

# 利用反转录环介导等温扩增技术 检测麻疹病毒

李淑华 刘岩 曹广文

**【摘要】** 目的 建立一种快速检测麻疹病毒的方法。方法 以分离到的麻疹病毒RNA为模板,利用环介导等温扩增技术(LAMP)原理,设计合成3套引物,特异型识别病毒基因的8个位点,在反转录酶作用下,63 ℃扩增60 min,80 ℃ 2 min终止反应,最终产物分别经凝胶电泳和荧光目视观察。通过real-time 仪实时监测反应过程,同时将该方法的灵敏度、特异度与常规RT-PCR、real-time RT-PCR进行比较。结果 RT-LAMP反应约1 h即可完成,最终产物经电泳观察可见大小片段不等的呈梯度的扩增条带,目视显示反应液颜色由黄色变为绿色。灵敏性是常规RT-PCR和real-time RT-PCR的100倍。结论 RT-LAMP方法具有灵敏、特异、快速、简便、成本低等特点,适用于基层和现场使用。

**【关键词】** 麻疹病毒;反转录环介导等温扩增;反转录-聚合酶链反应

**Detection of measles virus genome by reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP)** Li Shuhua<sup>1</sup>, Liu Yan<sup>2</sup>, Cao Guangwen<sup>2</sup>. 1 Shanghai Hongkou District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200082, China; 2 Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University  
Corresponding author: Cao Guangwen, Email: gcao@smmu.edu.cn

This work was supported by grants from the Forty-third Post-doctoral Science Foundation (No. 20080431367), Hongkou District Health Bureau of Shanghai (No. 1103-33) and Natural Science Foundation of Shanghai (No. 07ZR14141).

**【Abstract】 Objective** To establish a tool regarding the reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of measles virus. **Methods** Measles virus RNA was extracted by Trizol-LS reagent. The 1 242-1 442 sequence contained 8 primer sites of 6 sets primer. The RT-LAMP gene amplification was detected by a real-time PCR facility with AMV reverse transcriptase at 63 ℃ for 60 min before terminating the amplification at 80 ℃ 2 min. The amplified product was monitored by agarose gel electrophoresis and loop amp fluorescence methods. Sensitivity and specificity of the RT-LAMP assay were subsequently compared with that of conventional RT-PCR. **Results** The whole procedure of RT-LAMP took about 1 hour. The amplified products appeared to be a ladder-like electrophoresis pattern during the process of agarose gel electrophoresis. The appearance of color change in the reactions with positive controls and positive samples was evident at 20 min after RT-LAMP initiation. The sensitivity of RT-LAMP assay was 100-fold higher than that of the conventional RT-PCR of the real-time RT-PCR. The specificity of MV-specific LAMP assay was conformed by negative amplification of dengue virus and Japanese encephalitis virus. **Conclusion** RT-LAMP assay appeared rapid, cost-effective, highly sensitive and specific for the detection of genes of interest and proved to be potentially useful for surveillance on MV, especially in the grass root laboratories or for field studies.

**【Key words】** Measles virus; Loop-mediated isothermal amplification; Reverse transcription-polymerase chain reaction

麻疹病毒的实验室检测常用方法主要是病毒分

离和血清学双份血清抗体4倍增高方法,这两种方法所需时间较长、敏感性较低。环介导等温扩增技术(LAMP)<sup>[1-3]</sup>针对靶基因的8个部位设定3对引物,利用链置换反应在恒温下使靶基因高效扩增,最终产物形成不同柄-环结构的DNA和大量的副产物焦磷酸镁,通过与反转录酶的联合可用于对病毒RNA的检测,具有特异性强、灵敏度高、快速且低

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.02.019

基金项目:第43批中国博士后科学基金资助(20080431367);虹口区卫生局课题基金(虹卫1103-33);上海市自然科学基金(07ZR14141)

作者单位:200082 上海市虹口区疾病预防控制中心(李淑华);第二军医大学基础部流行病学教研室(刘岩、曹广文)

通信作者:曹广文, Email: gcao@smmu.edu.cn

成本等优点,目前已广泛应用于多种病毒检测。本研究在该技术原理的基础上,结合我国基层单位实验室的基础条件,在检测技术方面进行改良,以期能为我国麻疹病毒的快速检测、实验室诊断及提供技术储备。

## 材料与amp;方法

1. 病毒基因组来源:14株麻疹灭活病毒由第二军医大学提供,分别为2007、2008年宁波麻疹流行分离株,命名为MV07-05、13、20和MV08-02、06、12、18、23、27、29、33、36、44、47(与1993—2012年中国各地分离的麻疹流行株基因型相同,均为H1基因型)。随机选择MV07-05和MV08-02为代表株。麻疹S191疫苗代表株购于上海生物制品研究所(批号:20110501303),由虹口区疾病预防控制中心提供。其他病毒株如登革热病毒(DENV)、流行性乙型脑炎(乙脑)病毒(JEV)分别由第二军医大学和上海市疾病预防控制中心提供。

2. RNA提取:采用天根生化科技(北京)有限公司TIANamp病毒RNA提取试剂盒提取RNA。每份取病毒培养上清液200  $\mu$ l,按说明书操作,最后沉淀物用20  $\mu$ l DEPC处理水溶解,备用。

3. 引物设计及合成:参考文献[4]针对麻疹病毒基因保守区的8个位置设计3对引物:F3:ACA TTG GCA TCT GAA CTC (1 242 ~ 1 259 bp), B3: TCC TCG ACT CTG TTT GAC (1 425 ~ 1 442 bp); FIP (F1 + F2): TGT CCT CAG TAG TAT GCA TTG CA + GGT ATC ACT GCC GAG GAT G (F1: 1 298 ~ 1 320 bp; F2: 1 260 ~ 1 278 bp), BIP (B1 + B2): AGC CCA AGT ATC ATT TCT ACA CGG TG + TCC TAT CTT CCT TGC CCC CC (B1: 1 349 ~ 1 374 bp; B2: 1 401 ~ 1 422 bp); F LOOP: ATC TCT GAA ACA AG (1 284 ~ 1 297 bp), B LOOP: CAA AGT GAG AAT GAG CT (1 377 ~ 1 393 bp), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

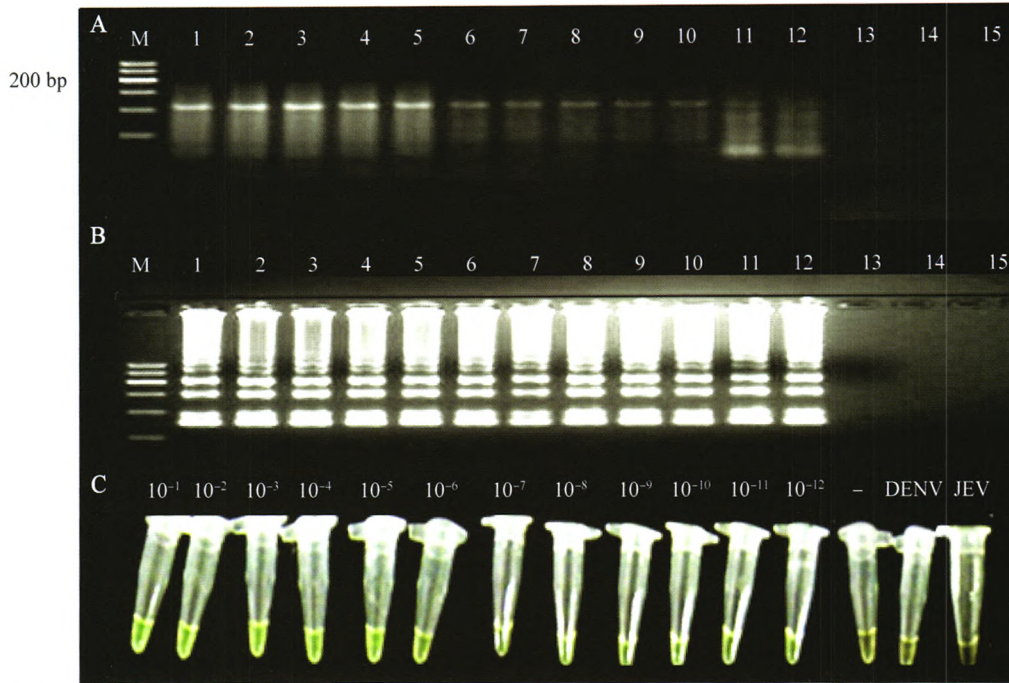
4. RT-PCR反应:采用美国Promega公司Access RT-PCR System试剂盒(批号:A1250)提取病毒RNA,以F3、B3为引物进行RT-PCR。反应体系:5  $\times$  Reaction Buffer 10  $\mu$ l, MgSO<sub>4</sub> (25 mmol/L) 2  $\mu$ l, dNTP mix (10 mmol/L) 1  $\mu$ l, F3 (10  $\mu$ mol/L) 和 B3 (10  $\mu$ mol/L) 各2  $\mu$ l, AMA reverse transcriptase (5 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, Tfl DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, 加DEPC处理水至总体积为50  $\mu$ l。反应条件:37  $^{\circ}$ C 30 min; 94  $^{\circ}$ C 2 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30个循

环;72  $^{\circ}$ C 10 min。反应结束后取10  $\mu$ l上样于含EB染料的3%琼脂糖凝胶电泳观察。同时分别以不同稀释度(10倍稀释)的病毒RNA为模板按同样方法构建RT-PCR反应,检测RT-PCR反应的灵敏度,用DENV、JEV RNA为模板,观察RT-PCR反应的特异度。

5. RT-LAMP反应:以病毒RNA为模板,反应体系为25  $\mu$ l: 1.0  $\mu$ l 50  $\mu$ mol/L FIP和BIP, 0.5  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L的F3和B3, 1.0  $\mu$ l 25  $\mu$ mol/L的FLP和BLP, 3.5  $\mu$ l 10 mmol/L dNTP(美国Promega公司), 4  $\mu$ l 5 mol/L三甲胺乙内酯(betaine), 2.5  $\mu$ l 10  $\times$  Buffer, 6  $\mu$ l 25 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ l *Bst* DNA polymerase (8 U/ $\mu$ l)(美国NEB公司), 0.2  $\mu$ l reverse transcriptase (5 U/ $\mu$ l)(美国NEB公司), 0.8  $\mu$ l DEPC处理水, 2  $\mu$ l RNA。63  $^{\circ}$ C 60 min, 80  $^{\circ}$ C 2 min终止反应。取10  $\mu$ l RT-LAMP反应液上样于含EB染料的3%琼脂糖凝胶电泳观察。同时分别以不同稀释度(10倍稀释)的病毒RNA为模板按同样方法构建RT-LAMP反应,检测灵敏度,用DENV、JEV RNA为模板,观察特异性。并于RT-LAMP反应液中加入1.0  $\mu$ l荧光探测试剂[Loopamp Fluorescence Detection Reagent, SLP221, 荣研生物科技(中国)有限公司], 混匀后,63  $^{\circ}$ C 30 min,观察反应液颜色变化。

6. real-time RT-PCR:采用One Step SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit(日本TaKaRa公司)分别以不同稀释度的麻疹病毒RNA为模板,以F3、B3为引物,构建20  $\mu$ l的反应体系,包括2  $\times$  One Step SYBR RT-PCR Buffer 10  $\mu$ l, Prime Script 1 Step Enzyme Mix 0.8  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L的F3和B3各0.8  $\mu$ l, RNA 2  $\mu$ l, DEPC处理水5.6  $\mu$ l,置于real-time PCR仪LightCycler480(瑞士Roche公司),反转录42  $^{\circ}$ C 5 min, 95  $^{\circ}$ C 10 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 10 s, 40个循环,483 ~ 537 nm观察荧光信号强度,扩增结束后进行60  $^{\circ}$ C ~ 95  $^{\circ}$ C的溶解曲线分析,每个反应设2个复孔。同时设DENV、JEV RNA为阴性对照。

7. real-time RT-LAMP:为了能实时监测RT-LAMP反应,同样分别以不同稀释度的病毒RNA为模板,按上述方法构建RT-LAMP反应体系,同时向每个反应体系中分别加入1  $\mu$ l 20  $\times$  SYBR Green I 荧光染料,63  $^{\circ}$ C 60 min置于real-time PCR仪中,每40 s为1个循环,483 ~ 537 nm观察荧光信号强度。扩增结束后进行60  $^{\circ}$ C ~ 95  $^{\circ}$ C范围内的溶解曲线分析,每个反应设2个复孔。同时设DENV、JEV RNA为阴性对照。



注：A: RT-PCR; B: RT-LAMP; C: 荧光目视法 RT-LAMP; M: Marker; 1~12: 麻疹病毒, 浓度为  $10^{-1}$  ~  $10^{-12}$ ; 13: 空白对照; 14: DENV RNA; 15: JEV RNA

图1 RT-PCR与RT-LAMP反应

结 果

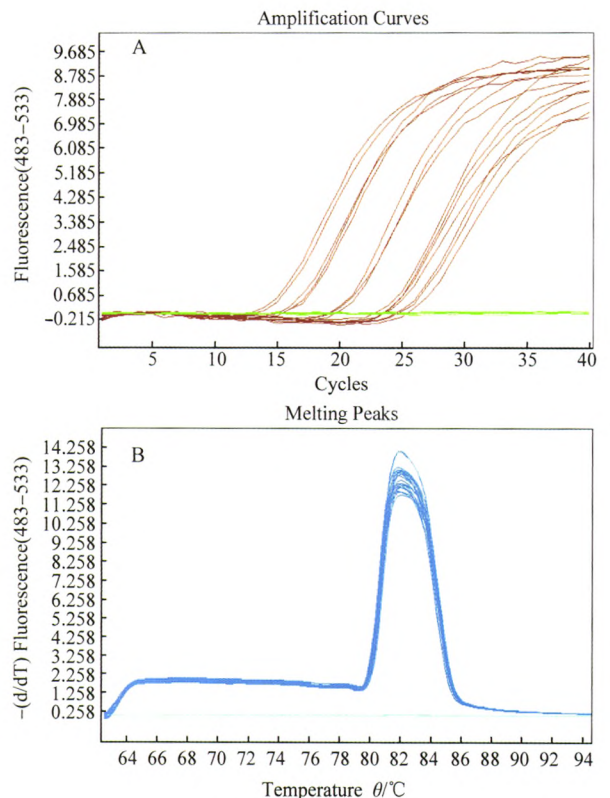
1. RT-PCR: RT-PCR 扩增后获得 200 bp 左右的片段(图 1A), 且阳性反应可以检测到病毒模板的  $10^{-10}$  稀释度, 阴性对照未见扩增条带。

2. RT-LAMP: 如图 1B 可见, 电泳带中可见片段大小不等的 DNA 条带, 这些条带由 6 条引物共同作用扩增生成的不同柄-环结构的 DNA 组成。阳性反应可检测至  $10^{-12}$  稀释度的病毒模板量, 灵敏度是 RT-PCR 的 100 倍, 空白、阴性对照未见扩增条带。

3. 荧光目视法检测 RT-LAMP: 如图 1C 所示, LAMP 反应 20 min 后, 溶液颜色呈现绿色, RNA 浓度越低, 颜色越浅,  $10^{-12}$  稀释管也显示绿色, 空白和阴性对照呈黄色, 与 RT-LAMP 电泳结果一致。

4. real-time RT-PCR: 不同模板浓度反应管 Ct 值与模板浓度呈现明显的相关性, 模板的浓度越小, 荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数越多。在反应进行第 15 个循环(约 15 min) 可见阳性扩增曲线, 最低模板浓度( $10^{-10}$  稀释度) 阳性扩增曲线也在第 25 个循环(20 min) 后可见, 约 40 个循环(30 min) 进入平台期。阴性对照未见扩增曲线(图 2A)。熔解曲线可见一组相同形状的曲线, 高峰均位于  $82\text{ }^{\circ}\text{C}$  ~  $84\text{ }^{\circ}\text{C}$ (图 2B)。反应结束后将反应体系各取 10  $\mu\text{l}$  进行电泳观察, 结果与图 1A 相一致。

5. real-time RT-LAMP: 不同模板浓度的反应管



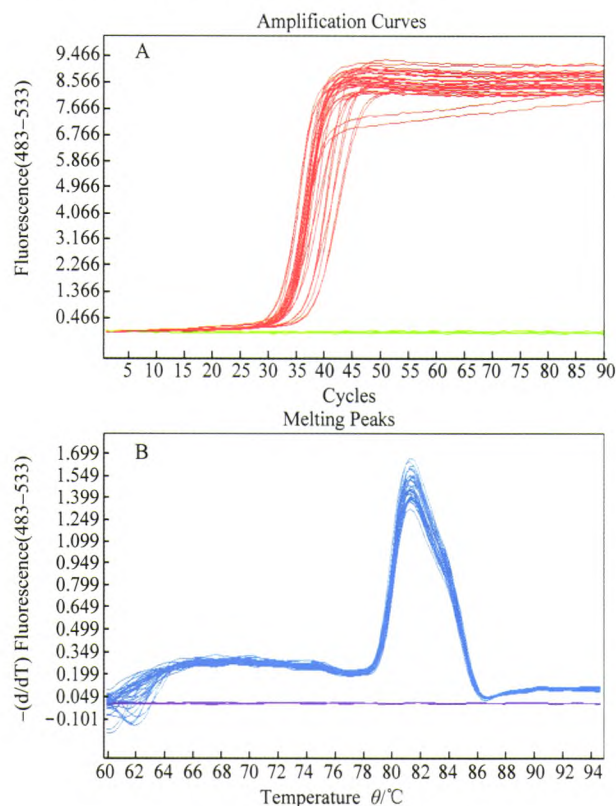
注：A: real-time RT-PCR 结果, 模板 RNA 浓度为  $10^{-1}$  ~  $10^{-10}$  稀释度; B: 熔解曲线

图2 麻疹病毒 real-time RT-PCR 反应

均在反应开始约 30 个循环(20 min) 出现阳性扩增曲线, 45 个循环(30 min) 后进入扩增平台期, 模板浓度可检测至  $10^{-12}$  稀释度。空白、阴性对照未见扩增曲



线(图3A),熔解曲线显示没有非特异性扩增,高峰均位于80℃~84℃。空白、阴性对照熔解曲线低平无峰(图3B)。反应结束后将反应体系各取10 μl进行电泳观察,结果与图1B相一致。



注:A:real-time RT-LAMP,模板RNA浓度为 $10^{-1}$ ~ $10^{-12}$ 稀释;  
B:熔解曲线

图3 麻疹病毒real-time RT-LAMP反应

6. 实际应用:分别用RT-PCR、real-time PCR、real-time RT-LAMP和荧光目视法RT-LAMP方法对2007—2008年宁波麻疹病毒分离株14株、26份临床疑似麻疹咽拭子标本(IgM检测均呈阳性,其中6份病毒分离阳性)进行麻疹核酸检测,结果显示,14株麻疹病毒分离株全部检出阳性,检出率为100.00%。26份临床疑似麻疹咽拭子标本利用RT-PCR方法进行检测,阳性数为9份(34.61%),利用real-time RT-PCR方法,阳性数为12份(46.15%)。利用real-time RT-LAMP和荧光目视法,阳性数均为18份(69.23%)。病毒分离阳性的6份咽拭子标本经4种方法进行检测,均显示麻疹病毒阳性,阳性率为100.00%。

## 讨 论

本研究利用LAMP反应的原理,63℃60min对麻疹病毒目的基因进行扩增,同时与常规PCR方法进行比较,电泳观测可见RT-PCR为单一的

RT-LAMP扩增反应呈现特有的分子质量大小不等DNA扩增条带,敏感性是常规RT-PCR方法的100倍,检测浓度达 $10^{-12}$ 稀释度。为了更好地监测RT-LAMP整个反应过程中DNA的扩增情况,采用SYBR Green I荧光PCR技术,对LAMP反应体系进行实时监测并将结果与常规real-time RT-PCR进行比较,结果显示,RT-LAMP反应DNA的扩增曲线呈“S”形,也分为起始、扩增和平台期,与real-time RT-PCR相比,反应迅速,模板浓度对 $C_t$ 值的影响不大,熔解曲线分析也均未见非特异扩增。

对麻疹疑似患者咽拭子标本进行检测的应用研究表明,该方法较常规的核酸检测方法更为敏感,阳性检出率高。

RT-LAMP对麻疹病毒进行检测,只需把试剂加入反应试管中,65℃保温约1h即可完成,不需要PCR仪,利用荧光目视方法直接观测结果,最大限度地控制实验室污染和假阳性,有效控制基因的检测成本,值得推广使用<sup>[5-7]</sup>,尤其适合基层实验室。

## 参 考 文 献

- [1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12):E63.
- [2] 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.
- [3] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(1):150-154.
- [4] Fujino M, Yoshida N, Yamaguchi S, et al. A simple method for the detection of measles virus genome by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. *J Med Virol*, 2005, 76(3):406-413.
- [5] Parida MM. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance[J]. *J Biosci*, 2008, 33(4):617-628.
- [6] Zhou JH, Hou X, Chen C, et al. Application of a simple method for the detection of measles virus genome by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. *Chin J Exp Clin Virol*, 2008, 22(6):403-405. (in Chinese)  
周剑惠,侯祥,陈超,等.应用简便反转录环介导等温扩增方法检测麻疹病毒核酸[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2008, 22(6):403-405.
- [7] Nakayama T, Sawada A, Kubo H, et al. Simple method to differentiate measles vaccine from wild-type strains using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. *Microbiol Immunol*, 2013, 57(3):246-251.

(收稿日期:2013-08-21)

(本文编辑:万玉立)