

水环境中诺如病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立及应用

罗鸿斌 (东莞理工学院, 广东东莞 523808)

摘要 [目的]基于诺如病毒(NV)基因保守区,设计一套 RT-LAMP 简并引物,建立能简便、特异、灵敏检测水环境样品中 NV 的一步法 RT-LAMP 技术。[方法]通过试验,优化反应温度(64 ℃)、反应时间(40 min)、Mg²⁺ 浓度(2 mmol/L)等参数,建立反应体系。[结果]该方法只需 1 台水浴锅在 1 h 内即可完成检测,可直接用肉眼观察结果,检测灵敏度比普通 RT-PCR 高 100 倍;简并引物的设计增强了特异性,可检测多个血清型的 NV。[结论]在样品检测中,RT-LAMP 技术的灵敏度达 97.7%,高于 RT-PCR 的 90.7%,更适用于野外样品和简陋实验室的快捷检测。

关键词 诺如病毒;逆转录;环介导等温扩增

中图分类号 X832 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)15-0057-03

Establishment and Application of RT-LAMP Rapid Detection Method for Norwalk Virus in Water Environment

LUO Hong-bin (Dongguan University of Technology, Dongguan, Guangdong 523808)

Abstract [Objective] Based on norovirus (NV) gene conserved region, to design a RT-LAMP degenerate primer, and to establish a simple, specific and sensitive method for the determination of NV in water environment samples by RT-LAMP. [Method] Through experiments, the reaction system was established by optimizing reaction temperature (64 ℃), reaction time (40 min) and Mg²⁺ concentration (2 mmol/L). [Result] The method only needed a water bath to complete the test in an hour, and could be observed directly with the naked eye, and the sensitivity was 100 times higher than that of the ordinary RT-PCR. The design of degenerate primers enhanced specificity and could detect multiple serotypes of NV. [Conclusion] In the sample detection, the sensitivity of RT-LAMP technology was 97.7%, higher than 90.7% of RT-PCR. It was more suitable for rapid detection of field samples and crude Laboratory.

Key words Norwalk virus; Reverse transcription; Loop-mediated isothermal amplification

诺如病毒(NV)感染性强,以肠道传播为主,可通过污染的水源、空气、食品、物品等传播,常在社区、学校、餐馆等地引起集体暴发^[1-2]。水环境易被诺如病毒污染,因为病毒很小,且摄入不到 100 个病毒就能使人发病^[3]。因此,快速、准确地对水源进行病毒监测和疾病防控至关重要。NV 引起的临床症状与其他很多疾病相似,同时由于 NV 具有众多的血清型及变异株,对 NV 的诊断和防治造成一定困难^[4]。目前对于 NV 的检测可分为两大类,一类为病原学检测;另一类为血清学检测。近年来发展的一种新型恒温核酸扩增方法,即环介导等温扩增法(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP),由于扩增反应的高效率,反应扩增结果可直接靠扩增副产物焦磷酸镁的沉淀浊度进行判断^[5]。LAMP 技术具有明显的优越性:①高特异性,4 条引物互补于核酸模板的 6 个区段^[6];②能够恒温扩增,可直接使用水浴锅进行反应,不需变温扩增仪器^[7];③快速、高效扩增,整个扩增不用 1 h 便完成^[8];④高灵敏度,扩增模板仅需 10 个拷贝甚至更少^[7];⑤鉴定方便,用肉眼观察副产物白色沉淀和比色法^[5]。笔者旨在建立一种新的用于 NV 的 RT-LAMP 快速诊断技术,可以从待检样品中直接检测病毒,具有快速、简便、特异性高等特点。

1 材料与方法

1.1 试剂与毒株

1.1.1 主要试剂。Bst DNA 聚合酶(8 U/μL)及配套缓冲液(NEB 公司);AMV 反转录酶(5 U/μL)、HRP RNA 酶抑制剂

(40 U/μL)及相应缓冲液、Ex Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)、dNTPs(2.5 mmol/L each)、EcoRI(15 U/μL)、DNA Marker DL 2000、RNAase free H₂O 均为 TaKaRa 产品。RNA 提取试剂 TRIzol Reagent(TaKaRa),甜菜碱 betaine(Sigma);10 000 × SYBR GreenI(百维信生物科技有限公司),青霉素和链霉素(BBI),琼脂糖(BIOWEST)。

1.1.2 毒株及对照毒株。NV 毒株分离自广东省各地。诺如病毒(NV)模板质粒由实验室保存,肠道病毒(Enterovirus, EV)、轮状病毒(Rotavirus, RV)、星状病毒(Astrovirus, AstV)由实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 引物设计和合成。选择最为保守的 ORF1 与 ORF2 来设计 LAMP 引物,共包括 4 条简并引物,互补于模板的 6 个片段,引物中包含简并碱基。引物序列见表 1。2 条引物 F3 和 B3 作为 RT-PCR 检测的引物。

表 1 RT-PCR 和 RT-LAMP 的引物

Table 1 Primer of RT-PCR and RT-LAMP

序号 No.	引物名称 Primer name	序列 Sequence(5'-3')
1	F3	GATGGGTCCRCAGCCAAC
2	B3	TCARATCAGGCCYAAGG
3	FIP	GCTACAGGYGCCGCRATAGC G GATCC CCCA-GAGGTCAACAATGAGG
4	BIP	TACAAGCCCCTGGTGGAGAGT G GATCC CGC-GCTCCAYAGTATYTCAC

注:简并碱基用斜体标识。R = G + A, Y = C + T。BamHI 的酶切位点位于 F1c 和 F2、B1c 和 B2 之间,用粗体标识

Note: The degenerate base is marked in italics. R = G + A, Y = C + T. The cleavage site of BamHI is between F1c and F2, between B1c and B2, marked by bold

1.2.2 RT-LAMP 反应体系优化。反应体系包括以下组分:10 × buffer、dNTPs(10 mmol/L)、FIP(10 μmol/L)、BIP

基金项目 广东省公益研究与能力建设专项资金项目(2014A020212692);东莞市高等院校、科研机构科技计划一般项目(2014106101006);广东高校省级重点平台和重大科研项目(2016GXJK156)。

作者简介 罗鸿斌(1987—),男,江西于都人,工程师,硕士,从事环境监测、环境微生物研究。

收稿日期 2017-03-31

(10 $\mu\text{mol/L}$)、F3 (10 $\mu\text{mol/L}$)、B3 (10 $\mu\text{mol/L}$)、 MgSO_4 (25 mmol/L)、Betaine (0.4 mol/L)、Bst DNA 聚合酶、AMV 逆转录酶、抽提 RNA, 去离子水补足至 25 μL 。

1.2.2.1 反应温度优化。根据引物的退火温度(T_m), 将反应物分别置于 65、64、63、62、61、60、59 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中反应 1 h, 然后于 80 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 终止反应。反应后取 5 μL 反应液, 用 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ EB) 电泳对反应产物进行检测。

1.2.2.2 反应时间优化。在 25 μL 反应体系中加入反应物, 同时设阴性对照, 置入 64 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中, 以优化后的反应温度反应, 分别在反应后 60、50、40、30、20 min 后取出 1 管。全部取出后, 取 5 μL 反应液, 用 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ EB) 进行电泳检测。

1.2.2.3 Mg^{2+} 浓度的优化。在 25 μL 反应体系中, 引物浓度、酶单位和模板浓度不变, 因为 Bst DNA 聚合酶的 buffer 含有 MgSO_4 , 除去该组分, 改变组分 MgSO_4 浓度, 研究 MgSO_4 浓度高低是否会影响扩增效率, 加入量依次为 5、4、3、2 mmol/L ; 所有分组反应都以 RNAase free H_2O 作为模板设阴性对照, 反应后进行电泳检测。在建立 RT-LAMP 检测方法时, 都使用阳性质料作为阳性模板, 用 RNAase free H_2O 做阴性模板。

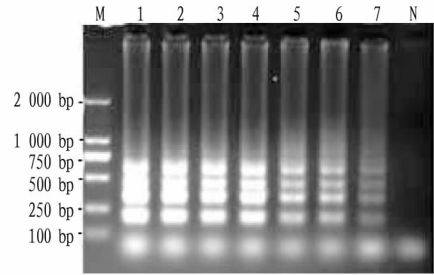
1.2.3 RT-LAMP 的灵敏度和特异性试验。取 200 μL 样品抽提 RNA, 然后按 10 倍倍比稀释, 每个稀释度都取 1 μL 模板用于 RT-LAMP, 以判断灵敏度。特异性试验是用 RT-LAMP 检测 EV、RV、AstV 病毒的 RNA、RNAase free H_2O 。

1.2.4 一步法 RT-PCR。为了比较 RT-LAMP 扩增的灵敏性和特异性, 使用 One-step RT-PCR 一步法试剂盒与 RT-LAMP 方法同步进行。RT-PCR 反应程序: 50 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min。共 30 个循环, RT-PCR 反应约 100 min。反应完毕, 取 5 μL 的产物在核酸染料染色的 2% 凝胶中跑胶, 扩增片段大小约为 209 bp。

2 结果与分析

2.1 最佳反应温度、时间及最佳 Mg^{2+} 浓度的确定 4 条简并引物要根据退火的顺序进行起始和延续反应, 因此, 反应温度是 RT-LAMP 扩增的最重要因素。图 1 显示, 在 59 ~ 65 $^{\circ}\text{C}$ 反应都能进行, 但 65、64、63 和 62 $^{\circ}\text{C}$ 比其他温度的条带要更明亮, 选择 64 $^{\circ}\text{C}$ 作为最佳反应温度。由图 2 可知, 20 min 就能看到特征性的梯状条带, 但需要 40 min 才能产生明亮的条带。不同 Mg^{2+} 浓度的 LAMP 扩增结果如图 3 所示, 4 mmol/L 时即可达到最佳反应效率, 因此, 选定 4 mmol/L 作为 Mg^{2+} 最佳反应浓度, 但是由于 Bst DNA 聚合酶的缓冲液含有终浓度为 2 mmol/L 的 MgSO_4 , 实际加入量为 2 mmol/L 即可。

2.2 优化后反应体系的确定 该试验中, 为了简化操作步骤, 将 4 条引物稀释成 10 $\mu\text{mol/L}$ 后按比例 4:1 组成引物混合物 (Primer Mixture), 每个 RT-LAMP 反应加入引物混合物 5 μL ; 而将 MgSO_4 、甜菜碱、dNTPs mix、RNAase free H_2O 与 Bst DNA 聚合酶反应缓冲液配成反应混合物 (Reaction Mix-

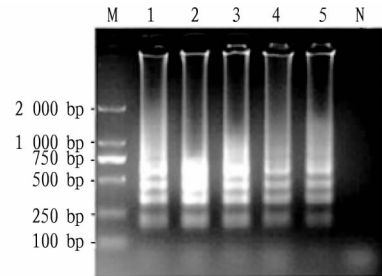


注: M. DL2000 DNA Marker; 1 ~ 7 分别为 65、64、63、62、61、60、59 $^{\circ}\text{C}$; N. 阴性对照

Note: M. DL2000 DNA Marker; 1 - 7 were 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59 $^{\circ}\text{C}$; N. Negative control

图 1 不同反应温度扩增结果

Fig. 1 Amplification results of different reaction temperatures

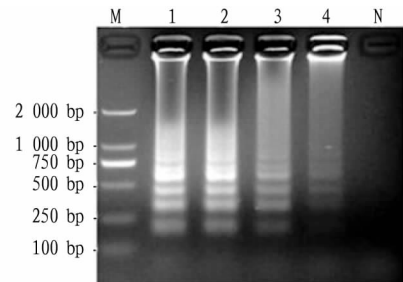


注: M. DL2000 DNA Marker; 1 ~ 5 分别为 60、50、40、30、20 min; N. 阴性对照

Note: M. DL2000 DNA Marker; 1 - 5 were 60, 50, 40, 30, 20 min; N. Negative control

图 2 不同反应时间扩增结果

Fig. 2 Amplification results of different reaction time



注: M. DL2000 DNA Marker; 1 ~ 4 表示 MgCl_2 浓度分别为 5、4、3、2 mmol/L 时的 LAMP 扩增; N 为阴性对照

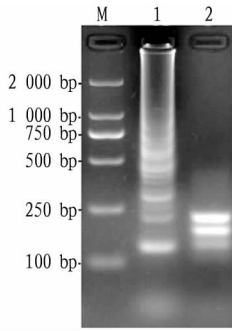
Note: M. DL2000 DNA Marker; 1 - 4 indicated that the MgCl_2 concentrations were 5, 4, 3 and 2 mmol/L , respectively; N. Negative control

图 3 不同 Mg^{2+} 浓度扩增结果

Fig. 3 Amplification results of different Mg^{2+} concentrations (ture, 2 \times), 每个 RT-LAMP 反应加入反应混合物 12.5 μL ; AMV 逆转录酶 0.25 μL , 抽提 RNA 2 μL 。

2.3 RT-LAMP 产物的酶切鉴定 图 4 显示, 用限制性内切酶 *Bam*HI 酶切扩增产物后, 产生 223 和 196 bp 的预期目的带。

2.4 RT-LAMP 扩增结果的肉眼判断 有 2 种肉眼直接观察的方法, 如图 5 所示。从图 5 可见, 阳性反应体系会有



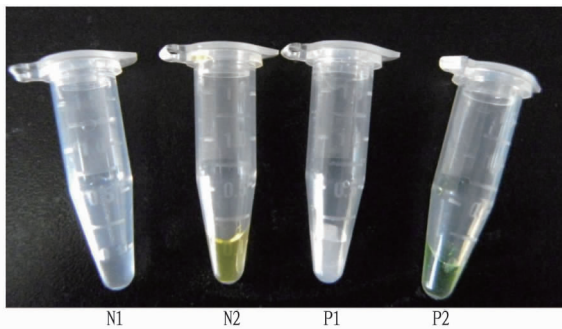
注: M. DL2000 DNA Marker; 1. 未酶切的扩增产物; 2. 扩增产物的酶切产物

Note: M. DL2000 DNA Marker; 1. Non enzymatic amplified product; 2. Amplified enzyme products

图 4 限制性内切酶 *Bam*HI 酶切鉴定

Fig. 4 Restriction endonuclease *Bam*HI digestion identification

白色混浊物,经短暂离心后会积聚在管底形成沉淀(P1),而阴性反应仍透明清亮(N1);加入 SYBR Green I 后,阳性反应变为绿色(P2),而阴性反应表现为染料原本的橙黄色(N2)。这 2 种判定方法灵敏度与电泳近乎一样。



注: N1 和 N2 为阴性对照, P1 和 P2 为阳性反应

Note: N1 and N2 were negative controls, P1 and P2 were positive

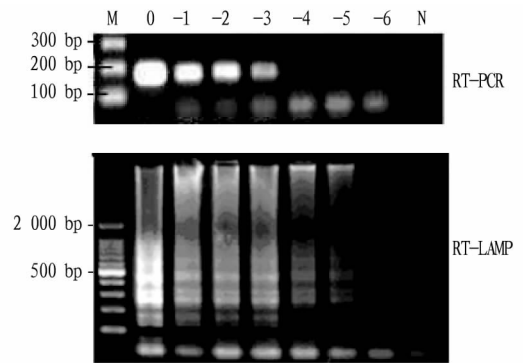
图 5 RT-LAMP 扩增结果

Fig. 5 Amplification results of RT-LAMP

2.5 灵敏度对比试验结果 抽提 RNA,按 10 倍比稀释后,取同等浓度的 RNA 用于 RT-LAMP 和 RT-PCR 反应。图 6 显示,RT-PCR 可检测的最高稀释度为 RNA 稀释 10^3 倍,RT-LAMP 可检测的最高稀释度稀释 10^5 倍。可见,RT-LAMP 比 RT-PCR 约灵敏 100 倍。

2.6 RT-LAMP 的特异性 用建立的 RT-LAMP 对实验室保存的 20 株 NV 病毒进行验证,结果均为阳性,RT-PCR 的产物为 186 bp。从图 7 可见,EV、RA、AstV 病毒均为阴性,未出现非特异性反应,说明所建立的 RT-LAMP 技术具有特异性。

2.7 RT-LAMP 应用于样品的检测 50 份样品是实验室从广东各地分离保存,确定 43 份阳性,7 份阴性,病毒分离阳性率为 86%,RT-LAMP 为 84%,RT-PCR 为 78%。阴性样品被 RT-PCR 和 RT-LAMP 检测也确定是阴性,但是 43 份阳性样品的检测中,RT-LAMP 漏检 1 份,被 RT-PCR 漏检 4 份。4 份被 RT-PCR 漏检的样品用 RT-LAMP 检测则为阳性。样品检测结果说明,RT-LAMP 表现出 97.7% 的灵敏

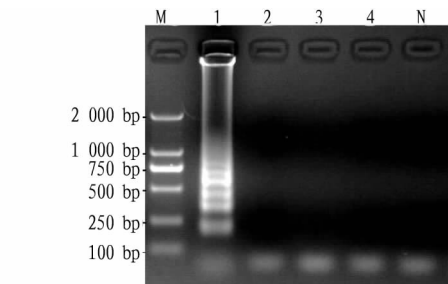


注: M. DL2000 DNA Marker; 0 ~ -6 (\log_{10}); 模板按 10 倍稀释后的扩增结果; N. 阴性对照

Note: M. DL2000 DNA Marker; 0 ~ -6 (\log_{10}); Amplification results after 10 fold dilution of the template; N. Negative control

图 6 RT-PCR 和 RT-LAMP 的灵敏性比照

Fig. 6 Sensitivity comparison of RT-PCR and RT-LAMP



注: M. DL2000 DNA Marker; 1 ~ 4 分别为 NV LAMP 引物检测 NV、EV、RV、AstV、RNAase free H_2O 的结果; N. 阴性对照

Note: M. DL2000 DNA Marker; 1 ~ 4 were the results for NV LAMP detecting NV, EV, RV, AstV, RNAase free; N. Negative control

图 7 RT-LAMP 反应特异性试验

Fig. 7 Specificity test of RT-LAMP reaction

度,而 RT-PCR 为 90.7%。

3 结论与讨论

(1) 该设计了一套 RT-LAMP 简并引物,建立了检测诺如病毒(NV)的一步法 RT-LAMP 技术,能简便、特异、灵敏地检测样品中的 NV;优化了反应温度($64\text{ }^{\circ}\text{C}$)、反应时间(40 min)等参数。在样品检测中,RT-LAMP 技术的灵敏度达 97.7%,高于 RT-PCR 的 90.7%,更适用于野外样品和简陋实验室的快捷检测。

(2) 研究仍存在的一些不足之处,改进之处包括特异性增强,简并引物的设计,弥补因模板点突变带来的缺陷,既能保证种间特异性,不扩增其他病毒,又可保证种内特异性,可以检测 NV 变异毒株;增加内引物酶切位点,进行特异性分析;优化和组合反应试剂,使操作更加简便、快捷。

(3) 该方法只需 1 台水浴锅在 1 h 内即可完成。而且,可直接用肉眼观察,使之便于在简易实验室用于病原诊断。如 RT-PCR 需要约 60 min,灵敏度高 100 倍,阳性样品加标试验和实际样品检测试验均可验证。该方法在野外试验中,也显示出很高的灵敏性,能够用于野外试验。

(下转第 84 页)

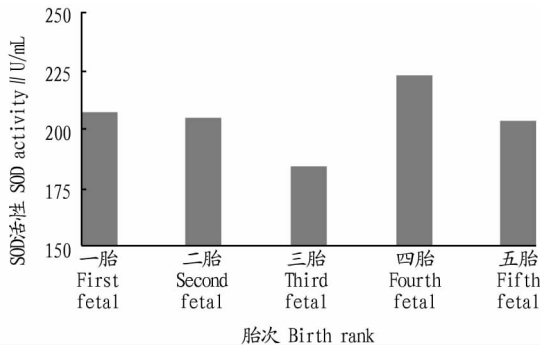


图1 不同胎次条件下天祝白牦牛乳中SOD活性变化

Fig.1 The variation of SOD activity in yak milk with the change of birth rank

3 结论与讨论

SOD活性与体内的氧自由基有关。牦牛生活在高海拔地区,为了消除强紫外线的照射而产生的过量氧自由基,使体内自由基维持平衡,SOD起到抗逆境作用,其活性升高^[8]。天祝白牦牛乳SOD活性比甘南牦牛乳小,比青海高原牦牛乳大,可能是品种不同,抗寒性不同,体内红细胞的SOD活性不同,因其具有清除体内自由基的作用,当机体逐渐衰老时,体内自由基的积累,而SOD活性也逐渐减小^[9]。冯启浩等^[10]对乳汁中SOD的研究表明,SOD的活性与pH的高低相关,还与乳脂肪含量相关,当pH调节偏低或偏高,就会直接影响比色杯中的反应液pH,从而与高速离心法所得样品活性会产生较大差异,一般pH低时,SOD活性偏高;对多种乳样的测定结果表明,乳脂肪含量高的乳样,SOD活性也相应较高。王惠生等^[11]对牛奶中SOD活性研究表明,乳中脂肪含量高的SOD活性要大于乳中脂肪含量低的牛乳;在泌乳期间,SOD活性与乳中干物质和蛋白质含量的变化规律基本一致,与产奶量的变化规律基本相反,乳中干物质和蛋白质含量越高,则其SOD活性越高,对提高饮奶人的免疫功能效果越好。该研究针对天祝白牦牛的3个牧区考察牛乳中的SOD活性,结果得出SOD活性差别不大,这表明SOD活性受地点的变化影响较小。对牦牛乳中SOD活性的热稳定性有必要作进一步的探讨。

同时该研究结果表明,白牦牛乳中SOD活性比较稳定,

基本不受胎次变化的影响。随着胎次的递增,SOD活性先下降再上升,又趋于稳定,即胎次对牦牛乳中SOD活性影响不大。唐正香^[12]的研究结果表明,牦牛乳中的SOD活性比较稳定,基本不受外界条件、胎次的影响,SOD活性较高的原因可能是由于牦牛生活在紫外线强的高海拔地区,为了消除体内因紫外线照射而产生的过量氧自由基,使体内自由基维持平衡,在抗逆境方面起重要作用的SOD活性就会提高,增加清除氧自由基的能力。该研究与唐正香^[12]的研究结果一致,即天祝白牦牛乳的SOD活性随季节、胎次变化影响不大。

对天祝3个牧区牦牛乳酶活性研究表明:天祝白牦牛乳SOD活性比甘南牦牛乳小,比青海高原牦牛乳大;同一品种3个牧区的天祝白牦牛乳中SOD活性有所变化,但是差异不显著;SOD活性随着胎次的变化无显著差异,即胎次对牦牛乳酶活性影响不大。

参考文献

- [1] BRESCIANI G, CRUZ I B M, DE PAZ J A, et al. The MnSOD Ala16Val SNP; Relevance to human diseases and interaction with environmental factors[J]. *Free radical research*, 2013, 47(10): 781-792.
- [2] SMITH V H. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: A global problem[J]. *Environmental science and pollution research*, 2003, 10(2): 126-139.
- [3] 董亮, 何永志, 王远亮, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2013, 15(5): 53-58.
- [4] 马伟荣, 童军茂, 单春会, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的特征及在植物抗逆性方面的研究进展[J]. *食品工业*, 2013, 34(9): 154-157.
- [5] 严万里, 陈晓明, 郭丽燕, 等. 超氧化物歧化酶活性测定的影响因素研究[J]. *生物学通报*, 2011, 46(3): 50-53.
- [6] 迟玉杰, 王明丽, 孙艳红. SOD对人体的营养保健作用[J]. *中国乳品工业*, 2000, 28(4): 27-29.
- [7] MCCORD J M, FRIDOVICH J. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (Hemocaprein) [J]. *Journal of biological chemistry*, 1969, 244: 6049-6051.
- [8] 徐靖. 超氧化物歧化酶及其应用的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(12): 387-391.
- [9] 史竞艳, 罗辛茹, 鲍江鸿, 等. 超氧化物歧化酶活性的测定[J]. *湖北大学学报(自然科学版)*, 2012, 34(4): 374-377.
- [10] 冯启浩, 俞进和, 袁勤生. 乳汁中超氧化物歧化酶的测定及其相关问题的研究[J]. *中国乳品工业*, 1994, 22(1): 15-18.
- [11] 王惠生, 李建安, 陈海萍, 等. 奶中超氧化物歧化酶(SOD)活性的研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 1995, 23(4): 99-101.
- [12] 唐正香. 不同放牧条件对天祝白牦牛乳中酶和激素的影响研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.

(上接第59页)

参考文献

- [1] 桑少伟. 诺如病毒急性胃肠炎分子流行病学调查研究[D]. 济南: 山东农业大学, 2012.
- [2] DOLIN R. Noroviruses: Challenges to control[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(11): 1072-1073.
- [3] ATMAR R L, ESTES M K. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2006, 35(2): 275-290.
- [4] 周晓红. 食品与水中诺如病毒检测方法的建立及其在疫情暴发中的初步应用[D]. 广州: 暨南大学, 2010.
- [5] MORI Y, NAGAMINE K, TOMITA N et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(1): 150-154.
- [6] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic acids research*, 2000, 28(12): 63-67.
- [7] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T, et al. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16(3): 223-229.
- [8] POON L L, WONG B W, MA E H, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: Detecting plasmodium falciparum directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Clinical chemistry*, 2006, 52(2): 303-306.