

表 1 两组临床总有效率比较情况  $n(\%)$ 

组别	$n$	显效	有效	无效	总有效率
观察组	30	20	9	1	29(96.67)
对照组	30	18	10	2	28(93.33)

表 2 两组临床效果比较情况  $n(\%)$ 

组别	例数	复发率	存活率	转移率	美容效果满意度
观察组	30	1(3.33)	29(96.67)	3(10.00)	26(8.67)
对照组	30	1(3.33)	28(93.33)	6(20.00)	5(16.67)

**讨论** 乳腺癌是一种较为常见的疾病,若不能及时治疗对患者的正常生活会带来很大的影响。随着经济的发展,人们的生活压力也在逐渐加重,这就造成了乳腺癌发病率的快速上升。因此,采取有效的治疗方式非常重要<sup>[7]</sup>。乳房对女性来说十分重要,不但起着哺乳婴儿的作用,也是女性的象征。对年龄较低的患者进行治疗时,切除乳房的方式患者很难接受<sup>[8]</sup>。切除虽然能起到较好的治疗效果,但会对患者生活状况以及心理造成很大的影响。患者在完成手术之后会出现严重的心理问题,对预后也有影响。因此保留乳腺术在临床治疗中得到了较为广泛的应用,不仅疗效好,还能使患者的乳房不受影响<sup>[9]</sup>。这种以患者为中心的治疗方式,可有效避免患者受到太大的心理压力,同时,术后的复发率也有明显下降。

本研究对患者的疗效以及心理状况进行比较之后发现,对患者的近期治疗效果较为显著,两种方式的治疗效果基本相同<sup>[10]</sup>。对远期疗效的比较发现,两组患者的存活的情况以及复发情况基本相同。对疾病的美容效果以及转移率的比较显示,保留乳腺手术在完成治疗之后的转移效果以及患者生

活质量的提升有着很大的优势。并且保留乳腺的方式能够避免患者出现心理问题,极大提升了患者的生活质量。

以上表明,保留乳腺的治疗方式能够在早期乳腺癌治疗的过程中起到很好的治疗效果,在近期和远期治疗的过程中所取得的治疗效果和传统治疗的方式所取得的治疗效果基本相应,并且在减小转移率方面明显优于传统的治疗方式。而且还能避免患者出现心理问题,提升患者的生活质量,值得在患者治疗的过程中广泛使用。

### 参 考 文 献

- [1] 方明.早期乳腺癌保留乳腺手术治疗的疗效分析[D].实用妇科内分泌杂志(电子版),2016,3(13):65-67.
- [2] 胡进,夏灏.早期乳腺癌患者应用保留乳腺手术治疗的效果研究[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(22):54-56.
- [3] 严雄,潘长海.分析早期乳腺癌保留乳腺手术治疗的临床价值[D].实用妇科内分泌杂志(电子版),2017,4(6):47-48.
- [4] 李晓明.早期乳腺癌保留乳腺手术治疗的临床效果[J].临床医药文献电子杂志,2017,4(42):8166-8168.
- [5] 王超,杨元勋.早期乳腺癌保留乳腺手术治疗的临床价值分析[J].中国实用医药,2017,12(28):34-35.
- [6] 高山.早期乳腺癌保留乳腺手术治疗的疗效分析[J].中国现代药物应用,2016,10(05):59-60.
- [7] 刘振华.保留乳腺手术治疗早期乳腺癌患者的临床疗效[J].医疗装备,2016,29(10):122-123.
- [8] 关竹.早期乳腺癌保留乳腺手术治疗的疗效分析[D].实用妇科内分泌杂志(电子版),2016,3(5):85-86.
- [9] 王庆祝.探讨保留乳腺手术治疗早期乳腺癌的临床疗效[J].中国实用医药,2016,11(21):97-98.
- [10] 翟杨海.早期乳腺癌保留乳腺手术治疗的疗效分析[J].基层医学论坛,2015,19(30):4217-4218.

(收稿日期:2018-01-10)

(本文编辑:郭俊杰)

## · 技术 · 方法 ·

# 环介导等温扩增技术在弓形虫感染小鼠腹腔液检测中的应用

郭俊杰 许妹珍 林颖悦 邓宏瑜 赵艳玲

**【摘要】** 目的 环介导等温扩增(LAMP)检测弓形虫感染小鼠腹腔液的反应条件及反应体系的优化与筛选。**方法** 建立弓形虫感染小鼠模型,酚氯仿法抽提小鼠腹腔液 DNA 作为反应模板,在弓形虫大小为 529 bp 的高度重复序列中选择一段靶序列设计内外引物,建立 LAMP 反应并对反应体系及条件中  $Mg^{2+}$ 、甜菜碱及反应温度条件进行优化。**结果** 所建立的 LAMP 反应以  $Mg^{2+}$  浓度和反应温度影响较为明显,而甜菜碱浓度变化的影响不大,优化后的 LAMP 反应体系能够特异性扩增弓形虫感染小鼠的腹水微量 DNA,且对日本血吸虫、肝吸虫及盾盘吸虫的 DNA 的扩增显示为阴性。**结论** 以弓形虫 529 bp 建立并优化后的 LAMP 技术可以检测到弓形虫微量 DNA,并且具有较好的特异性,可对人体弓形虫轻度感染诊断技术的建立提供一定的科学依据。

**【关键词】** 弓形虫; 腹水; LAMP; 核酸检测

[中图分类号]R382 [文献标识码]A DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2018.03.023

基金项目:齐齐哈尔市科学技术计划项目(SFZD-2012107)

作者单位:161006 齐齐哈尔医学院医学技术学院(郭俊杰),齐齐哈尔医学院 2013 级检验技术专业(许妹珍、林颖悦),齐齐哈尔医学院 2017 级检验技术专业(邓宏瑜),齐齐哈尔医学院 2015 级检验技术专业(赵艳玲)

通信作者:郭俊杰,Email: gjj72@126.com

**The application of loop-mediated isothermal amplification method for detection of ascites of Toxoplasma gondii infected mice** GUO Jun-jie. School of technology, Qiqihar medical College, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China

**【Abstract】 Objective** To optimize and scan the system of loop-mediated isothermal amplification method for detection of ascites of Toxoplasma gondii infected mice. **Methods** Firstly, toxoplasma gondii infected mice model was established. Phenol chloroform extraction method was used to extracted DNA from ascites of Toxoplasma gondii infected mice, and it was used as template for LAMP. Primers were selected and designed based on 529 bp fragment in Toxoplasma gondii genome, and then the system of LAMP were established and optimized, including  $Mg^{2+}$ , Betaine and reaction temperature. **Results** In the LAMP reaction, the concentration of  $Mg^{2+}$  and reaction temperature present more influence for reaction result, and the LAMP technology can find ascites DNA template from toxoplasma infected mice, and it's negative in finding schistosoma japonicum DNA, liver fluke DNA and shield plate trematode DNA. **Conclusions** This LAMP system can find trace amounts DNA from ascites of Toxoplasma gondii infected mice, and The LAMP had good specificity.

**【Key words】** Toxoplasma gondii; Ascite; LAMP; Nucleic acid detection

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是可寄生于所有有核细胞内的一种专性细胞内寄生虫。不同国家和地区感染率不同,约为 0.6%~0.94%,近年来我国因饮食习惯的改变及饲养宠物人群的增多,弓形虫感染者及病人逐渐增多,特别是育龄妇女妊娠期感染可造成胎儿的先天性感染,严重者可导致畸形甚至死胎<sup>[1]</sup>。但弓形虫病多数人感染后呈现为隐性感染状态,临床表现多样,病原体检测取材较为困难。目前临床中常用的血清学检测亦存在着无法进行早期感染及预后疗效考核,检测的敏感性和特异性不够理想。环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification method, LAMP)方法是目前在食品检疫及多种病原体检测中已经广泛应用的一种新型核酸检测方法,检测灵敏度高,特异性强<sup>[2]</sup>。弓形虫 529 bp 序列在基因组中具有拷贝数高、虫株间高度保守的优势可作为弓形虫分子生物学诊断技术的首选靶基因<sup>[3]</sup>。本研究以弓形虫 529 bp 高度重复序列为扩增靶序列建立并优化一种检测迅速且肉眼直接观察结果的方法-LAMP 检测法。

### 一、资料和方法

1. 标本来源与实验动物模型的建立:刚地弓形虫 RH 株(国际强毒株)由安徽科技大学寄生虫教研室惠赠。采用昆明种小鼠(购自齐齐哈尔医学院实验动物中心),雌性,体重 20~25 g,腹腔注射弓形虫 RH 株悬液,常规饲养。

2. LAMP 主要试剂及引物设计:SYBR Green I、Betaine 和  $MgSO_4$  (sigma 公司)、Bst DNA 聚合酶(New England Biolabs 公司。)根据 GenBank 中弓形虫 529bp 重复序列(AF-146527),利用引物设计软件设计 LAMP 引物,引物由上海生工合成。引物序列如下:FIP: tca tca tcg cct tca agg act aca gac gcg atg c, BIP: tgg ttg gga agc gac gag agt tcc agg aaa agc agc caa g, F3: cca cag aag gga cag aag tc, B3: tcc ggt gtc tet ttt tcc ac

3. 方法:(1)标本的收集:弓形虫感染小鼠于感染后 8 天处死,收集腹水,置-20℃冰箱保存。肝吸虫及盾盘吸虫由本教研室保存,日本血吸虫由苏州大学寄生虫学教研室惠赠。(2)DNA 模板的制备:肝吸虫成虫及盾盘吸虫成虫 DNA 模板的提取采用常规组织 DNA 提取方法<sup>[4]</sup>;弓形虫感染小鼠腹水 DNA 模板的抽提方法如下:腹水提取液 400  $\mu$ L 中加入弓形虫感染小鼠腹水 200  $\mu$ L 和 7.5  $\mu$ L 蛋白酶 K (20 mg/ml), 55℃水浴 10 min;离心后加入等体积酚:氯仿:异戊醇,振荡混

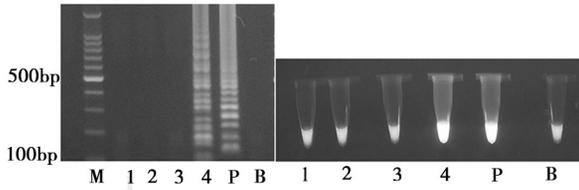
匀,1,2000 r/min 离心 10 min;重复一次后取上清加入等体积氯仿:异戊醇,振荡混匀,离心取上清加入 1/10 体积 NaAc (3 M) 和 2 倍体积的预冷无水乙醇,-20℃沉淀 30 min;取出 EP 管,1,2000 r/min 离心 10 min。倒去上清加入 1 mL 75% 常温乙醇洗涤 1 h;重复一次,置于 55℃干燥箱中烘干,加入 20  $\mu$ L TE 缓冲液,4℃过夜溶解沉淀并保存备用。(3)弓形虫 LAMP 法扩增体系的建立:反应体积 25  $\mu$ L,其中包括:10 $\times$ Bst-DNA polymerase Buffer 2.5  $\mu$ L, 50 mmol/L  $MgSO_4$  2.0  $\mu$ L, 10mmol/LdNTP 2.5  $\mu$ L, 10 mol/L Betaine 2.0  $\mu$ L, 20  $\mu$ M F3、B3 各 0.8  $\mu$ L, 20  $\mu$ M FIP、BIP 各 1.6  $\mu$ L, 8,000U/ml Bst-DNA polymerase 1  $\mu$ L, 模板 DNA 5  $\mu$ L, 补水至 25  $\mu$ L, 混匀,65℃水浴 90 min。(4)弓形虫 LAMP 反应体系的特异性:用上述实验中获得 LAMP 反应体系及程序分别对肝吸虫、日本血吸虫、盾盘吸虫基因组 DNA、弓形虫腹水 DNA、弓形虫 RH 混悬液、双蒸水(空白对照)进行扩增,电泳观察扩增结果。(5)基于 529 bp 靶序列的弓形虫 LAMP 检测方法反应体系及反应条件的优化:以弓形虫 DNA 为模板,分别对反应温度(63℃、64℃、65℃),反应体系中  $MgSO_4$  浓度(2、3、4、5、6mmol/L),反应体系中 Betaine 浓度(0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L),反应体系中外引物:内引物比例(1:2、1:4、1:6、1:8)优化。反应结束后加入 5  $\mu$ L 的 1:80 的 SYBR Green I DNA 5  $\mu$ L,肉眼观察扩增产物颜色的变化,绿色荧光表示扩增反应为阳性,荧光染料颜色不变为阴性;同时进行 2% 琼脂糖凝胶电泳观察结果,以观察到典型的梯状条带判定为阳性,二者相结合结果一致的最终判定为阳性反应。

### 二、结果

1. LAMP 反应检测弓形虫 DNA 体系的建立:通过对影响 LAMP 反应几个主要因素的优化,我们建立了最适的反应体系,利用该体系,可扩增出 LAMP 产物特有的梯状条带。获得优化后的 LAMP 反应体系反应体积 25  $\mu$ L,其中包括:10 $\times$ Bst-DNA polymerase Buffer 2.5  $\mu$ L, 50 mmol/L  $MgSO_4$  2.0  $\mu$ L, 10 mmol/LdNTP 2.5  $\mu$ L, 10 mol/L Betaine 2.0  $\mu$ L, 20  $\mu$ M F3、B3 各 0.4  $\mu$ L, 20  $\mu$ M FIP、BIP 各 1.6  $\mu$ L, 8,000U/ml Bst-DNA polymerase 1  $\mu$ L, 模板 DNA 5  $\mu$ L, 补水至 25  $\mu$ L, 混匀,64℃水浴 80 min。

2. LAMP 反应体系的特异性:用建立的 LAMP 方法分别

扩增肝吸虫基因组 DNA、日本血吸虫基因组 DNA、盾盘吸虫基因组 DNA、弓形虫感染小鼠腹水 DNA、弓形虫 RH 株混悬液 DNA 及双蒸水。结果显示弓形虫 529 靶序列与肝吸虫、日本血吸虫及盾盘吸虫均未出现 LAMP 梯形条带,弓形虫感染小鼠腹水中检测到特异性的 LAMP 梯形条带。见图 1。



M:100bp DNA Marker;1~3:依次为肝吸虫、日本血吸虫、盾盘吸虫的成虫DNA; 4: 感染弓形虫小鼠腹水DNA; P: 弓形虫RH株混悬液DNA; B: 空白对照(双蒸水)

图 1 529bp 靶序列的 LAMP 检测的特异性

**讨论** 弓形虫病目前常用方法主要有病原学及血清免疫学方法二种,病原学方法操作较复杂,而且低度感染者容易漏检;血清学检测有存在无法进行早期诊断等不足。LAMP 操作简单、反应所需时间短、特异性高,已经在多个领域广泛开展。LAMP 法具有 4 种特异引物,采用的链置换 DNA 聚合酶(Bst DNA polymerase)在恒温(65℃左右)中作用 1~1.5 h,即可完成扩增反应,采用肉眼观察来判断反应结果,在对疟原虫<sup>[5]</sup>、卫氏并殖吸虫<sup>[6]</sup>及多种病毒<sup>[7]</sup>的研究中获得了较好的应用评价。其中卫氏并殖吸虫病的敏感性检测结果显示 LAMP 法可达到 PCR 法的 100 倍,猪胃肠炎病毒 LAMP 法敏感性检测为普通 PCR 的 10 倍,与巢式 PCR 检测敏感性相当。近年来,多位学者开始研究 LAMP 法在弓形虫 DNA 的检测效果。检测选择的靶序列主要有 B1、SAG1、SAG2、SAG3 以及弓形虫 529 bp 序列,其中 529 bp 序列以其在基因组中拷贝数最高、且具有高度保守性,已经成为目前弓形虫核酸诊断技术的首选靶基因。因此,本实验选用了弓形虫这段 529 bp 大小的重复片段作为扩增靶基因,LAMP 扩增结果显示可以在弓形虫感染小鼠的腹水中检测到微量的弓形虫 DNA,说明此反应体系及程序具有了一定的在高通量宿主 DNA 背景下检测到弓形虫微量 DNA 的敏感性。结果显示弓形虫 529 靶序列与肝吸虫、日本血吸虫及盾盘吸虫均未出现 LAMP 梯形条带,显示弓形虫 529 bp 靶序列与肝吸虫、日本血吸虫及盾盘吸虫均无交叉反应;而在弓形虫感染小鼠腹水中检测到弓形虫 529 bp 特异性的 LAMP 梯形条带,显示了较好的特异性。研究报道, $Mg^{2+}$ 、Betaine 浓度及 LAMP 反应温度是影响 LAMP 反应三个主要因素,本实验主要从这三个方面进行优化,发现  $Mg^{2+}$  浓度影响最大,4 mmol/L 时效果最好,最适宜扩增温度

为 64℃ 水浴,而 Betaine 浓度影响较小,与袁恒青<sup>[8]</sup>、陈导桢<sup>[9]</sup>报道的温度或 Betaine 浓度是影响 LAMP 的最主要因素略有不同。LAMP 针对的六个特定区域设计的四对引物识别靶基因,提高了反应特异性。本实验对 529 bp 靶序列的反应特异性进行了探讨比较,结果显示仅有弓形虫 DNA 出现特有的梯状条带,而其他物种包括肝吸虫、日本血吸虫以及盾盘吸虫的 DNA 扩增均为阴性,证明了本反应体系及反应条件具有扩增弓形虫 DNA 的特异性,可作为今后临床实验诊断的研究基础依据。核酸扩增产物常采用的琼脂糖凝胶电泳染料-EB 是致癌诱变剂,对操作人员有危害作用。为了使 LAMP 产物易于观察,本实验采用了 SYBR Green I,然后在紫外灯下直接观察结果。阳性标本显绿色,反之无色。实验结果与 EB 染色结果一致。说明该方法简单易行,特别适合基层单位快速检测。

综上所述,本研究建立的检测弓形虫感染小鼠腹腔液 DNA 的 LAMP 方法,具有较好的反应敏感性及特异性,且所需反应时间短,希望对今后的临床诊断试剂盒的研发提供一定的参考价值。同时希望能在预防诊断孕妇流产、胎儿畸形等方面发挥作用。

#### 参 考 文 献

- [1] Luft B J, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS[J]. Clin Inf Dis, 1992, 15(2): 211-222.
- [2] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28: E63.
- [3] 杨秋林, 张如胜, 伍和平, 等. 应用环介导等温扩增技术检测弓形虫[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(4): 304-306.
- [4] 汪学龙, 沈际佳, 蒋美荣, 等. 日本血吸虫基因组 DNA 的提纯与鉴定[J]. 安徽医科大学学报, 1996, 12(31): 473-474.
- [5] 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]. Clinical Chemistry, 2006, 52(2): 303-306.
- [6] Chen MX, Ai L, Zhang RL, et al. Sensitive and rapid detection of Paragonimus westermani infection in humans and animals by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Parasitol Res, 2011, 108(5): 1193-1198.
- [7] Chen Q, Li J, Fang XE, et al. Detection of swine transmissible gastroenteritis coronavirus using loop-mediated isothermal amplification [J]. Virol, 2010, 29(7): 206-210.
- [8] 袁恒青, 徐前明, 李培英. 弓形虫 529bp 基因的克隆及序列分析[J]. 畜牧与兽医, 2012, 11(14): 60-63
- [9] 陈导桢, 许飞, 葛海燕, 等. 环介导等温扩增检测弓形虫方法的建立[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(10): 1712-1715.

(收稿日期:2017-12-20)

(本文编辑:郭俊杰)