

## 应用环介导等温扩增技术检测弓形虫

杨秋林\*, 张如胜, 伍和平, 张愉快, 王可耕

**【摘要】** 目的 用环介导等温扩增 (LAMP) 技术检测弓形虫。方法 用酚-氯仿法提取弓形虫速殖子基因组 DNA, 设计两对扩增弓形虫 B1 基因的 LAMP 引物。以间日疟原虫、恶性疟原虫、卡氏肺孢子虫、日本血吸虫及小鼠白细胞作对照, 进行 LAMP 反应, 产物经 SYBR Green I 显色及电泳后观察结果, 绿色判为阳性, 棕色判为阴性。将弓形虫速殖子经倍比稀释为  $(2\sim3) \times 10^6$  个/ml 至  $(2\sim3) \times 10^{-1}$  个/ml 等 8 个浓度, 进行 LAMP 反应, 验证该方法的敏感性。结果 LAMP 反应结果显示, 弓形虫速殖子检测管经显色后呈绿色, 对照组均呈棕色。弓形虫的 LAMP 产物经电泳后呈 LAMP 特征性梯状条带, 对照组均无扩增产物。LAMP 技术可检测到的弓形虫速殖子最低浓度为 2~3 个/ml。结论 LAMP 技术在弓形虫检测中显示出较好的特异性与敏感性。

**【关键词】** 弓形虫; 检测; 环介导等温扩增技术

中图分类号: R531.8, R446.6 文献标识码: A

### Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification

YANG Qiu-lin\*, ZHANG Ru-sheng, WU He-ping, ZHANG Yu-kuai, WANG Ke-geng

(Department of Parasitology, Medical College, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

**【Abstract】 Objective** To detect *Toxoplasma gondii* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Methods** DNA was extracted by phenol-chloroform extraction from *T. gondii* tachyzoites. Four primers which recognized 6 distinct regions on the B1 gene of *T. gondii* were designed and used for LAMP assay. To evaluate the specificity of the method, *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *Pneumocystis carinii*, *Schistosoma japonicum*, and mouse leucocytes were used as controls. The parasite extract (*T. gondii*) was 10-fold serially diluted for evaluating the sensitivity of LAMP, and was amplified by LAMP. LAMP results were read with naked eye and analyzed by electrophoresis. **Results** After LAMP reaction, positive amplification was observed with *T. gondii*, but no positive signal was noted for the negative controls in the study. The sensitivity of LAMP assay reached up to 2-3 *T. gondii* tachyzoites/ml per reaction. **Conclusion** LAMP assay shows proper specificity and sensitivity for the detection of *T. gondii*.

**【Key words】** *Toxoplasma gondii*; Detection; Loop-mediated isothermal amplification

\* Corresponding author, E-mail: hyyql@yahoo.com.cn

弓形虫(*Toxoplasma gondii*)可通过母婴垂直传播, 影响优生优育, 对免疫功能缺陷或使用免疫抑制剂的患者亦可造成很大危害。对隐性弓形虫感染者检测较为困难, 故迫切需要一种敏感、特异及简便的检测方法。环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术是 Notomi 于 2000 年报道的一种新型核酸扩增方法<sup>[1]</sup>, 该法具有不需要 PCR 仪、肉眼可判断结果及反应时间短等优点, 可用于病原体核酸的检测。本研究以弓形虫高度保守、多拷贝的 B1 基因为靶基因, 应用 LAMP 检测弓形虫, 探讨该法在弓形虫感染诊断上的价值。

### 材料与方法

#### 1 材料

1.1 虫种来源 弓形虫 RH 株速殖子、日本血吸虫由本室保存, 间日疟原虫和恶性疟原虫由福建省疾病预防控制中心张山鹰研究员惠赠, 卡氏肺孢子虫由江苏大学医学院陈盛霞副教授惠赠。

1.2 主要试剂 *Bst* DNA 聚合酶与 *Tai* I 限制性内切酶购自英国 Biolabs 公司, 三甲胺乙内酯(Betaine) 购自瑞士 Fluka 公司, 硫酸镁购自美国 Sigma 公司, SYBR 染料购自美国 Invitrogen 公司, DNA 标志物购自北京天根生化科技有限公司, 脱氧核苷三磷酸(dNTP)购自北京鼎国生物技术有限责任公司, T 载体(pUCm-T)及

作者单位: 南华大学医学院寄生虫学教研室, 衡阳 421001

\* 通讯作者, E-mail: hyyql@yahoo.com.cn

DNA胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。

## 2 方法

**2.1 模板 DNA 的制备** (2~3)×10<sup>4</sup> 弓形虫速殖子悬浮于 150 μl 裂解缓冲液 [10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl) pH8.0、100mmol/L NaCl、20mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)、0.1 mg/ml 蛋白酶 K] 中, 56 °C 消化 1 h, 加入等体积 2% 十二烷基硫酸钠(SDS), 56 °C 消化 1 h, 酚-氯仿法抽提 DNA [2]。同法提取血吸虫、卡氏肺孢子虫及小鼠白细胞 DNA。间日疟原虫、恶性疟原虫 DNA 的提取按文献[2]进行。

**2.2 LAMP 扩增反应** 利用 PrimerExplorer V3 软件设计扩增弓形虫 B1 基因(GenBank 登录号为 AF179871) 的两对引物, 即 F3: 5'-ACCAGCAGCAGAGGAGTG-3' 和 B3: 5'-CCATCAGACGAATCAACGGA-3', FIP: 5'-CCTCCTCTTCGCGAAACCTCAAAGATGCCTAGAGGAGACA-3' 和 BIP: 5'-ACAAGAGACGTGCCGCATGTACTGTGCCATTTTCTGAGCA-3'。其中, FIP 包括 F1c-F2, 利用 F1c 与 F1 互补自动成环进行正向扩增; BIP 包括 B1c-B2, 利用 B1c 与 B1 互补自动成环进行反向扩增(图 1)。F3 和 B3 在 *Bst* DNA 聚合酶作用下可分别置换 F1c-F2 引导合成的正向链及 B1c-B2 引导合成的反向链。引物由广州英骏生物技术有限公司合成。分别以弓形虫、间日疟原虫、恶性疟原虫、卡氏肺孢子虫、血吸虫及小鼠白细胞 DNA 为模板, 进行 LAMP 反应。反应体系为: FIP 和 BIP 分别为 1.6 μmol/L, F3 和 B3 分别为 0.2 μmol/L, dNTPs 1.4 mmol/L, 三甲胺乙内酯(betaine)1.0 mol/L, MgSO<sub>4</sub> 7.0 mmol/L, 10×*Bst* DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μl、*Bst* DNA 聚合酶 8 U、DNA 模板 1 μl、加双蒸水至 25 μl。混匀, 65 °C 反应 60 min, 80 °C 2 min 终止反应。每管加入 1 000× SYBR Green I 染料 1~2 μl 染色, 绿色判为阳性, 棕色为阴性。分别取 1.2 μl 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳。

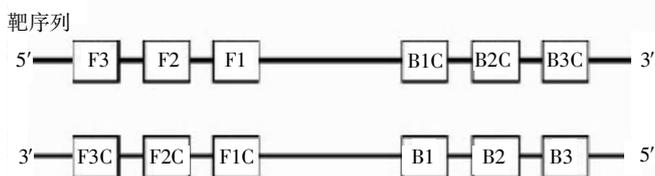


图 1 LAMP 引物设计原理

Fig.1 The principle of LAMP primer design

**2.3 LAMP 检测弓形虫的敏感性** 将弓形虫速殖子从 (2~3) ×10<sup>6</sup> 个/ml 至 (2~3) ×10<sup>-1</sup> 个/ml 进行 10<sup>-1</sup> 梯度稀释, 每个梯度分别提取 DNA 进行 LAMP 反应,

电泳检测结果。

**2.4 限制性内切酶酶切鉴定 LAMP 产物** 反应体系为: 8 μl LAMP 产物, 5 μl 去离子水, 1 μl 10×*Tai* I 限制性内切酶缓冲液, 1 μl *Tai* I 酶。65 °C 消化 16 h, 取 8 μl 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳。

**2.5 LAMP 产物的 DNA 序列分析** 从弓形虫 LAMP 产物的电泳胶上切下一条约 200 bp 的条带, 利用 DNA 胶回收试剂盒回收 DNA 后进行 TA 克隆[2], 将构建好的载体送上海生工生物技术有限公司进行 DNA 序列分析。

## 结 果

### 1 LAMP 扩增产物的检测

LAMP 扩增后加染料显色, 弓形虫检测管为绿色, 判为阳性, 全部对照组检测管为棕色, 判为阴性(图 2)。弓形虫 LAMP 产物经电泳后呈 LAMP 特征性梯状条带, 而各对照组均未扩增出条带(图 3), 显示引物具有特异性。

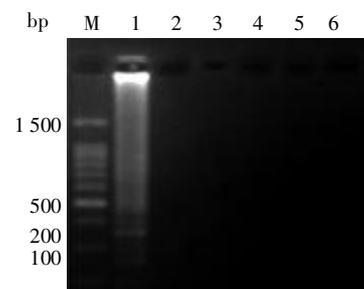


1: 弓形虫速殖子, 2: 间日疟原虫, 3: 恶性疟原虫, 4: 卡氏肺孢子虫, 5: 日本血吸虫, 6: 小鼠白细胞, 7: 空白对照。

1: *T. gondii* tachyzoites, 2: *Plasmodium vivax*, 3: *P. falciparum*, 4: *Pneumocystis carinii*, 5: *Schistosoma japonicum*, 6: Mouse leucocyte, 7: Blank control.

图 2 LAMP 扩增结果

Fig.2 The LAMP amplification results



M: DNA 标志物, 1: 弓形虫速殖子, 2: 间日疟原虫, 3: 恶性疟原虫, 4: 卡氏肺孢子虫, 5: 日本血吸虫, 6: 小鼠白细胞。

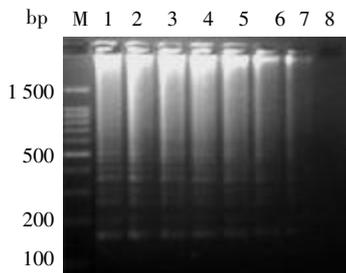
M: DNA marker, 1: *T. gondii* tachyzoites, 2: *Plasmodium vivax*, 3: *P. falciparum*, 4: *Pneumocystis carinii*, 5: *Schistosoma japonicum*, 6: Mouse leucocyte.

图 3 LAMP 扩增弓形虫的特异性

Fig.3 The specificity of LAMP-amplified *T. gondii* DNA

### 2 LAMP 检测弓形虫的敏感性

LAMP 结果显示, 可检测到弓形虫速殖子的最低浓度为 2~3 个/ml (图 4)。



M: DNA 标志物, 1~8:  $(2\sim3) \times 10^6$  个/ml~ $(2\sim3) \times 10^{-1}$ /ml 弓形虫速殖子。

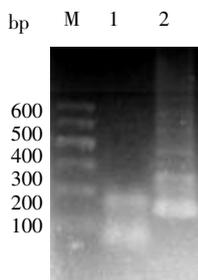
M: DNA marker, 1-8:  $(2\sim3) \times 10^6$  -  $(2\sim3) \times 10^{-1}$  *T. gondii* tachyzoites/ml.

图 4 LAMP 检测弓形虫速殖子的敏感性

Fig.4 Agarose gel illustrating the sensitivity of the LAMP assay

### 3 酶切鉴定 LAMP 产物

弓形虫 LAMP 产物经 *Tai* I 限制性内切酶酶切得到大小分别约为 170 bp 和 80 bp 的两个 DNA 片段, 结果与预期大小一致(图 5), 证明 LAMP 产物正确。



M: DNA 标志物, 1: 弓形虫 LAMP 产物经 *Tai* I 酶切 (170 bp 和 80 bp), 2: 未酶切的弓形虫 LAMP 产物。

M: DNA marker, 1: LAMP products after digestion with *Tai* I (170 bp and 80 bp), 2: LAMP products without digestion with *Tai* I.

图 5 LAMP 产物酶切图

Fig.5 LAMP amplified product digested by restriction enzyme

### 4 LAMP 产物 DNA 序列分析

测序结果表明, LAMP 扩增产物序列为: AACAGAGACGTGCCGATGTACTGTGCCATTTTCTGAGCA TCCCTTCCGATGGCTTAGCGACATGCGGCACGTCTCT AGTTATTCTTCTGTATATAATATGTTTCTCTCTTCGC GAAACCTCAATAGATTTGTTTCATAACACGCTGTGTCT CCTCTAGGCATCTTTGAGGTTTCGCGAAGAGGAGG, 与理论预测产物序列 (5'-B1CB2-B1-F1C-F2CF1-3') 一致, 表明 LAMP 反应扩增出目的序列。

### 讨 论

人体感染弓形虫后多表现为隐性感染, 体内虫体数量少, 加之虫体体积小, 病原学方法检测容易漏诊。如虫体寄生于大脑等器官, 则取材受限。动物培

养法需时较长, 对于免疫低下者免疫学方法不易检出弓形虫抗体, 而 DNA 检测不受机体免疫力的影响。PCR 技术虽然可以在一定程度上弥补病原学及免疫学方法的一些不足, 但需要 PCR 仪。LAMP 技术相比 PCR 具有以下优点<sup>[35]</sup>: ①特异性强, 2 对引物对靶序列的 6 个特异序列区的识别, 保证了 LAMP 扩增的高度特异性; ②快速高效, LAMP 在 1 h 内可将靶序列扩增至  $10^9 \sim 10^{10}$  倍。若在靶序列上进一步设计两条环引物, 扩增时间将在原来的基础上减少 1/3~1/2; ③反应在一恒温水箱中即可完成; ④结果鉴定简便。在核酸大量合成时, 从 dNTP 析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的  $Mg^{2+}$  结合, 产生大量的副产物——焦磷酸镁沉淀, 肉眼即可直接观察结果。

LAMP 引物设计的原理是选取靶基因一段约 200 bp 的保守序列, 设计 2 对引物 (外引物 F3、B3 和内引物 FIP、BIP), 利用内引物自动成环及外引物的置换作用快速完成靶序列的扩增。引物设计时要保持引物的退火温度约 55~65 °C, F2 与 B2 之间相距 120~180 bp, F2 与 F3 及 B2 与 B3 之间相距 0~20 bp, F2 与 F1 及 B2 与 B1 之间相距 40~60 bp, 避免引物二级结构形成。本研究针对弓形虫 B1 基因设计了两对 LAMP 引物进行弓形虫 DNA 的 LAMP 扩增, 结果显示, 以 B1 基因作为靶基因可检测到 2~3 虫体/ml 弓形虫, 本实验所使用的两对引物能特异扩增靶基因, 不与间日疟原虫、恶性疟原虫、卡氏肺孢子虫、日本血吸虫和小鼠白细胞 DNA 发生交叉反应, 具有较好的特异性。本实验结果表明 LAMP 检测弓形虫 DNA, 且具有特异、敏感和简捷等优点, 可望成为一种检测弓形虫感染的新方法。

### 参 考 文 献

[1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucl Acid Res, 2000, 28(12): E63.

[2] Xiao JH, Yang QL. A Laboratory Manual of Molecular Parasitology [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Publishing House, 2004. 13-92. (in Chinese) (肖建华, 杨秋林. 分子寄生虫学实验指南[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2004. 13-192.)

[3] Nagamine K, Watanage K, Ohtsuka K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template[J]. Clin Chem, 2001, 47(9): 1742-1743.

[4] 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.

[5] Fukuda S, Takao S, Kuwayama M, et al. Rapid detection of Norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(4): 1376-1381.

(收稿日期: 2007-12-06 编辑: 高石)