

## 猪呼吸与繁殖综合症病毒 RT-LAMP 检测方法的建立

鑫 婷<sup>1</sup>, 侯绍华<sup>1</sup>, 贾 红<sup>1</sup>, 郭晓宇<sup>1</sup>, 丁家波<sup>2</sup>, 李延鹏<sup>1</sup>, 丁 敏<sup>1</sup>, 朱鸿飞<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100081; <sup>2</sup>中国兽医药品监察所, 北京 100081)

**摘要:**【目的】建立一种适用于猪繁殖与呼吸综合症病毒的快速、灵敏、特异性检测方法, 即一步反转录环介导等温扩增技术 (RT-LAMP)。【方法】设计 3 对针对 PRRSV N 基因的 8 个位点的特异性引物, 用优化后的反应体系检测 RT-LAMP 的特异性、灵敏性并对临床样本进行检测。【结果】RT-LAMP 检测方法从核酸抽提到检测仅需要 70 min, 肉眼即可观察检测结果, 该方法具有良好的特异性, 灵敏度是 RT-PCR 的 10 000 倍, 在对 50 份猪血液样本 RNA 的检测中, 该方法与传统的 RT-PCR 检测方法具有很好的统一性 ( $\kappa = 0.83$ )。【结论】RT-LAMP 检测方法可快速、灵敏、特异的检测 PRRSV, 并适用基层和现场检测。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合症病毒; RT-LAMP; 检测

## Development of a Novel RT-LAMP Assay for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

XIN Ting<sup>1</sup>, HOU Shao-hua<sup>1</sup>, JIA Hong<sup>1</sup>, GUO Xiao-yu<sup>1</sup>, DING Jia-bo<sup>2</sup>, LI Yan-peng<sup>1</sup>, DING Min, ZHU Hong-fei<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; <sup>2</sup>China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081)

**Abstract:** 【Objective】 The objective of the experiment is to develop a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for rapid and sensitive detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). 【Method】 Three pairs of primers were designed to identify 8 positions in N gene, the sensitivity and specificity of RT-LAMP were determined and clinical test was performed under optimized amplification condition. 【Result】 A RT-LAMP assay was developed for the rapid detection of PRRSV. The process of assay was conducted with one step amplification within 70 minutes and amplification results were visualized. The sensitivity of RT-LAMP assay was 10 000 times higher than RT-PCR. In the detection of 50 porcine serum samples, this assay showed excellent agreement with the standard RT-PCR assay ( $\kappa=0.83$ ). 【Conclusion】 Therefore, the rapid and simple assay is a potential useful technique for PRRSV detection in field condition.

**Key words:** PRRSV; RT-LAMP; detection

### 0 引言

【研究意义】猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合症病毒 (PRRSV) 引起的传染病<sup>[1-2]</sup>, 该病毒变异很快, 2006 年中国南方爆发的“高热病”就是 *Nsp2* 基因部分缺失的 PRRSV 突变株引起的<sup>[3-5]</sup>。目前, 该病几乎已扩散到全球所有养猪业发达的国家

和地区, 给世界养猪业每年造成的损失达几十亿美元, 成为世界兽医学界近年来异常关注的疾病之一<sup>[6-8]</sup>。针对 PRRSV 临床检测难的问题, 本研究建立一种快速、灵敏、简便的检测方法——一步反转录环介导等温扩增技术 (RT-LAMP) 用以检测 PRRSV。【前人研究进展】猪繁殖与呼吸综合征目前主要依靠免疫学检测和核酸检测技术<sup>[9]</sup>, 但是 ELISA<sup>[10-11]</sup>耗时长、操作复杂并不适合作为快速检测方法; 以 RT-PCR<sup>[12]</sup>、套式

收稿日期: 2008-11-14; 接受日期: 2009-10-10

基金项目: 国家科技支撑项目 (2006BAD06A04)

作者简介: 鑫 婷, 硕士研究生。Tel: 010-82109855; E-mail: xinting\_xt@163.com。通信作者朱鸿飞, 研究员。Tel: 010-82109855; Fax: 010-62135638; E-mail: bioclub@vip.sina.com.cn

PCR<sup>[13]</sup>、实时 RT-PCR<sup>[14-15]</sup>、核酸探针原位杂交技术<sup>[16]</sup>为代表的核酸检测对样品宽容度高、灵敏、有较好的生物安全性，更适合于早期检测。但是，以上检测方法都耗时，对微量病毒粒子检测不灵敏，容易出现假阳性和假阴性。2000 年，日本学者 Notomi 等发明了一种新颖的恒温核酸扩增法，即环介导等温扩增法（Loop-mediated isothermal amplification, LAMP）<sup>[17]</sup>。该技术依赖能够识别靶序列上 6 个特异区域的引物和一种链置换 DNA 聚合酶（Bst DNA polymerase）在恒温下高效、快捷、特异扩增靶序列。LAMP 与传统 PCR 相比具有很多优点：扩增效率高，可在 15—60 min 内扩增 10<sup>9</sup>—10<sup>10</sup> 倍；由于 LAMP 识别靶序列 6—8 个特异性位点，具有很高的特异性；灵敏度高，一般能检测到 10 拷贝以下的质粒样品；成本低廉，仅需一个恒温加热装置如水浴锅即可；在 RNA 扩增中无需增加 42℃ 反转录步骤，大大缩短了反应时间；且检测结果易于观察<sup>[18-19]</sup>。【本研究切入点】目前，LAMP 技术已经用于人、动物、植物的多种病原体检测，如严重急性呼吸综合征（SARS）冠状病毒<sup>[20]</sup>、禽流感病毒<sup>[21-22]</sup>、口蹄疫病毒等<sup>[23-26]</sup>。本研究主要运用 LAMP 技术，建立一种猪繁殖与呼吸综合征病毒的快速检测方法。【拟解决的关键问题】利用 LAMP 技术，经过反应体系优化和临床试验，建立了一种检测 PRRSV 的新型、快速、实用、灵敏的检测技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病毒 PRRSV 疫苗株（Resprrs MLV AF066183）、经典株（VA）、变异株（F）；猪繁殖与呼吸综合征病例的临床病料；猪圆环病毒 II 型、猪细小病毒及猪伪狂犬病毒均由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物医学实验室采集、分离并保存。

1.1.2 主要试剂 Bst DNA 聚合酶购自 NEB 公司；甜菜碱、镁离子购自 Sigma 公司；RNA 提取试剂盒购自大连宝生物公司；AMV 反转录酶购自 Promega 公司；SYBR Green I 购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计 从 GenBank 中获得 PRRSV 毒株如 ATCC-VR2332 的 N 基因序列（登录号：PRU87392），利用 DNASTar 中的 MegAlign 进行序列比对，针对 N 基因的保守区，应用 Primer Explorer3.0 软件（<http://primerexplorer.jp>; Eiken Chemical Co. Ltd, Japan）设计 3 对引物包括两条外引物（F3 和 B3）、

两条内引物（FIP 和 BIP）和两条环引物（Loop F 和 Loop R）（图 1）；RT-PCR 引物引用自文献<sup>[15]</sup>，以上引物均由上海生工北京合成部合成。引物序列见表 1。

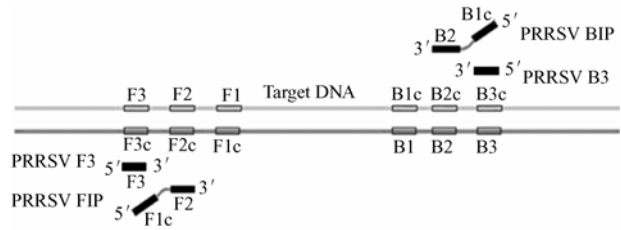


图 1 RT-LAMP 引物

Fig. 1 Primer design for RT-LAMP

表 1 引物序列表

Table 1 Sequences of oligonucleotides primers

引物名 Primer name	引物序列 5'-3' Sequence	引物长度 (bp) Primer length
PRRSV F3	GATGGCCAGCCAGTCAAT	18
PRRSV B3	GCCTTGATTAAAGGCGGTCT	20
PRRSV FIP	CTTTCCGGTCCCTTGCCCTTTT GTGCCAGATGCTGGGTAAG	43
PRRSV BIP	AACCCGGAGAAGCCCCATTTTT TTACACAATTGCCGCTCACTAG	45
PRRSV LOOP-F	ACTGGTTTTGCTGAGCGATGA	21
PRRSV LOOP-R	GCGACTGAAGATGATGTCAGACA	23
PRRSV P1	CCAGCCAGTCAATCARCTGTG	21
PRRSV P2	GCGAATCAGGCGCACWGTATG	21

1.2.2 RNA 的抽提 用 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.3.0 试剂盒，按说明书从 250 μL PRRSV 的细胞培养液中提取病毒总 RNA，溶于 30 μL 抽提液中，-80℃ 保存备用。

1.2.3 RT-LAMP 反应体系优化 根据反应体系优化策略，依次对反应温度、Mg<sup>2+</sup>浓度、甜菜碱浓度、引物浓度进行优化，具体梯度如下：反应温度分别为 61、62、63、64、65℃；Mg<sup>2+</sup>终浓度分别为 2、3、4、6、8、10 mmol·L<sup>-1</sup>；甜菜碱终浓度分别为：0、0.5、1、1.5、2 mol·L<sup>-1</sup>；内、外引物比例分别为：4、6、8、10；内外引物终浓度分别为：内引物 1.2、1.6、1.8、2.4、3.0、3.6、4 μmol·L<sup>-1</sup>，其对应的外引物终浓度分别为 0.2、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0 μmol·L<sup>-1</sup>。在 25 μL 的反应体系中 dNTP 混合液终浓度为 1.4 mmol·L<sup>-1</sup>，

Triton X-100 0.1%, Bst DNA 聚合酶 8 U, AMV 反转录酶 10 U, RNA 酶抑制剂 20 U, 模板 2  $\mu\text{L}$ , 环引物 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。所有体系在 63 $^{\circ}\text{C}$  分别反应 45 min, 80 $^{\circ}\text{C}$  加热 2 min 终止反应, 取 5  $\mu\text{L}$  反应产物上样于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 以确定最佳的反应体系。

**1.2.4 RT-LAMP 反应时间检测** 优化后的反应体系在 63 $^{\circ}\text{C}$  分别反应 30、45 和 60 min, 80 $^{\circ}\text{C}$  加热 2 min 终止反应以确定最少反应时间。取 5  $\mu\text{L}$  反应产物上样于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.2.5 RT-LAMP 反应产物内切酶鉴定** 用 SeqBilder 软件分析 RT-LAMP 目的片段中的酶切位点, 并筛选出单一的 *Hae* III (位点 GGCC), 酶切产物为 428 bp 和 10 bp。20  $\mu\text{L}$  反应体系中含 *Hae* III 10 U, 10 $\times$  缓冲液 2  $\mu\text{L}$ , RT-LAMP 产物 5  $\mu\text{L}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 2 h, 取 10  $\mu\text{L}$  的酶切产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定。

**1.2.6 RT-LAMP 的特异性检测** 分别从猪伪狂犬病毒、猪圆环病毒 II 型、猪细小病毒和 PRRSV 的疫苗株的细胞培养上清中, 用 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.3.0 试剂盒提取病毒基因组, 用优化后的反应体系在 63 $^{\circ}\text{C}$  反应 60 min, 80 $^{\circ}\text{C}$  反应 2 min, 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定。

**1.2.7 RT-LAMP 灵敏性检测** 从 250  $\mu\text{L}$  PRRSV 毒液中提取病毒总 RNA, 用紫外分光光度计在 260 nm 处测定其 OD 值, 并计算 RNA 含量; 取 10  $\mu\text{L}$  的 RNA 进行 10 倍梯度稀释 ( $10^{-1}$ — $10^{-10}$ ), 以稀释的 RNA 为模板, 设计 4 组试验: a 组不加环引物的 RT-LAMP; b 组加入环引物的 RT-LAMP; c 组为 RT-PCR; d 组不加环引物, 加入 SYBR Green I 染料。通过 4 组试验结果比较, 检测 RT-LAMP 灵敏度。RT-LAMP 反应体系如 2.1; 一步法 RT-PCR 反应体系 (25  $\mu\text{L}$ ) [15] 为: 10 $\times$  PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ 、引物 (P1 和 P2) 0.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、dNTP 混合液 0.4 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 、AMV 反转录酶 10 U、RNA 酶抑制剂 20 U、rTaq 20 U、模板 2  $\mu\text{L}$ , 反应循环参数为: 42 $^{\circ}\text{C}$  30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s、60 $^{\circ}\text{C}$  30 s、72 $^{\circ}\text{C}$  30 s (35 个循环); 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。反应结束后, a、b、c 组分别取 5  $\mu\text{L}$  的反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定, d 组加入 SYBR Green I 染料的反应管于紫外灯下观察结果。

**1.2.8 RT-LAMP 对不同 PRRSV 毒株的检测** 以优化后的 RT-LAMP 反应体系加入 1  $\mu\text{L}$  的 SYBR Green I 染料, 分别对 PRRSV 疫苗株、经典株和变异株进行检测, 63 $^{\circ}\text{C}$  保温 60 min, 80 $^{\circ}\text{C}$  加热 2 min, 反应结束后于紫外灯下观察。

**1.2.9 RT-LAMP 的临床检测试验** 从不同猪场采集 50 份血液样本, 用 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.3.0 试剂盒提取病毒总 RNA, 分别用 RT-LAMP 和 RT-PCR 两种方法检测 PRRSV。通过对两种检测结果的数据分析, 可以计算出 RT-LAMP 的特异性 (两种检测均为阴性的数据/RT-PCR 检测为阴性的数据), 灵敏度 (两种检测均为阳性的数据/RT-PCR 检测为阳性的数据), 并用 STATA10.0 软件 Kappa 程序分析两种检测方法的符合率。

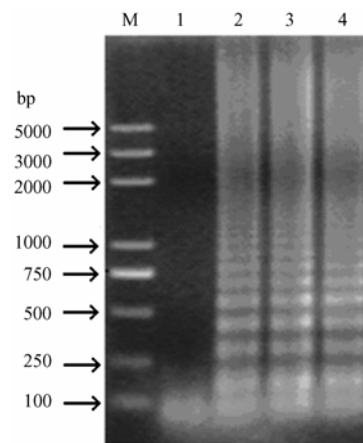
## 2 结果与分析

### 2.1 RT-LAMP 反应体系优化

优化后的反应体系 (25  $\mu\text{L}$ ) 确定为: 外引物 (F3 和 B3) 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 内引物 (FIP 和 BIP) 2.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 环引物 (Loop F 和 Loop R) 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  3 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ , 甜菜碱 0.5 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ , dNTP 混合液 1.4 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ , Triton X-100 0.1%, Bst DNA 聚合酶 8 U, AMV 反转录酶 10 U, RNA 酶抑制剂 20 U, 模板 2  $\mu\text{L}$ 。最佳反应温度为 63 $^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.2 RT-LAMP 反应时间的检测

用优化后的反应体系在 63 $^{\circ}\text{C}$  分别反应 30、45 和 60 min, 80 $^{\circ}\text{C}$  加热 2 min 终止反应, 取 5  $\mu\text{L}$  反应产物上样于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (图 2), 在反应 30 min 时就可看到明显的条带, 与传统一步法 PCR 方法比较, RT-LAMP 大大缩短了检测时间, 从核酸抽提到检测完成仅需 70 min。



M: Marker DL2000 plus; 1: 空白对照; 2—4: 分别为反应 30、45 和 60 min

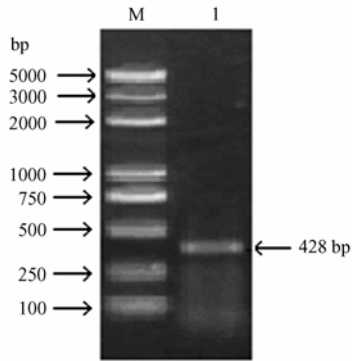
M: Marker DL2000 plus; Lane 1: Blank control; 2-4: Reaction for 30, 45 and 60 min, respectively

图 2 RT-LAMP 反应时间检测

Fig. 2 Determination of RT-LAMP at different times

### 2.3 RT-LAMP 反应产物内切酶鉴定

RT-LAMP 反应产物经 *Hae* III 酶切后, 取 10  $\mu$ L 反应产物上样于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (图 3), 可以看到一条 428 bp 的条带, 与理论值相符, 说明 RT-LAMP 扩增的条带是 PRRSV 的 *N* 基因。



M: Marker DL2000plus; 1: *Hae* III 酶切产物  
M: Marker DL2000 plus; 1: RT-LAMP products digested with *Hae* III

### 图 3 RT-LAMP 反应产物内切酶鉴定

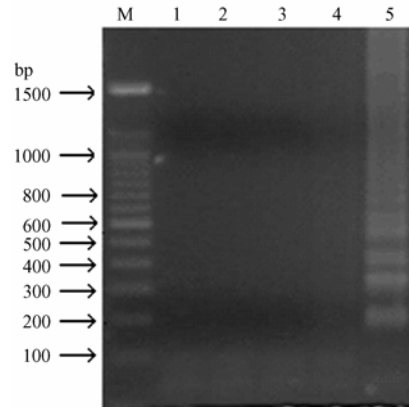
Fig. 3 Determination of RT-LAMP products digested with *Hae* III

### 2.4 RT-LAMP 的特异性检测

为验证 RT-LAMP 的特异性, 分别以猪伪狂犬病毒、猪圆环病毒 II 型和猪细小病毒基因组为模板, 按优化后的 RT-LAMP 体系进行恒温扩增, 取 5  $\mu$ L 反应产物上样于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 (图 4)。结果显示仅 PRRSV RNA 为模板可扩增出条带, 表明 RT-LAMP 检测方法对 PRRSV 具有良好的特异性。

### 2.5 RT-LAMP 灵敏性检测

从 250  $\mu$ L PRRSV 毒液中提取病毒总 RNA, 用紫外分光光度计在 260 nm 处测定其 OD 值为 0.037, 计算 RNA 含量为 0.0074  $\mu$ g $\cdot\mu$ L<sup>-1</sup>。用 10 倍梯度稀释的 PRRSV RNA 样本为模板, 进行 RT-LAMP 和 RT-PCR, 结果显示: 未加入环引物的 RT-LAMP 可以检测到 10<sup>-9</sup> 稀释度 (图 5-a), 如果在反应前加入 SYBR Green I 染料, 紫外灯下观察可见到强烈的绿色荧光, 即使没有加入环引物, 也可以检测到 10<sup>-10</sup> (图 5-d), 说明引入荧光染料可以提高检测的灵敏度; 加入环引物可检测到 10<sup>-10</sup> (图 5-b), 并且提高了反应效率, 增加了反应产物量, 从而缩短反应检测时间; 而 RT-PCR 可以检测到 10<sup>-5</sup> 释度 (图 5-c)。这表明 RT-LAMP 有很高的灵敏度, 是 RT-PCR 的 10 000 倍, 加入环引物



M: Marker 100bp DNA; 1: 空白对照; 2: 伪狂犬基因组扩增; 3: 猪圆环 II 型基因组扩增; 4: 猪细小基因组扩增; 5: PRRSV RNA 扩增  
M: Marker 100bp DNA; 1: Blank control; 2-5: Represent the results of different DNA/RNA template extracted from PPV, PCV II, PRV, PRRSV, respectively

### 图 4 RT-LAMP 特异性检测

Fig. 4 Specificity test for RT-LAMP

或荧光染料还可提高其敏感性。

### 2.6 RT-LAMP 对不同 PRRSV 毒株的检测

在 RT-LAMP 反应管中加入 SYBR Green I 染料, 分别对 PRRSV 疫苗株 (Resprsv MLV)、经典株 (VA) 和变异株 (F) 进行检测, 63 $^{\circ}$ C 保温 60min, 80 $^{\circ}$ C 加热 2 min, 反应结束后在紫外灯下观察, 可见疫苗株、经典株和变异株反应管均发出强烈的绿色荧光, 而阴性管无荧光 (图 6), 表明本套引物可检测美洲型 PRRSV 的经典株、疫苗株和变异株, 染料的加入使 RT-LAMP 的检测更为准确、快捷、方便。

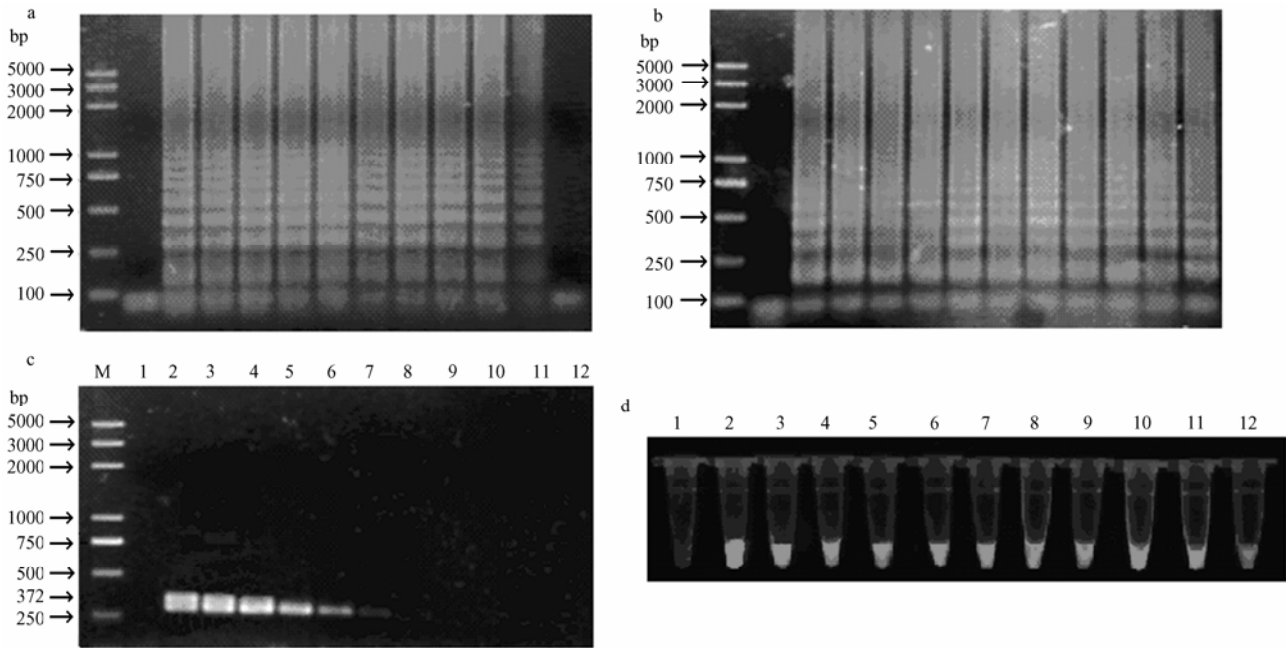
### 2.7 RT-LAMP 临床检测试验

对 50 份血液样本中提取的病毒 RNA, 分别进行 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测, 结果见表 2。相对于 RT-PCR, RT-LAMP 检测方法的特异性为 95%, 灵敏性为 93.3%。统计学分析显示 RT-PCR 和 RT-LAMP 两种检测方法有良好的统一性 ( $\kappa=0.83$ )。这表明, RT-LAMP 可以作为临床检测 PRRSV 的手段之一。

表 2 RT-LAMP 临床检测

Table 2 Comparison of RT-LAMP and RT-PCR in clinical test

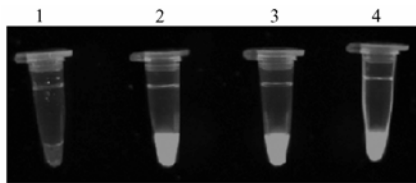
血清样本 Serum sample	RT-PCR 检测结果(符合率) RT-PCR result (agreement)			
	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative
RT-LAMP 检测结果 RT-LAMP result	阳性 Positive	19(95%)	30	
	阴性 Negative	28	27(93.3%)	



M: Marker DL2000 plus; 1: 空白对照; 2—12: 10 倍梯度稀释的 PRRSV RNA  $10^0$ — $10^{-10}$  a: 未加环引物的 RT-LAMP 反应; b: 加入环引物的 RT-LAMP 反应; c: RT-PCR 反应; d: 加入 SYBR Green I 染料的 RT-LAMP 反应  
M: Marker DL2000 plus; 1: Blank control; 2-12:  $10^0$ - $10^{-10}$  dilutions of RNA extract from PRRSV liquid a: Results of agarose gel electrophoresis of RT-LAMP products in witch without Loop primers; b: Results of gel electrophoresis of RT-LAMP products in witch with Loop primers; c: Results of gel electrophoresis of RT-PCR products; d: Results of SYBR Green I dye of RT-LAMP products in which without Loop primers

图 5 RT-LAMP 的敏感性试验

Fig. 5 Sensitivity test for RT-LAMP



1: 空白对照; 2—4: 模板分别为经典毒株、疫苗毒株和变异毒株的 RNA  
1: Blank control; 2-4: RNA extract from various strains of PRRSV

图 6 RT-LAMP 的显色反应

Fig. 6 Result of RT-LAMP with SYBR Green I dye

### 3 讨论

#### 3.1 RT-LAMP 的体系优化

良好的反应体系和反应温度才能表现出 RT-LAMP 的灵敏性和高效性, 本研究在反应体系和反应温度优化过程发现: 针对本套引物, 只有  $Mg^{2+}$  浓度不超过  $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 才能出现 LAMP 反应特有的梯状条带, 而以  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的反应条带最佳, 这

与之前文献报道的  $Mg^{2+}$  最佳浓度为  $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  不一致<sup>[12-14]</sup>, 可能与引物和目的基因本身的特点不同有关; 通常的 RT-LAMP 可在  $60$ — $65^\circ\text{C}$  反应<sup>[11-13]</sup>, 而在本研究中, 以  $63$ — $65^\circ\text{C}$  反应为好,  $61^\circ\text{C}$  反应结束后没有 LAMP 条带; 引物浓度对反应的影响并不大, 由于内引物之间距离短, 即使不加入环引物也与加入环引物后的灵敏度相近, 但是环引物<sup>[13]</sup> 的加入可提高反应效率、增加了产物量, 缩短反应时间; 由此可见针对不同基因的 LAMP 反应, 其反应体系和反应条件应重新优化, 不可一概而论。

#### 3.2 RT-LAMP 的优势

猪繁殖与呼吸综合征在中国多有发生, 以美洲型为主, 经典毒株、疫苗毒以及 2006 年后分离到的基因缺失突变株<sup>[3-5]</sup> 同时存在, 给中国的养猪业带来巨大损失。本研究建立的 RT-LAMP 检测方法 with 以往的检测方法相比具有诸多优势: 可以快速、准确、灵敏的检测到 PRRSV 的经典株、疫苗株和变异株; 利用 Bst DNA 聚合酶和 AMV 反转录酶在  $63$ — $65^\circ\text{C}$  等温扩增, 无需增加  $42^\circ\text{C}$  反转录步骤可在 1 h 内实现目的基因的

扩增<sup>[13]</sup>, 环引物的加入, 可在 30 min 实现目的片段的检测; 反应结果易于观察, 由于 LAMP 扩增过程中产生大量的焦磷酸镁沉淀使反应液浑浊<sup>[11]</sup>, 在反应结束后无需电泳可直接肉眼观察反应管是否浑浊来判断是否有扩增, 如果在反应前加入荧光染料, 反应结束后可根据在紫外下是否有强烈的绿色荧光来判断阳性与否; 特异性好, 对其它常见猪病原体基因组扩增阴性; 具有高度的灵敏性, 是传统 RT-PCR 的 10 000 倍, 即使是几个病毒粒子也能快速、准确的检测出来; 经济实用, 无需昂贵的检测仪器和专业的技术人员。

### 3.3 RT-LAMP 的临床应用

中国很多基层兽医单位和大多养殖企业尚未建立高等级诊断实验室, 依靠临床症状、病理剖检和简单的实验室检查很难快速准确的确定病原, 所以建立 PRRSV 的快速、灵敏、简便、实用的检测技术对基层至关重要。经过临床实验室检测, 表明本研究建立的 RT-LAMP 检测方法具有很好的灵敏性和特异性并与传统的 RT-PCR 检测方法有较高的符合度, 表明该检测方法可成为临床检测 PRRSV 的手段之一。

## 4 结论

本研究利用 LAMP 技术建立了一种快速、灵敏、特异的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 的检测方法。该检测方法具有很高的灵敏度, 是普通 RT-PCR 的 10 000 倍, 临床试验表明, 该检测方法可成为临床检测 PRRSV 的手段之一。

### References

- [1] Hopper S A, White M E C, Twiddy N. An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *The Veterinary Record*, 1992, 131(7): 140-144.
- [2] Wensvoort G, Terpstra C, Pol J M, ter Laak E A, Bloemendaal M, de Kluyver E P, Kraaijenhagen C. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Ielystad virus. *The Veterinary Quarterly*, 1991, 13(3): 121-130.
- [3] Tong G Z, Zhou Y J, Hao X F, Tian Z J, An T Q, Qiu H J. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, 13(9): 1434-1436.
- [4] Zhou Y J, Hao X F, Tian Z J. Highly virulent reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2008, 55(3-4): 152-164.
- [5] Li Y, Wang X, Bo K. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory virus in the Mid-Eastern region of China. *Veterinary Journal*, 2007, 174(3): 577-584.
- [6] Mateu E, Diaz I. The challenge of PRRS immunology. *Veterinary Journal*, 2008, 177(3): 345-351.
- [7] Cho J G, Dee S A. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*, 2006, 66(3): 655-665.
- [8] Prieto C, Castro J M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar. *Theriogenology*, 2005, 63(1): 1-16.
- [9] Wellenberg G J. diagnostic methods for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infections. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, 2006, 131(16): 566-572.
- [10] Denac H, Moser C, Tratschin J D, Hofmann M A. An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen. *Journal of Virological Methods*, 1997, 65 (2): 169-181.
- [11] Brown E, Lawson S, Welbon C, Li J, Murtaugh M P, Nelson E A, Molina R M, Zimmerman J J, Rowland R R R, Fang Y. Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2009, 16: 628-635.
- [12] Suarez P, Zardoya R, Martin M J, Prieto C, Dopazo J, Solana A, Castro J M. Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Research*, 1996, 42(1-2): 159-165.
- [13] Kono Y, Kanno T, Shimizu M, Yamada S. Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 1996, 58 (10): 941-946.
- [14] Wasilk A, Callahan J D, Christopher-Hennings J. Detection of U. S., Lelystad, and European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and relative quantization in boar semen and serum samples by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(10): 4453-4461.
- [15] Donadeu M, Arias M, Comez-Tejedor C, Aguero M, Romero L J, Christianson W T, Sánchez-Vizcaino J M. Using polymerase chain reaction to obtain PRRSV-free piglets from endemically infected herds. *Swine Health and Production*, 1999; 7(6): 255-261.
- [16] Sur J H, Cooper V L, Galeota J A. *In vivo* detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times post infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34(9): 2280-2286.
- [17] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H. Loop-mediated isothermal

- amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63.
- [18] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16(3): 223-229.
- [19] Nagamine K, Watanabe K, Ohtuka K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification using a nondenatured template. *Clinical Chemistry*, 2001, 47(9): 1742-1743.
- [20] Hong T C, Mai Q L, Cuong D V. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42: 1956-1961.
- [21] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H. Development of H5-RT-LAMP(loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine*, 2006, 24(44-46): 6679-6682.
- [22] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H. Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Virological Methods*, 2007, 141(2): 173-183.
- [23] Dukes J P, King D P, Alexandersen S. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *Archives of Virology*, 2006, 151(6): 1093-1106.
- [24] Parida M, Horioke K, Ishida H, Dash P K, Saxena P, Jana A M, Islam M A, Inoue S, Hosaka N, Morita K. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(6): 2895-2903.
- [25] Parida M M. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. *Journal of Biosciences*, 2008, 33(4): 617-628.
- [26] Yamazaki W, Taquchi M, Ishibashi M, Nukina M, Misawa N, Inoue K. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of campylobacter fetus. *Veterinary Microbiology*, 2008, 136(3/4): 393-396.

(责任编辑 林鉴非)