

NASBA——一种新型禽流感病毒检测方法^{*}

刘乐庭^{1,2} 刘爽^{1,2} 封燕芸^{1,2} 陈建国³ 于常海^{1,2**}

(1 北京大学神经科学研究所 北京大学医学部神经生物学系 教育部神经科学重点实验室 北京 100083)

(2 香港基因晶片开发有限公司 香港 3 北京大学生命科学院 北京 100871)

摘要 NASBA (nucleic acid sequence - based amplification) 是一项持续等温的核酸扩增技术, 特别适合于以 RNA 为模版的扩增, 与其它常用禽流感病毒检测方法 (病毒培养法、免疫学方法和 PCR) 相比, 具有灵敏度高、特异性强、操作简便等特点。就 NASBA 的操作原理及其在禽流感病毒检测中的成功应用进行综述。NASBA 不仅成为禽流感病毒检测的有力工具, 而且对于其它恶性传染病的监测、检测同样具有重要价值和意义。

关键词 NASBA 禽流感 检测方法

禽流感是一种从呼吸道疾病到严重性全身组织出血性病变等多种症状的急性高度致死性传染病, 其致病元凶禽流感病毒 (AIV) 属于 A 型流感病毒, 是一种负链 RNA 病毒。根据其膜蛋白 HA 和 NA 的抗原性可将现有的 AIV 分为 15 种 HA 亚型 (H1 ~ 15) 和 9 种 NA 亚型 (N1 ~ 9)。近来, Fouchier 等在北欧又发现了一种新的 AIV 病毒亚型, 根据其基因序列和抗原性分析命名为 H16 亚型禽流感病毒^[1]。而在 16 种亚型中, H5 及 H7 被定为高致病性^[2]。

AIV 除感染禽类外, 传播给人类的事件也屡有报道。因此禽流感对社会经济和人类健康构成的严重威胁应越发引起我们的重视。当前的重点是预防、围堵和控制 AIV 的传播, 因此建立快速、准确、有效的病毒检测手段至关重要。

1 禽流感病毒的检测

AIV 的常用检测方法包括: 病毒培养法、免疫学方法和核酸检测方法。病毒培养法是广泛应用的实验室检测方法之一, 灵敏度高, 但操作费时 (7 ~ 10 天), 而且对实验室条件的要求也较高^[3]。与之相比, 免疫学方法相对快速简便, 但灵敏度和特异性差^[4]。而且抗体

检测的结果仅仅说明被检测的禽类或动物曾经感染过禽流感病毒, 而不能准确反映当前是否感染或携带病毒, 因此, 在应用方面具有一定的局限性。特别是目前的家禽大多被注射疫苗免疫, 则不能使用该方法进行筛查。核酸检测方法 (如 PCR) 用于 AIV 的检测, 灵敏度高且快速, 能够准确反映是否携带病毒, 可结合其它检测方法加以进一步判定^[5,6]。与常规 PCR 相比, 荧光实时 PCR (real-time PCR) 技术检测禽流感病毒, 其灵敏度有很大提高, 但是对于某些超低病毒载量的样品, 仍不能达到检测要求^[7-9]。于是我们在此基础上开发了一种增强型荧光实时 PCR (ERT-PCR) 检测技术, 灵敏度比标准的荧光实时 PCR 高出最少 100 倍, 比常规 PCR 更高出 10^7 倍^[10-12]。尽管如此, 我们发现, 基于 PCR 原理的检测方法在扩增的过程中可能会丢掉很多信息, 因此特别采用适用于扩增 RNA 模板的 NASBA 技术对禽流感病毒进行检测, 开发了一系列检测禽流感病毒的试剂盒^[13-18]。

2 NASBA 技术检测禽流感病毒

NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) 技术是一项以 RNA 为模板的快速等温扩增技术^[19], 这项技术特别适用于 RNA 分子的检测。其特点是整个扩增过程在恒温条件下进行, 因此不需要特殊 (如 PCR 仪) 的控温装置, 大大避免了 PCR 扩增过程中复杂的温度变化。该技术使用 3 种酶 (逆转录酶、RNA 酶 H 和

收稿日期: 2005-07-15 修回日期: 2005-08-09

* 国家自然科学基金资助项目 (30270426, 30470543), 北京市自然科学基金资助项目 (7032026, 7051004)

**通讯作者, 电子信箱: achy@bjmu.edu.cn

T7 RNA 聚合酶)以及 2 条特别设计的寡核苷酸引物。上游引物 5 末端含有噬菌体 T7 RNA 聚合酶的启动子序列,下游引物的 5 末端含有与钉标的电化学发光检测探针 (ECL Probe)互补的序列,如图 1 所示的原理图,NASBA 是一种连续扩增技术,并不像 PCR 需要实时退火 (real-time annealing),所以在同一时间内,NASBA 拥有比 PCR 更高的扩增效率。此外,有很多因素会影响 PCR 反应,如一些 PCR 抑制物质(特别在取样过程中),NASBA 技术却不会受这些因素的影响,而且即使在有 DNA 污染或存在的情况下,同样具有较高的特异性和灵敏度。该技术已成功应用于病毒、细菌、霉菌、寄生虫和细胞因子等的检测,如人类艾滋病病毒 1 型、丙型肝炎病毒、EB 病毒、麻疹、带状疱疹、人类乳头瘤状病毒 16 型、沙门氏菌、沙眼衣原体、麻风分支杆菌、念珠菌、曲霉菌、疟原虫、编码巨噬细胞来源的趋化因子、组织因子和人抗肿瘤坏死因子 α 等的 mRNA^[14]。因此,NASBA 作为一项检测技术是十分成熟的,并且已经在国际上受到基础科学研究和应用研究领域的一致认可。

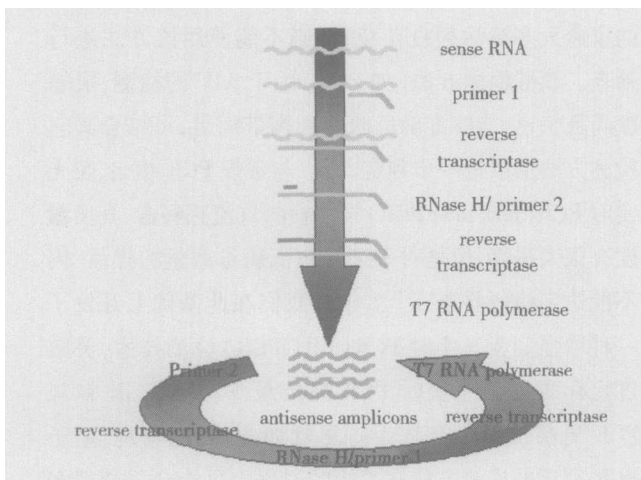


图 1 NASBA 技术扩增原理图

Fig 1 Application mechanism of NASBA

本研究小组自 2002 年首次在国际刊物上发表了关于应用 NASBA 技术检测禽流感病毒的论文^[13]以来,迄今已成功开发出可检测禽流感群特异性 (H1-H15) (NASBA-AIV)、H5 亚型 (NASBA-H5)、H7 亚型 (NASBA-H7)的 NASBA/ECL 检测试剂盒^[13-18]。实验结果显示,NASBA 技术比目前商品化的免疫检测试剂盒至少敏感 1 000 倍,比常规 PCR 方法也敏感许多,与现行的病毒培养检测方法的灵敏度相当^[13-18]。但是病

毒培养通常需要至少几天以上的时间才能得到结果,而 NASBA 技术通常仅需要 4~6 小时就可以准确地得到结果,便于尽早采取防治措施。我方在英国与联合国兽医参考实验室 (Veterinary Lab Agency)合作,采用 NASBA 技术对来自不同地区、不同时期爆发的禽流感病毒进行检测,结果显示,NASBA-H5、NASBA-H7、NASBA-AIV 均可准确无误地检出病毒^[13-18]。NASBA 技术操作简便,自动化水平高,可以减少人为造成的误差。而且还是一种高通量的方法,可以同时检测 50 个样本,非常适用于大规模样品的筛查。NASBA 技术的扩增产物为 RNA 分子,使用者可以根据需要选择不同的检测方法,如电化学发光法和酶联法 (microplate)等。而且,与 PCR 的产物 DNA 分子不同,RNA 分子不易对实验仪器和环境造成污染,避免了产物交叉污染实验仪器、操作环境导致的假阳性结果。

适用于 NASBA 技术的样品范围很广,除动物组织、血液、体液样本外,还可对环境样本进行监测,如禽类饲养场所、交易场所、运输工具等,因此为监测和控制禽流感的传播提供了有效的依据和手段。

3 小结与展望

NASBA 技术是一项灵敏度、准确度高且使用方便的快速检测方法,能应用于现场样品的检测,该技术的广泛应用将大大提高对禽流感的监测和控制力度。NASBA 技术不仅在疫情爆发时能够及时、准确地监测和检测病毒感染的情况,以采取有效措施控制病毒扩散。同时,由于其具有灵敏、准确、快速的特性,使其对于疑似感染的排除具有重要意义。这样,一方面可以减少由于不能确诊病毒而造成的不必要的恐慌,另一方面,还可以减少由疑似病例造成的大面积的家禽捕杀,用以降低经济损失。NASBA 技术作为一种有效的禽流感病毒检测方法,既新颖又成熟,并且成功经历过多方面的实地考验,具备成为国家乃至国际性的禽流感病毒检测标准的必备条件,对国家的农业、禽牧业及世界禽畜贸易均具有重要的社会意义和经济效益。

鉴于最近亚洲爆发的禽流感疫情所造成的巨大社会经济损失,以及对人类生命健康构成的严重威胁,我们必须尽快采取一切措施控制疫情。2003 年初爆发的 SARS 疫情,为我们防范与控制传染性疾提供了宝贵的经验^[12]。与疾病斗争的过程清楚地告诉我们,一定要建立一种快速、灵敏、准确的检测方法,而且这种方法必须是达到国际标准的,经得起实际考验的科学的

方法。就目前而言,控制疫情最有效的手段就是大规模筛查检测,在最短时间内发现感染病毒的牲畜或人员,以迅速采取隔离措施,防止病毒的肆意传播。因此,灵敏、可靠且快速的检测手段是我们打赢这场战争的锐利武器^[18]。

我们在 *Science*, *New England Journal of Medicine* 和 *Nature Biotechnology* 杂志上发表的文章都提到了建立标准化检测方法的重要性和必要性^[11,12,18]。此外,还特别指出检测过程中产生的假阳性和假阴性问题,由于检测方法的灵敏度有限导致的假阴性结果,会造成病毒的肆意传播,而假阳性结果的错误报道同样具有危害,往往会导致不必要的恐慌,甚至影响社会安定和经济稳定。因此,如何在检测方法上加以改进,提高特异性和灵敏度至关重要。我们经过多年的研究,在比较各种检测方法的基础上发现,NASBA 技术特别适合于禽流感病毒的常规检测操作,而且经过大量样品的检测及国际上的多方评估验证,具有很好的特异性和灵敏度,值得信赖。

参考文献

- [1] Fouchier R A, Bestebroer Y M, Herfst S, et al. Influenza A virus surveillance in European birds and identification of a novel H5N1 subtype. <http://www.gripp.ru>, 2004
- [2] Alexander D J, Brown I H. Recent zoonoses caused by influenza A viruses. *Rev Sci Tech*, 2000, 19: 197~225
- [3] Kaiser L, Briones M S, Hayden F G. Performance of virus isolation and Directigen flu A to detect influenza A virus in experimental human infection. *J Clin Virol*, 1999, 14: 191~197
- [4] Boivin G, Hardy I, Kress A. Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (FLU OIA test) in comparison with cell culture and reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 730~732
- [5] Ellis J S, Fleming D M, Zambon M C. Multiplex reverse transcription-PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 2076~2082
- [6] Magnard C, Valette M, Aymard M, et al. Comparison of two nested PCR, cell culture, and antigen detection for the diagnosis of upper respiratory tract infections due to influenza viruses. *J Med Virol*, 1999, 59: 215~220
- [7] van Elden L J, Nijhuis M, Schipper P, et al. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 196~200
- [8] Schweiger B, Zadow I, Heckler R, et al. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 1552~1558
- [9] Spackman E, Senne D A, Myers T J, et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 3256~3260
- [10] Lau L T, Fung Y W, Wong F P, et al. A real-time PCR for SARS-coronavirus incorporating target gene pre-amplification. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312: 1290~1296
- [11] Yu A C, Lau L T, Fung Y W. Boosting the sensitivity of real-time polymerase-chain-reaction testing for SARS. *N Engl J Med*, 2004, 350(15): 1577~1579
- [12] Yu A C. The difficulties of testing for SARS. *Science*, 2004, 303: 468~469
- [13] Collins R A, Ko L S, So K L, et al. Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (Eurasian lineage) using NASBA. *J Virol Methods*, 2002, 103: 213~225
- [14] Collins R A, Ko L S, Fung K Y, et al. Rapid and sensitive detection of avian influenza virus subtype H7 using NASBA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300: 507~515
- [15] Shan S, Ko L S, Collins R A, et al. Comparison of nucleic acid-based detection of avian influenza H5N1 with virus isolation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302: 377~383
- [16] Collins R A, Ko L S, So K L, et al. A NASBA method to detect high- and low-pathogenicity H5 avian influenza viruses. *Avian Dis*, 2003, 47: 1069~1074
- [17] Lau L T, Bank J, Ahme R, et al. Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313: 336~342
- [18] Fung Y W, Lau L T, Yu A C. The necessity of molecular diagnostics for avian flu. *Nat Biotech*, 2004, 22: 267
- [19] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 1991, 350: 91~92

NASBA—A New Method to Detect Avian Influenza Virus

LU Le-ting^{1,2} LU Shuang^{1,2} FENG Yan-yun^{1,2} CHEN Jian-guo³ YU Chang-hai^{1,2}

(1 Neuroscience Research Institute; Department of Neurobiology, Health Science Center,

Key Laboratory of Neuroscience, Ministry of Education Peking University Beijing 100083, China)

(2 Hong Kong DNA Chips Ltd Hong Kong, China 3 College of Life Science, Peking University Beijing 100871, China)

Abstract NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) is a continuous, isothermal, enzyme-based method for the amplification of nucleic acid. It is especially suitable for amplifying RNA sequences, and more sensitive, specific and convenient than other virus detection methods such as viral culture, viral antigen detection techniques and PCR. In this review, The principle and successful application of NASBA in avian influenza virus detection were focused on. NASBA is not only a useful tool for avian influenza virus detection, but also suitable for routine screening for other RNA virus.

Key words NASBA Avian influenza Detection method

化学工业出版社新书

分子生物学精要(原著第四版) Essentials of Molecular Biology

(美) George M. Malacinski著,魏群等译,2005年10月出版,ISBN 7-5025-7385-2,定价:39.00元。

本书由蛋白质、核酸及大分子复合物的结构,大分子的功能,细胞内大分子功能的协同作用,大分子的实验操作等一系列的单元组成,应用了对知识结构的分层法,复杂性随章节增加,主要介绍了分子结构和功能的基础知识。同时从对结构的回顾到对蛋白质组学的讨论,汲取了分子生物学学科的每一个主要方面的精华。本书适合作为分子生物学专业的高年级本科生、研究生学习用书,教师参考用书;也适合具备一定生物学知识并对分子生物学感兴趣的人员的学习指导用书;也可以作为相关科研人员的参考用书。

生物医学传感器与检测技术

杨玉星 编著,2005年9月出版,ISBN 7-5025-7601-0,定价 36.00元。

本书在作为内部教材多年使用的基础上,进一步加以完善而成。从基本概念、基础理论、相关仪器到性能特点、操作技术,逐步深入,力求将抽象的内容讲细讲透。既是一门知识面较宽的综合理论课,也是一门实践性较强的技术课程。在重视基本理论分析的基础上,结合最新的电子技术,对目前实践中常用的仪器和方法进行了重点讨论。另外,每一章内容后都附有习题,便于读者学习和自测。本书可以作为生物医学工程、医学物理、医学仪器设计和其他相关专业的专业基础课程教材。

微生物重要代谢产物——发酵生产与过程解析

陈坚 主编,2005年10月出版,ISBN 7-5025-7420-4,定价 68.00元。

本书是关于微生物重要代谢产物的系统论著。在代谢产物的选取上,注重其代表性,反映重要类型,同时已经成为近些年的研究热点,已进行生物法工业生产或即将取得重大突破。在具体介绍某一种产品时,强调论述的系统性,如首先概述其性质、合成方法和应用情况,并详细讲解其发酵生产的相关技术,最后突出介绍其代谢网络模型与代谢流分析。另外,书中介绍了近十年来国内外出现的一些重要发酵产品,并在充分分析先进的发酵工程理论与技术的基础上,结合研究实例,对多种微生物生产的重要代谢产物的研究进展情况、发酵生产技术和方法进行了详细论述。书中大量的研究数据均是编者的一线科研资料,这对于研究同行开展相关工作无疑会起到很大的参考和借鉴作用。

以上图书全国各大新华书店均有销售,邮购加收10%邮资费,邮购地址:100029北京市朝阳区惠新里3号,收款人:化学工业出版社发行部,电话:010-64918013;欢迎加入“化学工业出版社读者俱乐部”,可免收邮费并享受其他购书优惠,详情请致电:010-64982530,更多精彩图书请登陆网站 www.cip.com.cn