

进骨折愈合作用,而降低全血黏度及血浆黏度,改善血液流变性可能是其潜在的效应机制。

参考文献

1 Rutten S, Nolte PA, Korstjens CM, Klein - Nulend J. Low - intensity pulsed ultrasound affects RUNX2 immunopositive osteogenic cells in delayed clinical fracture healing. *Bone*,2009,45(5):862 - 869
 2 Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*,1998,355: S7 - S21
 3 Goldhahn J, Scheele WH, Mitlak BH, *et al.* Clinical evaluation of me-

dicinal products for acceleration of fracture healing in patients with osteoporosis. *Bone*,2008,43(2):343 - 347

4 李学东,陈斌,郑创义,等.三七总皂甙对骨髓基质细胞成骨分化及成骨作用的调节. *中国骨质疏松杂志*,2009,15(5):371 - 373
 5 Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am*,1997,79(11):1699 - 1709

(收稿:2010 - 01 - 14)

(修回:2010 - 04 - 07)

检测甲型 H1N1 流感病毒富集方法的初步探索

李 华 柯华昕 龙润乡 杨 蓉 何春艳 白慧珠 崔萍芳 谢忠平

摘要 目的 探索甲型 H1N1 流感病毒的富集方法,提高流感病毒核酸检测的灵敏度。**方法** 分别用 ProteinA/G 及 H1N1 特异性血清处理流感病毒样品,根据国家流感中心设计的 H1N1 亚型检测通用引物,采用反转录 - 聚合酶链反应(RT - PCR)方法,扩增产物为 527bp,来评价病毒的富集效果。**结果** 两种富集方法均能提高检测灵敏度,用 ProteinA/G 富集处理后检测灵敏度可达 10^{-6} ,用 H1N1 特异性血清沉淀富集处理后灵敏度为 10^{-5} 。**结论** 初步建立的富集甲型 H1N1 流感病毒方法,有效提高了流感病毒 RT - PCR 检测的灵敏度,可用于甲型 H1N1 流感病毒的检测。

关键词 流感病毒 甲型 H1N1 亚型 富集 检测

The Primary Exploration of Enrichment Methods for Influenza A (H1N1) Virus. Li Hua, Ke Huaxin, Long Runxiang, *et al.* Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Yunnan 650118, China

Abstract Objective To explore the enrichment methods for influenza A (H1N1) virus and improve the detection sensitivity of the virus nucleotide. **Methods** The influenza A (H1N1) virus samples were enriched by Protein A/G and the specific serum respectively. Universal primers of H1N1 subtype, which is designed by the National Influenza Center were applied in RT - PCR method to evaluate the effect of the virus enrichment. The RT - PCR product was 527bp. **Results** These two enrichment methods both could improve the detection sensitivity. The detection sensitivity of Protein A/G and H1N1 - specific serum enrichment methods could reach 10^{-6} and 10^{-5} respectively. **Conclusion** Such established enrichment methods for influenza A (H1N1) virus could effectively improve the detection sensitivity of influenza viruses through RT - PCR and could be used to detect Influenza A (H1N1) virus.

Key words Influenza virus; H1N1 subtype; Enrich; Detect

流感病毒属正粘病毒科,其基因组由分节段、单股负链 RNA 组成,其相对分子质量为 5000kDa。分为甲、乙、丙 3 个型别,均可引起人类急性呼吸道疾病^[1,2]。甲、乙型流感毒粒基因组有 8 个基因节段,而丙型仅有 7 个,缺 1 个编码神经氨酸酶蛋白的基因节段。基因组分节段是造成同型不同毒株间产生很高基因重配率的原因。甲、乙型流感病毒交替流行,涉及面广,对人群造成不同程度的危害,在婴

幼儿、老年人和免疫抑制患者中有更高的发病率和病死率。

2009 年 3 月,墨西哥暴发甲型 H1N1 流感,造成人员死亡,疫情很快蔓延到世界各地,我国内地也相继出现,因此,防治甲型 H1N1 流感成为当务之急。防治流感病毒首先要加强流感病毒变异的检测,尽量作出准确的预报,以便进行有针对性的措施如疫苗接种、治疗等。目前,实验室常规检测流感病毒的方法有 3 种;血清学诊断、病毒分离(通常取呼吸道标本包括鼻咽洗液和咽拭子,接种鸡胚或敏感细胞分离病毒,培养 16 ~ 72h)、快速诊断(使用 ELISA 和免疫荧光法^[3-6])。这些免疫测定方法需要相当完整的靶抗

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所

通讯作者:谢忠平,电子信箱:xzp218@126.com

原和型特异性的免疫血清,操作步骤繁琐。现在通过采用反转录-聚合酶链(RT-PCR)反应的分子检测为甲型 H1N1 流感早期诊断的主要方法,但如何解决样品中病毒含量过低、临床样品中存在抑制 PCR 的物质等影响因素。本研究主要将样品采取特异抗体捕捉及联合运用特异性抗体与 Protein A/G 结合的方法对流感病毒进行富集,以达到更准确、更灵敏地检测甲型 H1N1 流感病毒^[7]。

材料与方 法

1. 材料: H1N1 亚型检测通用引物 527bp; 上海生物工程技术有限公司合成甲型 H1N1 流感病毒样品; 由英国 NIBSC 提供。抗甲型 H1N1 流感病毒血清: 由中国医学科学院医学生物研究所生物制品五室提供。Protein A/G Ultralink Resin: Thermo scientific. lot: JJ124662。RNA 提取试剂盒 Axygen Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit. Lot. No: KC50070301。RT-PCR Kit: TAKARA One step RT-PCR Kit. lot: BK801。

2. 方法: (1) H1N1 流感病毒样品最低检测下限浓度的确定: 对病毒样品直接稀释(不做任何处理), 取 1: 200、1: 300、1: 400、1: 500、1: 600、1: 700、1: 800、1: 1000 共 8 个稀释度, 分别取 250 μ l, 用 RNA 提取试剂盒直接提取核酸, 再用 TAKARA One step RT-PCR Kit, 反应体系为 25 μ l, 其中 RNase Free Water 13 μ l, 5 \times RT-PCR 缓冲液 5.0 μ l, Enzyme Mix 1.0 μ l, 上游引物及下游引物各 0.5 μ l (20 μ mol/L), 模板 RNA 5.0 μ l。反应条件为 60 $^{\circ}$ C 1min, 42 $^{\circ}$ C 10min, 50 $^{\circ}$ C 30min, 95 $^{\circ}$ C 15min 进行反转录, 然后 94 $^{\circ}$ C 30s, 52 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 进行 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7min。电泳检测。(2) 免疫沉淀中特异性血清浓度的探索: 选稀释度 1: 500 病毒样品, 分成 7 管, 3.0 毫升/管, 分别在各管中加入特异性血清 10 μ l、20 μ l、30 μ l、40 μ l、50 μ l、60 μ l、70 μ l, 混匀后, 放置于 37 $^{\circ}$ C 水浴 1h, 12000r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 弃上清, 沉淀加入 300 μ l 水(无 RNA 酶)悬浮, 分别取 250 μ l, 用 RNA 提取试剂盒直接提取核酸, 再用一步法 RT-PCR Kit 按说明进行核酸扩增, 电泳检测。(3) Protein A/G 浓度的确定: 选稀释度 1: 500 病毒样品, 分成 7 管, 3.0 毫升/管, 分别在各管中加入特异性血清 40 μ l, 4 $^{\circ}$ C 过夜后, 加入 Protein A/G 10 μ l、20 μ l、30 μ l、40 μ l、50 μ l、60 μ l、70 μ l, 混匀后, 于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中以 120r/min 结合 60min, 离心, 弃上清, 用含 0.05% Tween20 的 PBS 洗涤 3 次, 沉淀加入 300 μ l 水(无 RNA 酶)悬浮, 分别取 250 μ l, 用 RNA 提取试剂盒直接提取核酸, 再用一步法 RT-PCR Kit 按说明进行核酸扩增, 电泳检测。(4) H1N1 流感病毒样品富集: 取 H1N1 流感病毒样品进行稀释, 稀释度从 10⁻¹ ~ 10⁻⁹, 分为两组, 一组加入 H1N1 特异性血清中和富集, 另一组加 H1N1 特异性血清及 Protein A/G 进行富集; 分别按(2)和(3)处理, 各取 250 μ l, 用 RNA 提取试剂盒直接提取核酸, 再用一步法 RT-PCR Kit 按说明进行核酸扩增, 电泳检测。同时用水做阴性对照。

结 果

1. 流感病毒样品最低检测下限浓度的确定: 病毒样品稀释后在 1: 200、1: 300、1: 400、1: 500、1: 600、1: 700、1: 800、1: 1000 共 8 个稀释度中, 最低检测下限为 1: 500。

2. 免疫沉淀中特异性血清浓度的探索: 选稀释度 1: 500 病毒样品, 加入特异性血清 10 μ l、20 μ l、30 μ l、40 μ l、50 μ l、60 μ l、70 μ l 作用后, 40 ~ 70 μ l 均有较好的免疫沉淀作用, 而 10 ~ 30 μ l 的免疫沉淀作用不明显。

3. Protein A/G 浓度的确定: 选稀释度 1: 500 病毒样品, 先各加入 H1N1 特异性血清 40 μ l, 再分别加入 Protein A/G 10 μ l、20 μ l、30 μ l、40 μ l、50 μ l、60 μ l、70 μ l 作用, 结果 40 μ l 效果较好。

4. Protein A/G 与特异性血清: 将病毒样品进行稀释, 分别加入 H1N1 特异性血清及 Protein A/G 40 μ l 富集作用后, 其结果显示 H1N1 特异性血清可检测的稀释度为 10⁻⁵, 结果见图 1; Protein A/G 可检测的稀释度为 10⁻⁶, 结果见图 2。

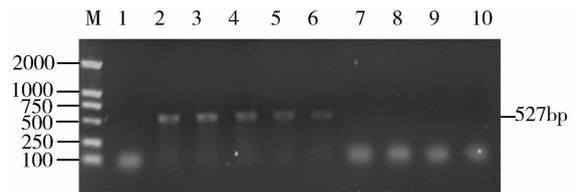


图 1 H1N1 特异性血清富集作用结果检测稀释度为 10⁻⁵

M. 蛋白质标记 DL2000; 1. 阴性对照;
2 ~ 10. 病毒稀释度 10⁻¹ ~ 10⁻⁹

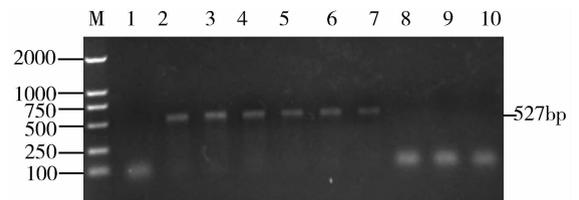


图 2 Protein A/G 富集作用结果检测稀释度为 10⁻⁶

M. 蛋白质标记 DL2000; 1. 阴性对照;
2 ~ 10. 病毒稀释度 10⁻¹ ~ 10⁻⁹

讨 论

核酸检测 H1N1 流感病毒的方法是基于 PCR 原理的一种快速有效的诊断方法, 在突发传染病应急工作中发挥了巨大作用。在进行流感病毒检测方法建立过程中, 对病毒进行不同富集方法的探索研究, 以达到更灵敏、快速有效地检测流感病毒, 为及时有效

地预防、控制疫情及治疗做准备。由于有些临床样品病毒数量极少,浓度极低,难以直接检测,参考目前提高环境水体中的病毒浓度的方法^[8],对样品中 H1N1 流感病毒的浓集采取免疫学反应法和免疫吸附法。其中免疫学方法(抗原抗体反应)其敏感性非常高、特异性强、操作简便;免疫吸附法在免疫学方法的基础上进一步浓集病毒,使检测的敏感性更高、特异性更强。通过富集,增加了病毒量,浓缩并纯化了检测的病毒样品,排除了干扰。对用于 PCR 方法检测的样品,消除了抑制物的影响^[9]。在本实验中有两个特异性选择过程,一是抗原-抗体的特异性免疫结合。另一个是 Protein A/G 与抗原-抗体免疫复合物的又一次特异性结合,保证了抗原样品的纯度及灵敏度,减少了非特异性,降低了检测结果的假阴性,提高了 RT-PCR 检测的灵敏度。实验中选择 Protein A/G,是利用其特性来富集、浓缩病毒以提高检测的灵敏度。Protein A/G 是使用 Protein A 与 Protein G 的抗体结合结构域融合后的重组蛋白和树脂偶联制成。由于 Protein A/G 连接所有人类 IgG 亚类、还有 IgA、IgE、IgM 及少量的 IgG,且连接不受环境条件 pH 的影响。Protein A/G 使用多位点交联技术,稳定性好、特异性高并具有广谱结合力,每毫升基质可特异性结合 6~10mg 抗体。

由结果可知,对样品直接 RT-PCR,其检测的稀释度仅约 10^{-2} (1:500),当采用 H1N1 特异性血清免疫沉淀病毒后,其检测的稀释度提高至 10^{-5} ,而用特异性血清与 Protein A/G 联合使用,其检测的稀释度

达 10^{-6} ,检测的灵敏度又提高 10 倍,所采用的病毒富集方法效果是显著的,说明通过用富集病毒的方法,使检测灵敏度得到提高,有可能为 H1N1 病毒分子检测提供新的思路和方法依据,同时也为其他 RNA 病毒的分子检测提供新的模式。

参考文献

- 1 卢锦汉,章以浩,赵锐. 医学生物制品学[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:642-651;2版,2007:805-810
- 2 陆学东. 临床常见呼吸道病毒及其实验室诊断技术[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(8):956-960
- 3 Ziegler T, Hall H, Sanchez-Fauquier A, et al. Type and subtype-specific detection of influenza viruses in clinical specimens by rapid culture assay. J Clin Microbiol, 1995,33:318-321
- 4 Doller G, Schuy W, Tjhen KY, et al. Direct detection of influenza virus antigen in nasopharyngeal specimens by direct enzyme immunoassay in comparison with quantitating virus shedding. J Clin Microbiol, 1992,30:866-869
- 5 中华人民共和国卫生部. 甲型 H1N1 流感诊疗方案(2009 年试行版第 1 版)[J]. 传染病信息,2009,22(3): I~III
- 6 贾菲综述,高宝荣,朱春玉,等. 高致病性禽流感病毒实验室检测方法研究进展[J]. 国际病毒学杂志,2009,16(2):39-43
- 7 王四全,吴俊,曹玉广. 水体中病毒富集方法研究进展[J]. 中国公共卫生,2009,25(11):1287-1289
- 8 陈小岳,田海林. 水体肠道病毒的浓集及核酸检测方法的应用[J]. 职业与健康,2007,23(4):293-295
- 9 陈军红,周志军,张林,等. 空气和水环境中病毒的富集与检测研究进展[J]. 中国公共卫生,2005,21(4):502-504

(收稿:2010-01-29)

(修回:2010-04-05)

虎杖苷吸入剂对哮喘大鼠模型炎性细胞的影响

江庆澜 雷秀霞 梁颜笑 刘桂长 巫小莉 梁成结 连家燕

摘要 目的 分析虎杖苷吸入剂对支气管哮喘大鼠模型的干预效果。**方法** 以 10% 的卵蛋白(OVA)和 3% 的氢氧化铝混合液腹腔注射实验大鼠 2 次致敏,然后以 2% 的 OVA 诱喘并进行虎杖苷和氨茶碱干预及生理盐水对照实验两周。观察实验大鼠诱喘和药物干预后的行为变化和肺组织切片、检测各组大鼠心室血中白细胞(WBC)、嗜酸性粒细胞(EOS)、嗜碱性粒细胞(BASO)、中性粒细胞(NEUT)和淋巴细胞(LYM)的数量变化。**结果** 在诱喘过程中,虎杖苷干预组大鼠的哮喘症状得到明显改善,虎杖苷干预组大鼠 EOS、LYM 和 MONO 数量 [$(0.1339 \pm 0.01794) \times 10^9/L$, $(6.5440 \pm 0.49530) \times 10^9/L$, $(0.2148 \pm 0.08287) \times 10^9/L$] 较哮喘对照组大鼠的 EOS、LYM 和 MONO [$(0.1948 \pm 0.02454) \times 10^9/L$, $(8.0090 \pm 0.71166) \times 10^9/L$, $(0.2946 \pm 0.14257) \times 10^9/L$] 有所下降 ($P < 0.05$, $P > 0.05$, $P > 0.05$),且与正常对照组水平 (0.1257 ± 0.02454 , 6.9610 ± 0.97243 , $0.1974 \pm$

基金项目:广州市医药卫生科技项目(2008-YB-027);广州市中医药、中西医结合科技项目(2009-A-05)

作者单位:510180 广州市第一人民医院(江庆澜,雷秀霞,梁颜笑,刘桂长,巫小莉);510182 广州医学院(梁成结,连家燕)