

• 技术与方法 •

LAMP 技术在肺部非典型感染病原体检测中的应用*

杨俊发¹, 柴晓宇¹, 许飞^{2△}

(1. 南昌大学医学院, 南昌 330006; 2. 南昌大学第一附属医院呼吸内科, 南昌 330006)

摘要:目的 探讨利用现代生物技术开发一套可以快速、准确而且高通量检测肺部 3 种常见非典型感染病原体的检测方法。方法 采用环介导等温核酸扩增技术(LAMP)对导致肺部非典型感染的肺炎支原体、肺炎衣原体及嗜肺军团菌 3 种常见病原体的特异性 DNA 片段进行扩增, 结合基因芯片杂交技术鉴定这 3 种肺部非典型感染的病原体。结果 采用 LAMP 技术对目的核酸进行扩增, 肺炎支原体、肺炎衣原体及嗜肺军团菌 3 种致病菌特异性核苷酸片段同时布阵在一张芯片上, 证明该鉴定系统可检测出的 DNA 浓度为 10^4 拷贝大小, 特异性高, 芯片质量稳定。结论 LAMP 技术结合基因芯片杂交技术可发挥独特的检测优势, 能为常见的肺部非典型感染病原体最终鉴定提供进一步佐证, 可提高检验鉴定结果的准确性, 具有简便快速、灵敏度高、特异性好等优势。

关键词: 环介导等温核酸扩增技术; 芯片分析技术; 军团菌杆菌, 嗜肺; 支原体, 肺炎; 衣原体, 肺炎

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.18.023

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)18-2122-03

The application of LAMP technology in detection of atypical lung infection pathogen*

Yang Junfa¹, Chai Xiaoyu¹, Xu Fei^{2△}

(1. Medical College of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Department of Respiration Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To invent a rapid, accurate and high throughput system to detect and diagnose the atypical lung infection which is often caused by three atypical pathogens by using the modern biological technology. **Methods** We used loop-mediated isothermal amplification(LAMP) to amplify the specific DNA segments of the three atypical pathogens causing atypical lung infection and Combining with gene chip technology to detect the three atypical pathogens. **Results** This research accomplished the amplify of the target genes by using LAMP. The specific segments of the three atypical pathogens were embattled in one chip at the same time; This system could detect the concentration of 10^4 copies of DNA; It had a high specificity as well as a stable quality. **Conclusion**

When some pathogens are harsh to be cultured, LAMP combining with gene chip technology may show a unique technical advantage. It can provide further evidence of pathogens in lung atypical pathogenic detection and improve the accuracy of detection. It has simple, rapid, high sensitivity and specificity advantages.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; microchip analytical procedures; legionella pneumophila; mycoplasma, pneumonia; chlamydia, pneumonia

非典型肺部感染以呼吸道为主要感染途径, 病原体以肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae, MP)、肺炎衣原体(chlamydia pneumoniae, CP)、嗜肺军团菌(legionella pneumophila, LP)为主, 临床表现可为轻、重不等的感染症状, 特别是并发重症肺炎, 预后差^[1]。及早明确引起非典型肺部感染的病原菌, 对临床医生制订诊治决策、指导针对性用药起重要作用。但现阶段临床上对这几种病原体的检测还处于相对滞后的局面^[2], 所以, 开发一套可以快速准确检测这 3 种病原体的方法是临床检测工作中亟待解决的问题。

环介导等温核酸扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[3-4]具有简便、经济、灵敏度及特异性好等优点, 近年来发展迅速, 已被广泛应用于核酸扩增领域。病原微生物基因组计划的进展, 使基因诊断病原微生物感染成为可能, 基因芯片杂交技术是在此基础上新兴的一种高通量技术, 即在面积较小的载体上实现对多种目标基因的同时检测^[5]。本研究拟采用 LAMP 技术对引起非典型肺部感染的 3 种常见病原体的特异基因片段进行扩增, 并结合基因芯片杂交技术实

现对病原体的检测, 以求开发一套可以快速检测非典型肺部感染的病原体的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种标准 DNA 来源 嗜肺军团菌 DNA 获赠于北京基因组研究所, 肺炎支原体及肺炎衣原体 DNA 为本实验室保存品。

1.1.2 标本来源 筛选 2009 年 3 月至 2010 年 9 月在南昌大学第一附属医院呼吸内科、江西省儿童医院等医院门诊就诊及住院的疑似肺部感染者, 根据临床相关诊断和排除标准, 选取非典型肺部感染及重症肺炎患者为标本来源, 标本为痰、血配对标本, 共 110 份, 编号后在适宜温度下保存。

1.1.3 主要试剂、仪器 试剂: $2 \times$ PCR TaqMix(Tiagen Biotech)、Bst DNA 聚合酶(New England BioLabs 公司)、Betaine(Sigma 公司)、 $20 \times$ smart green(Biotium 公司)、DNA Marker 500 bp、抽提液、预杂交液、杂交缓冲液、洗脱液、抗体液、显色液(上海百傲科技有限公司)。仪器: Biometra PCR 仪、美国

* 基金项目: 江西省 2009 年科技支撑计划基金资助项目(2009ZDS14800)。 作者简介: 杨俊发(1986~), 研究生在读, 主要从事肺部感染性疾病及肺部肿瘤介入治疗。 △ 通讯作者, Tel: 13870877117; E-mail: xfjxmc@163.com。

BIO-RAD 公司电泳仪、Alphamager EC 紫外成像系统、Omni Grid™100 microarrayer 点样仪、Gene Pix 4000B 共聚焦激光扫描仪、GenePixPro6.0 图像扫描和分析软件。

1.1.4 引物及探针的设计与合成 根据 GenBank 公布的肺炎支原体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌的基因序列分析特异基因片段,并据其设计特异性 LAMP 引物及探针,在引物上游的 5' 端标记生物素 Biotin^[6]。引物及探针均由上海生工生物有限公司合成。

1.1.5 探针的设计与合成 使用生物工程手段,根据上述各病原菌特异基因片段设计探针并进行 Blast 特异性比对,在探针的 5' 端连接 Poly(T),以确保探针之间的特异性,探针序列此处从略。引物及探针均由上海生工生物工程有限公司合成。

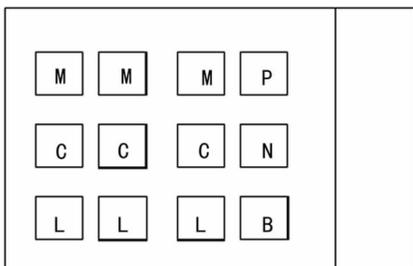
1.2 方法

1.2.1 痰标本 DNA 制备 在痰标本中 1:1 加入等量混匀的痰消化酶悬液(浓度 5%,pH 为 8),混匀后静置 30 min,充分液化至无痰丝。吸取 0.5 mL 入离心管中,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,沉淀加生理盐水 1 mL。振荡洗涤沉淀后 10 000 r/min 离心 5min。如此 2 次,弃上清液,沉淀物按照 DNA 提取试剂盒步骤提取 DNA,提取物编号后在 -80 ℃ 条件下保存。

1.2.2 LAMP 扩增 配置肺炎支原体、肺炎衣原体及嗜肺军团菌 3 种病原菌 LAMP 引物 Mix:F3(50 μm)4 μL,B3(50 μm)4 μL,FIP(50 μm)16 μL,BIP(50 μm)16 μL,ddH₂O 50 μL 混匀备用。取薄壁 PCR 管(0.2 mL),向各管中加入:2×U-LAMP Mix(10 μL)、引物 Mix(1 μL)、模板 DNA(2 μL)、Bst 酶(0.8 μL)、ddH₂O(6.2 μL),混匀,置于 PCR 仪中,温度-时间设置为 60 ℃ 60 min,80 ℃ 10 min。扩增产物经 PCR 产物纯化产品纯化。

1.2.3 LAMP 反应产物的检测 将 LAMP 反应后的 PCR 管置于 12 000 r/min 离心机中离心 1 min。先肉眼观察反应管是否有沉淀生成,将产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 25 min,于凝胶成像系统中成像,观察扩增产物是否呈带状带^[7]。

1.2.4 芯片制备 上述合成的探针用 DMSO 探针稀释调整浓度至 30 μmol/L,使用醛基化玻片进行点样,点样矩阵见图 1,将点样玻片置于 Omni Grid™100 microarrayer 点样仪中,设置点样程序,将每个样品点成 4×4 的矩阵,每个芯片上可以容纳 32 个矩阵(点样后在室温中干燥 10 min,晾置过夜,紫外交联仪固定,44 ℃ 干燥 10 min)。阳性对照(PC)选用 Poly(T)-Biotin,探针稀释液为空白对照(BC),基因阴性对照(NC)选用无同源性的酵母基因。点制好的芯片置于干燥箱中保存备用。基因芯片均由上海生物芯片国家工程研究中心点制(图 1)。



M:MP; C:CP; L:LP; P:阳性对照组; N:阴性对照组; B:空白对照组。

图 1 探针点样示意图

1.2.5 芯片杂交与结果判读 取 3 种病原体的 LAMP 产物各 10 μL 与 200 μL 杂交缓冲液充分混合,98 ℃ 变性 10 min,

瞬即转移至 0 ℃ 环境 5 min;将上述混合物转移至芯片反应区内,平铺均匀,45 ℃ 下杂交 3 h。杂交结束后,用 0.1 g/dl SDS,去离子水及无水乙醇分别洗涤芯片 1 min,晾干。用 Gene-Pix4000B 共聚焦激光扫描仪进行芯片扫描,设置合适的扫描通道和扫描时间,并运行图像扫描分析软件分析荧光信号的强度及结果判读^[8]。

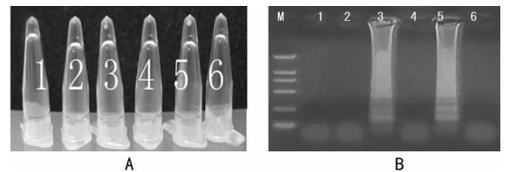
1.2.6 特异性检测 用制备的基因芯片和上述杂交方法,分别对 3 种病原体的标准 DNA 样本进行 LAMP 扩增和芯片杂交检测,验证基因芯片的特异性。

1.2.7 敏感度检测 提取标准菌株的基因组 DNA 并测定其浓度,将 DNA 调整到 30 ng/μL,然后进行 10 倍梯度稀释,即进行灵敏度实验的 DNA 浓度分别为 30 ng/μL,30×10⁻¹ ng/μL,30×10⁻² ng/μL,30×10⁻³ ng/μL,30×10⁻⁴ ng/μL,30×10⁻⁵ ng/μL,0 ng/μL,每个浓度的 DNA 各取 1 μL 分别进行 LAMP 试验和芯片杂交检测。本研究选取嗜肺军团菌 DNA 进行敏感度检测。

1.2.8 样品检测 将 110 份从痰液标本提取的核酸进行 LAMP 扩增及扩增后反应产物检测,后与基因芯片杂交,实现对 3 种病原体的检测,将杂交结果与标本 LAMP 反应结果比较。

2 结果

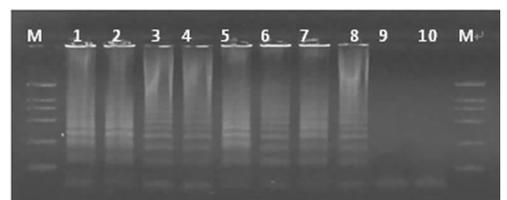
2.1 LAMP 反应结果 所设计的 3 套 LAMP 引物与相应 DNA 反应后均有特异性电泳条带产生,目标片段理想。如将标准肺炎支原体模板与其他对照 DNA 加入特异性引物后进行 LAMP 反应,能显示标准肺炎支原体 LAMP 反应,反应产物出现特异性的白色沉淀(图 2A)。将 LAMP 反应的产物经琼脂糖电泳后观察,肺炎支原体标本出现 LAMP 特有的阶梯状分布的扩增条带(图 2B)。嗜肺军团菌、肺炎衣原体 LAMP 反应均有同样表现。上述结果表明,该反应体系能有效地扩增目的基因。



A:LAMP 反应后肉眼可见 3、5 号管底有沉淀物,1、2、4 号管内无沉淀物;B:M,Marker(500 bp);1,嗜肺军团菌;2,肺炎衣原体;3,肺炎支原体;4,阴性对照;5,肺炎支原体阳性对照;6,空白对照。3、5 可见反应条带,lane1、2、4 均未见明显反应条带。

图 2 肺炎支原体 LAMP 反应结果

2.2 LAMP 检测嗜肺军团菌敏感性结果 对标准嗜肺军团菌 DNA 模板进行 10 倍比稀释,应用 LAMP 方法扩增各浓度模板中的相应特异基因,反应产物电泳后用凝胶紫外分析仪分析,标准曲线样品 LAMP 电泳扩增结果见图 3:LAMP 方法在 10⁴ 拷贝大小及以上浓度均有反应条带。

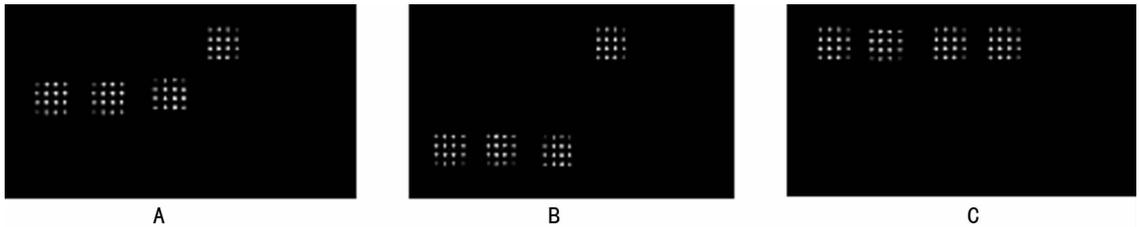


1~8 均可见特异反应条带,9~10 未见明显反应条带。

图 3 嗜肺军团菌 LAMP 反应敏感性结果

2.3 杂交反应判读结果 见图 4。根据布阵探针分布,杂交

结果均显示较高特异性。阳性对照杂交信号强,阴性对照、空白对照始终无信号出现。



A:肺炎衣原体杂交结果扫描图;B:嗜肺军团菌杂交结果扫描图;C:肺炎支原体杂交结果扫描图。

图 4 基因芯片杂交结果扫描图

2.4 特异性结果 将扩增产物分别与芯片杂交,检验 3 种病原体的特异性,在芯片对应的位置上出现杂交信号,其他不对应位置无杂交信号,表明芯片的特异性良好。在 LAMP 成功扩增的基础上,使用所设计的每一条探针,对相应的菌株 DNA 进行检测,结果显示所设计的探针与相应的菌株检测可以得到正确的检测结果。

2.5 灵敏度分析 分别采用芯片杂交、LAMP 两种方法检测病原体的灵敏度。基因芯片检测肺炎支原体、肺炎衣原体及嗜肺军团菌的灵敏度分别为 3.0×10^{-4} pg/ μ L、 2.25×10^{-4} pg/ μ L、 6.53×10^{-4} pg/ μ L。通过对检测结果比较,表明基因芯片的灵敏程度基本与 LAMP 法相近,可检测到 10^{-4} pg/ μ L 水平的核酸量。

2.6 临床标本检测结果 利用基因芯片对待测样品进行检测,检测到肺炎支原体阳性 12 份(0.109%);肺炎衣原体阳性 2 份(0.018%);嗜肺军团菌阳性 4 份(0.036%),结果与样品 LAMP 反应结果符合率为 100%。

3 讨论

目前,中国每年下呼吸道感染的发病人数在 5 000 万人次以上,其中非典型病原体引起的感染占很大比例^[9]。临床上,对非典型病原体的诊断主要依靠细菌培养、抗体检测等方法,然而,这些实验方法存在许多不足:实验周期长,如细菌培养需要 3 d 才能出结果,支原体及衣原体的抗体检测只能作为回顾性诊断;病原体培养困难,如军团菌的培养,现阶段实验室还难以做到;而 ELISA、荧光杂交方法敏感性及特异性较差,且价格昂贵^[10],不适合在各级医院普遍展开。

基因芯片技术具有快速、准确、高通量、自动化等优点^[11],运用基因芯片技术检测致病菌的同类研究已有报道。近年来,随着 LAMP 技术在中国的发展以及基因芯片技术的不断完善,对肺部非典型感染的病原体检测有了新的思路。本研究根据 LAMP 原理,针对常见的肺部非典型感染病原体基因保守序列设计引物,在选择基因保守序列方面,通常选用的病原菌 16S rRNA 序列差异很小,因此,用此序列做靶基因很难准确鉴别各种病原体^[12],为解决此问题,研究人员选用特异性更强的基因序列设计相应的反应引物与序列,经验证和筛选后得到最佳的引物,并且通过多次预实验总结出较为稳定的实验反应条件,取得了较满意的结果。实验证明该方法能够更高效准确地达成反应、检测目的。LAMP 技术与基因芯片技术的整合可以实现 2 种技术的优势互补,通过 LAMP 的基因放大作用和基因芯片的荧光探针杂交技术可使此种检测体系达到较高的灵敏度和特异度,且 LAMP 具有恒温反应的优点,无需过多考虑引物退火温度不统一、操作复杂等难题。本研究建立的 LAMP 结合基因芯片技术检测病原体的方法,具有创新性,经研究验证是一种可行的方法,为肺部非典型感染致病菌的检测

提供了一种可行手段。

参考文献:

- [1] WHO. Legionella and the prevention of legionellosis[M]. India: WHO Press, 2007: 125-131.
- [2] Gieffers J, Füllgraf H, Jahn J, et al. Chlamydia pneumoniae infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment[J]. Circulation, 2001, 103(3): 351-356.
- [3] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): 63-65.
- [4] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reacting using a non-denatured template[J]. Clin Chem, 2001, 47(9): 1743-1753.
- [5] Sugihara T, Koda M, Maeda Y, et al. Rapid identification of bacterial species with bacterial DNA microarray in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis[J]. Intern Med, 2009, 48(1): 32-35.
- [6] Caipang CM, Haraguehil, Ohira T, et al. Rapid detection of a fish iridovirus using loop-mediated isothermal amplification(LAMP)[J]. Virol Methods, 2004, 121(2): 155-161.
- [7] Okazaki N, Narita M, Yamada S, et al. Characteristics of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro[J]. Microbiol Immunol, 2001, 45(8): 617-620.
- [8] 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.
- [9] 黄海辉, 张婴元, 黄绍光, 等. 上海地区社区获得性肺炎的病原学调查[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2003, 6(3): 321-324.
- [10] 孙炜, 赵勇. 4 种抗肺炎支原体抗体检测方法应用比较[J]. 医学检验与临床, 2007, 18(1): 34-35.
- [11] 徐炳森, 邵健忠. 几种新型生物芯片研究进展[J]. 生物化学与生物物理学进展, 2000, 27(3): 251-254.
- [12] 薛建亚, 翁心华, 朱利平, 等. 细菌 16S rRNA 基因芯片的构建及其在细菌鉴定中的应用[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(2): 241-243.