

# 犬瘟热病毒 RT-LAMP 检测方法的建立和初步应用

温海, 秦海斌, 贺星亮, 朱骞, 高一龙, 张汇东

(公安部南京警犬研究所分子生物学实验室, 南京 210012)

**【摘要】** 目的 利用环介导等温扩增(LAMP)技术建立一种检测犬瘟热病毒感染的新方法。方法 根据 GenBank 中 NP 基因序列,设计 4 条 LAMP 特异性引物,对反应条件、特异性、可视化效果和应用效果进行研究。结果 在 60℃ 等温的条件下,1 h 内可完成 RT-LAMP 扩增过程;特异性和可视效果良好;对 63 份临床标本进行检测,阳性检出率为 71.4% (45/63),检出率高于 RT-PCR 的 63.5% (40/63)。结论 建立的 RT-LAMP 检测方法,显示了较高的特异性和敏感性,而且兼具高效、快捷、可视化的优势,为临床检测犬瘟热病毒感染提供了一种快速简便的新途径。

**【关键词】** 环介导等温扩增; 犬瘟热病毒; 检测

**【中图分类号】** S852.65+5; S858.292; R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)08-0051-05  
doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.008.012

## Detection of Canine Distemper Virus by Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification Method

WEN Hai, QIN Hai-bin, HE Xing-liang, ZHU Qian, GAO Yi-long, ZHANG Hui-dong  
(Nanjing Plicedog Research Institute of MPS, Nanjing 210012, China)

**【Abstract】 Objective** To develop a new method for rapid detection of canine distemper virus by reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification method (RT-LAMP). **Method** According to the published GenBank sequence, four strips of primers specific recognizing NP gene of canine distemper virus were designed. We studied the optimal reaction conditions, specificity, sensitivity, and its visualized judging method of products. Then we used 63 clinical specimens to verify its efficiency in field detection. **Results** The amplification can be performed at a constant temperature 60℃ within 1 hour. Specific primers did not recognize genes of other virus commonly infecting canine. The results of RT-LAMP could be easily observed by naked eyes after SYBR green I staining. In 63 specimens collected from Nanjing and Shangdong, 45 samples (71.4%) were positive, but only 40 samples (63.5%) were positive using RT-PCR. **Conclusion** The results of our study demonstrate a higher superiority of specificity, sensitivity, efficiency and convenience of the RT-LAMP method, and provide a new detection method for canine distemper virus.

**【Key words】** RT-LAMP; canine distemper virus, CDV

犬瘟热 (canine distemper disease, CD) 是由犬瘟热病毒 (canine distemper virus, CDV) 引起的一种急性、高度接触性传染病,可引起大批食肉目动物的

发病和死亡,死亡率高达 30% ~ 80%,其自然宿主包括犬科动物 (犬、狼、豺、狐等),鼬科动物 (貂、臭鼬、黄鼠狼等),浣熊科动物 (浣熊、小熊猫、大熊猫

[基金项目] 公安部应用创新计划 (2007YYCXNJQS161)。

[作者简介] 温海 (1961 -), 男, 副研究员, 从事动物疫病防控工作。E-mail: hingull@sina.com。

[通讯作者] 张汇东, 研究员, E-mail: zhuido@163.com。

等),还可感染灵长类动物(如日本猕猴等)<sup>[1]</sup>,近年来随着生态环境改变和病毒的进化,CDV 自然感染的宿主范围正在不断扩大<sup>[2]</sup>,已经出现人感染 CDV 的报道<sup>[3]</sup>。犬瘟热病毒的常用检测方法包括病毒分离、病理组织包涵体检查、血清学检测、核酸探针、原位杂交、胶体金快速诊断试纸条和 RT-PCR 等方法<sup>[3,4]</sup>,其中胶体金快速诊断试纸条和 RT-PCR 在临床诊断中的应用最为广泛,但是近几年研究表明,试纸条的假阴性和假阳性比例很高、准确性较差,RT-PCR 受样本、RNA 降解等因素的影响,检出率远未达到理想水平,因此,为适应临床检测对准确性和可操作性的更高要求,我们应用环介导的等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)建立了 CDV 的反转录-环介导等温扩增(RT-LAMP)快速诊断方法,进一步提高了对 CDV 的检出率、准确性,增强了临床实践中及时、准确地检测犬瘟热病毒的能力。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要毒株和细胞:CDV-Onderstepoort 株,由公安部南京警犬研究所分子生物学实验室保存;63 份待检样本(结膜分泌物 23 份、鼻拭子 18 份、死亡肺脏 15,血清 7 份),采集自南京和山东地区疑似 CDV 感染犬或水貂;非洲绿猴肾细胞(Vero)购自中国兽药监察所。

1.1.2 主要试剂:10 × ThermoPol 反应缓冲液、BstDNA 聚合酶(8 U/μL)购自 New England BioLabs 公司;5.0 mmol/L Betaine 购自 Sigma-Aldrich 公司;dNTP mixture、AMV 酶(5 U/μL)、TaqDNA 聚合酶、DNA/RNA 提取试剂盒均为 TaKaRa 公司产品。

### 1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中登录的犬瘟热病毒基因序列,用在线软件 PrimerExplorer version 4 (<http://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>) 在 NP 基

因保守区域筛选 4 条 RT-LAMP 引物(表 1),引物由上海皓佳生物技术有限公司合成。

### 1.3 RT-LAMP 检测方法的建立

1.3.1 RNA 模板的制备:RNA 采用 TaKaRa RNA 提取试剂盒进行提取,立即进行 RT-LAMP 反应。

1.3.2 RT-LAMP 检测体系:LAMP 反应总体积 25 μL,内含引物 BIP 和 FIP 各 1 μL (40 pmol)、F3 和 B3 各 0.5 μL (10 pmol)、2.5 μL 10 × ThermoPol 反应缓冲液[200 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 100 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0% Tween 20]、4.0 μL 5.0 mmol/L Betaine、4.0 μL 2.5 mmol/L dNTPs mixture、8 U Bst DNA polymerase、2 μL 模板 RNA;1 μL AMV (5 U/μL)、0.5 μL RNA 酶抑制剂(40 U/μL)、2 μL RNA 模板,ddH<sub>2</sub>O 补足体积到 25 μL。体系在 60℃、63℃ 和 65℃ 孵育 30、45 和 60 min,孵育反应结束后,再在 80℃ 作用 10 min 终止反应。根据反应产物的量选择合适的扩增条件。

1.3.2 LAMP 特异性鉴定:提取 CPIV GN 株、CDV GN 株和正常 F81 细胞培养产物的 RNA,于上述选择的适宜循环参数下进行 RT-LAMP 扩增,判断其特异性。

1.3.3 LAMP 结果可视化效果检测:分别以 CDV GN 株和蒸馏水作为阳性和阴性对照,对 63 份临床样本在最佳 LAMP 条件下进行检测,以琼脂糖凝胶电泳结果为参照,观察 SYBR green I 染色的可视化效果。琼脂糖凝胶电泳:10 μL LAMP 产物,以 1.5% 浓度的琼脂糖凝胶电泳,成像、观察。SYBR green I 染色:按照 1:100 的比例向 LAMP 反应管中加入 SYBR green I,静置观察。

### 1.4 与 RT-PCR 诊断方法的比较和应用

对 63 份临床送检的不同种类的病料应用 RT-LAMP、RT-PCR<sup>[5]</sup> 方法进行检测,比较两者的符合率和检出率的高低,初步判定 RT-LAMP 方法临床使用效果。

表 1 RT-LAMP 引物序列  
Tab. 1 Sequence of each primer for CDV RT-LAMP

引物 Primers	序列 Sequences
F3	5'-CAACGGACCTAAATTAAGTGG-3'
B3	5'-TGCCTCAGAATCCAAACT-3'
FIP	5'-GGTCGTCTATGATCCTCTGGAT-CAGTATCCTCTCCTTGTTTCG-3'
BIP	5'-AAGTTAGTAGAGGTAATCCCAAGCA-GCTCCTCTGGATGCAAAT-3'

## 2 结果

### 2.1 RT-LAMP 检测方法的建立

以 CDV GN 株 DNA 为模板,分别以 60℃、63℃ 和 65℃ 反应 60 min,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,显示在 60℃ 时该实验的条带清晰、分辨率较高(图 1)。在 60℃,分别反应 30 min、45 min 和 60 min,以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,表明在 45 min、60 min 即可实现扩增,本实验选择 60 min 以提高反应的灵敏度(图 2)。

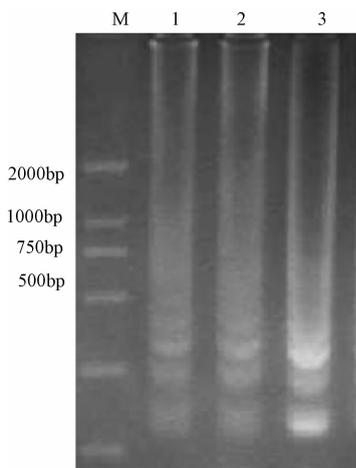


图 1 CDV GN 株的 RT-LAMP 反应在不同温度的扩增结果

M. DNA 标准 DL 2 000; 1. 65℃; 2. 63℃; 3. 60℃.

Fig. 1 RT-LAMP products amplified at different temperatures

M. DNA marker DL2000; 1. 65℃; 2. 63℃; 3. 60℃.

### 2.2 RT-LAMP 反应特异性试验

分别以 CDV GN 株、CPIV GN 株和蒸馏水对照 DNA 为模板,在 60℃ 反应 60 min,产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,CDV 对照的阳性条带明显,CPIV GN 株和蒸馏水对照均未出现准确条带,表明 RT-LAMP 反应特异(图 3)

### 2.3 RT-LAMP 方法的可视化效果

LAMP 反应结束后在产物内加入 1:100 稀释的 SYBR Green I,肉眼可见 CDV RT-LAMP 反应阳性管颜色变绿,而阴性对照管颜色仍为橙黄色,颜色变化明显。对 63 份临床样本进行检测,SYBR Green I 染色判定的阳性检出率和阴性检出率与电泳法相比符合率均为 100%,可视化判定操作简单、效果良好。此方法可作为 RT-LAMP 方法现场检测的判定标准,不必经过电泳、凝胶成像等繁琐的步骤和仪器。

### 2.4 RT-LAMP 方法的应用结果

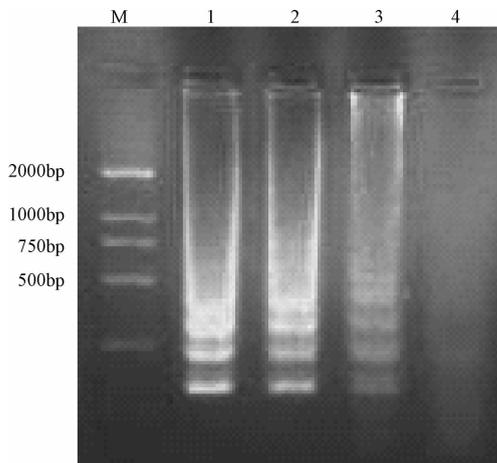


图 2 CDV GN 株的 RT-LAMP 反应在不同时间的扩增结果

M. DNA 标准 DL2000; 1. 60min;

2. 45min; 3. 30min; 4. 阴性对照

Fig. 2 RT-LAMP products amplified at different time points

M. DNA marker DL2000; 1. 60 min;

2. 45 min; 3. 30 min; 4. Negative control

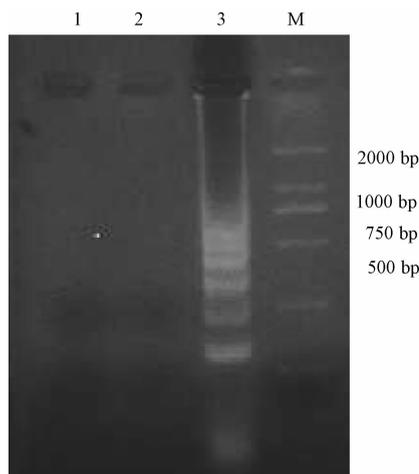


图 3 CDV RT-LAMP 反应的特异性扩增结果

M. DNA 标准 DL2000; 1. 阴性对照; 2. CPIV GN 株;

3. CDV GN 株. M. DNA 标准 DL2000;

Fig. 3 RT-LAMP specific amplified products of CDV

1. negative control; 2. CPIV GN strain; 3. CDV GN strain

对 63 份疑似 CDV 感染的病料进行 RT-PCR 和 RT-LAMP 检测,RT-PCR 总体检出率为 (40/63) 63.5%,RT-LAMP 方法的阳性检出率为 (45/63) 71.4%;其中,对 23 份结膜拭子和 7 份血清样品,两种方法的检测结果完全相同,18 份肺脏样品 RT-PCR 检测出 8 份阳性,RT-LAMP 方法检测出 12 份阳性,15 份鼻拭子中 RT-PCR 检测出 7 份阳性,RT-LAMP 方法检测出 8 份阳性。说明 RT-LAMP 方法的检出率更高,不易出现假阴性结果(表 2)。

表 2 CDV RT-LAMP 方法和 RT-PCR 方法的应用比较  
Tab. 2 Comparison between RT-LAMP and RT-PCR in clinical diagnosis

样本分类 Samples	RT-PCR		RT-LAMP		合计 Total
	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative	
结膜分泌物(犬) Canine conjunctive secretion	20	3	20	3	23
鼻拭子(犬) Canine nasal swab	7	11	8	10	18
肺脏(水貂) Mink lung	8	7	12	3	15
血清(犬) Canine serum	5	2	5	2	7
合计 Total	40	23	45	18	63

### 3 讨论

近年来, CDV 的自然感染宿主已由传统的犬科 (Canidae family)、鼬科 (Mustelidae family) 及浣熊科 (Procyonidae family) 扩展到了食肉目 (Carnivora order) 所有 8 个科及偶蹄目猪科 (Suidae family)、灵长目猕猴属 (Macaca Lacedpede) 和鳍足目海豹科 (Phocidae family) 等多种动物, 并且免疫动物爆发犬瘟热的病例在世界多个国家和地区都有报道。这些日趋复杂的临床症状给 CDV 的诊断带来一定难度。仅根据流行病学、临床症状、包涵体检查和病毒分离等常规方法很难确诊 CDV 感染。因此国内外许多学者建立了 RT-PCR、巢式 PCR、套式 PCR、原位杂交、原位杂交与 RT-PCR 结合等多种分子生物学检测方法, 但是对于 CDV 而言, 不同种类、不同病理阶段的检测材料对检测结果的影响存在很大差异, 上述各种检测方法在应用中均有其不足之处。Doo KIM 等应用 RT-PCR 方法对人工感染犬在不同病理时期采集的样本进行了检测效果的评价, 证实不同时期采集的外周血、结膜拭子、鼻拭子、尿液的检出率差别很大, 在攻毒后连续采样 20 d 中, 前 2 d 采集的鼻拭子和外周血中检测不到 CDV, 前 5 d 内采集的尿液中检测不出 CDV, 而结膜拭子从第 1 天到第 20 天均能达到 100% 的检出率 (7/7), 证实了采样部位和采样时机对 RT-PCR 结果的重要影响<sup>[6]</sup>。Frisk 等基于 NP 基因设计了 3 对不同引物, 研究不同引物对的检出率的影响, 在 29 个病毒阳性病例中, 三对引物的检出率分别为 82%、53%、41%, 分析认为 RT-PCR 的敏感性受到所选引物的影响, 取决于扩增片段的位置, 而且由于病程和发病类型的不同病毒的分布会有很大差异, 同样会影响检测结果。因此, 在一个病例中选择多种样本 (血清、外周血、鼻拭子、脑脊髓液) 或者采取不同时间的多个样本同时进行检测能够显著提高检测的准确性<sup>[7]</sup>。

无论是检材种类的不同、采样时间的差别、还是 RNA 降解的影响, 犬瘟热病毒检测时存在假阴性的一个重要原因, 是受到检测方法本身灵敏度的限制, 导致当病毒 (或其 RNA) 低于某个限量的时不能检出。要进一步提高 CDV 的检测准确性, 就必需采用具备更高灵敏度核酸检测技术。环介导的等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是近些年开发的一种简单、迅速、特异且具成本效益的新的核酸扩增技术<sup>[8]</sup>, 它利用 4 条不同引物识别 6 个不同区域的靶基因, 在恒温条件 (约 60~65)<sup>0</sup>C 能够通过一步反应在 15 min~60 min 内将 DNA 扩增 10<sup>9</sup>~10<sup>10</sup> 倍, 其灵敏度被证明是常规 PCR 的 10-100 倍<sup>[9-12]</sup>。鉴于 LAMP 技术在灵敏度上的优势, 本文建立了检测犬瘟热病毒的 RT-LAMP 方法, 经体系优化后, 证实该方法可在 60<sup>0</sup>C 等温的条件下、1 h 内完成扩增, 且对感染犬类的其他病毒不出现非特异性反应; 对 63 份临床可疑样本的检测结果表明, 该 RT-LAMP 方法阳性检出率高于 RT-PCR 方法, 能够减少的临床检测中假阴性的比例; 另外, 与常规 PCR 方法相比, LAMP 技术独特的可视化的结果判定方法和检测时间上的优势, 也大大增加了将之应用于现场检测的前景。但与其高超的灵敏度相对应, LAMP 方法的假阳性也是一个争论的焦点, 尤其检测大批量样本时阳性产物产生的气溶胶是造成假阳性的重要原因, 在本文中由于临床送检样本中内容物有限, 不足以对阳性样本进行假阳性验证, 因此仅对水貂肺脏样本进行了免疫组织化学检测 (另文发表), 证实了 LAMP 检测阳性而 RT-PCR 阴性的 5 份病料中可见典型的犬瘟热病毒核内包涵体, 之所以 RT-PCR 检测阴性, 可能是病料运送过程较长或者大量的内源性 RNA 酶在 RNA 提取过程中导致了核酸的降解, 超出了 RT-PCR 方法的检测下限, 这在相关研究已有提及<sup>[6]</sup>。

综上, 本研究针对犬瘟热病毒建立的 RT-LAMP 检测方法, 灵敏、迅速、特异性强, 无需使用昂贵的

仪器设备,具备可视化判定结果的能力,可作为一种高效检测 CDV 的手段,广泛应用于 CDV 的诊断和流行病学调查等相关研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Soma T, Ishii H, Hara M, et al. Comparison of immunoperoxidase plaque staining and neutralizing tests for canine distemper virus [J]. *Vet Res Commun*, 2001, 25(4): 311 - 325.
- [ 2 ] Appe IMJ, Yates RA, Foley GL, et al. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1994, 6: 277 - 288.
- [ 3 ] Hoyland JA, Dixon JA, Berry JL, et al. A comparison of in situ hybridization, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ-RT-PCR for detection of canine distemper virus RNA in Paget's disease [J]. *J Virol Methods*, 2003, 109(2): 253 - 259.
- [ 4 ] Jozwik A, Frymus T. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper [J]. *Vet Res Commun*, 2005, 29(4): 347 - 359.
- [ 5 ] 肖定福, 张汇东, 李文平, 等. RT-PCR 检测宠物犬的犬瘟热病毒 [J]. *经济动物学报*, 2005, 9(4): 221 - 224.
- [ 6 ] Frisk AL, Konig M, Moritz A, et al. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 3634 - 3643.
- [ 7 ] Doo KIM, Jeoung SY, So-Jeo AHN, et al. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs [J]. *J. Vet Med Sci*, 2006, 68(8): 877 - 879.
- [ 8 ] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.
- [ 9 ] Cho HS, Kang JI, Park NY. Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2006, 18(1): 81 - 84.
- [ 10 ] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H. Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method [J]. *Vaccine*, 2006, 24(44 - 46): 6679 - 6682.
- [ 11 ] 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.
- [ 12 ] Pham HM, Nakajima C, Ohashi K, et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(4): 1646 - 1650.

[修回日期]2012-05-24

#### (上接第 50 页)

- [ 9 ] 匡颖, 徐国江, 王龙, 等. 哺乳动物体细胞克隆技术的研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(12): 23 - 46.
- [ 10 ] 邵晓云, 黄岚珍, 孙莉, 等. 昆明小鼠胚胎成纤维细胞的分离与培养 [J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(22): 4226 - 4227.
- [ 11 ] 方驰华, 胡海北, 郝建志, 等. ICR 小鼠胚胎成纤维细胞的分离培养及饲养层制备 [J]. 2010, 14(23): 4299 - 4302.
- [ 12 ] 盛利琴, 叶荣, 韩甫, 等. 昆明小鼠胚胎成纤维细胞的分离与体外培养 [J]. *苏州大学学报(自然科学版)*, 2007, 23(1): 83 - 86.

[修回日期]2012-05-07