

专 论 与 综 述

环介导等温扩增核酸技术及其应用*

匡燕云 李思光** 罗玉萍

(南昌大学生命科学学院 南昌 330031)

摘要 环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,简称 LAMP)是利用 4 个特殊设计的引物和具有链置换活性的 DNA 聚合酶,在恒温条件下特异、高效、快速地扩增 DNA 的新技术。该技术在 1h 内能扩增出 10^9 靶序列拷贝,扩增产物是一系列反向重复的靶序列构成的茎环结构和多环花椰菜样结构的 DNA 片段的混合物,电泳后在凝胶上显现出由不同大小的区带组成的阶梯式图谱。LAMP 技术以其特异性强、灵敏度高、快速、准确和操作简便等优点在核酸的科学研究、疾病的诊断和转基因食品检测等领域得到了日益广泛的应用。

关键词 等温扩增 核酸 链置换反应 内引物 外引物

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(2007)03-0557-04

Loop-mediated Isothermal Amplification Method for Detection of Nucleic Acids and its Application*

KUANG Yan-Yun LI Si-Guang** LUO Yu-Ping

(College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031)

Abstract A novel nucleic acid amplification method, termed loop-mediated isothermal amplification (LAMP), which amplifies DNA with high specificity, efficiency, and rapidity under isothermal conditions, may be a valuable tool for the rapid detection of infectious diseases. This method employs a DNA polymerase that have activity of strand displacement DNA synthesis and a set of four specially designed primers that recognize a total of six distinct sequences on the target DNA. LAMP can amplify a few copies of DNA to 10^9 in less than an hour. The final products are stem-loop DNA with several inverted repeats of the target and cauliflower-like structures with multiple loops. A positive reaction would be shown as a ladder-like pattern in a gel electrophoresis analysis. Because of the advantage, the LAMP method will be widely applied to research of nucleic acid, clinical diagnosis of infectious diseases and detection of genetically modified organisms etc.

Key words LAMP, Nucleic acid, Strand displacement reaction, Inner primer, Outer primer

随着现代分子生物学的迅速发展,新的核酸扩增技术不断出现。70 年代初,核酸内切酶的发现使人们能够通过分子克隆的方法分离并克隆基因。传统的分子克隆技术包括酶切、连接、转化、培养以及同位素标记探针的筛选等过程,大约要用 1~2 周时间才能完成。80 年代中期,人们建立了聚合酶链式反应技术(polymerase chain reaction,PCR),将 DNA 扩增过程缩短到了 2h~3h,使得分子克隆技术得到了突破性的改进。2000 年 Notomi 等^[1]建立了一种新的体外扩增特异 DNA 片段的分子生物学技术,即环介导的等温扩

增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。该技术依赖于自动循环的链置换反应,在等温条件下,不到 1h 就能扩增出 10^9 靶序列拷贝。LAMP 技术以其特异性强、灵敏度高、快速准确和操作简单等优点在核酸的科学研究、疾病的诊断和预防、动物胚胎的性别鉴定和转基因食品检测等领域得到了日益广泛的应用。

1 LAMP 技术的原理

等温扩增反应(LAMP)是对靶基因的 6 个特异部位设定

* 国家自然科学基金项目(No.30660042)。

江西省自然科学基金(No.0630136)资助项目。

** 通讯作者 Tel:0791-8304099, E-mail: siguangli@163.com

收稿日期:2006-07-03,修回日期:2006-09-30

4种引物,利用具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶在恒温条件下催化新链合成,从而使靶基因高效扩增。图1所示靶序列上的6个特异区域和引物的结构,F2c和B2为扩增片段两端长度为18nt~24nt的特异序列,F1c和B1为分别位于F2c和B2内侧,且与其相距40nt的长度为18nt~24nt的特异序列,F3c和B3为分别位于F2c和B2外侧长度为17nt~21nt的特异序列。4条引物中2条为内引物,2条为外引物。内引物FIR(forward inner primer)包含F1c序列和FX(F2c区域的互补序列),即5'-F1c-F2;内引物BIR(backward inner primer)包含B1c(B1区域的互补序列)和B2序列,即5'-B1c-B2。外引物为F3和B3序列。

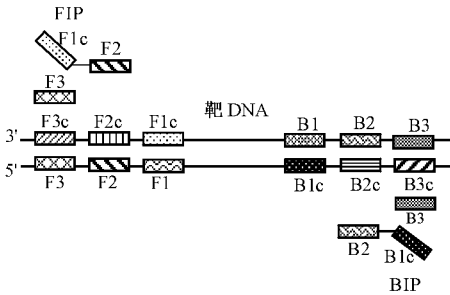


图1 靶序列上6个特异区域及引物设计

LAMP反应过程包括哑铃状模板合成阶段、循环扩增阶段、伸长和再循环阶段(图2^[1])。在LAMP哑铃状模板合成阶段,内引物FIP的F2序列结合到模板DNA的F2c上,引导合成互补的DNA链(图2结构1)。同时,外引物F3结合到模板DNA的F3c上(图2结构2),引导合成模板DNA的互补链,并通过置换反应,释放出由FIP引导合成的互补链(图2结构3)。被释放出的互补链末端的F1c和F1能够形成了一个环状结构,引物BIP结合到其另一端,引导合成该链的互补链,并且外引物B3也引导合成该链的互补链,同时置换出BIP引导合成的互补链(图2结构4、5)。被置换下由BIP引导合成的互补链两端自动成环,形成了一条两端环状的单链(哑铃结构)(图2结构6)。

在LAMP循环扩增阶段,这种哑铃结构的DNA为循环反应提供了原料,哑铃结构的DNA通过自我引导延伸,生成双链茎环结构,循环反应中引物FIP结合到茎环DNA的环状结构上(图2结构7),引导合成新的DNA双链,同时置换出与之相同序列的链,形成一个过渡性茎环结构DNA,在其茎上含有一个靶序列反向拷贝,而另一端通过BIP形成一个环状结构(图2结构8),在随后自我引导的链置换DNA合成反应中生成一条填补好缺口、长度为靶DNA 2倍的茎环DNA(图2结构9)和一个与结构6互补的DNA链(图2结构12)。这样就在结构6和结构12之间建立了循环反应。结构8和结构14可为伸长和再循环阶段中由内引物引导的链置换反应提供模板。在伸长和再循环阶段,内引物引导链置换延伸反应,茎环个数逐渐增加(图2结构9-11),最后的

扩增产物是一系列反向重复的靶序列构成的茎环结构和多环花椰菜样结构的DNA片段混合物(图2结构16、17),电泳后在凝胶上显现不同大小区带组成的阶梯式图谱。

逆转录LAMP(RT-LAMP)是基于LAMP建立的RNA分子检测技术^[2],其灵敏度是RT-PCR的100倍。RT-LAMP扩增原理与LAMP相同,但在反应体系中增加了逆转录试剂,使RNA的逆转录和cDNA的LAMP扩增在同一试管中完成而不需要分步进行。

2 LAMP技术的基本操作过程

LAMP等温扩增反应体系包含了引物、模板DNA、Bst DNA聚合酶、dNTP和缓冲液。其基本操作过程是将LAMP反应体系(除Bst DNA聚合酶)在95℃加热5min后,冷却,再加入8U Bst DNA聚合酶,在63℃保温60min,然后在高于80℃的温度下加热2min终止反应。

3 LAMP技术的优点

3.1 灵敏度高

LAMP一般能检测到比PCR低10倍的拷贝数,对于低浓度的病毒数量或无症状的病毒携带者的检测比PCR好。另外在动物胚胎性别的判断中,基于LAMP的动物胚胎性别检测方法具有很高的敏感性和准确性,用3~5个细胞样本可很准确地判断性别,用1~2个细胞的准确性也可达到75.0%~94.4%^[3]。

3.2 特异性强

由于LAMP通过4对引物与靶序列上的6个特异部位准确结合来产生扩增效应,因此能获得比PCR更高的特异性,这对特异性要求高的样品检测来说非常重要。

3.3 速度快

LAMP是恒温扩增反应,没有PCR反应中温度变化的耗时,在30min~60min内即可完成反应过程,比PCR反应速度更快,能满足临床标本需要快速检测的要求。另外,在LAMP反应体系中增加2条环引物可使其反应所需时间比原来缩短近一半,整个反应在不到30min内完成,大大提高了检测的效率^[4]。

3.4 设备简单

LAMP反应只需一个简单的恒温器,不需要昂贵的PCR仪,易于在基层医疗单位和食品检测部门推广应用。

3.5 产物检测便捷

LAMP在合成DNA的同时还产生大量的焦磷酸根离子,它们能与镁离子结合生成白色的焦磷酸镁沉淀,可根据反应体系中是否形成白色沉淀来定性判断LAMP反应。

4 LAMP技术的应用

LAMP和RT-LAMP以其灵敏度高、特异性强、速度快和操作简单等特点而倍受人们青睐,已日益广泛地应用于各

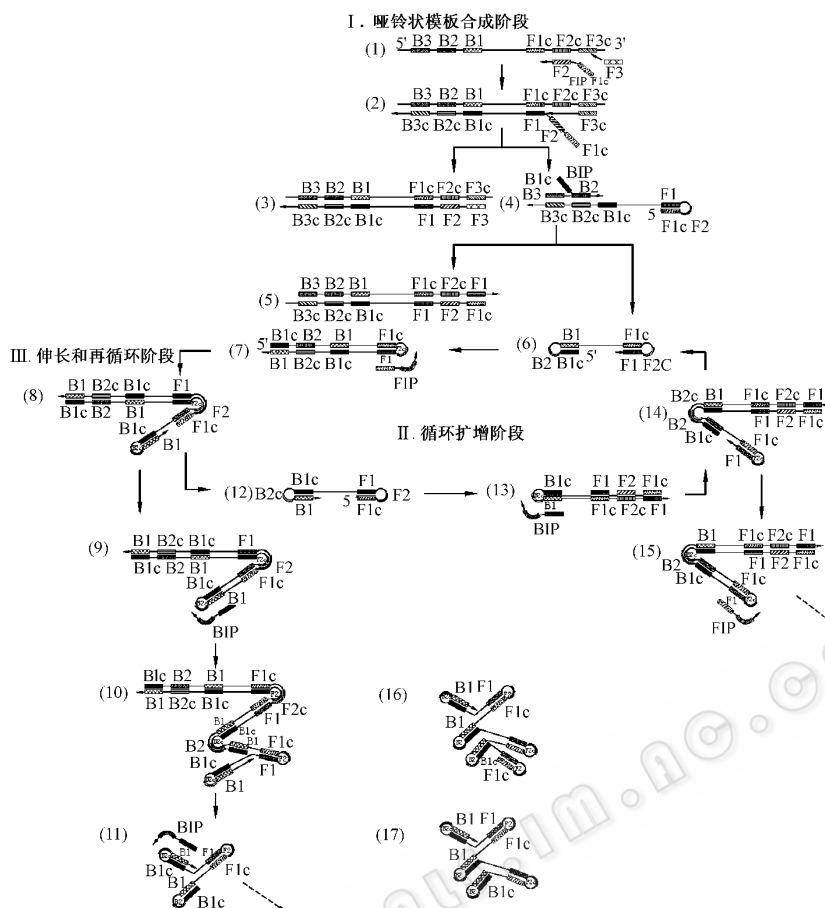


图 2 LAMP 反应原理

种样品中 DNA 和 RNA 的检测。

4.1 病毒病原体的检测

4.1.1.1 禽流感病毒的检测:禽流感病毒^[5]是一种单链 RNA 病毒,它不仅给养禽业造成巨大的经济损失,而且可以感染人。禽流感病毒的传统检测方法是血清学诊断技术,这种方法检测周期长且操作复杂;实时荧光 PCR 等诊断技术虽敏感性高、可将检测时间缩短为 4h,但需要复杂的仪器和昂贵的试剂。Poon 等^[6]利用 LAMP 技术建立了禽流感病毒检测方法。该方法简便快速,成本低,不需要特殊试剂而且敏感性比 PCR 高。Poon 用 LAMP 和 PCR 方法分别对稀释成不同浓度的禽流感病毒样本进行检测,PCR 最低检测到 10^{-2} PFU,而 LAMP 能在不到 1h 内检测到 10^{-3} PFU 且可以通过肉眼观察反应所生成的白色沉淀物来快速检测禽流感病毒,因此 LAMP 在应对农场大规模禽流感病毒检测时有相当广泛的应用前景。

4.1.1.2 严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)的检测: SARS-CoV^[7]是包含 29727 个核苷酸的单链 RNA 病毒,它严重影响了人类健康及全球经济,所以建立快速、准确的 SARS 检测技术是应对 SARS 的重要措施之一。目前有关 SARS 检测方法的建立主要集中在酶联免疫吸附(ELISA)和 PCR 技

术方面,但这两种方法都不适合在一般发展中国家进行常规检测。Poon 等^[8]将 SARS-CoV 的 *Rep* 基因逆转录为 cDNA,利用 LAMP 技术建立 SARS-CoV 检测方法。Hong 等^[9]对其进行改进,直接将病毒 RNA 和 RNA 逆转录试剂同时加入同一体系,采用 RT-LAMP 方法更快的检测了 SARS-CoV,其在不到 1h 的时间里能最低检测到 0.1PFU 的 SARS-CoV,RT-LAMP 的灵敏度是 RT-PCR 的 100 倍,并且 RT-PCR 的检出率只有 RT-LAMP 的 87%。

4.1.3 人类疱疹病毒的检测

疱疹病毒(Herpesviruses , HSV)是一类中等大小的双股 DNA 病毒,侵犯人类的疱疹病毒有 7 种。Enomoto 等^[10]采用 LAMP 建立了单纯疱疹病 HSV-1 和 HSV-2 的快速检测方法,分别扩增了 HSV-1 和 HSV-2 的特异 Gg 基因,对 HSV-1 和 HSV-2 做出了准确判断。Okamoto^[11]、Suzuki 等^[12]通过 LAMP 方法分别检测了水痘带状疱疹病毒(VZV)和细胞巨化病毒(CMV)的特异基因,该方法可检测到 500 拷贝/管,其特异性、阳性检测率都达到实时定量 PCR 的 98.9% 以上。人类疱疹病毒 6 型(HHV-6)和人类疱疹病毒 7 型(HHV-7)患病初期不易诊断, Ihira^[13]、Yoshikawa 等^[14]分别建立了 HHV-6 LAMP 和 HHV-7 LAMP 方法,该方法的高灵敏度非常适合 HHV-6 和 HHV-7 潜伏期病人的诊断。

LAMP还可应用于对虾白斑综合症病毒、西尼罗河病毒、乙型肝炎病毒、腮腺炎病毒、新城疫病毒、狂犬病毒、番茄黄化曲叶病毒等许多病毒的检测。

4.2 细菌病原体的检测

4.2.1 分枝杆菌的检测 临床上一一直在寻找快速准确的鉴别诊断生长缓慢的分枝杆菌的方法。Iwamoto等^[14]根据分枝杆菌属 16S 核糖体 DNA 保守序列设计共用引物,采用 LAMP 方法可以检测出分枝杆菌属病菌,他们还根据分枝杆菌不同种的 *gyrB* 基因序列的特异性分别针对结核分枝杆菌复合群、鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌设计引物从痰标本中鉴定结核分枝杆菌、鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌。

4.2.2 牙周细菌的检测 Yoshida 等^[15]针对牙龈卟啉菌(*P. gingivalis*)、福氏类杆菌(*T. forsythia*)、齿垢螺旋体(*T. denticola*) 3 种病原体分别设计引物,用 LAMP 方法最低能检测到的 *P. gingivalis* 和 *T. forsythia* 为 10fg/管、*T. denticola* 为 100fg/管。Maeda 等^[16]用 LAMP 方法对牙周炎主要致病菌 *P. gingivalis* 进行检测,通过 16S 核糖体 RNA 基因对其设计引物, LAMP 扩增 30min 后,能在 20 个细胞/管的样品中检测到扩增产物。

LAMP 还可用于艰难梭状芽孢杆菌、志贺菌、假结核耶尔森氏菌、迟钝爱德华氏菌、沙门氏菌、肺炎链球菌等许多细菌的检测。

4.3 真菌病原体的检测

巴西类球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*, PB)是一种热依赖的二相真菌,引起南美牙生菌病,用传统 PCR 从真菌细胞中检测出 PB 的特异基因 *gp43* 和 *gp27* 需要 5h~6h,而用巢式 PCR 从血液或组织标本中检测则需要 12h,Endo 等^[17]用 LAMP 检测 *gp43* 只需要 3h。

4.4 寄生虫病的检测

寄生虫对人体的危害主要包括其作为病原引起寄生虫病及作为疾病的传播媒介两方面。Poon 等^[18]用 LAMP 方法检测疟疾虫的小亚基核糖体 rRNA 基因,可准确判断人是否患有疟疾,其灵敏度和特异性可以分别达到实时 PCR 的 95%和 99%。巴贝西虫病是一种由蜱传播的致命性疾病,会导致犬类的死亡。Ikadai 等^[19]根据 18S rDNA 序列设计引物,采用 LAMP 和 PCR 的方法进行扩增反应,两者的检测虫体密度(parasitemia)的极限均为 0.0005%,但 LAMP 操作简单,结果可通过肉眼观察,并且时间比 PCR 少 3h。

4.5 其它方面的应用

4.5.1 转基因食品(GMOs)的检测 LAMP 已逐步应用于食品分析中。世界卫生组织在 20 世纪 90 年代提出了对转基因食品进行安全性评价的要求,规定转基因食品必须标示。由于大多数转基因食品都含有 CaMV-35S 启动子,因此,检测 CaMV-35S 启动子的存在与否可判断转基因食品。Shiro

等^[20]利用 LAMP 方法通过检测 CaMV-35S 启动子来确定大豆是否进行了转基因改良。

4.5.2 动物胚胎性别鉴定 Hirayama 等^[3]将 LAMP 方法应用于牛胚胎的鉴定。用于检测雄性胚胎的特异序列 S4 是 Y 染色体上的一段重复序列,用于雌雄共有的 LAMP 反应的特异序列是 1.715 卫星 DNA 序列。当 2 个 LAMP 反应都为阳性时胚胎为雄性,如果只有雌雄共有的 LAMP 反应为阳性则胚胎为雌性。

综上所述, LAMP 技术凭借其操作简单、所需模板量少、特异性强以及可以快速获得大量特异性扩增产物等优点将成为核酸研究的重要工具,在卫生防疫检验和食品检测中大显身手,成为应对大规模突发公共卫生事件最强有力的武器之一。

参考文献

- [1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. 2000, **28**(12): E63.
- [2] Gunimaladevi I, Kono T, Lapatra SE, et al. Arch Virol, 2005, **150**(5): 899~909.
- [3] Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, et al. Theriogenology, 2004, **62**(5): 887~896.
- [4] Nagamine K, Hase T, Notomi T. 2002, **16**(3): 223~229.
- [5] 李靖, 刘伯华, 祝庆余. 微生物学通报. 2005, **32**(3): 121~124.
- [6] Poon LL, Leung CS, Chan KH, et al. J Clin Microbiol, 2005, **43**(1): 427~430.
- [7] 李洪敏, 蔡忠军, 曹寿春, 等. 微生物学通报. 2003, **30**(5): 87~89.
- [8] Poon LL, Leung CS, Tashiro M, et al. Clin Chem, 2004, **50**(6): 1050~1052.
- [9] Hong TC, Mai QL, Cuong DV, et al. J Clin Microbiol, 2004, **42**(5): 1956~1961.
- [10] Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, et al. J Clin Microbiol, 2005, **43**(2): 951~955.
- [11] Okamoto S, Yoshikawa T, Ihira M, et al. J Med Virol, 2004, **74**(4): 677~682.
- [12] Suzuki R, Yoshikawa T, Ihira M, et al. J Virol Methods, 2006, **132**(1-2): 216~221.
- [13] Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y, et al. J Clin Microbiol, 2004, **42**(1): 140~145.
- [14] Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. J Clin Microbiol, 2003, **41**(6): 2616~2622.
- [15] Yoshida A, Nagashima S, Ansai T, et al. J Clin Microbiol, 2005, **43**(5): 2418~2424.
- [16] Maeda H, Kokeguchi S, Fujimoto C, et al. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005, **43**(2): 233~239.
- [17] Endo S, Komori T, Ricci G, et al. FEMS Microbiol Lett, 2004, **34**(1) 93-97. Clin Chem, 2004, **50**(6): 1050~1052.
- [18] Poon LL, Wong BW, Ma EH, et al. Clin Chem, 2006, **52**(2): 303~306.
- [19] Ikadai H, Tanaka H, Shibahara N, et al. J Clin Microbiol, 2004, **42**(6): 2465~2469.
- [20] Shiro Fukuta, Yuko Mizukami, Akira Ishida, et al. Eur Food Res Technol, 2004, **218**: 496~500.