

环介导等温扩增快速检测 EBV DNA 对鼻咽癌诊断的意义*

聂国辉¹ 董洪松¹ 何贵华¹ 徐小平¹ 石磊² 曹以诚² 陈洵²

【摘要】 目的:建立环介导等温扩增技术快速检测 EB 病毒的方法,为鼻咽癌的早期诊断提供辅助手段。方法:利用煮沸法快速提取样品中病毒 DNA,使用环介导等温扩增技术检测 EB 病毒特异基因片段,在等温条件下于 1 h 内完成检测过程。结果:环介导等温扩增技术在对 33 份临床标本的检测中显示了较高的特异性,较现有的 PCR 技术更加简便快速,能在等温条件下进行,不需复杂的仪器设备,检测成本大大降低。结论:本研究为鼻咽癌临床检测提供了一个快速简便的新辅助方法。

【关键词】 鼻咽肿瘤;环介导等温扩增;EB 病毒

【中图分类号】 R739.63 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1001-1781(2008)12-0555-03

The value of loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of EBV DNA

NIE Guohui¹ DONG Hongsong¹ HE Guihua¹ XU Xiaoping¹
SHI Lei² CAO Yicheng² CHEN Xun²

(¹Department of Otolaryngology, Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, 518035, China; ²South China University of Technology)

Abstract **Objective:** To establish a rapid method for EBV detection with loop-mediated isothermal amplification (LAMP), and to make it as a clue for early diagnosis of nasopharyngeal carcinoma cancer. **Method:** EBV DNA was fast extracted from samples after boiling, while the whole detection will be finished within an hour with specific amplification of EBV gene by LAMP. **Result:** High specificity was shown from EBV detection of 33 clinical samples. Comparing with PCR, LAMP is more simple and convenient to perform under isothermal conditions, and require no special apparatus, thus, it is more economical and practical. **Conclusion:** LAMP analysis of EBV may be an efficient and easy way for clinical diagnosis of nasopharyngeal carcinoma.

Key words Nasopharyngeal neoplasms; Loop-mediated isothermal amplification; Epstein-Barr virus

EB 病毒(EBV)感染与鼻咽癌密切相关,在鼻咽癌组织中几乎均可检测到 EBV 抗体或其 DNA^[1,2]。因此 EBV 可作为鼻咽癌的标志物^[3]。EBV 易通过密切接触传播,主要侵犯 B 淋巴细胞。EBV 分离培养困难,临床一般用血清学方法和分子生物学方法辅助诊断。目前较多实验室采用酶联免疫吸附试验(ELISA)或免疫荧光技术检测血清中特异性 EBV 抗体,以及基于核酸检测的 PCR 和 RT-PCR 方法^[4]。本研究建立环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术检测 EBV DNA 的方法,并与 PCR 方法作比

较,为鼻咽癌早期诊断提供辅助手段。

1 材料与方法

1.1 材料

经确诊的 33 例鼻咽癌患者血清样品来源于深圳市第二人民医院, LAMP 反应基础液由广州华峰生物科技有限公司提供,引物合成由广州英骏生物技术有限公司合成(表 1)。

1.2 样品处理

取被检者静脉血 2~3 ml,收集于无菌离心管中,2500 r/min 离心 8 min,吸取血清转入另一无菌离心管中备用。待测样本在 2~8℃ 保存不应超过 24 h。

样品 DNA 使用煮沸法快速提取,按广州华峰生物科技有限公司病毒基因组快速提取试剂盒方法操作,步骤如下:取血清样品 50 μl 于一洁净

* 2008 年深圳市科技计划资助项目(No:2080094)

¹ 深圳市第二人民医院耳鼻咽喉科(广东深圳,518035)

² 广州华南理工大学

通讯作者:聂国辉(Email: nghui@21cn.com)

[8] SOLARI D, MAGRP F, CAPPABIANCA P, et al. Anatomical study of the pterygopalatine fossa using an endoscopic endonasal approach: spatial relations and distances between surgical landmarks[J]. J Neurosurg, 2007, 106: 157-163.

[9] BASSIM M K, SENIOR B A. Endoscopic anatomy of the parasellar region[J]. Am J Rhinol, 2007, 21: 27-31.

[10] 文卫平,李健,史剑波,等.内窥镜下与颅底有关的鼻

腔鼻窦解剖标志的研究[J].中国临床解剖学杂志, 2005, 23(4): 381-384.

[11] 霍彦明,严勇兰,孙九爱,等.手术导航中精度问题的研究[J].北京生物医学工程,2002, 21(3): 230-233.

[12] 乔莉,邱建华,陈福权,等.影像导航系统在复杂鼻内镜手术中的作用和评价[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2007, 21(11): 489-490, 493.

(收稿日期:2007-11-01)

表 1 本研究使用的引物

引物	序列
F3	5'-GCATGTTTGAGTCCCGCTG-3'
B3	5'-CCATTGCTGTGGAAGTGCC-3'
FIP	5'-CACCCAACAAGGCAGGACGCTTTTGCTGAACATTAGCATCCCGG-3'
BIP	5'-GTGCCTGGGCTGCAATTTACTTTTGCATCTGGTGGGCATTTC-3'

1.5 ml离心管中,加入等体积裂解液 1,振荡混匀;置 80℃水浴中 10 min,转至冰浴中静置 10 min;10 000 r/min离心 5 min,取上清 50 μ l 于另一新的洁净 1.5 ml 离心管中;加入等体积裂解液 2,振荡混匀,即为 LAMP 反应模板;置 -20℃可长期保存备用。

1.3 LAMP 反应体系

总反应体系 25 μ l,包括 2 个内引物 FIP 和 BIP 各 0.8 μ mol/L,2 个内引物 F3 和 B3 各 0.2 μ mol/L,通用 LAMP 反应液 19 μ l(包括 dNTP 各 400 μ mol/L、Bst 酶 0.5 μ l 和 10 $\times$ Buffer 2.5 μ l、甜菜碱 1 mol/L、硫酸镁 4 mmol/L)和 2.5 μ l 样品 DNA 溶液。将反应管置 65℃水浴锅中保温 1 h;小心取出反应管冷却至室温结束反应,在通风橱中向反应管中加入 2 μ l 显色液,观察检测结果。

1.4 PCR 对照实验

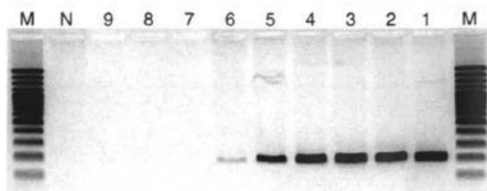
以外引物 F3 和 B3 做 PCR 反应为对照,探讨 PCR 与 LAMP 灵敏度特性。取阳性血清样品 1 例,按以上样品处理方法提取 DNA 模板,对样品 DNA 提取液用无菌水进行 10 倍梯度稀释,获得 10^{-1} ~ 10^{-9} 不同稀释度的样品 DNA 溶液;同时进行 PCR 反应及 LAMP 检测,比较两方法的参数差异,见表 2。PCR 反应按本实验室常规方法进行。

1.5 结果观察

将 PCR 和 LAMP 扩增产物各取 5 μ l 在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分析,BioRed 凝胶成像系统拍照并记录结果。

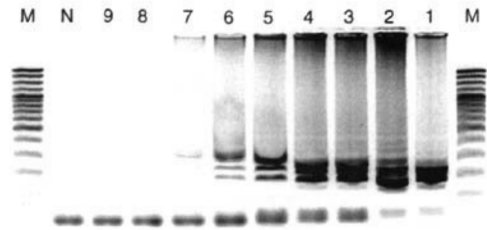
2 结果

33 例确诊为鼻咽癌患者的血清样品,EBV PCR 和 LAMP 检测结果均为阳性,用同一血清样本分别进行 PCR 和 LAMP 扩增的电泳结果如图 1 和图 2 所示。



M:100 bp DNA 分子量标准;1~9:分别代表 10^{-1} ~ 10^{-9} 模板稀释梯度 PCR 结果;N:阴性对照

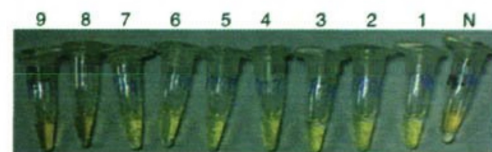
图 1 PCR 检测结果电泳图



M:100 bp DNA 分子量标准;1~9:分别代表 10^{-1} ~ 10^{-9} 模板稀释梯度 LAMP 结果;N:阴性对照

图 2 LAMP 检测结果电泳图

LAMP 反应结束后,加入显色液,通过颜色变化可肉眼直接判断结果,阳性反应为绿色荧光,阴性反应为橙色,可使用普通数码相机拍照并记录结果(图 3)。



此结果与图 2 样品对应;N:阴性对照;1:样品 10^{-1} ;2:样品 10^{-2} ;3:样品 10^{-3} ;4:样品 10^{-4} ;5:样品 10^{-5} ;6:样品 10^{-6} ;7:样品 10^{-7} ;8:样品 10^{-8} ;9:样品 10^{-9}

图 3 由数码相机记录的 LAMP 反应结果

将同一份血清样本稀释不同的倍数后分别用两种方法进行扩增,以比较其灵敏度(表 2)。

分别采用患者血清、正常人血清样品进行特异性实验,结果见表 3。

表 2 PCR 与 LAMP 技术参数比较统计表

技术参数	PCR	LAMP
灵敏度	10^{-6}	10^{-7}
特异性	33/33	33/33
操作时间	>2 h	<1.5 h
仪器使用	PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪	水浴锅

表 3 LAMP 方法特异性

样品类型	例数	LAMP 检测阳性	LAMP 检测阴性
EBV 感染阳性血清	33	33	0
正常阴性血清	10	0	10

分别选取阴性血清和阳性血清样品各 1 份,进行 5 次重复实验,结果:EBV 阳性血清者,LAMP 检测阳性 5 次,无阴性者;正常阴性血清者,LAMP 检测阴性 5 次,无阳性者。

3 讨论

根据世界卫生组织的粗略统计,全世界大约 80% 的鼻咽癌发生在中国,其中绝大部分集中在广东省。EBV 是该恶性肿瘤的重要标志物,给人们的健康带来严重威胁。因此,准确、高效地检测 EBV 感染,对鼻咽癌早期诊断和治疗具有重要意义。

目前 PCR 方法已被广泛用作临床疾病快速诊断的辅助手段,并获得普遍认可;但目前的检测方法技术难度较高,对操作要求、设备条件、工作环境均有较高的标准,仍不能进行广泛的普及和推广,特别是在医疗条件相对落后的地区更难以开展。

本研究探讨了新的体外扩增技术——LAMP 技术应用于临床 EBV 快速检测的可能性;从结果中我们可以看到,与常规 PCR 方法比较,当样品模板稀释至 10^{-6} 时 PCR 反应已经很难得到明确的结果,而 LAMP 反应结果到 10^{-7} 依然能够清晰地通过肉眼判断(图 3)。许多研究表明,LAMP 技术可检测到 10 个拷贝数甚至更低的靶标,在检测灵敏度上具有更大的优势。同时在特异性和重复性实验中,LAMP 反应均表现出较好的适用性,此方法在临床早期诊断中具有广阔的应用前景。

LAMP 技术由 Notomi 等^[5]首次报道,该技术利用 *Bst* DNA 聚合酶和根据不同靶序列设计的两对特殊的内、外引物,特异性识别靶序列上的 6 个独立区域,启动循环链置换反应。LAMP 反应的中、内引物结合在目标 DNA 区,启动互补链合成,导致哑铃状 DNA 产生。这种结构在酶的催化下以自身为模板,进行 DNA 合成延伸,形成茎-环 DNA 结构,在引物和自身结构的作用下实现靶序列的高效循环扩增。该方法全过程在恒温下完成,应用极其简便,仅需要 4 条合适的引物,*Bst* DNA 聚合酶和水浴箱或隔热装置即可进行。结果鉴定方便,可直接肉眼判断,非常适合高通量的快速筛查。

LAMP 技术主要特点为,以 4 条引物识别靶序列中的 6 个区段,并由其中可识别靶标 4 个位点的两条引物通过自身环化的方式引导链延伸的循环。这一特点提高了方法的特异性,从而有效降低了假阳性或交叉反应。同时,由于这种特殊的引物设计,使得引物介导的链延伸循环过程和子代 DNA 自身环化形成茎环结构引导链延伸过程同时存在,因此反应效率很高,可在 1 h 内实现 10^9 扩增。由此消耗的大量 dNTP 释放出的焦磷酸与体系中的镁离子形成乳白色焦磷酸镁沉淀,引起浊度变化,

可用于结果判断。然而本研究发现,通过肉眼判断浊度十分困难,在灵敏度比较实验中,仅 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ 稀释样品可观察到浊度变化(资料未显示),要求更精确的结果只能依赖仪器;而加入显色液后,我们可轻松准确地判读至 10^{-7} 稀释样品,检测过程无需额外设备,同时也省去了常规 PCR 方法需要电泳分析的操作,大大降低了技术的使用成本,易于普及、推广。

国内外众多学者应用 LAMP 技术对许多病原菌进行快速检测^[6~8],但未见该技术应用于鼻咽癌的辅助诊断。本研究利用鼻咽癌标志物——EBV,建立了鼻咽癌 LAMP 快速诊断新方法。本研究方法在灵敏度、特异性、高通量、高效性等方面均达到甚至优于传统的 PCR 方法;操作简单快速、使用成本低,有望成为鼻咽癌诊断的新方法。

参考文献

- [1] LO Y M, CHAN L Y, LO K W, et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Res, 1999, 59: 1188—1191.
- [2] DARDARI R, HINDERER W, LAND D, et al. Antibody responses to recombinant Epstein-Barr virus antigens in nasopharyngeal carcinoma patients: complementary test of ZEBRA protein and early antigens p54 and p138[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39: 3164—3170.
- [3] KRISHNA S M, JAMERS S, KATTOOR J, et al. Serum EBV DNA as a biomarker in primary nasopharyngeal carcinoma of Indian origin[J]. Jpn J Clin Oncol, 2004, 34: 307—311.
- [4] GULLEY M L. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases[J]. J Mol Diagn, 2001, 3: 1—10.
- [5] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28: e63.
- [6] YOSHIKAWA T, IHIRA M, AKIMOTO S, et al. Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42: 1348—1352.
- [7] OHTSUKA K, YANAGAWA K, TAKATORI K, et al. Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification and characterization of *Salmonella* isolates[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 6730—6735.
- [8] KUBOKI N, INOUE N, SAKURAI T, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 5517—5524.

(收稿日期: 2008-02-25)