

常见病原快速检测 技术与应用

CHANG JIAN BING YUAN KUAI SU JIAN CE
JI SHU YU YING YONG

主 审/唐小平 王 鸣 主 编/杨智聪 吴新伟



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

常见病原快速检测

技术与应用

主 审 唐小平 王 鸣

主 编 杨智聪 吴新伟

副主编 陈守义 狄 飏 白志军 李文学

编 委 (以姓氏笔画为序)

白志军 朱 伟 伍业健 刘静雯 许聪辉 苏文哲
李文学 李魁彪 杨智聪 吴继彬 吴新伟 狄 飏
张 晶 张 颖 张 豪 陈守义 陈佳璇 和 鹏
周 勇 胡玉山 侯水平 夏 丹 陶 霞 曹 蓝
曹毅敏 蒋力云 谢华萍

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

常见病原快速检测技术与应用 / 杨智聪, 吴新伟主编.
—北京: 人民卫生出版社, 2016
ISBN 978-7-117-22294-5

I. ①常… II. ①杨… ②吴… III. ①常见病 - 病原微生物 - 检测 IV. ①R372

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 063984 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

常见病原快速检测技术与应用

主 编: 杨智聪 吴新伟

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 中国农业出版社印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 23 插页: 2

字 数: 560 千字

版 次: 2016 年 5 月第 1 版 2016 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-22294-5/R · 22295

定 价: 90.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

主编简介



杨智聪, 流行病学二级主任医师, 中山大学公共卫生学院、广东药学院和中国疾病预防控制中心传染病防制所研究生导师, 现任广州市疾病预防控制中心副主任、广东省和广州市传染病防控与突发公共卫生事件应急专家、中华预防医学会预防医学信息专委会常委、中华医学会公共卫生分会委员、广东省医学会卫生学分会副主任委员、广东省预防医学会消毒专业委员会副主任委员、广东省预防医学会流行病学专业委员会常委、广东省和广州市社区卫生学会副会长、广州市预防医学会流行病学专业委员会主任委员, 《华南预防医学》副主编, 《中华现代医院管理杂志》、《热带医学杂志》和《广东药学院学报》编委。

长期从事传染病预防控制和病原学检测管理与研究工作。组织开展了登革热、甲型 H1N1 流感、H5N1 和 H7N9 禽流感、手足口病、霍乱等急性传染病和食物中毒、环境污染等突发公共卫生事件的调查处理和检测工作, 亲历了地震、冰雪、洪涝等现场救灾和应急防病。曾获广东省抗击非典三等功、广东省医学会先进工作者、广州市抗击非典先进个人、广州市抗震救灾优秀共产党员、广州市创建国家卫生城市先进个人、广州医师奖、广州市卫生局优秀科技人才、广州市高层次卫生重点人才等荣誉。

主持或参与美国 NIH、国家自然科学基金、省市重大重点科技攻关和应用基础等课题研究 20 多项。以第一作者或通讯作者发表学术论文 71 篇, 其中被 SCI 收录 20 篇, 主编出版学术专著《登革热》、《医院感染控制技术》和《突发公共卫生事件调查方略》。以第一完成人获国家计算机软件版权 6 个、广州市科技进步二等奖、三等奖各 1 项。

主编简介



吴新伟, 博士, 主任技师, 硕士生导师。1993 年获得四川大学生物化学学士学位, 1999 年获得华西医科大学生物化学与分子生物学博士学位, 1999—2001 年为中山医科大学分子生物学博士后, 2001 年进入广州市疾病预防控制中心, 负责微生物学实验室的工作, 参与 SARS、禽流感、登革热、手足口病等多次重大传染病疫情的预防控制, 并在亚运会、中国进出口商品交易会(广交会)、横渡珠江等公共卫生事件的卫生保障工作中发挥了积极的作用。

2003 年曾荣获广东省抗击非典一等奖、“广州市抗击非典模范”称号。2005 年作为访问学者留学加拿大不列颠哥伦比亚大学半年, 2010 年作为访问学者留学美国国家疾病预防控制中心 1 年。现为广州市疾病预防控制中心微生物学检验科科长, 广东省预防医学会卫生检验学会常委, 广东省热带医学学会理事, 广州市突发公共卫生事件专家委员会成员, 中山大学硕士生导师。

长期专注于病原微生物的快速诊断及其分子流行病学研究, 主持及参与多项国家、省、市级基金, 现已发表论文 80 余篇, 其中第一作者 24 篇, 通讯作者 15 篇, 以共同第一作者在 *Science* 及 *Proc Natl Acad Sci USA* 上各发表一篇论文。已获得国家发明专利授权 3 项, 获广州市科技进步二等奖 2 项, 广州市科技进步一等奖 1 项, 广东省科技进步二等奖 1 项, 广东省科技进步特等奖 1 项, 中华预防医学会科学技术三等奖 1 项。

序

后 SARS 时代,公共卫生事件开始越来越多地受到政府职能部门和社会公众的关注,无论是新型 H1N1 流感、中东呼吸综合征、埃博拉出血热等传染病疫情,还是肠出血性大肠杆菌 O104:H4、黄曲霉毒素等引起的食物中毒事件,对病原体进行快速检测和鉴定都是事件处置的首要关键,往往起到“一锤定音”的重要作用。但是,一方面,引起公共卫生事件的病原种类繁多,构成复杂;另一方面,各种新研发的检测技术方法层出不穷,各擅胜场,如何选择有效的检测方法,设计合理的检测策略,快速准确地锁定病原,是广大公共卫生检验人员目前经常面临的挑战。

广州市医学重点学科——“病原快速检测实验室”的检验研究和工作人员,针对病毒、致病菌、寄生虫和生物毒素等公共卫生事件常见病原,认真收集整理了各种病原检测技术的基本原理和操作细节,通过大量实际工作验证行之有效的检验方法,形成了这本《常见病原快速检测技术与应用》。更难能可贵的是,他们分享了各种方法的优缺点和适用范围,以及在实际工作中如何综合运用这些方法的经验教训。该书具有较强的针对性、实用性和实操性,是公共卫生实验室必备的专业技术书籍,也是疾病预防控制中心、医院病原生物学检验人员培训学习的参考教材。

在对我们的“敌人”——各种病原的分子结构和致病机制研究越来越深入的今天,希望本书能帮助大家更好地了解自己手中的“武器”,做到知己知彼,百战不殆。

中国科学院微生物研究所所长

中国疾病预防控制中心副主任

中国科学院院士

高 福

2016 年 1 月于北京

前言

近十年来,新发和再发的传染病种类繁多,发展迅速,传染性和死亡率高,给全世界人类健康和全球社会经济造成了巨大损失,如何预防控制其发生与流行已经成为目前最重要的问题。这些新发传染病的病原主要包括病毒、立克次体、细菌、衣原体、螺旋体以及寄生虫等,特别以病毒居多。由于人类对新发和再发传染病认识不足,往往无法在疾病流行早期快速检测病原体,而且因为人类对大多新发传染病无天然免疫力,往往造成世界范围内的大规模流行。由此可见,新发和再发传染病病原的快速准确检测在其防治中至关重要。

为了进一步提高实验室病原生物学检验专业人员的检测技术水平,提高实验室检验能力,为全面做好疾病预防工作提供技术支撑,特出版此书《常见病原快速检测技术与应用》。

传统的感染性疾病的诊断主要是以细菌的分离培养以及细菌生化鉴定为基础,以病毒的分离和患者血清学检测为主,这些诊断方法耗时长,不利于疾病流行早期快速检测病原体和早期准确控制的目的。随着分子生物学及基因组学的发展,病原的快速检测方法主要体现在分子生物学和免疫技术的应用,这些技术已经在疾病预防、临床诊断、食品安全分析等领域得到了广泛的应用,本书当中不同章节进行了阐述。

本书内容涵盖了日常病原生物性疾病的预防和控制工作以及突发公共卫生事件中各种病原体检验的基本原理、基本方法和检测技术。主要包括病毒、致病菌、寄生虫和生物毒素等快速检测技术四部分。每部分又根据不同病原体分别进行阐述,不同病原体所适用的检测方法不同,检测方法都是已经在该病原体检测当中非常成熟/适用的技术方法,实用性强。主要供市、县疾病预防机构、哨点医院病原生物学检验专业人员培训和学习使用。

本书编者均为广州市医学重点学科——“病原快速检测实验室”的骨干成员,在实验室长期从事病原微生物研究与检验工作,积累了大量实际工作经验。很多人经历了2003年的SARS,2009年的H1N1、2013年的H7N9等众多疫情暴发处理工作,一些快速检测方法也在疫情现场中得到了验证。

特别感谢中国科学院高福院士在百忙之中为本书作序,全国著名传染病学专家唐小平教授和国内著名传染病防控专家王鸣教授为本书审阅,中山大学中山医学院周俊梅老师为本书校核。

由于编者都是在各自繁忙的岗位工作中利用业余时间完成本专著的编写工作,时间仓促,难免有不足之处,恳请广大同仁和读者批评指正!

杨智聪 吴新伟

2016年1月于广州

目 录

第一章 概述	1
第二章 病毒的快速检测技术	11
第一节 流感及禽流感病毒	11
第二节 呼吸道合胞病毒	18
第三节 呼吸道腺病毒	24
第四节 副流感病毒	28
第五节 偏肺病毒	33
第六节 冠状病毒	39
第七节 博卡病毒	47
第八节 轮状病毒	53
第九节 肠道腺病毒	62
第十节 诺如病毒	67
第十一节 肠道病毒	73
第十二节 登革病毒	80
第十三节 汉坦病毒	88
第十四节 基孔肯雅病毒	92
第十五节 流行性乙型脑炎病毒	98
第十六节 新型布尼亚病毒	101
第十七节 西尼罗病毒	105
第十八节 埃博拉病毒	109
第十九节 麻疹病毒	115
第二十节 水痘-带状疱疹病毒	120
第二十一节 风疹病毒	123
第三章 致病菌的快速检测技术	128
第一节 鼠疫杆菌	129
第二节 霍乱弧菌	132

第三节 沙门菌	136
第四节 志贺菌	143
第五节 致泻性大肠埃希菌	150
第六节 副溶血性弧菌	155
第七节 创伤弧菌	161
第八节 金黄色葡萄球菌	167
第九节 蜡样芽胞杆菌	172
第十节 单核细胞增生李斯特菌	179
第十一节 军团菌	183
第十二节 小肠结肠炎耶尔森菌	188
第十三节 脑膜炎奈瑟菌	193
第十四节 溶血性链球菌	200
第十五节 空肠弯曲菌	206
第十六节 布鲁杆菌	213
第十七节 恙虫病东方体	219
第十八节 钩端螺旋体	226
第十九节 伯氏疏螺旋体	229
第二十节 埃立克体	234
第四章 寄生虫的快速检测技术	239
第一节 溶组织内阿米巴	240
第二节 杜氏利什曼原虫	243
第三节 蓝氏贾第鞭毛虫	247
第四节 疟原虫	250
第五节 弓形虫	257
第六节 隐孢子虫	262
第七节 华支睾吸虫	266
第八节 日本血吸虫	271
第九节 链状带绦虫	275
第十节 曼氏迭宫绦虫	280
第十一节 旋毛虫	284
第十二节 广州管圆线虫	288
第十三节 蠕形住肠线虫	292
第十四节 十二指肠钩口线虫和美洲板口线虫	293

第五章 生物毒素的快速检测技术	297
第一节 伏马菌素	297
第二节 黄曲霉毒素	302
第三节 脱氧雪腐镰刀菌烯醇	306
第四节 玉米赤霉烯酮	310
第五节 麻痹性贝类毒素	312
第六节 腹泻性贝类毒素	316
第七节 神经性贝类毒素	322
第八节 健忘性贝类毒素	325
第九节 展青霉素	329
第十节 雪卡毒素	332
第十一节 微囊藻毒素	337
第十二节 河豚毒素	344
参考文献	351

第一章

概 述

病原体(pathogen),指引起人或动植物疾病的微生物和寄生虫,主要包括细菌、病毒、真菌、支原体、衣原体、朊毒体、螺旋体、立克次体等。而大部分的疾病是由细菌、病毒和寄生虫引起的,其中的传染性疾病对人类的生命健康造成巨大威胁。据世界卫生组织(WHO)统计,2013 年全球肺结核、霍乱、利什曼病、麻风病、麻疹、百日咳等传染病共报告 55 488 806 例病例,2013 年全球艾滋病和肺结核的死亡率分别为 22/10 万和 16/10 万。近年来新发传染病在全球的暴发及流行提示必须进一步了解其三间分布及传播规律,而病原体的检测、表型及基因型的鉴别对此有重要意义,同时能为临床治疗、疫苗研发提供理论依据,达到保护高危人群,防止传染病的暴发及流行。

目前病原体的检测技术种类繁多,应用比较广泛的检测方法主要有直接涂片镜检、分离培养、生化反应、血清学反应、核酸分子杂交、基因芯片、聚合酶链反应、免疫胶体金、时间分辨荧光免疫分析等。

一、病原常规检测技术简介

(一) 传统方法

1. 涂片镜检法 采样、涂片、革兰染色后置于显微镜下观察细菌的形态、排列及结构特征,革兰阴性菌和阳性菌分别呈红色和紫色。涂片类型主要有血液、痰液、尿沉渣、粪便、鼻咽咽喉分泌物、阴道分泌物等。有研究表明在 45 例疑似口腔和 51 例肛门直肠及其他局部病灶感染的女性患者中,涂片镜检法的检测阳性率分别为 62.2% 和 82.4%,均高于分离培养法,两者的检测阳性率差异有统计学意义。涂片镜检法适用于具有特殊形态的病原微生物,能对病原微生物分类鉴定,操作简单,实验条件要求较低,不需要特殊仪器和设备,成本较小,在基层实验室即可进行,但仅凭肉眼判断检测结果易造成假阳性,但在传染病暴发流行期间不能同时处理批量样本,不利于现场大样本的初筛。

2. 分离培养法 将临床标本(如血液、痰、粪便等)的病原体接种于培养基或活细胞中进行人工培养,分离鉴定其种属。主要分为细菌和病毒的分离培养,实验室分离培养病毒的方法主要有鸡胚培养、组织培养和动物接种。分离培养法能根据研究目的选择不同的培养基,并能在多种细菌中分离出目标菌;也能对动物进行病毒接种,观察其病理反应及感染指标。申科敏研发了致病性弧菌培养基(VEM)并用于快速检测创伤弧菌、拟态弧菌、辛辛那提弧菌和海鱼弧菌,结果表明 VEM 与选择性鉴别培养基相结合检验致病菌的方法具有检测快速、操作方便简单、结果易于观察、可减少大量后续工作、检出率高和成本低廉等优点。但细菌的生长繁殖或病毒分离需要较长时间,检测周期较长,不能同时处理批量样本。

3. 生化鉴定方法 依据不同微生物酶系统的差异性,利用不同底物产生的不同代谢产

物来间接检测该微生物内酶的有无,从而达到检测特定微生物的目的。主要方法分为糖或醇类代谢、氨基酸和蛋白质代谢、有机酸盐和胺盐利用、呼吸酶类、毒性酶类和其他试验。该方法的特点是可供选择的生化反应类型较多,适合基层医院的实验室,但其试验步骤较多,操作烦琐,耗时长,鉴定速度慢,结果受实验条件和操作人员影响较大,因此敏感性与特异性有限。但随着实验技术的改进,近年来出现了一些较为快速的生化试验,如褚天新利用 MUCAP 荧光试验检测 56 株菌株,发现 12 株沙门菌,44 株非沙门菌中发现 7 株假阳性,其灵敏度、特异度、阳性和阴性预测值分别为 100%、84.09%、63.16% 和 100%,同时节约鉴定时间 12~24 小时。

(二) 血清免疫学方法

1. 凝集实验 将颗粒性抗原与相应抗体混合后,在电解质参与下,经过一定时间,抗原抗体凝聚成肉眼可见的凝集块,根据凝集程度的高低判断是否阳性及抗体效价。一般可分为直接和间接凝集反应。

2. 沉淀反应 可溶性抗原与相应抗体在液相中特异结合后,形成的免疫复合物受电解质影响出现的沉淀现象。一般可分为液体内和凝胶内沉淀反应。

3. 补体结合试验 根据补体的作用无特异性,能与各种抗原抗体复合物结合,但当抗原与抗体不相对应时,补体则不被结合而游离存在,可分为直接和间接补体结合试验。前者可用已知抗原检测标本中的相应抗体,或用已知抗体鉴定未知抗原;后者用于阻止抗原与随后再加入的已知相应抗体发生结合。

4. 免疫荧光技术 以荧光物质标记的特异性抗体或抗原作为标准试剂,用于相应抗原或抗体的分析鉴定和定量测定,是将抗原-抗体反应的特异性与荧光物质检测的敏感性和直观性结合起来的一种免疫分析技术。该法可分为五种:直接荧光法(DFA)、间接荧光法(IFA)、时间分辨荧光免疫分析法(TIF)、流式细胞仪(FC)、多指标同步分析(xMAP)。该法优点是灵敏度高、特异性强、检测速度快,但存在非特异染色问题,且操作程序较烦琐,需要特殊的昂贵仪器和染色标本不能长期保存。

5. 酶免疫技术 以酶标记的抗体(抗原)作为主要试剂,将抗原-抗体反应的特异性和酶催化的高效反应的专一性相结合的一种新型染色方法,利用酶作为标记物,并以酶分解底物的显色反应示踪抗原或抗体。该法可分为免疫酶组织化学技术和酶免疫测定。前者主要用于组织切片或其他标本中抗原的定位,后者主要用于液体标本中抗原(抗体)的定性和定量。而当中在病原体检测应用最广泛的是酶联免疫吸附测定(ELISA),基本原理是将特异的抗体(抗原)包被与载体上,通过抗原抗体反应使酶标记抗体(抗原)也结合在载体上,经洗涤去除游离的酶标记抗体(抗原)后,加入底物显色,定性或定量分析有色产物以确定待测物(量)。主要可分为双抗夹心法、间接法、竞争法,其中双抗夹心法常用于抗原测定,间接法常用于抗体测定,竞争法适用于两者。ELISA 方法的优点在于酶催化加快反应,可检测病原体抗原和机体抗体,提高其敏感性和特异性,并能定量测定。Veldkamp J 在 1975 年应用 ELISA 法检测 245 份梅毒血清样本,发现在梅毒病情进展各阶段,其灵敏度均较高,达到 99%,而其他实验方法介于 40%~81%,并具有较高特异性,提出了在一般人群中应用该法代替碱性磷酸酶作为梅毒初筛方法的可能。但该法检测结果的准确性受到较多因素的影响,如检测同一病原体,选取不同的抗原,其结果差异较大,可能导致假阳性;而不同疾病的病毒血症期持续时间不同,抗体检测时容易出现较多假阳性和假阴性结果,而且既往感染后抗

体水平高低也影响其结果及定量分析。A. A. GLYNN 等通过 ELISA 法检测不同时间 191 名淋病现患男性的血清样本,发现治疗一星期内,后四天平均抗体水平高于前三天,假阴性率远低于前三天,提示抗体反应在治疗 1~2 星期会逐渐消失;其抗体水平同时受到直肠指征、梅毒及既往淋病感染影响。随着检测技术的发展,经优化后的新 ELISA 法可针对不同时期的抗体进行检测,较大地提高其灵敏度和特异度,如 Emi Kitashoji 等在钩体病早期诊断中应用结合重组蛋白 LigA 的 IgM ELISA 法,证实在 167 名钩体病确诊患者中,该法灵敏度高于 Patoc-IgM ELISA 法且差异有统计学意义,特异度达 98%;也同时发现在疾病初期其灵敏度高于其他血清学方法(4 天内 LAMP 法最高),随着病情进展灵敏度逐渐升高。

二、病原快速检测技术简介

随着分子生物学及基因组学的发展,各种分子生物学技术已逐渐替代了传统生物学方法,广泛用于病原体快速检测及分型,成为医学实践中监测和鉴定病原微生物的主要手段。理想的快速检测方法除了应有较高的灵敏度和特异性之外,还应具备快速、廉价、可重复、易于操作、可通过互联网共享数据、适用范围广泛的病原菌等特点,但迄今开发的各种快速检测方法各有所长,却尚未出现满足所有条件的理想方法。因此,透彻理解各种方法的优点和局限性,根据自己实际工作的需求选择适当的方法至关重要。

(一) 核酸杂交技术

核酸分子变性处理后,在适当条件下,按碱基互补配对原则复性。根据这一原理设计病毒特异性序列作为探针,与待测标本杂交,经检测杂交信号,判断标本中是否存在相应的核酸。探针可自病毒置备,也可根据病毒已知序列合成,或用基因重组技术获得。探针标记物有放射性核素与非放射性物质两种。放射性核素主要应用 ^{32}P 、 ^{125}I 等,敏感性高,可检测出 pg 水平的病毒核酸,但因不易长期保存,且存在放射性污染等问题,现已较少应用。非放射性物质常用的有生物素、酶(主要为辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶)等,非放射性探针安全、稳定、操作方便、经济,但敏感性较低,近年来,由于杂交信号检测方法的改进,检测的敏感性得到了很大提高。

核酸杂交技术根据检测目的和检测手段的不同,可分为液相杂交、固相杂交及细胞内定位(原位)杂交。固相杂交又可分为斑点杂交,凝胶电泳印迹转移杂交。斑点杂交是直接将标本点在固相载体上杂交,该法迅速简单,一次可检测大量标本,是最初临床上应用最多的病毒核酸检测方法;凝胶电泳印迹转移杂交是电泳技术和杂交技术结合的一种方法。根据杂交核酸的不同,又可分为 Southern 印迹及 Northern 印迹法。传统的固相载体多应用硝酸纤维膜和尼龙膜,近年来发展的微孔板包被技术以微孔板为载体取得了良好的效果。细胞内定位技术是细胞学技术与核酸分子杂交技术结合的产物,可直接观察病毒核酸所在的细胞类型、细胞内分布等。但因细胞内核酸含量低,需使用高浓度、高活性的探针。

核酸杂交技术特异性强,并可用于多种病毒性疾病的诊断,但待测标本中核酸量少,直接进行杂交,效果较差,现多与核酸扩增技术结合应用,以得到最佳效果。

(二) PCR 技术

1. 传统 PCR PCR 即聚合酶链反应(polymerase chain reaction),是 20 世纪 80 年代中期发展起来的体外核酸扩增技术。其基本原理类似于 DNA 的天然复制过程,其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 由变性—退火—延伸三个基本反应步骤构成:

①模板 DNA 的变性:模板 DNA 经加热至 93℃左右一定时间后,使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离,使之成为单链,以便它与引物结合,为下轮反应作准备;②模板 DNA 与引物的退火(复性):模板 DNA 经加热变性成单链后,温度降至 55℃左右,引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合;③引物的延伸:DNA 模板-引物结合物在 72℃、DNA 聚合酶(如 TaqDNA 聚合酶)的作用下,以 dNTP 为反应原料,靶序列为模板,按碱基互补配对与半保留复制原理,合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链,重复循环变性—退火—延伸三过程就可获得更多的“半保留复制链”,而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 分钟,2~3 小时就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。扩增产物应用凝胶电泳、EB 染色技术进行检测。

2. 改良 PCR 在传统 PCR 的基础上,发展出了多种改良技术,如对 RNA 模板的检测需加入反转录酶,经反转录生成 cDNA 后,再进行 PCR 扩增,称为反转录 PCR (Reverse Transcript PCR, RT-PCR);使用两套引物进行两轮 PCR 扩增,在第一轮扩增中,使用一对外引物产生扩增产物,然后用一对内引物对第一轮扩增产物进行第二轮扩增,从而增强反应的敏感性和特异性,称为巢式 PCR (nested PCR);在一个 PCR 反应体系中加入 2 套以上特异性引物进行扩增,通过一次反应同时检测多个目标序列,称为多重 PCR (Multi-PCR)。

3. 荧光 PCR 荧光 PCR (fluorescent PCR)过程的监测有多种检测模式。最常用的有三种:

(1) SYBR Green I 检测模式:温度循环为 94℃—55℃—72℃三步法,只有引物,无探针,荧光染料镶嵌在双股螺旋链中间。通过对特定方向的强荧光检测获得信号,这种试剂检测模式易产生非特异信号,且本底光较大。

(2) 水解探针 (hydrolysis probe) 模式:又称为 Taqman 法,反应温度循环为 94℃—60℃两步法,不仅有引物,还有另外一个特异针对扩增模板的探针在引物对之间。在探针相邻两个碱基上分别结合两个荧光染料,一个染料接受激发光得到的能量传给了第二个染料,接受能量的第二个染料通过发射特征光子回到稳定态。当 Taq 酶在 60℃延伸扩增链时,遇到探针,利用 Taq 酶 5'—3'外切酶活性将探针水解成单个碱基,单个碱基之间距离较远,第一个染料能量无法传给第二个染料,只好通过发射特征光子回到稳定态,通过对溶液中第一个染料的荧光检测获得信号。这种试剂检测模式增加了检测信号的特异性,但是由于利用了 Taq 酶 5'—3'外切酶活性,一般试剂厂家只给 Taq 酶的聚合酶活性定标,没有同时给 Taq 酶 5'—3'外切酶活性定标,不同批号试剂之间会给定量带来差异。另外对探针的熔点温度 (T_m) 仅要求其高于 60℃,这就使不同试剂盒之间的特异性参差不齐,而且无法做质控检测。

(3) 杂交探针 (hybridization probes) 模式。温度循环为 94℃—55℃—72℃三步法,有引物,两个特异针对扩增模板相邻的探针在引物对之间,在一个探针 3'碱基上结合一个荧光染料,在另一个探针 5'碱基上结合第二个荧光染料。在 55℃时,两个探针都刚好接合在模板上,第一个染料接受激发光得到的能量传给了第二个染料,接受能量的第二个染料通过发射特征光子回到稳定态,通过对结合在扩增模板上双探针中第二个染料的荧光检测获得信号。这种试剂检测模式中荧光信号与特定杂交温度相关,探针的浓度始终保持不变,因此可以在扩增后检测熔解曲线作为信号的特异性质控。另外这种试剂检测模式可以用于点突变检测。

(三) 其他扩增技术

与 PCR 及其相关技术发展的同时,新的扩增技术也不断诞生。这些技术各有利弊,与 PCR 互为补充,有的可结合应用,共同构成了核酸体外扩增技术的大家族。相信随着分子生

物学技术的发展,这一家族一定会再涌现出新成员。

1. 连接酶链反应(LCR) 由两对相邻的引物参加反应,反应产物由相邻的引物连接而得。当待测模板 DNA 变性后,两对引物分别在相邻位置上与模板 DNA 链结合,然后被耐热的 DNA 连接酶连接,连接的产物又可在下一个周期中作为模板,反应中连接点如有一个碱基错配,寡核苷酸链则不能连接。产物以荧光标记探针,用荧光仪检测。LCR 在 FDA 的临床实验中证实效果良好。该技术可在专用仪器上运行。在美国 FDA 的临床实验中发现,LCR 技术在淋球菌、结核分枝杆菌及人乳头瘤病毒的检测中,敏感性、特异性高达 99% 以上,在 HCV RNA 的检测中也收到良好的效果。

2. 核酸序列复制系统(NASBA)/转录依赖的扩增系统(TMA) 核酸序列复制系统和转录依赖的扩增系统两种方法原理相似,均在同一温度下扩增,包括一系列目的核酸的反转录和转录过程。

NASBA 反应原理:引物带有 T7 RNA 多聚酶的结合位点,RNA 经反转录成 cDNA 后,形成 RNA/DNA 杂交分子,RNA 酶水解 RNA 分子,另一条引物与 cDNA 结合,合成 DNA 双分子,使 RNA 聚合酶启动子活化,在 T7 RNA 聚合酶的作用下产生大量的反义 RNA,又以反义 RNA 为模板,启动下一步循环,最终生成大量的反义 RNA。以 HRP 标记探针杂交后电泳,对凝胶直接染色分析,或用 ^{32}P 标记探针杂交后,经 Northern 杂交分析,也可用电化学仪器进行检测。

TMA 原理与 NASBA 相似,但仅有反转录和 RNA 多聚酶参加反应,整个反应在一个试管中进行,减少了污染。

3. 环介导核酸等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是 2000 年开发的一种新颖的恒温核酸扩增方法,其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物,利用一种具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶在等温条件(63°C 左右)保温 30~60 分钟,即可完成核酸扩增反应。与常规 PCR 相比,不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程。LAMP 是一种全新的核酸扩增方法,具有简单、快速、特异性强的特点。

4. 滚环扩增技术(RCA) 是近年来发展起来的一种新型的核酸扩增技术。该技术是基于连接酶连接、引物延伸、与链置换扩增反应的一种等温核酸扩增方法。在恒温的条件下,可以产生大量的与环型探针互补的重复序列。与传统的核酸扩增方法相比,它具有扩增条件简单,特异性高,能在恒温条件下进行等特点。滚环扩增技术结合荧光、电化学、电化学发光等检测技术可以实现高灵敏的生物分子检测。

5. 单引物等温扩增 恒定温度(42°C)下,鼠白血病反转录酶(MMLV 酶)与一条引物的相互作用,首先合成模板的互补 DNA 单链,互补 DNA 单链自身成环形成钥匙结构,并在 MMLV 酶的作用下形成 T7 RNA 聚合酶的启动子识别区域,T7 RNA 聚合酶识别转录出多个 RNA 拷贝。每一个 RNA 拷贝再从反转录开始进入下一个扩增循环;同时,带有荧光标记的探针和这些 RNA 拷贝特异结合,产生荧光。该荧光信号可由荧光检测仪器实时捕获,直观反映扩增循环情况。

6. 依赖解旋酶 DNA 恒温扩增技术(helicase-dependent isothermal DNA amplification, HDA) 是 2004 年发明的一种新型核酸恒温扩增技术。该技术模拟自然界生物体内 DNA 复制的自然过程,在恒温条件下利用解旋酶解开 DNA 双链,同时 DNA 单链结合蛋白(single-stranded DNA-binding protein, SSB)稳定解开的单链,并为引物提供结合模板,然后由 DNA

聚合酶催化合成互补链。新合成的双链在解旋酶的作用下又解成单链,并作为下一轮合成的模板进入上述的循环扩增反应,最终实现靶序列的指数式增长。

7. 链置换扩增(strand displacement amplification, SDA) 是近几年发展起来的一种酶促 DNA 体外等温扩增方法。在靶 DNA 两端带上被化学修饰的限制性核酸内切酶识别序列,核酸内切酶在其识别位点将链 DNA 打开缺口, DNA 聚合酶继之延伸缺口 3'端并替换下一条 DNA 链。被替换下来的 DNA 单链可与引物结合并被 DNA 聚合酶延伸成双链。其基本系统包括一种限制性核酸内切酶、一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶、两对引物、dNTP 以及钙、镁离子和缓冲系统。其基本过程包括准备单链 DNA 模板、生成两端带酶切位点的目的 DNA 片段、SDA 循环三个阶段。该过程不断反复进行,使靶序列被高效扩增。

(四) 脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

PFGE 的基本原理是使用限制性内切酶将高度纯化的 DNA 基因组样本切割成一定大小的片段,通过电场的不断改变将大小不等的片段分开,经 EB 染色后在凝胶上出现按 DNA 大小排列的电泳带型从而得以识别。对于多数细菌,PFGE 可以识别从 30kb 到 1Mb 不等的 DNA 条带。自 1984 年 Schwartz 和 Cantor 首先报道用 PFGE 分离酵母染色体获得成功以来,PFGE 以其重复性好、分辨力强而被誉为细菌分子生物学分型技术“金标准”。如不同来源菌株的 PFGE 图谱一致,可以认为是相同菌株。目前,对许多常见的细菌如肺炎链球菌、肠球菌、肠杆菌属和其他的革兰阴性菌以及结核分枝杆菌等都进行了 PFGE 分析。

与其他分型方法相比,PFGE 具有重复性好、分辨率高、结果稳定的优点,能在细菌基因组很庞大的情况下,尽可能多地反映变异信息。但 PFGE 也存在一定局限性,如分子量相近的 DNA 很难有效地分离开来,不能保证相同大小的条带就是相同的 DNA 片段,技术要求高,耗时长,不宜用于大量常规检验样本的分析,不同实验室间结果难以相互比较等。

(五) 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)

MLST 是一种通过直接测定多个管家基因的核苷酸序列来发现细菌变异的分型方法,一般测定 6~10 个管家基因内部 400~600bp 片段的核苷酸序列,每个位点的序列根据其发现的时间顺序赋予一个等位基因编号,每一株菌的等位基因编号按照指定的顺序排列就是它的等位基因谱,也即是这株菌的序列型(sequence type, ST)。根据提交至网络数据库中的 ST 数据,比较菌株间的 ST 型即可发现菌株的相关性。该方法最大的优点在于所有的实验数据有国际统一的命名标准,可以通过互联网实现实验室间数据共享及比较;可以通过软件追踪某一菌株具体的来源和传播信息。该方法在实验过程的可操作性及实验结果的可靠性之间取得了平衡,并且简便快速,重复性强,分辨率较高。

MLST 已经广泛用于多种病原菌,如脑膜炎奈瑟菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌等,但由于某些特定血清群菌株的管家基因序列较一致或者突变积累太慢,这个方法并不适合于所有血清群的菌株进行分型。

(六) 扩增片段长度多态性分析(amplified fragment length polymorphism, AFLP)

AFLP 是 1995 年由荷兰的 Zabeau 和 Vos Peter 创立的新 DNA 指纹技术。其基本原理是用两种限制性内切酶消化少量纯化的 DNA,再与两个具有同样黏性末端的寡核苷酸双链人工接头连接。作为扩增反应的模板,只有那些两端序列能与选择性碱基配对的限制性酶切片段才能够被扩增。不同的生物个体之间由于基因组的序列差异,在酶切时产生的片段长度各异,经电泳分离后形成不同的电泳图谱,从而区分出被检测物之间的亲缘性。

AFLP 技术产生后很快用于微生物学领域,它继承了限制性片段长度多态性的可靠性和 PCR 的优势,具有高分辨率、稳定性好、效率高和高灵敏度等优点,为构建遗传图谱、遗传多样性、品种鉴定等相关领域的研究提供了一个非常有效的工具。但在实际工作中,AFLP 仍存在实验耗时长,对 DNA 纯度要求较高,操作程序需要优化,设备昂贵等局限性,需进一步发展。

(七) 基因芯片(gene chip)技术

基因芯片(又称 DNA 芯片、生物芯片)指将大量探针分子固定于支持物上后与标记的样品分子进行杂交,通过检测每个探针分子的杂交信号强度进而获取样品分子的数量和序列信息。通俗地说,就是通过微加工技术,将数以万计、乃至百万计的特定序列的 DNA 片段(基因探针),有规律地排列固定于硝酸纤维膜、硅片、玻片等支持物上,构成的一个二维 DNA 探针阵列,与计算机的电子芯片十分相似,所以被称为基因芯片。它是在基因探针的基础上研制出的,所谓基因探针只是一段人工合成的碱基序列,在探针上连接一些基因芯片可检测的物质,根据碱基互补的原理,利用基因探针到基因混合物中识别特定基因。它将大量探针分子固定于支持物上,然后与标记的样品进行杂交,通过检测杂交信号的强度及分布来进行分析。

(八) 液相芯片(liquid chip)技术

液相芯片技术是 20 世纪 90 年代中期发展起来的,被誉为后基因组时代的芯片技术,也被称为 xMAP 技术。它是集流式细胞技术、激光技术、数字信号处理技术及传统化学技术为一体的新型生物分子检测技术,是唯一被美国 FDA 批准用于临床诊断的基因芯片技术。

液相芯片的技术原理是基于标记有不同荧光染料的直径 $5.6\mu\text{m}$ 聚苯乙烯微球,每一种荧光微球中加入 2 种不同荧光素,根据荧光素的比例不同将微球分为 1~100 号。不同的荧光微球表面可带有不同的基团(如羧基、亲合素和组氨酸等),共价结合不同类型的探针,如蛋白探针和核酸探针。将共价结合有不同探针分子的不同荧光信号的微球悬浮于一个液相体系中,加入待测分子与其充分反应,再加入标记有另一种荧光信号(一般为绿色荧光染料)的报告分子,就构成了一个液相芯片反应系统。在检测过程中,结合流式细胞技术和激光技术使微球逐个通过特制的检测通道。检测系统内置有激光发射器用于发射两束不同波长的激光,一束红色激光激发微球本身的荧光,用于鉴别微球的种类;另一束绿色激光激发报告分子结合的荧光,通过检测荧光的强度对被测物质进行定量分析。

与传统的固相芯片法比较,液相芯片具有以下优点:灵活性好,芯片制备简便,可以根据需要在实验室自行制备;效率高,由于微球直径小并且混悬在液体中,液相环境更好地保持蛋白质的天然构象和活性,有利于生物分子间的相互作用;稳定性好,克服了固相芯片在大分子检测时受表面张力、空间效应等对反应动力学的干扰,检测结果的稳定性和重复性得到很大的提高;价格便宜,试剂、消耗品和检测仪器都比固相芯片技术便宜。

(九) 免疫胶体金技术

氯金酸(HAuCl_4)在还原剂如白磷、维生素 C、枸橼酸等作用下,聚合成为特定大小的金颗粒,并通过静电作用成为一种稳定的胶体状态,称为胶体金。胶体金的一些物理性状,如高电子密度、颗粒大小、形状及颜色反应,与结合物的免疫和生物学特性相结合,使得其能够广泛应用于组织学、病理学、免疫学和细胞生物学等领域。

胶体金在合适的条件下,可以非共价键与大分子结合,当胶体金颗粒聚集后,形成肉眼