

## 黄热病毒逆转录环介导等温扩增检测方法的建立

吕沁风<sup>1</sup> 陈寅<sup>2</sup> 吴忠华<sup>1</sup> 郑伟<sup>1</sup> 张严峻<sup>2</sup> 李禾<sup>1\*</sup>

(1. 浙江国际旅行卫生保健中心 浙江 杭州 310003)

(2. 浙江省疾病预防控制中心 浙江 杭州 310051)

**摘要:**【目的】建立一种简便快速的黄热病毒分子检测方法。【方法】运用 RT-LAMP (Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification) 技术设计一套引物特异性识别黄热病毒 E 基因中的 6 个区域, 建立高效简便的黄热病毒等温扩增检测方法。【结果】该检测方法具有良好的特异性, 与其他虫媒病毒无交叉反应。同时检测灵敏度可达到 0.066 pg, 与 RT-PCR 相比, 灵敏度高 100 倍左右。模拟样本检测与预期相符, 临床样本未检测到阳性标本。【结论】该方法为黄热病毒检疫提供了一种可在简便环境中特异、灵敏的快速检测手段。

**关键词:** 黄热病毒, RT-LAMP, 检测

## Establishment of a reserve transcription loop-mediated isothermal amplification detection method for Yellow fever virus

LÜ Qin-Feng<sup>1</sup> CHEN Yin<sup>2</sup> WU Zhong-Hua<sup>1</sup> ZHENG Wei<sup>1</sup> ZHANG Yan-Jun<sup>2</sup> LI He<sup>1\*</sup>

(1. Zhejiang International Travel Healthcare Center, Hangzhou, Zhejiang 310003, China)

(2. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China)

**Abstract:** [Objective] Establish a simple and rapid molecular detection of Yellow fever virus. [Methods] The reserve transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) that amplifies RNA with high specificity and rapidity under an isothermal condition was applied for rapid detection of Yellow fever virus. A set of primers were designed specifically to identify six special areas of Yellow fever virus's E gene. [Results] The results indicated that the method had high specificity, and no cross amplification occurred with other arbovirus RNAs. The sensitivity of the RT-LAMP assay was 0.066 pg, which was 100 times higher than that of RT-PCR. The detection results of simulation samples were consistent with expected. [Conclusion] The established rapid detection method for Yellow fever virus that can be carried out in a simple experimental environment has been proved to be specific and sensitive.

**Keywords:** Yellow fever virus, RT-LAMP, Detection

基金项目: 国家质检公益性行业科研专项项目(No. 201010043); 浙江省重点科技创新团队(No. 2011R50021); 质检总局科研项目(No. 2013IK245)

\*通讯作者: Tel: 86-571-87850075; 邮箱: lihe@zqi.gov.cn

收稿日期: 2013-02-04; 接受日期: 2013-04-07; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

黄热病毒(Yellow fever virus , YF)是一种引起人类黄热病的 RNA 病毒 ,属于黄病毒科(Flaviridae)黄病毒属(Flavivirus)<sup>[1]</sup>。黄热病为国际三大检疫传染病之一 ,目前主要流行于非洲及南美洲 ,传播媒介主要为埃及伊蚊 ,我国尚未传入。人群对黄热病毒普遍易感 ,在某些暴发疫情中病死率可高达 20%–40% ,危害极大<sup>[2]</sup>。随着国际交流的日期增多 ,口岸传染病输入风险加大 ,因此建立黄热病毒的快速、灵敏检测方法具有重要的现实意义。

随着分子生物学方法的不断进步 ,2000 年 Notomi 等首先报道了一种新的核酸扩增技术 ,即环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification , LAMP)<sup>[3]</sup>。该技术依赖于 4 条能够识别靶序列上 6 个特异区域的引物和一种具有链置换特性的 DNA 聚合酶 ,不需要热变性的 DNA 作为模板 ,在恒温下就可进行高效、快速、高特异地扩增靶序列。

本研究将 LAMP 技术应用于黄热病毒检测 ,针对黄热病毒的 E 基因保守区序列设计引物 ,建立了 RT-LAMP 黄热病毒检测法 ,对特异性和灵敏度进行了验证 ,同时与 PT-PCR 进行了灵敏度比较。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞

黄热病毒减毒活疫苗 YFV17DTiantan 购自北京天坛生物制品股份有限公司。登革病毒 3 型与乙型脑炎病毒均用 C6/36 细胞分离于临床标本 ,由浙江省疾病预防控制中心惠赠。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司 ,AMV 逆转录酶购自 Promega 公司 ,Bst-DNA polymerase 购自 NEB 公司。TaKaRa Ex Taq 酶和 dNTPs 购自 TaKaRa 公司 ,RNase Inhibitor 购自 Fermentas 公司 ,SYBR Green I、MgSO<sub>4</sub> 和 Betain 为 Sigma-Aldrich 公司产品 ,DNA Marker DL2000 和琼脂糖 Agrose 购自 TaKaRa 公司。

1.3 引物合成

从 GenBank 下载代表性的黄热病毒序列 ,共选

择 33 株 1940–2010 年黄热病毒以及疫苗株黄热病毒的 E 基因序列 ,用 DNASTar 软件对黄热病毒 E 基因序列进行比对 ,根据目标基因中的 6 个特异性区域设计 4 条引物(表 1)。引物通过在线工具 PrimerExplore IV 进行设计 ,由上海 Sangon 公司合成。

1.4 病毒 RNA 的提取

严格按 QIAGEN 试剂盒说明书提取病毒 RNA ,溶于 100 μL 无 RNase 水中 ,–70 °C 保存。

1.5 RT-LAMP 的反应体系

RT-LAMP 反应体系如下 : 20 mmol/L Tris-HCl , 10 mmol/L KCl , 10 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , 8 mmol/L MgSO<sub>4</sub> , 0.1% Tween-20 ,引物浓度如下 : (F3 与 B3 均为 0.25 μmol/L ,BIP 与 FIP 为 2 μmol/L) , 0.8 mmol/L Betain , 1.4 mmol/L dNTP , 10 U AMV 逆转录酶 , 8 U Bst-DNA polymerase , 1 μL RNA 模板 ,补足 DEPC-H<sub>2</sub>O 至 25 μL ,混匀。

1.6 反应温度优化

在反应体系中加入适量 SYBR Green I ,进行 Real-time RT-LAMP ,采用 MJ Research Opticon 2 荧光定量 PCR 仪 ,利用荧光定量 PCR 仪的软件 Gradient Calculator ,计算并选择温度梯度 57.1、58.0、59.4、61.2、63.0、64.9、66.2 和 67.0 °C 分别进行反应以及荧光检测。温度梯度 57.1–67.0 °C 56 s ,荧光采集 4 s ,反应时间共 1 h。

1.7 RT-LAMP 反应的特异性试验

提取登革病毒与乙型脑炎病毒核酸与黄热病毒同时进行 RT-LAMP 反应 ,产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 ,1×TAE 缓冲液 ,电压 135 V ,22 min ,

表 1 黄热病毒核酸 RT-LAMP 扩增引物  
Table 1 The YFV RT-LAMP primers

引物 Primers	序列 Sequence (5'→3')
F3	TGGGAGAGGAGATTACGTT
B3	TCAAGCCGCCAAATAGCC
FIP	CCACGCCTTTTCATGGTCTGAGTTTACCAGT GGCACAAAGAGG
BIP	AGACACCGCCTGGGATTTYAGGCAGAGCC AAACACCGTATG

离心沉淀后在反应体系中加入 SYBR Green I, 在紫外灯下进行观察。

### 1.8 普通 RT-PCR 方法的建立

采用外引物 F3、B3 作为 RT-PCR 引物进行扩增, 反应体系如下: 引物 F3 与 B3 均为  $0.5 \mu\text{mol/L}$ ,  $10 \text{ U}$  AMV 逆转录酶,  $1.25 \text{ U}$  TaKaRa Ex Taq 酶,  $4 \text{ U}$  RNase Inhibitor, dNTPs Mixture (各  $0.25 \text{ mmol/L}$ ),  $1\times$  Ex Taq Buffer,  $1 \mu\text{L}$  RNA 模板, 补足 DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  至  $25 \mu\text{L}$ 。反应条件为:  $30^\circ\text{C}$   $10 \text{ min}$ ,  $37^\circ\text{C}$   $60 \text{ min}$ ,  $95^\circ\text{C}$   $5 \text{ min}$ ;  $95^\circ\text{C}$   $30 \text{ s}$ ,  $60^\circ\text{C}$   $30 \text{ s}$ ,  $72^\circ\text{C}$   $30 \text{ s}$ , 共 32 个循环;  $72^\circ\text{C}$   $5 \text{ min}$ ,  $4^\circ\text{C}$   $5 \text{ min}$ 。

### 1.9 RT-LAMP 与 RT-PCR 的灵敏度比较

对 RT-LAMP 和 RT-PCR 分别进行灵敏度试验, 比较二者灵敏度间差异。将黄热病毒 RNA 进行 10 倍比稀释, 测定 RNA 的浓度分别为  $6.60 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $0.66 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $66.00 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 、 $6.60 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 、 $0.66 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 、 $66.00 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 、 $6.60 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 、 $0.66 \text{ fg}/\mu\text{L}$ , 取  $1 \mu\text{L}$  作为模板分别加入 RT-LAMP 反应液和 RT-PCR 反应体系中, 各自反应后取  $2 \mu\text{L}$  反应产物进行电泳分析。

### 1.10 RT-LAMP 反应产物的测序分析

将 RT-LAMP 的扩增产物电泳, 选取靠近引物

带的清晰条带, 割胶回收后进行序列分析, 采用内引物(FIP, BIP)作为测序引物, 测序分析由中美泰和公司完成。

### 1.11 RT-LAMP 重复性试验

选取灵敏度检测中的强阳性标本、临界值标本以及阴性对照各 5 份, 各取  $1 \mu\text{L}$  作为模板进行实时荧光 RT-LAMP 检测, 批间重复测定 3 次, 批内重复测定 5 次, 计算批内及批间差异, 从而对该方法的重复性进行考核。

### 1.12 模拟样品及临床样本检测

将黄热病毒疫苗混入本中心出入境体检健康人员血清中作为阳性样本, 23 例杭州萧山国际机场送检发热病人分离血清待测, 提取上述血清核酸, 进行黄热病毒 RT-LAMP 检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄热病毒 RT-LAMP 反应温度的优化

反应结果见图 1。 $C_t$  值最小的扩增曲线对应的温度为  $63.0^\circ\text{C}$ , 其后依次为  $61.2^\circ\text{C}$ 、 $64.9^\circ\text{C}$ 、 $59.4^\circ\text{C}$ 、 $66.2^\circ\text{C}$ 、 $58.0^\circ\text{C}$ 、 $57.1^\circ\text{C}$ ,  $67.0^\circ\text{C}$  时扩增结果为阴性。结果说明反应的最适温度约为  $63.0^\circ\text{C}$ 。

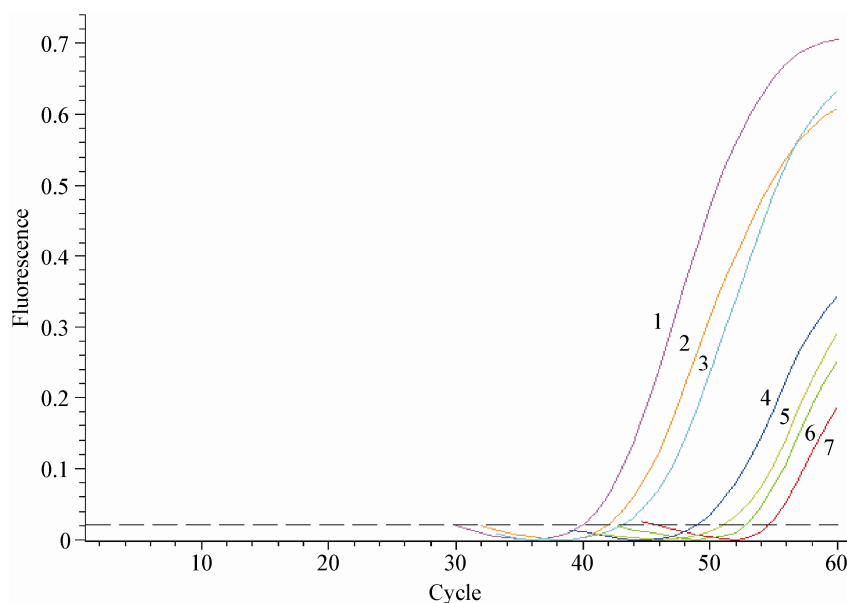


图 1 不同温度 Real-time RT-LAMP 检测黄热病毒扩增曲线

Figure 1 The Yellow fever virus Real-Time RT-LAMP amplification curve in different temperature

Note: 1:  $63.0^\circ\text{C}$ ; 2:  $61.2^\circ\text{C}$ ; 3:  $64.9^\circ\text{C}$ ; 4:  $59.4^\circ\text{C}$ ; 5:  $66.2^\circ\text{C}$ ; 6:  $58.0^\circ\text{C}$ ; 7:  $57.1^\circ\text{C}$ .

## 2.2 黄热病毒 RT-LAMP 检测

采用黄热病毒 LAMP 方法进行检测, 电泳反应结果见图 2, 黄热病毒核酸出现典型的阶梯状条带; 沉淀反应见图 3, 黄热病毒反应管可见明显的白色沉淀; 荧光检测见图 4, 黄热病毒反应管可见明亮的荧光反应。此外, 阴性对照、登革病毒与乙型脑炎病毒核酸的检测结果均为阴性, 由此显示了该方法具有很好的特异性。

## 2.3 RT-LAMP 反应与 RT-PCR 灵敏度比较

通过 GE 公司 NanoVue 微型光度计测量提取的黄热病毒 RNA 浓度为  $0.066 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。RT-LAMP 结果如图 5 所示, 3–8 泳道均有阶梯状条带产生, 检出限为  $0.066 \text{ pg}$  左右。RT-PCR 结果如图 6 所示, 1–4 泳道有特异性条带产生, 检出限为  $6.6 \text{ pg}$  左右, 实验表明 RT-LAMP 的灵敏度比 RT-PCR 高 2 个数量级左右。

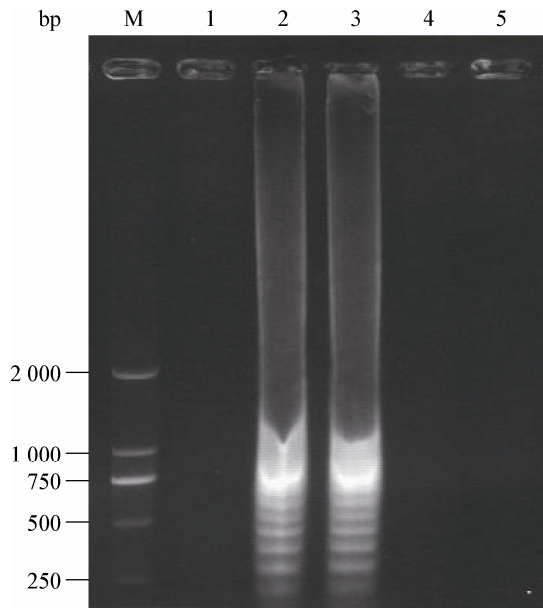


图 2 RT-LAMP 扩增电泳图

Figure 2 The electrophoresis results of RT-LAMP products

注: M: Marker; 1: 阴性对照; 2–3: 黄热病毒; 4: 登革热病毒; 5: 乙脑病毒。

Note: M: Marker; 1: Negative; 2–3: Yellow fever virus; 4: Dengue virus; 5: Japanese encephalitis virus.

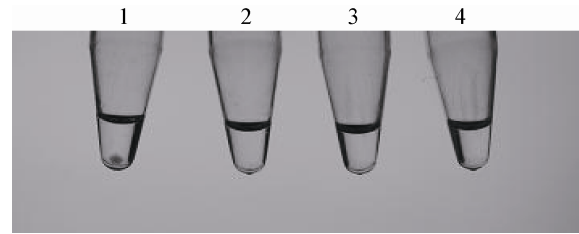


图 3 RT-LAMP 沉淀试验

Figure 3 The RT-LAMP precipitation test

注: 1: 黄热病毒; 2: 登革热病毒; 3: 乙脑病毒; 4: 阴性对照。

Note: 1: Yellow fever virus; 2: Dengue virus; 3: Japanese encephalitis virus; 4: Negative.

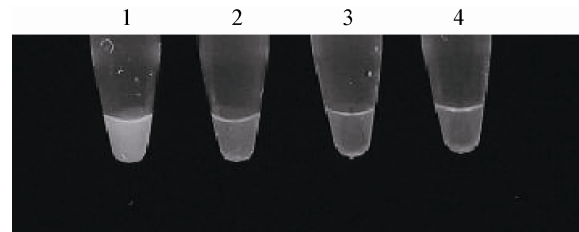


图 4 RT-LAMP 产物荧光检测

Figure 4 The RT-LAMP products detection with fluorescence

注: 1: 黄热病毒; 2: 登革热病毒; 3: 乙脑病毒; 4: 阴性对照。

Note: 1: Yellow fever virus; 2: Dengue virus; 3: Japanese encephalitis virus; 4: Negative.

## 2.4 重复性试验结果

根据实时荧光 RT-LAMP 的结果, 记录各次试验的  $C_t$  值。根据  $C_t$  值计算 SD 值及变异系数 (CV, %), 见表 2。结果表明强阳性及临界值样本的 CV 值均小于 5%, 重复性良好。

## 2.5 模拟样品及临床样本检测结果

模拟样品结果与预期相符, 检测为阳性; 23 例发热病人血清样本反应结果  $6\ 000 \text{ r/min}$  离心 3 min 未见沉淀, 加入荧光染料 SYBR Green I 紫外灯下没有绿色荧光产生, 产物电泳没有出现特异的阶梯状条带, 黄热病毒检测结果为阴性。

## 2.6 RT-LAMP 反应产物测序分析

将胶回收产物两条引物检测的共有序列在 GenBank 中进行比对, BLAST 分析序列与黄热病毒 E 基因片段相吻合, 结果见图 7。

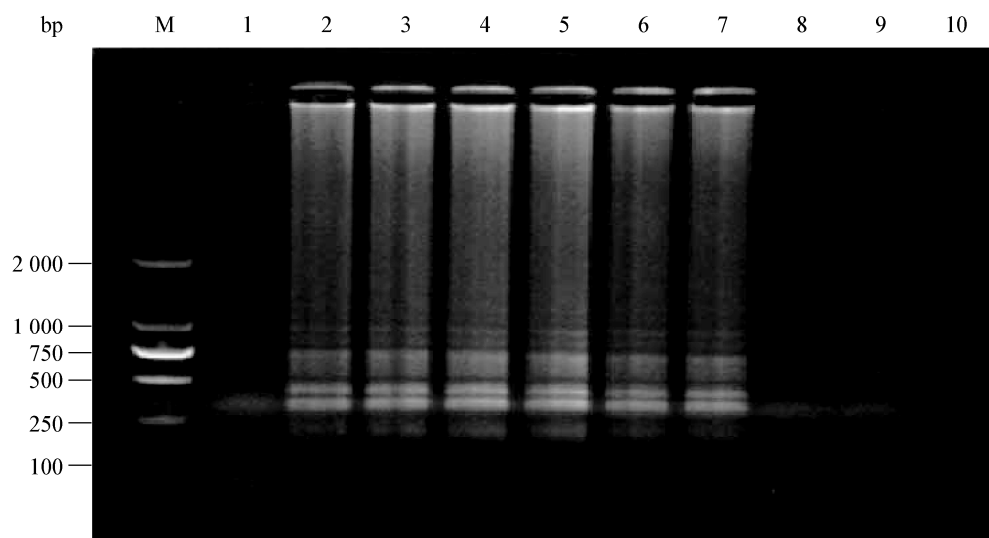


图5 黄热病毒 RT-LAMP 检测灵敏度试验

Figure 5 The sensitivity of RT-LAMP for Yellow fever virus

注：1：Marker；2：阴性对照；3-10 分别为 6.600 ng，0.660 ng，0.066 ng，6.600 pg，0.660 pg，0.066 pg，6.600 fg，0.660 fg，0.066 fg 的 RT-LAMP 反应产物。

Note: 1: Marker; 2: Negative; 3-10 were the RT-LAMP production of Yellow fever virus with the RNA concentration of 6.600 ng, 0.660 ng, 0.066 ng, 6.600 pg, 0.660 pg, 0.066 pg, 6.600 fg, 0.660 fg, 0.066 fg, respectively.

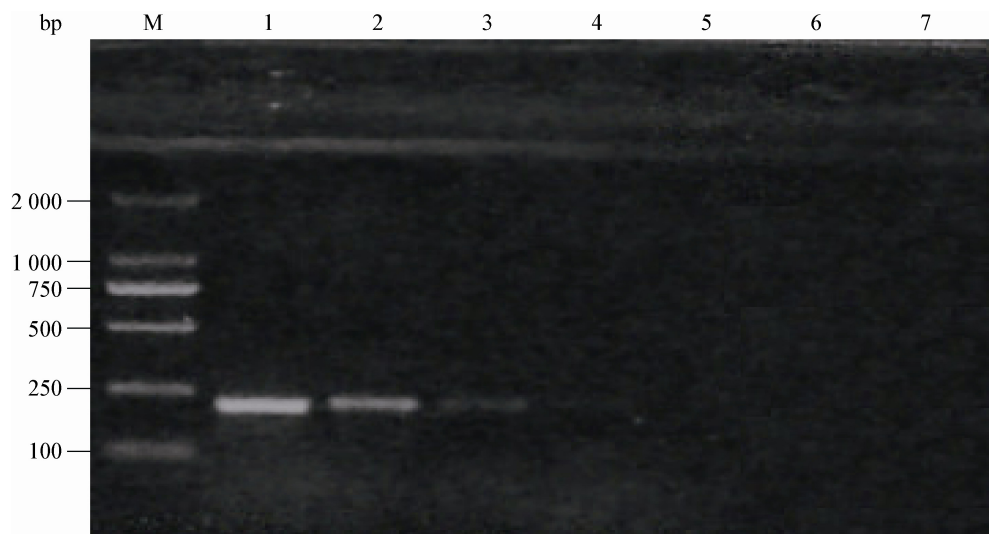


图6 黄热病毒 RT-PCR 检测灵敏度试验

Figure 6 The sensitivity of RT-PCR for Yellow fever virus

注：1：Marker；2-10 分别为 6.600 ng，0.660 ng，0.066 ng，6.600 pg，0.660 pg，0.066 pg，6.600 fg，0.660 fg，0.066 fg 的 RT-PCR 反应产物。

Note: 1: Marker; 2-10 were the RT-LAMP production of Yellow fever virus with the RNA concentration of 6.600 ng, 0.660 ng, 0.066 ng, 6.600 pg, 0.660 pg, 0.066 pg, 6.600 fg, 0.660 fg, 0.066 fg, respectively.

表 2 黄热病毒 RT-LAMP 检测重复性试验结果 Table 2 The repeatability test results of YFV RT-LAMP									
样本 Sample	C <sub>t</sub> 值 1 C <sub>t</sub> value 1	C <sub>t</sub> 值 2 C <sub>t</sub> value 2	C <sub>t</sub> 值 3 C <sub>t</sub> value 3	C <sub>t</sub> 值 4 C <sub>t</sub> value 4	C <sub>t</sub> 值 5 C <sub>t</sub> value 5	C <sub>t</sub> 值 平均值 Average value	标准差 s	批内变异系数 CV (Intra-assay) (%)	批间变异系数 CV (Inter-assay) (%)
强阳性样本 Positive samples	14.72	14.66	14.77	14.58	14.57	14.66	0.086 9	0.590	0.58
	14.58	14.52	14.64	14.43	14.54	14.54	0.077 6	0.530	
	14.26	14.50	14.43	14.47	14.44	14.42	0.093 5	0.650	
临界阳性样本 Cut-off samples	21.74	21.72	21.70	21.74	21.73	21.70	0.016 7	0.077	1.69
	21.51	21.46	21.49	21.47	21.56	21.50	0.039 6	0.180	
	21.15	20.96	20.89	21.11	21.00	21.00	0.107 0	0.510	
阴性样本 Negative samples	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	

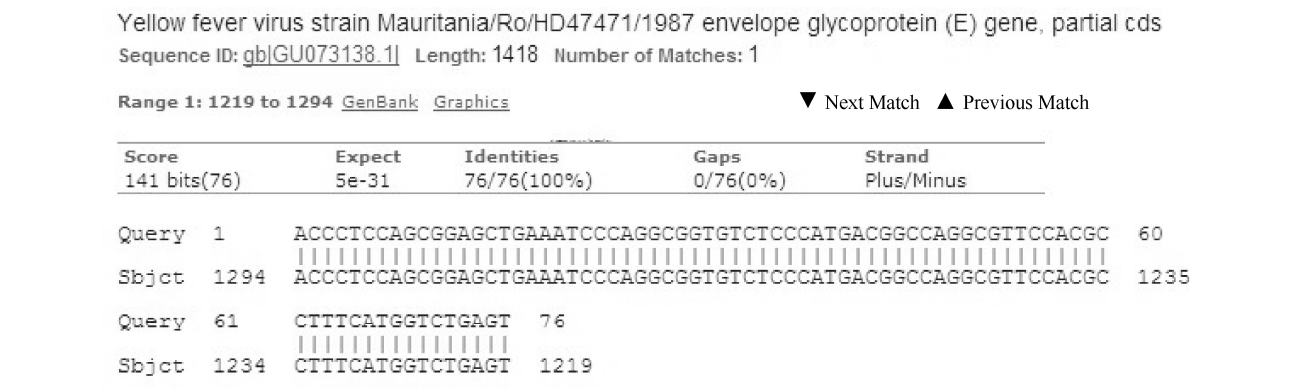


图 7 RT-LAMP 产物测序分析结果  
Figure 7 The sequencing result of RT-LAMP product

3 讨论

黄热病毒是首个被发现的感染人类的“滤过性颗粒”，也是第一个被证实是由蚊类媒介传播的疾病<sup>[4]</sup>。根据 WHO 的材料估计，全球每年大概可出现 20 万病例，其中死亡病例约 3 万人<sup>[5-6]</sup>。迄今为止，我国尚未有黄热病病例报道，我国东南沿海、西南等地存在着该病的传播媒介，一旦出现输入性病例，即有潜在的暴发风险。建立黄热病毒等温扩增快速检测方法为黄热病的监测提供了一种重要的检测手段。

现行的黄热疫苗(17D 株)是早在 1930 年研发成功的减毒活疫苗，目前国内使用的天坛生物生产的 YFV17DTiantan 与野生毒株 Asibi 的基因序列相比，相似性达到 99.3%<sup>[7]</sup>，其中 E 基因编码的 E 蛋白是黄热病毒重要的抗原蛋白<sup>[8]</sup>，本研究选择该基因中保守序列作为目的基因设计引物。由于黄热病毒与登革热病毒及乙脑病毒同属虫媒病毒黄病毒科黄病毒属，本研究将 3 种病毒同时检测，根据沉淀反应、产物电泳以及荧光检测结果表明，仅黄热

病毒可产生特异性反应,作为快速核酸检测方法的一种,PCR法是目前应用最为广泛,其仪器成本只有荧光定量PCR仪的十几分之一,因此本研究将灵敏度与普通PCR法进行比较,在灵敏度试验中发现RT-LAMP相比RT-PCR高出2个数量级左右;经上述试验证实LAMP技术检测黄热病毒具有良好的特异性和较高的灵敏度。国内LAMP产物的验证目前大多采用酶切手段,本研究为了验证扩增产物序列,将RT-LAMP的电泳产物直接进行割胶回收<sup>[9]</sup>,结果与目的片段序列一致,证明等温扩增的有效性。同时由于等温扩增的灵敏度非常高,在检测过程需要严格分区进行实验,防止污染。

根据WHO文件及卫生部印发的《6种输入性传染病预防控制指南和临床诊疗方案》,黄热病实验室诊断主要有血清学检测、核酸检测以及病毒分离。血清学检测灵敏度和特异性不如核酸检测高,病毒分离对环境要求高、周期长且影响因素多,不适宜在基层实验室开展。核酸检测主要有PT-PCR及Real-time RT-PCR<sup>[10-12]</sup>。与PCR方法相比,本研究中RT-LAMP的灵敏度比RT-PCR灵敏度高100倍左右,该方法由于操作简便,与其他核酸检测方法相比不需要特殊的仪器设备,可作为设备条件相对简陋的基层单位进行检测的方法。LAMP技术目前在国内得到广泛的研究与推广,本研究建立黄热病毒的快速等温扩增检测方法,为口岸卫生检疫做好技术储备,一旦发现疑似输入病例,可及

时进行检测,控制传染源,防止疾病的传入造成严重的公共卫生事件。

## 参考文献

- [1] 侯云德. 分子病毒学[M]. 北京: 北京学苑出版社, 1990, 447.
- [2] WHO. Report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases[J]. WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1.
- [3] Notom T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acid Research, 2000, 28(12): 63.
- [4] 侯爵, 刘颖, 邵一鸣. 黄热病毒基因组及其蛋白研究进展[J]. 病毒学报, 2011, 27(4): 388-394.
- [5] WHO. 2009年世界卫生统计[EB/OL]. [http://www.who.int/whosis/whostat/ZH\\_WHS09\\_Full.pdf](http://www.who.int/whosis/whostat/ZH_WHS09_Full.pdf).
- [6] WHO. 2010年世界卫生统计[EB/OL]. [http://www.who.int/whosis/whostat/ZH\\_WHS10\\_Full.pdf](http://www.who.int/whosis/whostat/ZH_WHS10_Full.pdf).
- [7] 李静, 俞永新, 董关木, 等. 中国黄热疫苗减毒株和世界卫生组织黄热疫苗标准株基因全序列分析[J]. 中国疫苗与免疫, 2009, 15(2): 145-151.
- [8] Bonaldo MC, Garratt RC, Marchevsky RS, et al. Attenuation of recombinant yellow fever 17D viruses expressing foreign protein epitopes at the surface[J]. Journal of Virology, 2005, 79(13): 8602-8613.
- [9] 周辰瑜, 谢芝勋, 宋扬, 等. H6亚型禽流感病毒RT-LAMP检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2011, 38(12): 1855-1861.
- [10] 彭文明, 邓永强, 于曼, 等. 黄热病毒的一步RT-PCR法检测[J]. 微生物学杂志, 2003, 23(4): 8-10.
- [11] 师永霞, 郑夔, 李小波, 等. 黄热病病毒的实时荧光RT-PCR检测方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(5): 1003-1006.
- [12] Weidmann M, Faye O, Faye O, et al. Improved LNA probebased assay for the detection of African and South American yellow fever virus strains[J]. Journal of Clinical Virology, 2010, 48(3): 187-192.