

- biofilm inhibitors[J]. J Med Microbiol, 2014, 63(9):1167-1173.
- [28] Lazzell AL, Chaturvedi AK, Pierce CG, et al. Treatment and prevention of *Candida albicans* biofilms with caspofungin in a novel central venous catheter murine model of candidiasis[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(3):567-570.
- [29] Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, et al. In vitro antifungal ac-

tivity and in vivo antibiofilm activity of Cerium nitrate against *Candida* species[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(4):1083-1093.

(收稿日期:2015-12-07)

• 综 述 •

高通量 LAMP 检测常见肠道病原体的可行性分析

疏义林, 张雪峰, 万 琴, 谢进维 综述, 张守德[△] 审核
(安陆市疾病预防控制中心, 湖北孝感 432600)

关键词: 病原体; LAMP; 高通量; 分子诊断; 传染性疾病

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 10. 034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)10-1385-03

人类粪-口途径传播的病原体主要是病原菌和一些病毒, 如志贺菌、沙门菌、大肠杆菌 O157、霍乱弧菌、弯曲杆菌、小肠结肠炎耶尔森菌、金黄色葡萄球菌、甲肝病毒、戊肝病毒、轮状病毒、诺如病毒、星状病毒等, 它们会引起肠道疾病等。人体携带这些病原体, 是严重危害公众健康的重大问题, 也是造成食品和水体污染的间接因素。每年我国发生由病原菌引起的食物中毒事件占食物中毒事件总数的 30%~90%, 中毒人数占食物中毒总人数的 60%~90%, 人们的身体健康受到严重危害^[1]。目前病毒性肝炎被世界卫生组织(WHO)列为全球第 9 大引起死亡的疾病, 在我国, 病毒性肝炎发病数位居法定管理传染病的第一位^[2]。甲型和戊型肝炎病毒, 主要通过粪-口途径传播, 病毒随粪便排出体外, 通过污染水源、食物、食具等传播途径造成散发性流行或大流行。针对粪-口途径传播的病原体的快速检测是预防和控制突发性肠道疾病关键措施, 而目前对病原体检测主要依靠病原体分离法、免疫方法和核酸扩增及其衍生技术方法, 虽然病原体分离是金标准, 但操作繁琐费时; 免疫方法敏感性高、操作简单和快速, 但易受到其他物质干扰和抗体特异性差异的影响, 从而会导致误诊或漏诊; PCR 及其衍生技术方法检测快速、敏感性高和特异性强, 已经广泛应用于一些病原体的检测, 但由于需要特殊仪器设备且操作复杂, 导致其不容易在基层单位实验室推广应用于病原体检测。

随着分子生物学技术不断发展, 不断产生新的核酸扩增技术。近年来, 一种新的恒温核酸扩增技术, 环介导等温扩增技术(LAMP)已被开发应用, 该技术操作简单、特异性强、灵敏度高、耐受性强, 已在病原体快速检测中得到广泛应用^[3-14], 有望解决突发性肠道疾病的相关病原体的快速检测的基层应用难题。结合本单位正在开展的 LAMP 技术检测甲型肝炎病毒和戊型肝炎病毒等病原体的相关研究, 对 LAMP 技术进行介绍和其高通量检测 12 种常见肠道病原体的可行性分析。

1 LAMP 技术简介

1.1 LAMP 技术原理 LAMP 技术是 2000 年 Notomi 等^[15]人发明的恒温核酸扩增方法。原理是根据序列保守区域设计的一对外引物和一对内引物特异性识别目标序列上的 6 个相应区域, 在 Bst 聚合酶的作用下进行自循环链置换反应, 在 60~65℃ 恒温内, 60 min 内大量扩增目标 DNA 片段, 可达到 10⁹ copies 以上, 同时伴随副产物白色焦磷酸镁沉淀的产生。

目前, LAMP 技术已经发展为普通 LAMP、RT-LAMP、实时浊度定量 LAMP 等。

1.2 LAMP 技术引物设计 LAMP 扩增引物包含 F3、B3、FIP 和 BIP 引物, 能结合目的序列 6 个不同区域。上游外部引物 F3 与目的序列 F3c 区域互补, 下游外部引物 B3 与目的序列 B3c 区域互补。上游内部引物 FIP, 由 F2 序列和 F1c 序列, 中间有 TTTT 连接组成, F2 序列与目的序列 3'端的 F2c 区域互补, F1c 序列与目的序列 5'端的 F1c 区域序列相同。下游内部引物 BIP, 由 B2 序列和 B1c 序列, 中间有 TTTT 连接组成, B2 序列与目的序列 3'端的 B2c 区域互补, B1c 区域与目的序列 5'端的 B1c 区域序列相同。引物设计示意图如图 1。Loop 引物(Loop F, Loop B)是有助于提高灵敏度, 缩短反应时间的引物^[16]。LAMP 技术的关键就是引物的设计。应用在线 LAMP 引物设计软件 Primer Explorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e>) 设计引物序列, 结合 DNASTAR 的 MegAlign 和 Olig6.0 对引物分析, 避免引物二聚体等产生, 再将设计好的引物, 在 Gene Bank 中进行比对, 进一步验证引物的特异性。LAMP 引物设计一般选取一段长约 130~300 bp 的保守序列作为靶序列。一般引物间距要求: F2 的 5'端到 B2 的 5'端的距离, 最好控制在 120~180 bp; F2 的前端和 F3 引物之间以及 B2 的前端与 B3 引物之间的距离应该在 0~20 bp; F2 与 F1 距离和 B2 与 B1 距离保持在 40~60 bp。引物的 Tm 值要求: Tm 主要由模板的 GC 含量决定, 通常 Tm 值为 60~65℃, 富含 AT 区域 Tm 值为 55~60℃, 同时引物 Tm 值应该满足 F2>60℃, B2<65℃, F3 和 B3<F2 和 B2<F1 和 B1。GC 含量约 40%~65%, 以 50%~60% 为最佳, 太高或太低都会影响结合效率。避免形成发卡结构, 3'端不应存在富 AT 区, 不能与其他引物互补。F2、F3、B2、B3 的 3'端稳定性很重要, F1c 和 B1c 的 5'端扩增以后相当于 F1 和 B1 的 3'端, 其稳定性同样很重要, 它们的 3'端或 5'端自由能改变值要求一般小于或等 -4 kcal/mol。

1.3 LAMP 反应体系及扩增结果鉴别方法 LAMP 反应体系包含了模板 DNA、dNTP、Bst DNA 聚合酶甜菜碱、缓冲液、引物、Mg²⁺ 和 ddH₂O。通常用 25 μL 反应体系: 模板 DNA 1~4 μL, FIP、BIP、F3、B3 各 0.2~2.0 μmol/L, 10×Bst DNA Polymerase Buffer 2.5 μL, dNTP Mixture (10 mmol/L) 3.5

μL , Betaine (5 mol/L) 5 μL , MgSO_4 (250 mmol/L) 0.3~0.8 μL , Bst DNA Polymerase (8 U/ μL) 1 μL , 补 ddH₂O 至 25 μL , 混合后在 60~65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15~60 min, 然后 80 $^{\circ}\text{C}$ 以上加热 2 min 让 Bst DNA 聚合酶热失活, 反应终止, 或者冰浴终止反应。RT-LAMP 反应体系 (25 μL): RNA 模板 3~5 μL , FIP、BIP、F3、B3 各 0.2~2.0 $\mu\text{mol/L}$, dNTP Mixture (10 mmol/L) 3.5 μL , 10 $\times$ Bst DNA Polymerase Buffer 2.5 μL , MgSO_4 (250 mmol/L) 0.3~0.8 μL , Betaine (5 mol/L) 5.0 μL , AMV 反转录酶 (200 U/ μL) 0.5 μL , Bst DNA Polymerase (8 U/ μL) 1 μL , 补 ddH₂O 至 25 μL 。产物鉴别方法有琼脂糖电泳, 观察梯度条带; 在扩增产物中加入 SYBR Green I, 反应结果变成绿色说明有扩增产物生成, 没有变色说明无扩增产物生成, 注意, 在起始反应液中加 SYBR Green I, 会影响到扩增效率; 在反应体系中加入 HNB, 反应结果变蓝色说明有扩增产物, 紫色说明无扩增产物; 在反应体系中加入一种发荧光的螯合剂 (钙黄绿素), 根据有无绿色荧光, 肉眼判断扩增结果; 通过对 LAMP 扩增副产物焦磷酸镁白色沉淀是否形成来判断有无扩增, 根据反应产生的焦磷酸镁白色沉淀形成浊度已经开发出一种实时浊度检测仪, 可以用于定量分析。加 HNB、钙黄绿素和观察浊度方法判断都可以避免开盖子检测。

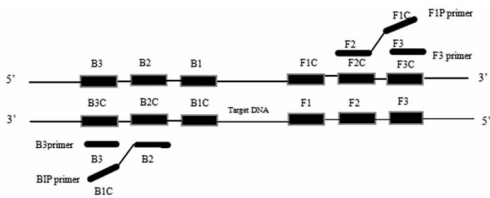


图 1 LAMP 引物设计示意图

2 高通量 LAMP 技术检测常见肠道病原体的可行性

沙门菌通过标记 invA 基因^[5], 已经成功鉴别, 而且荣研生物科技 (中国) 有限公司已经推出专门检测沙门菌环介导等温扩增法试剂盒。通过 LAMP 或 RT-LAMP 扩增志贺菌 ipaH 基因^[17], 弯曲杆菌旋转酶基因 (gyrA)^[7], 大肠杆菌 O157: H7 菌 rfbE 基因^[3], 霍乱弧菌溶血素基因 (hlyA)^[4], 小肠结肠炎耶尔森菌 Ail 基因^[18], 金黄色葡萄球菌 muc 基因^[19], 轮状病毒 VP7 基因^[20], II 型诺如病毒 RNA 聚合酶基因^[6], 星状病毒 HAsV-2 基因^[21], 已经成功达到鉴别目的。目前关于甲肝病毒、戊肝病毒有关 RT-LAMP 技术检测报道还没有, 但关于甲肝病毒、戊肝病毒分子检测报道有很多, 如 RT-PCR^[22-23]、荧光定量 RT-PCR^[24-25]。对甲肝病毒基因组和报道的 PCR 技术扩增片段分析得知 VP1/VP3 衣壳蛋白基因的连接区和编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRP) 的 3D 非结构蛋白基因, 它们都具有高度特异性。对戊肝病毒基因组分析得知除 ORF1 的 1 500~3 000 碱基有变异外, 其他部分特异性和保守性较强, 尤其 ORF2 序列占全部 GeneBank 序列一半以上, ORF15' 端的甲基转移酶区和 ORF13' 端的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶区 (RdRP) 也比较多。选取甲肝病毒和戊肝病毒特异性保守基因, 经 Primer Explorer V4 软件设计出多套用于 LAMP 扩增的引物, 经 Primer5.0 和 Olig6.0 综合分析选出几对基本符合 LAMP 引物设计要求的引物, 将设计好的引物, 在 Gene Bank 中进行比对, 保证其特异性。这些引物已经进行初步群体扩增试验筛选, 已经初步筛选出 2 组较为理想的引物组, 后期将进一步对反应体系优化以及对引物调整和修饰, 筛选出最理想引物组和反应体系, 最后用荧光定量 RT-PCR、测序和酶联方法

对其敏感性和特异性进行评估。在同一个水浴锅或者其他恒温控制设备中实现 12 种病原体高通量 LAMP 扩增检测, 就必须考虑到不同病原体 LAMP 引物组的 T_m 值要相近, 以便在相同温度下得到高效率扩增。这 12 种病原体的引物的 T_m 通过 Nearest Neighbor 法计算发现基本相近, 根据文献报道和初步试验发现 12 种病原体的标记序列在 61~65 $^{\circ}\text{C}$ 都可以有效扩增, 建议选择 63 $^{\circ}\text{C}$ 进行高通量扩增。在防止污染方面: 采用在起始反应体系中加入 HNB 或钙黄绿素, 避免开盖子检测; 为进一步防止气溶胶, 在反应液表面滴加矿物油封住液面; 为避免上一次扩增产物的污染, 可以用 dUTP 替代 dATP, 加 UGN 酶处理反应液后, 再进行扩增反应。

3 小结与展望

LAMP 技术特点: (1) 高效性, 在恒温条件下, 15~60 min 即可完成扩增反应。(2) 灵敏性高, 比常规 PCR 高出 1~2 个数量级, 能满足低拷贝数样品的检测, 扩增产物靶序列可达到 10⁹ 以上拷贝。(3) 特异性非常高, 4 条特异性引物与目的序列 6 个区域中任何区域不匹配都不能进行核酸扩增。(4) 操作简单, 肉眼直接就可以观察到扩增结果。(5) 耐受性较高, 主要是因为 Bst DNA 聚合酶的耐受性很好, 再加上反应缓冲液中的甜菜碱的作用, 使 LAMP 耐受性高于常规 PCR 很多, 因此样本中一些异物对 LAMP 反应影响较小, 扩增时不需要对样本进行纯化^[12]。(6) 不需特殊仪器设备, 一台恒温水浴锅或者其他恒温控制设备即可, 适合大规模筛查、现场诊断和基层单位实验室病原体或疾病检测。但也存在缺点: (1) 扩增产物容易产生气溶胶污染, 会造成假阳性。目前已经采用加 HNB、钙黄绿素和观察浊度等方法避免开盖子检测产生气溶胶污染, 在反应液上加封闭液进一步防止气溶胶扩散出来污染实验室, 采用 dUTP 替代 dATP, 加 UGN 酶处理反应液后, 再进行扩增反应, 防止上一次扩增产物的污染。(2) 引物设计要求比较高, 有些基因序列可能不适合使用环介导等温扩增方法。

随着 LAMP 技术、分子标记研究深入和不断推广, 相关行业已经制定 LAMP 技术的检测行业标准。不同款式的 LAMP 扩增仪的推出使 LAMP 技术的推广更加迅速。为了使 LAMP 技术能更好的运用于基层临床诊断、现场检测和即时检测, 必须在扩增稳定性、缩短扩增时间、定量和找到更简便防止扩增产物污染的检测方法方面努力。凭借敏感性高、特异性强、耐受性强、操作简单、检测结果易判定、成本低廉、适合高通量扩增等优点, LAMP 将成为核酸扩增领域的重要技术方法, 尤其在病原体快速高通量检测方面有着推广价值。

参考文献

- [1] 汪清, 葛秀清, 黄祖华. 细菌性食物中毒的现状与检验[J]. 中国动物检疫, 2004, 21(4): 20-22.
- [2] 郭晓奎, 潘卫庆. 病原微生物学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2012.
- [3] 张如胜, 宋克云, 苏良, 等. 环介导等温扩增技术快速检测 EHEC O157: H7[J]. 中华预防医学杂志, 2008, 42(12): 919-921.
- [4] 贺楠, 雷质文, 梁成珠, 等. LAMP 方法检测霍乱弧菌的研究[J]. 中国热带医学, 2009, 9(1): 23-26.
- [5] 刘威, 李环, 邹大阳, 等. 用环介导等温扩增技术快速检测粪便样本中的沙门菌[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(2): 237-241.
- [6] 张韶华, 崔伦标, 祁贤, 等. RT-LAMP 法对 II 型诺如病毒的检测[J]. 现代预防医学, 2014, 41(15): 2790-2792.
- [7] 唐梦君, 周生, 张小燕, 等. 空肠弯曲杆菌 LAMP (下转第 1437 页)

血小板计数差异无统计学意义($P < 0.05$),当 $70 \text{ fL} < \text{MCV} < 80 \text{ fL}$, $\text{RDW} > 14.6\%$ 时, PLT-I 与 PLT-O 测定血小板计数差异有统计学意义($P > 0.05$)。

PLT-I 经济稳定,是日常工作的首选方法,但 PLT-O 对血小板的形态有更好的鉴别能力。当遇到 $\text{MCV} < 70 \text{ fL}$ 或 $70 \text{ fL} < \text{MCV} < 80 \text{ fL}$,且 $\text{RDW} > 14.6\%$ 时,血小板应采用 PLT-O 进行复检,避免出现血小板的假性增高或减少。

血小板减少常引起出血,若标本中存在小红细胞或其碎片,可使血小板假性增高^[3],容易误导临床,使他们轻视了患者的出血倾向,延误诊疗时间。同时,齐凤芹等^[4]研究表明,危重患儿血小板越低,病情越重,预后越差,并发全身炎性反应综合征、多脏器功能障碍综合征概率越高。因此密切监测血小板的变化,能有效降低患儿病死率,判断患儿病情,估计预后。

另外,标本中若出现大血小板或未成熟血小板比率升高, PLT-I 可能误认为是红细胞^[5],而导致血小板假性减少,误导临床对患者进行其他不必要的辅助检查,或造成假性血小板危重值,致使患者无必要输注血小板,增加其发生免疫性输血反应和感染的风险^[6-7]。故此准确的血小板计数尤为重要。

值得注意的是, XE-2100 血细胞分析仪对血小板检测的精密密度较高,线性及相关性较高^[8],还可检测网织血小板^[9],但仍需要结合血小板计数值范围、报警内容、直方图及散点图的提示进行具体分析,特别当有潜在干扰因素,如血液标本不合格,有肉眼看不见的小凝块或标本被稀释等出现时,应用人工镜检法复查^[10-13],总体判断血小板的形态和计数,从而为临床提供快速准确的检验结果,满足临床需要。

参考文献

[1] 熊立凡. 临床检验基础[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2003.

(上接第 1386 页)

- 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国人兽共患病学报,2012,28(9):917-921.
- [8] 刘威,李奉京,何旭峰,等. 基于 LAMP 技术的核酸快速诊断技术平台建立[J]. 中国医疗器械信息,2014,5(4):43-47.
- [9] 李嘉彬,马艳平,柯浩,等. 嗜水气单胞菌与温和气单胞菌的 LAMP 检测方法的建立[J]. 南方水产科学,2014,10(5):8-16.
- [10] 吴家林,沙丹,孙燕萍,等. 应用环介导等温扩增技术快速检测副溶血性弧菌[J]. 中国卫生检验杂志,2013,23(6):1481-1484.
- [11] 余传信,殷旭仁,王玠,等. 快速检测日本血吸虫感染性钉螺 LAMP 试剂盒的建立及应用[J]. 中国病原生物学杂志,2011,6(2):121-124.
- [12] 马寅众,李琦,李奎,等. 环介导等温扩增法对乙肝病毒的快速检测和分型[J]. 华中科技大学学报:医学版,2012,41(1):49-53.
- [13] Jiang T, Liu J, Deng YQ, et al. Development and evaluation of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of enterovirus 71[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(3):870-874.
- [14] 孙兴泽,程兴东,张能英,等. 基于 LAMP 的手足口病病毒分离鉴定[J]. 广州化工,2015,43(4):131-134.
- [15] Notomi T, Okayama H, Masubuchi HA, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):E63.
- [16] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Mol Cell Probes, 2002, 16(3):223-229.

- [2] 张伟红,陈斌,黎梦珊,等. SYSMEX XE-5000 血液分析仪血小板准确计数的相关分析[J]. 检验医学,2014,29(7):741-744.
- [3] 郑玉芬,卢国光,吴春龙,等. 四种方法对不同 MCV 水平血小板计数的影响[J]. 浙江实用医学,2014,19(4):235-238.
- [4] 齐凤芹,李松,徐桂霞,等. 危重症患儿动态血小板计数监测及其临床意义[J]. 中国基层医药,2012,19(13):1976-1977.
- [5] 刘非,梁绮华,姜志勇,等. 血小板分布异常原因分析及对血小板计数的影响[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(6):726-728.
- [6] 江雪霞,陈辉,黎庆梅. XE-5000 血细胞分析仪 MCV 和 RDW 对血小板测定的影响[J]. 中国当代医药,2012,19(25):107-108.
- [7] 农荣欣. 假性血小板危急值报告分析[J]. 实验与检验医学,2013,31(4):349-351.
- [8] 顾晓菁,熊立凡. 血液分析仪 XE-2100 血小板计数准确性与血涂片复检的比较分析[J]. 实验与检验医学,2008,26(5):484-488.
- [9] 任春云,金明超,包丹妮,等. Sysmex XE-2100 血液分析仪定量检测成人网织血小板的方法学评价及参考区间建立[J]. 实验与检验医学,2010,28(5):459-460.
- [10] 卢其明. sysex-1800i 血细胞分析仪和镜检比值法血小板计数结果比较[J]. 实验与检验医学,2010,28(3):334.
- [11] 焦瑞宝,李娜,刘娜,等. 激光散射法和电阻抗法在全血血小板计数中的比较[J]. 安徽医药,2013,17(11):1887-1889.
- [12] 刘纹,郑妍,刘晓敏. SYSMEX XE-5000 血细胞分析仪血小板计数性能评价分析[J]. 检验医学与临床,2011,8(20):2492-2494.
- [13] 广圣芳. 血细胞分析仪测血小板结果假性降低的原因分析及纠正方法[J]. 安徽医学,2012,33(10):1296-1297.

(收稿日期:2016-02-01)

- [17] 孙边成,长如胜,宋克云,等. 10 种食源性疾病病原体高通量 LAMP 分子鉴别检测体系的建立及应用[J]. 实用预防医学,2011,18(12):2259-2264.
- [18] 梁磊,李英军,孟兆祥,等. 环介导等温扩增技术检测小肠结肠炎耶尔森氏菌的研究[J]. 食品科技,2011,36(9):335-339.
- [19] 荣蓉,张丽芳,李雨函,等. 实验动物金黄色葡萄球菌 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国比较医学杂志,2012,22(4):68-72.
- [20] 杨柏云,韦玉梅,杨丽,等. 基于 LAMP 的人轮状病毒检测方法及其在水环境中的应用[J]. 安全与环境学报,2013,13(1):113-118.
- [21] 杨丽,何晓青,韦玉梅. 环介导等温扩增技术(LAMP)检测人星状病毒方法的建立及其在再生水检测中的应用[J]. 生态毒理学报,2011,6(6):600-606.
- [22] 曹经媛,孟庆玲,李新兰,等. 新疆伊犁 2005 年甲型肝炎病毒流行株基因分型研究[J]. 病毒学报,2007,23(2):110-114.
- [23] 乔彩霞,张鹤晓,赖平安,等. 戊型肝炎病毒荧光定量 RT-PCR 快速检测技术的建立和初步应用[J]. 生物工程学报,2008,24(5):892-897.
- [24] 朱兆奎,张曦,滕峥,等. SYB GRgreen I 实时 PCR 检测甲肝病毒方法的建立与初步应用[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(7):1183-1185.
- [25] 荣义辉,李永利,游绍莉,等. 1 种血清戊型肝炎病毒荧光定量 RT-PCR 快速检测方法的建立[J]. 国际检验医学杂志,2015,36(5):601-603.

(收稿日期:2015-12-16)