

环介导等温扩增技术的引物设计与筛选研究

王德国¹, 王永真², 王爱萍³ (1. 许昌学院食品与生物工程学院河南省博士后研发基地, 河南许昌 461000; 2. 许昌学院公共实验中心, 河南许昌 461000; 3. 郑州大学生命科学学院, 河南郑州 450000)

摘要 [目的]研究引物设计与非特异扩增之间的关系。[方法]以单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的特异性基因 *hlyA* 与沙门氏菌(*Salmonella*)的特异基因 *invA* 为例设计引物,进行环介导等温扩增。[结果]就环介导等温扩增的任何2条引物而言,如果2条引物3'端的3~4碱基在同一条引物上都有2个互补序列,在常用的LAMP反应体系与反应条件下,必然有非特异性扩增,LAMP引物设计与筛选应避免这种情况出现。[结论]按照该试验的原则设计引物,可降低非特异性扩增。

关键词 环介导等温扩增(LAMP);引物设计;非特异性扩增

中图分类号 S188;Q81 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)11-03166-03

Study on Primer Design and Screening of Loop-mediated Isothermal Amplification

WANG De-guo et al (Henan Postdoctoral Research Base, Food and Bioengineering College, Xuchang University, Xuchang, Henan 461000)

Abstract [Objective] To study relationship between primer design and non-specific amplification. [Method] With specific gene *hlyA* of *Listeria monocytogenes* and specific gene *invA* of *Salmonella* as examples, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was conducted. [Result] As far as any two primers of LAMP primers were concerned, there should be non-specific amplification if 3-4 bases at 3' end of both primers had two complementary sequences on a same primer, LAMP primers should be designed and screened to avoid such situation. [Conclusion] LAMP reaction did not have non-specific amplification with primers designed according to above principle.

Key words Loop-mediated isothermal amplification (LAMP); Primer design; Non-specific amplification

日本学者 Notomi 等 2000 年研究报道了环介导等温扩增技术(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)^[1],该技术 2 对引物识别靶序列的 6 个片段,可灵敏、快速、特异性扩增靶序列。而且, Nagamine 等在反应体系中加入环引物进一步缩短了反应时间^[2]。因此,该扩增方法在特异性、灵敏度与检测速度方面优于聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)^[3-4]、核酸序列依赖性扩增法(Nucleic Acid Sequence Based Amplification, NASBA)^[5-6]、链置换扩增(Strand Displacement Amplification, SDA)^[7]、滚环扩增(Rolling Circle Amplification, RCA)^[8]和解链酶扩增技术(Helicase Dependent Amplification, HDA)^[9]。然而,该技术经过大约 15 年的研究与开发还没有被实际应用,由于非特异扩增导致该技术的假阳性率高,有关内容将在别处报道。试验通过引物设计与筛选探索解决非特异扩增的方案以 *L. monocytogenes* 的特异性基因 *hlyA* 与 *Salmonella* 的特异基因 *invA* 为例开展研究,旨在研究引物设计与非特异性扩增之间的关系。

1 材料与方 法

1.1 引物 针对 *L. monocytogenes* 的特异性基因 *hlyA* 采用 PrimerExplorer 4 软件设计了一套 LAMP 引物^[10],在这套引物的研究基础上,针对 *Salmonella* 的特异基因 *invA* 采用 Primer-Explorer 4 与 Oligo7 软件设计筛选了第 2 套 LAMP 引物^[11],如表 1 所示,这 2 套引物均由生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 DNA 模板 为了区分气溶胶污染与非特异扩增以及更好地研究引物设计与非特异扩增之间的关系,试验不提取

L. monocytogenes 的 DNA 模板,也不使用该菌的 DNA 模板;于 37 °C 过夜培养沙门氏菌 *S. enterica* ATCC 13076,使用 UNIQ-10 柱式 DNA 提取试剂盒提取基因组(生物工程(上海)有限公司)。

表 1 *L. monocytogenes* 的 *hlyA* 基因与 *Salmonella* 的 *invA* 基因的 LAMP 引物

编号	Primer	Sequence(5'-3')
1	HLYFIP	CGTGTTCCTTTTCGATTGGCGTCTTTTTTTCATCCATGGCACCAC
2	HLYBIP	CCACGAGATGTCAGTGACAAATGTTTTGGATTTCCTTTTTTCTCCACAAC
3	HLYF3	TTGCCGAACAACTGAAGC
4	HLYB3	GCTTTTACGAGAGCACCTGG
5	HLYLF	TAGGACTTGCAGCGGAGATG
6	HLYLB	GCCAAGAAAAGTTACAAAAGATGG
7	INVFIP	CCGGCTCTTCGGCACAAGTAATTTTTGGACTGATTGGCATCTCG
8	INVBIP	AAGCTCAACTGCGGACCGTTTTTAAACAATACTTC-CGGCAGGC
9	INV3	GGAAGAAAGAGGCTCGTCGT
10	INVB3	ATGCTGTTATCGTCCAGGC
11	INVLF	GGTACGGTCTCTGTAGACTTTA

1.3 *L. monocytogenes* 引物的等温扩增 在 25 μl 的反应体系中,含有 1.25 mmol/L 的 dNTPs,1 mol/L 的甜菜碱(Sigma)、20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)、10 mmol/L 的 KCl、10 mmol/L 的 (NH₄)₂SO₄、6 mmol/L 的 MgSO₄、0.1% 的 Triton X-100、1 × 的 EvaGreen₂、1 × 的 Rox 和 8 U 的 Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase (large fragment, New England Biolabs)^[10],不同反应管中加入不同的引物组合(HLYFIP + HLYBIP + HLYF3 + HLYB3 + HLYLF + HLYLB; HLYFIP + HLYLF; HLYFIP + HLYB3; HLYFIP + HLYLB; HLYFIP + HLYF3; HLYBIP + HLYF3; HLYBIP + HLYLB; HLYF3 + HLYB3),引物 HLY-

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 31172331 和 No. U1204330);河南省高等学校青年骨干教师资助计划项目(No. 2012GGJS-172);许昌学院杰出青年骨干人才培养计划项目。

作者简介 王德国(1975-),男,山东菏泽人,副教授,博士,从事生物化学与分子生物学研究。

收稿日期 2014-03-01

FIP、HLYBIP、HLYF3、HLYB3、HLYLF 和 HLYLB 的浓度分别为 0.8、0.8、0.4、0.4、0.1 和 0.1 mmol/L,为了避免气溶胶交叉污染而确定非特异扩增,所有反应管中均不加 DNA 模板。在 StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 系统 65 °C 扩增 95 min。

1.4 *Salmonella* 引物的 LAMP 反应 反应体系如上,阳性对照与阴性对照中加入 *Salmonella* 的所有 LAMP 引物,阳性对照中加入 10 ng 的 DNA 模板。

2 结果与分析

2.1 *L. monocytogenes* 特异基因 *hlyA* 的 LAMP 引物分析 试验对 7 种不同的引物组合(HLYFIP + HLYLF;HLYFIP + HLYB3;HLYFIP + HLYLB;HLYFIP + HLYF3;HLYBIP + HLYF3;HLYBIP + HLYLB;HLYF3 + HLYB3)进行分析,如图 1 所示,其中 3 对引物组合(HLYFIP + HLYLF;HLYFIP + HLYB3;HLYFIP + HLYLB)存在相同的情况,2 条引物 3' 端的 3~4 个碱基在同一条引物上都有 2 个互补序列;至于引物组合 HLYFIP 与 HLYF3,引物 HLYF3 的 3' 端 3 个碱基在引物 HLYFIP 有 1 个互补序列,引物 HLYFIP 的 3' 端 3 个碱基在引物 HLYF3 有 2 个互补序列;其他 3 对引物组合(HLYBIP + HLYF3,HLYBIP + HLYLB,HLYF3 + HLYB3),在

同一个引物上没有或互补序列较少。

2.2 *L. monocytogenes* LAMP 引物的等温扩增 所有反应管中均未加 *L. monocytogenes* 的 DNA 模板,添加了所有引物的反应管与添加了其他 3 种引物组合(HLYFIP + HLYLF;HLYFIP + HLYB3;HLYFIP + HLYLB)有非特异性扩增,溶解曲线各不相同;至于引物组合 HLYFIP 与 HLYF3,其中 2 个阴性对照有非特异扩增,另 2 个阴性对照无非特异扩增;其他 3 对引物组合(HLYBIP + HLYF3,HLYBIP + HLYLB,HLYF3 + HLYB3)无非特异性扩增。

综合 *L. monocytogenes* 的引物分析与等温扩增试验结果可知,就环介导等温扩增的任何 2 条引物而言,如果 2 条引物 3' 端的 3~4 个碱基在同一条引物上都有 2 个互补序列,在常用的 LAMP 反应体系与反应条件下,必然有非特异性扩增,LAMP 引物设计与筛选应避免这种情况出现。使用 PrimerExplorer 4 软件并按照该结论设计筛选 *hlyA* 的 LAMP 引物,未能筛选出可用的引物;然而,当 *Salmonella* 的 *invA* 基因作为靶序列时,筛选出了一套 LAMP 引物,不存在上述情况,如表 1 和图 2 所示。

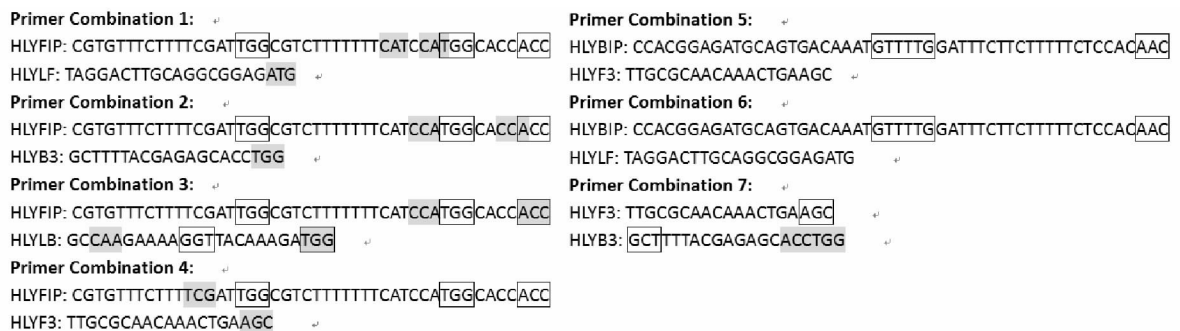


图 1 *L. monocytogenes* 特异基因 *hlyA* 的 LAMP 引物分析

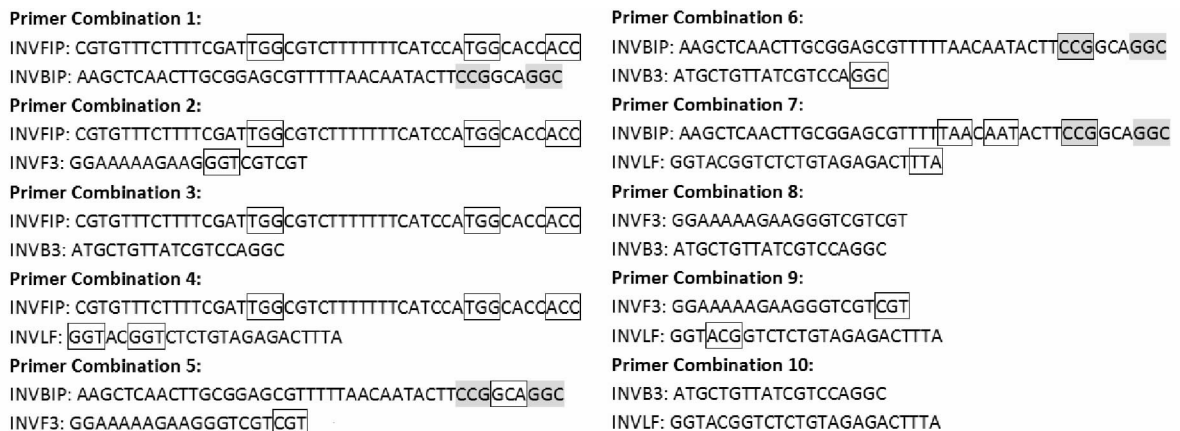


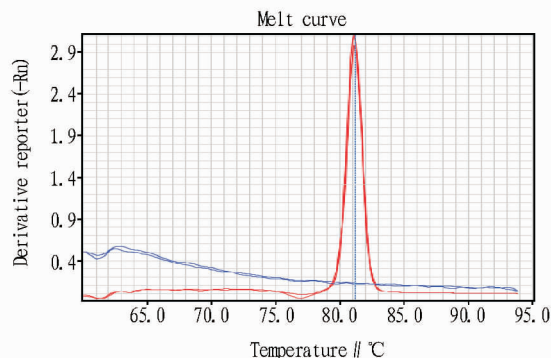
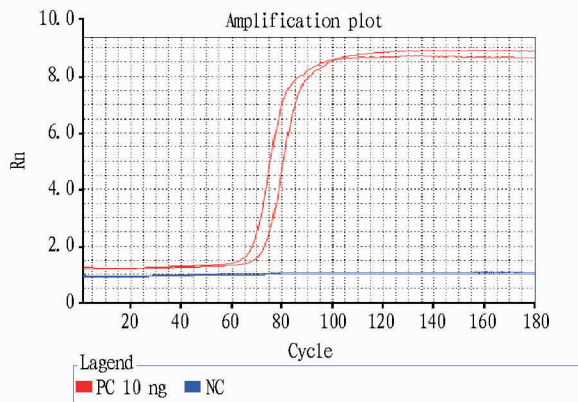
图 2 *Salmonella* 特异基因 *invA* 的 LAMP 引物分析

2.3 *Salmonella* 引物的 LAMP 反应 使用上述引物扩增检测 *Salmonella* 的特异基因 *invA*,2 个阴性对照不存在非特异性扩增,当 DNA 模板为 10 ng/reaction,可以在 35 min 内检出特异基因 *invA*,2 个阳性对照的溶解曲线 T_m 值为 81.17 °C。

3 结论与讨论

目前该领域的科研工作者普遍认为环介导等温扩增技

术灵敏度高,容易产生气溶胶污染,交叉污染是导致假阳性率高的主要原因,在实现不开盖检测方面进行了大量研究与尝试,如浊度法检测^[12]、实时浊度法检测^[13]、荧光染料检测^[14-15]、免疫侧向层析试纸检测^[16]、使用指示剂羟基萘酚蓝检测^[17-18]以及日本荣研公司的钙黄绿素检测,扩增产物的检测手段近乎非常完美,但不开盖检测并没有把环介导等温



注:PC 为阳性对照,10 ng DNA Template/reaction;NC 为阴性对照。

图3 *Salmonella* 特异基因 *invA* LAMP 扩增检测结果

扩增推向实际应用。试验结果表明,导致假阳性的主要原因是引物二聚体引起的非特异性扩增,通过调整反应调节可明显降低非特异性扩增,该研究成果已投其他期刊报道。为了增强 LAMP 的特异性扩增,试验重点研究了引物设计与非特异性扩增之间的关系,在引物设计与筛选方面探索降低 LAMP 非特异性扩增的方法。

试验表明,就环介导等温扩增的任何 2 条引物而言,如果 2 条引物 3' 端的 3~4 碱基在同一条引物上都有 2 个互补序列,在常用的 LAMP 反应体系与反应条件下,必然有非特异性扩增,LAMP 引物设计与筛选应避免这种情况出现,但这种非特异性扩增的机理需要进一步研究。以 *Salmonella* 的特异基因 *invA* 为靶序列,设计筛选出一套 LAMP 引物不存在这种情况,并且阴性对照不存在非特异性扩增。

总之,LAMP 检测的假阳性主要是引物之间的非特异性扩增引起的。因此,引物设计与筛选至关重要^[19],试验提出了一种引物设计与筛选的方法,有助于 LAMP 技术的快速推广应用。

参考文献

- [1] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28:63.
- [2] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16:223-229.
- [3] SAIKI R K, SCHARF S, FALOONA F, et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia[J]. *Science*, 1985, 230:1350-1354.
- [4] SAIKI R K, GELFAND D H, STOFFEL S, et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase [J]. *Science*, 1988, 239:487-491.
- [5] COMPTON J. Nucleic acid sequence-based amplification[J]. *Nature*, 1991, 350:91-92.
- [6] FAHY E, KWONG D Y, GINGERAS T Y. Self-sustained sequence replication(3SR): an isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR[J]. *Genome Res*, 1991, 1:25-33.
- [7] WALKER G T, FRAISER M S, SCHRAM J L, et al. Strand displacement

- amplification-an isothermal, in vitro DNA amplification technique[J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20:1691-1696.
- [8] LIZARDI P M, HUANG X, ZHU Z, et al. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification[J]. *Nat Genet*, 1998, 19:225-232.
- [9] VINCENT M, YAN X, KONG H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification[J]. *EMBO Reports*, 2004, 5:795-800.
- [10] TANG M J, ZHOU S, ZHANG X Y, et al. Rapid and Sensitive Detection of *Listeria monocytogenes* by Loop-Mediated Isothermal Amplification[J]. *Curr Microbiol*, 2011, 63(6):511-516.
- [11] HARA-KUDO T, YOSHINO M, KOJIMA T, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*[J]. *EMS Microbiology Letters*, 2005, 253(1):155-161.
- [12] DEVIKA P, MANOJKUMAR B, MOHANAKUMARAN N, et al. Optimisation of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Macrobrychium rosenbergii* nodavirus and extra small virus in *Macrobrychium rosenbergii* [J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 167:61-67.
- [13] PERERA N, AONUMA H, YOSHIMURA A, et al. Rapid identification of virus-carrying mosquitoes using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 156:32-36.
- [14] REN X F, LI P C. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virus Genes*, 2011, 42:229-235.
- [15] PROMPAMORN P, SITHIGORNGUL P, RUKPRATANPORN S, et al. The development of loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 52:344-351.
- [16] LEE M F, CHEN Y H, PENG C F. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA hybridization assay for molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 76:174-180.
- [17] CARDOSO T C, FERRARI H F, BREGANO L C, et al. Visual detection of turkey coronavirus RNA in tissues and feces by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification(RT-LAMP) with hydroxynaphthol blue dye[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2010, 24:415-417.
- [18] 张侃, 蒋菲, 张跃伟, 等. 羟基萘酚蓝在伪狂犬病毒环介导等温扩增检测方法中的应用[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(6):1075-1080.
- [19] LI S L, ZHANG X B, WANG D G, et al. Simple and Rapid Method for Detecting Foodborne *Shigella* by a Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)[J]. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 2009, 17(4):465-475.