

质体且体积大,由于一般都有核,更易于再生复原^[16],因此选择合适菌龄的菌丝体制备原生质体是一个值得考虑的问题。其三,由于丝状真菌的细胞壁的结构和组成复杂且千差万别,在选择酶解体系时既要考虑原生质体的形成,又要兼顾原生质体的再生。所以选择一个合适的酶解系统,在较低的酶浓度下依然能保证原生质体制备率,降低因为酶浓度过高对原生质体再生造成的不利影响,可能是提高原生质体再生率的一个有效途径。

参考文献:

- [1]张举成,刘卫,易中周,等.竹红菌乙素光动力作用调控胶原蛋白中吡啶啉交联含量:光动力治疗纤维化症机制的初探[J].科学通报,2009,54(14):2076-2081.
- [2]乔亮.光动力疗法治疗进展[J].中国厂矿医学,2009,22(2):221-223.
- [3]Brown SB,Brown EA,Walker I.The present and future role of photo dynamic therapy in cancer treatment [J].*Lancet Oncol* 2004,5(8):497-508.
- [4]方杰,方祖军,丁强,等.光动力学疗法与膀胱内灌注化疗治疗膀胱癌远期疗效比较[J].中国激光,2009,36(10):2696-2699.
- [5]许焕波,肖哲.光动力疗法治疗颅内肿瘤的研究进展[J].汕头大学医学院学报,2010,23(1):61-64.
- [6]李践.光动力学疗法治疗癌症[J].中国生物医学工程学报,2005,24(2):237-239.

- [7]彭莹莹,葛海燕.光动力抗菌化学疗法治疗难治性细菌感染性疾病的研究进展[J].中国激光医学杂志,2010,19(1):50-53.
- [8]熊鸿雁,陈惠孙,胡小兵,等.特异光敏作用对血细胞悬液中DH-BV的灭活作用[J].中国输血杂志,2002,15(3):153-156.
- [9]Bonsor S J,Pearson G J.Current clinical applications of photo-activated disinfection in restorative dentistry [J].*Dent Update*,2006,33(3):143-144.
- [10]孟祥明,陈孝云,傅尧,等.光敏开关及其在化学生物学中的应用[J].化学进展,2008,20(12):2034-2044.
- [11]蒋丽金,何玉英.竹红菌素类光敏剂的光物理化学及光生物学[J].科学通报,2000,45(19):2019-2033.
- [12]卢明锋,张月杰.一株产花萼类光敏剂丝状真菌AL18的液体发酵工艺研究[J].生物技术,2006,16(4):62-65.
- [13]张志光,李东屏,邹寿长,等.丝状真菌原生质体技术的研究(VII)-渗透压稳定剂对原生质体的影响[J].湖南师范大学自然科学学报,1998,21(2):67-71.
- [14]李巍,吕圭源,胡伟莲,等.*Blakeslea trispora* H1-原生质体制备与再生条件研究[J].浙江科技学院学报,2009,21(1):23-31.
- [15]毛雨,王丹,李强,等.产琥珀酸放线杆菌的原生质体制备与再生[J].中国生物工程杂志,2010,30(6):103-108.
- [16]郭成金,杨子美.槐耳原生质体制备与再生研究[J].天津师范大学学报:自然科学版,2010,30(4):63-67.

专题综述

REVIEW ARTICLES

环介导等温扩增技术的研究进展

黄火清¹, 郝昂^{2*}

(厦门大学 近海海洋环境科学国家重点实验室 环境科学研究中心 福建 厦门 361005)

摘要:环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新式核酸扩增技术,它依靠一种具有链置换活性的DNA聚合酶和2对特殊设计的引物,不需要反复的温度循环和昂贵的仪器设备,在等温条件下即可高效快速地完成扩增反应,目前已广泛应用于细菌、病毒、寄生虫等病原体的检测,及动物胚胎性别的鉴定。该文总结了LAMP技术的基本原理、相对于传统核酸检测技术的优点、产物的检测方法及其临床应用,最后指出LAMP目前存在的不足以及采取的相应措施,并对其发展前景进行了展望。

关键词:环介导等温扩增; 核酸扩增; 应用

中图分类号: Q78 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1004-311X.2012.03.76

Advances of Loop - Mediated Isothermal Amplification

HUANG Huo - qing¹, YU Ang^{2*}

(State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) which relies on a DNA polymerase with strand displacement activity and two pairs of specially designed primers is a novel nucleic acid amplification method. No repeated temperature cycling, no expensive equipment, the LAMP reaction was carried out under isothermal conditions with a high efficiency and a high speed. It has been widely applied to the detection of such pathogens as bacteria, virus, parasite etc, as well as sexing of animal embryos. The basic principle, advantages related to other gene amplification techniques, the methods to judge target sequence as well as application of LAMP were reviewed. Finally, some existing problems and corresponding measures and prospects for LAMP were discussed in order to provide reference for reader studying.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; DNA amplification technique; application

0 引言

基因扩增是分子生物学领域的常用研究手段,目前应用

最广的是常规PCR和real-time PCR技术^[1],因其灵敏度高,特异性强,已成为分子生物学领域的关键技术。但PCR方法

的操作较复杂,对操作人员和仪器设备的要求都较高,不适合基层及现场的快速检测。随着分子生物学技术的不断发展和改进,新技术不断涌现, Tsugunori Notomi 等^[2]于2000年提出了 LAMP,一种新颖的核酸扩增技术,利用该技术只需在恒温条件下(60~65℃)保温几十分钟就可快速完成核酸的扩增,无需购置昂贵的 PCR 仪,操作简单,快速,可用于现场的快速检测,近年来已得到广泛的应用。

本文综述了 LAMP 技术的基本原理、相对于传统核酸检测技术的优点、产物的检测方法及其临床应用,最后指出 LAMP 目前存在的不足以及应采取的相应措施,并对其发展前景进行了展望,从而为 LAMP 技术在临床研究上的应用提供参考。

1 LAMP 法的原理及特点

1.1 LAMP 引物的设计

LAMP 技术的核心之一在于引物的设计,因此,设计出特异性强的引物是进行 LAMP 实验的首要任务。LAMP 引物由一对内引物(FIP 与 BIP)和一对外引物(F3 与 B3)组成,其中 FIP 由 F1c 和 F2 组成,BIP 由 B1c 和 B2 组成,严格针对靶基因 3' 端的 F1c、F2c 和 F3c 区以及 5' 端的 B1、B2 和 B3 区而设计^[3]。结构组成如图 1 所示。

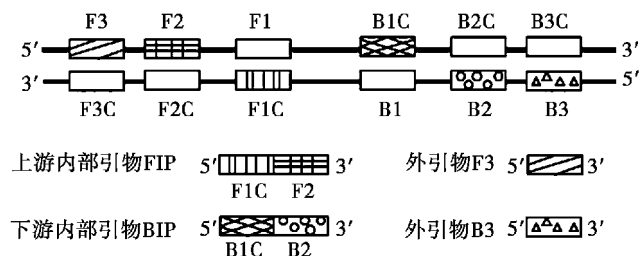


图 1 LAMP 引物结构图

Fig. 1 The structure of LAMP primers

1.2 扩增原理

DNA 在 65℃ 左右处于动态平衡状态,此时,任何一个引物向双链 DNA 的互补部位进行碱基配对延伸时,另一条链就会解离,变成单链^[4,5]。据此,LAMP 反应被划分为 2 个阶段,即起始物合成阶段和循环扩增阶段。

在第 1 阶段,内引物 FIP 首先与模板 F2c 区结合,启动互补链的合成,产生双链 DNA。接着,引物 F3 与 F3c 互补配对,在 *Bst* DNA 聚合酶的作用下,启动链置换反应,并释放出由 FIP 引导合成的单链,此单链的 5' 末端存在互补序列(F1c 和 F1),于是通过碱基互补配对形成一环状结构。以此链为模板,与 FIP 和 F3 类似,在 BIP 和 B3 的作用下,在 DNA 片段的另外一端产生了新的环状结构,于是整条链呈哑铃状结构^[6],如图 2 所示,到此,第 1 阶段反应完成。

收稿日期:2011-11-17;修回日期:2012-03-03

资助项目:中央高校基本科研业务费专项资金项目(2010121035) 资助作者简介:黄火清(1987-),女,福建省三明市人,硕士,研究方向:环境毒理学,Email: hqhuang147@163.com; * 通讯作者:郁昂(1970-),男,博士,助理教授,研究方向:海洋生态毒理学,Email: yuang@xmu.edu.cn。

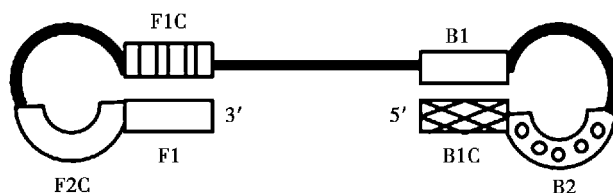


图 2 LAMP 循环起始物结构图

Fig. 2 The starting structure for LAMP cycling

循环扩增阶段,以哑铃状结构为模板,FIP 与茎环区域 F2c 杂交,同时,F1c 与 F1 结合,启动新一轮链置换反应,解离出由 F1 引导合成的双链核酸,并释放出由 F2 引导合成的单链,此单链两端均成环状结构,BIP 与茎环区域 B2c 互补,启动新一轮扩增。如此不断循环,茎的长度和环的个数都不断增加,最后的产物为茎-环状 DNA 与花椰菜状 DNA 所组成的混合物。

1.3 LAMP 技术的优点

与普通 PCR 相比,LAMP 具有许多优点:① 特异性强,引物的设计须严格针对靶基因的 6 个区域,任何一个不匹配就会导致反应无法进行;② 灵敏度高,可检测出 1~10 拷贝的模板,比 PCR 高出 10 倍的检测限^[7];③ 反应时间短,只需在恒温条件下保温 30~60min 就可完成扩增;④ 设备简单,不需要昂贵的 PCR 仪和特殊的试剂,只需一台恒温设备就可进行;⑤ 产物易检测,只需用肉眼观察有无白色浑浊或有无绿色荧光,就可判断扩增是否发生。LAMP 与普通 PCR 的比较结果见表 1。

表 1 PCR 与 LAMP 的优缺点比较

Table 1 Characteristics comparison between PCR and LAMP methods

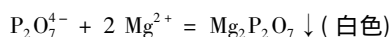
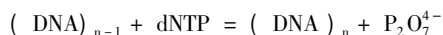
| | LAMP | PCR |
|------|------|-----|
| 灵敏度 | 高 | 高 |
| 特异性 | 强 | 强 |
| 检测效率 | 高 | 较高 |
| 检测成本 | 低 | 高 |
| 结果分析 | 简单 | 复杂 |

1.4 LAMP 产物的检测

反应结束后,对结果进行判定常用琼脂糖凝胶电泳检测、浊度检测、荧光比色检测和荧光实时定量检测。

1.4.1 浊度检测

随着核酸的大量生成,溶液中会发生如下反应:



由 dNTP 析出的 $P_2O_7^{4-}$ 与溶液中的镁离子结合,生成肉眼可见的焦磷酸镁白色沉淀,通过与阴性管比较反应液的浑浊情况,或用浊度仪检测其在 400 nm 处的沉淀浊度,就可判断扩增的有无。

1.4.2 荧光比色检测

对 LAMP 产物进行荧光比色检测时,常用的染料有 SYBR Green I、钙黄绿素、HNB、溴化乙淀和 Picogreen 等^[8]。其中,SYBR Green I 和 HNB 的检测灵敏度最高,是钙黄绿素的 10 倍^[9]。然而 SYBR Green I 不能在反应前加入 LAMP 体系中,否则会抑制反应^[10],而反应后加就必须开盖,又违反了 LAMP

不开盖原则,造成气溶胶污染。HNB 则是在反应前加入体系中,避免了开盖污染的问题,扩增结束后,阳性管呈紫色,阴性管呈天蓝色,由此,可判断靶基因的有无。

2 LAMP 技术的应用

LAMP 技术自 2000 年开发以来,因其简便快速,操作简单等优点,已广泛应用于细菌、病毒、寄生虫和动物胚胎性别鉴定等检测中。

2.1 细菌的检测

Yoshiteru Aoi 等^[11]利用 LAMP 对环境中的氨氧化细菌进行了测定,结果可检测出 10 个拷贝数的 DNA,具有与 real-time PCR 相同的灵敏度,且背景 DNA 对 LAMP 的检测干扰很小,可忽略不计。徐芊等^[12]将 LAMP 用于检测副溶血弧菌,直接对食品样品进行检测,只用一台恒温水槽,65℃ 反应 1 h,即完成扩增反应,与传统培养方法相比,大大缩短了检测周期,检测限达到 89 cfu/g。叶宇鑫等^[13]将原位荧光 LAMP 技术应用于食品中沙门氏菌的检测,与传统沙门氏菌检测方法和 PCR 方法相比,原位荧光 LAMP 无需破碎细胞提 DNA,反应方便易行,耗时少;恒温条件(63℃)下反应,避免了原位 PCR 方法过高的循环温度(95℃)对细胞结构的破坏;在检测人工污染的样品时,结果没有受到杂质的影响,可以检测到样本中的单个细胞。

张宏伟等^[14]以荚膜脂多糖合成调控子 *resA* 为靶基因片段,设计了肺炎克雷伯菌特异性引物,建立了 LAMP 检测方法,灵敏度可达 2.2~3.4 CFU/100 g,检测流程可缩短至 2 d,比 PCR 法更加快速。董培培等^[15]结合 LAMP 与横向流动试纸条技术(Lateral flow dipstick, LFD)建立起一种鳃利斯顿氏菌快速检测方法,能在 30 min 内完成检测,灵敏度为 7.7 cfu/ml,比常规 PCR 方法高一个数量级,通过与横向流动试纸条检测技术结合,进一步克服了由非特异性扩增导致的假阳性。

可见,将 LAMP 技术用于细菌检测时,其检测限比常规 PCR 更高,与 real-time PCR 法相比则具有相同的灵敏度,无需分离培养细菌,可直接提取感染动物组织基因组进行扩增^[16],操作更为简单、方便,且不需要昂贵的仪器,该方法有望成为细菌检测的常规手段。

2.2 病毒的检测

2.2.1 DNA 病毒

Ting Cai 等^[17]利用 LAMP 方法检测血清样本中的 HBV,并与 real-time PCR 法进行了比较,结果表明两者的检出率一致,且对于低浓度的样品,LAMP 的准确率更高,更适用于临床检测。李多云等^[18]根据对虾白斑综合症病毒(WSSV)的结构蛋白 VP26 基因序列,设计一套引物,建立了针对 WSSV 的 LAMP 检测方法,可检测到最低模板浓度为 0.563 pg/ μ l,灵敏度比常规 PCR 法高 1 个数量级,并且当模板浓度由 10^{-5} 倍稀释到 10^{-6} 倍时,PCR 产物浓度显著降低,受模板浓度的影响较大,而 LAMP 的扩增产物浓度则基本不受影响。张侃等^[19]将 LAMP 用于伪狂犬病病毒的检测,在 45 min 内完成检测,其特异性与 PCR 方法一致,敏感性则是 PCR 的 100 倍,最低能够检测 10 个拷贝的目的基因。

2.2.2 RNA 病毒

Leo L. M. Poon 等^[20]于 2004 年首先建立了针对 SARS 的 RT-LAMP 技术,通过对 31 例 SARS 患者的检测,检出率为 64%,其灵敏度略低于实时 PCR,但是比常规 PCR 法更高。Tetsuo Yoneyama 等^[21]用 RT-LAMP 法检测了粪便中的 HAV,实验中加入了环引物,将检测时间缩短至 50 min,与 RT-PCR 法(需要 2~3 h)相比大大节省了时间;对 HAV 实验室病毒毒株的检测,灵敏度为 0.4~0.8 FFU/5 μ l,与侵染性实验法相当,且能检测到 HAV III 型,比 real-time RT-PCR 法的检测范围更广,可作为基层疫情监控的常规检测方法。聂凯等^[22]采用一步法的 RT-LAMP 检测人甲型 H1N1 流感病毒基因,在反应体系中直接加入反转录酶,大大简化了 LAMP 技术用于 RNA 病毒检测的操作步骤。

此外,LAMP 技术在检测艾滋病病毒^[23]、鹅细小病毒^[24]、猪繁殖与呼吸综合症病毒^[25]、人星状病毒^[26]、单纯疱疹病毒 I 型^[27]、猪圆环 2 型病毒^[28]等方面均有报道,无论是 DNA 还是 RNA 病毒 LAMP 都能做到快速检测,在检测 RNA 病毒时更是省去了 RT-PCR 法中费时的反转录步骤,在临床检测上显示出越来越重要的地位。

2.3 寄生虫的检测

Hiroimi Ikadai 等^[29]将 LAMP 法用于巴贝斯虫的检测,证实 LAMP 具有与 PCR 和光学显微镜同样的敏感性,而且更加简便、快速。李群等^[30]为提高牛巴贝斯焦虫病的检出率,采用 LAMP 法进行了检测,结果表明,LAMP 检测体系特异性强,与双芽巴贝斯焦虫 DNA 不发生交叉反应;敏感性高,最小检测值为 0.014 fg,为一般 PCR 法的 10^3 倍。Jun-Hu Chen 等^[31]用 LAMP 法对间日疟感染患者进行诊断,在 117 例镜检呈阳性的血清样本中,LAMP 检出 115 例,灵敏度和特异性与镜检法和 nested PCR 法相近,但是操作更加简单,不需要昂贵的仪器,且对 DNA 的抽提要求不高,有望成为检验科或疟疾诊所的常规诊断方法。

2.4 动物胚胎性别的鉴定

LAMP 在动物胚胎性别的鉴定方面也有应用,Hiroki Hirayama 等^[32]首次利用 LAMP 法检测牛胚胎的性别,鉴定的准确率为 88.9%~94.4%,整个鉴定过程不超过 1 h。Khairy M. A. Zoheir 等^[33]也成功将 LAMP 用于牛胚胎性别的鉴定,以 EB 和 CuSO_4 为指示剂,反应 45 min 即可通过肉眼观察颜色的变化,从而鉴定出雌雄,准确率达 100%,简单快速,成本低,可用于养殖场现场操作。

3 不足与对策

3.1 存在的不足

对扩增产物定量检测时,需要购置昂贵的荧光定量 PCR 仪或浊度仪;LAMP 法的扩增靶序列长度控制在 300 bp 以下,对引物要求高,由在线软件设计的引物有上千条,要筛选出合适的引物需要耗费大量的工作;LAMP 灵敏度高,一旦开盖容易形成气溶胶污染;传统 PCR 产物的电泳图都是呈现单带,而 LAMP 法阳性反应则是呈阶梯状条带,因此,若有非特异性扩增的产生,则不易辨别,造成 LAMP 容易出现假阳性。

3.2 对策

严格做好防污染工作,体系的配制一定要在超净台内进

行,实验器材要进行消毒灭菌;Bst DNA 酶最后加入体系,若有必要可以在体系上覆盖一层矿物油;LAMP 体系的配制和检测必须要严格分区,操作人员往返两区域进行实验时要更换实验服,同时要尽可能地避免无关紧要的人员流动,凡进入检测区的实验器材都不要再拿回配制区。由于开盖检测容易造成气溶胶污染,所以反应结束后最好不要打开 PCR 管,可采用反应前加入 HNB 染料的方法对扩增产物进行定性检测。

一旦出现污染,应立即停止实验,每天给实验室通风,给超净台紫外灭菌并通风,一段时间后更换所有试剂再做。

采用 Hidenori Tani 等^[34,35]提出的 ABC-LAMP 技术对 LAMP 产物进行定量,该方法主要是在反应体系中加入探针 AB-QProbe 和已知浓度的内标,探针的荧光值代表靶基因与内标的比值,随着反应的进行,靶基因与内标被同等程度扩增,通过测定反应终点两者的荧光值之比,结合内标的初始浓度就能对初始模板定量,从而实现了以较低的成本对产物的定量检测。

4 展望

LAMP 作为一种新颖的核酸扩增技术,其最大的优点在于反应速度快,设备简单,而且结果易于鉴定,尤其适用于基层检验检疫机构和医疗机构。目前,我国已有几十种 LAMP 试剂盒开发成功并出售,试剂盒的国产化和商业化,将使检测成本降低,进一步促进了 LAMP 技术的推广和普及。

然而,目前关于 LAMP 的报道主要见于各种食源性致病菌及病原体的检测,在环境监测方面的应用比较少,尤其在生态毒理学方面则鲜有报道。利用分子水平上的生态毒理学生物标志物,通过检测其含量可指示生物体受环境污染物影响而产生的异常变化^[36],因此,有望利用一种理想的分子生物标志物,利用 LAMP 技术检测其随污染的变化情况,从而反映出生物体受到的污染胁迫,最终为环境污染物的监测提供一种快速而又简便的检测方法。

参考文献:

- [1] 张仑,殷幼平,王中康. 环介导等温扩增技术的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(6): 21-25.
- [2] Tsugunori Notomi, Hiroto Okayama, Harumi Masubuchi, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): 63-69.
- [3] 唐毕锋. 环介导等温扩增技术的应用和发展[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(22): 3972-3973.
- [4] 蔡哲钧,冯杰雄. 环介导等温扩增技术及在传染性疾病预防中的应用[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2006, 33(5): 343-345.
- [5] 杨小鹏,吴清平,张菊梅,等. 环介导等温扩增核酸技术及其在食品安全检测领域的应用[J]. 微生物学通报, 2010, 37(8): 1227-1233.
- [6] 郑洋妹,陈信忠. 环介导等温扩增技术检测动物病原研究进展[J]. 生物技术通报, 2009, (S1): 108-112.
- [7] 吴阳升,罗淑萍. 一种新的高效快速核酸恒温扩增方法——LAMP 法[J]. 生物技术, 2004, 14(4): 76-78.
- [8] 许毓亮,南文龙,周浩,等. 布鲁氏菌环介导等温扩增(LAMP)可视化检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2011, 28(8): 37-40.
- [9] Motoki Goto, Eiichi Honda, Atsuo Ogura, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxyl anphthol

blue [J]. *Bio Techniques* 2009, 46: 167-172.

- [10] Njiru Zablon Kithinji, Mikosza Andrew Stanislaw John, Armstrong Tanya, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense* [J]. *Plos Negl Trop Dis* 2008, 2: e147.
- [11] Yoshiteru Aoi, Mariko Hosogai, Satoshi Tsuneda. Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria [J]. *J Biotechnol*, 2006, 125: 484-491.
- [12] 徐芊,孙晓红,赵勇,等. 副溶血弧菌 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(12): 66-72.
- [13] 叶宇鑫,李琳,山崎伸二,等. 原位荧光 LAMP 技术检测食源性沙门氏菌[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(3): 137-141.
- [14] 张宏伟,张霞,侯丽萍,等. 环介导等温扩增技术检测乳粉中肺炎克雷伯菌[J]. 南开大学学报, 2011, 44(2): 38-43.
- [15] 董培培,李长红,丁文超,等. 环介导等温扩增技术与横向流动试纸条法快速检测鳟利斯顿氏菌的研究[J]. 水产科学, 2011, 30(2): 63-68.
- [16] 杨德全,鞠厚斌,葛菲菲,等. 环介导等温扩增技术及其在动物疫病诊断中的应用[J]. 中国动物传染病学报, 2011, 19(2): 75-81.
- [17] Ting Cai, GuoQiang Luo, Jin Yang, et al. Development and evaluation of real-time loop-mediated isothermal amplification for hepatitis B virus DNA quantification: A new tool for HBV management [J]. *J Clin Virol*, 2008, 41: 270-276.
- [18] 李多云,丁文超,陈炯,等. 环介导等温扩增技术快速检测对虾白斑综合症病毒方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(1): 186-190.
- [19] 张侃,蒋菲,张跃伟,等. 羟基萘酚蓝在伪狂犬病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.
- [20] Leo L. M. Poon, Cynthia S. W. Leung, Masato Tashiro, et al. Rapid detection of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a loop-mediated isothermal amplification assay [J]. *Clin Chem*, 2004, 50(6): 1050-1052.
- [21] Tetsuo Yoneyama, Tomoko Kiyohara, Noriko Shimasaki, et al. Rapid and real-time detection of hepatitis A virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay [J]. *J Virol Methods* 2007, 145: 162-168.
- [22] 聂凯,王大燕,秦萌,等. 基于颜色判定的环介导逆转录等温扩增技术检测人甲型 H1N1 流感病毒基因[J]. 病毒学报, 2010, 26(2): 81-87.
- [23] Kelly A. Curtis, Donna L. Rudolph, S. Michele Owen. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. *J Virol Methods* 2008, 151: 264-270.
- [24] Yang JinLong, Yang Rui, Cheng AnChun, et al. A simple and rapid method for detection of Goose Parvovirus in the field by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Virology Journal*, 2010, 7: 14.
- [25] Lei Zhang, Ye-bing Liu, Lei Chen, et al. Rapid and sensitive detection of PRRSV by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay [J]. *Virologica Sinica* 2011, 26: 252-259.
- [26] 杨丽,何晓青,韦玉梅,等. 环介导等温扩增技术(LAMP)检测人星状病毒方法的建立及其在再生水检测中的应用[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(6): 600-606.

- [27] 彭丁晋,罗永富,周支香,等. 环介导等温扩增技术检测单纯疱疹病毒 I 型的应用[J]. 中国病原生物学杂志 2011 6(2):101-103.
- [28] 罗兆飞,杨得胜,严乾临,等. 猪圆环 2 型病毒环介导等温扩增实时检测方法的建立与评价[J]. 国外畜牧学(猪与禽) 2011 31(1):72-73.
- [29] Hiromi Ikadai, Hiroko Tanaka, Nona Shibahara, et al. Molecular evidence of infections with Babesia gibsoni parasites in Japan and evaluation of the diagnostic potential of a loop-mediated isothermal amplification method [J]. *J Clin Microbiol* 2004 42(6):2465-2469.
- [30] 李群,王素华,周前进,等. 快速检测牛巴贝斯焦虫 LAMP 方法的建立[J]. 中国预防兽医学报 2010 32(10):781-784.
- [31] Jun-Hu Chen, Feng Lu, Chae Seung Lim, et al. Detection of Plasmodium vivax infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *Acta Tropica* 2010 113:61-65.
- [32] Hiroki Hirayama, Soichi Kageyama, Satoru Moriyasu, et al. Rapid se-

- xing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification [J]. *Theriogenology* 2004 62(5):887-896.
- [33] Khairy M. A. Zoheir, Ahmed A. Allam. A rapid method for sexing the bovine embryo [J]. *Anim Reprod Sci* 2010 119:92-96.
- [34] Hidenori Tani, Tatsuya Teramura, Ken Adachi, et al. Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification [J]. *Anal Chem* 2007 79:5608-5613.
- [35] Hidenori Tani, Takahiro Kanagawa, Shinya Kurata, et al. Quantitative method for specific nucleic acid sequences using competitive polymerase chain reaction with an alternately binding probe [J]. *Anal Chem* 2007 79:974-979.
- [36] 姜元臻. 生物标志物检测环境污染研究新进展[J]. 广东化工, 2010 37(4):150-152.

钠离子通道研究进展

李宝珠,高炳森,吴勇,于津鹏,吴潇洒,长孙东亭,罗素兰*

(海南大学热带生物资源教育部重点实验室,海南大学海口市海洋药物重点实验室,海南 海口 570228)

摘要: 细胞电活动是生命现象的基本特征之一,而离子通道是其结构和功能的基础。因此,研究离子通道作用机制具有重大的理论和现实意义。许多神经系统和心血管疾病,如多发性硬化症、癫痫、脑溢血、神经痛、Brugada 综合征(BrS)、进行性心脏传导缺陷(PCCD)和原发性心室纤颤(IVF)等,都与钠离子通道氨基酸序列和结构发生的改变有关。该文对钠离子通道的研究进展进行综述。

关键词: 钠离子通道;钠离子通道病;钠离子通道药物;研究方法;研究进展

中图分类号:Q71;Q952.6 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1004-311X.2012.03.77

Research Progress of the Sodium Channels

LI Bao-zhu, GAO Bing-miao, WU Yong, YU Jin-peng, WU Xiao-sa, ZHANGSUN Dong-ting, LUO Su-lan*

(Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The electrical activity of the cells was one of the essential features of the life phenomena, and ion channels were its structural and functional base. Therefore, the research of the ion channels mechanism played a significant role in theory and reality. Many nervous system and cardiovascular diseases, such as multiple sclerosis, epilepsy, cerebral apoplexy, neuropathic pain, brugada syndrome (BrS), progressive cardiac conduction defects (PCCD), idiopathic ventricular fibrillation (IVF) etc, were concerned with the alterations in the amino acid sequences and structures. The research progress of the sodium channels was discussed.

Key words: sodium channels; sodium channel diseases; sodium channel drugs; research methods; research progress

细胞膜上具有各种各样的离子通道,这些离子通道对于细胞内外进行物质及能量的交换具有十分重要的意义,同时,离子通道对生物体正常生理功能的维持具有基础性作用。研究表明,某些神经系统和心血管疾病就是由于细胞膜上钠离子通道功能紊乱造成的,对钠离子通道的研究可以帮助科学家找出具体病因,并研制相应的药物。

天然多肽类生物毒素为离子通道的研究提供了极为丰富的资源,我国天然生物毒素的研究主要集中在蛇毒素、蜂毒

素、蝎毒素、芋螺毒素以及蜘蛛毒素等。在海南捕鸟蛛、虎纹捕鸟蛛以及敬钊缨毛蛛等我国特有的蜘蛛种类中都发现了可以阻断钠离子通道电流的多肽类毒素分子^[1,2]。钠离子通道在神经元兴奋性的调控和动作电位的产生等方面起着重要的作用。近年来,研究人员试图从分子水平上揭示钠通道蛋白的空间构象、构象变化与通道门控动力学之间的关系。研究钠离子通道的功能和特性对于人们克服某些钠离子通道病,寻找更好的治疗方式,有着极其重要的现实意义。

1 钠离子通道简介

1.1 钠离子通道的分类和类型

1.1.1 钠离子通道的分类

离子通道主要分为电压门控离子通道(voltage gated channels)、配体门控离子通道(ligand gated channels)和机械门控离子通道(mechanogated channels)三大类,其主要是根据门控机制的不同来进行的划分^[3]。钠离子通道主要分为电压门控钠

收稿日期:2012-02-25;修回日期:2012-05-05

基金项目:国家自然科学基金项目(81160503);长江学者和创新团队发展计划项目(No. IRT1123);海南省重点科技计划项目(ZDXM20110040);海南大学“211工程”创新人才计划项目;海南省教育厅高等学校研究项目(Hkj2010-02)资助

作者简介:李宝珠(1987-),女,山东淄博人,硕士生,研究方向:海洋药物与生物技术。*通讯作者:罗素兰(1969-),女,教授,博士生导师, Tel:0898-66289538, Email: luosulan2003@163.com。