

环介导等温扩增检测甲型 H1N1 病毒核酸方法的建立

张永乐 潘克女 武 静 钟华燕 娄国强 杨 劲

摘要 **目的** 建立检测甲型 H1N1 病毒环介导等温扩增的方法(LAMP)。**方法** 根据已公布的甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因序列 766~995bp 的 6 个位点设计 6 条 LAMP 引物(2 条内引物,2 条外引物,2 条环引物),优化并建立 LAMP 检测体系。并对 36 例确诊 H1N1 感染患者和 20 例健康体检者的咽拭子同时采用实时荧光 RT-PCR(Real-time RT-PCR)和 LAMP 进行 H1N1 病毒核酸的检测。**结果** 所建立的甲型 H1N1 病毒核酸 LAMP 反应体系具有良好的特异性,采用该体系检测结果与 Real-time RT-PCR 检测结果一致,对 H1N1 核酸阳性的标本经 LAMP 扩增产物电泳图为阶梯状条带,健康对照标本未见条带产生。灵敏度试验,采用 10^3 复制的 H1N1 质粒进行 10 倍稀释后 LAMP 法仍能检出。特异性试验,20 例体检标本经两种方法检测全阴性,对肺炎支原体和肺炎衣原体阳性标本采用该反应体系进行检测结果为阴性。**结论** 甲型 H1N1 病毒核酸 LAMP 检测方法简便、快捷,对实验仪器设备要求不高,适合各级实验室和现场快速诊断使用。

关键词 流感病毒 A 型 H1N1 亚型 病毒 环介导等温扩增 实时荧光 RT-PCR

Development of Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP) Method for Detection of Influenza A(H1N1) Virus. Zhang Yongle, Pan Kenv, Wu Jing, Zhang Huayan, Lou Guoqiang, Yang Jing, Hangzhou Sixth People's Hospital, Zhejiang 310014, China

Abstract Objective To detect H1N1 infection rapidly by using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Methods** The H1N1-specific LAMP primer set, including two inner, two outer, and two loop primers, was designed according to the conserved segment of HA gene, located between 766 and 995nt. The LAMP assay was further optimized. The oral swab samples, from 36 confirmed H1N1 patients and 20 healthy controls, were tested both by Real-time PCR and LAMP method. **Results** H1N1-LAMP specifically detected H1N1 virus strain, showing specific ladder-like pattern in electrophoresis, while no positive signal could be observed in control group. The results of H1N1-LAMP were consistent to those of Real-time RT-PCR. The sensitivity of H1N1-LAMP assay was performed by 10-fold dilution of the samples with the concentration of 10^3 Copies, which was confirmed by real-time RT-PCR. For the specificity experiment, 20 example physical examination specimen examined were all negative after two methods. **Conclusion** H1N1-LAMP assay is easy to perform, no requiring of sophisticated equipment. It is potential for widely application in clinical laboratory and point of care setting.

Key words Influenza A virus; H1N1 subtype; Virus; Loop-mediated isothermal amplification; Real-time RT-PCR

甲型流感病毒是引起人流感的主要病原体^[1], 2009 年的甲型 H1N1 流感在墨西哥暴发以来很短的时间内传播全球,WHO 预测全球 80% 人群普遍易感^[2],感染新型甲型 H1N1 流感临床表现与季节性流感和其他病毒性流感相似,多为高热、咳嗽、肌肉痛,部分患者病情进展较快容易继发严重肺部疾病,甚至死亡。但该病是一种可预防、可治疗的疾病,早期快速诊断、隔离是控制甲型 H1N1 流行的有效手段,目前 WHO 推荐的 Real-time RT-PCR 法检测甲型

H1N1 流感病毒核酸为确诊试验,但该方法需要时间长,检测实验设备要求高,不利于各级医院开展。笔者采用环介导恒温扩增(LAMP)技术测甲型 H1N1 流感病毒不需要昂贵仪器可应用于各级医院和疾病预防控制中心,检测时间快,实验简单易操作,现报告如下。

材料与方法

1. 标本来源:36 例确诊为甲型 H1N1 流感病毒感染患者是 2009 年 6 月 10 日~12 月 5 日由杭州市疾病控制中心确诊后在杭州市第六人民医院隔离治疗的患者,其中男性 22 例,女性 14 例,平均年龄 23.5 岁。诊断依据卫生部颁布甲型 H1N1 流感病毒诊疗方案中确诊病例的诊断标准,20 例健康体检者为同时期在笔者医院体检中心体检者,排除近期有呼吸道感染病史^[3]。

2. 仪器和试剂:所用仪器有 ABI7900 荧光定量 PCR 检测仪,上海精宏公司产恒温水浴锅,德国 eppendorf 冷冻离心机,

作者单位:310014 杭州市第六人民医院分子诊断实验室(张永乐、武静);感染科(娄国强);杭州市第一人民医院检验科(潘克女);杭州市优思达生物技术有限公司(钟华燕);浙江省血液中心(杨劲)(注:张永乐与潘克女为并列第一作者)

通讯作者:张永乐,电子信箱:da-an-ren@163.com

eppendorf 移液器,所用试剂:荧光定量 RT-PCR 检测甲型 H1N1 流感病毒试剂盒为上海之江生物科技有限公司生产, LAMP 检测甲型 H1N1 流感病毒试剂所用原料购自杭州优思达生物公司,样本 RNA 抽提试剂购自上海之江生物有限公司。

表 1 H1N1 核酸检测引物及探针

引物	引物序列
LAMP 法	F3:5'-ATAACATTAGAAGCAACTG-3'
	B3:5'-AAATAGGCCTCTAGATTG-3'
	FIP:5'-GTGGACTGGTGTATCTGAAATGATAGAAATCTAGTGGTACCGAGA-3'
	BIP:5'-ATACAACCTTGTCAGACACCCAAGGGACATTTTCCAATTGTGATCG-3'
	Loop-1:5'-TTCCTCAATCCTGTGGCCA-3'
	Loop-2:5'-GATATGCATTGCGCAATGGAA-3'
实时 RT-PCR	上游:5'-GTGCTATAAACACCAGCCTCCA-3'
	下游:5'-CGGGATATTCCTTAATCCTGTGC-3'
	探针:5'-FAM-CAGAATATACATCCGTCACAATTGGAAA-TAMRA-3'

4. 反应体系配比及反应条件:LAMP 检测体系为 F3/B3、FIP/BIP、Loop1/Loop2 各 1μl, 10 × buffer 3μl, MgCl₂ 2.5μl, 10mmol/L dNTP 各 1.25μl, 5 × Betaine 6μl, 宝生物酶 1μl, Bst 酶 1μl, RNase 酶 0.5μl, 模板 5μl, 合计体系 25μl。反应条件为 65℃ 45min(恒温水浴锅中进行)结束后在 1.5%~2% 的琼脂糖凝胶中电泳,电泳条带显示 LAMP 特征性梯状条带者判断为阳性;如无特征性梯状条带时判为阴性,Real-time RT-PCR 检测采用上海之江生物科技有限公司试剂盒进行检测反应条件为 50℃ 30min, 94℃ 2min, 94℃ 15s, 60℃ 45s 扩增 45 个循环,阳性判断参照文献[4]报道关于 Real-time RT-PCR 阴阳性图形判断。

5. 标本收集及 RNA 的提取:收集患者在发热 3 天内未使用任何抗病毒药物时的咽拭子置于含有 1ml RNA 保存液的无菌试管中立即送本院分子诊断实验室。RNA 的提取,采用上海之江生物科技公司提供的磁珠提取试剂盒经行 RNA 的抽提。具体操作为将含有咽拭子和 RNA 保存液的试管在振荡器上振荡 1min 后挤干棉拭子,将液体转入无菌 1.5ml 离心管 13000r/min 离心 5min,弃上清加入 500μl 的生理盐水溶解沉淀。取溶解液 200μl 加 600μl 结合液,6μl RNA 助沉剂,20μl 磁珠混匀后转入亲和柱静置 3min, 13000r/min 离心 1min,加 600μl 洗涤液 13000r/min 离心 1min,重复洗涤 2 次。13000r/min 离心 3min,使亲和柱干燥后加入 50μl 洗脱液 13000r/min 离心 2min,浆洗脱的 RNA 模板置于无 RNase 的离心管中备用。

6. LAMP 扩增产物的测序鉴定:随机抽取 5 份 LAMP 扩增阳性的标本送往上海之江生物科技有限公司进行测序对比。

7. LAMP 扩增和实时 RT-PCR 检测 H1N1 核酸的灵敏度分析:对 10³ 复制的病毒质粒进行 1:10 的稀释后采用两种方法检测,特异性,采用肺炎支原体衣原体阳性的标本和 20 例体检标本用本反应体系经行测定看是否存在假阳性。

3. LAMP 核酸检测和 Real-time RT-PCR 所需引物:核酸试纸条法根据 2009 年公布甲型 H1N1 流感病毒基因序列设计 6 条环介导等温扩增引物(表 1),其中包含了两条外引物(F3、B3),两条环状结合引物(Loop1、Loop2),两条内引物(FIP、FIB),荧光定量 RT-PCR 试剂引物由试剂商提供。

结 果

1. LAMP 扩增甲型 H1N1 病毒核酸的电泳分析:甲型 H1N1 流感病毒经 LAMP 扩增检测阳性扩增产物电泳图呈 LAMP 特征的梯形条带,阴性标本未见任何条带(图 1)。

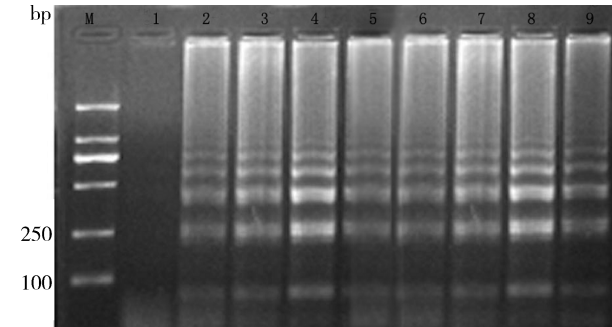


图 1 LAMP 扩增甲型 H1N1 流感病毒 RNA 的特异性电泳图

M, 为 Mark 标准条带,1 为阴性条带,2~7 为 H1N1 核酸阳性条带,8 为阳性指控条带,9 为 10² 复制浓度条带

2. Real-time RT-PCR 检测 H1N1 结果分析:Real-time RT-PCR 扩增检测 H1N1 核酸标本根据标本中原始 H1N1 核酸的模板量不同扩增出的曲线 Ct 值不同,Ct 值小表明原始模板量大,Ct 值小表明原始模板量少。具体分析如图 2。

3. 甲型 H1N1 病毒感染者和健康对照咽拭子检测结果:36 例经杭州市疾病预防控制中心确诊 H1N1 感染患者在入院时的咽拭子经 LAMP 和 Real-time RT-PCR 检测 H1N1 病毒核酸全阳性,20 例健康对照经两种方法检测全阴性,二者结果完全一致。

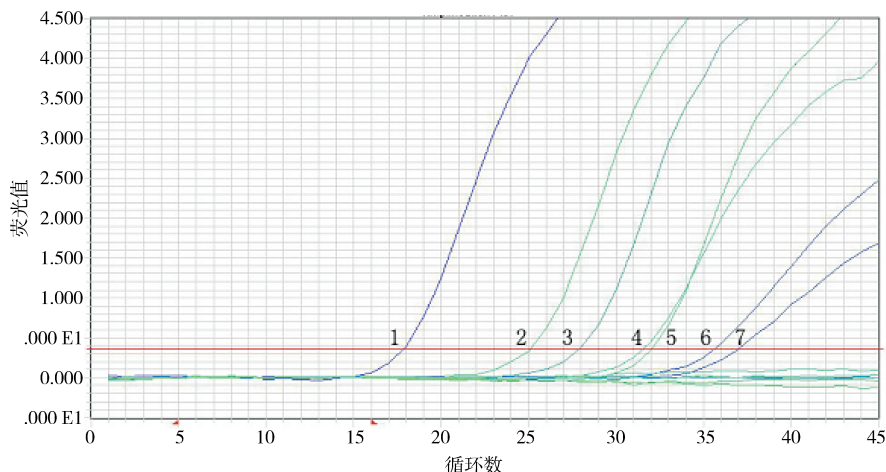


图2 Real-time RT-PCR 扩增甲型 H1N1 流感病毒 RNA 的曲线图

1~7 为 H1N1 核酸经 Real-time RT-PCR 检测阳性标本。从 1 到 7 H1N1 核酸浓度逐渐下降,

7 为 10^3 复制浓度的 H1N1 病毒量,红色曲线以下的平直线为阴性标本曲线

4. LAMP 和实时 RT-PCR 法灵敏度比较:对 10^3 复制的病毒质粒进行 1:10 的稀释后同时进行实时 RT-PCR 检测和 LAMP 检测,结果实时 RT-PCR 检测为阴性,而 LAMP 检测结果为阳性,电泳条带如图 1 中 9 号标本条带所示,5 份经 LAMP 检测 H1N1 阳性的标本送上海之江生物进行测序比对证实该序列为 2009 年流行的 H1N1 序列,同时对 10 例肺炎支原体和肺炎衣原体标本阳性的标本经行该体系检测结果为阴性。

讨 论

环介导等温扩增技术 (LAMP) 是一种新的核酸等温扩增技术^[5],原理是在目的基因片段上的 6 个位点上设计 4~6 条引物,该引物设计方式与日本学者报告的甲型 H1N1 环介导等温扩增方法大体相似,其中包括一对外引物 F3/B3,一对内引物 FIP/BIP,以及一对环状引物 LOOP1/LOOP2,他们在 BstDNA 聚合酶的作用下,将目的片段在等温情况下 ($60 \sim 65^\circ\text{C}$) 无限扩增的过程,其产物形成大小不一的 DNA 片段,产物在琼脂糖电泳中显示梯状条带^[6,7]。日本学者采用该技术对 2009 年流行全球的甲型 H1N1 流感病毒进行了检测,得出 LAMP 检测的特异性和敏感度都要较普通 PCR 法要高^[6]。目前该技术被应用于病毒,细菌,寄生虫等的检测^[8~11]。

本文采用 LAMP 技术建立了检测甲型 H1N1 病毒核酸的检测方法,通过与中国疾控中心推荐的 H1N1 流感病毒 RNA 实时 RT-PCR 法相比较,两种方法的特异性相当,对 36 例 H1N1 感染者两种检测方法均为阳性,特异性,对 20 例非 H1N1 感染的健康

对照者检测均呈阴性,10 例肺炎支原体肺炎衣原体阳性的标本采用该体系检测均为阴性,5 例经 LAMP 检测 H1N1 阳性的标本经行测序比对与 2009 年流行的 H1N1 病毒序列高度吻合。将 10^3 复制的病毒量的质粒进行 1:10 倍稀释后实时 RT-PCR 检测阴性而 LAMP 检测仍为阳性,因此 LAMP 的灵敏度要较实时 RT-PCR 法灵敏 10 倍以上。从检测时间上看 LAMP 完成 1 次检测可在 1h 内完成,而实时 RT-PCR 法则需要 3h。从所需仪器上看实时 RT-PCR 需要荧光定量 PCR 仪,而 LAMP 只需很温水浴锅即可。

综上所述,本研究建立的甲型 H1N1 流感病毒核酸 LAMP 检测方法具有特异性强、灵敏度高、方便快捷等特点,可在基层或小型实验基地进行,同时也可应用于现场检测、卫生评价、临床诊断等方面。为甲型 H1N1 流感病毒核酸检测提供了一种新的技术与方法。

参考文献

- 1 Ron Foucher AM, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H_{16}) obtained from black headed gulls. J Virol, 2005, 79(5): 2814-2822
- 2 Novel swine - origin influenza A (H_1N_1) virus investigation team. Emergence of a novel swine - Origin influenza A (H_1N_1) virus in humans[J]. N Engl J Med, 2009, 360(25): 2605-2615
- 3 中华人民共和国卫生部. 甲型 H1N1 流感诊疗方案 (2009 年施行版第一版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2009, 2(3): 135-136
- 4 张永乐, 潘克女, 徐岱, 等. 手足口病病原体实时荧光 RT-PCR 反应体系的建立与临床应用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 29(3): 276-278
- 5 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

- 6 Kubo T, Agoh M, Mai le Q, *et al.* Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus as a novel molecular method for diagnosis of pandemic influenza in resource-limited settings. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(3):728-735
- 7 Shigemoto N, Fukuda S, Takao S, *et al.* Rapid detection of novel influenza A virus and seasonal influenza A (H1N1, H3N2) viruses by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Kansenshogaku Zasshi*, 2010, 84(4):431-436
- 8 张永乐, 徐岱, 娄国强, 等. 乙型肝炎病毒恒温扩增试纸条法检测

在临床中的应用[J], 中华预防医学杂志, 2010, 44(2):174-175

- 9 Ji J. Rapid diagnosis of duck plague virus infection by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Res Vet Sci*, 2009, 87(1):53-58
- 10 朱水荣, 陈寅, 王志刚, 等. 应用环介导等温扩增法快速检测 O139 群霍乱弧菌[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 29(6):564-567
- 11 杨秋林, 张如胜, 伍和平, 等. 环介导等温扩增技术检测卡氏肺孢子虫的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28(6):565-567

(收稿:2010-10-15)

(修回:2011-04-21)

肿瘤标志物联合检测在胰腺癌诊断中的价值

钱燕儿

摘要 目的 探讨血清 CA199、CA125 和 CEA 三种指标联合检测对提高胰腺癌诊断性能的价值。**方法** 应用电化学发光免疫分析法检测 63 例胰腺癌和 97 例胰腺良性病组(包括急慢性胰腺炎)以及 109 例正常体检者血清中 CA199、CA125 和 CEA 的水平, Logistic 回归和 ROC 曲线分析三者联合检测对胰腺癌诊断性能, 评价它们的诊断价值。**结果** 各肿瘤标志物在胰腺癌组浓度均显著高于胰腺良性病组和正常对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); CA199、CA125 和 CEA 对胰腺癌诊断的灵敏度特异性和准确度分别为 82.3%、89.6%、0.837、62.7%、91.8%、0.691 和 79.4%、90.5%、0.811; Logistic 回归和 ROC 曲线分析三者联合检测对胰腺癌诊断的灵敏度特异性和准确度分别为 92.6%、86.5% 和 0.912。**结论** CA199、CA125 和 CEA 联合检测可明显提高胰腺癌诊断的灵敏度, 有助于为胰腺癌提供参考诊断。

关键词 胰腺癌 CA199 CA125 CEA 联合检测

The Value of Three Tumor Markers in the Diagnosis of Pancreatic Cancer. Qian Yaner. Department of Laboratory Medicine, Shaoxing People's Hospital, Zhejiang 312000, China

Abstract Objective To evaluate the value of the three serum tumor markers, CA19-9, CEA and CA125 in improving the diagnostic performance of pancreatic cancer. **Methods** The serum concentrations of CA199, CEA and CA125 were measured with electrochemiluminescence immunoassay in the 93 patients with pancreatic cancer, 63 patients with the chronic pancreatitis and 109 normal controls. The value of the three serum tumor markers in the diagnostic performance of pancreatic cancer was evaluate with the ROC curve. **Results** The concentrations of these tumor markers in the patients with pancreatic cancer were significantly higher than those in the chronic pancreatitis and normal controls($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The sensitivity, specificity and accuracy of CA199, CEA and CA125 were 82.3%, 89.6%, 0.837 and 62.7%, 91.8%, 0.691 and 79.4%, 90.5%, 0.811, respectively. The sensitivity, specificity and accuracy of combined detection of CA199, CA125 and CEA were 92.6%, 86.5% and 0.912. **Conclusion** The combined measurement of serum CA199, CA125 and CEA significantly increased the sensitivity for diagnosis of pancreatic cancer and can provide useful information as a diagnosis of the reference in patients with pancreatic cancer.

Key words Pancreatic cancer; CA199; CA125; CEA; The combined measurement

由于吸烟、饮酒、饮咖啡、幽门螺杆菌感染以及遗传因素造成胰腺癌的发病率逐年上升, 在我国, 胰腺癌已成为我国人口死亡的十大恶性肿瘤之一, 且发病隐匿, 出现转移早, 手术成功率低, 病情恶变快, 被称

为癌症的“王中之王”。由于缺乏特异性和灵敏度比较好的诊断方法, 临床就诊的患者多是中晚期, 使得 5 年生存率低于 5%^[1]。因此, 胰腺癌的早期诊断非常重要, 临床辅助检查主要为血清肿瘤标志物检查和影像学检查^[2]。目前临床上用于诊断的肿瘤标志物 CA199、CA50、Dupan-2、CA125 和 CEA 等, 单独检测