

禽新型黄病毒 RT-LAMP 检测方法的建立

李兆龙^{1,2}, 陈仕龙^{1,2}, 林锋强^{1,2}, 王 劲^{1,2}, 程晓霞^{1,2}, 朱小丽^{1,2}, 陈少莺^{1,2*}

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福州 350013; 2. 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福州 350013)

摘 要: 根据环介导等温扩增技术(LAMP), 建立了一种适用于禽新型黄病毒的逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)快速检测方法。根据禽新型黄病毒 E 蛋白基因序列, 在保守区设计了一套针对禽新型黄病毒基因 8 个区域的 6 条特异性引物, 并对反应条件进行优化。结果表明该方法对 NDRV、GPV、MDRV、NDV、ILTV、FPV 均无扩增反应, 并可通过反应液是否有沉淀或向反应液中加入荧光染料来对结果进行可视化观察; 扩增反应只需要在常温水浴锅中进行, 45 min 内可完成反应; 该方法对禽新型黄病毒 RNA 的最小检测限为 1 pg, 灵敏度是一步法 RT-PCR 方法的 100 倍。本研究建立的 RT-LAMP 方法简便、快速、灵敏、特异, 适合在基层进行禽新型黄病毒的快速检测。

关键词: 禽新型黄病毒; RT-LAMP; 检测方法

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)04-0659-05

Establishment of Rapid Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification for Detection of Avian Novel Flavivirus

LI Zhao-long^{1,2}, CHEN Shi-long^{1,2}, LIN Feng-qiang^{1,2}, WANG Shao^{1,2},
CHENG Xiao-xia^{1,2}, ZHU Xiao-li^{1,2}, CHEN Shao-ying^{1,2*}

(1. *Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China*; 2. *Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou 350013, China*)

Abstract: A reverse transcription loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay was developed for detection of avian novel flavivirus virus. According to the sequences of avian novel flavivirus virus E protein gene, six primers specific to the eight sites of novel flavivirus virus gene were designed, and the reaction conditions were optimized. The results showed that the assay had no cross reaction with NDRV, GPV, MDRV, NDV, ILTV and FPV. The assay was performed in water bath within 45 minutes and the amplification result was visualized by adding SYBR Green I or inspecting the white sediment. The detection limit of RT-LAMP assay was 1 pg, which was 100 fold higher than that of one step RT-PCR. The detection in clinical samples was 100% compliance with RT-PCR. These results suggested that the newly developed RT-LAMP assay is a simple and specific method for rapid detection of avian novel flavivirus virus in field conditions.

Key words: avian novel flavivirus; loop-mediated isothermal amplification; diagnosis method

2009 年以来,福建省多个蛋鸡养殖场出现一种蛋鸡发热、产蛋急降或停止、采食减少或食欲废绝的疾病,给蛋鸡养殖业造成巨大的损失。该病具有传染性,一年四季均可发生,以冬春季节多发,剖检主

要表现为卵泡出血,萎缩,部分卵黄破裂,选成卵黄性腹膜炎。本研究室从临床发病鸡场采集病料进行病原分离鉴定,证实导致此次蛋鸡产蛋下降的病原属于黄病毒科黄病毒属的一个新成员^[1-2]。目前,对

收稿日期: 2011-07-07

基金项目: 福建省农科院创新团队项目(STIF-Y02); 福建省公益类科研院所专项(2011R1025-2)

作者简介: 李兆龙(1973-),男,助理研究员,主要从事动物传染病病原与防治研究, E-mail: lizhaolong522@163.com

* 通讯作者: 陈少莺, E-mail: chensy58@163.com

该病的诊断方法主要是 RT-PCR, 虽然该方法灵敏性好, 但是操作繁琐、耗时, 不适于基层兽医的临床检测。因此本项目组在明确该病病原^[1]及其全基因序列的基础上, 为有效防制该病, 开展了更有效的诊断技术研究。

环介导等温扩增技术 (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) 是由 Notomi 等^[3]于 2000 年建立的一种新型核酸扩增技术, 其原理是通过识别靶序列上 8 个特异区域的引物和一种具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶, 在等温条件下进行自动循环的链置换核酸扩增反应, 反应中会产生大量肉眼可见的白色沉淀。该技术具有特异性高、操作简便、反应迅速、成本低廉等优点, 目前在一些病原微生物的检测中开始被广泛运用^[4-5]。本研究根据 RT-LAMP 原理, 优化相关反应条件, 建立了适合基层应用的禽新型黄病毒逆转录环介导等温扩增 (RT-LAMP) 快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 毒株

新型鸡黄病毒 (JD06) 由本实验室分离鉴定及

序列测定, 新型鸭呼肠孤病毒 (NDRV)、鹅细小病毒 (GPV)、番鸭呼肠孤病毒 (MDRV)、鸡的新城疫病毒 (NDV)、鸡的传染性喉气管炎病毒 (ILTV)、鸡痘病毒 (FPV) 均由本实验室保存、提供。

1.2 试剂

Bst DNA 聚合酶 (大片段) 购自 New England Biolabs 公司。MgCl₂、dNTPs、Sma I、MiniBEST Viral RAN/DNA Extraction Kit Ver 等均购自 TaKaRa 公司。甜菜碱 (Betaine) 购自 Sigma 公司, M-MLV Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司。SYBR Green I 荧光染料购自北京 Solarbio 公司。

1.3 引物和探针的设计与合成

利用 DNASTar 6.0 对 JD06 E 蛋白基因进行序列分析, 选取基因保守区的 800 bp, 利用在线生物软件 Primer Explorer V4 进行引物设计。引物包括 F3、B3、FIP (F1c+F2)、BIP (B1c+B2)、FL、BL 等 6 条引物, 分别识别 E 蛋白基因保守区 8 个基因位点。引物 (表 1) 由 Invitrogen 公司生物技术有限公司合成。

表 1 RT-LAMP 引物序列

Table 1 Sequences of RT-LAMP primers

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Sequence	基因组中的位置 ^a Position in genome
F3	CGACACGTATGGGTTGACTG	1951-1929
B3	GCAGGGTTTGAAGCTGAAAG	1756-1736
FIP	ATGGGCCCTGTAGAGTTCAT-CAAGCGTCCAAGTGGTGT	1858-1880 1925-1907
BIP	CACGACAGTGCCATGCCCAG-ACCTACCCGATGTGTAGCAA	1833-1813 1761-1781
FL	GTACAGTAAGTCTAGACGGCTG	1906-1884
BL	TGTCGGTAGGATTCTTACTAGGGA	1813-1789

a. 相应基因组位置 (GenBank 登录号 JN092575)

a. Genome position (GenBank accession No. JN092575)

1.4 病毒 RNA 的提取

按照 TaKaRa MiniBEST Viral RAN/DNA Extraction Kit Ver 使用说明书和文献进行病毒 JD06 RNA 抽提, -70 °C 保存备用。

1.5 RT-LAMP 方法的优化

设置不同的内外环引物浓度比、dNTPs 浓度、

Mg²⁺ 浓度、Betaine 浓度及不同的反应时间和反应温度, 分析各因素对 RT-LAMP 的影响。RT-LAMP 反应体系中, 含有内引物 F3/B3、外引物 FIP/BIP、环引物 FL/BL、dNTPs、Mg²⁺、Betaine、BstDNA 聚合酶、M-MLV 反转录酶、10×Thermopol 缓冲液以及模板 RNA。设置不同的内外环引物浓度比 (1:8:4, 1:8

: 5, 1 : 10 : 4, 1 : 10 : 5); dNTPs 浓度 (0.2~1.4 mmol · L⁻¹); Mg²⁺ 浓度 (4~10 mmol · L⁻¹); Betaine 浓度 (0~1.3 mmol · L⁻¹) 及不同的反应时间 (10~70 min) 和反应温度 (65, 63, 61 °C)。分析各因素对 RT-LAMP 的影响, 优化检测体系, 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 特异性和灵敏度检验

利用优化好的 RT-LAMP 反应体系, 以 JD06 RNA 及 NDRV、GPV、MDRV、NDV、ILTV、FPV 的核酸为待检样品进行检测, 检验 RT-LAMP 方法的特异性。将制备的 JD06 RNA 按 10 倍递增稀释, 并使用分光光度计测定稀释后各个梯度的 RNA 浓度, 分别为 100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、0.1 pg、0.01 pg。对各浓度 RNA 用 RT-LAMP 方法进行检测, 并用 RT-PCR 方法同时进行扩增。1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果确定该方法的灵敏度。

1.7 扩增产物的可视化检测

扩增反应结束后, 加入 1 μL SYBR Green I 染料, 观察反应体系的颜色变化, 置于紫外灯下观察是否有荧光产生。

1.8 RT-LAMP 产物酶切鉴定

RT-LAMP 反应结束后, 采用限制性内切酶 *Sma* I 进行酶切鉴定, 酶切体系如下: RT-LAMP 产物 8 μL、10×buffer 2 μL、*Sma* I 1 μL、去离子水

9 μL, 37 °C 作用 3 h。酶切产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

1.9 RT-LAMP 的初步应用

通过常规 RT-PCR 以及 RT-LAMP 方法对送检临床样品进行检测, 对比其符合率。临床样品包括 20 份新型鸡黄病毒样品。

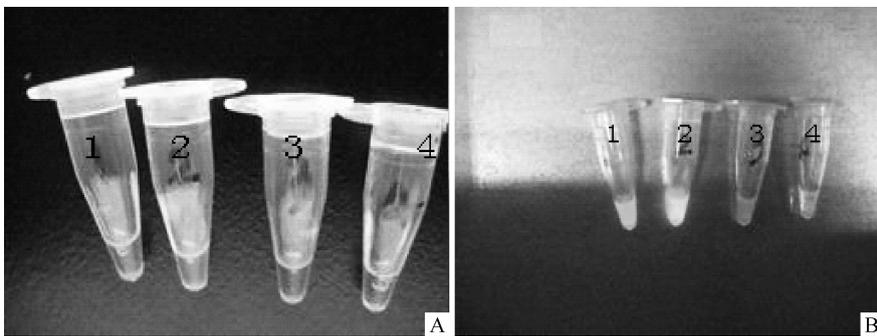
2 结果

2.1 RT-LAMP 方法的条件优化与建立

根据优化条件建立的反应体系: 0.6 pmol · L⁻¹ F3/B3、2.5 pmol · L⁻¹ FIP/BIP、0.8 pmol · L⁻¹ FL/BL、0.8 mmol · L⁻¹ dNTPs、20 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8)、10 mmol · L⁻¹ KCl、10 mmol · L⁻¹ (NH₄)₂SO₄、6 mmol · L⁻¹ Mg²⁺、0.1% TRITON X-100、0.8 mmol · L⁻¹ Betaine、8 U Bst DNA 聚合酶、1 U M-MLV 反转录酶及模板 RNA 3 μL。反应程序: 65 °C 水浴 45 min。

2.2 RT-LAMP 扩增产物的可视化检测

反应结束后, 向体系中加入 0.5 μL SYBR Green I 染料, 结果显示 JD06 样品呈绿色 (图 1A 第 1、2 管), 而第 3、4 管 (空白对照) 仍为染料原色橙色; 置于紫外灯下观察, 可见第 1、2 管呈现明显的荧光, 而第 3、4 管则无特异性荧光 (图 B), 均与 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果一致。



1, 2. 新型鸡黄病毒 JD06 (阳性样品); 3, 4. 阴性对照
1, 2. Novel flavivirus virus JD06 strain (positive sample); 3, 4. Negative control

图 1 自然光 (A) 和紫外灯 (B) 下 RT-LAMP 的可视化结果

Fig. 1 Visualization of the results of under natural light (A) and UV (B)

20 份样品的 RT-LAMP 检测结果见图 2。后文 (2.6) 将与 RT-PCR 结果进行比较。

2.3 RT-LAMP 的特异性测定

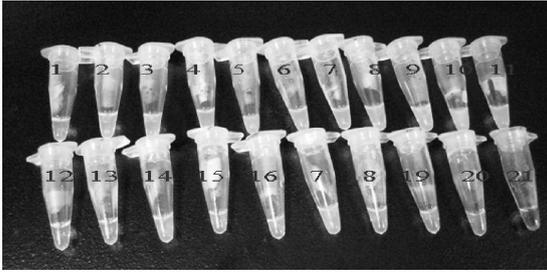
应用建立的 RT-LAMP 方法检测 JD06 及 NDRV、GPV、MDRV、NDV、ILTV、FPV 的核酸样品,

结果显示: 仅 JD06 核酸样品出现明显的梯状条带, 而 NDRV、GPV、MDRV、NDV、ILTV、FPV 等样品均未出现特异性条带, 表明该方法特异性良好 (图 3)。

2.4 RT-LAMP 敏感性试验

分别采用 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法检测不

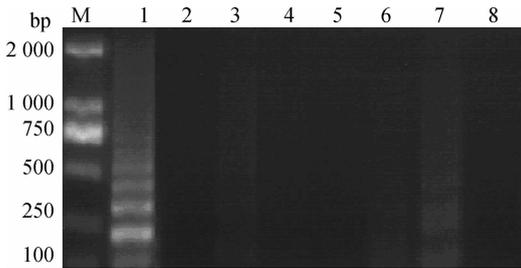
同浓度的 JD06 RNA, 结果显示 RT-LAMP 最小检出量为 1 pg(图 4), 而 RT-PCR 检测量为 100 pg(图 5)。表明建立的 RT-LAMP 检测方法灵敏度比 RT-PCR 高 100 倍。



1~10. 减蛋病料; 11~15. 分离株细胞适应毒; 16~20. 分离株尿囊液毒; 21. 阴性对照
1-10. The egg drop diseased sample of novel flavivirus-positive; 11-15. Cell-based virus; 16-20. Allantoic fluid virus; 21. Negative control

图 2 20 份样品的 RT-LAMP 检测结果

Fig. 2 The RT-LAMP results of clinical samples

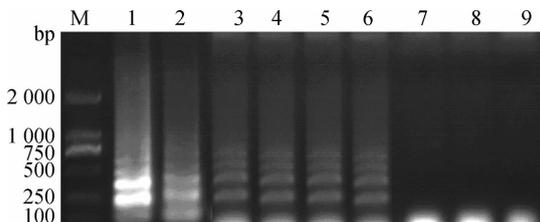


M. DNA 相对分子质量标准; 1. JD06; 2. NDRV; 3. GPV; 4. MDRV; 5. NDV; 6. ILTV; 7. FPV; 8. 阴性对照

M. DNA marker; 1. JD06; 2. NDRV; 3. GPV; 4. MDRV; 5. NDV; 6. ILTV; 7. FPV; 8. Negative control

图 3 RT-LAMP 特异性检测

Fig. 3 Specificity test for RT-LAMP

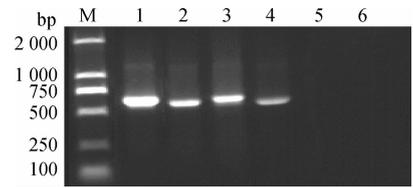


M. DNA 相对分子质量标准; 1~8. 不同量的 JD06 RNA (分别为每管 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0.1 pg, 0.01 pg); 9. 阴性对照

M. DNA marker; 1-8. Different concentration of JD06 RNA (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0.1 pg, 0.01 pg per tube, respectively); 9. Negative control

图 4 RT-LAMP 灵敏度试验结果

Fig. 4 The sensitivity results of RT-LAMP



M. DNA 相对分子质量标准; 1~6. 不同量的 JD06 RNA (分别为每管 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg)

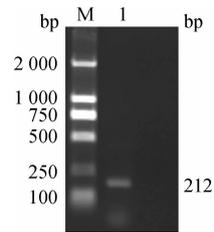
M. DNA marker; 1-6. Different concentration of JD06 RNA (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg per tube, respectively)

图 5 RT-PCR 灵敏度试验结果

Fig. 5 The sensitivity results of RT-PCR

2.5 RT-LAMP 产物酶切鉴定

用限制性内切酶 *Sma* I 对 RT-LAMP 产物进行酶切鉴定, 出现与预期大小 212 bp 相符合的酶切产物条带(图 6)



M. DNA 相对分子质量标准; *Sma* I 酶切产物

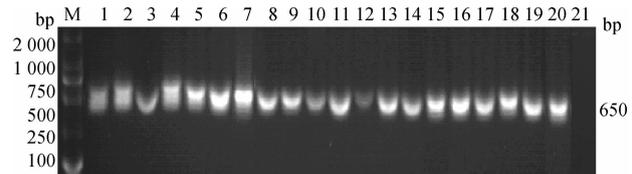
M. DNA marker; 1. *Sma* I digested

图 6 RT-LAMP 产物的酶切鉴定

Fig. 6 RT-LAMP products of restriction enzyme digestion

2.6 RT-LAMP 的初步应用

应用建立的 RT-LAMP 检测经 RT-PCR 鉴定为阳性的 20 份样品, 其中 10 份为蛋鸡新型黄病毒阳性减蛋病料, 5 份为鸡(鸭)黄病毒分离株细胞适应毒, 5 份分离株尿囊液毒, 结果 20 份样品均为阳性(图 2), 同 RT-PCR 的符合率为 100%(图 7)。



1~10. 减蛋病料; 11~15. 分离株细胞适应毒; 16~20. 分离株尿囊液毒; 21. 阴性对照

1-10. The egg drop diseased sample of novel flavivirus-positive; 11-15. Cell-based virus; 16-20. Allantoic fluid virus; 21. Negative control

图 7 RT-PCR 临床检测结果

Fig. 7 The results of RT-PCR clinical test

3 讨 论

LAMP 技术是一种简便、快速、灵敏、成本低廉的新型核酸扩增技术^[6]。该技术利用 Bst DNA 聚合酶在 60~65 °C 具有核酸双链解链功能和瀑布式核酸扩增功能,在等温条件下即可进行核酸的变性和扩增,不需要特殊的仪器设备,仅在水浴锅中就可完成扩增反应。LAMP 技术在目的基因保守区设计了针对 8 个特异区域的 6 条引物,使扩增反应具有很高的特异性,在内引物之间增加 2 条环引物提高了扩增效率,缩短了反应时间。LAMP 反应结果的观察方法非常简便,在反应过程中焦磷酸根离子会与 Mg^{2+} 结合产生大量的副产物焦磷酸镁,反应液变浑浊,离心后可见白色沉淀,另外极高的扩增效率使得反应液中有大量的双链核酸,所以反应结束后向反应液中加入荧光染料,反应液会变成翠绿色,在紫外线下可见较强的绿色荧光,如没有扩增反应则反应液加染料后为桔红色,在紫外线下也无绿色荧光。由于 LAMP 反应的扩增效率很高,在少量 cDNA 存在的条件下就可进行核酸的大量扩增,所以只需要在 LAMP 反应体系中加入反转录酶,就可以完成 RNA 的检测(RT-LAMP)。RT-LAMP 技术具有特异性强、仪器设备简单、结果便于观察的特点,应用前景广阔^[7-8]。

本研究建立的禽新型黄病毒 RT-LAMP 可视化检测方法能特异地检测禽新型黄病毒,并且表现出较高的灵敏度,RNA 的最小检测限为 1 pg,灵敏度是常规 RT-PCR 的 100 倍。整个反应只需要在水浴锅中水浴 45 min 后加入染料即可判断结果。由于 RT-LAMP 反应具有较高的 RNA 模板污染而导致假阳性结果的出现,另外 RT-LAMP 反应扩增效率极高,打开反应管时,反应产物易形成气溶胶而污染周围环境,所以不仅配制反应体系时要注意操作时防止 RNA 模板污染试剂,而且应将配制反应体系的区域与观察反应结果的区域进行严格分区,防止假阳性结果的出现。本研究对 RT-LAMP 反应

体系进行了优化,扩增效率极高。近年来,禽新型黄病毒的流行病学不清楚,流行的面积较广,传染性强,给养禽业造成巨大经济损失。本研究建立的禽新型黄病毒 RT-LAMP 检测方法尤其适合在基层兽医站和养殖场进行快速检测,对指导当前禽新型黄病毒的防控具有重要意义。

参考文献:

- [1] 陈仕龙,陈少莺,王 劭,等.一种引起蛋鸡产蛋下降的新型黄病毒的分离与鉴定[J].福建农业学报,2011,26(2):170-174.
- [2] 曹贞贞,张 存,黄 瑜等.鸭出血性卵巢炎的初步研究[J].中国兽医杂志,2010,46(12):3-6.
- [3] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): 63-68.
- [4] MORI Y, NAGAMINE K, TOMIT N, et al. Detection of loop mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289: 150-154.
- [5] PARIDA M, POSADAS G, INOUE S, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus [J]. *Clin Microbiol*, 2004, 42(1):257-263.
- [6] DUKES J P, KING D P, ALEXANDERSEN S. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot and mouth disease virus [J]. *Arch Virol*, 2006,151: 1093-1106.
- [7] KANEKO H, KAWANA T, FUKUSHIMA E, et al. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2007, 70: 499-501.
- [8] CHEN H T, ZHANG J, MA L N, et al. Rapid pre-clinical detection of classical swine fever by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. *Mol Cell Probes*, 2009, 23(2): 71-74.

(编辑 白永平)