

环介导等温扩增过程监测与结果分析技术研究进展

张旭志 吕志林 崔正国 孔 青

2000 年,Notomi 等^[1]建立了一种新颖的核酸扩增方法—环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。该技术利用 4 种不同的特异性引物识别靶基因的 6 个特定区域,在恒温条件进行反应,不需要模板的热变性和长时间温度循环。较之于传统的 PCR 方法,其不但简便、快速、不需要昂贵的仪器设备,适合现场使用、特异性好,而且甚至可以免模板 DNA 提取操作,因此解决了基于核酸的分子生物学检测技术的诸多难题,使快速、廉价诊断成为可能^[2~6]。近年来,LAMP 技术在微生物检测及动物胚胎性别鉴定等很多领域得到广泛的研究与应用。比如在日本,其已成为病原微生物常规检测的官方推荐手段^[6]。

目前,LAMP 工作中,应用 Bst DNA 聚合酶与相应的引物使目标基因片段快速复制的方(反应步骤)已臻成熟,而对 LAMP 扩增结果的测定及扩增进程的监测(分析步骤)方法大家各有己见,仁者见仁,智者见智。本文就此予以综述及展望。

一、LAMP 结果分析目前发展现状

LAMP 具有特异性高的内在本质,因此可以根据是否扩增和扩增结果(产量)来获得初始模板 DNA/细胞中目标基因的定性定量信息,其生化反应过程如下:(DNA/RNA)_{n-1}+dNTP=(DNA)_n+P₂O₇⁴⁻, P₂O₇⁴⁻+2Mg²⁺=Mg₂P₂O₇(沉淀)。据上述反应式可知,科研工作者既可等反应完毕后测定产物 DNA 或副产物焦磷酸镁(直接或间接)进行结果判断,也可通过监测生化反应进程获得混合液实时状态,进而对初始模板 DNA 中目标基因的信息进行判断或计算。

1. LAMP 生化反应结束后测定产物或副产物:像处理 PCR 扩增反应结果一样,LAMP 生化反应结束后产物 DNA 的测定也有几种常见的方法,比如传统的

凝胶电泳等。此外,由于 LAMP 产物量很大(产率可达到 0.15mg/ml)且伴随不透明的白色沉淀副产物,所以还可采用独特的结果分析方法,比较典型的如目测法等^[7]。下面予以详细分类阐述。(1)凝胶电泳法:凝胶电泳法是检测 LAMP 产物的经典方法,检测范围较宽,也是最准确的方法。扩增产物经过核酸染料染色后电泳,然后在紫外灯下观察,结果如图 1 所示:阳性扩增可见大小不一的梯状条带(LAMP 产物均为初始结构的整数倍),而阴性及阴性对照则没有条带出现^[1,6~11]。近年来,快速电泳及基于微芯片技术的高速电泳的应用推动了该分析模式的进一步发展^[12,13]。然而,由于必须利用电泳及观测设备,决定了其响应慢、不适于现场应用两大缺点难以克服。此外,在传统的电泳过程中,扩增产物很可能扩散到空气等周边环境里,留下污染隐患。

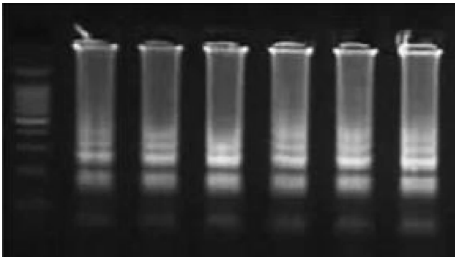


图 1 凝胶电泳检测 LAMP 扩增产物^[9]

2. 荧光染料法:基于可视化效果的荧光染料法,因显色速度快、灵敏度较高、简单方便等特点而受青睐。几种常见的染料及应用实例列举在表 1 中。但显色剂都存在不稳定性,遇光分解,检测限通常比凝

表 1 荧光染料法检测 LAMP 结果

染料	特点	判断方法	文献
SYBR Green I	灵敏度高,橙变绿	紫外/肉眼	[14~17]
DAPI	对活细胞无不良反应	显微镜	[18]
EB	高灵敏度、强烈毒性	凝胶成像系统	[4, 19, 20]
Pico green	灵敏度高、检测范围宽,橘黄变绿	肉眼	[4, 21]
Gene Finder	灵敏度高、毒性低	肉眼	[22, 23]
Propidium iodide	灵敏度高、不能透过活细胞膜	紫外/肉眼	[4]

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(21005086)
作者单位:266071 青岛,中国水产科学研究院黄海水产研究所(张旭志、崔正国);266003 青岛,中国海洋大学食品科学与工程学院(吕志林、孔青)
通讯作者:张旭志,电子信箱:zhangxz@ysfri.ac.cn

胶电泳高。某些染料还具有强烈的毒性(如溴化乙锭,EB),具有环境危害风险性。此外,主观误差不可避免、试剂昂贵、无法精确定量也是该方法的硬伤。同时,还有人认为荧光染料对结果的鉴定有可能会出现假阳性^[24]。

3. 生物传感器法:是指利用生物物质(如酶、蛋白质、DNA、抗体、抗原、生物膜、微生物、细胞等)作识别元件,将生化反应转变成可定量的物理、化学信号,从而能够进行生命物质和化学物质检测和监控的方法。其中利用DNA的特异性杂交能力所构建的具有专一识别功能的生物传感器,即基因传感器,是检测LAMP扩增产物的另一个选择。如Sun等^[25]、Nakamura等^[26, 27]和Ahmed等^[28, 29]就曾以DNA杂交传感器或基因芯片分别成功检测LAMP扩增产物。该方法(特别是电化学生物传感器)有两个优点:一是仪器设备简单,二是可以自动给出结果,避免了主观误差;缺点是传感器制作不易,应用成本较高。

4. 浊度法:由于LAMP扩增伴随着焦磷酸镁(dNTP析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg^{2+} 结合)沉淀产生,因而浊度法是另一种较为常用的结果判断方式。大量的焦磷酸镁沉淀肉眼即可识别(在高速离心机中离心后,白色沉淀集中于反应管底更便于观察),简单、快捷、无费用^[8, 24, 30-32]。但扩增产物较少时白色沉淀不明显,容易出现误判,于是人们引入了浊度仪,在进一步降低了主观误差产生的可能性,也降低了检测限^[33, 34]。浊度法的缺点是对反应液的透明度要求高,因而很多情况下不得不增加预处理步骤。

2. 实时检测LAMP生化反应进程:在许多情况下,我们所感兴趣的是LAMP之前的起始模板量,而在生化反应终点时检测生成物量来倒推起始模板量具有诸多不利因素:一是进入平台期或叫饱和期后定量误差较大(终点值不易判断);二是易造成交叉污染;三是不易自动化。因此,科学工作者力求构建一种新的方法——通过实时监测LAMP体系生化反应进程,找出动态的扩增反应与反应之前模板DNA浓度之间的关系,从而达到精确定量起始模板的目的(类似于实时定量PCR)。就目前来看,常见的途径有两条:其一是利用浊度仪实时监控副产物焦磷酸镁沉淀量;其二是利用对LAMP生化反应没有影响的指示染料。二者各有优劣,分别介绍如下。(1)浊度检测:利用混浊仪或LED-PD装置等光学手段监测LAMP反应液,可以直观、实时的观察与获得反应的

进行情况并进而推断出目标基因的定量情况^[5, 9, 15, 31, 35, 36]。较之与肉眼观察法,灵敏度至少提高了一个数量级;较之与电泳等基于结果检测的方法,该模式的建立更是具有里程碑意义——不但可以快速、较准确地定量,而且不用打开反应器皿,从而有效避免了产物污染环境的可能性。因此,目前已得到了深入的研究与广泛的应用。但是,该方法也有劣势:①光学检测往往需要光/电转换装置才能方便地自动输出结果,因而昂贵且体积较大^[24];②对反应混合液中每种试剂成分以及反应器皿壁的透明度、吸光系数都有较高的要求,因而系统条件苛刻。(2)染料显色法:羟基萘酚蓝(HNB)是一种金属指示剂,其存在不影响LAMP生化反应。LAMP前加入HNB,随着反应进展混合液将由紫色向天蓝色转变,因而可以作为定性指示剂使用^[37-39]。如果得出转变临界点时间与反应之前模板DNA浓度之间的关系,也可用来半定量或定量实时测定。与之类似,反应前可加入混合液中钙黄绿素,该指示剂与 Mg^{2+} 结合不显示出荧光。当扩增反应开始进行,因产生沉淀而使其与 Mg^{2+} 分离,导致绿色荧光显现^[8, 39, 40]。此外,也有报道以SYBR Green作为LAMP反应产物指示剂,用荧光定量PCR仪做定量检测,显然仪器与试剂成本不菲^[41]。

二、展 望

理想的分析检测技术无疑将会极大推动LAMP的发展与推广应用。目前的各种方法虽然能够出色地完成扩增反应的监测与检测,但就大范围,特别是高通量、自动化与现场应用方面,新的理念依然颇为需要。免疫DNA提取快速分析检测目标微生物及动、植物中的特殊基因是LAMP技术发展的重点方向。为之,实时浊度法具有显著优势。然而,被分析物及相关试剂的光学特性往往差异显著。是通过预处理提高灵敏度和准确度,还是放弃预处理步骤以保证高效率,这是个两难选择。再考虑到操作中要尽量避开LAMP的最大敌人——污染的影响,我们相信在未来的研究中,除高通量浊度法与定量荧光法以外,还有两个不必考虑混合液光学性质影响的方向值得期待:一是性能更加优越、更加廉价的在线生物传感器;二是基于非接触式的电化学分析实时监控LAMP生化反应进程。

参考文献

- 1 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63
- 2 Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, *et al.* Tolerance of loop-mediated

- ated isothermal amplification to a culture medium and biological substances [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2007, 70(3): 499–501
- 3 Poon LL, Wong BW, Ma EH, *et al.* Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria; detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Clin Chem*, 2006, 52(2): 303–306
- 4 Joshua H, Shilpa B, Ishwad C, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli* [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(8): 2800–2804
- 5 Yamazaki W, Ishibashi M, Kawahara R, *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 163–170
- 6 Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases [J]. *J Infect Chem*, 2009, 15(2): 62–69
- 7 刘永生, 丁耀忠, 张杰. 环介导等温扩增 (LAMP) 技术的应用研究 [J]. *中国农通报*, 2010, 26(8): 87–89
- 8 Tomita N, Mori Y, Kanda H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products [J]. *Nat Protocols*, 2008, 3: 877–882
- 9 Le Roux CA, Kubo T, Grobbelaar AA, *et al.* Development and evaluation of a real-time reverse transcription Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of rift valley fever virus in clinical specimens [J]. *Clin Microbiol*, 2009, 47(3): 645–651
- 10 Yolanda S, Robert CW, Tom R, *et al.* Continuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in micro-fluidic micro-droplets [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(1): 302–306
- 11 Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16(3): 223–229
- 12 Yukari H, Lihua Z, Yasuyoshi M, *et al.* Analysis of specific gene by integration of isothermal amplification and electrophoresis on poly(methyl methacrylate) microchips [J]. *Anal Chem*, 2004, 76(13): 3689–3693
- 13 Iseki H, Alhassan A, Ohta N, *et al.* Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 71(3): 281–287
- 14 Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(6): 2616–2622
- 15 刘业兵, 张磊, 宁宜宝, 等. 猪细小病毒 LAMP 检测方法的建立 [J]. *中国农业科学*, 2010, 43(14): 3012–3018
- 16 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]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(5): 2418–2424
- 17 Maeda H, Koikeguchi S, Fujimoto C, *et al.* Detection of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-mediated isothermal amplification method [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006, 43(2): 233–239
- 18 Fumito M, Takehiko K, Nobuyasu Y, *et al.* Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(8): 5023–5028
- 19 夏永恒, 杨兵, 张杰等. 2 种鸡免疫抑制性疾病 LAMP 检测方法的建立 [J]. *中国动物检疫*, 2009, 26(5): 29–32
- 20 Tianyan S, Claudia T, Noboru N, *et al.* Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method [J]. *FEMS Microbiol Letters*, 2005, 243(1): 259–263
- 21 李健, 熊炜, 方雪恩等. 猪瘟病毒 RT-LAMP 检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2010, 40(10): 1033–1038
- 22 Qingli Z, Chenyin S, Kuntong J, *et al.* Rapid diagnosis of turbot reddish body irido virus in turbot using the loop-mediated isothermal amplification method [J]. *J Virol Methods*, 2009, 8(1–2): 18–23
- 23 Xiaofeng R, Pengchong L. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Virus Genes*, 2011, DOI 10.1007/s11262-011-0570-3
- 24 Daniel HP, Mallika I, Abul M, *et al.* Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 77(5): 972–976
- 25 Sun W, Qin P, Gao H, *et al.* Electrochemical DNA biosensor based on chitosan/nano-V2O5/MWCNTs composite-modified carbon ionic liquid electrode and its application to the LAMP product of *Yersinia enterocolitica* gene sequence [J]. *Bioelectron*, 2010, 25(6): 1264–1270
- 26 Nakamura N, Ito K, Takahashi M, *et al.* Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(24): 9484–9493
- 27 Nakamura N, Fukuda T, Nonen S, *et al.* Simple and accurate determination of CYP2D6 gene copy number by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip [J]. *Clin chim acta*, 2010, 411(7–8): 568–573
- 28 Ahmed MU, Hasan Q, Hossain MM, *et al.* Meat species identification based on the loop-mediated isothermal amplification and electrochemical DNA sensor [J]. *Food Control*, 2010, 21(5): 599–605
- 29 Ahmed MU, Saito M, Rao SR, *et al.* Electrochemical genosensor for the rapid detection of GMO using loop-mediated isothermal amplification [J]. *Analyst*, 2009, 134(5): 966–972
- 30 Kubota R, Vine BG, Alvarez AM, *et al.* Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Bacteriology*, 2008, 98(9): 1045–1051
- 31 Mori Y, Nagamine K, Tomita N, *et al.* Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(1): 150–154
- 32 Poon LL, Wong BW, Ma EH, *et al.* Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria; detecting *Plasmodium falciparum*

- DNA directly from heat - treated blood by loop - mediated isothermal amplification [J]. Clin Chem, 2006, 52(2): 303 - 306
- 33 Enosawa M, Kageyama S, Sawai K, *et al.* Use of loop - mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured mycobacterium avium subsp. paratuberculosis [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(9): 4359 - 4365
- 34 Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, *et al.* Detection of human Herpes - virus 7 DNA by loop - mediated isothermal amplification [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3): 1348 - 1352
- 35 Thai HTC, Le MQ, Vuong CD, *et al.* Development and evaluation of a novel loop - mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 1956 - 1961
- 36 Mori Y, Kitao M, Tomita N, *et al.* Real - time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA [J]. J Biochem Biophys Methods, 2004, 59(2): 145 - 157
- 37 聂凯, 王大燕, 秦萌等. 基于颜色判定的环介导逆转录等温扩增技术检测人甲型 H1N1 流感病毒基因 [J]. 病毒学, 2010, 26(2): 81 - 86
- 38 Xuejun M, Yuelong S, Kai N, *et al.* Visual detection of pandemic influenza A H1N1 virus 2009 by reverse - transcription loop - mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye [J]. Journal of Virological Methods, 167(2), 2010: 214 - 217
- 39 Sally L. Wastling, Kim Picozzi, Abbas S. L. Kakembo, Susan C. Welburn. LAMP for Human African Trypanosomiasis: A Comparative Study of Detection Formats [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(11): E865
- 40 张跃伟, 李旭妮, 郭盼盼等. 荧光显色在环介导等温扩增 (LAMP) 检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的应用 [J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(3): 508 - 513
- 41 蔡哲钧, 冯杰雄, 朱圣禾. 核酸环介导等温扩增技术 [J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(12): 1092 - 1093
- (收稿: 2011 - 04 - 06)
- (修回: 2011 - 04 - 11)

肾移植发展现状研究

杜然然 高东平 李 扬 池 慧

肾移植作为当今公认的治疗终末期肾脏疾病最理想的方法越来越受到医院、家庭和社会的关注。本文对肾移植在国内外的历史沿革与发展进行了回顾, 综述了当前肾移植技术发展过程中需关注的重点及解决办法, 并综合科技进步和技术手段变迁, 展望未来肾移植研究的技术趋势, 以期对肾移植的临床诊治和科学研究有所帮助。

一、肾移植的沿革与发展

1. 国际肾移植概述: 自 20 世纪初欧美学者就开始对临床肾移植工作进行各种尝试。1902 年, Ullmann 和 Decastello 就成功地完成了同种动物肾移植。1933 年, 乌克兰外科医生 Voronoy 施行了第 1 例人同种异体尸肾移植, 虽未成功, 但这是对人肾移植最早的尝试。1936 年, 苏联医生沃罗诺伊 (Voronoy) 进行了最早的同种肾移植, 并首次发现输血对移植肾存活有益。1954 年, 在美国波士顿的布里格姆医院, 约瑟夫·默里 (Joseph Murry) 医生做了世界第 1 例纯合双

生子间的肾移植手术, 获得成功, 开辟了器官移植的新纪元, 也为其他器官 (如肝、胰和心脏等) 的移植铺平了道路。1959 年和 1962 年 Hamburger 等先后成功完成了异卵孪生间活体肾移植和表亲间活体肾移植, 2 例患者均健康存活 10 余年^[1]。20 世纪 60 年代中期, Hamburger 和 Dausset 开展了供受者间的组织配型, 显著降低了超急性排异的发生率, 加上硫唑嘌呤在临床应用上的推广, 肾移植手术逐渐得以广泛应用^[2]。20 世纪 90 年代以后, 随着淋巴细胞免疫球蛋白制剂的普及, 以及脾切除术抑制排斥等方法的使用, 患者及移植肾的 8 年存活率明显提高。经过一个多世纪的探索和发展, 目前肾移植已在世界各地成功开展并普及。

由于等待肾移植的患者数量不断增加, 而供体器官缺乏, 使得相当多的患者只能依靠长期透析来维持生命。据美国器官分享联合网 (UNOS) 统计资料可知, 从 2000 ~ 2010 年底, 在 UNOS 上注册等待接受肾移植的患者数量从 50000 人左右上升至接近 100000 人, 且上升势头呈逐年加速趋势。

在供体选择上, 活体供肾在延续了 20 世纪 90 年代的增长后, 近些年数量逐渐稳定, 由于肾移植总量需求增加, 尸体供肾依然是肾移植的重要器官来

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2008BAI60B01)

作者单位: 100020 北京协和医学院/中国医学科学院医学信息研究所

通讯作者: 池慧, 电子信箱: chi.hui@imicams.ac.cn