

王永娟, 崔平福, 朱善元, 等. 番鸭呼肠孤病毒可视化 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2017, 33( 6 ): 1321-1326.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.018

## 番鸭呼肠孤病毒可视化 RT-LAMP 检测方法的建立

王永娟<sup>1</sup>, 崔平福<sup>2</sup>, 朱善元<sup>1</sup>, 夏文龙<sup>1</sup>, 孟 婷<sup>1</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室, 江苏 泰州 225300; 2. 泰州出入境检验检疫局, 江苏 泰州 225300)

**摘要:** 为实现番鸭呼肠孤病毒的快速检测, 本研究根据 GenBank 中公布的番鸭呼肠孤病毒  $\sigma C$  蛋白基因的高度保守序列设计了 4 条引物, 通过优化反应体系中各组分的浓度、反应时间和温度, 建立了一种灵敏、便捷的 RT-LAMP 扩增方法。然后以鸭常见病毒基因组为模板, 开展特异性检测, 最后通过添加 SYBR Green I 荧光染料完成可视化 LAMP 检测方法的建立。结果显示: 25  $\mu$ l LAMP 反应体系, 镁离子  $5 \times 10^{-5}$  mmol, dNTP  $1.25 \times 10^{-5}$  mmol, Bst DNA 聚合酶 8 U, F3/B3  $5 \times 10^{-6}$   $\mu$ mol, FIP/BIP  $3 \times 10^{-5}$   $\mu$ mol, 62  $^{\circ}$ C, 45 min 为最优反应条件; 在最佳条件下甜菜碱对反应体系影响不明显; 对临床样品的阳性检出率与常规 RT-PCR 检测方法一致, 但灵敏度高于 PCR 方法, 最低检测限为 10 pg, 检测结果可直接通过肉眼观察来判断。该方法为番鸭呼肠孤病毒的可视化 RT-LAMP 快速检测试剂盒研制奠定了基础。

**关键词:** 番鸭呼肠孤病毒; 环介导等温扩增; 可视化; 快速检测

中图分类号: S851.34<sup>+</sup>7.201 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2017)06-1321-06

## Establishment of visual reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for muscovy duck reovirus detection

WANG Yong-juan<sup>1</sup>, CUI Ping-fu<sup>2</sup>, ZHU Shan-yuan<sup>1</sup>, XIA Wen-long<sup>1</sup>, MENG Ting<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Jiangsu Provincial Key Laboratory of Veterinary Bio-pharmaceutical High Tech Research, Taizhou 225300, China; 2. Taizhou Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Taizhou 225300, China)

**Abstract:** To realize the rapid detection of duck reovirus, four primers were designed according to the highly conserved sequence of avian reovirus  $\sigma C$  protein gene published in GenBank. A sensitive and convenient reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method was established by optimizing reaction time, temperature and the concentration of each component in the reaction system. Then, the genome of duck common virus was used as template to detect specificity. Finally, a visualized LAMP detection method was established by adding SYBR Green I fluorescent dyes. The result showed that 25  $\mu$ l reaction system,  $Mg^{2+}$   $5 \times 10^{-5}$  mmol, dNTP  $1.25 \times 10^{-5}$  mmol, Bst DNA polymerase 8 U, F3/B3  $5 \times 10^{-6}$   $\mu$ mol, FIP/BIP  $3 \times 10^{-5}$   $\mu$ mol, 62  $^{\circ}$ C, 45 min was the optimum reaction condition, the influence of betaine on the reaction system was not obvious under the optimal condition.

收稿日期: 2017-07-24

**基金项目:** 江苏省教育厅自然科学基金面上项目 (16KJB230004); 江苏省“六大人才”高峰第十二批培养对象资助项目 (NY023); 江苏省大学生创新创业训练计划校企合作基金项目; 安徽省科技攻关项目 (1201c0602006); 泰州市科技支撑计划农业项目 (TN201703); 江苏省高校优秀科技创新团队资助项目 (2050305-44)

**作者简介:** 王永娟 (1980-), 女, 江苏海门人, 博士, 副教授, 主要从事动物传染病防治研究, (E-mail) 43088591@qq.com

**通讯作者:** 孟 婷, (E-mail) mengting2010@foxmail.com

The positive rate of the method was consistent with that of the conventional RT-PCR assay, but the sensitivity was higher than the PCR method, and the minimum detection limit was 10 pg. The results could be determined directly by the naked eye observation. This method laid the foundation for development of rapid detection kit of the RT-LAMP method for the visualization of muscovy duck reovirus.

**Key words:** muscovy duck reovirus; reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP); visualization; rapid detection

番鸭呼肠孤病毒 (Muscovy duck reovirus, MDRV) 可引发以软脚为临床主要特征的番鸭呼肠孤病毒病, 该病多发生于 40 日龄内的番鸭, 病死率高, 对现代养鸭业造成了巨大的损失, 是危害中国禽类养殖业的主要传染病之一。病死鸭最明显的病变是在肝和脾表面上出现密集的灰白色坏死点, 肾脏肿大、出血, 表面有黄白色条纹<sup>[1-3]</sup>。

2000 年 Notomi 等开发了一种新的核酸等温扩增方法, 即环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。该技术根据靶序列上的高度保守区域设计出一套特异性引物, 经过链置换 Bst DNA 聚合酶 (Bst DNA polymerase) 的作用, 在等温环境下, 短时间内便可完成指数级的扩增。在扩增过程中, dNTP 会析出焦磷酸根离子, 会与  $Mg^{2+}$  反应生成  $Mg_2P_2O_7$  沉淀, 所以通过肉眼就可以判断反应是否发生<sup>[4-5]</sup>。因为其简捷、高效、灵敏、特异等优点, 并且所需设备十分简单, 所以在基层一线检测中具有广阔的前景。本研究拟根据番鸭呼肠孤病毒  $\sigma C$  蛋白基因的高度保守序列设计了一套特异性引物, 建立番鸭呼肠孤病毒的 RT-LAMP 检测方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒株

鸭瘟病毒 (DPV-F34 株)、番鸭细小病毒 (MP-DV-FJM3 株)、鸭坦布苏病毒 (DTMUV-JS804 株) 由中国农业科学院上海兽医研究所惠赠, 番鸭呼肠孤病毒 (MDRV-HNF 株) 由福建省农业科学院惠赠, 鸭 H9N2 低致病性禽流感病毒 (H9N2-C/SH/F/98 株) 由扬州大学兽医学院惠赠, 7 份 MDRV 感染病料为本实验室保存。

### 1.2 主要试剂

2×LAMP Master Mix、2×Es Taq MasterMix (含染料) 均购自康为世纪生物科技有限公司,  $MgSO_4$ 、甜菜碱均购自天根生化科技 (北京) 有限公司, Bst DNA 聚合酶、SYBR Green I 染料均购自 New England Biolabs 公司, dNTP、100 bp Ladder DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司, DEPC 水购自 Sigma 公司, 引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成, 病毒基因组提取试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

### 1.3 引物设计与合成

根据在 GenBank 中已公布的 MDRV  $\sigma C$  蛋白序

列作为参考, 选择一段高度保守序列, 运用在线引物设计软件 PrimerExplorer V4 设计出一套 LAMP 特异性引物, 包括 2 条外引物 F3/B3 和 2 条内引物 BIP/FIP。根据文献[6]设计 MDRV 的常规 PCR 引物, 其中包括上游引物 F 和下游引物 R。所有引物均由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。引物序列详见表 1。

表 1 引物序列信息

Table 1 The primer sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')
F3	GTCGAGGACTTGTCCCGT
B3	CTCGCCGTCAGTGACATG
FIP	ACGCAAGCGAAGCACCTCTTCGTCTCTCCTCATTGCAGTC
BIP	ATCCGATTTAGCGGACCGTGTTAAAGGAGCCCGGACAGTC
F	GCACTCTGGATCCAGTAC
R	CAATGGAGAAGCGAACC

### 1.4 病毒核酸的提取

按照 Viral RNA/DNA Extraction Kit 试剂盒说明书, 分别提取 5 种病毒基因组 RNA/DNA, 无核酸酶超纯水溶解后分光光度计测定浓度与纯度。将 DT-MUV、MDRV 及 H9N2 的 RNA 反转录为 cDNA, 所有 DNA/cDNA 置于  $-80^{\circ}\text{C}$ , 保存备用<sup>[7-9]</sup>。

### 1.5 LAMP 预反应体系及程序

利用 LAMP 特异性引物, 以番鸭呼肠孤病毒的 cDNA 为模板, 建立 LAMP 预试验, 预试验反应体系总量为 25.0  $\mu\text{l}$ , 各组分含量分别为: 0.5  $\mu\text{l}$  100 mmol/L  $MgSO_4$ , 3.5  $\mu\text{l}$  2.5 mmol/L dNTP, 1.0  $\mu\text{l}$  8 U/ $\mu\text{l}$  Bst DNA 聚合酶, 2.5  $\mu\text{l}$  10×Thermo Pol 缓冲液, 0.5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol/L}$  F3/B3, 3.0  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol/L}$  FIP/BIP, 2.0  $\mu\text{l}$  5 mol/L 甜菜碱, 1.0  $\mu\text{l}$  DNA 模板, 6.0  $\mu\text{l}$  双蒸水。反应程序为  $62^{\circ}\text{C}$  45 min,  $80^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$  冷却, 同时设置双蒸水阴性对照。5.0  $\mu\text{l}$  扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 染色后拍照观察。

### 1.6 番鸭呼肠孤病毒 LAMP 反应条件的优化

1.6.1  $Mg^{2+}$  浓度的优化 在其他条件不变情况下, 分别设置  $Mg^{2+}$  浓度为 1 mmol/L、2 mmol/L、3 mmol/L、4 mmol/L 和 5 mmol/L, 按照预试验反应程序进行 LAMP 扩增 ( $n=3$ ), 根据琼脂糖凝胶电泳结果确定最适  $Mg^{2+}$  浓度。

**1.6.2 dNTP 浓度的优化** 根据已确定好的最适  $Mg^{2+}$  浓度,保持其他条件均不变,分别设置 dNTP 浓度为 0.4 mmol/L、0.8 mmol/L、1.2 mmol/L、1.6 mmol/L、2.0 mmol/L 和 2.4 mmol/L,按照预试验反应程序进行 LAMP 扩增( $n=3$ ),根据琼脂糖凝胶电泳结果确定最适 dNTP 浓度。

**1.6.3 内外引物比的优化** 先确定外引物量 0.5  $\mu$ l 10 mmol/L,再根据 1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10 的内外引物比设置内引物量,保持其他条件不变,按照预试验反应程序进行 LAMP 扩增( $n=3$ ),根据琼脂糖凝胶电泳结果确定最适内外引物比。

**1.6.4 Bst DNA 聚合酶用量的优化** 根据已确定的其他优化条件,在其他条件不变情况下将 Bst DNA 聚合酶的用量分别设置为每 25  $\mu$ l 体系 1.6 U、3.2 U、4.8 U、6.4 U、8.0 U,进行重复试验( $n=3$ ),确定 Bst DNA 聚合酶的最佳用量。

**1.6.5 反应温度的优化** 根据已经确定好的其他最适反应条件,将反应温度分别设置为 59  $^{\circ}$ C、60  $^{\circ}$ C、61  $^{\circ}$ C、62  $^{\circ}$ C、63  $^{\circ}$ C、64  $^{\circ}$ C,进行 LAMP 扩增( $n=3$ ),根据琼脂糖凝胶电泳结果确定最佳反应温度。

**1.6.6 反应时间的优化** 根据已经确定好的其他最适反应条件与反应温度,分别设置 15 min、30 min、45 min、60 min 和 75 min 进行 LAMP 扩增( $n=3$ ),根据琼脂糖凝胶电泳结果确定最优时间。

以上试验均设双蒸水为阴性对照。

## 1.7 甜菜碱对反应体系的影响

在最优条件下,控制其他反应条件不变,去除甜菜碱,双蒸水补足至 25  $\mu$ l,根据电泳结果,对比确定甜菜碱的有无对试验结果的影响。

## 1.8 LAMP 灵敏度检测

将提取的 MDRV 的反转录产物用双蒸水进行 10 倍梯度稀释,获得 500 ng/ $\mu$ l、50 ng/ $\mu$ l、5 ng/ $\mu$ l、500 pg/ $\mu$ l、50 pg/ $\mu$ l、5 pg/ $\mu$ l、500 fg/ $\mu$ l、50 fg/ $\mu$ l 8 个浓度梯度,各组浓度梯度分别取 2  $\mu$ l,按照最适 LAMP 反应条件进行 3 次重复试验,同时参考文献[8]的方法进行 PCR 检测,分析 LAMP 的灵敏度。

## 1.9 LAMP 的特异性检测

分别以 MDRV、MPDV、H9N2、DTMUV 和 DPV 的 DNA/cDNA 为模板,利用建立的 LAMP 方法进行试验,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析特异性。

## 1.10 LAMP 的可视化检测

根据已确定的最适反应体系、温度和时间,在最优条件下进行扩增,扩增产物 4  $^{\circ}$ C 冷却后,在反应产物中加入 1  $\mu$ l SYBR Green I 荧光染料,充分震荡混匀后观察反应管中颜色变化,同时用紫外灯观察是否有荧光物质产生。

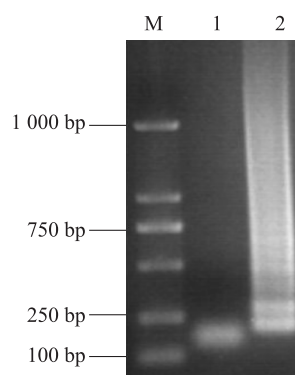
## 1.11 临床样品的可视化检测

参照文献[8]的方法,用建立的可视化 LAMP 检测方法对实验室保存的 7 份 MDRV 感染的番鸭肝脏组织进行 RT-LAMP 扩增,设 PBS 空白对照组。

# 2 结果与分析

## 2.1 MDRV LAMP 预试验结果

参照文献[1],设计了 MDRV 的 LAMP 预试验体系与程序,结果如图 1,设计的引物可在常规条件下特异性检测  $\sigma$ C 基因序列,阴性对照组无扩增。



M:DL2000 DNA ladder; 1:阴性对照; 2:MDRV RT-LAMP 产物。

图 1 RT-LAMP 预试验电泳图

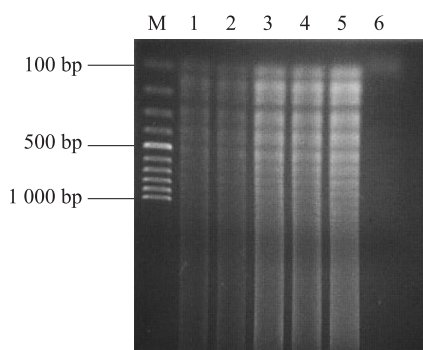
Fig.1 Pre-experimental electrophoresis products for reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)

## 2.2 MDRV LAMP 反应条件优化结果

经过预试验及反应体系中条件的优化,最终确定 25  $\mu$ l LAMP 反应体系中,各组分的最优剂量为:镁离子  $5 \times 10^{-5}$  mmol (图 2),dNTP  $1.25 \times 10^{-5}$  mmol (图 3),F3/B3  $5 \times 10^{-6}$   $\mu$ mol, FIP/BIP  $3 \times 10^{-5}$   $\mu$ mol (图 4),Bst DNA 聚合酶 8 U (图 5),最佳反应温度为 62  $^{\circ}$ C (图 6),最佳反应时间为 45 min (图 7)。

## 2.3 甜菜碱对 LAMP 反应的影响

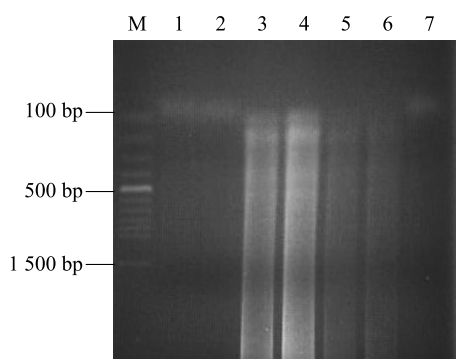
为了研究甜菜碱的有无对 LAMP 体系的影响,分别进行了有甜菜碱与无甜菜碱的 LAMP 试验,并进行对比观察,结果如图 8,可见添加或不添加甜菜



M: 100 bp DNA ladder marker; 1~5: 1 mmol/L、2 mmol/L、3 mmol/L、4 mmol/L、5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ; 6: 阴性对照。

图2 镁离子浓度的优化

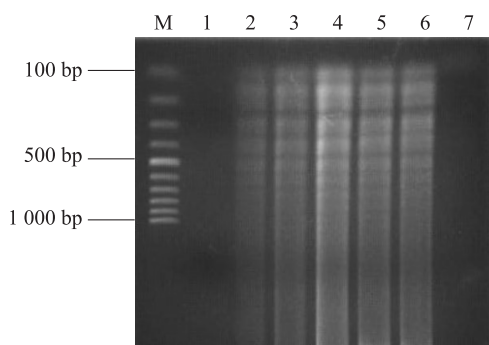
Fig.2 Optimization of concentration of  $Mg^{2+}$  on the LAMP reaction



M: 100 bp plus DNA ladder marker; 1~6: 0.4 mmol/L、0.8 mmol/L、1.2 mmol/L、1.6 mmol/L、2.0 mmol/L、2.4 mmol/L; 7: 阴性对照。

图3 dNTP 浓度的优化

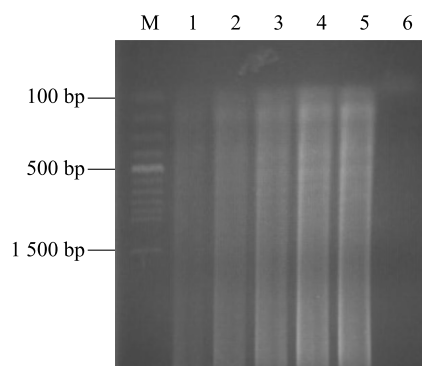
Fig.3 Optimization of concentration of dNTPs on the LAMP reaction



M: 100 bp DNA ladder marker; 1~6: 1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10; 7: 阴性对照。

图4 内外引物浓度比的优化

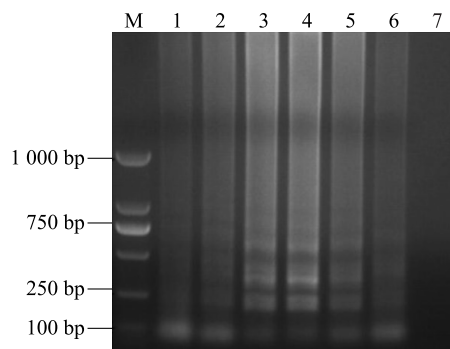
Fig.4 Optimization of FIP/BIP concentration on the LAMP reaction



M: 100 bp plus DNA ladder marker; 1~5: 1.6 U、3.2 U、4.8 U、6.4 U、8.0 U; 6: 阴性对照。

图5 Bst DNA 聚合酶浓度的优化

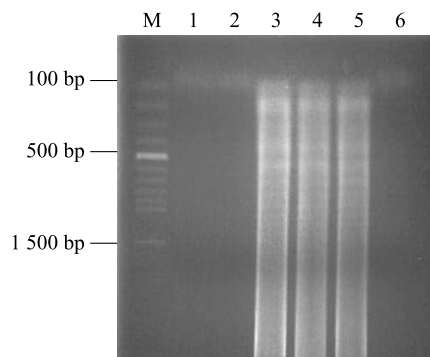
Fig.5 Optimization of Bst concentration on the LAMP reaction



M: DL2000 DNA ladder; 1~6: 59 °C、60 °C、61 °C、62 °C、63 °C、64 °C; 7: 阴性对照。

图6 反应温度的优化

Fig.6 Optimization of reaction temperature on the LAMP reaction



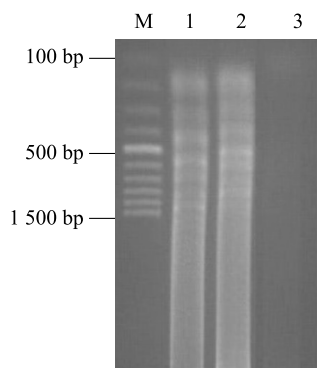
M: 100 bp plus DNA ladder marker; 1~5: 15 min、30 min、45 min、60 min、75 min; 6: 阴性对照。

图7 反应时间的优化

Fig.7 Optimization of reaction time on the LAMP reaction



碱均有特异性条带产生,无甜菜碱并不影响 LAMP 反应的进行。



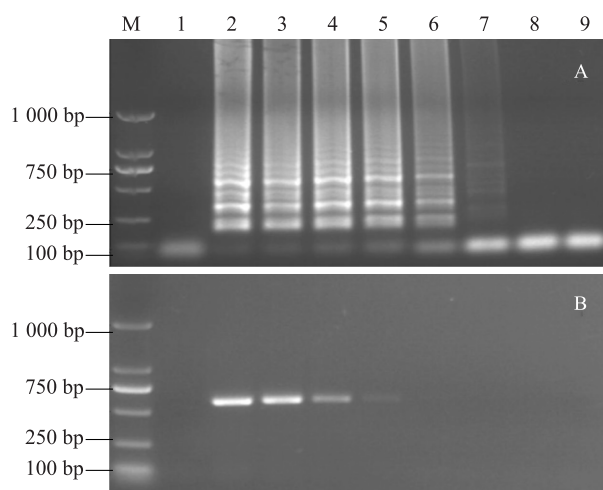
M:100 bp DNA ladder marker; 1~3:1 mol/L 甜菜碱、无甜菜碱、空白对照。

图 8 甜菜碱对 LAMP 体系的影响

Fig.8 Effect of concentration of betaine on the LAMP reaction

## 2.4 灵敏度检验结果

在同等反应条件下,改变基因组剂量分别进行 LAMP 和 PCR 检测,结果如图 9 所示,LAMP 检测方法最低能检测 10 pg 的 cDNA,比 PCR 的灵敏度高 2 个数量级。



A:LAMP 检测结果;B:PCR 检测结果;M:DL2000 DNA marker; 1~9:阴性对照、1 µg、100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg。

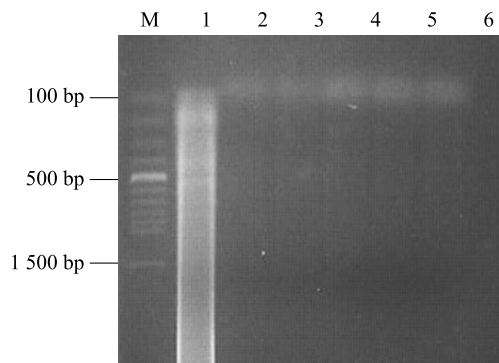
图 9 LAMP 和 PCR 灵敏度检测

Fig.9 Detection sensitivity of muscovy duck reovirus (MDRV) by LAMP and PCR

## 2.5 LAMP 的特异性检验结果

利用建立的 LAMP 方法分别对 MDRV、MPDV、

H9N2、DTMUV 和 DPV 的 DNA/cDNA 进行检测试验,扩增结果如图 10,仅见 MDRV 所对应泳道出现特异性 LAMP 条带,其他无扩增。



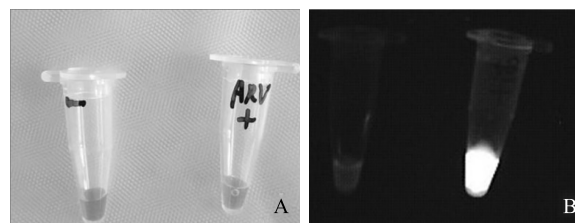
M:100 bp plus DNA ladder marker; 1~5:MDRV、DPV、MPDV、DTMUV、H9N2;6:阴性对照。

图 10 LAMP 特异性检测

Fig.10 Specificity of LAMP assay for MDRV

## 2.6 LAMP 的可视化检测结果

在 LAMP 反应产物中加入 SYBR Green I 荧光染料,充分混匀后可见阳性管呈现黄绿色,而阴性管只呈现本身的橘黄色,紫外灯下可见阳性管有明显荧光,而阴性管中没有(图 11)。



A:自然光下可视化结果 B:紫外光下可视化结果。

图 11 LAMP 可视化检测

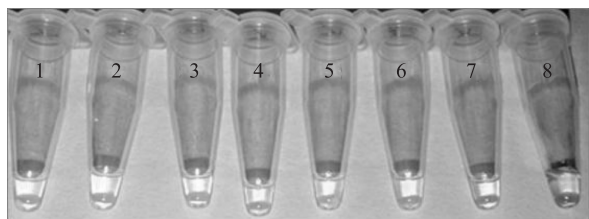
Fig.11 Result of the visual detection of LAMP

## 2.7 临床样品的可视化检测结果

用建立的可视化 LAMP 检测 7 份 MDRV 感染的番鸭肝脏组织,结果如图 12 所示,7 份感染病料呈现黄绿色,而阴性管呈现橘黄色,检测结果与 RT-PCR 检测结果<sup>[8]</sup>一致。

## 3 讨论

近几年来,随着家禽养殖业的规模扩大,番鸭呼肠孤病毒所引起的急性传染病对家禽养殖业造成的



1~7: 临床样品; 8: 阴性对照。

图 12 临床样品的可视化检测

Fig.12 Result of the visual detection of clinical samples

危害更加严重,但由于传统的番鸭呼肠孤病毒的检测方法对操作人员、操作环境和仪器设备的要求过高,不利于在基层养殖场和兽医站普及。因此,迫切需要建立一种更加快速、经济的检测方法。本研究建立的 RT-LAMP 检测方法与 RT-PCR 检测方法相比,检出效率高,操作简便,时间更短,不需要复杂的仪器,无需染色,肉眼就可以判断结果,安全环保,更适合在基层推广应用。

从 LAMP 试验的结果可以看出,影响 LAMP 反应的因素很多,反应体系中的每个参数都可能会影响最终的结果。本次试验中研究了甜菜碱的有无对 RT-LAMP 的影响,从结果可以看出,在最优条件下,甜菜碱并未影响 LAMP 的试验结果,这说明甜菜碱在试验体系中虽然可以作为减少碱基堆积的化学物质影响 LAMP 的反应速率,但仅仅是辅助作用,对试验体系的影响非常小,对试验结果并不一定产生影响<sup>[10]</sup>。

由于 LAMP 反应的高灵敏性,污染所造成的假阳性问题一直十分突出,为了弥补这一缺点,在实际操作中规范操作细节便显得尤为重要。主要体现在以下几点:(1)在通风良好的环境下进行试验,避免气溶胶的污染;(2)样品的检测和配置设在不同地点、采用不同的移液器、PCR 板以防止交叉污染;(3)定期对试验器材进行清洗、消毒,并进行紫外照射,消除可能存在的污染。

#### 参考文献:

- [1] 李启强.番鸭呼肠孤病毒套式 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J].中国畜牧兽医,2012,39(10):83-86.
- [2] 刘晓丽,刘婷,刘波,等.鸭呼肠孤病毒人工感染 SPF 鸡胚的病理学研究[J].中国农业科学,2016,49(14):2844-2849.
- [3] 陈杰伟,雷利平.景宁县鸭传染性浆膜炎的发病特点[J].浙江畜牧兽医,2005,30(6):15.
- [4] 马艳平,刘振兴,郝乐,等.环介导等温扩增技术的研究进展[J].河北科技师范学院学报,2011,25(1):77-80.
- [5] 孙秀娟.环介导等温扩增(LAMP)技术快速检测灿烂弧菌的研究[D].青岛:青岛科技大学,2013.
- [6] 叶伟成,余斌,刘跃生,等.番鸭呼肠孤病毒通用 RT-PCR 检测方法的建立[J].浙江农业学报,2014,26(6):1453-1456.
- [7] 施少华,万春和,程龙飞,等.种番鸭呼肠孤病毒的分离及 RT-PCR 鉴定[J].中国兽医杂志,2011,47(7):23-24.
- [8] 王永娟,左伟勇,朱善元,等.鸭呼肠孤病毒的 RT-PCR 检测方法的建立[J].江苏农业学报,2016,32(5):1107-1110.
- [9] 李银.禽流感病毒 H9N2 鸭分离株的生物学与分子生物学特性及其快速诊断的研究[D].南京:南京农业大学,2006.
- [10] 江彦增,朱鸿飞.非洲猪瘟病毒环介导等温扩增快速检测方法的建立[J].中国畜牧兽医,2009,36(2):72-74.

(责任编辑:陈海霞)