

· 临床检验研究论著 ·

丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法的建立及应用*

周有良¹, 胡春凌², 汪朝晖², 任传路³, 胥萍⁴, 陈佩琴¹, 刘 惺¹

(1. 苏州出入境检验检疫局, 江苏苏州 215011; 2. 深圳博睿祥晖生物技术有限公司, 广东深圳 518050; 3. 中国人民解放军 100 医院检验科, 江苏苏州 215007; 4. 苏州市第五人民医院检验中心, 江苏苏州 215007)

摘要:目的 建立丙型肝炎病毒 1a、1b、2a、3a、3b、6a 亚型的核酸液相芯片分型检测方法。方法 建立 PCR 扩增及核酸探针偶联方法, 将 PCR 产物与偶联核酸探针的微球混合物进行杂交, 建立液相芯片检测方法, 并对建立的液相芯片检测方法进行灵敏度及特异性评价, 应用该方法对 93 份血清样本核酸进行检测。结果 建立的丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法具有较高的特异性和敏感性, 能对 6 种亚型进行检测和分型, 对于 HCV 1a、3a 和 6a 亚型核酸液相芯片分型检测方法的灵敏度为 1×10^5 copies/PCR; 对于 HCV-1b、2a 和 3b 亚型核酸液相芯片分型检测方法的灵敏度为 1×10^4 copies/PCR。对 93 份临床样本的检测结果表明, 该方法具有高通量、快速、敏感、特异的特点。结论 本方法能对丙型肝炎病毒的 6 种亚型进行同时快速检测, 为丙型肝炎病毒的分型检测提供一种新方法。

关键词: 肝炎, 丙型; 肝炎病毒; 液相芯片; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.019

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)13-1710-04

Establishment and application of HCV genotype liquichip detection method*

Zhou Youliang¹, Hu Chunling², Wang Zhaohui², Ren Chuanlu³, Xu Ping⁴, Chen Peiqin¹, Liu Xing¹

(1. Suzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Suzhou, Jiangsu 215011, China;

2. Shenzhen Smartshinging Biotechnologies Co., Ltd., Shenzhen, Guangdong 518050, China;

3. Department of Clinical Laboratory, 100 Hospital of PLA, Suzhou, Jiangsu 215007, China;

4. Laboratory Center, Suzhou Municipal Fifth People's Hospital, Suzhou Jiangsu 215007, China)

Abstract: Objective To establish a liquichip method for detecting 6 sub-genotypes of hepatitis C virus (HCV), including 1a, 1b, 2a, 3a, 3b and 6a. Methods The coupling method of PCR amplification and nucleic acid probe was established. The PCR product and the microspheres mixture of the coupled nucleic acid probe were hybridized for establishing the liquichip detection method. The sensitivity and specificity of the established liquichip detection method were evaluated. Nucleic acid in 93 serum samples was detected by this method. Results The established HCV nucleic acid liquichip genotype detection method had the higher specificity and sensitivity, which could detect and classify 6 HCV sub-genotypes. The sensitivity for HCV 1a, 3a and 6a sub-genotypes was 1×10^5 copies/PCR; the sensitivity for HCV 1b, 2a and 3b sub-genotypes was 1×10^4 copies/PCR. The detection results in 93 serum samples showed that the this genotyping method had the characteristics of high throughput, rapidness, sensitivity and specificity. Conclusion This method can be used for the simultaneous and quick detection of 6 HCV sub-genotypes and provides a new method for the genotyping detection of HCV.

Key words: hepatitis C; hepatitis viruses; liquichip; polymerase chain reaction

丙型肝炎病毒 (hepatitis C Virus, HCV) 是引起输血后非甲非乙型肝炎的主要元凶, 全球感染率高达 3%^[1-2]。HCV 感染后, 约有 50%~80% 转为慢性感染, 并有多达 20%~30% 在感染后 20~30 年后会发展为肝硬化及肝癌^[3-4]。HCV 感染严重威胁人们的健康和生命, 造成巨大的社会、经济和医疗负担, 是一个严重的社会公共卫生问题。HCV 基因组呈高度异质性, 至少可分为 6 个基因型 (HCV 1~6 型), 有 100 多个基因亚型。准确鉴别 HCV 亚型, 对于更好地了解 HCV 病毒进化、探讨病毒的传播途径、选择临床治疗方案、判断病情变化、评价抗病毒治疗效果、疫苗制备等具有非常重要的意义^[5-7]。液相芯片技术有机整合了荧光编码微球技术、激光技术、流体学和数字信号处理等技术, 其最突出的优势在于多重检测, 能在一

个反应孔内同时检测样本中的多达 100 种指标, 被广泛应用于核酸、蛋白等领域的研究^[8-10]。本研究以 HCV 为研究对象, 根据 HCV 的流行情况, 针对 HCV 的 6 种亚型, 包括 1a、1b、2a、3a、3b 和 6a, 建立能同时分型的核酸液相芯片检测方法, 能为丙型肝炎临床分型检测、分子流行病学调查等提供了一种新的检测方法, 为抗病毒治疗方案的选择提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 HCV-1a、1b、2a、3a、3b 和 6a 基因标准品质粒 (上海锐进生物技术有限公司), 磁性羧基化荧光编码微球 (Magnetic COOH Beads, 美国 Luminex 公司, 1.25×10^7 个/mL), 链霉亲和素-藻红蛋白 (treptavidin, R-phycoerythrin con-

* 基金项目: 江苏省大型科学仪器设备共享服务平台资助项目 (BZ201205); 江苏出入境检验检疫局科技计划 (2014KJ40)。作者简介: 周有良, 男, 副主任技师, 主要从事免疫检测技术的研究。

jugate, SA-PE, 美国 Invitrogen 公司), Shead Fluid(美国 Luminex 公司), PCR Master Mix(美国 Fermentas), PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit(日本 Takara)。

1.1.2 仪器设备 液相芯片检测系统(MAGPIX 型, 美国 Luminex 公司)和 PCR 仪(T100™, 美国 Bio-Rad 公司)。

1.1.3 引物和探针 引物和探针均根据 Genbank 发表的 E1 基因序列, 采用 Primer Primer 5.0 软件设计而成。引物、探针核苷酸序列如表 1 所示。为了使 PCR 扩增产物生物素化, 下游引物 5' 端进行了生物素标记。为了便于探针和羧基化微球进行偶联反应, 所有探针 5' 进行了 C6 氨基化修饰, 同时为了保证探针与 PCR 产物的杂交效率, 在探针的 5' 端添加了 10 个 poly(T), poly(T) 作为间隔臂可有效减少空间位阻, 有利于探针杂交反应的进行。引物和探针均由大连宝生物工程有公司合成。

表 1 HCV 液相芯片分型检测引物和探针序列

名称	序列(5'-3')
HCV-E1-F	GGTTGCTCYTTYTCTATCTT
HCV-E1-R	TCATCATATCCCANGCCAT
HCV-1a-P	TTTTTTTTTT-CTAGGGACGGCAAAC
HCV-1b-P	TTTTTTTTTT-AGAACAACGCCTCCC
HCV-2a-P	TTTTTTTTTT-AGAACCAGTAAGAG
HCV-3a-P	TTTTTTTTTT-AGCTAGTCTAGGGTG
HCV-3b-P	TTTTTTTTTT-GTCTGGTCTAGAGCACA
HCV-6a-P	TTTTTTTTTT-GGCTCTTACCTACG

1: Y 为简并碱基代码, 表示 C 和 T; 2: N 为简并碱基代码, 表示 A、T、C 和 G。

1.2 方法

1.2.1 微球的活化与核酸探针偶联 随机选取 26 号、36 号、43 号、46 号、52 号和 62 号磁性羧基化荧光编码微球用于实验, 分别包被 6a、1a、1b、2a、3a 和 3b 亚型探针, 标记为 26-HCV-6a、36-HCV-1a、43-HCV-1b、46-HCV-2a、52-HCV-3a 和 62-HCV-3b。参照美国 Luminex 公司的操作说明书进行, 微球用量为 50 μL, 100 pmol/μL 氨基化修饰的核酸探针用量为 10 μL。

1.2.2 丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法的建立和优化 以合成的基因标准品质粒为模板建立和优化丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法。

1.2.2.1 PCR 扩增 以合成的基因标准品质粒为模板, 按照以下体系进行 PCR 反应: PCR Master Mix(2×) 10 μL, Primer HCV-E1-F 0.8 μL, Primer HCV-E1-R 0.8 μL, 模板 1 μL, 用 ddH₂O 补足 20 μL。反应条件为: 95 °C 10 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 40 s, 40 cycles; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。设计引物比例包括: F : R = 1 μmol/L : 10 μmol/L (1 : 10), 1.25 μmol/L : 10 μmol/L (1 : 8), 1.67 μmol/L : 10 μmol/L (1 : 6), 2.5 μmol/L : 10 μmol/L (1 : 4), 5 μmol/L : 10 μmol/L (1 : 2), 10 μmol/L : 10 μmol/L (1 : 1)。

1.2.2.2 PCR 产物与偶联探针的混合微球杂交及液相芯片检测 充分重悬偶联核酸探针的混合微球工作液; 在每个样品孔, 加入 33 μL 核酸杂交缓冲液, 然后加入 10 μL 混合微球工

作液, 加入 1 μL/3 μL/5 μL/7 μL 的 PCR 产物, 每个样品设置 3 个重复, 加入 TE 补足体积至 50 μL, 充分混匀, 进行如下反应: (1) 95 °C 变性 5 min; (2) 37 °C 杂交 30 min。用核酸检测缓冲液将 1 mg/mL SA-PE 稀释成 4 μg/mL, 每孔加入 25 μL, 37 °C 孵育 5 min; 加入 150 μL 终止反应液(37 °C 预热), 将样品置于 Luminex MAGPIX 上进行测试, 分析样品的荧光信号值(MFI)。

1.2.3 丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法的灵敏度实验 根据基因标准品质粒的浓度, 将每种标准品稀释至 1×10¹⁰ copies/μL, 然后采用 10 倍稀释法稀释至 1×100 copies/μL, 每 PCR 反应加入模板量为 1 μL。采用 1.2.2 建立的丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法进行检测, 评价方法的灵敏度。

1.2.4 丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法的特异性实验 采用 1.2.2 建立的丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法对甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、梅毒螺旋体、基孔肯雅热病毒、登革热病毒进行检测, 每 PCR 反应加入模板量为 1 μL, 评价方法的特异性。

1.2.5 丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法检测模拟混合感染样品实验 根据基因标准品质粒的浓度, 将每种标准品稀释至 1×10⁷ copies/μL, 将标准品进行组合, 在一个反应管中同时加入 2 种、3 种、4 种、5 种、6 种质粒标准品。采用 1.2.2 建立的丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法进行检测, 评价方法检测混合感染样品的效果。

1.2.6 丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法的临床应用 收集健康者、丙型肝炎患者血液样本, 共 93 份, 分离获取血清, 提取样本 RNA, 反转录成 cDNA。采用 1.2.2 建立的丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法和实时荧光 PCR 方法同时进行检测。与临床诊断结果比较, 对实验检测结果进行分析, 确定本研究所建立的丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法的敏感性、准确性。实时荧光 PCR 方法购买商业化的试剂盒进行检测。同时, 对于核酸液相芯片分型检测方法检测为阳性的丙型肝炎样品, 进行 PCR 扩增, PCR 产物克隆至 T 载体, 挑选单克隆, 经 PCR 鉴定阳性后, 送至北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序, 对测序结果进行分析, 判定 HCV 基因亚型, 分析结果与液相芯片检测方法进行比较。

1.2.7 丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法实验结果判断标准的确立 根据 Luminex 公司推荐判断标准及文献资料^[8, 11-15], 结合本研究实验情况, 丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测实验结果的判断标准设定如下: (1) 数据有效性分析: 空白对照组的荧光信号值不高于 100; (2) 待测样本分析判断: 检测结果 Cutoff 值设定为 PCR Blank 荧光信号值的 4 倍, 当 ①待测样本的荧光信号值不高于 PCR Blank 荧光信号值的 2 倍时, 判定为阴性样本; ②待测样本的荧光信号值大于或等于 Cutoff 值时, 判定为阳性样本; ③当 PCR Blank 荧光信号值的 2 倍小于或等于荧光信号值小于 Cutoff 值时, 设置为灰度区间, 判定为可疑样品, 需要进行重复实验或采取其他检测方法进一步验证。

2 结 果

2.1 丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法的建立和优化

实验结果 通过对丙型肝炎病毒 6 个亚型的基因标准品质粒进行检测分析,确定丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法的最佳反应条件是:F:R 引物比例为 1:10 和 1:8;PCR 产物加样量为 3 μL 、5 μL 或 7 μL 。根据实验情况及实验操作的方便性,选择 F:R 引物比例为 1:10,PCR 产物加样量为 5 μL ,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,37 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 30 min,SA-PE 浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为最佳反应条件。以 6a 亚型实验结果对检测方法的建立和优化进行说明,图 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)可以看出,随着引物比例 F:R 的升高,荧光信号值呈下降趋势。当 F:R 引物比例为 1:10 和 1:8 时,荧光信号值较高,且背景信号值较低,获得较好的实验结果。当引物比例为 1:2 和 1:1 时,荧光信号值降低的同时,部分样品微球背景信号值却升高。当引物比例为 1:6 和 1:4 时,荧光信号值降低不太明显,但部分样品微球背景信号值也有明显升高。随着 PCR 产物加样量的增加,荧光信号值呈升高并趋于平稳的趋势。PCR 产物加样量从 1 μL 增加至 3 μL 时,荧光信号值增加的幅度最大,当 PCR 产物加样量从 3 μL 增加至 5 μL 和 7 μL 时,荧光信号值有增加,但是增加的幅度相对不明显。综上所述,丙型肝炎病毒(6a 亚型)核酸液相芯片分型检测方法的最佳反应条件是:F:R 引物比例为 1:10 和 1:8;PCR 产物加样量为 3 μL 、5 μL 或 7 μL 。

2.2 丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法的灵敏度实验

实验结果表明,对于 HCV 1a、3a 和 6a 亚型核酸液相芯片分型检测方法的灵敏度为 1×10^5 copies/PCR;对于 HCV 1b、2a 和 3b 亚型核酸液相芯片分型检测方法的灵敏度为 1×10^4 copies/PCR。其中,对于 HCV 1a 亚型和 6a 亚型的 1×10^4 copies 质粒标准品样品的检测结果位于灰度区间内;对于 HCV 1a 亚型的 1×10^4 copies 和于 1×10^3 copies 质粒标准品样品的检测结果位于灰度区间内,可通过其他检测方法进一步确认。1b 亚型灵敏度实验结果如图 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)所示,其余 5 个亚型实验结果略。

2.3 丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法的特异性实验

采用所建立的丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法对甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、梅毒螺旋体、基孔肯雅热病毒、登革热病毒及丙型肝炎病毒基因标准品质粒进行检测,图 3(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)实验结果表明,对于丙型肝炎病毒基因标准品质粒及丙型肝炎病毒样品,检测结果为阳性。其中丙型肝炎病毒样品,3 个为 HCV 1b 亚型,1 个为 HCV 1a 亚型,1 个为 HCV 2a 亚型,还有 1 个为 HCV 1b 和 2a 亚型混合感染。HCV 3a、3b 和 6a 亚型未检出。对于甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、梅毒螺旋体、基孔肯雅热病毒和登革热病毒样品,检测结果为阴性。实验结果说明,本研究所建立的丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法的特异性较好。同时,对 HCV-002 的检测结果表明,本方法能对混合感染样品进行准确检测。

2.4 丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法检测模拟混合

感染样品实验结果 根据基因标准品质粒的浓度,将每种标准品稀释至 1×10^7 copies/ μL ,将标准品进行组合,在一个反应管中同时加入 2 种、3 种、4 种、5 种、6 种质粒标准品。采用丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法进行检测,图 4(见《国际

检验医学杂志》网站“论文附件”)的实验结果表明,该方法能对任意 2 种亚型、任意 3 种亚型、任意 4 种亚型、任意 5 种亚型和 6 种亚型核酸进行准确检测。本实验采用标准品质粒模拟混合感染样品,获得较好的检测结果,说明本方法能对混合感染样品进行准确检测。

2.5 丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法的临床应用

实验结果 收集健康人、丙型肝炎患者血液样本,共 93 份,分离获取血清,提取样本 RNA,反转录成 cDNA。采用 3.2.9 建立的丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法和实时荧光 PCR 方法同时进行检测。实验检测结果见表 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”),本研究所建立的丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法的检测结果与临床诊断结果相比较,敏感性为 74.55%,特异性为 86.84%,诊断效率为 79.57%;与实时荧光 RT-PCR 法检测结果相比较,敏感性为 76.47%,特异性为 83.33%,诊断效率为 79.57%。实时荧光 RT-PCR 检测结果与临床诊断结果相比较,敏感性为 76.36%,特异性为 76.32%,诊断效率为 76.34%。采用核酸液相芯片法的检测结果与临床诊断结果和实时荧光 RT-PCR 检测结果有较高的一致性。对于核酸液相芯片分型检测方法检测为阳性的丙型肝炎样品共 41 份,其中,1a 亚型为 9 例,1b 亚型为 20 例,2a 亚型为 2 例,3b 亚型为 2 例,6a 亚型为 5 例,1b 和 2a 混合感染亚型为 3 例。对样品进行测序分析后,其中,1a 亚型为 7 例,1b 亚型为 22 例,2a 亚型为 4 例,3b 亚型为 2 例,6a 亚型为 6 例。核酸液相芯片分型检测方法结果与测序法检测结果有较高的一致性,但测序法只能对单一亚型进行分析,对混合感染样品检测结果不够准确。丙型肝炎病毒核酸液相芯片分型检测方法为高通量检测方法,能通过一次检测同时对 6 种亚型进行筛查检测,相对于每次只能检测一个指标的实时荧光 RT-PCR 方法,能大大缩短操作时间及检测工作量,能有利于丙肝病毒的分型检测。

3 讨 论

HCV 严重危害人类的健康和生命,在给人类精神造成伤害的同时,给人类造成巨大的经济损失。丙肝疾病临床治疗方案的选择要根据基因型而定,此外,基因型对于临床治疗效果有显著的影响。因此,对 HCV 进行基因分型具有重要的意义,能为丙肝疾病的治疗及预防提供依据及指导。目前,HCV 的基因分型方法主要有测序法、特异性引物扩增法、基因芯片法等,这些方法存在一些局限性,如只能区分个别亚型,容易发生漏检、误检等。因此,通过研究新的检测方法,实现对 HCV 的快速、准确、高通量检测分型具有非常重要的意义。

本研究利用液相芯片技术平台多重检测和灵活组合的技术优势,在丙型肝炎病毒 E1 区段设计扩增引物及分型探针,利用合成的基因标准品质粒,优化建立了丙型肝炎病毒 1a、1b、2a、3a、3b 和 6a 6 个亚型同时分型检测的核酸液相芯片检测方法。通过采用标准品模拟混合感染样品,该方法能对混合感染样品进行准确检测。将本研究所建立的分型检测方法应用于临床样本的检测,与临床诊断结果及实时荧光 RT-PCR 结果相比,具有较高的一致性。但是,液相芯片检测方法在高通量及同时筛查分型方面具有无可比拟的优势。在本研究中,检测到 3 例 1b 和 2a 亚型混合感染样品。此(下转第 1715 页)

6%。结果提示 T2DM 患者合并甲状腺功能异常的患病率较健康人群高,尤其以女性亚临床甲状腺功能减退最常见,这与国内外文献[4]报道相似。美国甲状腺协会建议对乙型糖尿病患者进行常规甲状腺功能筛查[5]。

T2DM 患者甲状腺功能异常发病率较高,但 T2DM 合并甲状腺功能异常的患者多无明显的临床症状及体征,多在化验检查时才发现甲状腺功能异常,故建议在糖尿病患者中筛查甲状腺功能。定期监测其 TSH、FT3、FT4 对糖尿病患者的病情的评估、预后的判断和指导治疗具有重要的临床意义。

甲状腺自身抗体阳性是甲状腺功能发生异常的危险因素,几乎已成为学术界公认的事实。本研究显示,T2DM 患者中,TPO-Ab 阳性率为 15.2%,明显高于对照组的 10.2%。表明 T2DM 患者甲状腺自身免疫反应性较高,从而出现功能损害。这可能与长期的糖代谢紊乱而导致的机体免疫系统功能紊乱有关。

本课题两组研究对象(健康对照组及 T2DM 组)女性患者的 TPOAb、TGAb 阳性率均高于男性。健康对照组女性 TPOAb 阳性率为 13.7%,高于男性(6.6%);女性 TGAb 阳性率为(9.4%),显著高于男性(3.5%)。T2DM 组女患者 TPO-Ab 阳性率为 22.2%,高于男患者(9.0%);女患者 TGAb 阳性率为(10.3%),显著高于男患者(4.3%),研究结果提示,性别可能与甲状腺自身免疫损伤有关,TPO-Ab 阳性的 T2DM 患者发生甲状腺功能异常的风险较高。英国一项长期随访研究显示,在甲状腺抗体阳性的 T2DM 患者中有较大比例为亚临床甲状腺功能的异常[6]。由于其起病隐匿,常被忽视,亚临床甲减有发展为临床甲减及易合并血脂异常使动脉粥样硬化、

心肌梗死等心血管疾病的发病率和病死率增高的潜在风险。因此,建议对甲状腺自身抗体阳性的 T2DM 患者应定期检查甲状腺功能,以早期发现并及时治疗。

参考文献

[1] Goswami R, Marwaha RK, Goswami D, et al. Prevalence of thyroid au2 to immunity in sporadic idiopathic hypoparathyroidism in comparison to type 1 diabetes and premature ovarian failure[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(11): 4256-4259.

[2] Vondra K, Vrbikova J, Dvorakova K. Thyroid gland diseases in adult patients with diabetes mellitus[J]. Minerva Endocrinol, 2005, 30(4): 217-236.

[3] Junik R, Kozinski M, Debska KK. Thyroid ultrasound in diabetic patients without overt thyroid disease [J]. Acta Radiol, 2006, 47(7): 687-691.

[4] Smithson M J. Screening for thyroid dysfunction in a community population of diabetic patients[J]. Diabetes Med, 1998, 15(2): 148-150.

[5] Ladeson PW, Singer PA, Ain KB, et al. American Thyroid Association guidelines for detection of thyroid dysfunction[J]. Arch Intern Med, 2000, 160(11): 1573-1575.

[6] Li Y, Teng D, Shah Z, et al. Antithyroperoxidase and anti-thyroglobulin antibodies in a five-year follow-up survey of populations with different iodine intakes[J]. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2008, 93(5): 1751-1757.

(收稿日期:2014-02-28)

(上接第 1712 页)

外,鉴于 HCV 亚型非常多,研究者能在此研究的基础上,利用液相芯片易于组合的特点,摸索增加更多亚型的同时分型检测。

本研究因临床阳性样本的限制,对于丙型肝炎 3a 亚型病毒未能获得临床检测方面的实验数据,虽通过标准品模拟检测实验成功建立了方法,但对 3a 亚型的临床应用效果还需要进一步验证。

参考文献

[1] 张太松,李明. 丙型肝炎病毒基因分型与临床分子诊断[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(5): 289-293.

[2] 赵晶,孟令章,陶钧,等. HCV 分子流行病学的研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2011, 6(5): 364-367.

[3] Alberti A, Benvegnu L. Management of hepatitis C[J]. J Hepatol, 2003, 1(38): 8104-8118.

[4] Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C[J]. Hepatology, 2002, 36(5): 835-846.

[5] 中华医学会传染病与寄生虫病分会和肝病分会. 丙型肝炎防治指南[M]. 2004: 3.

[6] Orlent H, Vrolijk JM, Veldt BJ, et al. Hepatitis C 2002 guidelines: summary and annotations[J]. Scand J Gastroenterol Suppl, 2003, 39(2): 105-110.

[7] Mchutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C[J]. New Engl J Med, 1998, 339(21): 1485-1492.

[8] Qin ZF, Sun J, Lu TK, et al. Subtyping animal influenza virus with general multiplex RT-PCR and Lighchip high throughput (GM-PLex)[J]. Virol Sin, 2012, 27(2): 120-131.

[9] Oliver KG, Kettman JR, Fulton RJ. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system [J]. Clin Chem, 1998, 44(19): 2057-2060.

[10] Han X, Wang H, Chen H, et al. Development and primary application of a fluorescent liquid bead array for the simultaneous identification of multiple genetically modified maize[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 11(2): 360-366.

[11] 陈茹, 毕英佐, 刘志玲, 等. 建立液相芯片方法检测鉴别结核分支杆菌符合群、鸟分支杆菌与副结核分枝杆菌[J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 908-915.

[12] 王子良, 王颖, 彭少杰, 等. 新型液相芯片系统在食源性致病菌快速检测中的应用研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(3): 462-465.

[13] 范丽, 李裕昌, 康晓平, 等. Luminex 液相芯片技术检测 6 种虫媒病毒方法的建立[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(5): 459-463.

[14] 欧叶青, 顾大勇, 史蕾, 等. 8 种重大烈性传染病病毒液相芯片检测方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2012, 35(1): 154-158.

[15] 何雅青, 张海龙, 杨洪, 等. 液相芯片检测轮状病毒和诺如病毒方法的建立[J]. 中国病毒病杂志, 2011, 1(5): 376-381.

(收稿日期:2014-01-08)