

# 应用环介导逆转录等温扩增技术 快速检测新城疫病毒

孔令辰<sup>1\*</sup>, 侯佳蕾<sup>1\*</sup>, 蒋文泓<sup>2</sup>, 聂 飞<sup>2</sup>, 敖艳华<sup>1</sup>, 廖 明<sup>1</sup>, 任 涛<sup>1</sup>

(1 农业部养禽与禽病防治重点开放实验室, 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642;

2 广东省农业厅, 广东 广州 510500)

**摘要:**参考新城疫病毒融合基因(fusion gene, F gene)序列, 设计了 2 对能够特异性地识别 F 基因上的 6 个区域的引物, 并以此建立了一种简单、快速、有效的环介导逆转录等温扩增(RT-LAMP)方法检测 NDV. 试验结果表明: 该方法用时短(2 h 内完成)、特异性好而且灵敏度高, 最小检测限可达 100 pg; 对人工发病样品进行鸡胚分离和 RT-LAMP 检测, 二者的阳性符合率高达 93.5%; 同时采用镁离子沉淀对检测结果进行可视化处理, 方便利用肉眼直接观察.

**关键词:**环介导逆转录等温扩增技术; 新城疫病毒; 快速检测

中图分类号:S854.43

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)04-0075-04

## Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique for Rapid Detection of Newcastle Disease Virus

KONG Ling-chen<sup>1</sup>, HOU Jia-lei<sup>1</sup>, JIANG Wen-hong<sup>2</sup>, NIE Fei<sup>2</sup>, AO Yan-hua<sup>1</sup>, LIAO Ming<sup>1</sup>, REN Tao<sup>1</sup>

(1 Key Laboratory of Poultry Freeding & Disease Control of the Ministry of Agriculture,

College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Department of Agricultural of Guangdong Province, Guangzhou 510500, China)

**Abstract:** A simple, rapid and effective reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification(RT-LAMP) method was developed by using two pairs of specific primers targeting the 6 district sequences of the fusion gene of the newcastle disease virus (NDV). This RT-LAMP method can rapidly amplified the NDV within 2 h and was highly sensitive and specific. The detection limits was 100 pg by using a serial 10-fold dilution of RNA. Result of detection of clinical samples showed a good correlation between the chicken embryo separation and the RT-LAMP (coincidence 93.5%). The presence of the NDVs could be detected in a simple manner through visual assessment by adding  $Mg^{2+}$  into the system to produce a white precipitate.

**Key words:** reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification; newcastle disease virus; rapid detection

新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)是危害养禽业的一种重要的急性、高度接触性传染病病原. 新城疫自 1926 年报道爆发以来, 已经在世界范围内造成了广泛的传播和流行, 使得养禽业遭受巨

大的经济损失<sup>[1]</sup>. 目前常用的检测方法除了传统的鸡胚分离法之外, 还有 HA 及 HI、免疫荧光试验、ELISA 和免疫胶体金试纸条等常规检测方法. 常规诊断方法或是实验周期长、操作步骤繁琐或是容易

收稿日期:2008-03-15

作者简介:孔令辰(1980—), 男, 硕士; 侯佳蕾(1982—), 女, 硕士研究生; \*: 对本文具有同样的贡献; 通讯作者:任涛(1968—), 男, 教授, 博士, E-mail:rentao@scau.edu.cn

基金项目:广东省自然科学基金(5500-E07106); 广东省科技计划项目(2004B20201030; 5500-E08020; 2007A020100006)

出现交叉污染等,均存在一定的缺陷. 分子生物学检测方法在快速检测病原方面具有非常明显的优势,现在已建立了多种针对 NDV 的 RT-PCR 方法<sup>[2-5]</sup>,可以在很短的时间内检测出病毒的存在,大大加快了检测速度.

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是 Notomi 等<sup>[6]</sup>在 2000 年建立的一种新的核酸扩增方法,这种方法采用 4 条引物,分别识别目的基因中的 6 个位点,其中内引物含有目的基因的正向序列及反向互补序列,主要起启动 LAMP 反应及其扩增的作用;而外引物主要通过 DNA 链置换反应而生成单链 DNA. 反应终产物(许多大小不一茎环状的重复序列)在电泳凝胶中呈阶梯状的特殊条带. 该方法特异性强;而且扩增效率十分高,反应灵敏. 若在 LAMP 反应体系中加入反转录酶,则可以一步完成 RNA 的检测. 该方法的检测是连续等温的条件下进行的,仅需恒温水浴锅,且反应不需要开盖,在一管内完成全部检测,避免后续操作污染. 同时还可利用不同的方法对结果进行可视化处理,使得结果的观察和判定具有直观性<sup>[7-8]</sup>.

本文建立了针对 NDV F 基因的特异环介导逆转录等温扩增(RT-LAMP)方法,并以出现镁离子白色沉淀作为结果的判定标准,可较快速、准确地检测出 NDV,对临床样品的检测也达到较高的准确性,可作为一种新的 NDV 检测方法使用.

## 1 材料与方法

### 1.1 种毒

NDV F48E9 株、4 株已鉴定的 NDV 分离株(GM-03、GD-05、DH-04、GD-99)、已鉴定的 AIV 分离株(H1N1、H3N2、H5N1、H9N2 亚型)、禽传染性支气管炎病毒(IBV)及禽传染性喉气管炎病毒(ILTV)等毒株均由华南农业大学传染病学教研室禽病组保存并提供.

### 1.2 主要试剂

RNA 抽提试剂盒、Reverse Transcriptase XL (AMV)、DNA Marker DL2000、dNTPs 等为宝生物工程(大连)有限公司产品;Bst DNA 聚合酶大片段为纽英伦生物技术(北京)有限公司产品;Betaine 甜菜碱为 Sigma 公司产品.

### 1.3 引物设计

采用 Primer premier5.0 软件,根据已有 NDV F 基因的保守序列进行引物设计,送上海英俊生物有限公司合成. 各引物依次为 Outer (F): 5'-GAGCTGTGTCCGTCTGACAAA-3'; Outer (R): 5'-TATAAAGCGTCTCTGCCTCCT-3'; Inner (F): 5'-CCT-

GTCTGAGATGAGTATATGTTTTATGGAAGGCCTCTTGCAGCTG-3'; Inner (R): 5'-AAAGAGGCGTGTGCAAAAGCCCTTTTTGCGGATAGAATCACCAAGGG-3'.

### 1.4 RT-LAMP 检测方法的建立

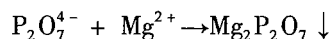
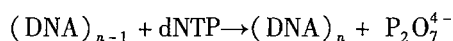
采用 RNAiso Reagent 抽提试剂盒对试验所用的 NDV 毒株以及 AIV、IBV 和 ILTV 毒株进行 RNA 抽提,具体操作参照说明书进行. RT-LAMP 反应体系为 40  $\mu$ L,各组分分别为:ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 6  $\mu$ L, MgSO<sub>4</sub> 1.5  $\mu$ L, Betaine (100  $\mu$ mol/L) 5  $\mu$ L, 10  $\times$  Bst Buffer 2.5  $\mu$ L, Inner F&R 各 2  $\mu$ L (20 pmol/ $\mu$ L), Outer F&R 各 0.25  $\mu$ L (20 pmol/ $\mu$ L), Bst 酶 1  $\mu$ L (8 U), AMV 1  $\mu$ L (5 U), 抽提所得的 RNA 10  $\mu$ L, 混匀. 然后 65  $^{\circ}$ C 水浴 1.5 h, 水浴结束后, 80  $^{\circ}$ C 灭活 2 min, 再 7 500 r/min 离心 5 min, 或取反应产物 5  $\mu$ L 在 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果.

### 1.5 RT-LAMP 产物的双酶切鉴定

取 RT-LAMP 反应产物采用限制性内切酶 *Hinf* I 和 *Dpn* I 进行双酶切鉴定, 所得酶切片段预计为 164 bp. 在 PCR 仪 37  $^{\circ}$ C 作用 30 min 后, 取反应产物 5  $\mu$ L 在 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳并观察.

### 1.6 可视化结果处理

在 RT-LAMP 反应体系中加入一定量的镁离子与 DNA 扩增反应中生成的  $P_2O_7^{4-}$  离子进行反应, 生成的  $Mg_2P_2O_7$  为白色沉淀. 具体反应如下:



RT-LAMP 完成后, 产物 7 500 r/min 离心 5 min, 然后将离心管置于光亮处观察有无白色沉淀生成.

### 1.7 临床样品的 RT-LAMP 检测

将 NDV F48E9 病毒液以 0.2 mL/只的剂量对 6 周龄的非免疫健康鸡进行点眼滴鼻, 其攻毒量为  $LD_{50} = 10^{-5.7} \text{ mL}^{-1}$ , 总计攻毒鸡只为 40 只, 另有 10 只鸡作为空白对照. 攻毒后第 2 d 开始采集泄殖腔和咽拭子用于检测, 每天随机采集 10 只, 连续采集 9 d. 将采集到的棉拭子充分拧干后除去拭子, 悬液经 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液分别作 RT-LAMP 及鸡胚病毒分离检测.

## 2 结果

### 2.1 RT-LAMP 特异性检测

利用已合成的 NDV F 基因特异引物, 对 4 株 NDV 分离株进行 RT-LAMP 扩增, 见图 1. 4 株 NDV 分离株的电泳泳道均有特异的阶梯状条带出现, 符合 LAMP 的电泳特征, 证明该方法能够成功检测出 NDV.

利用建立的方法对 NDV F48E9 标准株、禽流感

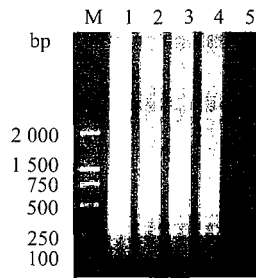


图1 RT-LAMP 的特异性检测电泳图

M: DNA marker DL2000; 1~4: 已鉴定的 NDV 分离株; 5: 生理盐水阴性对照

Fig. 1 The NDV result of the RT-LAMP

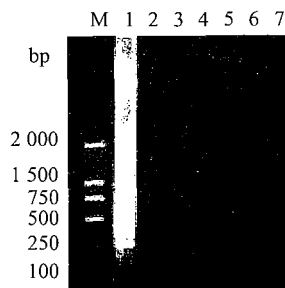


图2 RT-LAMP 的特异性检测结果

M: DNA marker DL2000; 1: NDV F48E9 毒株; 2~5: AIV 分离株; 6: IBV 毒株; 7: ILTV 毒株

Fig. 2 The result of the specific evaluation of RT-LAMP

分离株 (H1N1、H3N2、H5N1、H9N2 亚型)、IBV M41 毒株以及 ILTV 分离株进行扩增, 结果见图 2。电泳图显示: 仅在 NDV F48E9 的泳道中有特异性的电泳条带出现, 空白对照及其他的病毒毒株泳道均无条带, 说明该方法对 NDV 具有良好的特异性。

## 2.2 RT-LAMP 可视化结果

利用反应体系中  $Mg^{2+}$  与扩增副产物焦磷酸离子形成的白色焦磷酸镁沉淀, 对 RT-LAMP 扩增进行可视化处理, 肉眼判定结果, 如图 3。1 号管 (NDV GM-03) 与 3 号管 (F48E9) 管底出现了白色沉淀 (图中箭头所指), 而 2 号管 (空白对照) 与 4 号管 (AIVH5N1) 管底处则无。本试验其余 3 株 NDV 分离株均能产生肉眼可见的沉淀, 其余的流感毒株以及 IBV 和 ILTV 毒株均无沉淀生成, 说明沉淀的生成具有特异性。

## 2.3 RT-LAMP 产物的双酶切鉴定

用 *Hinf* I 和 *Dpn* I 限制性内切酶对 RT-LAMP 产物进行双酶切鉴定, 结果 (图 4) 表明, 本试验中的 RT-LAMP 产物确实由 NDV F 基因扩增所得, 设计的引物具有良好的反应性和特异性。

## 2.4 RT-LAMP 的灵敏性检测

抽提 NDV F48E9 株的总 RNA, 进行 10 倍稀释

至  $10^{-5}$ , 再进行 RT-LAMP 检测。结果显示该方法的最低检测限约为 100 pg, 结果见图 5。

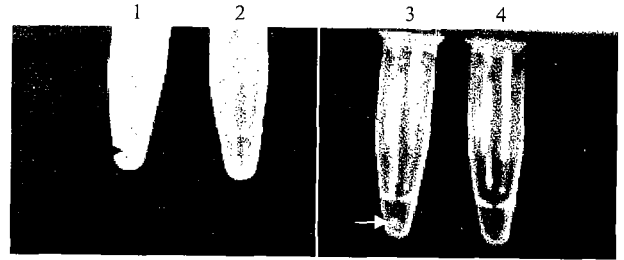


图3 RT-LAMP 特异性检测的可视化结果

1: NDV 分离株 GM-03; 2: 生理盐水空白对照; 3: F48E9 毒株; 4: AIV-H5N1

Fig. 3 The visual result of the specific evaluation of RT-LAMP

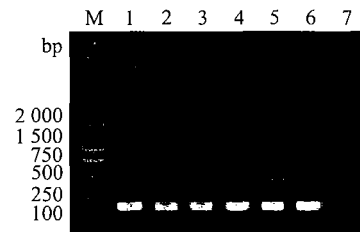


图4 RT-LAMP 产物的双酶切鉴定

M: DNA marker DL2000; 1: GD-01-01Go; 2: GD-01-02Go; 3: GD-94; 4: GD-99; 5: La Sota; 6: F48E9; 7: 空白尿囊液对照 control

Fig. 4 The result of enzymatic digestion by *Hinf* I and *Dpn* I

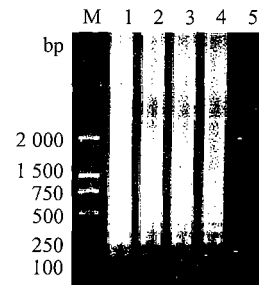


图5 RT-LAMP 的灵敏性检测电泳图

M: DNA marker DL2000; 1: 100 ng; 2: 10 ng; 3: 1 ng; 4: 100 pg; 5: 10 pg; 6: 空白尿囊液对照 control

Fig. 5 The result of the sensitivity evaluation of RT-LAMP

## 2.5 RT-LAMP 人工发病样品检测

采用鸡胚分离法与 RT-LAMP 方法同时检测攻毒后的第 2~9 d 采集的鸡咽喉、泄殖腔拭子, 并对这 2 种方法的检出率和符合率进行了比较。结果表明, 在攻毒后第 3 d 用 RT-LAMP 方法即可检出发病样品中的 NDV, 且 2 种方法总检出符合率可达 93.5%。

## 3 讨论

环导恒温扩增技术是一种能在恒温的条件下快速、准确、特异地扩增目的基因的技术。目前已具有

多种将 LAMP 结果可视化的方法,如镁离子沉淀法<sup>[7]</sup>、阳离子沉淀<sup>[9]</sup>、荧光探针法<sup>[10]</sup>等.在试验中更可通过测定沉淀生成量来推算参加反应的 DNA 量,进行更精确的测定<sup>[11]</sup>.通过在内引物处设计相应的酶切位点即可进行产物的回收,从而方便进一步的研究.而且通过添加 Loop 引物的方法更可将其反应速度进一步提高,可缩短约一半的反应时间<sup>[12]</sup>.

RT-LAMP 方法与传统的鸡胚分离法相比,鸡胚分离法准确性较好,但一次试验耗时 4~7 d,不利于快速诊断和采取相应的措施;RT-LAMP 方法操作简便,仪器要求较低,只需恒温水浴箱和离心机,而且结果可进行肉眼观察无需进行凝胶电泳,比较安全快捷.完成一次 RT-LAMP 可在 2 h 内结束,并通过观察有无镁离子沉淀判定结果,无需进行电泳检测,结果的准确性与 RT-PCR 方法相近<sup>[11,13]</sup>.

RT-LAMP 方法在实际应用中,可通过改变 Betaine, MgSO<sub>4</sub> 和 dNTPs 等组分浓度来控制假阳性结果的出现.另外,RT-LAMP 所用的引物需要识别目的基因上的 4 个特异位点,因此该方法对于引物的要求较高,引物比例的调整对于整个体系的优化具有重要意义<sup>[14-15]</sup>.同时,合成的引物相对普通引物较容易失活,因此应注意低温保存.

本试验中 RT-LAMP 方法最小检测浓度可达 100 pg,证明建立的 NDV RT-LAMP 方法具有较高的灵敏性;同时,该方法与鸡胚分离法之间符合率达 93.5%,其作为鉴定 NDV 的一种分子生物学方法具有较好的准确性.而且,RT-LAMP 方法具有操作简便、仪器设备要求低、无需开盖检测避免污染等优点,能有效及时地为禽场提供准确快速的诊断.在实际生产中尽早地对新城疫进行确诊,将能有效地提高禽场的应变能力,使禽场尽早地采用相应的处理措施控制疫情,在实际生产中有着巨大的应用前景.

#### 参考文献:

- [1] SAIF Y M, BARNES H J, GLISSON J R, et al. Diseases of poultry [M]. 11th ed. Iowa: Iowa State University Press, 2003: 64-81.
- [2] 宋长绪, 刘福安. 用 PCR 检测鸡新城疫病毒的初步试验[J]. 中国兽医科技, 1995, 25(10): 20.
- [3] 曹殿军, 刘培欣, 闫丽辉, 等. 鸡新城疫病毒强弱毒株 RT-PCR 鉴别诊断方法[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(6): 415-417.
- [4] 单松华, 邹键, 姚龙涛, 等. 复合 RT-PCR 快速鉴别鹅副粘病毒与鸡新城疫病毒[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2004, 22(4): 355-357.
- [5] 黄淑坚, 龚中贵, 陈秀玲, 等. 禽流感、新城疫、传染性支气管炎病毒多联 RT-PCR 诊断方法的建立[J]. 广东农业科学, 2006(10): 62-65.
- [6] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): i-vii.
- [7] MORI Y, NAGAMINE K, TOMITA N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. Biochem Bioph Res Co, 2001(289): 150-154.
- [8] 李启明, 马学军, 周蕊, 等. 环介导逆转录等温扩增技术(RT-LAMP)在丙型肝炎病毒基因检测中的应用[J]. 病毒学报, 2006, 22(5): 334-338.
- [9] MORI Y, HIRANO T, NOTOMI T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers[J]. BMC Bio, 2006(6): 3.
- [10] NAGAMINE K, KUZUHARA Y, NOTOMI T. Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products[J]. Biochem Bioph Res Co, 2002(290): 1195-1198.
- [11] POON L L M, WONG B W Y, CHAN K H, et al. Evaluation of real-time reverse transcriptase PCR and real-time loop-mediated amplification assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus detection[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(7): 3457-3459.
- [12] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Mol Cell Probe, 2002(16): 223-229.
- [13] PHAM H M, NAKAJIMA C, OHASHI K, et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of newcastle disease virus[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4): 1646-1650.
- [14] FUKUTA S, IIDA T, MIZUKAMI Y, et al. Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP[J]. Arch Virol, 2003(148): 1713-1720.
- [15] USHIO M, YUI I, YOSHIDA N, et al. Detection of respiratory syncytial virus genome by subgroups-A, B specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)[J]. J Med Virol, 2005(77): 121-127.

【责任编辑 柴 焰】