

- [26] Waswa J, Irudayaraj J, DebRoy C. Direct detection of *E. Coli* O157 : H7 in selected food systems by a surface plasmon resonance biosensor[J]. LWT, 2007, 40(2): 187-192.
- [27] Thillaiyinayagalingam P, Gommeaux J, McLoughlin M, et al. Biopharmaceutical production: Applications of surface plasmon resonance biosensors[J]. J Chromatogr B, 2010, 878(2): 149-153.
- [28] Gutiérrez-Gallego R, Bosch J, Such-Sanmartín G, et al. Surface plasmon resonance immuno assays-A perspective [J]. Growth Horm IGF Res, 2009, 19(4): 388-398.
- [29] Xiang GS, Zhang N, Zhou XD. Localized surface plasmon resonance biosensing with large area of gold nanoholes fabricated by nanosphere lithography[J]. Nanoscale Res Lett, 2010, 5(5): 818-822.
- [30] Beattie J, Phillips K, Shand JH, et al. Molecular interactions in the insulin-like growth factor(IGF) axis: a surface plasmon resonance (SPR) based biosensor study[J]. Mol Cell Biochem, 2008, 307(1/2): 221-236.
- [31] Springer T, Sipova H, Vaisocherova H, et al. Shielding effect of monovalent and divalent cations on solid-phase DNA hybridization: surface plasmon resonance biosensor study[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(20): 7343-7351.
- [32] Scarano S, Mascini M, Turner APF, et al. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25(5): 957-966.
- [33] 陈翠敏, 张晓莉, 府伟灵. X 连锁型视网膜色素变性的分子遗传学研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(3): 227-229.
- [34] 姚春艳, 府伟灵. 适配子技术在生物传感器中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(8): 707-708, 712.

(收稿日期: 2010-08-23)

• 综 述 •

## 环介导等温扩增在病原诊断中应用\*

李 鹏<sup>1</sup>, 马艳娇<sup>1,2</sup>, 夏 伟<sup>1</sup>综述, 张西臣<sup>3</sup>审校

(1. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江大庆 163319; 2. 讷河市畜牧水产技术推广中心, 黑龙江讷河 161300; 3. 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130000)

**关键词:** 核酸扩增技术; 诊断; 环介导等温扩增**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 03. 027**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2011)03-0343-03

经典的病原检测和诊断方法是体外培养和显微镜技术, 这种方法在临床实验室仍然是一项核心技术。但由于临床上很多病原体难以被选择培养, 从而限制了它们的诊断。尤其在发展中国家, 这种敏感性较低的抹片显微镜检查往往会延误治疗, 甚至导致死亡, 因此, 建立一种迅速、敏感、准确的诊断方法就更为重要。近年来, 在诊断技术上已经取得了一定的成果, 已开发出聚合酶链反应、连接酶链反应、核酸序列扩增和链置换扩增等多种体外扩增病原体核酸序列的方法, 这些方法都有了商品化的试剂盒, 它们的标准化和自动化的能力比传统方法更高, 还可以检测抗药。环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新兴的快速扩增技术, 它利用 4 个特殊设计的引物和具有链置换活性的 DNA 聚合酶, 在恒温条件下特异、高效、快速地扩增 DNA, 非常适合于现场检测。

### 1 LAMP 技术的发展历史

**1.1 LAMP 技术的原理** LAMP 可以在等温条件下快速、高效、特异地扩增 DNA 序列。LAMP 可以被分为 3 个阶段, 分别是: 开始阶段、扩增循环阶段、延伸阶段。LAMP 引物的设计是方法成败的关键, 引物设计主要是针对靶基因的 6 个不同的区域, 基于靶基因 3' 端的 F3c、F2c 和 F1c 区以及 5' 端的 B1、B2 和 B3 区等 6 个不同的位点设计 4 种引物<sup>[1]</sup>, 其中内引物 2 种, 分别是上游内部引物(forward inner primer, FIP)和下游内部引物(backward inner primer, BIP); 外部引物 2 种, 分别是上

游外部引物(forward outer primer)F3 和下游外部引物(backward outer primer)B3。60~65 °C 是双链 DNA 复性及延伸的中间温度, DNA 在 65 °C 左右处于动态平衡状态。因此, DNA 在此温度下合成是可能的。4 种特异引物依靠 1 种高活性链置换 DNA 聚合酶, 使得链置换 DNA 合成不停地自我循环, 从而实现快速扩增。

**1.2 LAMP 技术的应用** LAMP 技术已被应用到沙门氏菌、军团杆菌、李斯特杆菌、大肠杆菌、弯曲杆菌等多种食源及病原微生物的检测中, 并已有相应的试剂盒问世。沙门氏菌是主要经食物传播的病原体, 可导致人类胃肠道疾病。有研究者已经表明 LAMP 技术可以用于检测沙门氏菌, 他们还把 LAMP 技术和普通 PCR 技术进行对比, 发现 LAMP 的敏感性高于普通 PCR。

大肠杆菌是另一种能够引起食源性疾病的病原体。Hara-Kudo 已经研制出一种鉴定大肠杆菌的 LAMP 试剂盒。研究者已经开发出可以快速灵敏诊断产肠毒素大肠杆菌的 LAMP 试剂盒。也有研究者研制了适用于检测人尿样本中常见大肠杆菌的 LAMP 试剂盒。

诺如病毒(Noroviruses, NoVs)是一组世界范围内引起流行性胃肠炎的重要病原, 主要通过污染水和食物传播, 牡蛎等贝壳类是常见的被污染食品, NoVs 也会通过密切接触或空气途径传播, 在学校和医院, NoVs 可以引起人与人之间的传染。由于 NoVs 无法培养, 只能通过电子显微镜来检测, 但是这种

\* 基金项目: 大庆市科学技术局项目(SGG2007-048)。

方法不太敏感且耗时很长。虽然 PCR 方法已经被用于区分 NoVs 基因型(G I 和 G II),但非常耗时且对实验器材要求很高。商业化的 LAMP 试剂盒用于检测 NoVs,极大地改善了这一状况。Iturriza-Gómara 等<sup>[2]</sup>利用 LAMP 试剂盒检测了 NoVs 感染患者的粪便,结果表明,该试剂盒对主要影响发病的 G II 株的敏感度比 G I 株高。Fukuda 等<sup>[3]</sup>报道了两步等温扩增法可以检测牡蛎中的 NoVs,由于 NoVs 基因组在牡蛎体内的拷贝数很低,他们采用了依赖核酸序列的扩增(nucleic acid sequence based amplification, NASBA)技术来提高敏感度。

研究者已将 LAMP 试剂盒成功应用到检测严重急性呼吸性综合冠状病毒(SARS-CoV),实验表明,在检测鼻咽分泌样本中,LAMP 试剂盒要比荧光定量 PCR 方法更加简单且具有很高的临床诊断价值。研究者也报道了应用 LAMP 试剂盒成功检测 SARS-CoV 的实验,他们通过设计引物使 LAMP 检测方法比普通的检测方法好 100 倍之多。

流感是一种危害公共卫生的重大疾病<sup>[4]</sup>,人流感主要由流感 A 型或 B 型病毒引起。在流感病毒的 15 个血凝素亚型和 9 个神经氨酸苷酶亚型中,只有 3 个血凝素亚型(H1~H3)和 2 个神经氨酸苷酶亚型(N1, N2)可以感染人类。在老人和孩子中,如果得不到妥善的治疗,流感可能导致致命性的疾病。研究者报道了他们设计的流感亚型 1(HA1)、流感亚型 3(HA3)和流感病毒 B 型的 LAMP 引物,并采用 LAMP 技术对 3 种流感亚型进行了检测,发现 LAMP 技术优于商业化的(RDTs)试剂盒,具有更高的敏感性和特异性。除了人类流感,高致病性禽流感(H5N1 亚型)也已严重危害人类健康和社会经济,为了防止该病毒的暴发及其在人类中的传播,需要建立一种非常敏感和简单的诊断方法。Imai 等<sup>[5]</sup>在野生鸟类的咽部样本中检测到 H5 禽流感病毒,他们通过设计 H5 型血凝素基因的引物,采用 LAMP 技术检测到 H5N1 型流感,并发现这种方法要比普通 PCR 方法敏感度高 100 倍之多,但是该引物不能扩增人流感病毒(H1N1 和 H3N2)中的 RNA,他们还利用这种方法检测了临床患者咽部样本中的 H5N1 病毒。研究者报道了他们的 LAMP 方法作为一种比较好的扩增方法已被世界卫生组织(WHO)推荐。

此外,LAMP 技术还被用于检测其他一些重要的病原体,包括麻疹病毒、人类乳头状瘤病毒、腮腺炎病毒、隐孢子虫卵、军团菌和霍乱弧菌等。

**1.3 LAMP 技术的现状** 在发展中国家,由于人口众多、传染性疾病多发,所以更加需要一种简单、快速的诊断方法,LAMP 技术作为一种快速、高效、特异的诊断方法,适用于实验室条件较落后的发展中国家。

肺结核(pulmonary tuberculosis, TB)是一种在发展中国家常见的传染性疾病,其发病率在发展中国家一直处于上升趋势。控制 TB 失败的原因之一是缺乏简单、快速和敏感的诊断方法。在发达国家,核酸扩增技术(nucleic acid amplification technique, NAT)对于诊断 TB 具有很好的效果,但在发展中国家常规的实验室却不具备这种实验条件<sup>[6]</sup>。研究者报道了 LAMP 技术用于检测结核分枝杆菌,且与 PCR 具有相同的敏感性。研究者报道 LAMP 技术操作简单,且与传统的商业化

NAT 等效。

疟疾是经按蚊叮咬而感染疟原虫所引起的虫媒传染病,在发展中国家,疟疾常常危害孕妇和儿童的健康<sup>[7]</sup>。近年来,大约有 30~50 亿人感染疟疾,约 200 万人死亡。有 4 种疟疾种类可以感染人类,但疟疾的症状与其他一些传染病的症状相似,在没有任何诊断的情况下,抗疟药物常常就开给那些疑似患有疟疾的患者,这种药物的滥用导致了疟原虫株的耐药性,由于这些原因,一种快速、准确的诊断方法对于预防和控制疟疾意义重大。目前,虽然疟疾快速诊断试验(rapid diagnostic tests, RDTs)已经可以商业化的诊断该疾病,然而对于一些发展中国家,那些方法的花费、时间和实验室的基础设施都是不可能达到的。研究者报道 LAMP 技术可以直接检测恶性疟原虫,这种方法检测的结果要比普通涂片检查敏感度高 10 倍。在发展中国家,LAMP 技术可以作为一种检测疟原虫的分子诊断方法之一。另一方面,研究者已经设计出 LAMP 引物诊断疟疾的 4 种类型,其这种方法的敏感性和特异性与巢式 PCR 反应相似,他们表明,1 个简单的水浴锅就可以完成 LAMP 反应。在发展中国家,LAMP 技术将有可能替代传统诊断疟疾方法<sup>[8]</sup>,成为一种控制疟疾的诊断方法。

LAMP 技术除了可以诊断结核病和疟疾外,还可以检测人免疫缺陷病毒(HIV)<sup>[9]</sup>,诊断非洲人类锥虫病(HAT)或昏睡病等以前被人类忽视的疾病<sup>[10]</sup>。

## 2 展 望

目前,可行的 NAT 系统都很复杂、成本较高,很难在发展中国家的实验室广泛应用,但是 LAMP 技术具有操作简单、成本低的优点,所以被很多发展中国家的实验所应用,这样的诊断方法可能在很大程度上控制和预防很多疾病的流行<sup>[11-14]</sup>。

2002 年 SARS 引起了全世界的恐慌,然而这种疾病对于发达国家仍是很难攻破的问题,很可能相同的恐慌还会被其他流行性疾病引起,比如 H5 流感,为了与这些流行性疾病抗衡,建立一种能够随时随地诊断疾病的技术十分必要。

近年来,LAMP 技术因其操作简单,能够对细菌、病毒等多种病原体进行准确的诊断,且成本低廉,已在很多发展中国家被采用,它作为一种快速、敏感、特异的诊断方法将得到更加广泛的应用<sup>[15]</sup>。

## 参考文献

- [1] 蔡哲钧,冯杰雄,朱圣禾.核酸环介导等温扩增技术[J].国际检验医学杂志,2006,27(12):1092-1093,1096.
- [2] Iturriza-Gómara M, Xerry J, Gallimore CI, et al. Evaluation of the loopamp (loop-mediated isothermal amplification) kit for detecting norovirus RNA in faecal samples[J]. J Clin Virol, 2008, 42(4):389-393.
- [3] Fukuda S, Sasaki Y, Seno M. Rapid and sensitive detection of norovirus genomes in oysters by a two-step isothermal amplification assay system combining nucleic acid sequence-based amplification and reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assays[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(12):3912-3914.
- [4] Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections[J]. Annu Rev Pathol, 2008, 3:499-522.
- [5] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, et al. Rapid diagnosis of H5N1

avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin genespecific loop-mediated isothermal amplification method[J]. J Virol Methods, 2007, 141(2): 173-180.

[6] Ling DI, Flores LL, Riley LW, et al. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens; meta-analysis and meta-regression[J]. PloS One, 2008, 3(2): e1536.

[7] Bell D, Wongsrichanalai C, Barnwell JW. Ensuring quality and access for malaria diagnosis; how can it be achieved[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(9): 682-695.

[8] Snounou G. Rapid, sensitive and cheap molecular diagnosis of malaria; is microscopy on the way out[J]. Future Microbiol, 2007, 2(5): 477-480.

[9] Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)[J]. J Virol Methods, 2008, 151(2): 264-270.

[10] Boutayeb A. Developing countries and neglected diseases; challenges and perspectives[J]. Int J Equity Health, 2007, 6: 20.

[11] Njiru ZK, Mikosza AS, Matovu E, et al. African trypanosomiasis; sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA [J]. Int J Parasitol, 2008, 38(5): 589-599.

[12] 江彦增, 朱鸿飞. 非洲猪瘟病毒环介导等温扩增快速检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2009(2): 72-74.

[13] 吴绍强, 孙晓智, 林祥梅, 等. 亚洲 I 型口蹄疫病毒环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立[J]. 检验检疫学刊, 2008, 18(1): 9-12.

[14] 朱水荣, 王志刚, 张政, 等. 嗜肺军团菌环介导等温扩增快速检测方法的建立与应用[J]. 中华流行病学杂志, 2009, 5: 481-485.

[15] Rodger AJ, Cooke GS, Ord R, et al. Cluster of falciparum malaria cases in UK airport [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(8): 1284-1286.

(收稿日期: 2010-05-24)

• 综 述 •

## 乙型肝炎病毒基因诊断进展\*

商红艳 综述, 欧启水 审校

(福建医科大学附属第一医院检验科, 福州 350005)

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 基因; 突变; 检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)03-0345-03

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是引起中国急、慢性肝炎的主要病原体, 感染后会引发慢性乙型肝炎、肝硬化, 最后甚至发展成肝癌。快速、准确、特异地诊断乙型肝炎对于其治疗、预后及转归至关重要, 其中基因诊断技术起关键作用。近年来, HBV 的基因诊断有了很大进展, 基因分型的临床意义得到新的认识, 新的耐药突变位点及检测技术不断被发现, 本文就这方面的进展进行综述。

### 1 HBV 生物学特性

HBV 基因组是 1 个大约含 3 200 个碱基的部分双链环状 DNA, 其负链核苷酸序列有 4 个相互重叠的开放读码框(open reading frame, ORF), 即 C、S、P、X 基因区, 分别编码核衣壳蛋白、外膜蛋白、DNA 多聚酶和具有反式激活作用的 X 蛋白。HBV 的复制由前基因组 RNA 中间体反转录为负链 DNA, 反转录是利用病毒本身的 DNA 聚合酶, 此酶缺乏校对活性, 可造成复制过程中反转录失真, 导致 HBV 变异率比其他 DNA 病毒高约 4 个数量级。HBV 变异广泛存在于其基因组的不同部位, 可单独存在于某个基因区, 亦可同时出现在几个基因区, 因此 1 个宿主可以感染许多相似株。HBV 感染时, 比较单一的病毒株易于呈自限性经过, 而呈相似株分布的感染将可能使感染慢性化。

### 2 HBV 基因分型

以 HBV 核苷酸全序列异质性大于等于 8% 为依据, 可将 HBV 病毒株分为 A~H 共 8 个基因型<sup>[1]</sup>。HBV 各基因型在

世界范围内具有严格的地理分布特征, 具体见表 1。

表 1 HBV 各基因型的地理分布

基因型	分布地区
A	北欧、美国、中非
B	中国、日本、韩国、越南等亚洲地区
C	中国、日本、韩国、越南等亚洲地区
D	南欧、中东地区、印度
E	非洲地区
F	美国中部、南部、波利尼西亚
G	美国、法国
H <sup>[2]</sup>	美洲

在中国, HBV 基因型南方以 B 型为主, 北方以 C 型为主, D 型仅见于西部及少数民族地区, A 和 F 型偶有发现, 还未发现其他型别。HBV 基因型影响肝脏疾病的自然史、严重程度、HBeAg 血清转化率、前核心/核心启动子区变异形式<sup>[3]</sup>以及抗病毒药物治疗<sup>[4]</sup>。有研究表明, A 型 HBV 感染者比其他基因型感染者更不容易形成肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC), 在亚洲地区, C 型比 B 型更容易形成 HCC。近年来, 有研究发现, C 型乙肝患者肝组织病理改变明显重于 B 型, 基因 B、C 分型检测结合肝穿刺病理检查有助于判断疾病轻重程度、指导治疗及评估预后。慢性乙肝患者感染病毒株的基因型将成为医生在对其治疗前进行临床评估时考虑的 1 个重要因素。

\* 基金项目: 福建省科技计划重点项目(2010 Y0022); 福建省医学创新课题(2009-CX-9)。