



贾 坤, 韩太光, 远立国, 等. 牛流行热病毒可视化 RT-LAMP 检测技术的建立及应用[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(3):15-20.

牛流行热病毒可视化 RT-LAMP 检测技术的建立及应用

贾 坤, 韩太光, 远立国, 孙凌霜, 宁章勇, 王 衡, 李守军
(华南农业大学 兽医学院/广东省兽医临床重大疾病综合防控重点实验室/
广东省宠物工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】建立一种能够快速、简便、可视化地检测牛流行热病毒的分子生物学方法。【方法】根据牛流行热病毒 G 蛋白基因的 6 个保守区域设计 2 对引物, 建立牛流行热病毒可视化逆转录环介导等温扩增 (Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP) 检测技术, 优化 RT-LAMP 的反应条件, 将其与 PCR 方法进行比较。【结果】当 Mg^{2+} 浓度为 $3\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、甜菜碱浓度为 $0.4\text{ mol} \cdot L^{-1}$ 、dNTPs mix 浓度为 $1.2\text{ }\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 、内外引物浓度比例为 8:1、反应温度为 $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 反应梯形条带最明显, 在反应 40 min 后可以观察到明显的梯形条带。建立的 RT-LAMP 检测方法特异性好, 只对牛流行热病毒进行扩增; 灵敏度比普通 PCR 高 10 倍。【结论】该方法操作简便, 特异性强, 结果判读方便, 可用于牛流行热的快速检测。

关键词:牛流行热; 病毒检测; RT-LAMP; PCR; 灵敏性; 特异性
中图分类号:S854;S855 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2017)03-0015-06

Establishment and application of visual RT-LAMP technology for detecting bovine ephemeral fever virus

JIA Kun, HAN Taiguang, YUAN Liguang, SUN Lingshuang, NING Zhangyong, WANG Heng, LI Shoujun
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/Key Laboratory of Prevention and Control for Severe Clinical Animal Diseases of Guangdong Province/Guangdong Technological Engineering Research Center for Pet, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】To develop a rapid, convenient and visual molecular assay for detecting bovine ephemeral fever virus (BEFV). 【Method】Two pairs of primers based on six conserved regions in G protein gene of BEFV were designed, and the visual reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detecting BEFV was developed. The reaction conditions of RT-LAMP assay were optimized, and the assay was compared with PCR. 【Result】The reaction ladder bands from the RT-LAMP assay were most obvious when the RT-LAMP reaction system contained $3\text{ mmol} \cdot L^{-1}\text{ Mg}^{2+}$, $0.4\text{ mol} \cdot L^{-1}$ betaine and $1.2\text{ }\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ dNTPs mix, the ratio of inner to outer primers was 8:1, and the reaction temperature was $63\text{ }^{\circ}\text{C}$. Clear reaction ladder bands were observed after 40 min of reaction. The established RT-LAMP assay had excellent specificity with only BEFV being amplified. The sensitivity was 10 times higher than that of ordinary PCR. 【Conclusion】The visual RT-LAMP assay is easy to operate and highly specific, and the results can be conveniently determined. This method can be used for the rapid detection of bovine epidemic fever.

Key words:bovine ephemeral fever; virus detection; RT-LAMP; PCR; sensitivity; specificity

收稿日期:2016-06-27 优先出版时间:2017-04-12
优先出版网址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20170412.1429.020.html>
作者简介:贾 坤 (1981—), 男, 讲师, 博士, E-mail:jiakun@scau.edu.cn; 通信作者:李守军 (1968—), 男, 教授, 博士, E-mail:shoujunli@scau.edu.cn
基金项目:广东省科技计划 (2015B020203005, 2015A020224039); 广东省现代农业科技创新联盟建设项目 (2016LM2150); 广州市珠江科技新星专项 (201610010073)

牛流行热是由牛流行热病毒(Bovine ephemeral fever virus, BEFV)引起的一种非接触传染性疾病,黄牛、奶牛和水牛易感,其他反刍动物也可感染本病^[1]。该病主要由蚊虫叮咬而传播,临床上以突然发热、精神沉郁、大量流涎、僵硬、跛行,甚至卧地不起等为特征。本病传播迅速,发病率高,病死率近年来有所上升,甚至出现急性呼吸衰竭病例。本病通常呈周期性流行,每隔 3~5 年发生 1 次较大规模的流行,发病季节多为 5—10 月份。世界多地均有此病流行^[2]。我国最早在 1955 年就出现过本病的报道,1976 年首次分离到牛流行热病毒株 JB76H^[3,4]。广东地区近几年均有发生,该病的发生周期有变短的趋势,严重危害养牛业^[4]。

牛流行热的常规诊断方法为血清学检测方法^[5-7],目前,国内主要采用微量血清中和试验方法,由于需使用活病毒,且在试验前需要测定病毒的 TCID₅₀,不仅费时费力,检测周期长,影响了牛流行热的快速诊断,还存在病毒污染扩散的风险。ELISA 检测技术的建立,某种程度也为牛流行热抗体的筛查提供了便利条件^[8],核酸检测技术中的普通 PCR 和荧光定量 PCR 等技术,具有敏感、快速、特异和高通量等优点^[9-10],已广泛用于多种重要疫病病原体的检测,刘志玲等^[11]建立了牛流行热病毒 LUX-TM 荧光 RT-PCR 检测方法,具有较好的检测准确度和灵敏度,但是荧光定量检测需要昂贵的仪器,且检测试剂成本较高。建立快速高效、低成本的分子生物学诊断方法,对牛流行热的防控具有重要的意义。

逆转录环介导等温扩增(Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术的出现,在多种病原的检测方面发挥了巨大的作用,尤其是该方法简便、易于操作,对仪器设备要求不高,适合临床生产一线使用^[12-14]。通过对 LAMP 技术的改进,在反应体系中加入显色成分钙黄绿素,还能实现反应产物的可视化^[15]。这样直接通过肉眼观察颜色变化即可判定结果,具有较好的临床应用前景。

1 材料与方法

1.1 病毒 RNA

2013—2015 年广东地区牛流行热流行期病牛抗凝血由本实验室采集保存,赤羽病病毒(Akabane virus, AKV)核酸、牛传染性鼻气管炎病毒(Infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)核酸、牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)核酸由广东检验检疫技术中心动检实验室惠赠。

1.2 试剂

RNA 抽提试剂盒购自 Invitrogen; AMV Reverse

Transcriptase 购自 Promega 公司; Bst DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司;甜菜碱购自 Sigma 公司。

1.3 仪器

Bio-Rad 梯度 PCR 仪、Bio-Rad 型电泳仪:美国 Bio-Rad 公司生产;凝胶成像系统:美国 Alpha 公司生产;5810R 冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司生产;恒温水浴箱:德国 GFL 公司生产。

1.4 引物的设计与合成

参照 Genbank 中 BEFV 糖蛋白 G 的基因序列,应用 DNASTar 7.0 软件 MegAlign 5.0 程序进行分析,利用在线软件(<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>)在序列保守区域设计 LAMP 引物(表 1),其中, F3、B3 为外引物, FIP、BIP 为内引物。

表 1 LAMP 引物
Tab. 1 LAMP Primers

引物名称	序列(5'→3')
F3	CAGATACGAGGGAATAGAGG
B3	AACCAACCTACAACAGCA
FIP	ACTGGCTTAAATTTCTCATCTTCCTGATA- AAATTTGAGGTAATGGAGTAC
BIP	AAGCCACATGAGAAAAGTCAAGATA- AAACCTTCTTTCCTCCTC

1.5 模板的制备

按照 RNA 抽提试剂盒的说明书进行病毒 RNA 的抽提,提取的 RNA 在 -80 ℃ 条件下保存备用。

1.6 RT-LAMP 方法的优化及建立

参照国内其它病毒的 LAMP 检测反应体系,以牛流行热病毒 RNA 为模板,先建立一个 25 μL LAMP 反应体系: 5 mmol·L⁻¹ 的甜菜碱 5.0 μL、100 mmol·L⁻¹ 的 MgSO₄ 1.0 μL、8 U·μL⁻¹ 的 Bst DNA 聚合酶 1.0 μL、10×Bst DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μL、10 mmol·L⁻¹ 的 dNTPs 3.0 μL、BIP(20 μmol·L⁻¹) 2.0 μL + FIP(20 μmol·L⁻¹) 2.0 μL、F3(20 μmol·L⁻¹) 2.0 μL + B3(20 μmol·L⁻¹) 2.0 μL、模板 RNA 1 μL、5 U·μL⁻¹ 的 AMV 反转录酶 1.0 μL、RNase inhibitor 0.5 μL、加 DEPC 水至 25 μL。阴性对照模板为 DEPC 水,反应后用 15 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

之后根据反应优化策略,对 Mg²⁺ 浓度、甜菜碱浓度、Bst DNA 聚合酶浓度、dNTP 浓度、引物浓度等条件分别进行优化。设置反应温度为 60、61、62、63、64 和 65 ℃,确定最佳退火温度。反应时间以 10 min 起始,每隔 10 min 取样检测至 1 h,确定最佳反应时间。

1.7 RT-LAMP 方法的灵敏性检测

将抽提获得的 RNA 进行 10 倍梯度逐级稀释,

以 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 不同稀释液作为模板, 利用所建立的 RT-LAMP 反应体系和 RT-PCR 检测方法进行灵敏性比对。

1.8 RT-LAMP 方法的特异性检测

分别抽提牛流行热病毒 (BEFV)、牛赤羽病病毒 (AKV)、牛传染性支气管炎病毒 (IBRV)、牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) RNA, 同时设立阴性对照, 采用上面已经优化的反应体系和条件, 检测 RT-LAMP 方法的特异性。

1.9 RT-LAMP 反应产物的分析

LAMP 反应体系存在扩增产物, 在反应前 RT-LAMP 体系中按体积比加入 1:10 的钙黄绿素和氯化锰, 反应结束后, 样品根据反应结果不同而呈现不同颜色。使用琼脂糖凝胶电泳技术对产物进行分析, 阳性反应呈现弥散型条带。

1.10 临床样品检测

对采集自广东地区的 56 份疑似病牛全血, 经 RNA 抽提后分别进行 LAMP 检测和普通 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 LAMP 反应条件的优化

通过对反应体系的优化, 可见当 Mg^{2+} 浓度为 $3\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ (图 1)、甜菜碱浓度为 $0.4\text{ mol} \cdot L^{-1}$ (图 2)、dNTPs mix 浓度为 $1.2\text{ }\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ (图 3)、反应温度为 $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ (图 4)、内外引物浓度比例为 8:1 (图 5) 时反应梯形条带最明显, 在反应 40 min 后可以观察到明显的梯形条带 (图 6), 随着时间的延长, 条带变得更加清晰。

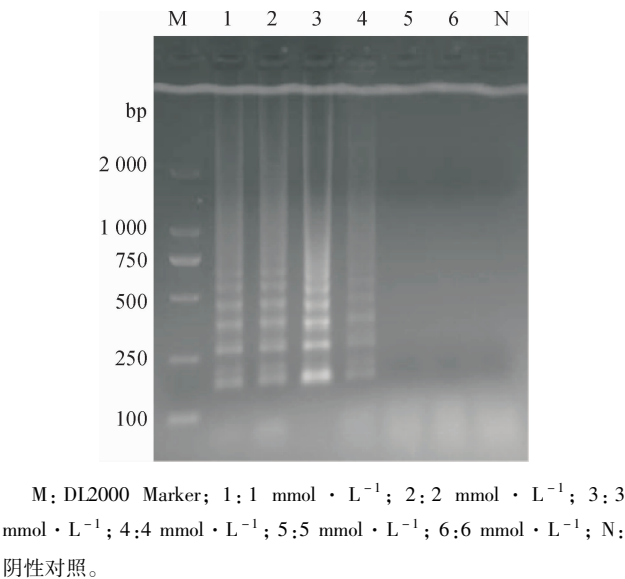


图 1 LAMP 反应体系 Mg^{2+} 浓度的优化

Fig. 1 Optimization of Mg^{2+} concentration in the LAMP reaction system

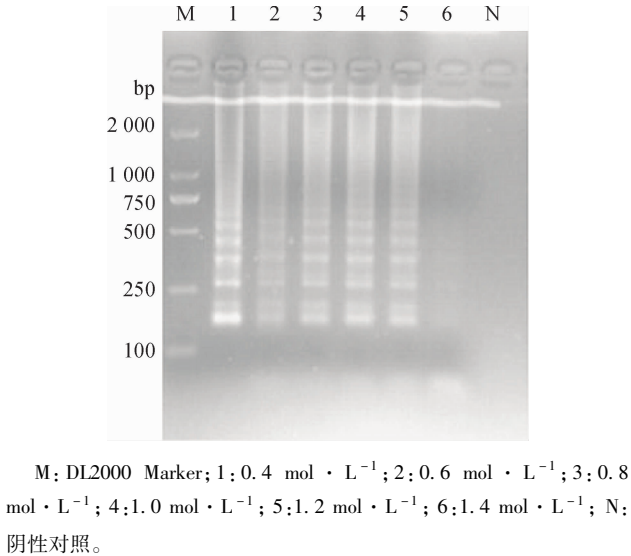


图 2 LAMP 反应体系甜菜碱浓度的优化

Fig. 2 Optimization of betaine concentration in the LAMP reaction system

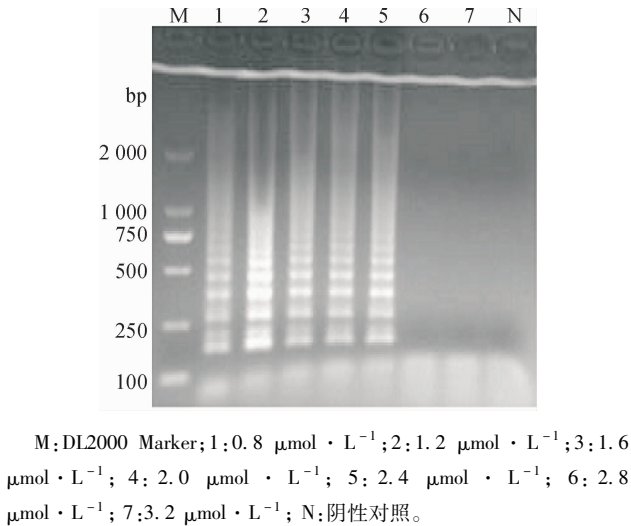


图 3 LAMP 反应体系 dNTPs mix 浓度的优化

Fig. 3 Optimization of dNTPs mix concentration in the LAMP reaction system

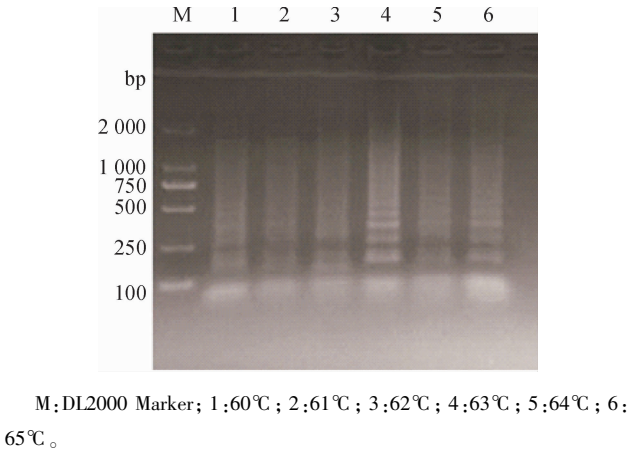
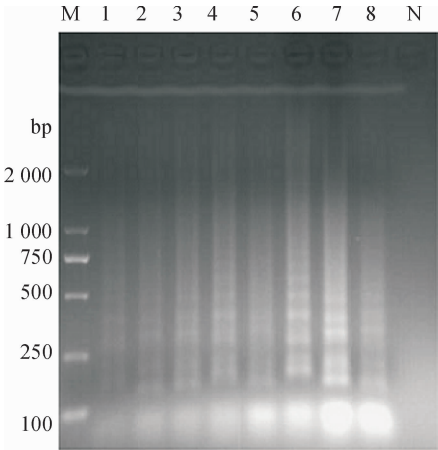


图 4 LAMP 反应温度的优化

Fig. 4 Optimization of LAMP reaction temperature

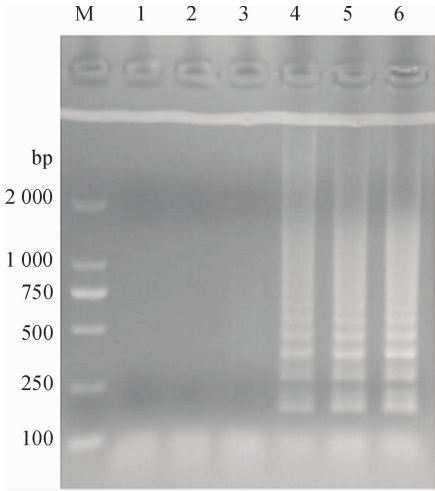
<http://xuebao.scau.edu.cn>



M:DL2000 Marker; 1:0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (FIP + BIP), 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (F3 + B3); 2:0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (FIP + BIP), 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (F3 + B3); 3:0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (FIP + BIP), 0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (F3 + B3); 4:0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (FIP + BIP), 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (F3 + B3); 5:0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (FIP + BIP), 1.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (F3 + B3); 6:0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (FIP + BIP), 1.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (F3 + B3); 7:0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (FIP + BIP), 1.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (F3 + B3); 8:0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (FIP + BIP), 2.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (F3 + B3); N:阴性对照。

图 5 LAMP 反应体系内外引物比例优化

Fig. 5 Optimization of the ratio of inner to outer primers in the LAMP reaction system



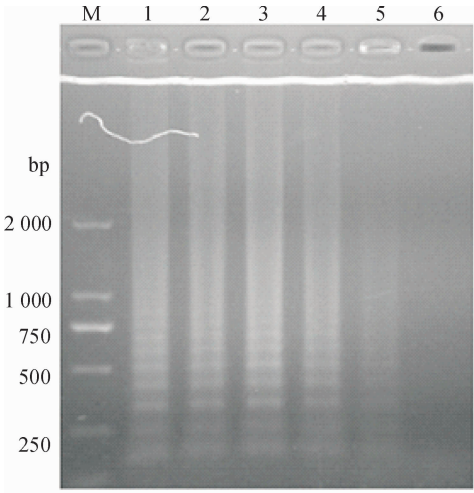
M:DL2000 Marker; 1:10 min; 2:20 min; 3:30 min; 4:40 min; 5:50 min; 6:60 min。

图 6 LAMP 反应时间的优化

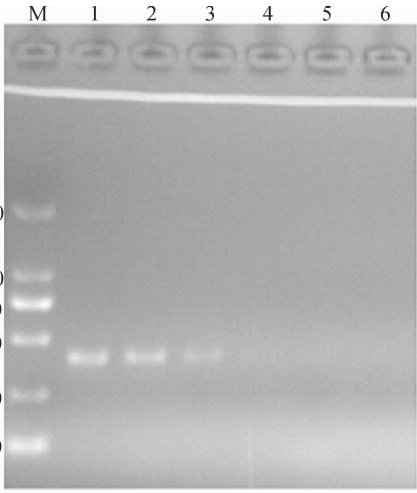
Fig. 6 Optimization of LAMP reaction time

2.2 灵敏度试验

由图 7 可见,在将 RNA 原液稀释 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 倍后作为模板时,LAMP 扩增的产物都出现明显的梯形条带,而普通 PCR 的扩增产物只有当 RNA 原液稀释 10^0 、 10^{-1} 和 10^{-2} 倍出现明显的条带,两者的检测灵敏度相比,LAMP 的检测灵敏度提高了 10 倍。



A: LAMP 扩增



B: PCR 扩增

M:DL2000 Marker; 1~6:RNA 稀释倍数依次为 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 。

图 7 LAMP 扩增与 PCR 灵敏度对比

Fig. 7 Sensitivity comparison of LAMP and PCR

2.3 特异性试验

分别以 BEFV、AKV、IBRV、BVDV 作为样品,检测建立的 LAMP 方法的特异性。从图 8 中可以看出,只有以 BEFV 阳性样品为模板的泳道内出现了明显的梯形条带,其他样品为阴性。结果表明 LAMP

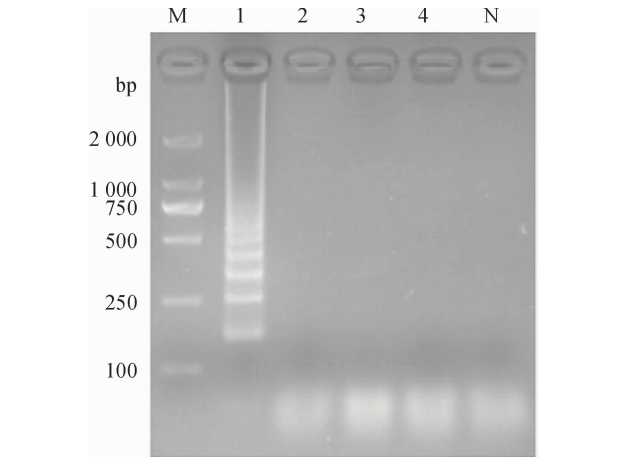
<http://xuebao.scau.edu.cn>

引物对 BEFV 具有专一性,依此可区分与牛流行热症状相似的一些牛病。

2.4 可视化 LAMP 检测

LAMP 反应体系存在扩增产物,在反应前 RT-LAMP 体系中按体积比加入 1:10 的钙黄绿素和氯化

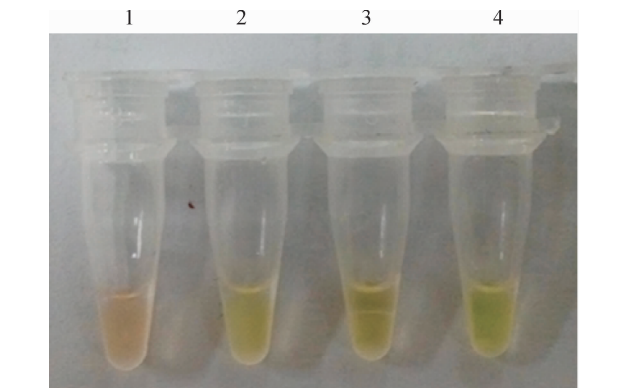
锰,反应结束后,阳性样品呈浅绿色,阴性样品呈橘红色(图9)。



M:DL2000 Marker; 1:BEFV(牛流行热病毒); 2:AKV(赤羽病病毒); 3:IBRV(牛传染性鼻气管炎病毒); 4:BVDV(牛病毒性腹泻病毒); N:阴性对照。

图8 BEFV LAMP 反应特异性

Fig. 8 Specificity of the LAMP assay detecting BEFV



1:阴性样品; 2~4:阳性样品。

图9 BEFV LAMP 可视化检测结果

Fig. 9 Visualization test of the LAMP assay detecting BEFV

2.5 临床样本检测

对临床采集的 56 份疑似牛流行热样品进行检测。PCR 方法检测出 5 份阳性样品,阳性检出率为 8.93%,而 LAMP 方法则检测出 6 份阳性样品,阳性检出率为 10.70%。

3 讨论与结论

LAMP 是一种在恒温条件下,高效、特异、快速的扩增靶标序列的核酸检测技术^[11]。本研究在牛流行热病毒 G 蛋白基因的 6 个位点设计 4 条引物,通过对反应体系和反应条件的优化,建立了可视化 RT-LAMP检测方法。利用该方法对牛流行热病毒(BEFV)及 IBRV、AKAV、BVDV 的 RNA 进行特异性

检测,结果表明该可视化 LAMP 检测方法对 BEFV 具有良好的特异性,对 BEFV 病料中核酸的最低检测限是常规 PCR 灵敏度的 10 倍。采用该方法对临床样品进行检测,其中阳性检出率为 10.70%,高于普通 PCR 的检出率(8.93%)。为了便于结果的观测,国内外学者对 LAMP 检测技术进行显色反应^[15]。目前的研究中多数采用 SYBR Green I,该方法需在反应结束后打开反应管,加入 SYBR Green I 方能发挥显色指示作用,根据颜色的不同,从而判定检测结果,该方法简便易行,试剂也相对便宜,但是显色反应需要开盖添加 SYBR Green I,这时容易产生气溶胶,由于 LAMP 反应本身的高特异性和灵敏性,极易导致实验室污染,产生假阳性结果。也有研究者使用浊度仪实时监测 LAMP 反应结果,但该方法在实际操作中要使用价格昂贵的浊度仪,不利于基层实验室开展检测工作。本研究利用钙黄绿素与 Mn^{2+} 结合而不发荧光,随着反应的进行,产生了大量更易与 Mn^{2+} 结合的焦磷酸根离子,从而释放钙黄绿素,游离的钙黄绿素可自发荧光,且 Mg^{2+} 存在的环境中荧光效果得到加强的原理,使用钙黄绿素 + Mn^{2+} 混合液替代 SYBR Green I 进行结果显色指示^[15],无需开盖,直接通过肉眼观察颜色变化即可判定检测结果^[15]。

参考文献:

[1] NANDI S, NEGI B S. Bovine ephemeral fever: A review [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1999, 22(2): 81-91.

[2] AZIZ-BOARON O, KLAUSNER Z, HASOKSUZ M, et al. Circulation of bovine ephemeral fever in the Middle East--strong evidence for transmission by winds and animal transport[J]. Vet Microbiol, 2012, 158(3/4): 300-307.

[3] DAVIES F G, OCHIENG P, WALKER A R. The occurrence of ephemeral fever in Kenya, 1968-1988 [J]. Vet Microbiol, 1990, 22(2/3): 129-136.

[4] ZHENG F, LIN G, ZHOU J, et al. A reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification assay for detection of bovine ephemeral fever virus in the blood of infected cattle[J]. J Virol Methods, 2011, 171(1): 306-309.

[5] LI Z, ZHENG F, GAO S, et al. Large-scale serological survey of bovine ephemeral fever in China[J]. Vet Microbiol, 2015, 176(1/2): 155-160.

[6] 吴清明, 魏文才, 陈水生, 等. 奶牛流行热疫情的防控应对[J]. 南方奶业, 2013(1): 11-13.

[7] 白文彬, 姜春凌, 严隽端, 等. 牛流行热病毒微量血清中和试验[J]. 中国畜禽传染病, 1988(4): 40-43.

[8] ZHENG F Y, LIN G Z, QIU C Q. Development and application of G1-ELISA for detection of antibodies against bovine ephemeral fever virus[J]. Res Vet Sci, 2009, 87(2): 211-212.

[9] STRAM Y, KUZNETZOVA L, LEVIN A. A real-time RT-quantative(q)PCR for the detection of bovine ephemeral fever virus[J]. J Virol Methods, 2005, 130(1/2): 1-6.

[10] BLASDELL K R, ADAMS M M, DAVIS S S. A reverse-transcription PCR method for detecting all known ephemero-viruses in clinical samples[J]. J Virol Methods, 2013, 191(2): 128-135.

[11] 刘志玲, 陈茹, 邱索平, 等. 牛流行热病毒 LUXTM 荧光 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 生物技术通报, 2010(8): 174-179.

[12] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nu-cleic Acids Res, 2000, 28(12): 63.

[13] CHEN C, CUI S. Detection of porcine parvovirus by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Virol Methods, 2009, 155(2): 122-125.

[14] SHIVAKOTI S, ITO H, MURASE T, et al. Development of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplifica-tion (RT-LAMP) assay for detection of avian influenza vi-ruses in field specimens[J]. J Vet Med Sci, 2010, 72(4): 519-523.

[15] ZHU R Y, ZHANG K X, ZHAO M Q. Use of visual loop-mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* [J]. J Microbiol Methods, 2009, 78(3): 339-343.

【责任编辑 李晓卉】