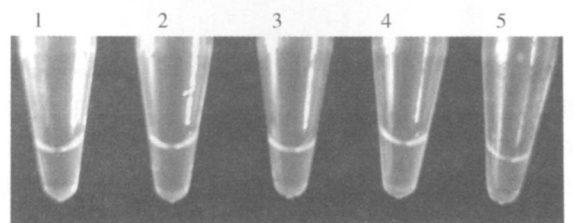


图 4 反应前加入优化后的染料进行结果判定

1. 10 拷贝; 2. 10² 拷贝; 3. 10³ 拷贝; 4. 10⁴ 拷贝; 5. 阴性对照

讨 论

LAMP 具有操作简便, 灵敏度高, 特异性强等优点。由于其灵敏度高, 容易造成气溶胶污染是限制其广泛应用的主要问题, 因此检测后不开盖进行结果判

定测将是其发展的趋势。

RT-LAMP扩增反应中可以形成可视的焦磷酸镁白色沉淀,因此肉眼也可进行结果判别^[7]。目前,日本已利用这种特性研制出专门用于LAMP检测的实时监控浊度仪,可以实现对LAMP扩增过程的全程实时监控,但其价格昂贵不适于推广应用。利用电泳检测法判定结果具有灵敏度高的优点,对于一些弱阳性样本或扩增效率较低时的结果判定具有良好效果。其缺点是需要电泳设备和时间,并且要开盖检测,而此过程易产生气溶胶污染,影响后续实验。通过肉眼观察焦磷酸镁沉淀进行结果判定简便易行,反应后不用开盖,避免了气溶胶污染,但此方法判定结果比电泳检测灵敏度低2~3个数量级,在模板拷贝数很低或扩增效率不高时,此方法容易造成假阴性。反应后加荧光染料法的优点是灵敏度较高,在直接观察不能准确判断结果时,加入荧光染料可增加其可视性,提高判断的准确度;缺点是需要反应完成后开盖加染料,易产生气溶胶污染。反应前加染料法在反应完成后不需开盖即可观察结果,避免了气溶胶污染,同时该染料经优化后,阴阳性色差明显,更容易判断结果,避免了前3种方法的缺点。

从临床诊断需求来说,大部分检测只需要定性,因此,反应前加入不抑制反应的染料是即满足检测的

灵敏度需求,又可避免气溶胶污染,同时价格低廉的结果判定方法,在未来的LAMP诊断试剂中有较大的发展空间,有望在临床诊断上得到广泛应用。

参考文献

- 1 Saki RK, Scharf S, Fabona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230: 1350-1354
- 2 Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991, 350: 91-92
- 3 Guatelli JC, Whitfield KM, Kwok DY, et al. Isothermal in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990, 87: 1874-1878
- 4 Walker GT, Fraiser MS, Schram L, et al. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme-DNA polymerase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992, 89: 392-399
- 5 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000, 28: e63
- 6 Tomita N, Mori Y, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocols* 2008, 3(5): 877-882
- 7 Toriwa H, Komaya T. Rapid detection and quantification of Japanese encephalitis virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol Immunol* 2006, 50(5): 379-387

(收稿: 2010-01-01)

(修回: 2010-03-15)

获得性食管气管瘘食管改道术后旷置食管结构及屏障功能研究

杨光 白光振 李小飞 王小平 周勇安 韩勇 姜涛 程庆书

摘要 **目的** 探讨获得性食管气管瘘(tracheoesophageal fistula, TEF)食管改道术后旷置段食管组织结构及屏障功能的变化情况。**方法** 对15只瘘旷置(A组)杂种犬、15只食管单纯旷置(B组)杂种犬及5只正常(C组)杂种犬的旷置段食管及正常食管进行大体标本、HE染色、透射电镜(TEM)、扫描电镜(SEM)、硝酸钨示踪观察研究。**结果** A组与B组犬旷置段食管组织结构及屏障功能变化一致。A、B组与C组相比:①食管组织结构发生改变,黏膜下层腺体减少、缺失;②细胞间隙增宽,桥粒数目减少,屏障功能降低,但基膜完整未见破坏,钨颗粒未能突破;③细胞间隙极易见到钨颗粒填充,呈线状分布。**结论** 对于难治性获得性TEF,食管旷置术并食管改道术是简便、可行、有效的方法,术后并发症少,值得推广应用。

关键词 瘘 旷置 屏障功能

The Research of Structure and Esophageal Barrier Function of Excluded Esophagus after Esophageal Diversion Surgery in Acquired Tracheoesophageal Fistula Yang Guang, Bai Guangzhen, Li Xiaofei, Wang Xiaoping, Zhou Yong'an, Han Yong, Jiang Tao, Cheng Qingshu

作者单位: 710038 西安, 第四军医大学唐都医院胸腔外科

通讯作者: 程庆书, 电子信箱: cheches@fmmu.edu.cn