

• 论 著 •

肠道病毒 71 型 RT-LAMP 快速检测方法的建立及初步应用

李 莎, 张如胜, 陈静芳

(湖南省长沙市疾病预防控制中心 410000)

摘 要:目的 建立手足口病肠道病毒 71 型(EV71 型)逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)快速检测方法,并对其进行应用评价。方法 利用软件针对 EV71 型病毒特异性基因 6 个区域设计 4 条 LAMP 引物,在普通恒温水箱内 65 ℃保温约 1 200 min 完成 RT-LAMP 扩增,扩增结果通过电泳和肉眼来判断。利用 RT-LAMP 和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法同时检测 70 份 EV71 型肠道阳性标本;将 EV71 型的 RNA 做一系列 10 倍稀释后用 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法进行检测来比较两者敏感度。结果 EV71 型出现 LAMP 特征性梯状条带,肉眼可以判断结果;RT-LAMP 与 RT-PCR 方法检测 100 份 EV71 型标本的检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$);RT-LAMP 方法的敏感度($10.0\text{ pg}/\mu\text{L}$)与 RT-PCR 方法相同。结论 建立了一个可以在普通恒温水箱内进行核酸扩增的 EV71 型 RT-LAMP 检测方法,初步应用证实该方法有一定的应用前景。

关键词:环介导等温扩增; 肠道病毒 71 型; 检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.04.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)04-0470-03

Establishment and preliminary application of RT-LAMP rapid detection method of enterovirus 71

LI Sha, ZHANG Rusheng, CHEN Jingfang

(Changsha Municipal Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410000, China)

Abstract: **Objective** To establish a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification RT-LAMP rapid detection method of enterovirus 71(EV71) in hand, foot and mouth disease (HFMD), and to evaluate its application. **Methods** Four types of LAMP primers were designed by using the software needle based on the 6 distinct regions of the specific gene of EV71. The process of amplification was completed in the ordinary thermostatic water container by 65 ℃ for 1 200 min. The results of amplification were judged by electrophoresis and naked-eye. Seventy EV71 type intestinal positive specimens were simultaneously detected by RT-LAMP and RT-PCR methods. EV71 type of intestinal virus RNA were made a series. After 10 times of dilution, the RT-LAMP and RT-PCR methods were used to conduct the detection for comparing their sensitivities. **Results** The LAMP characteristic ladder bands of EV71 appeared, then the results could judged by the naked-eye. The detection rate in 100 EV71 samples had no statistical difference between RT-LAMP and RT-PCR methods ($P>0.05$). The sensitivity ($10.0\text{ pg}/\mu\text{L}$) of RT-LAMP was same to that of RT-PCR method. **Conclusion** The RT-LAMP detection method for EV71 was established, which can be used for nucleic acid amplification in the ordinary thermostatic water container. The preliminary application verifies that this RT-LAMP assay has a certain application prospect.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; enterovirus 71; detection

引起手足口病(HFMD)的肠道病毒有 20 多种,其中以肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(CoxA16)最常见。HFMD 患者大多症状轻微,以发热和手、足、口腔等部位的皮疹或疱疹为主要症状,但感染 EV71 型病毒的患儿,神经系统易受累,可致死亡或留有后遗症。自 1974 年 Schmidt 等^[1]首次报道从表现为中枢神经系统症状的患者标本中分离到 EV71 后, EV71 病毒的流行在不同的国家或地区相继被报道^[2],中国台湾地区 1998 年暴发 EV71 的大流行,约有 12 万以上的人被感染,死亡 78 人^[3]。近年来, HFMD 疫情防控形势日趋严峻:2008 年湖南报告 HFMD27114 例,死亡 11 例;2015 年湖南报告 HFMD135 628 例,死亡 14 例^[4];监测数据显示:2015 年, EV71 型病毒引起的 HFMD 占到所有病例的 11.37%,占重症病例的 29.48%,占死亡病例的 88.89%,是引起湖南省 HFMD 重症和死亡病例的主要血清型^[4]。2016 年上市的手足口病疫苗仅针对 EV71 型病毒引起的 HFMD,可以预见 HFMD 的防控形势仍将严峻。

HFMD 易于与其他出疹性疾病(如水痘)混淆,特别是在无相关检测技术的基层医疗机构出现 HFMD 病例时,更易误

诊。因此,早期、快速、准确的检测对 HFMD 的正确治疗和控制显得尤为重要。HFMD 肠道病毒细胞培养分离是金标准,但其阳性率低且耗时 1 周左右;血清学方法(中和试验)难以区分近期感染和既往感染,适合流行病学调查而不利临床诊断。PCR 技术、荧光定量 PCR 技术快速、准确,但由于需要昂贵的 PCR 仪和试剂不利于一般实验室的普遍开展。为此本研究拟利用一种不需要 PCR 仪且肉眼可以判定结果的环介导等温扩增(LAMP)技术^[5-11]建立 HFMD 的 EV71 型核酸检测方法。

1 材料与方法

1.1 标本来源 50 份经荧光-PCR 验证的 EV71 型阳性粪便标本、20 份 EV71 型阳性咽拭子标本和 30 份 EV71 型阴性咽拭子标本。根据已公布的 EV71 型的基因序列,通过 Primer-Explorer V3 设计 4 条 LAMP 引物序列见表 1。引物序列由上海 Life Technologies 公司合成。

1.2 仪器与试剂 GeneAmp PCR System 9700 分析仪(美国 ABI 公司);PowerpacTM Universal 电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);Centrifuge 5415R 离心机(德国 Eppendorf 公司),通用型核酸提取试剂(广州华瑞安生物);SuperScript III One-Step

RT-PCR System with Platinum Taq 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);Gel Doc 2000 凝胶成像仪(美国 BIO-RAD 公司);DK-8D 电热恒温水槽(上海精宏);SYBR Green I 染料(美国 Invitrogen 公司);AMV 反转录酶(美国 Invitrogen 公司);DNA Ladder 为北京天根公司产品。

表 1 EV71 型 RT-LAMP 引物序列

引物	序列(5'~3')
EV71-F3	CTT TTG TTG CGT GCA CAC C
EV71-B3	GCG ACA TGA ATG GCA CTG AA
EV71-FIP	TGG CTT AGG GGC TCC AGG TGC GGG GAA GTT GTC CCA CA
EV71-BIP	TCT AGG GAA TCC CTT GCA TGG CAG GGT CTG ACA GCT TGA CA

1.3 方法

1.3.1 RNA 提取 取粪便少许,用适量生理盐水稀释后离心,取 60 μL 上清液(咽拭子标本直接取 60 μL)利用核酸通用提取试剂盒(广州华瑞安生物技术公司)抽提 RNA,操作步骤:(1)取 200 μL 抽提 A 液于 0.5 mL 离心管中,每管分别加入 50 μL 做好标记,颠倒混匀数次,室温静置 3 min;(2)加入 200 μL 抽提 B 液,颠倒充分混匀数次,13 000 r/min 离心 10 min,去上清液;(3)加入 200 μL 抽提 C 液,颠倒混匀数次,13 000 r/min 离心 5 min,吸弃上清液,室温或 55 ℃ 放置 2~5 min 晾干;(4)加入 25 μL 样本稀释液混悬沉淀物,短暂离心,上清中即含有抽提的核酸,如当天不使用,应放入-80 ℃ 保存。

1.3.2 RT-LAMP 扩增 EV71 型方法 反应体系(25 μL): FIP、BIP(40 μmol/L)各 1.0 μL,F3、B3(10 μmol/L)各 0.5 μL, 10×Bst DNA Polymerase Buffer 2.5 μL,dNTP Mixture(10 mmol/L) 3.5 μL,Betaine(5 mol/L)5.0 μL,MgSO₄(50 mmol/L)1.5 μL,Bst DNA Polymerase (8 U/μL)1.0 μL,AMV 反转录酶(200 U/μL)0.5 μL,RNA 模板 5μL、加 ddH₂O 至 25 μL。轻弹混匀,反应条件为 65 ℃ 孵育 120 min,80 ℃ 2 min 灭活酶结束 RT-LAMP 反应。

1.3.3 LAMP 扩增产物的检测 肉眼检测:每 25 μL 体系的反应管加 1 000×SYBR Green I 1~2 μL,1~5 min 观察结果,反应液变绿为阳性,保持无色或棕色为阴性。电泳检测: 1.5 μL 扩增产物与 0.3 μL 上样缓冲液混匀后点样于含 0.8 μg/mL 溴化乙锭的 2%~3% 琼脂糖凝胶中,80 V 电泳约 50 min 后置凝胶成像系统中成像,电泳图片显示 LAMP 特征性梯状条带,则结果为阳性;如无任何条带则结果为阴性。

1.3.4 RT-PCR 检测 EV71 型方法 利用中国疾控中心提供的 EV71 型引物[EV71 核酸检测引物序列:EV71-S(上游)为 5'-GCA GCC CAA AAG AAC TTC AC -3';EV71-A(下游)为 5'-ATT TCA GCA GCT TGG AGT GC -3']。建立 RT-PCR 检测方法,对 50 份粪便和 20 份咽拭子标本进行核酸检测;反应体系为 25 μL:F、R(20 μmol/L)各 0.5 μL,Rnase free water 5.5 μL;2×PCR Master MIX 12.5 μL;Platinum Taq Mix 1.0 μL,模板 RNA 5.0 μL;将上述反应体系混匀低速离心后分装到 PCR 反应管,置冰上备用。放入 ABI9700 PCR 仪中按照如下程序进行扩增:60 ℃ 30 min,94 ℃ 2 min,再按 94 ℃ 15 s, 60 ℃ 30 s,68 ℃ 30 s 循环 40 次,68 ℃ 5 min;4 ℃ 保存。RT-PCR 扩增反应后取 3 μL 扩增产物与 0.5 μL 上样缓冲液混匀后点样于含 0.8 μg/mL 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中,90 V

电泳 30 min 后放于凝胶成像系统中成像,观察 RT-PCR 扩增产物有无预期大小的目的 DNA 片段 226 bp。

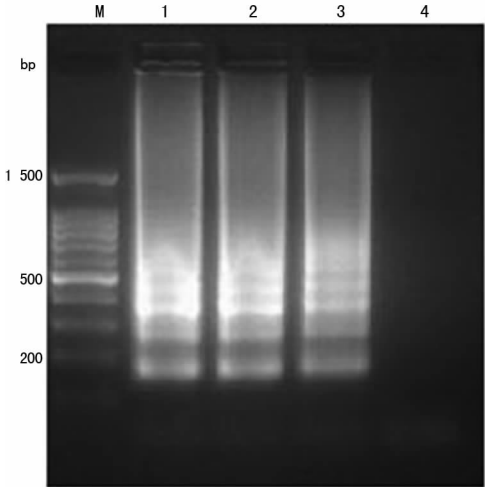
1.4 RT-LAMP 和 RT-PCR 扩增肠道病毒 EV71 RNA 的敏感度分析 EV71 型阳性标本所提 RNA 一系列稀释为:40、20、10、5 pg/μL。分别用 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法来检测。

1.5 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法比较分析 以经荧光 PCR 验证的 50 份 EV71 型阳性粪便标本、20 份 EV71 型阳性咽拭子标本和 30 份 EV71 型阴性咽拭子标本作为检测对象,提取 RNA 后同时进行 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测。

2 结 果

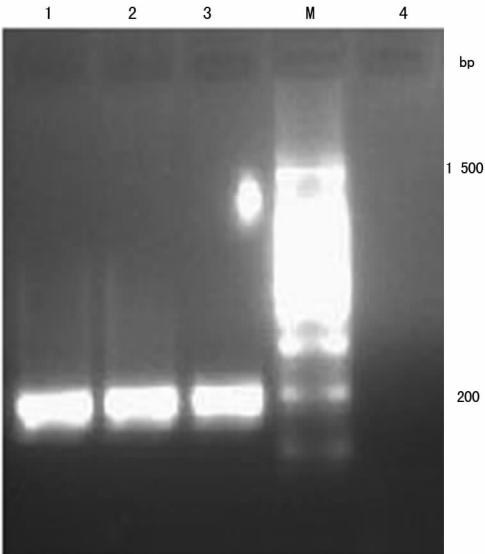
2.1 RT-LAMP 扩增 EV71 型的肉眼检测分析 EV71 型 RT-LAMP 检测管反应液加荧光染料后检测管反应液变绿,而对照管反应液保持棕色未变色,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 RT-LAMP 和 RT-PCR 扩增 EV71 型 RNA 的敏感度检测 结果表明 RT-LAMP 和 RT-PCR 反应敏感度均为 10 pg/μL,见图 2、3。



注:M 表示 100 bp DNA 标志物;1~4 分别表示 40、20、10、5 pg/μL EV71 RNA。

图 2 RT-LAMP 扩增 EV71 RNA 的敏感度分析图



注:M 表示 100 bp DNA 标志物;1~4 分别表示 40、20、10、5 pg/μL EV71 RNA。

图 3 RT-PCR 扩增 EV71 RNA 的敏感度分析图

2.3 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法比较分析 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法同时检测 100 份肠道病毒标本结果见表 2, 两种方法检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 EV71 型两种方法检测结果(n)

RT-LAMP 法	RT-PCR		合计
	+	-	
+	60	3	63
-	2	35	37
合计	62	38	100

3 讨 论

引物是 LAMP 方法的关键^[12], 本研究设计了 4 套 LAMP 引物, 经筛选, 选择其中 2 套用于 HFMD EV71 型肠道病毒 LAMP 检测。由于目前的国产 HFMD 荧光 PCR 检测试剂盒质量参差不齐, 本研究选择中国疾控中心下发的《手足口病标本采集及检测技术指南》中的普通 RT-PCR 作为本研究的参照方法。比较发现, 本研究建立的 EV71 型 RT-LAMP 方法与 RT-PCR 方法检出率和敏感度相同, 但本研究建立的 EV71 型 RT-LAMP 方法无需 PCR 仪, 在普通恒温水箱内恒温 120 min 即可完成核酸扩增, 具有方便快捷的优点。

RT-LAMP 方法相比 LAMP 方法需要逆转录步骤, 逆转录酶的效率也是研究中的一个重点, 本研究中对常用的 3 种酶进行了比较, 发现 AMV 逆转录酶(Promega 公司)相比 Platinum Taq Mix 逆转录酶(Invitrogen 公司)更适合本研究中的 RT-LAMP 方法。

关于肉眼检测, 本研究尝试了使用阿拉丁和 1 000×SYBR Green I 进行肉眼观察的比较研究, 发现 1 000×SYBR Green I 显色更稳定, 但阿拉丁可以在配置反应体系时加入, 无需后续开盖加入染料染色的过程(避免了污染的可能), 但其显色表现尚不稳定, 需要进一步使用其他品牌染料进行试验(如进口阿拉丁染料)。

综上所述, 本研究建立了 HFMD EV71 型肠道病毒 LAMP 检测方法, 该方法无需昂贵的仪器设备, 仅需要 1 台普通恒温水箱即可进行 LAMP 核酸扩增, 方便快捷, 将本方法优化后有望用于 HFMD 的早期快速检测。

参考文献

[1] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system[J]. J Infect Dis, 1974, 129(3): 304-309.

(上接第 469 页)

20(11):2948-2954.

[10] Ansaldi F, Orsi A, Sticchi L, et al. Hepatitis C virus in the new era: perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(29):9633-9652.

[11] 许芳, 李晓兰, 祝琳. 丙肝病毒核心抗原检测对于丙型肝炎诊断的价值[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(5): 713-715.

[12] 朱鸿, 张韬, 范存琳, 等. 丙型肝炎病毒核心抗原检测对于丙型肝炎诊断的价值[J]. 大连医科大学学报, 2010, 32

[2] Lum LC, Wong KT, Lam SK, et al. Neurogenic pulmonary oedema and enterovirus 71 encephalomyelitis[J]. Lancet, 1998, 352(9137):1391.

[3] Lin TY, Chang LY, Hsia SH, et al. The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management[J]. Clin Infect Dis, 2002, 34(2):52-57.

[4] 罗垵炜, 高立冬, 胡世雄, 等. 2015 年湖南省手足口病流行特征分析[J]. 热带病与寄生虫学, 2016, 14(1):6-9.

[5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi HA, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):63.

[6] Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex, Mavium, and M. intracellulare in sputum samples[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(6):2616-2622.

[7] Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, et al. Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3):1348-1352.

[8] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA [J]. J Biochem Biophys Methods, 2004, 59(2):145-157.

[9] Song T, Toma C, Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli by a loop-mediated isothermal amplification method [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 243(1):259-263.

[10] Horisaka T, Fujita K, Iwata T, et al. Sensitive and specific detection of Yersinia pseudotuberculosis by loop-mediated isothermal amplification [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(11):5349-5352.

[11] Seki M, Yamashita Y, Torigoe H, et al. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the lytA gene for detection of Streptococcus pneumoniae[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4):1581-1586.

[12] 匡燕云, 李思光, 罗玉萍. 环介导等温扩增核酸技术及其应用[J]. 微生物学通报, 2007, 20(3):557-560.

(收稿日期:2016-11-03 修回日期:2016-12-24)



(2):211-212.

[13] Park Y, Lee JH, Kim BS, et al. New automated hepatitis C virus(HCV)core antigen assay as an alternative to real-time PCR for HCV RNA quantification [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(6):2253-2256.

[14] Calvaruso V, Craxi A. Immunological alterations in hepatitis C virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(47):8916-8923.

(收稿日期:2016-10-03 修回日期:2016-11-24)