

Rapid Detection of Respiratory Bocavirus by Loop Mediated Isothermal Amplification

Zheming Yan¹, Yun Xiang², Shike Hu¹, Jiayun Zhang², Xingchun Tang^{1*}, Hongwu Ai^{2*}

¹College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan

²Department of Laboratory Medicine, Wuhan Children's Hospital, Wuhan

Email: *tangxingchun@hubu.edu.cn, *ahw066@126.com

Received: Apr. 16th, 2013; revised: Apr. 25th, 2013; accepted: May. 9th, 2013

Copyright © 2013 Zheming Yan *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Objective: To Build a method (LAMP, Loop mediated isothermal amplification) for detecting Human Bocavirus. **Methods:** By designing 4 LAMP primers specified for 6 sites in NP1 gene sequence of Bocavirus, we built a system to detect Human Bocavirus. And we detected 60 oropharyngeal swab samples by using this system and realtime fluoescence quantitative PCR to check whether this system works well at the same time. **Results:** We found that we can get the production through the LAMP amplification and the gel electrophoresis results of the 60 samples, in which we found 8 positive samples, are consensus between the realtime fluoescence quantitative PCR and the LAMP system. **Conclusion:** LAMP, a kind of quick, simple, specific, sensitive and low cost method in detecting the nucleic acids of virus, is an ideal alternative for quick screening assay and clinical detection in medical institutions because of the experimental instruments and requirements are not high.

Keywords: LAMP—Loop Mediated Isothermal Amplification; Human Bocavirus; Realtime Fluorescence Quantitative PCR

环介导等温扩增技术快速检测呼吸道博卡病毒

闫明哲¹, 向 贇², 胡适可¹, 张家云², 汤行春^{1*}, 艾洪武^{2*}

¹湖北大学, 生命科学学院, 武汉

²武汉市儿童医院, 检验科, 武汉

Email: *tangxingchun@hubu.edu.cn, *ahw066@126.com

收稿日期: 2013年4月16日; 修回日期: 2013年4月25日; 录用日期: 2013年5月9日

摘要: 目的: 建立一种检测呼吸道博卡病毒的环介导等温扩增方法(LAMP)。 **方法:** 通过博卡病毒 NP1 基因特异性序列的 6 个位点设计 4 条 LAMP 引物, 建立 LAMP 检测体系。并对 60 例疑似感染者的咽拭子, 同时采用实时荧光定量 PCR 和 LAMP 方法进行博卡病毒核酸的检测。 **结果:** 通过凝胶电泳能观察到 LAMP 方法扩增引物的存在, 且采用此体系的检测 60 份咽拭子中 8 份阳性反应和实时荧光定量 PCR 检测结果一致。 **结论:** 博卡病毒核酸的 LAMP 检测方法快速、简单、特异、灵敏、成本低, 对实验仪器设备要求不高, 适用于基层医疗机构临床检测和现场快速诊断。

关键词: 环介导等温扩增技术; 博卡病毒; 实时荧光定量 PCR

1. 引言

人博卡病毒(human bocavirus, HBoV)是 2005 年瑞

*通讯作者。

典科学家 Allander 等^[1]对呼吸道感染患儿鼻咽分泌物进行检测时, 在鼻咽分泌物中发现的一种新病毒。HBoV 属于细小病毒科(parvoviridae), 细小病毒亚科,

博卡病毒属, 是单链 DNA 病毒, 会引起急性呼吸道感染。HBoV 在儿童中, 特别是 <3 岁的婴幼儿有很高的感染率以及共感染, 但 HBoV 在成人中很少检测到^[2,3]。环介导等温扩增技术(Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP), 是指在一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶的协助下使用 2 对引物对模板的 6 个位点在恒温(60°C~65°C之间)条件下, 1 h 内即可完成反应^[4]。目前 LAMP 已经被广泛的应用于各种样品的 DNA 和 RNA 检测中。Poon 等利用 LAMP 技术建立了严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)的检测方法^[5]。也有人将此方法用于胚胎性别鉴定和不同病原体的检测^[6]。

因此, 本文建立了一种操作简便、灵敏度较高以及特异性较强的检测 HBoV 的 LAMP 方法。

2. 材料与方法

2.1. 标本的采集

根据“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项传染病监测技术平台项目中的“发热呼吸道症候群监测方案”进行操作。收集 2012 年 5~7 月武汉市儿童医院检测儿童的咽拭子。将咽拭子样本加入一定量缓冲液 PBS 充分振荡, 然后 8000 rpm 离心 5 min, 吸取上清液加入到冻存管中保存到-80°C 备用。

2.2. 仪器与试剂

仪器: PCR 仪器(applied biosystems), 核酸提取试剂盒(Roche), LighCycler 实时荧光定量 RT-PCR 仪器(Roche), 电泳仪(Biometra)等。

试剂: BstDNA 聚合酶、MgSO₄、10×Buffer、MgCl₂、dNTP、Taq 酶、SYBER Green I 等。

2.3. HBoV 病毒 DNA 提取和 HBoV 病毒实时荧光定量 PCR 检测

用核酸提取试剂盒提取 DNA^[7]。再通过以下程序进行实时荧光定量 RT-PCR 扩增, Pre-Incubation: 95°C (5 min), 1 个循环; Amplification: 95°C (10 s), 55°C (15 s), 72°C (10 s), 40 个循环; Melting Curve: 95°C (1 min), 65°C (10 s), 1 个循环; Cooling: 40°C (10 s), 1 个循环。

正向引物: 5'-GGCTCCTGCTCTAGGAAATAAA GAG-3'

反向引物: 5'-CCTGCTGTTAGGTCGTTGTTGTA TGT-3'

2.4. LAMP 引物的设计

通过在线的 LAMP 引物设计软件 Primer Explorer V4 设计 2 对引物, 包括 1 对外引物(F3 和 B3)、1 对内引物(FIP 和 BIP), 其中要注意 FIC 和 BIC 的 5'端 ΔG 的绝对值要>4, 其它的 3'端 ΔG 值 > 4; 引物在设计时使其 GC 含量介于 40%~65%之间, 但是当引物的 GC 含量介于 50%~60%时, 引物的质量相对较好; F2 区段的 5'端到 B2 区段的 5'端(LAMP 反应扩增的区域)之间的距离建议是 120~180 bp; F3 区段的 3'端到 F2 区段的 5'端之间的距离是 0~20 bp。同理 B2 和 B3 之间的距离是 0~20 bp。F2 区段的 5'端到 F1 区段的 5'端之间的距离是 40~60 bp^[8]。

外引物:

F3 5'-ATCAGCCACCTATCGTCT-3'

B3 5'-CAATGCGAGTAGAGTGCC-3'

内引物:

FIP 5'-ATTGTCTTTTTTCCCCGATGTACTCCAC TGCTTCGAAGACCTC-3'

BIP 5'-TCCATACACTGTATTTCAGTCAACACAG TAGAACCCACACCACC-3'

2.5. LAMP 检测方法的建立

LAMP 的反应体系中包括: 内引物、外引物、Bst 聚合酶、Thermopol Buffer、MgSO₄、dNTPs、DEPC 水、模板、MLV 酶。其中要对内外引物浓度的比值、MgSO₄ 浓度、dNTPs 浓度、Thermopol Buffer 浓度和反应时间以及反应温度对 LAMP 反应的影响进行优化试验, 获得最好的反应条件, 从而建立 HBoV 的 LAMP 检测体系。

2.6. LAMP 扩增产物的电泳检测和染料检测

取 6 μL LAMP 扩增产物, 于 2%琼脂糖凝胶上进行电泳检测。扩增反应结束后, 加入 0.1 μL 的 10,000 × SYBR Green I 染料, 观察 LAMP 反应是否发生颜色变化。

2.7. LAMP 检测 HBoV 的灵敏度

选取一份通过实时荧光定量 PCR 检测出来的阳性样本, 提取核酸后进行常规 PCR, 电泳检测后回收目的条带。经浓度检测后进行 10 倍递进稀释, 得到 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^{-1}$ copies/ μL 的共 11 个稀释度, 并用 SYBR Green I 染料进行检测 LAMP 扩增结果。

2.8. LAMP 的特异性检测

提取甲型流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒以及腺病毒的病毒核酸, 按照所建立的 HBoV 检测方法进行特异性试验, 以 ddH₂O 作为阴性对照, 待反应结束后于各反应试管中加入 0.1 μL SYBR Green I 观察颜色变化。

2.9. 博卡病毒临床样本的 LAMP 检测

从武汉市儿童医院选取 60 份儿童咽拭子, 分批次进行核酸提取, 然后分别进行实时荧光定量 PCR 和 LAMP 检测。

3. 实验结果

3.1. LAMP 检测方法的建立

通过对内外引物浓度的比值、MgSO₄ 浓度、dNTPs 浓度、Thermopoli Buffer 浓度和反应时间以及反应温度对 LAMP 的影响, 确定最佳反应体系为 25 μL : Bst 链置换聚合酶 8 U(1 μL)、模板(2 μL)、DEPC 水(9.5 μL)、10 \times Thermopoli(2.5 μL)、MgSO₄ 10 mM(1.5 μL)、dNTPs 1.5 mM(3.5 μL)、F3/B3(1 μL /1 μL)、FIP/BIP(1 μL /1 μL)、MLV 酶 10 U(1 μL)。反应条件为: 65 $^{\circ}\text{C}$ 1 h; 80 $^{\circ}\text{C}$ 3 min^[8-10]。

3.1.1. MgSO₄ 浓度优化

图 1 表明, MgSO₄ 浓度在 8~12 mM 范围时, LAMP 扩增效率无明显差异; 4 mM 浓度无 LAMP 反应发生, 6 mM 浓度时扩增效率较低。因此, 最终确定 MgSO₄ 的最佳浓度为 10 mM。

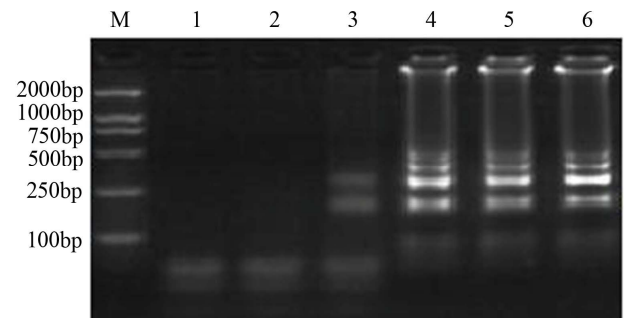
3.1.2. dNTPs 浓度优化

图 2 表明, dNTPs 浓度在 1.5~2.0 mM 时, LAMP 扩增效率无明显差异。当 dNTPs 浓度为 0.5 mM 时, 无 LAMP 扩增反应; dNTPs 浓度为 1.0 mM 时, 浓度

过低, LAMP 反应微弱, 而 dNTPs 浓度为 2.5 mM 时, 浓度过高会阻碍 LAMP 扩增效率, 最终选择 1.5 mM 作为本试验的最佳 dNTP 反应浓度。

3.1.3. Bst DNA 链置换聚合酶浓度优化

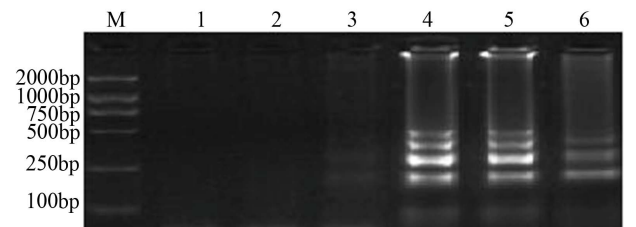
图 3 表明, Bst DNA 链置换聚合酶浓度在 4~10 U 范围时, 均有 LAMP 反应发生。而 4 U 的酶浓度扩增效率低, 最终选择的最佳酶浓度为 8 U。



M: DL2000 Marker; 1. ddH₂O; 2. 4 mM; 3. 6 mM; 4. 8 mM; 5. 10 mM; 6. 12 mM.

Figure 1. The optimized results of MgSO₄ concentration in LAMP reaction

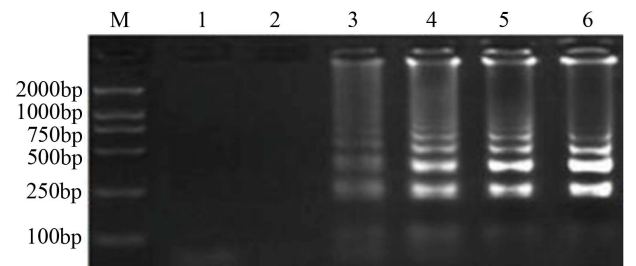
图 1. LAMP 反应 MgSO₄ 浓度优化结果



M: DL2000 Marker; 1. ddH₂O; 2. 0.5 mM; 3. 1 mM; 4. 1.5 mM; 5. 2 mM; 6. 2.5 mM

Figure 2. The optimized results of dNTP concentration in LAMP reaction

图 2. LAMP 反应 dNTPs 浓度优化结果



M: DL2000 Marker; 1. ddH₂O; 2. 2 U; 3. 4 U; 4. 6 U; 5. 8 U; 6. 10 U

Figure 3. The optimized results of Bst DNA polymerase concentration in LAMP reaction

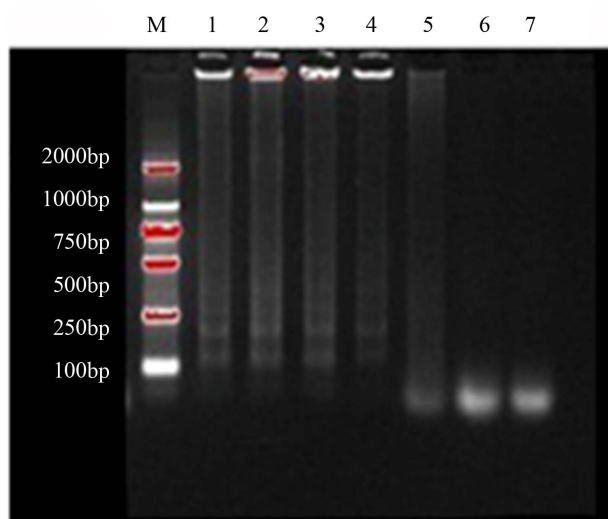
图 3. LAMP 反应 Bst DNA 链置换聚合酶浓度优化结果

3.1.4. MLV 酶浓度优化结果

图 4 表明, MLV 酶浓度在 6~14 U 范围时, 均有 LAMP 反应发生。浓度为 4 U 时没有 LAMP 反应发生。最终确定 MLV 酶的最佳浓度为 10 U。

3.1.5. 反应温度优化结果

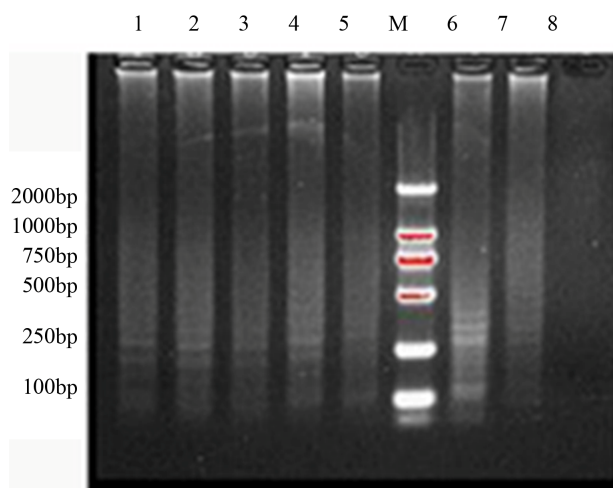
反应温度在 60℃~66℃ 范围内时, 均有 LAMP 反应发生。当温度在 65℃ 时条带最亮, 因此, 最终确定最佳反应温度为 65℃ (图 5)。



1. 14 U; 2. 12 U; 3. 10 U; 4. 8 U; 5. 6 U; 6. 4 U; 7. negative control; M. marker

Figure 4. The optimized results of MLV enzyme concentration in LAMP reaction

图 4. LAMP 反应 MLV 酶浓度优化结果



1. 60℃; 2. 61℃; 3. 62℃; 4. 63℃; 5. 64℃; 6. 65℃; 7. 66℃; 8. negative control; M. marker

Figure 5. The optimized results of reaction temperature in LAMP reaction

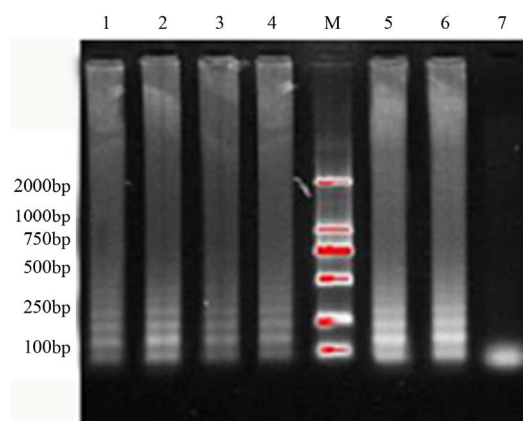
图 5. LAMP 反应温度优化结果

3.1.6. 反应时间优化结果

当反应时间在 45 min~120 min 范围内, 均有 LAMP 反应发生, 时间在 45 min 时条带较暗, 而在 60~120 min 时间范围时条带亮度较亮且无明显区别。因此最终确定 LAMP 最佳反应时间为 60 min (图 6)。

3.2. LAMP 扩增产物的电泳检测和染料检测

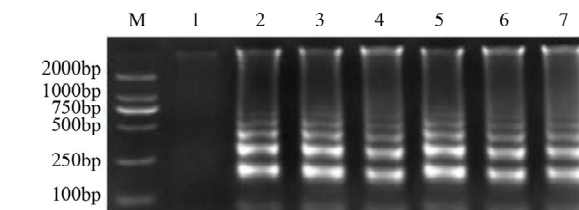
LAMP 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 阳性管有特异性的梯状条带, 阴性对照则无条带出现 (图 7)。加入 SYBR Green I 后, 阳性的样本肉眼观察为黄绿色, 阴性则观察不到颜色或者为淡橙色 (图 8)。



1. 45 min; 2. 60 min; 3. 75 min; 4. 90 min; 5. 105 min; 6. 120 min; 7. negative control; M. marker

Figure 6. The optimized results of reaction time in LAMP reaction

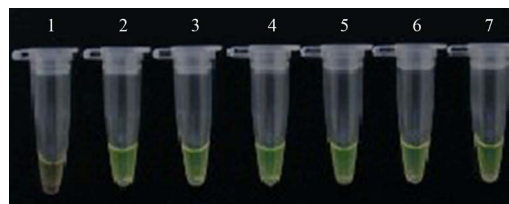
图 6. LAMP 反应时间优化结果



1. negative control; 2-7. HBoV positive sample; M. marker

Figure 7. Analysis of LAMP reaction production using agarose gel electrophoresis

图 7. LAMP 反应产物的琼脂糖凝胶分析



1. negative control; 2-7. HBoV positive sample; M. marker

Figure 8. The results of LAMP amplification (SYBR Green 1 staining)

图 8. LAMP 扩增结果 (SYBR Green 1 染色)

3.3. LAMP 反应的灵敏性检测

目的条带回收后的产物浓度进行 10 倍递进稀释得到 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^{-1}$ copies/ μL 共 11 个稀释度, LAMP 扩增后用 SYBR Green I 进行检测, 当模板浓度在 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^0$ copies/ μL 之间显绿色, 当模板含量在 1.0×10^{-1} copies/ μL 时显淡橙色, 阴性对照也是如此(图 9)。表明所建立的 LAMP 检测方法有很高的检测灵敏性, 检测最低可达到 1 拷贝数。而实时荧光定量 PCR 检测方法最低检测浓度为 100 copies/ μL , 由此可见 LAMP 检测方法相对于实时荧光定量 PCR, 不仅反应时间更快, 而且对模板检测也更加灵敏。

3.4. LAMP 反应的特异性检测

用所建立的方法对 FluA、PIV、RSV 和 AdV 检测结果均为阴性(图 10)。表明所建立的 LAMP 方法具有良好的特异性。

3.5. 实时荧光定量 PCR 和 LAMP 检测临床样本

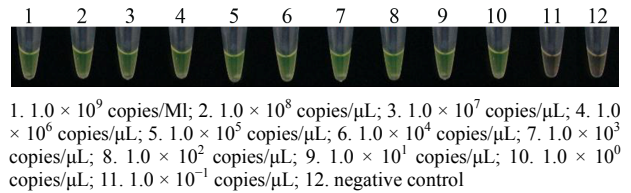
对 2012 年 5~7 月间武汉市儿童医院检测儿童的 60 份咽拭子样本, 同时用实时荧光定量 PCR 和 LAMP 方法进行检测, 都检测出 8 份 HBoV 阳性样本, 二种检测方法的检测结果一致。

4. 讨论

自 1985 年发明聚合酶链式反应方法^[1]已经广泛应用于生物学检测, 由高温变性、低温退火以及延伸等几个步骤, 使目的 DNA 迅速扩增。直到 2000 年, 日本科学家 Notomi 等^[4]发明了环介导等温扩增方法(LAMP), 在 Bst 链式聚合酶的作用下快速完成对靶序列的信号放大。该反应中对引物的设计具有特异性, 因此检测方法的特异较高, 整个检测过程在 65°C 等温条件下只需 1 h 就可完成。

对 LAMP 扩增产物进行检测时, 反应体系中会出现肉眼可视的扩增反应副产物即白色焦磷酸镁沉淀, 但由于对 Mg^{2+} 和引物浓度进行了优化, 实验并没有大量的白色沉淀。只有在体系中加入 SYBR Green I 染料再观察 LAMP 扩增产物, 结果就较为明显了。

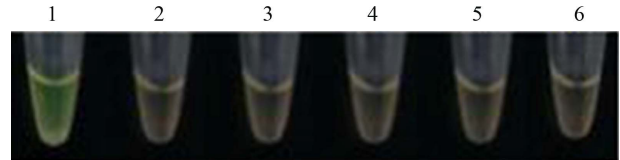
在对临床儿童咽拭子检测, 同时用了实时荧光定量 PCR 和 LAMP 检测方法, 比较发现, 两种检测方法的检出率相同。但进行灵敏度检测时, 发现 LAMP



1. 1.0×10^9 copies/ μL ; 2. 1.0×10^8 copies/ μL ; 3. 1.0×10^7 copies/ μL ; 4. 1.0×10^6 copies/ μL ; 5. 1.0×10^5 copies/ μL ; 6. 1.0×10^4 copies/ μL ; 7. 1.0×10^3 copies/ μL ; 8. 1.0×10^2 copies/ μL ; 9. 1.0×10^1 copies/ μL ; 10. 1.0×10^0 copies/ μL ; 11. 1.0×10^{-1} copies/ μL ; 12. negative control

Figure 9. The sensitivity of LAMP reaction (SYBR Green I staining)

图 9. LAMP 反应的灵敏性检测



1. HBoV; 2. ddH₂O; 3. FluA; 4. PIV; 5. RSV; 6. AdV

Figure 10. The specificity of LAMP reaction (SYBR Green I staining)

图 10. LAMP 反应的特异性检测

检测方法要比 PCR 检测方法灵敏度高很多^[12]。使用 LAMP 方法检测病毒核酸有很好的便捷性、特异性以及灵敏度。基于操作性、检测时间和对设备要求等方面, LAMP 检测方法都优于 PCR 检测方法, 更适合在基层医疗检测中推广。

5. 致谢

感谢国家科技重大专项“湖北及周边省传染病病原谱流行规律研究”(2009ZX10004207; 2012ZX10004207)的支持。

参考文献 (References)

- [1] T. Allander, M. T. Tammi, M. Eriksson, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(36): 12891-12896.
- [2] X. Ma, R. Endo, N. Ishiguro, et al. Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(3): 1132-1134.
- [3] J. Lindner, S. Modrow. Human bocavirus—A novel parvovirus to infect human. *Intervirology*, 2008, 51(2): 116-122.
- [4] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63.
- [5] L. L. Poon, C. S. Leung, K. H. Chan, et al. Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(1): 427-430.
- [6] 常小斌, 刘洵, 程天印等. 环介导等温扩增技术及其应用研究进展[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2006, 12: 12-14.
- [7] Y. Deng, X. Gu, X. Zhao, et al. High viral load of human bocavirus correlates with duration of wheezing in children with severe lower respiratory tract infection. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34353.

- [8] 张坤, 黄伟, 李刚. H5N1 禽流感病毒环介导等温扩增快速检测方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(2): 217-220.
- [9] T. Okafuji, N. Yoshida, M. Fujino, et al. Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(4): 1625-1631.
- [10] M. Ito, M. Watanabe, N. Nakagawa, et al. Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: Comparison with immunochromatography and virus isolation. *Journal of Virological Methods*, 2006, 135(2): 272-275.
- [11] 李坤, 史伟峰, 石旦等. 逆转录 - 环介导等温扩增快速检测 EV71 病毒[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(1): 26-29.
- [12] N. Mori, Y. Motegi, Y. Shimamura, et al. Development of a new method for diagnosis of rubella virus infection by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(9): 3268-3273.