

H6 亚型禽流感病毒 RT-LAMP 检测方法的建立

周辰瑜¹ 谢芝勋^{2*} 宋杨³ 彭宜² 陈安莉¹ 刘加波² 庞耀珊² 邓显文² 谢志勤² 谢丽基²

(1. 广西大学 动物科学技术学院 广西 南宁 530004)

(2. 广西兽医研究所 广西 南宁 530001)

(3. 广西南宁市动物卫生监督所 广西 南宁 530001)

摘要: 建立一种快速、敏感、特异的检测 H6 亚型禽流感病毒(AIV)逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)检测方法。根据 H6 亚型 AIV 血凝素(HA)基因序列的保守区 8 个位点设计了 6 条特异性 LAMP 引物,以 H6 亚型 AIV 阳性样品 RNA 为模板进行一步法扩增,对反应条件和反应体系进行优化。结果表明该方法的特异性良好,对其他呼吸道病原体均无扩增反应。该方法灵敏度高,最低可检测到 H6 亚型 AIV RNA 为 0.01 pg,该方法无需特殊仪器,只需在水浴锅中进行,是一种适于基层的简便、灵敏、快速的 H6 亚型 AIV 检测方法。

关键词: H6 亚型禽流感病毒, 逆转录环介导等温扩增, 特异性, 敏感性

Establishment of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detection of H6 subtype avian influenza virus

ZHOU Chen-Yu¹ XIE Zhi-Xun^{2*} SONG Yang³ PENG Yi² CHEN An-Li¹
LIU Jia-Bo² PANG Yao-Shan² DENG Xian-Wen² XIE Zhi-Qin² XIE Li-Ji²

(1. College of Veterinary Medicine, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China)

(2. Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning, Guangxi 530001, China)

(3. Guangxi Animal Health Inspection, Nanning, Guangxi 530001, China)

Abstract: To develop a rapid sensitive and specific method of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detection of H6 subtype avian influenza virus (AIV), six primers specific to the eight site of HA gene were designed according to the sequences of H6 subtype AIV hemagglutinin gene available in GenBank. The viral RNA was amplified with one-step RT-LAMP method, and the reaction conditions were optimized. The results showed that the specificity of the assay was fine without cross amplification of other respiratory tract pathogens, and the detection limit of the

基金项目: 国家百千万人才工程人选专项资金项目(No. 945200603); 广西科技专项资金项目(No. 桂科专项 10-3); 广西特聘专家专项经费资助项目(No. 2011B020)

* 通讯作者: Tel: 86-771-3105702; 信箱: xiezhixun@126.com

收稿日期: 2011-05-31; 接受日期: 2011-08-25

RT-LAMP assay was 0.01 pg. The assay is a sensitive, simple, rapid and practical method for detection of H6 subtype AIV in the field.

Keywords: H6 subtype avian influenza virus, RT-LAMP, Specific, Sensitive

禽流感(AI)是 A 型流感病毒引起的禽类全身性或呼吸器官性传染病, 主要侵害鸡、火鸡、鸭和鹅等^[1]。禽流感病毒的毒株分类基于 HA 和 NA 亚型。根据表面抗原的鉴定结果从禽类分离到的流感病毒有 16 种不同的血凝素(HA)和 9 种不同的神经氨酸酶(NA), 可组合产生众多亚型^[2]。其中 H5N1 和 H7N2 亚型被称为高致病性禽流感病毒(Highly pathogenic avian influenza viruses, HPAIVs), 可以引起禽类全身感染, 有比较高的发病率和死亡率。现在越来越多研究表明, 禽类低致病性禽流感病毒(Low pathogenic avian influenza viruses, LPAIVs)可以通过基因重排为能感染人的禽流感病毒提供基因^[3]。水禽可以自然感染所有亚型的流感病毒, 并经粪便排毒污染水系, 通过直接传播或候鸟的南北迁徙将 LPAIVs 进一步散播开来, 感染其它禽类和哺乳动物。研究表明, 北美与欧洲部分地区的鸭群中 H3、H4 及 H6 亚型流感病毒的分离率最高^[4]。H6 亚型禽流感病毒(AIV)可以从水禽及野鸟中分离到, 呈低致病性感染, 自 2000 年开始我国相继有 H6 亚型 AIV 的分离报道。最近有研究表明 H6 亚型 AIV 还可以感染鼠和水貂^[5]。有文献报道人群中检测到 H6 亚型 AIV 的抗体, 表明它可能感染了人^[6], 因此 H6 亚型 LPAIVs 具有重要的公共卫生学意义。

环介导等温核酸扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是日本学者 Notomi 等在 2000 年发明的一种恒温核酸扩增新技术^[7], 它是用一种具有链置换活性的 *Bst* DNA 聚合酶在 65 °C 条件下进行扩增, 可通过肉眼观察反应产物是否产生白色混浊沉淀判定结果, 产生白色沉淀为阳性, 不产生白色沉淀为阴性。或是向产物中加入 SYBR Green I 染料, 在紫外线观察是否发出绿色荧光来判定结果, 发出绿色荧光为阳性, 不发出绿色荧光为阴性。反应可在 1 h 内完成, 不需要特殊的实验设备。该技术具有快速、特异性好、灵敏度高、操作

简易的特点, 十分适合应用在基层和现场。现在这项技术已在多种主要动物病原体检测上得到应用, 例如 H5、H9 亚型 AIV, I 群禽腺病毒和鸡新城疫病毒等^[8-11]。本研究根据 LAMP 技术原理, 建立了 H6 亚型 AIV 的 RT-LAMP 快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 毒株

H1、H3、H6、H9 亚型 AIV 由本实验室分离鉴定, H5N2、H7N2 亚型 AIV RNA 为美国宾夕法尼亚州立大学禽病诊断研究室惠赠; 新城疫病毒(NDV)F48、传染性支气管炎病毒(IBV)M41、传染性喉气管炎病毒(ILTV)北京株及鸡毒霉形体(MG)S6 由本实验室保存提供。

1.2 试剂

SPF 鸡胚购自北京梅里亚公司, RNA 提取试剂 TRIzol LS Reagent 购自 Invitrogen 公司, 天根血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒购自天跟生化科技有限公司, AMV 反转录酶、*EcoR* I、*EcoR* V、dNTP 购自 TaKaRa 公司, *Bst* DNA 聚合酶(大片段)、MgSO₄、Betaine 购自 New England Biolabs 公司, SYBR Green I 荧光染料购自北京 Solarbio 公司。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 数据库中已有的 H6 亚型 AIV HA 基因的保守核苷酸序列, 应用 DNASTar 软件 MegAlign 程序分析, 采用 Primer explore V4 在线软件针对 H6 亚型 AIV 8 个位点设计 3 对特异性 LAMP 引物, 所有引物都经 BLAST 序列分析。引物包括内、外引物和环引物: FIP (F1c+F2)、BIP (B1c+B2)为内引物, F3、B3 为外引物, Bloop 和 Floop 为用于提高扩增效率的环引物, 其中 F1c、F2 和 B1c、B2 之间分别为 *EcoR* I 和 *EcoR* V 的酶切位点, 引物(表 1)由上海 Invitrogen 公司合成, 引物 FIP 和 BIP 进行 HPLC 纯化, 其余引物均为 PAGE 纯化。

表 1 H6 亚型 AIV RT-LAMP 引物序列
Table 1 Sequence of LAMP primers designed for H6 subtype AIV

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'→3')
F3	GGGAATCCCAATGCGAC
B3	TCTACTCCTGCCCATGTACT
FIP	GTAGCAGATCCCATTTTGAGC-GAATTC-CTTGGTGATCAAAGCTGGTCAT
BIP	CCAGGAATTTTGAATGAAGTAGAAG-GATATC-TTGGGAAACATTTCAAATCTCTCT
FLoop	TAGGICTTTTCCACTATAT
BLoop	CACTTATTGGATCAGGAGA

1.4 病毒 RNA 抽提

参照 TRIzol LS Reagent 使用说明书和文献[12]进行病毒 RNA 抽提, -70 °C 保存备用。

1.5 病毒 DNA 的抽提

使用天根血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒进行病毒 DNA 的抽提, -30 °C 保存备用。

1.6 RT-LAMP 方法反应条件的优化

对体系进行优化: 分别对引物浓度比(内引物和外引物比例为 4:1、6:1、8:1、10:1)、Mg²⁺浓度(0.6–9 mmol/L)、甜菜碱的浓度(0.2–1.9 mmol/L)、*Bst* DNA Polymerase (4–14 U)、dNTPs (0.6–1.6 mmol/L)、退火温度(按 60 °C–64 °C 依次递增)、反应时间(30–70 min)进行优化, 进行重复试验并确定最佳反应条件。

1.7 RT-LAMP 方法的特异性和敏感性试验

利用优化好的 RT-LAMP 反应体系, 以 H1、H3、H5、H6、H7、H9 亚型 AIV 及 NDV、IBV、ILTV、MG 核酸为待检样品进行检测, 检验 RT-LAMP 方法的特异性, 并用 2%琼脂糖凝胶电泳观察结果。将制备好的 H6 AIV RNA 按 10 倍倍比稀释, 并用 Beckman UV-800 紫外分光光度计测定稀释后各个梯度的 RNA 浓度, 分别为 1.00 ng、100.00 pg、10.00 pg、1.00 pg、0.10 pg、0.01 pg、1.00 fg。对各浓度 RNA 用 RT-LAMP 方法进行扩增, 并用一步 RT-PCR 方法同时进行扩增。2%琼脂糖凝胶电泳观察结果确定该方法的敏感度。

1.8 临床样品检测

对本实验在活禽市场采集的 62 份棉拭子样品,

用双抗(青-链霉素组合)磷酸盐缓冲液(PBS)处理后接种鸡胚尿囊腔, 收取 24–96 h 死亡或未死亡鸡胚尿囊液, 进行病毒分离。同时对 62 份棉拭子样品进行 RNA 抽提, 利用建立的 H6 AIV RT-LAMP 和 RT-PCR 方法进行检测, 验证 RT-LAMP 方法的可靠性。

1.9 RT-LAMP 产物酶切鉴定

RT-LAMP 反应结束后, 采用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *EcoR* V 进行酶切鉴定, 酶切体系如下: RT-LAMP 产物 4 μL、10×buffer 2 μL、*EcoR* I 2 μL、*EcoR* V 2 μL、去离子水 10 μL, 37 °C 作用过夜。酶切产物用 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳。

2 结果

2.1 RT-LAMP 反应条件的优化

通过对 LAMP 反应条件的反复试验, 最终确定最佳反应体系为 25 μL, 最佳引物浓度比为内外引物浓度比例为 6:1, F3、B3 引物终浓度各 0.2 μmol/L, FIP、BIP 引物各 1.2 μmol/L, FLoop 和 BLoop 引物各 0.6 μmol/L, Betaine 1 mmol/L, Mg²⁺ 5 mmol/L, DNTP 为 0.8 mmol/L, *Bst* DNA polymerase 8 U, AMV 5 U, 去离子水 5.0 μL。经过多次试验比较后, 确定最佳温度为 63 °C, 最佳反应时间为 1 h, 最后 80 °C 5 min 终止反应。可视化观察加入 50×SYBR Green I 染料 2 μL。

2.2 特异性检验

结果表明 H6 亚型 AIV RT-LAMP 的特异性良好。加入 SYBR Green I 染料后 H6 亚型 AIV 阳性样品呈绿色, 显示为阳性。IBV、ILTV、MG、NDV、H1 亚型 AIV、H3 亚型 AIV、H5 亚型 AIV、H7 亚型 AIV、H9 亚型 AIV 为成橙红色, 显示为阴性。如图 1A 所示; 将其放置紫外线下, 阳性产物管发出很强的绿色荧光, 而阴性管不发出绿色荧光, 如图 1B 所示; 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测, 阳性产物出现特异性的梯状条带, 阴性产物无条带出现, 如图 1C 所示。

2.3 敏感性检测

结果表明 RT-LAMP 方法对 H6 亚型 AIV 病毒

的 RNA 的最小检测限为 0.01 pg, 即 ≥ 0.01 pg。而常规 RT-PCR 对 H6 亚型 AIV 病毒的 RNA 的最小检测限为 1 pg, 即 ≥ 1 pg。由此计算, RT-LAMP 方法的灵敏度是 RT-PCR 方法的 100 倍。如图 2A、2B、2C 和图 3 所示。

2.4 临床样品检测

在选取的 62 份临床样品中, 用 RT-LAMP 方法检测到 6 份阳性, 用 RT-PCR 检测到 5 份阳性。病毒分离到 6 株 H6 亚型 AIV 病毒阳性样品。RT-LAMP 方法的检测结果与病毒分离结果符合率为 100%。如表 2 所示。

2.5 RT-LAMP 产物酶切鉴定

扩增产物通过 *EcoR* I、*EcoR* V 酶切后, 出现与预期大小相符的条带, 如图 4 所示。

3 讨论

H6 亚型 AIV 虽然不是高致病性禽流感病毒, 但是它在禽类间可以传播, 造成禽类的隐形感染, 还有可能发生抗原漂移或转变形成新的毒力更强的毒株, 因此对其早期的筛查十分重要。常规的禽流感病毒诊断方法有: 病毒分离、血凝(HA)及血凝抑制(HI)试验、酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫组织化

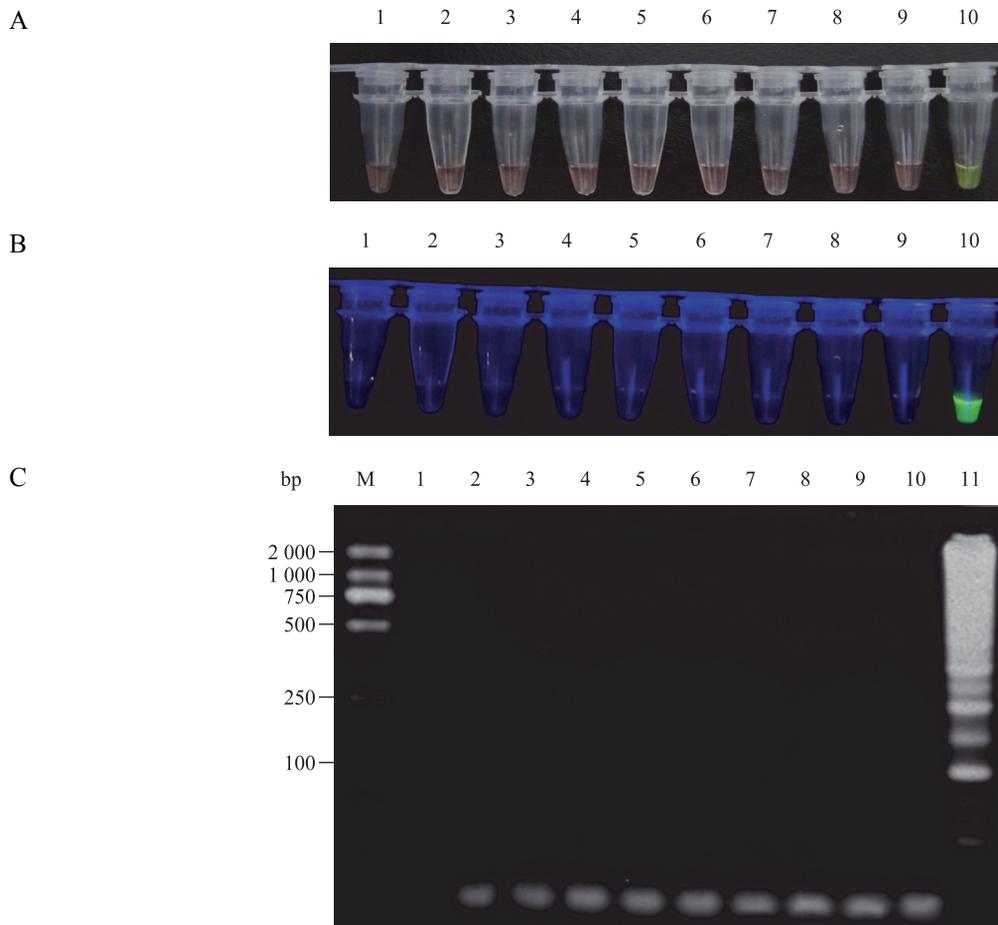


图 1 RT-LAMP 方法检测 H6 亚型 AIV 的特异性

Fig. 1 Specificity of RT-LAMP assay for detection of H6 subtype AIV

Note: A: Results of RT-LAMP under daylight after adding SYBR Green I; B: Results of RT-LAMP under UV light after adding SYBR Green I; 1-10: IBV, ILTV, MG, NDV, H1 subtype AIV, H3 subtype AIV, H5 subtype AIV, H7 subtype AIV, H9 subtype AIV, H6 subtype AIV, respectively; C: Results of RT-LAMP assay for detection of H6 subtype AIV; 1: Blank control; 2-11: IBV, ILTV, MG, NDV, H1 subtype AIV, H3 subtype AIV, H5 subtype AIV, H7 subtype AIV, H9 subtype AIV, H6 subtype AIV, respectively; M: DL2000 DNA ladder.

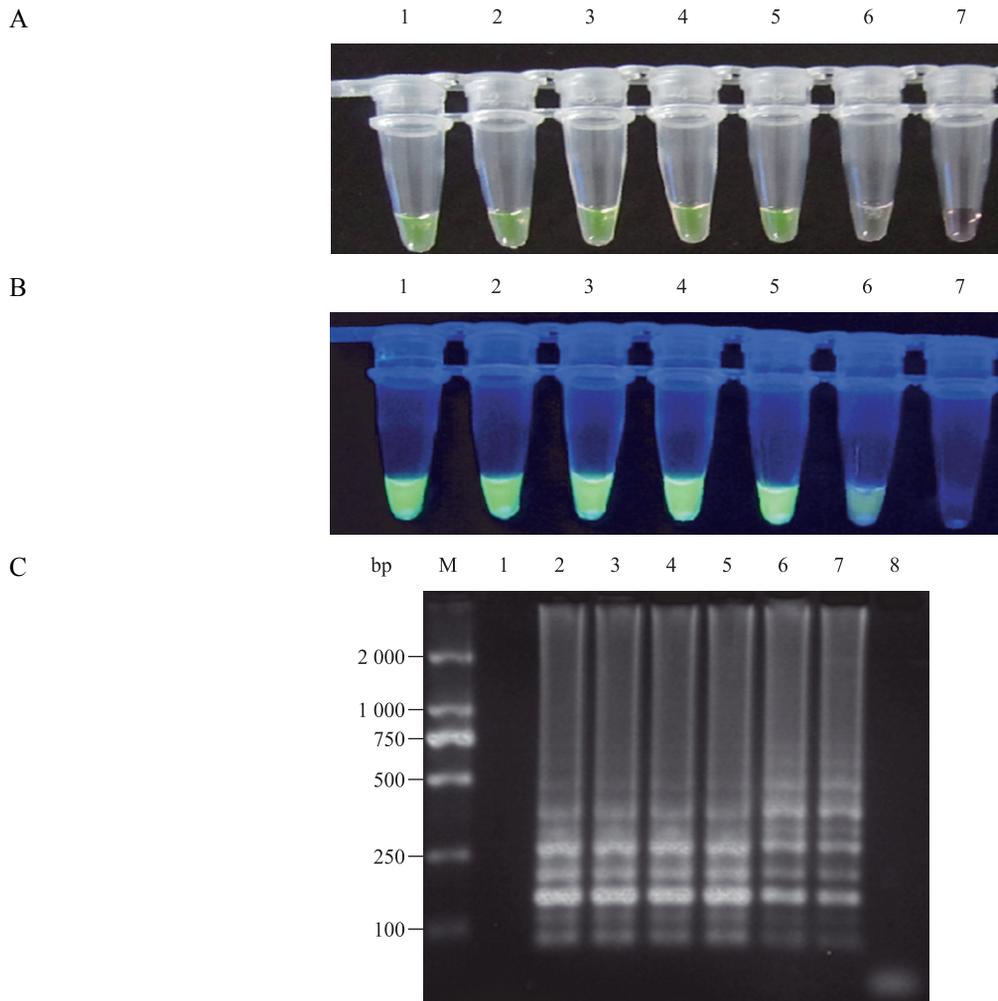


图 2 RT-LAMP 方法敏感性试验结果观察

Fig. 2 The results of sensitivity text

Note: A: Results of RT-LAMP under daylight after adding SYBR Green I . B: Results of RT-LAMP under UV light after adding SYBR Green I : 1-7: Different concentration of H6 subtype AIV RNA (1.00 ng, 100.00 pg, 10.00 pg, 1.00 pg, 0.10 pg, 0.01 pg, 1.00 fg/tube, respectively). C: The results of RT-LAMP sensitivity text: 1: Blank control; 2-8: Different concentration of H6 subtype AIV RNA (1.00 ng, 100.00 pg, 10.00 pg, 1.00 pg, 0.10 pg, 0.01 pg, 1.00 fg/tube, respectively); M: DL2000 DNA Ladder.



图 3 RT-PCR 灵敏度试验结果

Fig. 3 The results of RT-PCR sensitivity text

Note: 1: Blank control; 2-8: Different concentration of H6 subtype AIV RNA (1.00 ng, 100.00 pg, 10.00 pg, 1.00 pg, 0.10 pg, 0.01 pg, 1.00 fg/tube, respectively); M: DL2000 DNA ladder.

表 2 H6 亚型 AIV 临床样品检测结果
Table 2 Detection of H6 subtype AIV in clinical samples

方法 Methods	阳性样品数 Positive samples	阴性样品数 Negative samples	样品总数 Total number of samples
病毒分离 Virus isolation	6	56	62
RT-LAMP 方法 RT-LAMP	6	56	62
RT-PCR 方法 RT-PCR	5	57	62

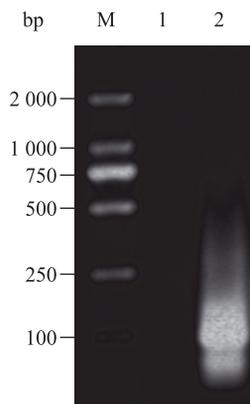


图 4 RT-LAMP 产物的酶切鉴定

Fig. 4 Products digested by *EcoR I* and *EcoR V*

Note: Blank control; 2: Products digested by *EcoR I* and *EcoR V*; M: DL2000 DNA ladder.

学以及免疫荧光技术(IF)等。这些方法都各有优点,但是也存在以下的不足之处:检测周期长、灵敏度不高、特异性不强、不适合基层活禽市场或者进出口大量样品的检测等。因此,建立简便、快速、准确并能在基层和现场应用的检测方法具有非常重要的公共卫生学意义。

环介导的等温核酸扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术是一种较为新型的核酸扩增技术,其技术核心是通过识别靶序列上 8 个特异性区域的 3 对引物实现扩增。反应时使用一种具有链置换活性的 *Bst* DNA 聚合酶,不需要模板热变性和长时间的温度循环,在等温条件下即水浴锅中就可完成扩增反应^[7],不需要特殊的仪器设备如 PCR 仪等。LAMP 技术反应特异性主要依靠应用外引物(F3、B3)和内引物(FIP、BIP)的扩增来实现。LAMP 方法的检验过程耗时较少,因为在复合引物 F1C 和 F2 间及 B1C 和 B2 间设计环引物 Floop 和

Bloop,使反应效率大大提高,在 60 min 内即可完成反应。反应完成后可直接通过观察扩增副产物白色焦磷酸镁沉淀判定反应结果。或者向产物管中加入 SYBR Green I 染料观察,阳性管可看到反应液变成绿色,在紫外线下可见明显的绿色荧光,阴性管的反应液为橙色,紫外线下无绿色荧光。

本研究建立的 RT-LAMP 方法对 H6 亚型禽流感病毒的检测具有良好的特异性和较高的灵敏度。此方法的 RNA 最小检测值为 0.01 pg,为常规 RT-PCR 的 100 倍。值得注意的是,正因 LAMP 方法的敏感性很高,因此打开反应液管盖时,反应产物容易形成气溶胶污染环境、试剂和实验器材而造成假阳性的产生。因此,为了防止假阳性结果的出现,我们在 LAMP 技术的整个实验中要谨慎小心,提高实验者的操作水平,将配制反应液的实验区域和加入模板的实验区域以及观察结果的实验区域分开,实行分区操作。本研究还尝试将 SYBR Green I 染料加入到反应体系中,并取得十分理想的效果,反应后阳性产物显示为较浅绿色,这样可以减少气溶胶的污染,减少假阳性的出现。

本研究建立的 H6 亚型 AIV LAMP 方法具有简便快速、成本低廉、特异性好、敏感性高等特点,适合边境口岸和基层现场的 H6 亚型禽流感病毒检测,对该病的防控具有重要意义。

参考文献

- [1] 卡尔克 BW. 禽病学[M]. 高福,等译. 北京:北京农业大学出版社,1991.
- [2] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,1997: 736-750.
- [3] Chin PS, Hoffmann E, Webby R, et al. Molecular evolution of H6 influenza viruses from poultry in Southeastern China: prevalence of H6N1 influenza viruses possessing seven A/Hong Kong/156/97 (H5N1)-like genes in poultry[J]. J Virol, 2002, 76(2): 507-516.
- [4] Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, et al. Global patterns of influenza A virus in wild birds[J]. Science, 2006, 312(5772): 384-388.
- [5] Li CJ, Yu KZ, Tian GB, et al. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in mainland China[J]. Virology, 2005, 340(1): 70-83.

- [6] 陈妍梅, 葛万运, 黄川, 等. 广西健康青年 H9、H6 亚型禽流感病毒血清抗体调查[J]. 中国热带医学, 2008, 8(6): 985-986.
- [7] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): e63.
- [8] 侯佳蕾, 罗开健, 樊惠英, 等. H5 亚型禽流感病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(12): 1070-1074.
- [9] 彭宜, 谢芝勋, 刘加波, 等. H9 亚型禽流感病毒 RT-LAMP 可视化检测方法的建立[J]. 中国人畜共患病学报, 2011, 27(1): 19-22.
- [10] 孔令辰, 侯佳蕾, 蒋文泓, 等. 应用环介导逆转录等温扩增技术快速检测新城疫病毒[J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(4): 75-78.
- [11] 唐熠, 谢芝勋, 熊文婕, 等. I 群禽腺病毒环介导等温扩增检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(7): 713-716.
- [12] Lee MS, Chang PC, Shien JH, et al. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR[J]. *J Virol Methods*, 2001, 97(1/2): 13-22.

书 讯

欢迎订阅《英语科技论文撰写与投稿(第二版)》

本书是科技论文写作与投稿的指南读物, 书中全方位地分析和展示了科技论文写作的技巧与诀窍。从论文选题、科技写作的道德规范、拟投稿期刊的选择等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量的实例分析阐述了论文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则, 分别从写作技巧、时态和语态的使用等角度介绍了科技论文正文的撰写, 举例说明了致谢及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

书中还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 从选词、重要语法和文体等方面系统地阐述了科技英语写作的文法与表达, 全面总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、在线投稿、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。此外, 还从 PPT 制作、会议讲演等方面系统地阐述了会议报告的准备与口头交流的注意事项。

本书可作为理工科研究生的教学用书或自学教材; 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

作者简介

任胜利: 理学博士, 国家自然科学基金委杂志社编审, 《中国科学》杂志社副总编辑。社会兼职有中国科技期刊编辑学会理事, 《编辑学报》编委、《中国科技术语》编委、《中国科技期刊研究》副主编等。

自 1997 年博士后出站后从事科技编辑工作以来, 先后在 *Science*, *Nature*, *Scientometrics*, *Learned Publishing*, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学和科技编辑与写作方面的论文或杂文 60 余篇。有丰富的科技编辑与写作方面的培训经验, 2007 年和 2009 年先后主持翻译了《科技英文写作与演讲》和《科技英语写作进阶》。曾获中国科学院期刊出版领域引进优秀人才择优支持、第二届中国出版政府奖优秀出版人物奖等资助和奖项。

个人博客: www.sciencenet.cn/blog/rensl.htm

订阅方式: 各地图书卖场及网上书店。

邮购: 定价: 35 元 ISBN: 978-7-03-031305-8

北京学士书店: 地址: 北京东黄城根北街 16 号(100717); 电话: 010-64000246, 64034558, 64034205;
科学出版社科学书店: 地址: 北京朝阳门内大街 135 号(100010); 电话: 010-64017892。