

DOI:10.13350/j.cjpb.230205

• 论著 •

# 防气溶胶污染的 UDG-LAMP-LFD 核酸检测体系的建立\*

陈星湘<sup>1</sup>, 费樱<sup>2</sup>, 黄月明<sup>1,3</sup>, 汪浪<sup>1,4</sup>, 王榕<sup>1</sup>, 吴青青<sup>2\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学医学检验学院临床微生物与免疫学教研室, 贵州贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属医院临床检验中心;  
3. 贵州省人民医院; 4. 湖南医药学院)

**【摘要】** 目的 建立一种基于热敏 UDG 酶防污染的、环介导等温扩增(LAMP)技术及横向流动试纸条(LFD)联合使用的核酸检测方法,实现对 HPV18 的快速、可视化检测。方法 使用 LAMP 在线引物设计软件设计 HPV18 特异性引物,同时引入热敏 UDG 酶,建立 UDG-LAMP 检测体系,优化 T/U 碱基比例,设置对照试验验证热敏 UDG 酶防污染能力;根据 LFD 要求,设计特异性同化探针及淬灭探针,建立 UDG-LAMP-LFD 核酸检测体系并对 LAMP 反应时间进行优化;对该体系进行灵敏度、特异性及临床样品的验证,并与 QPCR 结果进行比较。结果 优化的 LAMP 反应时间为 40 min, T/U 比例为 1 : 1;热敏 UDG 酶孵育时间为 10 min,防污染效果显著;LFD 结果判读耗时 5 min,整个检测时间为 55 min。该 UDG-LAMP-LFD 核酸检测体系在以 HPV18 作为检测对象时,灵敏度  $10^3$  拷贝/ $\mu\text{l}$ ;29 例临床样品的验证结果与 QPCR 检测结果完全一致。结论 建立的 UDG-LAMP-LFD 检测体系可快速、特异、灵敏、可视化的检测 HPV18,同时可避免气溶胶污染导致的假阳性。该方法对实验设备及工作人员要求较低,适合在偏远地区及基层医院使用。

**【关键词】** 热敏 UDG 酶;环介导等温扩增技术;横向流动试纸条;人乳头瘤病毒 18 型;气溶胶污染

**【中图分类号】** R392

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)02-0147-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Feb;18(2):147-152.]

## Establishment of udg-lamp-lfd nucleic acid detection system against aerosol pollution

CHEN Xing-xiang<sup>1</sup>, FEI Ying<sup>1</sup>, HUANG Yue-ming<sup>1,3</sup>, WANG Lang<sup>1,4</sup>, WANG Rong<sup>1</sup>, WU Qing-qing<sup>2</sup> (1. School of Medical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Clinical Laboratory Center, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University; 3. Clinical Laboratory Department of Guizhou Provincial People's Hospital; 4. Hunan University of Medicine) \*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To establish a rapid and visual detection for nucleic acid of HPV18 combining loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and lateral flow strip (LFD), which is a contamination-free method based on heat-labile uracil-DNA glycosylase(UDG). **Methods** LAMP online primer design software was used to design HPV18 primers, and UDG-LAMP detection system was set up by using heat-labile uracil-DNA glycosylase and optimizing T/U ratio. A control experiment was established to verify the anti pollution ability of UDG. The UDG-LAMP-LFD detection system was established with specific assimilation probes and optimized UDG-LAMP reaction system. The sensitivity, specificity and clinical samples of the system were tested, and the results were compared with clinical QPCR. **Results** The optimized LAMP reaction time was 40 min and the ratio of T/U was 1 : 1;The incubation time of UDG was 10 min, and the anti pollution effect was significant;The interpretation of LFD results took 5 min and the whole detection time was 55 min. Nucleic acid of HPV18 could be specifically detected with a sensitivity of  $10^3$  copies/ $\mu\text{l}$ . The detection results of 29 clinical samples tested using our detection system were consistent with that tested by clinical QPCR. **Conclusion** The UDG-LAMP-LFD detection system established in this study can detect HPV18 rapidly, specifically, sensitively and visually. In addition, it can prevent reaction from being contaminated by aerosol. This method has low requirements for equipments and operators, which is suitable for use in remote areas and primary hospitals.

**【Key words】** heat-labile uracil-DNA glycosylase; loop-mediated isothermal amplification; lateral flow dipstick; human papillomavirus

\* **【基金项目】** 贵州省科技厅项目(No. 黔科合基础-Z[2022]一般 441);贵州医科大学 2021 年博士科研启动基金项目(No. gyfybsky-2021-47);贵州医科大学国家自然科学基金培育项目(No. 19NSP081)。

\*\* **【通讯作者】** 吴青青, E-mail: susanwqq@163.com

**【作者简介】** 陈星湘(1997-),女,贵州毕节人,硕士研究生,初级检验师。主要研究方向:分子生物学。E-mail: 1971648883@qq.com

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术是2000年由Notomi等<sup>[1]</sup>提出的,其包括基础的外引物(F3、B3)内引物(FIP、BIP)各一对,加速扩增的环引物(LF、LB)<sup>[2]</sup>一对,具有灵敏度高、特异性强等优点,同时整个反应恒温进行,耗时短,只需要水浴箱或金属恒温孵育器等可控制温度的简单仪器即可完成反应。近年来,LAMP技术多使用和横向流动试纸条(lateral flow dipstick, LFD)结合的方式广泛用作快速现场可视化核酸检测,既节约了核酸扩增的昂贵设备成本,又降低了结果判读的技术难度。

LAMP技术的高灵敏度同时意味着该技术抗污染的能力弱,实验过程中由于开盖产生的气溶胶污染极易导致假阳性<sup>[3-4]</sup>,这也是LAMP技术想要在实际中得以应用必须攻克的难题。

尿嘧啶-DNA糖基化酶(uracil-DNA glycosylase, UDG酶)是在大肠埃希菌中发现的一种参与尿嘧啶切除修复的高度保守的DNA修复酶<sup>[5]</sup>,于1990年首次被使用来防治核酸扩增技术中的污染<sup>[6]</sup>。其原理为:在核酸扩增反应中以U碱基替代T碱基掺入DNA中,形成含U碱基的核酸扩增产物,UDG酶选择性水解DNA中含U碱基的糖苷键,降解核酸扩增产物,而对生物样品中的DNA无降解作用<sup>[5]</sup>。UDG酶发挥作用分为两步:首先将U碱基掺入到扩增产物中,若含U碱基的扩增产物产生气溶胶污染进入到下一次LAMP扩增中,UDG酶可先降解掉含U碱基的污染物,再进行LAMP扩增。普通UDG酶灭活温度在90℃以上,广泛用于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)中,而克隆自嗜冷海洋细菌UDG基因的热敏UDG酶对高温敏感,50℃以上就能使酶完全失活,非常适合用于LAMP反应中解决污染问题。

早发现、早诊断、早治疗有利于阻断传染性疾病的传播及发展<sup>[7]</sup>。人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是常见的性传播感染病毒<sup>[8]</sup>, HPV18是全球范围内高危型人乳头瘤病毒(high risk human papillomavirus, HR-HPV)之一<sup>[9]</sup>。持续的HR-HPV感染与女性宫颈癌的发生发展相关,宫颈癌更是女性因癌症死亡的主要原因之一<sup>[10-11]</sup>。在发展中国家,HPV疫苗的接种率相对较低,宫颈癌筛查的资源有限,因此具有较高的HPV感染率和死亡率<sup>[12-13]</sup>。目前,PCR是临床上广泛用于HPV基因检测及分型的方法,但是由于PCR反应设备昂贵,对检验人员要求较高,在资源匮乏的基层医院开展该项检查存在困难,导致部分感染者未能在疾病初期被诊断,延误最佳治疗时期。本研究针对HPV18的保守序列设计引物

及探针,建立UDG-LAMP-LFD检测体系,以期实现对HPV18基因的快速、可视化检测。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

1.1 临床样品与质粒 共收集35份宫颈黏液DNA样品,其中包括HPV18型21份、HPV16、31、32、51、52、58型各1份,HPV阴性样品8份,均由贵州医科大学附属医院临床检验中心QPCR法检测确认并提供。

应用在线NCBI BLAST软件比对分析,选取高保守、高特异的HPV18基因,克隆含有HPV18基因部分序列(304bp)的pUC57质粒DNA标准品,由上海生工生物工程股份有限公司合成并验证。

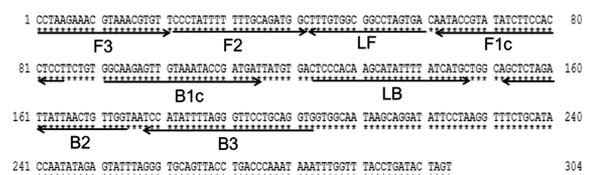
1.2 主要仪器与试剂 ThermoStatC型恒温孵育器(德国Eppendorf公司),ABI7500HT型荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司),DYY-II型电泳仪(北京市六一仪器厂生产),GenoSens1880型凝胶成像系统(上海勤翔公司),彩虹型核酸检测试纸条(北京宝盈同汇生物技术有限公司),LAMP试剂(NEB北京有限公司),热敏UDG酶(NEB北京有限公司),甜菜碱(美国Sigma-Aldrich公司)。

### 2 方法

2.1 质粒标准品浓度的计算 根据上海生工生物工程股份有限公司提供的质粒浓度,使用换算公式得出标准质粒的拷贝数。拷贝数(拷贝/μl) = (6.02 × 10<sup>23</sup>) × (浓度(ng/μl) × 10<sup>-9</sup>) / (DNA Length × 660)。

2.2 引物和探针的设计与合成 以质粒DNA序列为靶序列,利用LAMP引物设计软件Primer Explorer V5设计特异性引物,包括外引物(F3和B3)、内引物(FIP和BIP)以及环引物(LF和LB)。

本实验使用的探针类型为同化探针,并且引入淬灭探针。在环引物LF上添加一段序列,使用荧光素基团FAM标记,设计互补淬灭探针使用淬灭基团BHQ1标记,同时使用Biotin标记环引物LB。被双标记的扩增产物即可在LFD上完成检测。引物和探针序列见表1。HPV18引物位置示意图见图1。



注:F2与F1c构成FIP,B2与B1c构成BIP。

图1 HPV18引物位置示意图

Notes:F2 and F1c form FIP,B2 and B1c form BIP.

Fig. 1 Schematic representation of the HPV 18 primer positions

表 1 HPV 18 引物及探针  
Table 1 Primer and probe sequences of HPV18

引物 Primer	长度(bp) Length	序列(5'-3') Sequence
F3	21	CCTAAGAAAACGTAAACGTGTT
B3	22	CAGGAACCTAAAAATATGGATT
FIP	45	AGGAGGTGGAAGATATACGGTATTCCC TATTTTTTTCAGATGGC
BIP	47	GGCAAGAGTTGTAAATACCGATGACCA ACAGTTAATAATCTAGAGCT
LF	18	TCCTAGGCCGCCACAAA
LB	25	CTCCCACAAGCATATTTTATCATGC
LF-P	58	ACGCTGAGGACCCGGATGCGAATGCGGA TGGCGATGCCGAT <b>CTACTAGGCCGCCACAAA</b>
LB-P	25	Biotin-CTCCCACAAGCATATTTTATCATGC
Quench strand	40	TCGGCATCCGCATCCGCATTCGCAT CCGGTCTCTCAGCGT-BHQ1

注:LF-P下划线部分为淬灭链互补碱基序列,加粗部分为LF引物碱基共同序列。

Notes: The underlined part of LF-P is the complementary sequence of quench strand, and the bold part is the common sequence of LF primer.

**2.3 UDG-LAMP 检测方法的建立及优化** 在前期优化的 LAMP 体系<sup>[14]</sup>基础上完成,该反应体系总体积为 25  $\mu$ l。包含有甜菜碱, dATP, dCTP, dTTP, dGTP, dUTP, 等温扩增缓冲液, MgSO<sub>4</sub>, LAMP 引物, Bst 2.0 Warmstart DNA 聚合酶, 热敏 UDG 酶, 质粒 DNA 模板, 以无核酸酶水补足 25  $\mu$ l。热敏 UDG 酶孵育温度设置为 25  $^{\circ}$ C, LAMP 反应温度设置为 63  $^{\circ}$ C。

由于热敏 UDG 酶仅作用于掺入扩增产物中的 U 碱基,因此需要对 T 碱基与 U 碱基的比例进行筛选,设置 T/U 比例依次为 1 : 0, 0.75 : 0.25, 0.5 : 0.5, 0.25 : 0.75, 0 : 1; 确认 T 碱基与 U 碱基比例后,使用含相同 T 碱基、U 碱基比例的扩增产物依次稀释 10<sup>2</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>10</sup>、10<sup>12</sup> 倍,分别加入含热敏 UDG 酶组及不含热敏 UDG 酶组,使用模拟污染的方式验证该体系的防污染能力。反应使用仪器为实时荧光定量 PCR 仪,结果使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测验证。

**2.4 UDG-LAMP-LFD 检测方法的建立及优化** 该反应体系总体积为 25  $\mu$ l。在 UDG-LAMP 的基础上引入特异性同化探针,并对探针浓度进行优化,同时为了节约反应时间,对 LAMP 反应时间进行筛选,反应设置时间梯度为 10、20、30、40、50、60 min。反应使用仪器为金属恒温孵育板,反应后使用蒸馏水将体积扩为 100  $\mu$ l,使用 LFD 观测结果,结果使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测验证。

**2.5 UDG-LAMP-LFD 特异性检测** 用优化的反应体系分别对 HPV16、18、31、32、51、52、58 型阳性 DNA 样品进行特异性验证,样品均由贵州医科大学附属医院临床检验中心提供。以无核酸酶水设置阴性对

照,LAMP 反应仪器为金属恒温孵育板,使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测验证结果。

**2.6 UDG-LAMP-LFD 灵敏度检测** 将 HPV18 质粒 DNA 进行 10 倍梯度稀释(10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10 拷贝/ $\mu$ l),按优化的条件进行试验,LAMP 反应仪器为金属恒温孵育板,使用 2% 琼脂糖凝胶电泳验证检测结果。

**2.7 临床样品的 UDG-LAMP-LFD 检测** 对 29 份临床样品(21 份 HPV18 阳性,8 份 HPV 阴性)按照优化的 UDG-LAMP-LFD 体系进行检测,检测结果与 QPCR 法相比较。

## 结 果

### 1 UDG-LAMP 检测方法的建立及优化

由 T、U 碱基比例筛选第一步结果(图 2A、图 2C)可见,随着反应体系中 U 碱基占比的增多,对 LAMP 反应的抑制越明显;由第二步结果(图 2B、图 2D)可见,当 T、U 碱基比例为 1 : 1 时,热敏 UDG 酶具有明显的降解污染物的能力,随着 U 碱基占比增多,热敏 UDG 酶能将污染物完全降解,避免假阳性扩增。综合 LAMP 反应的效率及 U 碱基含量对热敏 UDG 酶的影响,确定 T、U 碱基比例为 1 : 1。在防污染能力验证中,扩增产物被稀释了 10<sup>12</sup> 倍,无热敏 UDG 酶组(图 3A)仍能产生明显的 LAMP 扩增产物。在含热敏 UDG 酶组(图 3B),当混入的扩增产物量仍然很高时(扩增产物稀释 10<sup>4</sup> 倍),热敏 UDG 酶已经开始发挥作用;当扩增产物稀释 10<sup>6</sup> 倍时,热敏 UDG 酶能完全降解掉污染物,未检测到 LAMP 扩增产物的存在,说明在该体系内热敏 UDG 酶具有明显的防污染能力。

### 2 UDG-LAMP-LFD 检测方法的建立及优化

图 4A 显示,在 UDG-LAMP-LFD 检测体系阴性对照无扩增;HPV18 阳性基因能在对应的检测区域观察到红色条带(阳性),与 2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 4B)一致,证明 UDG-LAMP-LFD 检测体系构建成功。在 LAMP 反应时间筛选结果中(图 5A),LFD 显示在 30 min 内可检测到 LAMP 扩增产物,且结果趋于稳定,2% 琼脂糖凝胶电泳结果(图 5B)显示在 30 min 内可检测到 LAMP 扩增产物,但在 40 min 内趋于稳定。因此,LAMP 反应时间确定为 40 min。

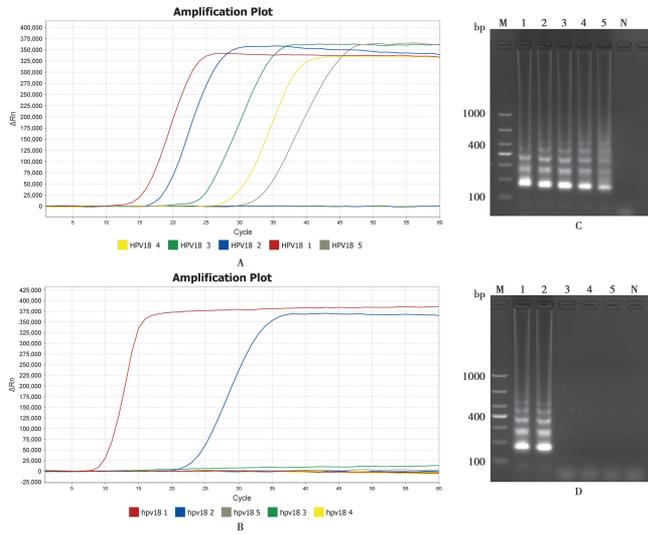
### 3 UDG-LAMP-LFD 的特异性

UDG-LAMP-LFD 检测体系特异性验证结果如图 6A,临床检出率较高的 HPV16、31、32、51、52、58 型均无扩增,仅 HPV18 发生特异性扩增,与 2% 琼脂糖凝胶电泳结果(图 6B)一致。

### 4 UDG-LAMP-LFD 的灵敏度

UDG-LAMP-LFD 灵敏度检测结果如图 7A,该

体系检测 HPV18 基因的灵敏度为  $10^3$  拷贝/ $\mu$ l, 其结果与 2% 琼脂糖凝胶电泳结果(图 7B)一致。

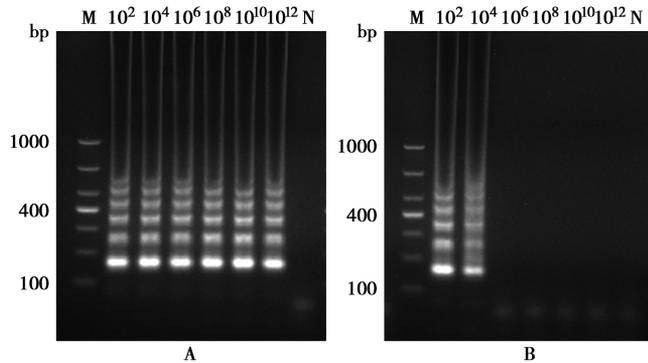


M DNA 标志物 N 阴性对照 1 T 100% 2 T 75%+U 25% 3 T 50%+U 50% 4 T 25%+U 75% 5 U 100% A UDG-LAMP 第一步实时检测 B UDG-LAMP 第二步实时检测 C UDG-LAMP 第一步 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 D UDG-LAMP 第二步 2% 琼脂糖凝胶电泳检测

图 2 T、U 比例筛选

M DNA maker N Negative control 1 T 100% 2 T 75%+U 25% 3 T 50%+U 50% 4 T 25%+U 75% 5 U 100% A UDG-LAMP first step real-time detection B UDG-LAMP second step real-time detection C UDG-LAMP first step agarose gel electrophoresis detection D UDG-LAMP second step agarose gel electrophoresis detection

Fig. 2 The ratio of T to U screening



M DNA 标志物 N 阴性对照  $10^2 \sim 10^{12}$  为加入污染物的稀释倍数 A 不含热敏 UDG 酶 B 含热敏 UDG 酶

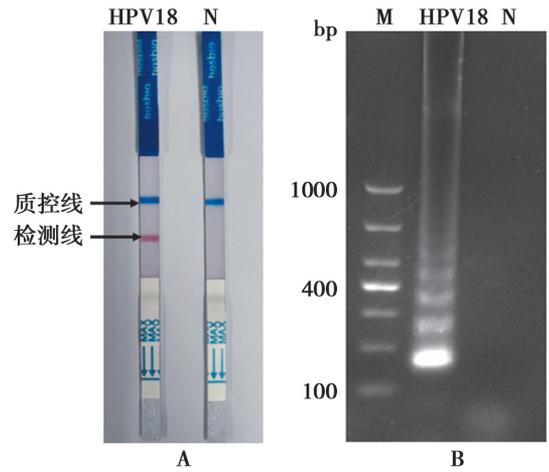
图 3 热敏 UDG 酶防污染能力验证

M DNA maker N Negative control  $10^2 \sim 10^{12}$  The dilution multiple of the contaminant added A Without UDG B With UDG

Fig. 3 Validation of anti-contamination ability of heat-labile uracil-DNA glycosylase

### 5 临床样品的 UDG-LAMP-LFD 检测

共验证 29 份临床样品, 包括 21 份 HPV18 阳性样品和 9 份 HPV18 阴性样品。用建立的 UDG-LAMP-LFD 进行检测, 结果如图 8, 与临床 QPCR 法完全一致。

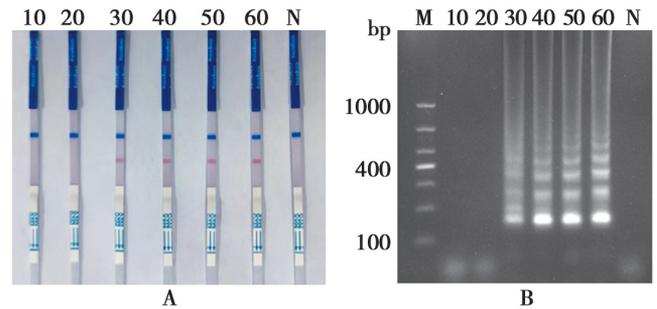


M DNA 标志物 N 阴性对照 A UDG-LAMP-LFD 检测 B UDG-LAMP 2% 琼脂糖凝胶电泳检测

图 4 UDG-LAMP-LFD 检测体系的建立

M DNA maker N Negative control A UDG-LAMP-LFD detection B UDG-LAMP agarose gel electrophoresis detection

Fig. 4 The establishment of UDG-LAMP-LFD detection system

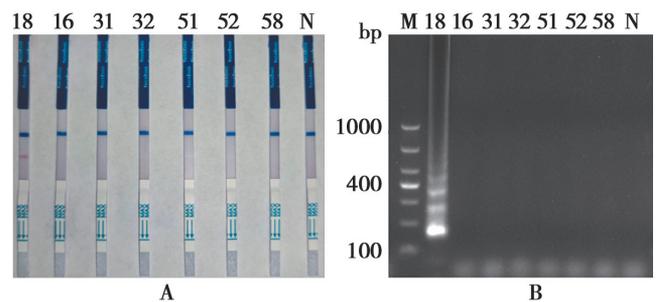


M DNA 标志物 N 阴性对照 10~60 LAMP 反应时间 (min) A UDG-LAMP-LFD 检测 B UDG-LAMP 琼脂糖凝胶电泳检测

图 5 LAMP 反应时间筛选

M DNA maker N Negative control 10-60 The reaction time of LAMP (min) A UDG-LAMP-LFD detection B UDG-LAMP agarose gel electrophoresis detection

Fig. 5 LAMP reaction time screening

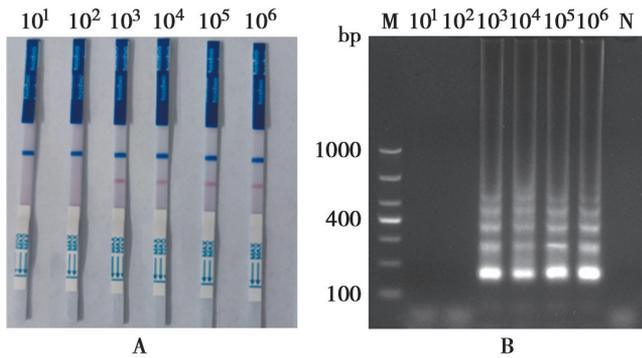


M DNA 标志物 N 阴性对照 16~58 HPV 型 A UDG-LAMP-LFD 检测 B UDG-LAMP 琼脂糖凝胶电泳检测

图 6 UDG-LAMP-LFD 特异性检测

M DNA maker N Negative control 16-58 HPV A UDG-LAMP-LFD detection B UDG-LAMP agarose gel electrophoresis detection

Fig. 6 Specificity of UDG-LAMP-LFD



M DNA 标志物 N 阴性对照  $10^1 \sim 10^6$  HPV18 质粒浓度  
A UDG-LAMP-LFD 检测 B UDG-LAMP 2% 琼脂糖凝胶电泳检测

图 7 UDG-LAMP-LFD 灵敏度检测

M DNA maker N Negative control  $10^1 \sim 10^6$  HPV18  
plasmid concentration A UDG-LAMP-LFD detection B UDG-LAMP  
agarose gel electrophoresis detection

Fig. 7 Sensitivity of UDG-LAMP-LFD



1~21 HPV18 阳性样品 22~29 HPV 阴性样品

图 8 UDG-LAMP-LFD 临床样品检测

1-21 HPV18 positive samples 22-29 HPV negative samples

Fig. 8 UDG-LAMP-LFD clinical sample detection

## 讨论

LAMP 技术是继 PCR 后发展起来的等温核酸扩增技术之一,该方法相对于传统的 PCR 较为简便,不需要精密的温度循环仪器。虽然 LAMP 技术具有仪器设备要求低、耗时短、灵敏度高、特异性高等优势,但其大量的扩增产物极易导致气溶胶污染,这也是 LAMP 技术面临的重要问题之一。大多数研究通常采取钙黄绿素<sup>[15]</sup>、SYBR Green I<sup>[16]</sup>等染料结合的方法及浊度分析法<sup>[17]</sup>闭管检测 LAMP 扩增产物,但是该类方法不具有特异性,不但难以区分出非特异性扩增,且存在人为视觉误差。

为了使 LAMP 结果更具特异性,将 LFD 检测结果特异可视化的优势与 LAMP 技术结合,一定程度上增强了结果检测的特异性。但是在使用 LFD 进行结果检测的过程中,对 LAMP 产物开盖极易导致气溶胶污染,Xu 等<sup>[18]</sup>设计了密闭 LFD 装置对扩增产物进行检测,但是该方式对装置的密闭性要求极高,在该检测体系中扩增管与 LFD 并不是一体的,也不能完全避免气溶胶产生。本研究引入热敏 UDG 酶有效防止了检测过程中气溶胶扩散导致的污染,同时联合 LAMP 技

术及 LFD,建立了一种 UDG-LAMP-LFD 检测体系,实现了对 HPV18 的快速、特异、可视化检测。

不同于普通 UDG 酶,本研究引入的热敏 UDG 酶可在室温(25~37 °C)下降解气溶胶污染,且在 LAMP 反应过程中(63 °C)热敏 UDG 酶已经被完全灭活,无需增加额外的高温循环使酶灭活,也不会降解产生的扩增产物。该检测体系优化后耗时短,能在 55 min 内完成对样品的检测及结果判读(包括热敏 UDG 酶孵育 10 min,LAMP 反应 40 min,LFD 判读 5 min),且临床样品验证结果同 QPCR 检测结果一致。虽然受热敏 UDG 酶和尿嘧啶碱基的影响,该体系的检测灵敏度低于实时荧光 LAMP<sup>[14]</sup>,但根据不对称策略<sup>[19]</sup>调整引物及探针的浓度,其灵敏度略优于 PCR 法<sup>[20]</sup>。

除此之外,与文献[21]不同的是,本研究不仅使用同化探针的方式设计与 LFD 特异性结合的标记物,同时还引入淬灭探针,以减少非特异性反应的发生<sup>[22-23]</sup>。苏华等<sup>[24]</sup>通过在检测体系中加入染料后的颜色变化进行判断,结果判读具有主观性,而本研究中使用 LFD 将检测结果的判读变得更加直接及简单,同时还避免了气溶胶污染导致的假阳性问题。

HPV 感染是 99% 的宫颈癌病因,虽然目前有针对性 HPV 病毒的疫苗,并且接种后能有效减少宫颈疾病的发生<sup>[25-26]</sup>,但在发展中国家以及发达国家的偏远地区,由于疫苗数量较少,价格昂贵,接种率仍然不高,无法减少疾病传播<sup>[27]</sup>,HPV 感染和相关疾病仍然是世界范围内的一个严重负担<sup>[28-29]</sup>。定期对妇女进行 HPV 筛查可以显著降低其死于宫颈癌的风险<sup>[30]</sup>。本研究建立的 UDG-LAMP-LFD 检测体系能灵敏、特异、快速、可视化的检测 HPV18 基因。除此之外,可针对不同的 HPV 型别特异序列设计对应的引物及探针,即可检测出不同型别的 HPV 病毒,且不易发生气溶胶污染。该体系引入资源有限地区及基层医院,有望成为 HPV 病毒筛查的重要技术手段。

## 【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(12):E63.
- [2] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16(3):223-229.
- [3] Hsieh K, Mage PL, Csordas AT, et al. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP) [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2014, 50(28):3747-3749.
- [4] Kil EJ, Kim S, Lee YJ, et al. Advanced loop-mediated isothermal amplification method for sensitive and specific detection of Tomato chlorosis virus using a uracil DNA glycosylase to control

- carry-over contamination[J]. J Virol Methods, 2015(213): 68-74.
- [5] Ravishankar R, Bidya SM, Roy S, et al. X-ray analysis of a complex of *Escherichia coli* uracil DNA glycosylase (EcUDG) with a proteinaceous inhibitor. The structure elucidation of a prokaryotic UDG[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(21): 4880-4887.
- [6] Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions[J]. Gene, 1990, 93(1): 125-128.
- [7] Pimple SA, Mishra GA. Global strategies for cervical cancer prevention and screening[J]. Minerva Ginecol, 2019, 71(4): 313-320.
- [8] Dunne EF, Park IU. HPV and HPV-associated diseases[J]. Infect Dis Clin North Am, 2013, 27(4): 765-778.
- [9] Machalek DA, Roberts JM, Garland SM, et al. Routine cervical screening by primary HPV testing; early findings in the renewed National Cervical Screening Program[J]. Med J Aust, 2019, 211(3): 113-119.
- [10] Ventriglia J, Paciolla I, Pisano C, et al. Immunotherapy in ovarian, endometrial and cervical cancer; State of the art and future perspectives[J]. Cancer Treat Rev, 2017(59): 109-116.
- [11] Olusola P, Banerjee HN, Philley JV, et al. Human papilloma virus-associated cervical cancer and health disparities [J]. Cells, 2019, 8(6): 622.
- [12] de Martel C, Plummer M, Vignat J, et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type[J]. Int J Cancer, 2017, 141(4): 664-670.
- [13] Ferlay J. Cancer incidence and mortality worldwide; sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Intern J Cancer, 2015, 136(5): E359-86.
- [14] 周骏, 牟颖, 黄月明, 等. 基于实时荧光环介导等温扩增的 HPV16 及 HPV18 检测体系的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(1): 58-63.
- [15] 朱海鹏, 郑旭, 王慧, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌可视化 LAMP 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医科学, 2022, 52(7): 837-845.
- [16] 贺春萍, 董文敏, 吴伟怀, 等. 橡胶树红根病原菌 LAMP 检测方法的建立及应用[J]. 热带作物学报, 2021, 42(1): 182-187.
- [17] Saetiew C, Limpaboon T, Jearanaikoon P, et al. Rapid detection of the most common high-risk human papillomaviruses by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Virol Methods, 2011, 178(1-2): 22-30.
- [18] Xu Y, Xiang W, Wang Q, et al. A smart sealed nucleic acid biosensor based on endogenous reference gene detection to screen and identify mammals on site[J]. Sci Rep, 2017(7): 43453.
- [19] Pierce KE, Sanchez JA, Rice JE, et al. Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR; primer design criteria for high yields of specific single-stranded DNA and improved real-time detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(24): 8609-8614.
- [20] Hamzan NI, Ab Rahman N, Suraiya S, et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of human papillomavirus 16 in oral squamous cell carcinoma[J]. Arch Oral Biol, 2021(124): 105051.
- [21] Zhang J, Cao J, Zhu M, et al. Loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow dipstick (LAMP-LFD) to detect *Mycoplasma ovipneumoniae*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2019, 35(2): 31.
- [22] Hardinge P, Murray JAH. Reduced false positives and improved reporting of loop-mediated isothermal amplification using quenched fluorescent primers[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 7400.
- [23] 黄月明, 牟颖, 周骏, 等. 环介导等温扩增联合横向流动试纸条可视化检测 HPV16 及 HPV58 方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(6): 624-629.
- [24] 苏华, 陈琛, 马先, 等. 环介导等温扩增技术快速检测 HPV18 方法的建立[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(10): 1034-1037.
- [25] St Laurent J, Luckett R, Feldman S. HPV vaccination and the effects on rates of HPV-related cancers[J]. Curr Probl Cancer, 2018, 42(5): 493-506.
- [26] Mladenka A, Slama J. Vaccination against HPV and view of new possibilities[J]. Ceska Gynekol, 2018, 83(3): 218-225.
- [27] Roman BR, Aragones A. Epidemiology and incidence of HPV-related cancers of the head and neck[J]. J Surg Oncol, 2021, 124(6): 920-922.
- [28] Petca A, Borislavski A, Zvanca ME, et al. Non-sexual HPV transmission and role of vaccination for a better future (Review)[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(6): 186.
- [29] Yang A, Farmer E, Wu TC, et al. Perspectives for therapeutic HPV vaccine development[J]. J Biomed Sci, 2016, 23(1): 75.
- [30] Bedell SL, Goldstein LS, Goldstein AR, et al. Cervical cancer screening; Past, Present, and Future[J]. Sex Med Rev, 2020, 8(1): 28-37.

【收稿日期】 2022-08-22 【修回日期】 2022-11-16