

应用环介导等温扩增技术 (LAMP) 快速检测家蚕核型多角体病毒的研究*

唐芬芬 杨伟克 邵榆岚 谢道燕 廖鹏飞 杨海 白兴荣**

(云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所 蒙自 661101)

摘要 由家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus, BmNPV) 侵染家蚕 *Bombyx mori* 引起的家蚕核型多角体病 (血液型脓病) 在养蚕生产中发生较为普遍, 对蚕业生产造成重大的经济损失。本研究建立了快捷有效的环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 用于快速检测 BmNPV, 为蚕业生产提供了一个有效检测 BmNPV 和进行早期诊断的技术。该方法是针对 BmNPV 的 *pe38* 基因的 6 个区段设计的 6 条引物用于扩增检测, 整个反应在恒温条件 63℃ 下进行 25 min, 扩增产物用电泳法和可视法检测 (用 SYBR Green I 染色)。结果显示, LAMP 检测方法的灵敏度是常规 PCR 方法的 100 倍, 能检测的范围为 21 个拷贝。另外, 用 4.86×10^8 OBs/mL 感染 4 龄起蚕, 提取血淋巴 DNA 为模板, PCR 在感染 36 h 后检出病毒 DNA, LAMP 法能检测感染 12 h 后的样品。

关键词 家蚕核型多角体病毒, 环介导等温扩增技术, 早期诊断, 蚕业

Prompt diagnosis of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus by loop-mediated isothermal amplification

TANG Fen-Fen YANG Wei-Ke SHAO Yu-Lan XIE Dao-Yan LIAO Peng-Fei
YANG Hai BAI Xing-Rong**

(Institute of Sericulture and Apiculture, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi 661101, China)

Abstract *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus (BmNPV) is a disease of silkworms that causes significant economic losses in sericulture. In this study, a robust and simple loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of BmNPV was developed; the first suitable for potential diagnosis and for helping to monitor BmNPV infections in sericulture. A set of six specific primers were designed to recognize the six distinct genomic sequences of *pe38* from BmNPV. The entire assay duration was 25 min under isothermal conditions at 63℃. The amplified products were analyzed by electrophoresis and visual judgment following SYBR Green I dyeing. The results show that the LAMP assay is 100-fold more sensitive than the routine PCR assay, with a detection limit of 21 copies per reaction. The amount of viral DNA in haemolymph sampled from larvae at different times after infection was also investigated by PCR and LAMP.

Key words *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus (BmNPV), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), diagnosis, sericulture

家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus, BmNPV) 是家蚕重要的病原, 由 BmNPV 侵染家蚕 *Bombyx mori* 引起的家蚕核型多角体病 (血液型脓病) 在养蚕生产中的发生较为普遍, 特别是在夏秋期蚕病易暴发流行, 造

成的经济损失严重。家蚕核型多角体病毒属于杆状病毒科, 核型多角体病毒属, 寄生在家蚕的血细胞和体腔内各种组织细胞的细胞核中, 并在其中形成多角体 (Pringle, 1999; 金伟, 2001)。杆状病毒的遗传物质为 DNA。目前, BmNPV 完整核苷酸

* 资助项目: 云南省现代农业产业技术体系建设专项 (蚕桑); 云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所青年基金项目 (OC2012002)。

** 通讯作者, E-mail: bxrong3@163.com

收稿日期: 2012-08-24, 接受日期: 2012-12-11

序列已从国际核酸序列库中获得, BmNPV 基因组全长 128 413 bp, G + C 含量约为 40%, 有 136 个开放阅读框(ORF)(Gomi *et al.*, 1999)。

在过去的几十年中, 发展了很多方法用于该蚕病的诊断, 如传统的显微镜检法、PCR 基因扩增技术(涂纳新等, 1994), 但这些所需的实验过程复杂、PCR 技术还需要专门的热循环仪, 价格昂贵, 且需要专业人员操作, 温度试剂也有要求, 加上操作繁琐, 不利于生产上广泛地推广和使用, 难以快速、准确、简便的检测。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是由日本学者 Notomi 等(2000)报道的一种新的核酸扩增技术, 该技术是利用具有链置换活性的 BstDNA 聚合酶, 在恒温(60 ~ 65℃)条件下即可完成对靶基因的特异性扩增。具有特异性高, 反应温度恒定, 扩增效率高, 结果易于判定, 操作简单等优点。

核型多角体病属于亚急性传染病, 当蚕感染后, 小蚕一般经过 3 ~ 4 d, 大蚕 4 ~ 6 d 发病死亡, 如果能在感染发生初期及早检测出传染源(BmNPV), 及时采取适当而果断的措施, 是防止群体内蚕病大流行或避免蚕病暴发造成经济损失的有效途径。因此, 开展对家蚕病原 BmNPV 的检测技术研究, 从而建立一种快速、特异、简单方便的检测技术, 具有重要意义。本文探讨了新兴的分子生物学检测技术——LAMP 用于 BmNPV 的检测, 并与 PCR 方法进行了比较。

1 材料与方法

1.1 试虫与供试病毒

供试家蚕品种为云 7, 养至 4 龄起蚕进行 BmNPV 添食(由于家蚕核型多角体病毒主要寄生在血细胞和组织细胞的细胞核中, 针对发病初期检验, 组织材料最好的选择是血淋巴, 而家蚕 1 ~ 3 龄个体较小, 不容易获得血淋巴, 故选 4 龄起蚕作为研究对象)。

家蚕核型多角体病毒(BmNPV)为作者实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器

引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, 质粒抽提试剂盒购及凝胶回收试剂盒购自上海生工; DNA 扩增试剂盒(恒温扩增法)为广州奥迪生

物有限公司产品; D2000 DNA Ladder 购自北京索莱宝科技有限公司; 试剂盒 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 4.0, 载体 pMD® 18-T, 内切酶 *Psh*BI, *TaKaRa Taq*TM, *RNaseA* 等均购自宝生物工程(大连)有限公司。

主要仪器: 恒温金属浴为浙江奥盛仪器有限公司; 高速冷冻离心机, PCR 仪及凝胶成像系统均为美国 BIO-RAD。

1.3 病毒提取及纯化

病毒提取方法参考王文欢等(2009)的方法, 略有改进。用 BmNPV 感染家蚕 4 龄幼虫起蚕, 待虫死后取虫尸若干于研钵中, 加入少量磷酸缓冲液(pH 7.4)于研钵充分研磨虫尸, 过滤; 滤液使用差速离心法反复离心至乳白色, 收集沉淀, 用少量的 PBS 悬浮静置。然后将纯化的病毒多角体悬浮于适量双蒸水, 用血球计数法计数约为 4.86×10^8 个多角体(occlusion bodies, OBs), 4℃ 保存备用。

1.4 病毒 DNA 提取与纯化

应用碱裂解法(Sambrook and Russell, 2001)提取病毒 DNA。具体方法为: 取纯化的多角体病毒悬液, 沉淀后溶于适量 TE(pH 8.0)中, 加入等体积碱解液(pH 10.8), 37℃ 碱解 4 h; 10% HAc 调 pH 值至 7 ~ 8; 加 SDS 和蛋白酶 K 至终浓度分别为 0.5% 100 μg/mL; 37℃ 水浴 3 h; 等体积酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)和等体积氯仿: 异戊醇(24: 1)抽提溶液, 加 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠溶液; 加 2.5 倍体的冰乙醇沉淀 DNA; -20℃ 沉淀过夜; 预冷的 75% 乙醇漂洗 2 次, 风干后的基因组 DNA 溶于 TE, -20℃ 贮存备用。

1.5 试虫接种与血淋巴提取

用浓度为 4.86×10^8 OBs/mL 的 BmNPV 多角体感染家蚕 4 龄起蚕幼虫, 接毒后每隔 12 h(0、12、24、26、48、60、72、86 h)取一次样, 每头取 50 μL, 取 4 头共 200 μL 血淋巴为一个样品, 每个时段重复 3 次。86 h 取样时, 虫体全部发病, 表现出明显病症: 体壁紧张发亮, 环节肿胀, 体壁易破, 血液为乳白色(吕鸿声和钱纪放, 1982), 陆续死亡。

1.6 引物设计

LAMP 引物设计是采用 Notomi 等(2000)及 Nagamine 等(2002)的设计方法, 用 LAMP 引物设

计在线软件 PrimerExplorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/>) 设计的。由 NCBI 上(登录号为:NC_001962.1)获取家蚕核型多角体病毒基因 *pe38* 序列,设计的一系列引物包括正向外侧引物(F3),反向外侧引物(B3),正向内侧引物(F1P),外向内侧引物(B1P)以及两条环状引物(LF,LB)。引物序列及位置如图 1 和表 1 所示。同时,用 F3 和 B3 作为 PCR 扩增引物。

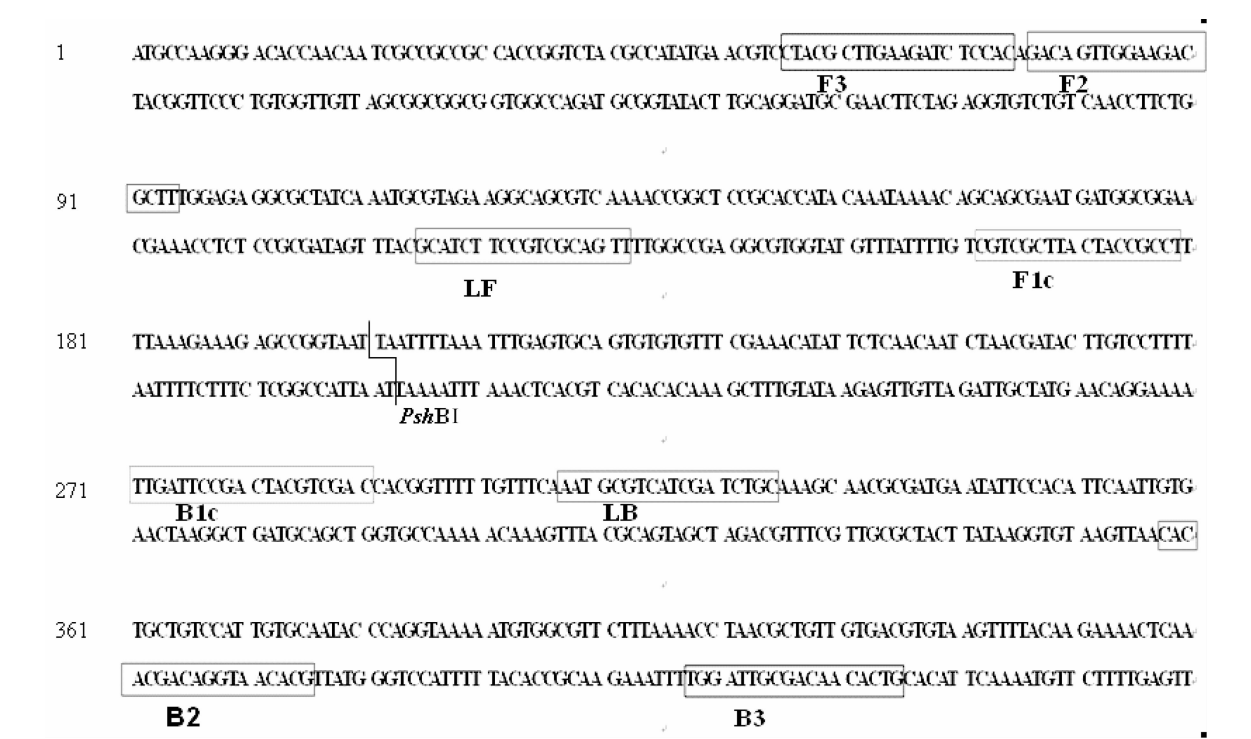


图 1 用于 LAMP 引物设计的靶基因 *pe38* 的片段序列

Fig.1 The nucleic acid sequences of *pe38* used for primer design
位置用方框标注。
The positions are marked by box.

表 1 LAMP 与 PCR 反应引物
Table 1 Primer sets of LAMP and PCR

引物名称 Name of primers	引物序列(5′-3′) Sequences
正向外侧引物 Forward outer primer, F3	CTACGCTTGAAGATCTCCAC
反向外侧引物 Backward outer primers, B3	GTCACAACAGCGTTAGGT
正向内侧引物 Forward inner primers, F1P(F1c + F2)	TCCGCCATCATTCGCTGCGACAGTTGGAAGACGCTT
反向内侧引物 Backward inner primers, B1P(B1c + B2)	TTGATTCCGACTACGTGCGACGCACAATGGACAGCACAC
正向环状引物 Loop primer (LF)	TTGACGCTGCCTTCTACG
反向环状引物 Loop primer (LB)	AATGCGTCATCGATCTGC

1.7 LAMP 产物的检测与鉴定

Loopamp DNA 扩增试剂盒用于 LAMP 反应, LAMP 产物(反应条件为 63℃, 1 h)用琼脂糖凝胶电泳检测,在紫外灯下观察,阳性扩增可见大小不一的梯状条带,阴性及阴性对照则没有条带出现;其次,通过在反应管内添加染料 SYBR Green I 用肉眼观察颜色变化判定结果,绿色为阳性结果,橘黄色为阴性结果(Parid *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010)。反应产物可通过内切酶 *PshB* I 酶切确定产物序列是否正确, *PshB* I 酶切位点如 1 图示。酶切的 LAMP 产物,取 5 μ L,用 2.5% (w/v) 琼脂糖进行检测。

1.8 LAMP 反应条件优化

以 BmNPV 的 DNA 为模板,对 LAMP 反应条件进行优化。在不同温度梯度(61、63、65、67℃),选出最适温度,然后用不同反应时间(30、45、60、75 min),在最适反应温度下反应,筛选出最佳反应时间。以后 LAMP 反应均用优化条件进行。

1.9 LAMP 及 PCR 灵敏度实验

以 F3, B3 为引物扩增的产物克隆到 pMD®

18-T,构建的重组质粒 pMD® 18-pe38,并测序鉴定,作为标准样品。然后,以 10 倍梯度稀释(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7})作为模板,用于 LAMP 与 PCR 灵敏度检测。对于 PCR 反应,反应条件为 94℃ 1 min, 30 个循环包括 94℃ 30 s, 53℃ 15 s, 72℃ 30 s, 最后程序为 72℃ 10 s。LAMP 和 PCR 反应的产物用 2.5% (w/v) 琼脂糖进行检测。同时,在 LAMP 反应管内添加染料 SYBR Green I 用肉眼观察颜色变化判定结果。

2 结果与分析

2.1 LAMP 扩增产物检测与鉴定

在 63℃ 下反应 1 h 后,进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 2(A)所示,阳性扩增可见大小不一的梯状条带,阴性对照则没有条带出现。同时,酶切产物大小片段与预期 230 bp 和 326 bp 相吻合。从而,确定为目的产物。另外,通过在反应管内添加染料 SYBR Green I,观察颜色变化,确定阳性扩增,如图 2(B)所示。

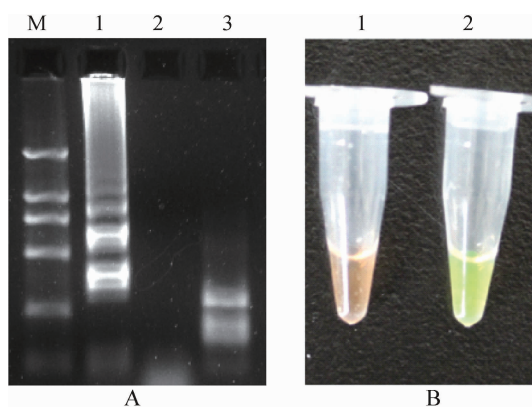


图 2 用电泳(A)和可视法(B)检测 LAMP 产物

Fig. 2 LAMP products detected by electrophoresis analysis (A) and by visual observation (B)

M: DNA 分子标准; 1: 电泳检测以 BmNPV 抽提的 DNA 为模板扩增的 LAMP 产物; 2: 阴性对照; 3: 用内切酶 *PshB* I 酶切鉴定 LAMP 产物; 管子 1: 添加染料 SYBR Green I 可视法检测阳性反应; 管子 2: 阴性反应。

M: DL2000 molecular marker; lane 1: electrophoretic analysis of LAMP products using DNAs extracted from BmNPV; lane 2: negative control reaction; lane 3: LAMP products digestion with *PshB*I; tube 1: positive reaction visualized by adding SYBR Green I; tube 2: negative reaction.

2.2 LAMP 反应条件优化

在不同温度梯度(61、63、65、67℃)下,进行 LAMP 反应 1 h,结果显示 61、63、65℃ 没有明显变

化,67℃ 下结果明显差一些。根据实验,最终以 63℃ 为最佳反应温度,25 min 为最佳反应时间。

2.3 LAMP 与 PCR 方法灵敏度比较

图 3 是以标准质粒 10 倍梯度稀释为模板进行 LAMP 和 PCR 反应的产物凝胶电泳图。图 3 中 LAMP 产物用琼脂糖凝胶电泳检测的结果和可视法检测结果一致,能检测到标准质粒 10^{-6} 的稀释

液。因此用标准质粒作模板,LAMP 最低检测水平为 7 fg(相当于 21 个拷贝)。PCR 扩增产生 DNA 条带大小为 370 bp,其电泳结果显示 PCR 能检测到 10^{-4} 的稀释液,即为 0.7 pg。

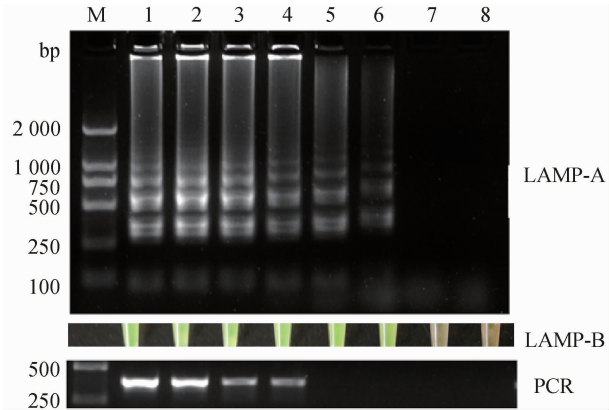


图 3 LAMP 与 PCR 方法灵敏度检测

Fig. 3 Sensitivity of LAMP and PCR assay

M:DNA 分子标准;1~7:标准质粒梯度 10 倍稀释(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7});8:阴性对照;LAMP-A:琼脂糖凝胶电泳检测 LAMP 法扩增的 10 倍梯度稀释的标准样品;LAMP-B:可视法添加 SYBR Green I 染料检测了 LAMP 法的灵敏度;PCR:琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 法扩增的 10 倍梯度稀释的标准样品。

M:DL2000 molecular marker; lanes 1-7 : diluted pMD18-T-(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}); lane 8 : negative control;LAMP-A : agarose gel electrophoresis demonstrating the sensitivity of the LAMP assay using 10-fold serial dilutions of pMD18-T-BT17; LAMP-B : colorimetric analysis using SYBR Green I demonstrating the sensitivity of the LAMP assay; PCR: agarose gel electrophoresis demonstrating the sensitivity of the PCR assay using 10-fold serial dilutions of pMD18-T-BT17.

2.4 接毒样品检测

用 4.86×10^8 OBs/mL 浓度的 BmNPV 多角体病毒感染家蚕 4 龄幼虫,每隔 12 h 取样一次,用所取各时间的试虫血淋巴抽提的 DNA 为模板进行

PCR 扩增。结果如图 4 所示,可见 LAMP 的灵敏度比 PCR 的灵敏度高,PCR 在接毒 36 h 后被检出,而 LAMP 可检测到接毒 12 h 后的样品。

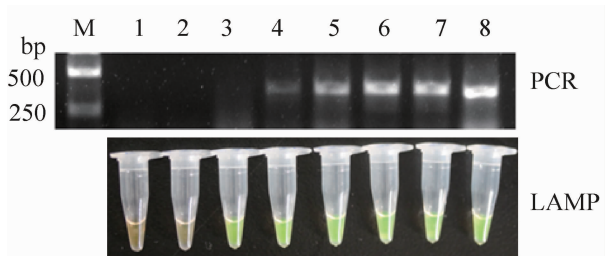


图 4 感染浓度为 4.86×10^8 OBs/mL 的 BmNPV 多角体病毒后家蚕 4 龄幼虫血淋巴的 LAMP 和 PCR 扩增结果

Fig. 4 LAMP and PCR amplifications with hemolymph from silkworm 4th instar larvae infected with BmNPV at 4.86×10^8 OBs/mL

M:DNA 分子标准;1:阴性对照;2~8:接毒后 12、24、36、48、60、72、84 h,取血淋巴抽提的 DNA 为模板。

M:DL2000 molecular marke; lane 1:negative control; lanes 2-8:hemolymph were sampled DNA at the following different time after the larvae infected : 12,24,36,48,60,72,84 h.

3 讨论

家蚕的血液型脓病,是由病原体——BmNPV 所引起的一种传染性蚕病,具有传染性强,发病急的特点,严重危害蚕桑业的发展。快速、准确的发现病原对于采取有效的措施进行早期防控至关重要。LAMP 作为一种新的核酸扩增技术被用于病原物的快速检测和食品卫生的检验(Thau *et al.*, 2004;朱胜梅等,2008;Nimitphak *et al.*, 2010;Wang *et al.*, 2011;Liu *et al.*, 2012)。本文探讨了 LAMP 在早期检测 BmNPV 的优势及其应用的可能性。在本研究中,PCR 检测需 2 h 左右,而 LAMP 检测不到 1 h,体现了时间的优越性;其次,LAMP 扩增的产物可以通过添加染料直接肉眼判别,能快速获取结果,这一点为其在生产中的应用提供了可能性;另外,LAMP 方法简单,结果易于判定,所用到的仪器比起 PCR 仪简单、易操作,充分体现了它的实用性。同时,对家蚕用病毒悬液喂毒后,短时间内试虫血淋巴内复制的多角体量应非常小,而本研究以染病虫血淋巴提取的 DNA 为模板,用 PCR 方法能检测到接毒 36 h 后的样品,LAMP 能检测到接毒 12 h 后的样品,说明 LAMP 方法的灵敏度非常高,可以应用于实践中的早期诊断,为感染发生初期及早检测出传染源(BmNPV),及时采取适当而果断的措施,控制该病的暴发,为蚕业生产作出贡献。

特异基因的筛选对于灵敏度较高的 LAMP 尤为重要,本论文特异基因之所以选择 *pe38* 主要考虑到两方面原因:一方面,*pe38* 基因属于病毒基因组复制所需的基因,并参与病毒基因的表达与基因调节,*pe38* 基因是杆状病毒极早期基因(Krappa and Knebel-Morsdorf, 1991; Carstens *et al.*, 2002; Milks *et al.*, 2003);另一方面,*pe38* 基因只在少数几种昆虫病毒中存在(在 NCBI 中查找到 16 种昆虫病毒中含有此基因),且在每种病毒中序列特异性极高(应用 NCBI 中的 BLAST 比对)。这两个特点使 *pe38* 可能成为很好的靶基因,故选之。由于 LAMP 灵敏度高,这也就极易受到污染而产生假阳性结果,故要特别注意严谨操作。在本文中,除了 DNA 抽提,LAMP 反应液配置,LAMP 产物检测判定都分区进行外,还在反应液中使用了矿物油以减少扩增产物的污染。

LAMP 简单、快速、灵敏度高的优点已被充分

证实。本实验建立的 LAMP 检测 BmNPV 的技术,在蚕业生产上用于早期诊断、治疗监测和病情评估方面有广阔的应用前景。

参考文献 (References)

- Carstens EB, Liu JJ, Dominy C, 2002. Identification and molecular characterization of the baculovirus CfMNPV early genes: *ie-1*, *ie-2* and *pe38*. *Virus Res.*, 83:13 – 30.
- Gomi S, Magima K, Meada S, 1999. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.*, 80:1323 – 1337.
- Krappa R, Knebel-Morsdorf D, 1991. Identification of the very early transcribed baculovirus gene *pe-38*. *J. Virol.*, 65 (2):805 – 812.
- Liu A, Guan GQ, Du PF, Gou H, Zhang J, Liu ZJ, Ma M, Ren QY, Liu JL, Yang JF, Li YQ, Niu QL, Bai Q, Yin H, 2012. Rapid identification and differentiation of *Theileria sergenti* and *Theileria sinensis* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Vet. Parasitol.*, 191(1/2):15 – 22.
- Milks ML, Washburn JO, Willis LG, Volkman LE, Theilmann DA, 2003. Deletion of *pe38* attenuates AcMNPV genome replication, budded virus production, and virulence in *Heliothis virescens*. *Virology*, 310:221 – 234.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T, 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes.*, 16(3):223 – 229.
- Nimitphak T, Meemetta W, Arunrut N, Senapin S, Kialpathomchai W, 2010. Rapid and sensitive detection of *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral-flow dipstick. *Mol. Cell. Probes.*, 24(1):1 – 5.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T, 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 28 (12):e63.
- Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Saxena P, Ambuj S, Sahni AK, Rao PVL, Morita K, 2006. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, 44(11): 4172 – 4178.
- Pringle CR, 1999. Virus Taxonomy-1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of viruses during 1998. *Arch. Virol.*, 144(2):

- 421 – 429.
- Ren W, Renault T, Cai YY, Wang CM, 2010. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 DNA. *J. Virol. Methods.*, 170(1):30 – 36.
- Sambrook JF, Russell DW, 2001. *Molecular Cloning*. NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 32 – 36.
- Thau HTC, Le MQ, Vuong CD, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K, 2004. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Clin. Microbiol.*, 42(5):1956 – 1961.
- Wang YQ, Kang ZH, Gao YL, Qin LT, Chen L, Wang Q, Li JK, Gao HL, Qi XL, Lin H, Wang XM, 2011. Development of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of avian leukosis virus subgroup A. *J. Virol. Methods.*, 173(1):31 – 36.
- Xie QM, Ji J, Pickens TT, Du LQ, Cao YC, Li HM, Wang LG, Ma JY, Bi YZ, 2010. Rapid detection of infectious laryngotracheitis virus isolates by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods.*, 165(1):71 – 75.
- 金伟, 2001. 家蚕病理学. 北京:中国农业出版社. 44 – 58.
- 吕鸿声, 钱纪放(编译), 1982. 昆虫病理学. 杭州:浙江科学技术出版社. 128 – 145.
- 涂纳新, 张志芳, 郭锡杰, 吴祥甫, 1994. 用 PCR 技术诊断家蚕核型多角体病毒病. 蚕业科学, 20(2):124 – 125.
- 王文欢, 曲良建, 王玉珠, 张永安, 2009. 基于 PCR 方法的美国白蛾核型多角体病毒早期检测. 昆虫学报, 52(6):702 – 712.
- 朱胜梅, 吴佳佳, 徐驰, 屈炯, 陈炜, 陈福生, 2008. 环介导等温扩增技术快速检测沙门菌. 现代食品科, 24(7):725 – 730.