

现代生物技术前沿

彭涛 主编

核酸等温扩增技术 及其应用



科学出版社

www.sciencep.com

现代生物技术前沿

核酸等温扩增技术及其应用

彭 涛 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

近年来核酸等温扩增技术迅猛发展,显现出广阔的应用前景。本书分为10章,第1章介绍核酸等温扩增技术的定义、特点与分类,并对该技术的发展概况进行了论述。第2~9章分别介绍了各种方法的原理、操作要点及应用范围,帮助读者了解各种方法的特点,并可进行基本操作。第10章概述了相关企业及产品,分析了产业化发展前景及对策。

本书既有原理又有实验方法,适合从事分子生物学、临床医学、药学、环境科学等学科的科研工作者学习使用。

图书在版编目(CIP)数据

核酸等温扩增技术及其应用/彭涛主编.—北京:科学出版社,2009

(现代生物技术前沿)

ISBN 978-7-03-024693-6

I.核… II.彭… III.核酸-等温-研究 IV.Q52

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 090717 号

责任编辑:李 晓 王 静 席 慧/责任校对:赵桂芬

责任印制:钱玉芬/封面设计:陈 敬

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双 青 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009年6月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2009年6月第一次印刷 印张:7

印数:1—2 000 字数:126 000

定 价:38.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(科印))

编者名单

主 编：彭 涛

副主编：朱钦昌

参编人员：（按姓氏笔画排序）

王玉涛 龙 飞 石 磊 关文达

朱钦昌 高文娟 莫自耀 秦 笙

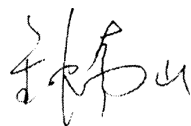
彭 涛 廖东江

序

一直以来，病原微生物的体外培养是病原体诊断的“金标准”。据微生物学家的估计，采用目前的培养技术，仅有约 1% 的细菌可以培养。在过去的一个世纪里，以聚合酶链反应（PCR）为代表的基于核酸的检测技术发展迅速，为其他病原体的精确检测诊断提供了可能。毋庸置疑，Kary Mullis 发明的 PCR 技术是 20 世纪 80 年代分子生物学领域的一项革命性突破。也许他本人当时也没有想到，PCR 技术会在分子生物学、医学、法学等领域发挥如此重要的作用。经过几十年的改进，PCR 方法已从定性发展为定量，能够在几个小时内，从几个拷贝或单个细胞开始扩增到数十亿特异性的核酸片段，而且特异性也有了极大的提高。然而，从 PCR 技术的诞生之日起，它始终无法摆脱依赖精良仪器设备的局限，使得以 PCR 为基础的核酸扩增检测技术无法更广泛地推广和应用。

基于这种强烈的需求，以核酸等温扩增技术为基础的检测技术近年来得到了迅猛的发展。多种机制的等温技术不仅诞生，而且有些技术已经相当成熟，完成了从实验室到实际应用的过渡，正逐步在分子生物学、医学、法学等领域得到广泛运用。特别是在临床和现场（point-of-care）快速诊断技术方面，核酸等温扩增技术显示了其突出的优越性。更为重要的是，核酸等温扩增技术由于不需要温度变化的时间过程且摆脱了对精良仪器设备的依赖，使得我们对病原体的检测诊断得以快速并高通量的实现。

《核酸等温扩增技术及其应用》对当今主要的等温核酸扩增技术进行了总结，对这些技术的特点、原理及基本操作进行了简明的描述，同时也对各种方法的应用进行了概括。相信该书的出版发行将有助于该类技术的普及，推动核酸等温扩增技术的创新和发展。



钟南山

中国工程院院士

2008 年 12 月

前 言

在诊断试剂产业中，核酸扩增技术的迅猛发展使分子诊断成为最具发展潜力的领域。尽管 PCR 技术长期占据着核酸扩增技术的垄断地位，但新近研发的一系列等温（isothermal）核酸扩增技术正逐渐成为 PCR 技术的替代方法而被广泛应用。无论是在实际操作还是仪器要求方面，这些等温技术都比 PCR 技术更简单和廉价，从而更容易被开发成诊疗现场的应用产品。其具有应用范围广，诊断成功率高的特点，具有更广阔的市场潜力。

在这些核酸等温扩增技术中，有一些已经相当成熟，占据了分子诊断市场的较大份额。美国 Becton Dickinson 公司以链替代扩增（strand displacement amplification, SDA）为主导技术开发的 ProbeTec 系统，是为大量标本的检测而专门设计的，具有高通量快速检测传染病原体的能力，被广泛地应用于大型医院和检验中心。另一个被商业化的等温扩增技术是由美国 Third Wave Technologies Inc. 开发的 Invader 技术，该技术可以应用于飞行质谱、荧光检测等多种检测形式。基于 Invader 技术，目前已经有将近 40 种商业化的试剂盒，检测范围包括基因型检测、病原体检测等多个方面。

在我国，目前很多高校、科研院所和出入境检验检疫局等卫生检验检疫相关单位都在积极开展核酸等温扩增技术的研究和应用，研究较多的是 LAMP 和 NASBA 技术；国内很多公司已经用该类技术研制开发出核酸等温扩增检测试剂盒，如检测大肠杆菌的 LAMP 试剂盒、检测禽流感的 NASBA 试剂盒等。其中“禽流感病毒 NASBA 检测方法”的国家标准已经制定和颁布（GB/T 19440—2004）。

本书是一本入门书，它系统地总结了国内外核酸等温扩增技术的最新进展，详细地介绍了各种核酸等温扩增技术的原理及其应用；同时，本书根据实际需求，较详细地描述了每种方法的实际操作步骤，所以，也可以作为实验人员的操作手册。

本书在编写过程中，得到了科学出版社的大力支持，同时极大地受益于哥伦比亚大学的陈敬贤教授、广州市儿童医院检验中心周荣博士的建议。中国科技大学的王晟同学、湖南师范大学的姜含芳同学积极参与了本书的编纂工作。在此，我们一并表示衷心的感谢。

彭 涛

2008 年 12 月

目 录

序

前言

1 概述	1
1.1 核酸等温扩增技术的定义及特点	1
1.2 核酸等温扩增技术的分类	2
2 环介导的核酸等温扩增技术	4
2.1 LAMP 概述	4
2.2 LAMP 技术原理	4
2.3 LAMP 操作程序与技术要点	8
2.4 LAMP 技术特点	11
2.5 LAMP 技术的发展	12
2.6 LAMP 技术的应用	14
参考文献	19
3 自主序列复制与依赖于核酸序列的扩增	22
3.1 3SR 与 NASBA 概述	22
3.2 NASBA 技术原理	23
3.3 NASBA 操作程序与技术要点	25
3.4 NASBA 技术特点	27
3.5 NASBA 技术的发展	28
3.6 NASBA 的应用	29
参考文献	32
4 滚环扩增技术	35
4.1 RCA 概述	35
4.2 RCA 技术原理	35
4.3 RCA 操作程序与技术要点	39
4.4 RCA 技术特点	41
4.5 RCA 技术的发展与应用	42
参考文献	44
5 单引物等温扩增	47
5.1 SPIA 概述	47

5.2	SPIA 技术原理	47
5.3	SPIA 操作程序与技术要点	52
5.4	SPIA 技术特点	54
5.5	SPIA 技术的发展与应用	55
	参考文献	57
6	依赖解旋酶的等温扩增技术	58
6.1	HDA 概述	58
6.2	HDA 反应原理	58
6.3	HDA 操作程序与技术要点	60
6.4	HDA 技术特点	62
6.5	HDA 技术的发展	63
6.6	HDA 技术的应用	65
	参考文献	65
7	链替代扩增	67
7.1	SDA 概述	67
7.2	SDA 反应原理	67
7.3	SDA 操作程序与技术要点	69
7.4	SDA 技术特点	70
7.5	SDA 技术的发展与应用	71
	参考文献	73
8	快速等温检测放大技术	76
8.1	RIDA 概述	76
8.2	RIDA 原理	76
8.3	RIDA 操作程序和技术要点	78
8.4	RIDA 技术特点	82
8.5	RIDA 技术的发展和和应用	83
	参考文献	85
9	切刻内切酶核酸恒温扩增	86
9.1	NEMA 概述	86
9.2	NEMA 原理	86
9.3	NEMA 操作程序与技术要点	90
9.4	NEMA 技术特点	93
9.5	NEMA 的应用	95
	参考文献	96

10	核酸等温扩增技术产业化发展前景及对策分析	97
10.1	核酸等温扩增技术的产业化优势	97
10.2	核酸等温扩增技术产业化存在的问题	99
10.3	促进我国核酸等温扩增技术产业化的对策.....	100

1 概 述

彭 涛

1.1 核酸等温扩增技术的定义及特点

核酸等温扩增技术 (isothermal nucleic acid amplification technology) 是指一类分子生物学技术的总称, 它们能在某一特定的温度下, 扩大特定 DNA 或 RNA 片段的拷贝数。

核酸等温扩增技术属于核酸扩增技术 (nucleic acid amplification technology, NAAT) 范畴。在过去的 20 年里, 核酸扩增技术作为分子生物学的核心得到了迅猛的发展和应用。特别是在疾病的临床诊断中, 核酸扩增技术以其快速、灵敏和特异的优点, 不仅日益取代了传统的诊断方法, 而且使以往无法完成的诊断成为了可能。以微生物病原体的诊断为代表, 许多针对特异病原体的检测方法已经开发为试剂盒并进入常规检测, 取代了诸如乳胶凝集、病原体体外培养等传统的微生物学方法。表 1.1 以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的检测为例, 比较了传统培养的体外培养与核酸扩增的诊断过程和时间。

表 1.1 基于微生物培养的和基于核酸扩增的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 临床检测的过程和时间比较

时间	基于培养的 MRSA 检测	基于核酸扩增的 MRSA 检测
第 0 天	从患者取样, 接种于富集培养基 孵育培养	从患者取样, 接种于富集培养基 孵育培养
第 1 天	从孵育培养基接种到选择性培养板 孵育培养	核酸提取, 扩增检测 报告结果
第 2 天	观察在选择性培养板上的生长 继续孵育培养	
第 3 天	开始确认实验, 如完成金黄色葡萄球菌乳胶实验 报告结果	
第 4 天	准备其他基于培养的确证实验, 如抗生素药敏试验 基于培养的确证实验的继续培养 报告结果	

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是核酸扩增技术的典型代表。该技术是由美国 PE-Cetus 公司人类遗传研究室的 Mullis 等于 1985 年发明的, 它以线性 DNA 为模板进行复制反应。PCR 反应通常在温度循环器 (thermocycler) 中进行, 该装置可为 PCR 反应提供所需的高温、低温和中温环境。每次三个阶段构成一个循环。PCR 反应每经过一个循环, 目标基因的数目就扩增 1 倍。这样, 在经过 N 次循环后, 一个目标基因分子就可能被扩增到 2^N 个。

由于 PCR 温度循环依赖性的特点, 核酸扩增技术分为两大类: 以 PCR 为代表的核酸非等温扩增技术, 以及本书着重介绍的核酸等温扩增技术。

与 PCR 技术相比, 核酸等温扩增技术的特点是在特定温度条件下实现核酸的扩增。由于扩增反应的全过程均在同一温度下进行, 使它们对仪器的要求大大简化, 反应时间大大缩短, 可通过加热模块、水浴槽等简单的, 甚至是非专业的设备完成反应。因而, 更能满足现代分子检测技术“快速简便”的需求, 具有较大的实际应用价值。

1.2 核酸等温扩增技术的分类

在近几年里, 产生了一系列新型的核酸等温扩增技术。这些技术或者基于 DNA/RNA 生物合成机制研究的新发现, 或者利用具有特殊功能的核酸酶。在本书中, 我们将着重介绍其中较为成熟的环介导的核酸等温扩增技术 (LAMP)、依赖于核酸序列的扩增技术 (NASBA)、滚环扩增技术 (RCA)、单引物等温扩增技术 (SPIA)、依赖于解旋酶的等温扩增技术 (HDA)、链替代扩增技术 (SDA)、自主序列复制系统 (3SR), 同时, 我们也将介绍快速等温检测放大技术 (RIDA) 和切刻内切酶核酸恒温扩增技术 (NEMA) 这两个较为新型的技术。

核酸扩增检测方法有两种基本分类方式。以扩增的目标不同可分为“目标扩增” (target amplification) 和“信号放大” (singal amplification); 以扩增对象的类别不同可分为“DNA 扩增”和“RNA 扩增”。如表 1.2 所示, 目前的核酸等温扩增技术主要以“目标扩增”为主, 但在本书也介绍了 RCA 和 RIDA 所属的“信号放大”技术。同样, 核酸等温扩增技术以“DNA 扩增”为主, 而 NASBA、3SR 为“RNA 扩增”。值得注意的是, RIDA 技术同时适用于“DNA 扩增”和“RNA 扩增”。

表 1.2 核酸等温扩增技术分类表

	LAMP	NASBA (3SR)	RCA	SPIA	HDA	SDA	RIDA	NEMA
目标放大	✓	✓		✓	✓	✓		✓
信号放大			✓				✓	
DNA 扩增	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
RNA 扩增		✓					✓	

“目标放大”技术通过增加目标序列的拷贝数实现检测的目的，而“信号放大”技术通过检测到目标序列后对获得的信号进行放大实现检测目的。因此，在实际应用中，两类技术可以通过相互结合，实现“目标”与“信号”的双重放大，从而进一步提高检测的速度和灵敏度。例如，研究证明，将 NASBA 技术与 RIDA 技术在等温条件下结合，可以在 10min 内检测到几个拷贝的目标序列。

2 环介导的核酸等温扩增技术

朱钦昌

2.1 LAMP 概述

环介导的等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是 2000 年由日本研究人员 Notomi 等^[1]发明的一种新型的体外等温扩增特异核酸片段的技术。该技术主要是利用两对特殊设计的引物和具有链置换活性的 DNA 聚合酶,使反应中在模板两端引物结合处循环出现环状单链结构,从而保证引物可以在等温条件下顺利与模板结合并进行链置换扩增反应。该技术克服了传统 PCR 反应需要通过反复的热变性过程获得单链模板的缺点,并避免了反复升降温的耗时过程,实现了恒温条件下的连续快速扩增,具有更高的灵敏度和扩增效率。同时,因为两对引物针对靶基因的 6 个区域,这使 LAMP 具有极高的扩增特异性。该技术可以在 15~60min 内扩增出 $10^9 \sim 10^{10}$ 倍靶序列拷贝,得到高达 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DNA。LAMP 的扩增产物是由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。产物可以通过常规的荧光定量和电泳检测,也可以通过简易直观的荧光目测比色和焦磷酸镁浊度检测。若在反应体系中加入逆转录酶,LAMP 还可以实现对 RNA 模板的扩增(即 RT-LAMP)。LAMP 技术是一种崭新的核酸扩增方法,具有简单、快速、特异性强的特点。目前,LAMP 已在临床病原微生物检测、遗传病诊断、SNP 分型、传染病监测和转基因食品鉴定等领域显示出了巨大的应用潜力并正得到日益广泛的应用。

2.2 LAMP 技术原理

2.2.1 原理核心

LAMP 的技术核心是针对靶基因 6 个区域的 4 条特殊引物的设计和具有链置换活性的 *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) DNA 聚合酶的应用。*Bst* DNA 聚合酶最适温度是 60~65 $^{\circ}\text{C}$ 。在此恒温条件下,利用可以产生环状结构的引物和 *Bst* DNA 聚合酶链置换合成的活性,在靶序列两端引物结合处循环不断地产生环状单链结构,使得引物在等温条件下引发新链合成,从而使靶基因高效

扩增。

结构基础 LAMP 反应中的 4 条引物及其对应的 6 个区域的结构如图 2.1 所示, F2 区和 B2c 区是位于靶序列两端的特异序列, F1 区和 B1c 区为分别位于 F2 区和 B2c 区内侧的特异序列, F3 区和 B3c 区为分别位于 F2 和 B2c 外侧的特异序列。4 条引物可以分成一对内部引物和一对外部引物, 内部引物包括上游内部引物 (forward inner primer, FIP) 和下游内部引物 (backward inner primer, BIP)。FIP 包含 F1c 序列和与 F2c 互补的 F2 序列, 这两个序列间直接相连, 即 $5'-F1c-F2-3'$; BIP 包含 B1c (B1 区域互补序列) 和 B2 序列, 两段序列直接相连, 即 $5'-B1c-B2-3'$ 。外部引物为分别与 F3c 和 B3c 互补的 F3 和 B3 序列。

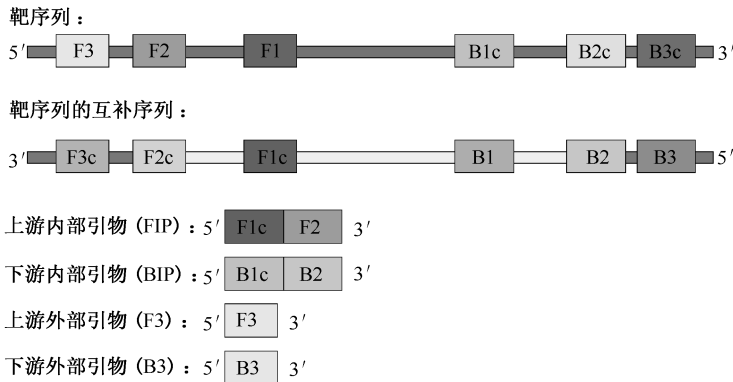


图 2.1 LAMP 引物结构图

LAMP 的扩增过程可分为三个阶段: 循环模板合成阶段、循环扩增阶段和伸长再循环阶段^[1]。在循环模板合成阶段, 内引物 FIP 因为 T_m 值和浓度都大于外部引物 F3, 所以 FIP 的 F2 序列先于 F3 结合到模板 DNA 的 F2c 上引导合成互补的 DNA 链 (图 2.2, 结构 1)。外引物 F3 进而结合到模板 DNA 的 F3c 上 (图 2.2, 结构 2), 引导合成模板 DNA 的互补链 (图 2.2, 结构 3), 并通过置换反应, 释放出由 FIP 引导合成的互补链 (图 2.2, 结构 4)。被释放出的互补链 5' 端的 F1c 和 F1 发生自我碱基配对形成一个环状结构, 同时引物 BIP 结合到其 3' 端, 引导合成该链的互补链, 并把 5' 端的环状结构打开, 以类似于 F3 的方式, 外引物 B3 接着从 BIP 引物外侧结合到 B3c 上引导合成该链的互补链, 同时置换出由 BIP 引导合成的互补链 (图 2.2, 结构 4、5)。被置换出的互补链两端分别带有 B1c-B2-B1 和 F1-F2c-F1c 互补结构, 自然发生碱基配对, 形成一条两端环状的哑铃式单链结构 (图 2.2, 结构 6)。该结构是 LAMP 法基因扩增循环的起始结构, 是后续循环扩增反应的模板。

在循环扩增阶段, 哑铃式的单链 DNA 结构通过自我引导延伸反应迅速生成

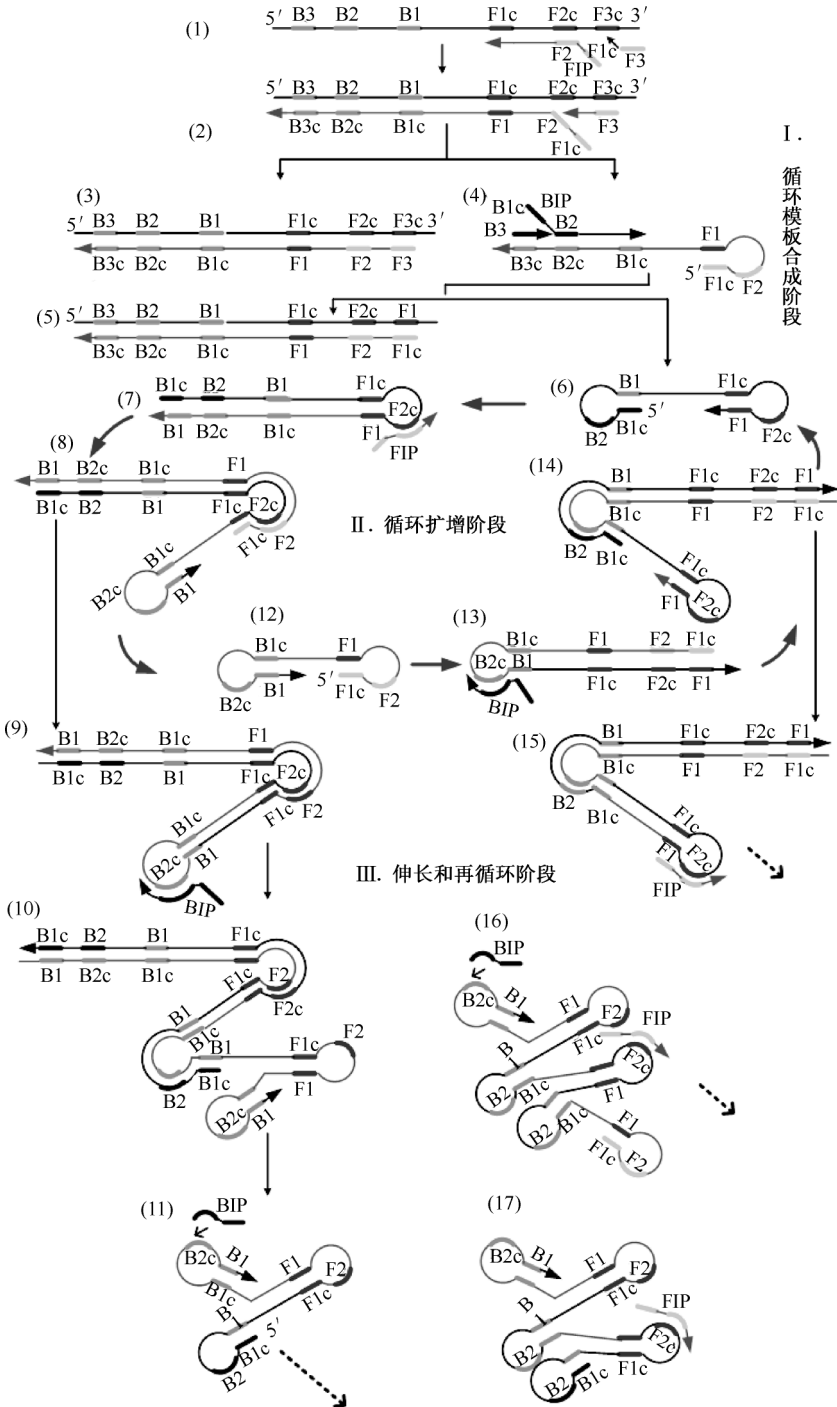


图 2.2 LAMP 扩增原理

双链茎环结构,引物 FIP 结合到茎环结构的环状结构上(图 2.2,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。被置换出的单链 3'端 5'-B1c-B2c-B1 结构自动环化,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(图 2.2,结构 8)。随后通过自我引导的链置换反应,合成一条填补好缺口、含有反向重复靶序列的茎环 DNA(图 2.2,结构 9),并释放出一个与结构 6 互补的 DNA 链(图 2.2,结构 12)。结构 12 在内引物作用下通过类似结构 6 经历的反应(图 2.2,结构 13、14),产生一个与结构 6 一样的 DNA 链和一个与结构 9 互补的 DNA 链(图 2.2,结构 15),从而在结构 6 和结构 12 之间建立了循环反应。结构 9 和结构 15 可为伸长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 2.2,结构 9~11),最后的扩增产物是一系列大小不一的由反向重复的靶序列构成的茎环结构和多环花椰菜结构的 DNA 片段混合物(图 2.2,结构 16、17)。

2.2.2 RT-LAMP

逆转录 LAMP (RT-LAMP)是在 LAMP 基础上建立起来的可实现对特异 RNA 分子快速等温扩增的技术^[1,2]。其扩增原理与 LAMP 相同,只是在反应体系中增加了逆转录试剂(逆转录酶),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。RT-LAMP 扩增的灵敏度比常规的 RT-PCR 检测高 10 倍^[3]。

2.2.3 产物检测原理

LAMP 产物是一系列大小不一的 DNA 片段混合物,其检测可以分为常规核酸检测和直观检测。

1) 常规核酸检测

(1) 电泳分析:常规电泳后用 EB 或 SYBR Green I 染色,在凝胶上出现的是从点样孔开始由大小不同的区带组成的连续阶梯式图谱。

(2) 荧光定量检测:利用荧光染料(如 SYBR Green I)与 DNA 双链结合时,发出较原先强 800~1000 倍的荧光的原理,在反应体系内加入 SYBR Green I,随着合成 DNA 量的增加,荧光信号强度也相应增加。通过荧光检测仪实时检测荧光强度,并与标准模板的扩增比较,可以实现扩增的实时定量检测。

2) 直观检测

(1) 副产物——焦磷酸镁浊度检测:在 DNA 大量合成时,从 dNTP 析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg^{2+} 结合,产生副产物——焦磷酸镁白色沉淀,出现肉眼可见的混浊。其浊度的大小与 DNA 的含量呈正比,且具有极高的特异

性,因此只要用肉眼观察其混浊情况,就能够判断是否发生 DNA 扩增。也可用仪器(如分光光度计)检测其 400nm 光吸收,实现实时定量检测^[4,5]。

(2) 荧光目测比色:目前包括三种方法,第一种是直接在 LAMP 反应体系内加入荧光增补染料,如 SYBR Green I,如果存在扩增产物,肉眼可以观察到溶液变绿色,如无扩增,溶液则为橙色,从而直接判断是否发生扩增反应^[6];第二种是在 LAMP 反应体系中加入靶向扩增产物环状结构的荧光标记探针(如 FITC 或 ROX 标记),反应完成后再加入低分子质量的阳离子多聚物聚乙烯亚胺(PEI),利用 PEI 可以沉淀 DNA 的原理,经短暂低速离心后,在常规紫外灯照射下(365nm),PEI-DNA 复合物沉淀出现肉眼可见的标记荧光,从而判断发生了目标序列的扩增^[7];第三种是在 LAMP 反应体系中加入预先混合的钙黄素和锰离子,在反应开始前锰离子与钙黄素结合,起猝灭钙黄素的作用。扩增反应产生的焦磷酸根离子可以跟锰离子结合,并把锰离子从钙黄素上释放下来,从而使钙黄素恢复荧光。同时体系中的 Mg^{2+} 与钙黄素结合,进一步加强钙黄素的荧光。在紫外灯的照射下,发生 DNA 扩增反应的管可以明显看到钙黄素发出的蓝绿色荧光^[8]。

2.3 LAMP 操作程序与技术要点

运用 LAMP 或 RT-LAMP 技术进行核酸检测的基本步骤可分为靶序列选择与引物设计、模板制备、反应条件确定和产物检测 4 部分。

2.3.1 靶序列选择与引物设计

靶序列一般为特异基因上的保守序列,靶序列的长度不宜过长,超过 500bp 的靶序列会明显降低 LAMP 扩增的效率,最佳的靶序列长度为 120~180bp。引物设计是个相对复杂的过程,也是 LAMP 技术的核心。日本荣研化学株式会社已开发出专门用于设计 LAMP 引物的软件 Primer Explorer,并提供在线服务(<http://primerexplorer.jp/e/>)。经典 LAMP 反应的 4 个引物(F3、FIP、BIP 和 B3)以及其对应的 6 个区域的结构见图 2.1。后来发展的环引物的结构见图 2.3,环引物 F(loop F)和 B(loop B)结合的区域分别位于 F1 和 F2 间的 FLP 以及 B1 和 B2 间的 BLP。引物设计时需要考虑的因素主要包括以下几点。

(1) 引物的大小及引物结合区之间的距离:引物区的大小由序列的 GC 含量决定,一般 F2、F1、B1c 和 B2c 区长度为 18~24nt,而 F3、B3c 区和环引物区 FLPC 及 BLPC 的长度为 17~21nt;F2 区和 B2 区决定产物的大小,所以从 F2 5'端到 B2 5'端的最佳距离为 120~180bp。F2 到 F3 或 B2 到 B3 的距离为 0~20bp。F2 5'端到 F1 5'端(或 B2 5'端到 B1 5'端)的距离决定反应中所形成的环的大小,它们之间的最适距离是 40~60bp。

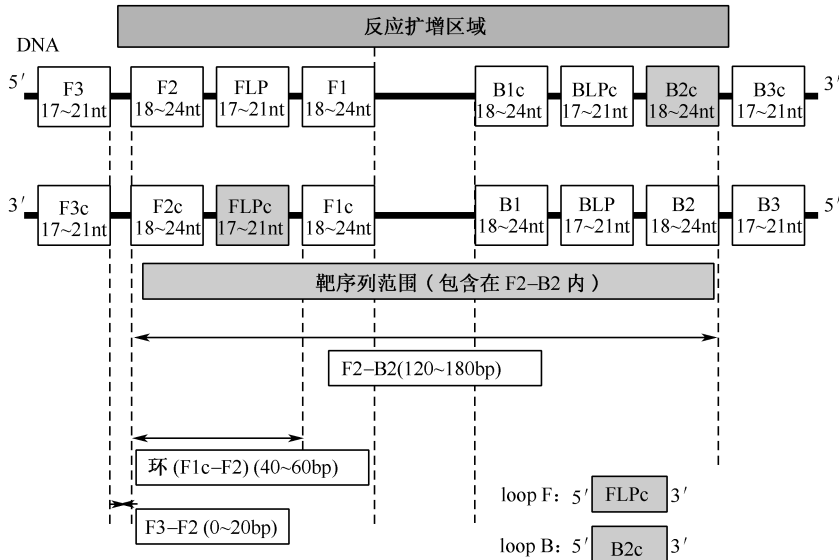


图 2.3 引物区域分布及大小图

(2) 引物区的 T_m 值：对于 GC 含量丰富的序列，引物区的 T_m 值控制在 $60\sim 65^\circ\text{C}$ ，而对于 AT 含量丰富的序列，引物区的 T_m 值则控制在 $55\sim 60^\circ\text{C}$ 。F1c 和 B1c 的 T_m 应比 F2 和 B2 的稍高，以利于在单链模板释放时立刻形成环状结构。

(3) 引物末端的稳定性：F1c (或 B1c) 的 5' 端和 F2、F3 (或 B2、B3) 的 3' 端 6 个碱基中 dG 的含量应小于 -4kcal/mol 。

(4) 引物 GC 含量：对于 GC 含量丰富的序列或一般序列，引物 GC 含量应在 $50\%\sim 60\%$ ，而对于 AT 含量丰富的序列，引物 GC 含量为 $40\%\sim 50\%$ 。

(5) 引物二级结构：引物的设计应避免容易出现二级结构，3' 端序列应避免高 AT 含量和与其他序列发生互补。

(6) 其他一些因素：如果靶序列在除引物区外带有限制酶酶切位点，这个酶切位点可以用于扩增产物的鉴定。

2.3.2 模板制备

一般情况下，需要先对样品进行 DNA 或 RNA 的抽提以制备反应模板。Enomoto 等^[13]直接用感染部位拭子样品进行疱疹病毒 DNA 检测，获得与 DNA 抽提样品同样的效果。而 Ihira 等^[16]直接用患者血清进行疱疹病毒 DNA 检测，也取得很好的效果，并且发现加入热变性 (96°C , 30s) 处理，可以大大提高血清检测的灵敏度。其他的检测是否需要核酸抽提，决定于具体的样品，需要通过实验确定。

2.3.3 反应条件确定

LAMP反应体系包含了引物、模板DNA、*Bst* DNA聚合酶、dNTP和反应缓冲液。RT-LAMP反应体系除了模板为RNA外，还需额外加入逆转录酶（如AMV）。通常的LAMP体系包括：20mmol/L Tris-HCl (pH8.8)、10mmol/L KCl、10mmol/L (NH₄)₂SO₄、8mmol/L MgSO₄、0.1% Tween20、0.8mol/L甜菜碱 (betaine)、1.4μmol/L dNTP、1.6μmol/L FIP、1.6μmol/L BIP、0.2μmol/L F3、0.2μmol/L B3、一定量的*Bst* DNA聚合酶和DNA模板。可选择性地使用环状引物 (0.8μmol/L loop F, 0.8μmol/L loop B)。反应体系中的酶用量和引物用量可进行优化调整，特别是内部引物的用量，但应保证外部引物的浓度在内部引物浓度的1/4~1/10。此外，引物的纯度也要注意，最好使用HPLC纯化的引物。LAMP反应程序是：将反应体系置于60~65℃保温30~60min，然后80℃，2min终止反应，进行产物检测。操作流程见图2.4。

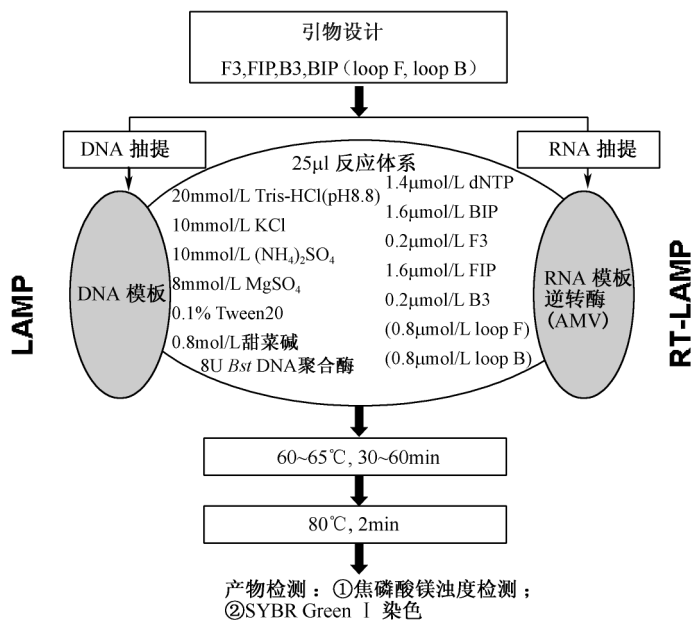


图 2.4 操作流程图

2.3.4 产物检测

LAMP产物检测方法包括琼脂糖电泳检测（图2.5 A，连续阶梯式图谱）、荧光定量检测（图略，出现S形曲线，同一般的实时定量PCR）、焦磷酸镁浊度检测和荧光目测比色法（见原理部分）。琼脂糖电泳检测和荧光定量检测是传统

的核酸检测方法，存在操作较为繁琐且仪器设备要求高、成本高的特点。焦磷酸镁浊度检测和荧光目测比色法是相对简便成本较低检测方法。焦磷酸镁浊度检测不需要加入其他试剂，可通过肉眼观察反应前后的混浊情况，判断是否扩增（图 2.5 B），也可以用分光光度计检测其 400nm 光吸收进行检测。日本 Teramecs 公司开发的专门用于 LAMP 产物检测的浊度实时检测仪 LA 系列（LA-100、LA-200）可以实现浊度的实时定量检测。最简便的荧光目测比色法是反应后在反应管内加入一定量的 SYBR Green I 染料，直接观察溶液颜色变化，如果变绿，表明存在扩增产物，如颜色保持橙色不变，表明没有扩增（图 2.5 C）。检测方法的选用应根据具体的目的和实际情况进行选择。直观检测方法简便快速，使 LAMP 技术从反应到检测可以在很短的时间内完成，特别适用于现场快速大量的检测。

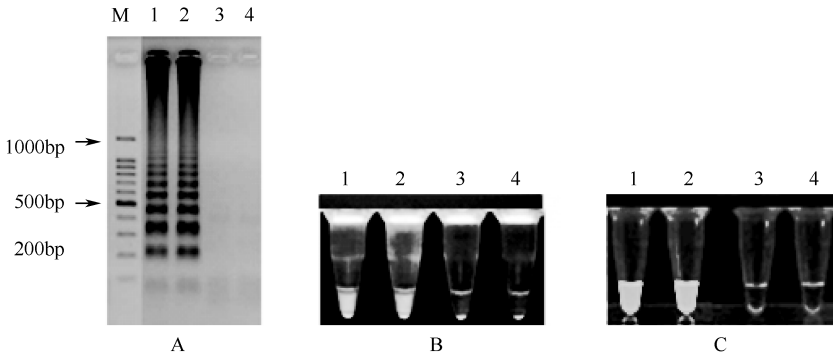


图 2.5 产物检测图

A. 琼脂糖电泳检测结果；B. 焦磷酸镁浊度检测结果；C. SYBR Green I 染料检测结果。

1、2 为阳性扩增，3、4 为阴性扩增

2.3.5 注意事项

进行 LAMP 反应的注意事项与 PCR 的相似：①注意防止污染，应把配制反应试剂的地方、添加模板的地方和产物检测的地方分开；②注意各种反应试剂的保存条件，一般反应试剂保存于 -20°C ，未稀释的引物保存于 -80°C ，模板 DNA 和引物应该溶于 TE 溶液中 ($\text{pH}8\sim 9$)。

2.4 LAMP 技术特点

2.4.1 LAMP 技术的优点

(1) 等温扩增：只需要一个恒定温度就能完成扩增反应，不需要像 PCR 那

样循环的温度变化。

(2) 快速高效：因没有反复变性复性等耗时过程，LAMP 体系从开始到结束都在不停地进行扩增反应，所以 LAMP 可以实现快速高效的扩增。整个扩增反应可以在 30~60min 内完成，扩增出 $10^9 \sim 10^{10}$ 倍靶序列拷贝，DNA 产量高达 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

(3) 特异性高：4 个引物靶向 6 个区域决定了 LAMP 的高特异性，其中 6 个独立的序列在扩增起始阶段决定靶序列的识别，而在后续的扩增反应中，则由 4 个独立的序列决定靶序列的识别。因此就算在非靶 DNA 共存的情况下，LAMP 的特异扩增也不受影响。

(4) 灵敏度高：LAMP 能检测到是 PCR 检测限 1/10 的拷贝数，扩增模板可达 10 拷贝或更少。对少至几个细胞的样品也能进行扩增反应。

(5) 产物检测方便：因为 LAMP 反应产生大量的产物，因此可以利用直观的焦磷酸镁浊度检测法或荧光目测比色法对扩增结果进行简便快速的检测。

(6) 设备简单：LAMP 等温扩增和产物直观检测的特点决定了其不需要复杂的设备，它只需一个简单的恒温器，不需要昂贵的 PCR 和检测设备，这对现场检测或基层应用极其有利。

2.4.2 LAMP 技术的缺点

(1) 不易区分非特异性扩增：LAMP 的结果判读只有扩增与不扩增两种，一旦发生非特异性扩增，不易区分。

(2) 无法用于长片段扩增：因为 LAMP 要求靶序列长度不能过长，为保证高效率的扩增，一般不超过 300bp，所以不宜用于长片段检测。

2.5 LAMP 技术的发展

自 LAMP 技术发明以来，该技术尚在不断的发展中，除了与逆转录酶组合实现对 RNA 模板的快速检测 (RT-LAMP) 外，目前还在以下几方面进行技术扩展。

2.5.1 非变性模板的使用

尽管原始的 LAMP 技术扩增反应可以在等温条件下完成，但需要先对模板 DNA 进行 95 $^{\circ}\text{C}$ 5min 后骤冷的预变性处理。Nagamine 等^[9] 对使用非变性处理 DNA 模板进行 LAMP 反应的可行性进行了探索。他们研究发现无论是使用带有 HBV DNA 片段的质粒还是临床 HBV-DNA 阳性患者分离血清样品、 λ DNA、人类基因组 DNA 等，不进行模板的预变性处理一样可以顺利进行 LAMP 扩增。

这一发现使 LAMP 技术在临床检测的应用更加方便可行。

2.5.2 环状引物的使用

为了提高 LAMP 反应的速度, Nagamine 等^[10]在原来 4 条引物的基础上, 再增加 2 条靶向扩增反应中形成的环状结构的环引物。两条环引物 F 和 B 也是通过与茎环结构杂交, 启动链置换 DNA 的合成, 但它们所结合的区域与内引物所靶向的结构不一样。环引物 F (loop F) 和 B (loop B) 结合的区域分别位于 F1 和 F2 间以及 B1 和 B2 间 (FLP 和 BLP), 而内引物 FIP (5'F1c-F2 3') 和 BIP (5'B1-B2c 3') 靶向的区域分别为 F2c 和 B2c 区 (图 2.3)。环引物的加入, 不但对原来内引物的结合没有影响, 而且可以结合内引物无法结合的其他环结构并引发链置换 DNA 合成, 因此保证了扩增反应中所有形成的环状单链结构都有相应的引物与之结合, 引发 DNA 合成, 从而大大提高 LAMP 反应速度。使用环状引物的 LAMP 反应比原来的 LAMP 反应时间缩短近一半, 灵敏度也明显提高^[6]。使用环引物的 LAMP 扩增检测可以在 1h 内完成。

2.5.3 单链 DNA 分离

LAMP 的产物是由大量反向重复的靶序列构成的复杂茎环结构, 因此, 需要基因芯片等手段进行单链的靶序列后续试验。如何有效地从 LAMP 的产物中分离出单链的靶序列对于 LAMP 的应用尤其重要。Nagamine 等^[11]建立了一套从 LAMP 扩增产物中分离单链 DNA 的方法。这种方法是利用设计 LAMP 引物时在内引物 FIP 的 F1c 和 F2 中间和 BIP 的 B1c 和 B2 间引入 *Tsp* RI 酶切位点序列, LAMP 扩增结束后加入 *Tsp* RI 酶 65℃ 进行消化, 然后纯化酶切产物, 再加入与酶切后形成的黏末端结合的引物 5'-GACACTGCA-3', 并在 *Bst* DNA 聚合酶作用下进行链置换和扩增, 从而置换出一条单链 DNA。整个反应仍然在恒定的温度下进行。

2.5.4 LAMP 原位扩增

近年来, 荧光原位杂交 (FISH) 技术被广泛应用于病原体的检测。FISH 技术可提供在自然环境中待测病原体的形态、所在细胞的大小及生理活性等信息。研究表明, FISH 技术与原位 PCR 技术结合, 可有效地提高检测的效率和特异性。然而, 原位 PCR 存在需要反复升温降温, 造成细胞破坏和扩增产物泄露, 导致出现高背景等局限。针对原位 PCR 的问题, Maruyama 等^[12]将 LAMP 和 FISH 结合, 用于检测携带 *stxA* (2) 基因的 *E. coli* O157 : H7, 克服了原位 PCR 的缺点。LAMP 原位检测与原位 PCR 相比, 不需要反复升温, 可在等温条件且相对较低的温度下进行反应, 可减少对细胞的破坏, 有利于应

用荧光抗体进行同步细胞鉴定。其次，LAMP 产物含有大量的靶序列及其反向重复序列，这样的特殊结构有效地防止了产物泄露至细胞外。此外，LAMP 使用的 DNA 聚合酶分子质量小，更容易进入细胞。因此 LAMP 原位检测更有应用优势。

2.5.5 产物的检测

简便直观的检测方法对 LAMP 技术的应用至关重要，目前已发展出一系列的直观检测方法，如焦磷酸镁浊度检测、荧光标记探针与 PEI 沉淀结合的荧光目测比色法、钙黄素荧光目测比色法等（见原理部分）。这些简便直观的检测方法的发展，使 LAMP 技术真正实现了快速诊断，具备现场快速检测应用的巨大潜力。

2.5.6 商品化 LAMP 检测试剂盒的开发

最早将 LAMP 技术开发成商品化检测试剂盒的是日本荣研化学株式会社（Eiken Chemical Co., Ltd.），它的产品主要用于环境和食品安全方面的检测，包括沙门氏菌检测、大肠杆菌检测、单核细胞增多性利斯特氏菌检测等，此外它的产品还包括实验室研究专用的 DNA LAMP 检测和 RNART-LAMP 检测试剂盒（不带引物）、部分病原微生物的 LAMP 检测引物、用于产物检测的试剂和用于浊度检测的浊度仪。国内首先开发出 LAMP 检测试剂盒的是广州华峰生物科技有限公司，其产品包括 6 种食源微生物检测试剂盒和 18 种病原微生物检测试剂盒原型。

2.6 LAMP 技术的应用

LAMP 技术因其快速高效、灵敏度高、特异性强、操作方便、检测直观和设备要求低等特点，自发明以来，迅速被用于病原微生物检测、遗传病诊断、食品安全等领域的 DNA 和 RNA 检测，显示出比传统 PCR 检测更有优势的应用前景。

2.6.1 病原微生物的检测

病原微生物是一类严重危害人类健康的微生物，主要包括各种细菌和病毒。准确快速的诊断对于控制病原微生物的传播和治疗其所引起的疾病具有极其重要的意义。目前对病原微生物的检测主要依靠病原体分离培养法、免疫学方法和各种 PCR 方法。病原体分离培养法虽然是金标准，但繁琐费时；免疫学方法的特异性和敏感性均较低；PCR 方法灵敏快速，可代替病原学检测，但由于 PCR 需

要较昂贵的仪器设备、较高的检测费用和较复杂的步骤而使其不适用于现场快速检测及基层普及应用。LAMP 技术克服了常规 PCR 技术设备要求高、检测复杂的缺点,并进一步提高了敏感性和特异性,缩短了检测时间,简化了操作过程,更适合临床病原微生物的检测要求。目前已有许多 LAMP 技术用于各种病原微生物检测的报道。

2.6.1.1 DNA 病毒的检测

当前报道的用 LAMP 技术检测的 DNA 病毒主要有人类疱疹病毒、腺病毒、乙型肝炎病毒、人细小病毒等。已发现的 8 种人类疱疹病毒中的 7 种已被成功建立 LAMP 检测方法,如 Enomoto 等^[13]根据靶向型特异的 gG 基因建立了单纯疱疹病毒 HSV-1 和 HSV-2 的特异快速的 LAMP 检测方法,在 63℃ 30min 条件下就能完成扩增反应。通过对 18 份临床样品的检测及其他疱疹病毒科病毒(如 HCMV、VZV 等)的检测,并与实时定量 PCR 比较证实了该法对 HSV-1 和 HSV-2 可以做出准确的诊断。Ihira 等^[14]和 Yoshikawa 等^[15]分别建立了人疱疹病毒 6 型(HHV-6)和 7 型(HHV-7)的 LAMP 检测方法,所设计的 LAMP 引物具有高度的特异性和敏感性,非常适合潜伏期的检测。他们发现琼脂糖电泳法检测扩增产物的灵敏度要比浊度检测法高 1 倍。而且提高引物浓度或延长 1 倍的反应时间,灵敏度都可提高 1 倍。Ihira 等^[16]还进一步用该法直接对患者血清的 HHV-6 DNA 进行检测,发现用该法直接检测血清样品的灵敏度为 1000 拷贝每管,而对热变性处理的血清样品的检测灵敏度为 10 拷贝每管。对 300 个来源于发热儿童的样品的检测结果显示,这种不需要 DNA 抽提的 HHV-6 LAMP 方法检测的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值分别为 95.5%、95.2%、94.0%和 96.4%,表明该法可以用于临床幼儿急疹的快速诊断。Wakabayashi 等^[17]设计了针对腺病毒不同亚型 *ad1*、*ad3*、*ad4*、*ad8*、*ad19*、*ad37* 特异基因的 LAMP 引物,以热变性处理的腺病毒 DNA 作模板,在 45min 内可特异地扩增出相应的目标产物。对于碱处理的腺病毒样品同样可以进行扩增反应,但直接以结膜刮削碎屑为模板则不能实现扩增。在对临床标本的检测上,该 LAMP 检测分型法与 PCR 测序法一致。

2.6.1.2 RNA 病毒的检测

RT-LAMP 技术只需要在 LAMP 基础上加入 RNA 模板和逆转录酶就可以实现 RNA 模板的同管一步法快速扩增,因此运用 RT-LAMP 技术可以对各种 RNA 病毒进行快速检测。

1) SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome-coronavirus) 的检测

在 SARS 暴发期进行现场检查要求检测手段简便快速准确,而临床上常用的 SARS-CoV 抗体检测和荧光定量检测,因检测时间较晚或设备操作要求高,都不是理想的现场检测手段。Poon 等^[18]建立 SARS-CoV 检测的 LAMP 两步检

测法, 先是将 *Rep* 基因逆转录为 cDNA, 然后利用 LAMP 原理建立检测方法, 并利用该法对 31 例 SARS 和 58 例其他呼吸疾病患者及 30 名健康人鼻咽分泌物标本进行检测。结果显示 SARS 患者中 SARS-CoV 检出率为 64%, 而另外两组标本均为阴性, 与实时 PCR 比较, 该 SARS-CoV-LAMP 法的敏感性稍低, 但能达到 PCR 的灵敏度。Hong 等^[19] 根据 SARS 冠状病毒的保守序列 *1b Rep* 基因可读框设计了包括环引物在内的 6 条引物, 在 63°C 60min 条件下进行了一步法 RT-LAMP 检测。该法检出时间为 11min, 检测极限达到了 0.01PFU, 而灵敏度则比 RT-PCR 高 100 倍。对 49 例临床鼻、咽拭子 RT-LAMP 和 RT-PCR 对照检测, RT-LAMP 的灵敏性达到 100%, 产物经限制性内切核酸酶酶切及测序验证其特异性达到 87%。

2) 流感病毒 (influenza virus) 的检测

Poon 等^[20] 利用 LAMP 技术检测甲型流感病毒, 针对 6 个独立的结合位点设计两对特异性的引物来扩增目标基因, 以看家基因或外源性 RNA 分子作为阳性参照, 检测了 H1~H3 的甲型流感病毒, 与 PCR 法比较符合率为 100%。Imai 等^[21] 报道了检测 H5N1 的 RT-LAMP 方法, 可以检测 0.01PFU 的病毒, 敏感性是传统 RT-PCR 的 100 倍。Ito 等^[22] 建立甲型流感病毒 H1、H3 亚型和乙型流感病毒的检测分型 RT-LAMP 方法, 从 RNA 提取到检测分型整个过程可以在 3h 内完成。在对临床样品的检测中, RT-LAMP 方法的检出率为 85.5%, 高于免疫色谱法的 75.9%。

3) 呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 的检测

Ushio 等^[23] 建立 RSV RNA 的 RT-LAMP 检测方法, 并与 RT-PCR、病毒分离法和酶联免疫法 (EIA) 进行比较。在 50 例临床样品检测中, RT-LAMP 检出 47 例阳性样品; RT-PCR 检出 42 例阳性样品; EIA 检测出 34 例阳性样品; 而病毒分离法仅检测出 29 例阳性样品。Shirato 等^[24] 分别针对 RSV 亚型 A 和 B 的基质蛋白保守区设计特异引物建立 RT-LAMP 检测法, 并对 59 例呼吸道感染儿童鼻咽样品进行了 RT-LAMP、病毒分离和免疫学检测比较, 得到的检出率分别为 61%、34% 和 56%。

4) 腮腺炎病毒 (mumps virus, MV) 的检测

MV 是一个高传染性的病毒, 易在幼儿园和小学中流行。2005 年 Okafuji 等^[25] 建立 MV 检测的 RT-LAMP 方法, 通过对 33 例临床样品的检测发现 LAMP 检测 MV 的灵敏度达 0.1PFU, 与巢式 PCR 灵敏度相同并高于病毒分离法。2007 年 Yoshida 等^[26] 针对腮腺炎病毒基因组中红细胞凝集素-唾液酸苷酶编码区域设计引物建立了从临床病样中检测腮腺炎病毒的 LAMP 方法, 并证实该法可用于鉴别腮腺炎 Hoshino 疫苗株和循环野生株。

5) 日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV, 即乙脑病毒) 检测

Toriniwa 和 Komiya^[27] 利用 LAMP 原理靶向 JEV 的包膜 E 蛋白基因建立了一种快速实时定量检测 JEV 的 RT-LAMP 方法。该法可以在 1h 内完成检测, 检测灵敏度达 1PFU, 与常规 RT-PCR 相似。运用该法对与 JEV 同家族的森林脑炎病毒和相关病毒 (登革热病毒和西尼罗河病毒) 进行了扩增, 均未见扩增反应, 表明所建立的 RT-LAMP 法对 JEV 检测具有高度特异性。此外, RT-LAMP 定量的结果与常规病毒定量方法检测出的数量高度相符, 显示所建立的 RT-LAMP 定量检测方法是一种快速准确的 JEV 定量检测方法。

6) 西尼罗河病毒 (West Nile virus, WNV) 的检测

Parida 等^[28] 靶向 WNV 胞膜基因建立的一步 RT-LAMP 检测方法, 使用了环引物, 在单管内 63℃ 恒温条件下 60min 即可完成扩增反应, 扩增产物通过浊度仪实现实时检测。该法检测下限达 0.1PFU, 敏感性比常规 RT-PCR 高 10 倍, 产物酶切证实该法具有高度特异性。

7) 诺瓦克病毒 (Norwalk virus) 的检测

诺瓦克病毒是引起人类腹泻的一种传染性病原体, 可在幼儿园、医院、学校传播流行, 由于诺瓦克病毒培养困难, 目前一般通过电镜或 RT-PCR 进行检测。Fukuda 等^[29] 针对诺瓦克病毒 G1 和 G2 型的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶基因 C 端到衣壳基因 N 端的特异性序列分别设计了 9 条和 13 条特异引物, 并对 26 份临床粪便标本进行了一步法单管 RT-LAMP 扩增检测, 成功检测了不同亚型的诺瓦克病毒, 检测下限为每反应管 $10^2 \sim 10^3$ 拷贝, 与 RT-PCR 比较, 对 G1 型的检测敏感性和特异性分别为 94% 和 100%, 而对于 G2 型均为 100%。

除了上述 DNA 和 RNA 病毒外, 报道的用 LAMP 技术检测的病毒还有丙型肝炎病毒 (HCV)、登革热病毒、埃博拉病毒、麻疹病毒^[30]、日本红薯花叶病毒、菊花斑点枯萎病毒^[31] 等。

2.6.1.3 细菌核酸的检测

Maruyama 等^[12] 最先报道将 LAMP 技术用于细菌检测, 他们用该技术成功建立大肠杆菌 *stxA* (2) 基因原位检测的方法。之后不断出现运用 LAMP 技术对多种细菌进行检测的报道。Song 等^[32] 用改进的 LAMP 检测了志贺氏菌属、侵袭大肠杆菌和引起反刍动物慢性进行性结肠炎的副结核分枝杆菌, 结果提示 LAMP 的敏感性高于传统 PCR, 扩增时间比 PCR 缩短一半, 对副结核杆菌的检出最低限为 0.01pg/ μ l。与早期的 LAMP 相比, 不需要对扩增产物进行电泳, 可直接通过肉眼观察反应副产品 (焦磷酸镁) 的浊度判定结果, 大大简化了操作程序。对众多细菌研究的结果表明, 与传统 PCR 相比 LAMP 技术不仅快速、敏感, 而且具有良好的特异性。Iwamoto 等^[33] 根据 *gyrB* 基因序列设计针对结核分枝杆菌、鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌的特异引物和 16S rRNA 保守序列的分枝杆

菌属公共引物，用 LAMP 方法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。其操作极其简单，只需要将所有反应物混合后 63℃ 孵育，即可在反应试管中加入 SYBR Green I 进行检测。

2.6.1.4 真菌的检测

Endo 等^[34]用 LAMP 技术成功检测巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*, PB)。PB 是引起南美牙生菌病 (PCM) 的热依赖二相真菌，PCM 高发于拉丁美洲国家，其诊断比较困难。传统 PCR 从真菌中检测出 PB 特异的基因 (*gp43* 和 *gp27* 等) 需要 5~6h，而使用巢式 PCR 从血液或组织标本中检测，则需要 12h 以上。Endo 等建立的 LAMP 检测法检测 *gp43* 基因，包括 DNA 抽提在内仅需 3h，显示 LAMP 技术在真菌检测方面的良好前景。

2.6.2 胚胎性别的鉴定

在胚胎研究中，胚胎性别的判断极其重要。Hirayama 等^[35]运用 LAMP 方法对 Y 染色体特异序列进行检测以鉴定牛胚胎性别，取得良好效果。经过显微切割的胚胎标本，处理后提取 DNA，然后被均分在 2 个试管中，同时进行 2 次 LAMP 反应，即雄性特异的和雌雄共有的 LAMP 反应。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 反应为阳性时，则胚胎为雌性；如果雌雄共有的 LAMP 反应为阴性时，则反应无效。这种基于 LAMP 的胚胎性别检测方法，具有很高的敏感性和准确性，用 3~5 个细胞样本可以准确地判别性别，而用一两个细胞，准确性也达到 75.0%~94.4%，而且能减少胚胎切割后的流产率。整个过程包括提取 DNA 在内不超过 1h，产物的检测则可非常方便地利用其生成的白色沉淀进行浊度分析。因此，LAMP 在胚胎性别鉴定方面具有很大的应用前景，并在家畜胚胎生物工程方面具有广阔市场。

2.6.3 SNP 的检测

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 作为第三代遗传标记，在复杂疾病的基因定位、关联分析、个体疾病易感性分析与药物基因组学研究中发挥着越来越重要的作用。可通过直接测序法、单链构象多态性分析、基因芯片法进行检测，但存在操作繁琐、检测成本高等问题。运用 LAMP 技术可以实现低成本简便的 SNP 检测。其基本原理是将 SNP 位点设置在 F1C 和 B1 共有碱基上，并相对应地在内引物 FIP 和 BIP 的 5' 端设置 SNP 位点的野生型碱基或突变型碱基，如果模板是野生型的，使用突变型引物则无法进行 LAMP 扩增反应，反过来，如果模板是突变型的，用野生型引物也无法进行扩增，这样利用

突变型和野生型引物同时进行反应,通过判断是否发生扩增来实现 SNP 分型。Fukuta 等^[36]运用 LAMP 技术对影响甜瓜保存期的 SNP 位点进行检测,在长保存期品种检测中,使用长保存期的 O-3 品种及其 F₁ 代、纯合或杂合 F₂ 代作模板,可以在 40min 后看到浊度明显增加,而以短保存期品种 Nat-2 或其纯合 F₂ 代作模板,则 90min 后也看不到浊度增加,反之亦然。表明 LAMP 用于 SNP 检测具有高度可信性。

2.6.4 转基因食品的检测

自 1983 年首批转基因植物问世以来,世界各国批准商业化种植的各类转基因植物产品已接近百种。出于对转基因作物及其相关食品的安全性评价需要,转基因产品必须进行检测和标识。转基因食品(GMO)的检测一般是通过检测转入的外源启动子来判断,如大多数转基因食品都含有的 CaMV-35S 启动子。LAMP 技术因其灵敏、快速、简便、对操作人员专业知识要求低等特点,已逐步被应用于食品分析中。Shiro 等^[37]靶向 CaMV-35S 启动子基因建立 LAMP 方法通过副产物焦磷酸镁产生的混浊来判断大豆是否进行了转基因改良。

参 考 文 献

- [1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28 (12): E63
- [2] Soliman H, El-Matbouli M. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS). *Vet Microbiol*, 2006, 114 (3,4): 205~213
- [3] Gunimaladevi I, Kono T, Lapatra S E, et al. A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch Virol*, 2005, 150(5): 899~909
- [4] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289 (1): 150~154
- [5] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods*, 2004, 59 (2): 145~157
- [6] Yoshida A, Nagashima S, Ansai T, et al. Loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (5): 2418~2424
- [7] Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnol*, 2006, 6: 3
- [8] Blomstrom A L, Hakhverdyan M, Reid S M, et al. A one-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for simple and rapid detection of swine vesicular disease virus. *J Virol Methods*, 2008, 147 (1): 188~193

-
- [9] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clin Chem*, 2001, 47 (9): 1742~1743
- [10] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*, 2002, 16 (3): 223~229
- [11] Nagamine K, Kuzuhara Y, Notomi T. Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290 (4): 1195~1198
- [12] Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, et al. Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69 (8): 5023~5028
- [13] Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, et al. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (2): 951~955
- [14] Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y, et al. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*, 2004, 42 (1): 140~145
- [15] Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, et al. Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*, 2004, 42 (3): 1348~1352
- [16] Ihira M, Akimoto S, Miyake F, et al. Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Virol*, 2007, 39 (1): 22~26
- [17] Wakabayashi T, Yamashita R, Kakita T, et al. Rapid and sensitive diagnosis of adenoviral keratoconjunctivitis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Curr Eye Res*, 2004, 29 (4, 5): 219~224
- [18] Poon L L, Leung C S, Tashiro M, et al. Rapid detection of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Chem*, 2004, 50 (6): 1050~1052
- [19] Hong T C, Mai Q L, Cuong D V, et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol*, 2004, 42 (5): 1956~1961
- [20] Poon L L, Leung C S, Chan K H, et al. Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (1): 427~430
- [21] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, et al. Development of H5~RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine*, 2006, 24 (44~46): 6679~6682
- [22] Ito M, Watanabe M, Nakagawa N, et al. Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification; comparison with immunochromatography and virus isolation. *J Virol Methods*, 2006, 135 (2): 272~275
- [23] 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 Med Virol*, 2005, 77 (1): 121~127
- [24] Shirato K, Nishimura H, Saijo M, et al. Diagnosis of human respiratory syncytial virus infection using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*, 2007, 139 (1): 78~84
- [25] Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, et al. Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (4): 1625~1631

-
- [26] Yoshida N, Fujino M, Ota Y, et al. Simple differentiation method of mumps *Hoshino vaccine* strain from wild strains by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Vaccine*, 2007, 25 (7): 1281~1286
- [27] Toriniwa H, Komiya T. Rapid detection and quantification of Japanese encephalitis virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol Immunol*, 2006, 50 (5): 379~387
- [28] Parida M, Posadas G, Inoue S, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J Clin Microbiol*, 2004, 42 (1): 257~263
- [29] Fukuda S, Takao S, Kuwayama M, et al. Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol*, 2006, 44 (4): 1376~1381
- [30] Fujino M, Yoshida N, Yamaguchi S, et al. A simple method for the detection of measles virus genome by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J Med Virol*, 2005, 76 (3): 406~413
- [31] Fukuta S, Ohishi K, Yoshida K, et al. Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spotted wilt virus from chrysanthemum. *J Virol Methods*, 2004, 121 (1): 49~55
- [32] Song T, Toma C, Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 243 (1): 259~263
- [33] Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol*, 2003, 41 (6): 2616~2622
- [34] Endo S, Komori T, Ricci G, et al. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 234 (1): 93~97
- [35] Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, et al. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*, 2004, 62 (5): 887~896
- [36] Fukuta S, Mizukami Y, Ishida A, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based SNP markers for shelf-life in melon (*Cucumis melo* L.). *J Appl Genet*, 2006, 47 (4): 303~308
- [37] Shiro F, Mizukami Y, Ishida A, et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified organisms. *Eur Food Res Technol*, 2004, 218: 496~500