

• 检验技术与方法 •

不同方法检测流感病毒的敏感性

史芳芳, 李红叶[△]

(新疆生产建设兵团疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830002)

摘要:目的 对比两种方法检测甲型 H1N1 流感病毒的敏感性。方法 分别利用 RT-PCR 与实时荧光 RT-PCR 方法对不同稀释度的流感咽拭子标本进行扩增, 比较两种方法的敏感性。结果 RT-PCR 只能对稀释 100 倍以下的流感标本扩增出条带, 而实时荧光 RT-PCR 对稀释 1 000 倍的标本仍能出现扩增曲线。结论 实时荧光 RT-PCR 方法比 RT-PCR 方法敏感性高 10 倍。

关键词:流感病毒 A 型, H1N1 亚型; 聚合酶链反应; 敏感性和特异性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)18-2112-01

随着现代生物技术的发展, 分子生物学技术已被大量应用于甲型 H1N1 流感病毒的快速诊断^[1]。目前, 实验室诊断流感的方法很多^[2], 主要以 RT-PCR 与实时荧光 RT-PCR 为主。但两者的敏感性高低不仅取决于所采用的方法, 而且结果分析所使用的精密仪器也很重要。本研究从实验方法到检测结果所得到的数据及曲线图谱系统地分析了两种方法的敏感性。对于样本中病毒含量极低的标本, 可以参考本研究, 选择敏感性相对较高的方法进行检测^[3]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 由各哨点医院送检的疑似流感咽拭子标本。
1.2 仪器 PTC-200PCR 仪; QIAxcel 全自动毛细管电泳仪; Eppendorf 5424 型微型离心机; Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR System。

1.3 试剂 RNA 提取试剂盒(QIAGEN RNeasy Mini Kit), 一步法 RT-PCR 试剂盒(QIAGEN One step RT-PCR Kit)购自 QIAGEN 公司; β-巯基乙醇, 70% 乙醇购自上海生工公司; RNase 抑制剂(RNasin Ribonuclease Inhibitor)购自北京天根公司; 甲型 H1N1 流感病毒 RNA 检测试剂盒购自北京金豪制药有限公司。

1.4 方法

1.4.1 RT-PCR 方法 甲型 H1N1 阳性标本按照 10 倍系列稀释, 共稀释 3 个梯度, 分别以不同稀释度的标本为模板进行扩增。将提取的 RNA 稀释 100 倍测定 OD₂₆₀ 值, 计算其 RNA 浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$) = $\text{OD}_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40$, 实验中测得 OD₂₆₀ = 0.010 4, 则原液浓度为 41.6 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 其他稀释度依次类推。反应体系及程序见表 1 和表 2。

表 1 反应体系

项目	体积(μL)
去 RNA 酶水	5.8 × n
5 × RT-PCR 缓冲液	5 × n
5 × Q-solution	5 × n
酶反应液	1 × n
10 mM dNTP 混合液	1 × n
RNase 抑制剂	0.2 × n
上、下游引物	2 × n
RNA 模板	5 × n
总体系	25 × n

1.4.2 实时荧光 RT-PCR 以上述中的各稀释度标本为模板进行实时荧光 PCR。按照样本数量配置荧光 PCR 反应液, 其中每份均使用 4 种反应液。扩增程序: 逆转录及变性: 50 °C 30 min, 95 °C 3 min; 预扩增: 95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C min, 共

5 个循环; 扩增及荧光收集: 95 °C 10 s, 55 °C 40 s, 共 40 个循环, 在 55 °C 收集 FAM 荧光信号。见表 3。

表 2 反应程序

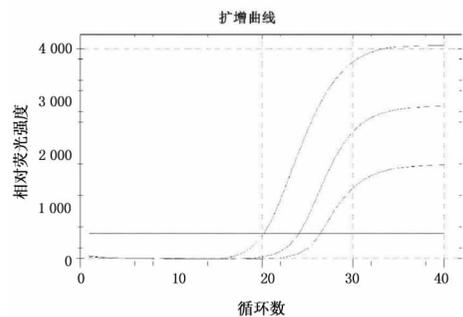
步骤	反应程序	时间(min)	温度(°C)
1	反转录	10/30	42/50
2	PCR 预变性	15	95
3	变性	0.5	94
4	退火	0.5	50
5	延伸	1	72
6	PCR 扩增: 35 个循环从步骤 3→5		
7	最终延伸	7	72

表 3 实时荧光体系配置

项目	体积(μL)
4 种 H1N1 反应液	19.0
DNA 聚合酶	1.0
逆转录酶	0.35

2 结果

2.1 实时荧光 RT-PCR 检测 以 CT 值 37 为临界值, 结果显示 3 个稀释度均出现扩增曲线, 且 CT 值均小于 30, 表明对于样本量较低的标本, 该方法仍能检测出。见图 1。



		(C(-))	C(-)	C(-)	
A02	FAM	10(-1)	20.17	20.17	0.000
A03	FAM	10(-2)	24.05	24.05	0.000
A04	FAM	10(-3)	26.38	26.38	0.000

图 1 依次稀释 10 倍的扩增曲线

2.2 RT-PCR RNA 稀释度降至 1 000 倍时, 已无法看到目标条带, 而且实验中采用的是全自动毛细管电泳仪分析结果, 该仪器的分辨率比琼脂糖电泳更高。由此可见, 普通 RT-PCR 比实时荧光 PCR 至少低 10 倍, 见图 2。 (下转第 2119 页)

[△] 通讯作者, E-mail: lihonyeD991@126.com。

求相关。而且,对于许多项目可获得生物学变异分量的数据,且在容易获得的文献中有大量的汇编。最近的出版物使得这些数据很容易获得。另外,这些估计值好像普遍地独立于研究场所、研究对象的数量、研究的时间、分析方法、研究对象的年龄或者其是否处于健康状态,或虽有慢性疾病但是处于稳定状态,因此可以无所不在地使用已发表的数据。

5 质量规范的传播

关于质量规范的产生和应用已做了大量的工作,它们的传播主要是通过发表的论文、读者来信、综述、书籍中章节和会议论文集。然而,应该鼓励正确地应用规范。与新的方法、试剂盒或分析系统评价有关的文章作者并没有使用客观的质量规范作为可接受性的准则,杂志编辑和审稿人应该鼓励作者使用这些客观的规范;另外,杂志在给作者的须知中就应包括这些内容。工业上不仅要使用客观的规范来识别急需在方法上和系统的发展上需要改进的那些项目,而且它们能帮助传播质量规范的有关资料,即在它们的标识上文件记录这些资料,就像当前介绍的性能特征和参考值一样。能力验证(PT)计划和室内质量评价计划(EQAS)的组织者在鼓励使用客观质量规范上扮演着重要的角色,即通过使用这些质量规范作为固定限来评估实验室的性能和通过使用这些准则强调可接受的和不可接受的方法。希望通过这些努力鼓励对于实验室程序的性能特征更多的使用基于生物学变异的质量规范。

参考文献

[1] Petersen HP, Fraser CG, Kallner A, et al. Strategies to set global

analytical quality specifications in laboratory medicine[J]. Scand J Clin Lab Invest, 1999, 59(11): 575-585.

[2] Fraser CG, Petersen HP. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications[J]. Clin Chem, 1999, 45(26): 321-323.

[3] Petersen HP, Horder M. Influence of analytical quality on test results[J]. Scand J Clin Lab Investing, 1992, 58(19): 65-87.

[4] Fraser CG. Biological Variation: from principles to practice[M]. Washington DC: AACC Press, 2001.

[5] Fraser CG, Petersen HP, Libeer JC, et al. Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology[J]. Ann Clin Lab Invest, 1997, 34(16): 8-12.

[6] Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress[J]. Scand J Clin Lab Invest, 1999, 59(21): 491-500.

[7] Fraser CG, Petersen HP, Ricos C, et al. Proposed quality specifications for reference methods and operating specifications for networks of reference laboratories[J]. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1992, 30(13): 949-957.

[8] Fred SA, Mauro P, Jan R, et al. Quality specifications for B-Type natriuretic peptide assays[J]. Clin Chem, 2005, 51(21): 486-493.

[9] Fraser CG. Quality specifications for imprecision of B-Type natriuretic peptide assays[J]. Clin Chem, 2005, 51(14): 1307-1309.

(收稿日期: 2011-02-12)

(上接第 2112 页)



图 2 依次稀释 10 倍的扩增条带

3 讨论

近年来,随着分子生物学技术的发展,实时荧光 RT-PCR 技术为快速检测各种病毒提供了强有力的技术支持。同时实时荧光 RT-PCR 检测方法普通的 RT-PCR 检测方法相比,具有独特的优势:(1)扩增反应和结果分析是在完全封闭的反应管内进行的,能有效防止扩增产物在空气中的扩散。发生交叉污染的概率更小,确保了检测结果的准确。(2)试剂和标本核酸是在 PCR 扩增仪上进行扩增和分析,扩增效率高,又无需进行琼脂糖电泳,因此实验人员不需要接触到溴化乙锭等致癌物,有效地保障了实验人员的身体健康并且节省了电泳的时间。(3)结果不需要用紫外灯进行观测,可直接通过电脑软件收集荧光信号并及时在电脑上显示扩增曲线,具有结果直观、重复性好、特异性和灵敏性强、操作简便等优点^[4]。

通常实验室对流感标本的核酸检测多会选择普通 RT-PCR 方法,但在暴发疫情时,本组建议还是选择实时荧光 RT-PCR,因为通过本实验证明,实时荧光 RT-PCR 敏感性更高,这样在检测时就不会因为浓度低而不能被检测到的标本^[5]。

本实验中,对原液浓度为 41.6 ng/ μ L 的 RNA 标本分别

稀释了 10、100、1 000 倍,即稀释 1 000 倍时, RNA 浓度仅为 0.041 6 ng/ μ L,相当于 41.6 pg/ μ L,此时,实时荧光 RT-PCR 仍能看到扩增曲线,而普通 RT-PCR 则在 RNA 浓度为 41.6 pg/ μ L 时就不能检测出条带了。经实验表明该方法具有良好的特异性和重复性,灵敏度与 RNA 浓度有极大的相关性。本研究可对流感核酸检测工作提供良好的技术支持。

综上所述,实时荧光 RT-PCR 法检测具有敏感性和特异性高、定性准确、重复性好等特点,有助于动态反映病毒复制和突变情况,预测抗病毒治疗效果,是了解病情严重程度、病情转归及预后的有效手段之一^[6]。

参考文献

[1] 严安,丁国徽,周正峰,等. 利用 RT-PCR 特异扩增甲型流感病毒 HA 基因多变区片段并测序确定分型的方法[J]. 科学通报, 2009, 54(12): 1648-1651.

[2] 张欣,闫惠平,刘秀红,等. 甲型 H1N1 流感病毒核酸检测的应用及临床相关性的探讨[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(9): 872-874.

[3] 中国疾病预防控制中心. 甲型 H1N1 流感监测方案[S]. 2009-05-11[EB/OL]. <http://www.chinacdc.net.cn/n272442/n272530/n273736/n273781/n4624704/n4661330/index.html>.

[4] 廖国东,陈家图,李晖,等. 应用实时荧光 RT-PCR 技术检测诸如病毒感染[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 91-92.

[5] 尹惠琼,刘松婷,史利军,等. 甲型 H1N1 流感病毒核酸荧光定量 RT-PCR 检测技术[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(2): 244-247.

[6] 张金菊,牛恒彩. 实时荧光 RT-PCR 在麻疹和风疹病毒检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 256-257.

(收稿日期: 2011-08-21)