

• 基础实验研究论著 •

建立用于检测 HIV-1 的基于核酸序列扩增的酶联免疫吸附测定法

尹 锐¹, 薛 健¹, 孙亚娟²

(1. 吉林农业科技学院生物工程学院, 吉林吉林 132101; 2. 吉林大学第二医院, 吉林长春 130041)

摘要:目的 建立用于检测 HIV-1 的基于核酸序列扩增的酶联免疫吸附测定(NASBA-ELISA)法。方法 根据 HIV-1 基因组长末端重复序列设计引物对 HIV-1 RNA 进行基于核酸序列扩增(NASBA), 结合微孔板中液相杂交和酶标显色反应检测核酸扩增物, 并对该检测方法的灵敏度、特异度及其对临床样本的检测结果进行评价。结果 该方法可检测到 0.1 fg/ μ L 的 RNA, 且对 HIV-1 具有特异性。在 120 例临床样本的检测中, 其检测准确度高于常规的实时荧光定量反转录聚合酶链反应(fqRT-PCR)法。结论 NASBA-ELISA 方法能灵敏并特异地检测 HIV-1。

关键词: HIV-1; 核酸扩增技术; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.03.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)03-0263-03

Development of a NASBA-ELISA based method for detection of HIV-1

Yin Rui¹, Xue Jian¹, Sun Yajuan²

(1. College of Biological Engineer, Jilin Agricultural and Technology College, Jilin, Jilin 132101, China;

2. the 2nd Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130041, China)

Abstract: **Objective** To develop a nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) coupled ELISA method for detection of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1). **Methods** The HIV-1 RNA was amplified by NASBA using gene special primers, which were designed according to the long terminal repeat nucleotide sequence of the HIV-1 genome. And the NASBA products were hybridized into the microplates in liquid phase and colorimetric changes were observed. Then the sensibility, specificity and clinical test results of this method were evaluated. **Results** This method could detect as little as 0.1 fg/ μ L RNA, and was highly specific for HIV-1 detection. Results from 120 clinical samples showed its accuracy was higher than traditional real-time RT-PCR. **Conclusion** The NASBA-ELISA method can detect HIV-1 sensitively and specifically.

Key words: HIV-1; nucleic acid amplification techniques; enzyme-linked immunosorbent assay

根据病毒核酸测序将 HIV 分为 HIV-1 和 HIV-2 两型, 其中 HIV-1 是目前全球流行的主要病毒类型, 具有很强变异性, 分子流行病学调查结果显示, 中国已经成为 HIV-1 流行最多的国家之一^[1]。目前国际上建立了一系列用于检测 HIV 的方法, 其中最常用的是抗体检测, 但从人体感染 HIV 到血液出现 HIV 特异性抗体有 1 个 1~3 个月的“窗口期”, 该时期内患者无法确认自己是否感染, 故无法对 HIV-1 实现早期诊断^[2]。对病原体进行核酸检测可以缩短检测的“窗口期”。常用的核酸检测方法主要有实时荧光定量反转录聚合酶链反应(fqRT-PCR)、反转录聚合酶链反应(RT-PCR)等^[3-4]。但 fqRT-PCR 因需要昂贵的荧光定量 PCR 仪而限制了其在发展中国家广泛推广; 而普通 RT-PCR 虽对设备要求较低, 但较容易出现假阳性结果, 不能很好地满足临床需要。随着中国艾滋病感染者的增多, 建立经济的、适合国情的 HIV-1 核酸恒温检测方法非常必要; 核酸序列依赖性扩增(NASBA)是一项成熟的恒温 RNA 扩增技术, 现已广泛应用于肝炎病毒^[5]、狂犬病病毒^[6]、禽流感病毒^[7]等病原体的快速检测。其中检测禽流感病毒的 NASBA 方法已被列为国家诊断标准方法之一。本试验在 NASBA 扩增 HIV-1 RNA 的基础上结合寡核苷酸液相分子杂交和酶标显色反应, 建立了用于检测 HIV-1 的基于核酸序列扩增的酶联免疫吸附测定(NASBA-ELISA)方法。

1 材料与方法

1.1 标本来源 乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、甲型肝炎病毒(HAV)阳性血浆, 长春地区疑似 HIV-

1 感染的 120 例血浆样本及 HIV-1 阳性血浆均由吉林大学第二医院检验科提供。

1.1.1 仪器与试剂 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; AMV 反转录酶、T7 RNA 聚合酶、RNA 酶抑制剂、核糖核酸酶 H 均购自 NEB 公司; 链亲和素板、对硝基苯磷酸二钠(pNPP)购自 Amresc 公司; 碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体购自罗氏公司; NASBA 扩增基础试剂盒购自法国梅里埃生物公司。

1.1.2 引物设计与合成 根据 HIV-1 病毒各亚型基因组 5' 端高度保守序列设计引物及探针^[8]。序列如下, 正向: 5'-TGA TGC AAG GTC GAT ATG AGC TCA ATA AAG CTT GCC TTG A-3', 下划线部分与检测探针互补; 反向: 5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGG GCG CCA CTG CTA GAG A-3', 下划线部分为 T7 启动子序列。捕获探针: 5'-生物素-TCT GGT AAC TAG AGA TCC CTC-3', 为基因特异探针; 检测探针: 5'-DIG-TGA TGC AAG GTC GAT ATG AG-3'。正、反向引物预计扩增片段长度为 120 bp, 引物及探针均由上海生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 NASBA 扩增反应程序 Trizol 法提取样品总 RNA, 取 0.5 μ L RNA 和 10 μ L 反应混合液[含 40 mmol/L、pH 8.5 的 Tris-HCl, 120 mmol/L 的 KCl, 10 mmol/L 的 MgCl₂, 5 mmol/L 的二硫苏糖醇(DTT), 1 mmol/L 的脱氧核苷三磷酸(dNTP), 10 mmol/L 的核苷三磷酸(NTP), 100 g/L 的二甲基亚砷(DMSO), 上、下游引物各 0.2 μ mol/L]加入到 600 μ L 离心管

中,65℃加热 2 min,以去除 RNA 二级结构。41℃冷却 2 min 后迅速加入酶混合液 5 μL(含 40 U Superscript II 反转录酶,80 U T7 RNA 聚合酶,0.2 U 核糖核酸酶 H),反应总体积为 20 μL,轻弹混匀后 40℃反应 90 min,然后于-20℃终止反应。

1.2.2 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测 焦碳酸二乙酯(DEPC)水配制 2%琼脂糖凝胶及 1×TAB,凝胶及电泳仪在 H₂O₂ 中浸泡 15 min,用 DEPC 水冲洗,取恒温核酸扩增物于 5 V/cm 电压电泳 15 min,凝胶成像系统观察。

1.2.3 扩增产物的 ELISA 检测 (1)链霉抗生物素蛋白包被的酶标板的制备:将链霉亲和素用 pH 8.6、0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液稀释为 0.012 5 mg/mL,包被酶标板,每孔 100 μL,室温过夜;用含 1%牛血清白蛋白(BSA),pH9.6、0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液封闭酶标板,每孔 100 μL,37℃孵育 2 h,PBST 洗板 3~5 次,4℃避光保存备用。(2)杂交:每孔加入 43 μL 杂交缓冲液、2 μL 探针混合液和 5 μL NASBA 扩增产物,振荡混匀,41℃孵育 30 min,TBST 洗板 3~5 次。(3)结合酶标抗体:每孔加入 100 μL 碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体(1:5 000 稀释),室温孵育 30 min,TBST 洗板 3~5 次。(4)显色:每孔加入 100 μL pNPP,室温避光显色 10 min,每孔加入 100 μL 碳酸钠终止显色。(5)读值:用酶标仪测定 405 nm 波长的光密度(OD)值。阴性与阳性的临界值为 0.27,当样品 OD 值大于或等于 0.27 时判定为阳性,样品 OD 值小于 0.27 时判定为阴性。

1.2.4 特异性试验 用 Trizol 试剂提取乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒的 RNA,用 NASBA-ELISA 法进行检测,确定检测的特异性。

1.2.5 灵敏度试验 将初始浓度为 1 ng/μL HIV-1 RNA 做 10⁻¹~10⁻⁸ 倍的稀释,NASBA-ELISA 方法分别对其进行检测,以确定检测的灵敏度。

1.2.6 样本的检测 对疑似 HIV-1 感染的 120 例样本用 fqRT-PCR 及 NASBA-ELISA 两种方法进行检测,每次试验均取 1 例阴性血浆作为阴性对照,同时取 35 例健康者血清进行 fqRT-PCR 及 NASBA-ELISA 鉴定。

2 结 果

2.1 NASBA 扩增产物的电泳检测 用建立的 NASBA 方法对 HIV-1 RNA 及从阴性血浆提取的 RNA 进行扩增,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,见图 1。HIV-1 RNA 扩增出大小约为 120 bp 的目的片段,而阴性血浆无特异性的扩增产物,表明该方法能够完成对 HIV-1 RNA 的扩增。

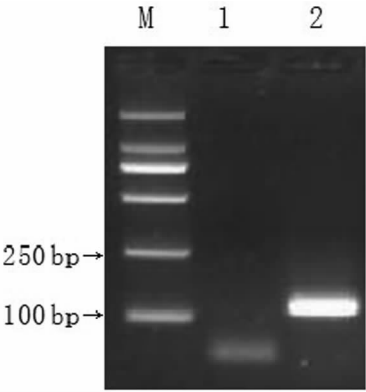
2.2 特异性试验 只有 HIV-1 RNA 检测结果为阳性,而其他病原体样品的检测结果均为阴性,表明该方法对 HIV-1 RNA 的检测具有特异性,见表 1。

表 1 NASBA-ELISA 特异性试验

毒株	OD	结果
HIV-1	0.975	+
HCV	0.207	-
HBV	0.182	-
HAV	0.165	-

2.3 灵敏度试验 对初始浓度为 1 ng/μL 的 HIV-1 RNA 进行 10 倍梯度稀释(稀释后浓度依次为 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ ng/μL)。对稀释的系列浓度样本采用

NASBA-ELISA 方法检测,得到的 OD 值依次为 1.213、1.231、1.004、0.901、0.669、0.564、0.379、0.214。可见,RNA 样本稀释至 10⁻⁷ ng/μL 时仍有阳性扩增产物,灵敏度为 0.1 fg/μL,表明该方法具有较高的灵敏度,见附表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。



M:标准带;1:阴性对照;2:HIV-1 RNA。

图 1 NASBA 扩增 HIV-1 RNA 琼脂糖凝胶电泳

2.4 临床样本检测 NASBA-ELISA 方法检测出 13 例阳性样品,阳性率为 10.8%;fqRT-PCR 方法检测出 14 例阳性样品,阳性率为 11.7%,二者的符合率高。对 fqRT-PCR 检测为阳性而 NASBA-ELISA 检测为阴性的 1 例样品,将其扩增结果送上海生物工程有限公司进行测序,结果在 GenBank 中进行 BLASTN 分析,证实其为假阳性。表明 NASBA-ELISA 方法准确性更高,不易出现假阳性,更适合临床样本的检测。

3 讨 论

NASBA 是在 PCR 基础上发展起来的一项新型扩增技术,1991 年加拿大 Cangene 公司首次对该技术进行了介绍^[9]。其原理是利用 3 种酶(AMV 反转录酶、T7 RNA 聚合酶、核糖核酸酶 H)的混合物及 2 条特别设计的寡核苷酸引物,在 42℃条件下形成一个连续的扩增系统。该技术特别适用于扩增单链 RNA,在最适宜的条件下,扩增倍数将达 10⁹ 之多。在随后的检测过程中,RNA 扩增产物通过捕获探针被特异性地固定在微孔板上,随后加入的检测探针与被固定的扩增产物杂交。底物加入后所产生的比色信号可在 405 nm 波长下进行检测,这一检测读数与 RNA 的扩增产物质量浓度呈正比。扩增过程中的引物和检测过程中的探针的双重作用保证了病原体检测的特异性。

本研究将 NASBA 技术与液相杂交和 ELISA 检测方法相结合,初步建立了 HIV-1 RNA 的检测方法,且检测结果具有较高的灵敏度及特异性,临床样品的检测结果也表明 NASBA-ELISA 与 fqRT-PCR 方法具有较高的可重复性,NASBA-ELISA 的准确性高于 fqRT-PCR 方法,更适合临床样本的检测。另外,在发展中国家,越是处于社会底层生活条件落后的人群其感染 HIV 的概率越高,由于检测条件的限制,只有少数 HIV 感染者被发现,而大多数仍处于隐蔽或不知晓状态。本研究建立的对 HIV-1 RNA 的检测仅需要一个恒温水浴锅和一台常规酶标仪就能够完成对病原体的早期检测,克服了以往核酸检测产品成本高、仪器设备要求高、难以普及等缺点,非常适用于基层单位开展,对 HIV-1 病原体的检测具有实际意义。

参考文献

[1] 王佑春.艾滋病实验室检测技术与质量保证[M].(下转第 266 页)

2.2 AMY、LPS 单独及联合检测用于诊断的比较 AMY、LPS 单独及联合检测用于诊断的情况,见表 2、3。AMY、LPS 联合检测的准确度、特异度以及灵敏度均高于 AMY、LPS 单独检测,差异有统计学意义($P<0.05$);另外,LPS 单独检测比 AMY 单独检测的准确度、特异度、灵敏度高($P<0.05$)。

表 2 不同检测方式的阳性和阴性检出情况(n)

项目	阳性	阴性
临床确诊结果	50	50
AMY 单独检测	63	37
LPS 单独检测	59	41
AMY、LPS 联合检测	53	47

表 3 不同检测方式的检测准确度、特异度、灵敏度(%)

检测项目	准确度	特异度	灵敏度
AMY	87.0	74.0	79.4
LPS	91.0	82.0	84.7
AMY 联合 LPS	97.0	94.0	94.3

3 讨 论

急性胰腺炎如发现和治疗不及时,会进展为 SAP;统计显示,SAP 患者中,约有 1/5 的患者最终死亡^[3]。因此,采取合理的诊断方式及时予以诊断,可通过及时对病情进行控制,降低患者的死亡风险。

AMY 与 LPS 均是临床用于急性胰腺炎诊断的比较常用的指标。其中,AMY 一般在发病后的 3~12 h 即开始持续性升高,并于 1~2 d 内升至高峰,多数患者 AMY 水平于发病 2 d 后会基本恢复至正常,另有极少数患者的 AMY 水平升高后会持续 10 d 以上。因此,一般对上腹部出现剧痛且发病时间在 12 h 内的患者采用 AMY 检测可对是否发生胰腺炎作出初步的判断,但部分重症患者,因胰腺腺泡受到严重破坏,导致 AMY 的生成量明显减少,血 AMY 或尿 AMY 的水平反而与正常值差别不明显,此时仅采用 AMY 对急性胰腺炎进行诊断,存在一定的漏诊率^[4]。

LPS 是胰腺分泌的一种消化酶,仅存在于胰腺中,且在健康者的胰腺中水平很低,一旦发生急性胰腺炎,LPS 的水平会在 4~8 h 后即明显升高,并于 1~2 d 升至高峰,维持时间一般在 7~10 d。与 AMY 相比,LPS 升高时间更早,且维持的时间更长,因此在急性胰腺炎的诊断中效果更理想^[5-7]。本文研究显示,LPS 比 AMY 用于诊断的准确度、特异度、灵敏度更高,差异有统计学意义($P<0.05$),但是胰腺癌、慢性和酒精性胰腺炎以及多种肝胆疾病患者的 LPS 水平一般也较健康者更高。因此,LPS 单独检测用于对急性胰腺炎的诊断也存在一定局限性。

AMY、LPS 联合检测方式可集合这 2 个检测指标的优势,弥补单独检测存在的不足。本研究显示 AMY、LPS 联合检测比 AMY、LPS 单独检测用于急性胰腺炎诊断的准确度、特异度、灵敏度更高,差异有统计学意义($P<0.05$)。除此之外,急性胰腺炎患者 AMY、LPS 水平与病情的严重程度有关,本研究中 SAP 较 MAP 组患者的 AMY、LPS 水平更高。

综上所述,AMY、LPS 联合检测用于急性胰腺炎的诊断具有较高的应用价值,值得积极推广。

参考文献

[1] 顾炳权,刘茂贤,闻勤生,等.急性胰腺炎淀粉酶脂肪酶检测的意义[J].第四军医大学学报,1999,20(7):630-632.

[2] 秦学军.血清淀粉酶和脂肪酶联合测定在急性胰腺炎诊断中的意义[J].中国实用医药,2013,8(7):44-45.

[3] 薛彦菊.急性胰腺炎血清淀粉酶和脂肪酶的动态变化[J].医学检验与临床,2008,19(4):84-85.

[4] 李宗波.血清淀粉酶联合脂肪酶在急性胰腺炎中的诊断价值[J].内蒙古中医药,2012,31(2):98.

[5] 闫红霞.联合检测淀粉酶和脂肪酶对急性胰腺炎患者的诊断价值[J].中国现代医药杂志,2012,14(9):110-111.

[6] 张菁菁,王东霞,赵永新.淀粉酶与脂肪酶联合检测诊断急性胰腺炎效果观察[J].中国乡村医药,2008,15(5):57.

[7] 丰先明,杜戎.联合动态检测血清脂肪酶和淀粉酶在急性胰腺炎诊断中的作用[J].中国民康医学,2012,24(9):1038-1040.

(收稿日期:2013-10-15)

(上接第 264 页)

北京:科学出版社,2009:1-2.

[2] 王陇德.中国艾滋病流行与控制[M].北京:北京出版社,2006:76-80.

[3] Gibellini D, Vitone F, Gori E, et al. Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) viral load by SYBR green real-time RT-PCR technique in HIV-1 seropositive patients[J]. J Virol Methods, 2004, 115(2):183-189.

[4] Van Laethem K, Beuselinck K, Van Dooren S, et al. Diagnosis of human immunodeficiency virus infection by a polymerase chain reaction assay evaluated in patients harbouring strains of diverse geographical origin[J]. J Virol Methods, 1998, 70(2):153-166.

[5] Damen M, Sillekens P, Cuypers HT, et al. Characterization of the quantitative HCV NASBA assay[J]. J Virol Methods, 1999, 82(1):45-54.

[6] Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies[J]. Lancet, 2001, 358(9285):892-893.

[7] Lau LT, Banks J, Aherne R, et al. Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(2):336-342.

[8] de Baar MP, van der Schoot AM, Goudsmit J, et al. Design and evaluation of a human immunodeficiency virus type 1 RNA assay using nucleic acid sequence-based amplification technology able to quantify both group M and O viruses by using the long terminal repeat as target[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(6):1813-1818.

[9] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification[J]. Nature, 1991, 350(6133):91-92.

(收稿日期:2013-10-08)