

• 综 述 •

国境口岸细菌性生物恐怖剂检测技术研究进展*

陆 琳, 刘国传, 王 飞 综述, 车志军[△] 审校

(北京出入境检验检疫局 100026)

关键词: 生物恐怖; 检测; 进展

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.022

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)01-0051-03

和平与发展已成为当今世界的两大主题,然而,由于各种矛盾所引发的地区性冲突和局部战争却从未中断,大规模杀伤性武器,尤其是生物武器被使用的事实和可能性一直存在,这对全球所有地区构成了现实的威胁。近年来相继发生的几起生物恐怖事件印证了这一点:1995年3月由奥姆真理教发动的东京地铁“沙林”事件,2001年9、10月发生在美国的“炭疽信件”以及后来在美国国会参议院接连发生的两起可疑毒素事件,不但造成了严重的人员伤亡,而且对社会和经济造成了严重的冲击,给社会造成了极度的恐慌和不安^[1-3]。中国生物反恐形势也非常严峻,2001年上海 APEC 会议前,在美国时任总统布什即将下榻的套房内发现了白色粉末。其后,中国发生“白色粉末”事件百余起,其中阳性一起,由于处置得当,未造成太大影响。常用来作为细菌性生物恐怖剂的主要有炭疽芽孢杆菌、鼠疫杆菌、土拉弗菌、布鲁菌属、沙门菌属、志贺菌、大肠杆菌 O157:H7、霍乱弧菌等,其具有致病力强、传染途径多、易大量增殖、容易引起传染病大规模流行等特征^[4-6]。因此,快速检测并确定生物恐怖剂的种类是疫情控制的关键。生物恐怖剂检测的结果是判定是否遭受生物武器袭击的主要依据,随着科技的迅猛发展,生物恐怖剂检测技术也与分析化学、电子工程学等学科相结合,使检测的结果和灵敏度大幅提高。本文对目前国内细菌性生物恐怖剂检测技术的研究进展和应用进行综述。

1 生物传感器

1.1 纳米生物传感器 近年来,由于纳米技术研究的不断深入,利用纳米材料在尺寸上的减少以及表面状态的改变,会使其表现出许多既不同于微观粒子又不同于宏观物体的特性,以及具有巨大的比表面积和界面对外部环境的变化都十分敏感的优势。利用纳米固体的界面效应、尺寸效应、量子效应制成的生物传感器容易实现便携化,在生物恐怖剂检测方面具有广阔的应用前景。

1.2 核酸电化学传感器 核酸电化学传感器是利用核酸适体作为识别的接受器,以电化学电极、热敏电阻、场效应晶体管、压电石英晶体等作为换能器,再加上电子线路三部分组成,是一种可以对待测物质进行定性定量检测的装置。单链核酸物质体系构建的核酸电化学传感器是在适当的温度、pH 值和离子强度条件下将适体固定到电极表面,并把待测目的物加入电极表面,当目的物与适体发生作用时,电极表面结构发生变化,通过检测电极表面电话性识别元素的电信号,达到识别和鉴定靶物质的目的。双链核酸物质体系构建的核酸电化学传感器有不完全双链结构和完全双链结构两种。不完全双链结构是将巯基修饰腺苷单磷酸适体与一条较短的互补链杂交,形成

“半双链”结构,然后固定至金电极表面,待氨苄西林与适体结合后,双链解开,产生明显的电信号变化。完全双链结构将核酸适体的互补链固定在电极表面,然后与标志过电话性物质的核酸适体进行杂交,形成双螺旋结构,待靶物质与适体的高亲和力和结合后,核酸适体从电极脱落,从而产生电信号变化。两条单链核酸物质体系构建的核酸电化学传感器是根据核酸适体与靶物质的结合位点个数或适体数量,将能与靶物质特异性结合的一条核酸适体作为捕获探针与靶物质先结合,再加入另外一条具有不同结合位点的核酸适体加入反应体系,通过检测酶催化反应或金属离子的溶出峰,达到定量分析^[7-8]。

1.3 压电生物传感器 压电生物传感器则是以压电材料为换能器的新型生物传感器,当某些电解质晶体在外力作用下发生形变时,在其表面出现异号极化电荷。这种没有电场的作用,只是由于应变或应力在晶体内产生电极化的现象称为压电效应。近年来,利用石英晶体为转换器的压电传感器发展迅速,已广泛应用于生物恐怖剂检测等领域^[9]。与传统 ELISA 等方法比较,压电生物反应器的特点是反应灵敏、特异性高、简便快速、样品无需标志、方法易于自动化、集成化。

2 PCR 检测技术

2.1 多重 PCR 多重 PCR 检测方法是在反应体系中包含多组 PCR 引物,可以同时完成多个致病菌或同一致病菌中多个靶点的检测,因而可以很好地实现高通量检测这一目标,目前已经成功应用于生物恐怖剂的检测工作中^[10]。此外,多重 PCR 引物也不能造成各扩增之间有干扰,这种干扰会使多种 PCR 的扩增反应体系难以得到优化,特别是在引物对数量较多的反应体系中尤为关键。

2.2 巢式 PCR 巢式 PCR 是一种变异的聚合酶链反应,使用两对(而非一对)PCR 引物扩增完整的片段,第一对 PCR 引物扩增片段和普通 PCR 相似;第二对引物称为巢式引物(因为其在第一次 PCR 扩增片段的内部),结合在第一次 PCR 产物内部,使得第二次 PCR 扩增片段短于第一次扩增。巢式 PCR 的好处在于,如果第一次扩增产生了错误片段,则第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低。巢式 PCR 通过两轮 PCR 反应,使用两套引物扩增特异性的 DNA 片段。第二对引物的功能是特异性的扩增,位于首轮 PCR 产物内的一段 DNA 片段。因此,巢式 PCR 的扩增非常特异,目前根据该技术设计出的生物恐怖剂检测和鉴定方法已有不少报道^[11]。

2.3 反转录 PCR 反转录 PCR(RT-PCR)又称为逆转录 PCR。其原理是:提取组织或细胞中的总 RNA,以其中的 mRNA 作为模板,采用 Oligo(dT)或随机引物利用逆转录酶反转录成 cDNA,再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,而获得目的基因或

* 基金项目:国家质检总局科技计划资助项目(2010IK219)。 △ 通讯作者, E-mail: ciqchuan@126.com。

检测基因表达。RT-PCR 使 RNA 检测的灵敏性提高了几个数量级,使一些极为微量 RNA 样品分析成为可能。该技术主要用于:分析基因的转录产物、获取目的基因、合成 cDNA 探针、构建 RNA 高效转录系统。在实验过程中要防止 RNA 的降解,保持 RNA 的完整性。在总 RNA 的提取过程中,注意避免 mRNA 的断裂。另外,为了防止非特异性扩增,必须设阴性对照。

3 免疫学检测方法

免疫检测方法是抗原与相对应的抗体高度专一性结合的检测,是通过形成抗原-抗体复合物来实现的。免疫学检测方法可分为体液免疫和细胞免疫测定。体液免疫测定主要利用抗原与相应抗体在体外发生特异性结合,并在一些辅助因子参与下出现反应,从而用已知抗原或抗体来测未知抗体或抗原。细胞免疫测定法是根据各种免疫细胞(T 细胞、B 细胞、K 细胞、NK 细胞及巨噬细胞等)表面所具有的独特标志和产生的细胞因子等,测定各种免疫细胞及其亚群的数量和功能,以帮助了解机体的细胞免疫水平。免疫学方法可以用来检测病原或毒素,是用抗体检测病原的特异蛋白,可以做到光谱的生物恐怖剂检测速度快且易于实现自动化。其中应用比较广泛的免疫荧光法(荧光抗体法)是应用荧光素染料(如异硫氰酸荧光黄等)来标志抗体,但不影响其活性,此种抗体称荧光抗体。用已知种类的荧光抗体浸染待检的含有抗原的细胞或组织切片,如有相应抗原存在,则抗原即与此种抗体发生特异性结合,形成复合物而黏着在细胞上,不易洗脱,在荧光显微镜下成为发出荧光的可见物,可达到检测生物恐怖剂的目的^[12]。

4 生物芯片

生物芯片技术具有准确、快速、高通量、平行化检测等优点,已经开始应用于生物恐怖剂的检测领域,但由于其检测成本、稳定性及灵敏度等方面的问题,制约着该项技术普及和最大限度地发挥其在检测领域的优势。生物芯片技术可以平行化检测大量的目的片段,实现对多种目的基因的平行化鉴定。正是生物芯片这一高通量的特点使其适合于多种细菌性生物恐怖剂的同时鉴定。将基因芯片技术与致病菌检测和生物恐怖剂的检测有机地结合在一起,全面地提高检测的水平,增强对多种致病菌检测的能力,实现了同时对大量的致病菌进行检测的目的。目前,国外已经有基因芯片在食源性致病菌检测方面进行报道,建立了一种寡核苷酸芯片的体系用于对多重 PCR 扩增致病菌大肠杆菌的产物进行鉴定,该方法将免疫诱捕技术与 PCR、基因芯片结合在一起可以得到很高的灵敏度,对鸡肉中的致病菌检测的灵敏度低于 100 CFU/mL。生物芯片技术高通量分析的特点与病原微生物检测相结合,是细菌性生物恐怖剂检测和鉴定领域的重大技术突破。但是从目前该技术的普及和应用情况来看,还存在大量问题,所以造成该项技术只能停留在实验室检测和一些辅助鉴定的水平,无法真正发挥生物芯片技术在病原微生物检测中的巨大优势^[13-14]。首先,虽然近些年基因芯片技术平台已经引入了生物恐怖剂检测方面,但由于目前使用的生物芯片扫描仪均是检测荧光染料激发的荧光信号,有自身难以克服的缺点,如光淬灭、信号强度低、光谱重叠、激发光随机闪烁(时有时无)等。另外,有机荧光染料并不是在各种环境中都稳定,从而影响到检测信号的均一性和实验重现性。生物芯片技术的应用特别是在致病菌、生物恐怖剂现场检测和鉴定方面的应用及其相关标准化产品和仪器的研制仍然需要进一步加大研究的力度。

5 展 望

综上所述,由于应对生物恐怖事件的迫切需要,各种有可

能用于生物恐怖剂检测的先进技术都会被尝试用于此领域。目前,对于细菌性生物恐怖剂检测、鉴定手段仍停留在培养、血清和生化等水平,一些分子生物学技术由于没有成熟的产品问世,离能够远程、快速、广谱地准确鉴定生物恐怖剂还有一定的差距,导致这些技术很少应用到实际的检测鉴定工作中,只能作为常规标准检测方法的补充和辅助^[15]。纳米金是一种新型的标志检测技术,应用于基因芯片检测中,为基因芯片技术的研究开辟了一个新领域,成为当前生物芯片领域研究的一个热点^[16-17]。与传统荧光标志法相比,金标银染方法具有成本低、灵敏度高等优点,应用于基因芯片检测,克服了传统荧光标志法需借助激光扫描仪实现数据采集的缺点,结果可通过肉眼观察或普通扫描仪扫描,结果判断方便、直观,具有很好的应用前景,适合于在生物恐怖剂检测、食品安全和传染病监督中现场检测的需求。为进一步提高国境口岸生物恐怖剂检测技术能力,研究高通量、高特异性、准确、快速和低成本的纳米金标银染的可视化生物芯片技术,从而提升中国口岸在反生物恐怖中对细菌性生物恐怖剂的侦检能力。

参考文献

- [1] Tang P, Chiu C. Metagenomics for the discovery of novel human viruses[J]. *Future Microbiol*, 2010, 5(2):177-189.
- [2] Kumar S, Tuteja U. Detection of virulence-associated genes in clinical isolates of bacillus anthracis by multiplex PCR and DNA probes[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(11):1475-1481.
- [3] Kobari T, Iwaki K, Nagashima T, et al. Detection limit used for early warning in public health surveillance[J]. *Anal Sci*, 2009, 25(6):795-800.
- [4] 马静, 史套兴, 田青, 等. 生物恐怖袭击事件特点及其医学应对处置能力建设[J]. *解放军预防医学杂志*, 2008, 15(3):106-107.
- [5] Lee Y, Park S, Park J, et al. Micropatterned assembly of silica nanoparticles for a protein microarray with enhanced detection sensitivity[J]. *Biomed Microdevices*, 2010, 135(1):56-59.
- [6] Woo PC, Lau SK, Choi GK, et al. Resequencing microarray for detection of human adenoviruses in patients with conjunctivitis[J]. *J Clin Virol*, 2010, 47(3):282-285.
- [7] Ritari J, Paulin L, Hultman J, et al. Application of hybridization control probe to increase accuracy on ligation detection or minisequencing diagnostic microarrays[J]. *BMC Res Notes*, 2009, 14(2):249.
- [8] Hatano B, Maki T, Obara T, et al. LAMP using a disposable pocket warmer for anthrax detection, a highly mobile and reliable method for anti-bioterrorism[J]. *Jpn J Infect Dis*, 2010, 63(1):36-40.
- [9] 苏明权, 杨柳, 马越云, 等. 实时荧光定量 PCR 检测金黄色葡萄球菌方法的试验研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(8):794-796.
- [10] Chizhikov V, Rasooly A, Chumakov K, et al. Microarray analysis of microbial virulence factors[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 67(7):3258-3263.
- [11] 王晓东, 李凤焕, 周津, 等. 抗体捕捉荧光定量聚合酶链反应检测血清低水平 HBV-DNA[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(7):687-688.
- [12] van Ijperen C, Kuhnert P, Frey J, et al. Virulence typing of *Escherichia coli* using microarrays[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2009, 16:371-378.
- [13] Mc Grath SC, Schieltz DM, Mc Williams LG, et al. Detection and quantification of ricin in beverages using isotope dilution tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(8):2897-2905.

- [14] Ancona V, Appel DN, de Figueiredo P. *Xylella fastidiosa*: a model for analyzing agricultural biosecurity [J]. *Biosecur Bioterror*, 2010, 8(2): 171-182.
- [15] Jin DZ, Liu GC, Wen SY, et al. DNA microarrays assay for simultaneous detection and identification of multiple common intestinal pathogens [J]. *Molecular & Cellular Probes*, 2008, 89 (20): 337-347.
- [16] 瞿良, 王惠萱, 谭德勇, 等. 金黄色葡萄球菌的基因芯片检测研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(8): 773-775.
- [17] Niotis AE, Mastichiadis C, Petrou PS, et al. Dual-cardiac marker capillary waveguide fluoroimmunosensor based on tyramide signal amplification [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(3): 1187-1196.

(收稿日期: 2011-11-01)

• 综 述 •

北京基因型结核杆菌播散致病的相关性研究

张运玲 综述, 朱朝敏 审核

(重庆医科大学附属儿童医院感染消化科 400014)

关键词: 抗药性; 北京基因型; 结核杆菌
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.023 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2012)01-0053-03

北京基因型结核杆菌是结核杆菌的一个独特遗传谱系, 全球广泛分布, 并在许多地区占优势, 已达全球分离结核杆菌的 13%, 在东亚超过 50%, 并常和结核多耐药耐多药相关。在过去的十年里, 许多研究显示北京基因型结核杆菌对世界结核杆菌的流行和结核多耐药耐多药有重要意义。

1 选择性优势

北京基因型结核杆菌的广泛传播和分布与抗结核的两大措施, 即卡介苗接种和抗结核治疗有一定的相关性^[1]。长期以来, 接种卡介苗被认为可能是北京基因型结核杆菌成功蔓延的一个优势。在雅加达^[2]、印尼的一项研究中显示, 26% 的北京基因型结核杆菌和 23% 其他患者有卡介苗接种疤痕。在越南, 北京基因型结核杆菌患者中, 卡介苗接种者也比其他菌株患者高。虽然在调整年龄后相关性不明显^[3], 但许多研究提示卡介苗接种对北京基因型结核杆菌患者的保护作用更弱, 结核抗体的治疗效果更差, 这在 BALB/c 小鼠结核动物模型中得到证明^[4-5]。也有学者认为, 北京基因型结核杆菌的传播优势源于其对抗结核药的敏感性下降。

最近有调查显示, 埃塞俄比亚菌株显示出更多的基因多态性, 但卡介苗接种在突尼斯更为普遍, 这在一定程度上提示卡介苗接种对结核杆菌的选择性。北京基因型结核杆菌可能也有相似的机制。

2 分子表达的改变

北京基因型结核杆菌的蔓延在疫苗引进和抗菌剂治疗很早之前就已经开始, 提示北京基因型结核杆菌可能有内在生物学优势^[6-7], 赋予其更高的毒力, 更好的抵抗性, 和逃逸人类免疫系统的能力。全球流行的 4 种不同遗传背景的菌株中发现, 北京基因型菌株毒力最强, 且能在一定程度上抑制宿主的免疫反应, 显示分子表达的改变是导致其高毒力和宿主免疫抑制的重要因素^[8]。

体外实验中发现, 北京基因型结核杆菌的一个亚群产生具有生物活性的脂质-酚糖脂 (PGL), 抑制炎症介质的释放, 并与动物的致命性感染相关^[8]。动物模型实验发现, 敲除相关编码基因, 该菌株毒力明显减弱。但该糖脂只能由北京基因型结核杆菌的一种亚型合成, 所以其不是致病的惟一因素。同时, 体外有氧培养中发现北京基因型结核杆菌蓄积了大量的三酰甘油 (TG), 同时上调 Rv3130c (一种 DOSR 休眠调节子)。Rv3130c 的产物即 TG 合成酶, DOSR 的正调节可能使该家族成员比其

他菌株在低氧或无氧环境中更具有选择优势^[9]。

蛋白质组研究中, 与其他临床分离株和 H37Rv 相比, 北京基因型结核杆菌高表达 α -晶体体同源蛋白^[10] (16×10^3 的蛋白; 一种结核分枝杆菌的致病因子), 同时减少了热休克蛋白 Hsp65、磷酸盐转运蛋白 PstS1, 47×10^3 蛋白的表达, 逃逸宿主免疫杀伤^[11]。其中 PstS1 是 38×10^3 的磷酸脂蛋白, 已知的 T、B 细胞刺激分子。韩国一项利用人类单核细胞系 U-937 表达蛋白质的研究中发现, GlpP 蛋白在北京基因型结核杆菌的亚型中较其他菌株有更高的表达^[12], 高表达的 GlpP 蛋白可诱导巨噬细胞活化迁移抑制因子, 这对细菌是有利的。目前这些蛋白质的作用尚未完全明确, 但其可能在结核发病播散中起重要作用。

综上所述, 北京基因型结核杆菌分子表达的改变, 有助于增加毒力, 或逃避宿主防御保护机制的抑制, 利于细菌广泛播散、蔓延。

3 高免疫原性与免疫抑制

不同基因型菌株诱导不同的宿主免疫反应, 北京基因型结核杆菌可诱导不同的免疫反应或者破坏有效宿主免疫反应。北京基因型结核杆菌感染的巨噬细胞表达高水平的诱导型氧化氮合酶 (iNOS)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-12 (IL-12) 和低水平的抗炎因子白细胞介素-10 (IL-10)^[13], 这种细胞因子模式与结核控制相关。北京基因型结核杆菌感染的巨噬细胞虽能高表达 TNF 和 iNOS, 但不足以刺激 Th1 细胞, 阻止细菌的大量增殖, 导致大面积组织损伤和宿主早期死亡。巨噬细胞受到北京基因型结核杆菌脂质碎片的刺激, 可以表达更高水平的 TNF- α 和 IL-10, 但同时下调 TLR2 (Toll 样受体 2)、TLR4 (Toll 样受体 4)、MHc II 类分子表达, 降低了对结核菌的免疫识别和抗原呈递作用^[14-15]。有研究表明, 感染细胞的凋亡有利于宿主消除细菌的生长环境, 北京基因型结核杆菌可调节已感染肺泡巨噬细胞的凋亡, 为细菌的增殖和扩散创造条件。对肺结核鼠模型的研究显示, 北京基因型结核分枝杆菌感染鼠 1~3 d 后, 诱导活化巨噬细胞的凋亡比 H37Rv 诱导的凋亡低一半^[16]。

4 易获得耐药性

北京基因型结核杆菌被怀疑是获得耐药性优势的进化谱系, 将北京基因型结核杆菌在多药耐药菌株中的比例与在药物敏感株中的比例进行比较 (82% 与 72%) 发现^[17], 北京基因型