

免疫 PCR 检测微量 H5 亚型禽流感病毒

邓明俊^{1,2}, 肖西志^{1,2}, 吴振兴², 张彦明^{1*}, 辛学谦², 郑小龙², 王群², 王昌军²

(1. 西北农林科技大学 动物医学院, 杨凌 712100; 2. 山东出入境检验检疫局, 青岛 266002)

摘要: 为了有效检测低浓度禽流感病毒, 笔者通过将高特异性的抗原-抗体反应与高灵敏性的 PCR 扩增技术相结合, 建立了一种快速检测痕量 H5 亚型禽流感病毒的间接免疫 PCR 方法和间接“三明治”抗体夹心免疫 PCR 方法。以 TopYield 96 孔板为固相免疫吸附载体, 以禽流感病毒 H5 蛋白为检测对象, 通过一系列免疫反应及亲和素-生物素桥联作用, 将生物素标记的报告 DNA 分子和生物素标记的禽流感病毒 H5 亚型抗体分子连接。充分洗涤后, 在 TopYield 板孔中添加 PCR 反应液, 对板壁偶联的报告 DNA 进行 PCR 扩增, 间接达到检测微量禽流感病毒 H5 蛋白的目标。通过优化报告 DNA 分子和链亲和素的浓度, 2 种免疫 PCR 技术都可检测到约 1 fg 的禽流感病毒 H5 蛋白, 与常规 ELISA 方法相比, 灵敏性提高了近 1 000 倍。

关键词: 免疫 PCR; 禽流感病毒; H5 血凝素蛋白

中图分类号: S854.43

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)07-1039-07

Immuno-PCR Assay for Detection of H5 Hemagglutinin Subtype Avian Influenza Virus

DENG Ming-jun^{1,2}, XIAO Xi-zhi^{1,2}, WU Zhen-xing²,
ZHANG Yan-ming^{1*}, XIN Xue-qian², ZHENG Xiao-long²,
WANG Qun², WANG Chang-jun²

(1. Northwest Agriculture and Forestry University, College of Veterinary Medicine, Yangling 712100, China; 2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

Abstract: In order to detect the low concentration of avian influenza virus (AIV) in the tracheal and cloacal swabs taken from the HPAI-infected poultry, an indirect immuno-polymerase chain reaction (immuno-PCR) assay and an indirect sandwich immuno-PCR assay, based on Immunology and polymerase chain reaction (IPCR) which combining enzyme immunoassay with DNA amplification, were developed. For the indirect immuno-PCR assay, TopYield microtiter plates were coated with purified AIV/H5 protein that was recognized by anti-AIV/H5 monoclonal antibody. For the indirect sandwich immuno-PCR assay, the monoclonal antibody was immobilized on TopYield plates for detecting H5 protein that was recognized by its polyclonal antibodies. Reporter DNA was prepared by PCR amplification using biotinylated 5'-primers, and it was coupled with biotinylated antibodies through streptavidin. In order to increase sensitivity and reduce background noise, the amounts of reporter DNA and streptavidin were optimized. Using the optimized concentration of reporter DNA and streptavidin, both indirect and indirect sandwich immuno-PCR assays detected AIV/H5 protein as low as 1 fg. These results are a nearly 1 000-fold improvement over conventional indirect ELISA and indirect sandwich ELISA methods. Our data demon-

收稿日期: 2010-12-24

作者简介: 邓明俊(1974-), 男, 新疆奇台县人, 高级兽医师, 博士, 主要从事动物分子病原学与免疫学及动物疫病检测工作, E-mail: sdcjqdmj@126.com, Tel: 0532-80885620

* 通讯作者: 张彦明, E-mail: ylzhangym@sohu.com.

strate that this MAb-based immuno-PCR method provided a platform capable of mass screening of clinical samples for AIV H5 subtype and could serve as a model for other immuno-PCR assays.

Key words: immuno-PCR; avian influenza virus; H5 hemagglutinin protein

RT-PCR 技术是目前常用的禽流感快速诊断方法之一^[1-4]。然而,在禽感染初期,由于棉拭子中的病毒含量不足;或者病料、样品的储存不当、运送时间过长;或者 RT-PCR 等技术环节操作不当、试验环境受污染,这些因素都有可能导导致 RT-PCR 检测结果呈现假阴性或假阳性的现象。

免疫 PCR 是 1992 年 Sano 等建立的一种检测微量蛋白的高灵敏度技术^[5]。该技术把抗原抗体反应的高特异性和聚合酶链反应的高敏感性有机的结合起来,是迄今最敏感的抗原检测方法之一。免疫 PCR 的基本原理是用一段已知的 DNA 分子来标记特定的检测抗体作为探针,然后用此探针与待检抗原结合反应,然后通过 PCR 方法扩增吸附在抗原抗体复合物上的这段标记 DNA 分子,最终通过凝胶电泳或荧光技术等对待检抗原进行定性,结合特异性 PCR 产物的有无,判断待检抗原是否存在。免疫 PCR 技术已在很多相关领域广泛应用,很多学者在对肿瘤标记物或细胞因子^[6-8]、致病微生物^[9-12]、寄生虫感染^[13]以及毒素^[14-15]等医学和生物技术领域的研究取得了很好的效果。本研究以禽流感病毒 H5 血凝素蛋白为检测对象,通过亲和素-生物素的桥联作用,建立了间接免疫 PCR 和间接“三明治”免疫 PCR,初步研究和评价了免疫 PCR 技术对禽流感病毒检测的效果和意义。

1 材料与方 法

1.1 报告 DNA 分子的制备

利用 5'生物素标记的上游引物: F: biotin- 5'-GGGATAACGCAGGAAAGAA-3'和下游引物 R: 5'-CAGGGTTCGGAACAGGAGA-3',以 pUC19 为 DNA 模板,进行 PCR 扩增制备报告 DNA(218 bp)。50 μL PCR 体系:上游引物 F(20 pmol \cdot L⁻¹)、下游引物 R(20 pmol \cdot L⁻¹)、Mg²⁺(2.5 mol \cdot L⁻¹)、dNTP (mixture),0.4 mmol \cdot L⁻¹, Taq 酶(2.5 U),DNA 模板 10 ng。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环。PCR 产物经过纯化后作为免疫 PCR 报告 DNA。本试验用 DNA Fragment Purification kit (TaKaRa)对 PCR 产物进行纯化。

1.2 间接 ELISA 检测禽流感病毒 H5 血凝素蛋白

以溶液 A(0.05 mol \cdot L⁻¹, pH9.6 的碳酸盐缓冲液)对 AIV/H5 血凝素蛋白(重组蛋白,)进行 2 倍系列稀释,使其浓度为 2 000~2 ng \cdot L⁻¹,分别取 50 μL 不同浓度的 H5 血凝素蛋白稀释液于 TopYield 板,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被(16 h 以上)。包被板用溶液 B(洗涤液:含有 1% Tween-20 和 0.1 mmol \cdot L⁻¹ EDTA 的 PBS 液)洗涤 5 次。然后取 200 μL 溶液 C-1(封闭液:含有 1% BSA、0.2% 的甘氨酸的溶液 B)于各板孔内,放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 1 h。洗板,在各孔中加入 50 μL 抗 AIV/H5 蛋白单抗(以溶液 D 将其稀释为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 工作浓度,溶液 D 为含有 0.1% Tween-20 和 0.5% BSA 的 PBS 液),置 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 1 h。洗板,取 50 μL 以溶液 D 稀释的生物素标记的羊抗鼠 IgG 溶液(1:5 000),分别将其加入各板孔内,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 1 h。洗板,在各孔中加 50 μL 用溶液 D 稀释的链亲合素并置 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 1 h。洗板,在各孔中加 50 μL 以溶液 D 稀释偶联有 HRP 的生物素溶液(1:10 000),置 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 1 h。继续以溶液 B 洗板 5 次,然后在在各孔中加 100 μL TMB 底物溶液,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 30 min,然后用 2 mol \cdot L⁻¹ H₂SO₄ 溶液终止反应,并将反应板置酶标仪内,以 450 nm 波长的可见光扫描,记录检测数据(OD 值)。

1.3 间接 Sandwich ELISA 检测禽流感病毒 H5 血凝素蛋白

以溶液 A(0.05 mol \cdot L⁻¹, pH9.6 的碳酸盐缓冲液)对 AIV/H5 血凝素蛋白的单抗进行稀释,使其浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,分别在 TopYield 板各孔中加 50 μL AIV/H5 血凝素蛋白单抗稀释液,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被(16 h)。洗板 5 次,在各板孔内加 200 μL 封闭液,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h。洗板后加 50 μL 以缓冲液 D 进行 2 倍系列稀释的不同浓度的 AIV/H5 蛋白溶液(蛋白浓度范围 2 000~2 ng \cdot L⁻¹),置 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 1 h。洗板 5 次,在各孔中分别加 50 μL 兔抗 AIV/H5 的 IgG(扬州大学提供,以溶液 D 将其稀释为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 工作浓度),并置 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 1 h。洗板 5 次,在各孔中分别加 50 μL 以生物素标记的羊抗兔的 IgG 稀释液(1:5 000,溶液 D 稀释),置 37 $^{\circ}\text{C}$ 感

作 1 h。添加链亲和素之后的程序同 1.2 间接 ELISA 方法相应部分。

为了准确检测 AIV/H5 血凝素蛋白,确保检测的特异性和准确性,在间接 ELISA 和间接 Sandwich ELISA 试验中,对链亲和素的使用浓度进行了优化和确定。以溶液 D 将链亲和素稀释为 0.01、0.1、1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个不同浓度的稀释液,分别取这 3 个不同浓度的链亲和素溶液进行 ELISA 试验。

1.4 间接免疫 PCR 方法检测禽流感病毒 H5 血凝素蛋白

间接免疫 PCR 检测 AIV/H5 蛋白的步骤基本同间接 ELISA 方法。与 ELISA 方法不同之处在于与生物素偶联的 HRP(辣根过氧化物酶)在免疫 PCR 中被生物素标记的报告 DNA 分子取代,免疫 PCR 试验所用的封闭液添加了终浓度为 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲑鱼精 DNA 的溶液。在各孔中加 50 μL 链亲和素溶液 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后,洗涤液洗板 10 次,在各孔中加 50 μL 以溶液 D 稀释的生物素标记的报告 DNA 分子,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。先用洗涤液洗板 15 次,然后用双蒸水洗涤 3 次。在 TopYield 各板孔中分别按照 PCR 扩增体系,添加 PCR 反应液,对板内结合的报告 DNA 进行 PCR 检测。本试验选用 TaKaRa one shot LA PCRTM mix 试剂盒进行 PCR 扩增。50 μL PCR 体系主要包含:上游引物 F(20 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、下游引物 R(20 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 Mg^{2+} (2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、dNTP (Mixture), 0.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Taq 酶(2.5 U)。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环。本试验的 PCR 反应产物(218 bp)通过 2% 琼脂糖凝胶(Gelred 染色)在 90 V 电压条件下电泳 25 min,然后通过凝胶成像系统观察电泳结果。

1.5 间接 Sandwich 免疫 PCR 方法检测禽流感病毒 H5 血凝素蛋白

间接 Sandwich 免疫 PCR 方法检测 AIV/H5 蛋白的步骤基本同间接 Sandwich ELISA 方法。与 Sandwich ELISA 不同的是生物素偶联的 HRP(辣根过氧化物酶)被生物素标记的报告 DNA 分子取代,免疫 PCR 试验所用的封闭液添加了终浓度为 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲑鱼精 DNA 的溶液。在板孔中加 50 μL 用溶液 D 稀释的链亲和素并置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,洗涤液洗板 10 次,在各孔中加 50 μL 以溶液 D 稀释的生物素标记的报告 DNA 分子,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。先用洗涤液洗板 15 次,然后用双蒸水洗涤 5 次后,在 TopYield 各板孔中分别按照 PCR 扩增体系,添加

PCR 反应液,对板内结合的报告 DNA 进行 PCR 检测。PCR 反应体系和条件同 1.4。PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳(Gelred 染色)后观察检测结果。

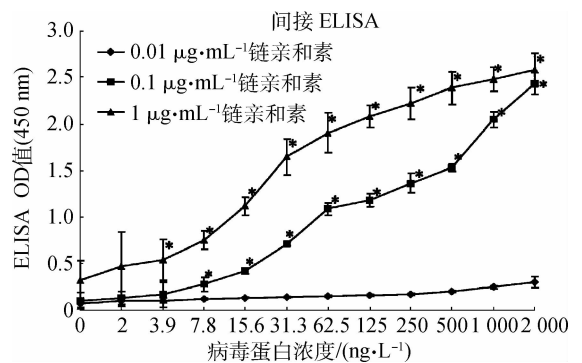
1.6 间接 Sandwich 免疫 PCR 方法检测 H5 亚型禽流感病毒的特异性

为了验证免疫 PCR 方法检测 H5 亚型禽流感病毒的效果以及其特异性,本研究采用优化的间接 Sandwich 免疫 PCR 方法,参照 1.5 步骤分别对灭活的 H5 亚型禽流感病毒(AIV/H5)、H7 亚型禽流感病毒(AIV/H7)、H9 亚型禽流感病毒(AIV/H9)、新城疫病毒(NDV)、鸡传染性法氏囊病毒(IBDV)进行了免疫 PCR 检测。

2 结果

2.1 间接 ELISA 和间接 Sandwich ELISA 检测试验中链亲和素浓度的优化和确定

试验结果显示(图 1、2),当链亲和素浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,ELISA 检测试验出现明显的非特异性反应。当链亲和素浓度为 0.01 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,ELISA 检测不敏感,在检测不同浓度的 H5 蛋白时,检测信号呈现一定程度的饱和现象。而当链亲和素浓度为 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,ELISA 检测试验未出现明显的非特异性反应,而且检测信号与检测病原的剂量的相关性良好。由此可看出,链亲和素的使用浓度对 ELISA 检测有着非常重要的影响。



The streptavidin concentrations for ELISA were 1, 0.1 and 0.01 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and for each streptavidin titration curve, a serial of two-fold dilution of AIV/H5 protein (Ranging from 2 000 to 2 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$) were used. *. $P < 0.05$, $n=3$. The same as Fig. 2

图 1 不同浓度链亲和素进行间接 ELISA 检测禽流感病毒 H5 血凝素蛋白

Fig. 1 The optimization of the streptavidin concentration for indirect ELISA

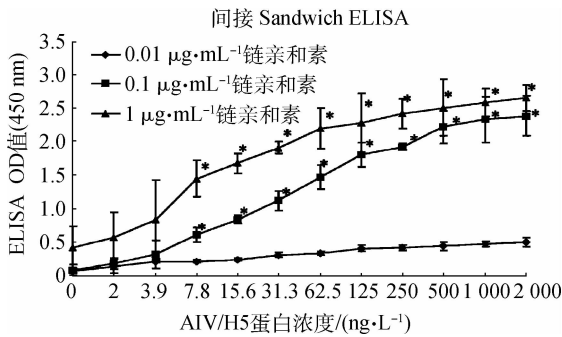


图2 不同浓度链亲和素进行间接 Sandwich ELISA 检测禽流感病毒 H5 血凝素蛋白

Fig. 2 The optimization of the streptavidin concentration for indirect Sandwich ELISA

2.2 免疫 PCR 中最佳报告 DNA 浓度的确定

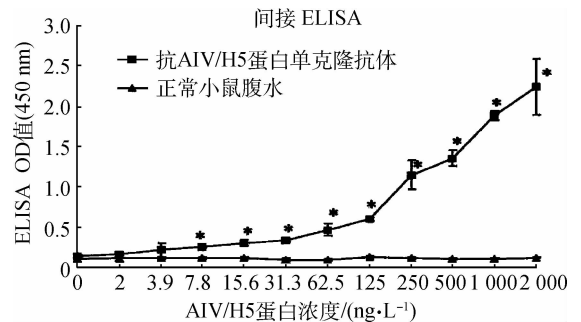
本试验将报告 DNA 进行 10 倍系列稀释,使其浓度分别为 $1\ 000 \sim 0.001\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。免疫 PCR 试验中分别使用不同浓度的报告 DNA,试验过程中除不添加 AIV H5 蛋白和链亲和素外,检测体系的其它检测试剂和步骤完全同 1.4、1.5。试验结果显示,PCR 产物的浓度与报告 DNA 使用浓度呈现剂量的依赖型,当报告 DNA 的浓度小于 $10\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,PCR 条带完全消失。因此,将 $10\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 确定为免疫 PCR 检测试验中报告 DNA 的最佳使用浓度。

2.3 免疫 PCR 中最佳链亲和素浓度的确定

ELISA 试验结果显示,高浓度的链亲和素环境下,ELISA 检测结果出现明显的非特异性反应。为了最大程度上降低非特异性反应,在试验中必须对不同浓度链亲和素下免疫 PCR 的检测效果进行比较和综合评价。本研究以 $2\ 00\ \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AIV H5 蛋白为检测目标(每孔 $10\ \mu\text{g}$),选择最佳浓度的报告 DNA($10\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行免疫 PCR 试验。在间接免疫 PCR 和间接 Sandwich 免疫 PCR 试验中,取浓度分别为 $1\ 000$ 、 100 、 10 和 $1\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链亲和素进行免疫 PCR 试验。试验具体操作步骤同 1.4、1.5。结果显示当链亲和素浓度分别为 $1\ 000$ 、 100 、 10 和 $1\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,含 AIV H5 蛋白的检测孔中都有 PCR 产物扩增,在不含 AIV H5 蛋白的对照孔中,链亲和素浓度分别为 $1\ 000$ 、 $100\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的检测孔出现非特异性的 PCR 扩增,链亲和素浓度小于 $10\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,无非特异性的 PCR 扩增。因此,本试验选择 $10\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为免疫 PCR 体系的最佳链亲和素工作浓度。

2.4 间接 ELISA 及 Sandwich ELISA 检测禽流感病毒 H5 血凝素蛋白的灵敏性试验

间接 ELISA 检测 AIV H5 蛋白的试验中,将不同浓度 AIV/H5 蛋白直接包被 TopYield 板,以抗 AIV/H5 蛋白单克隆抗体作检测抗体(以正常小鼠腹水为对照),进行免疫 PCR 检测。间接 ELISA 检测限的阈值设定:以健康小鼠腹水为对照 OD 值的平均值与 2 个标准差的总和所对应的病原检测量为该试验的检测限。根据计算结果,间接 ELISA 试验对 AIV/H5 蛋白的检测限约为 $780\ \text{fg}$ (图 3)。间接 Sandwich ELISA 检测 AIV H5 蛋白的试验中,以抗 AIV/H5 蛋白单抗作捕获抗体,以免抗 AIV/H5 蛋白的多抗作检测抗体(健康兔血清作对照),进行免疫 PCR 试验。检测限的阈值设定:以正常兔血清 OD 值的平均值与 2 个标准差的总和所对应的病原检测量为该试验的检测限。结果显示(图 4),Sandwich ELISA 试验对 AIV/H5 蛋白的检测限约为 $780\ \text{fg}$ 。



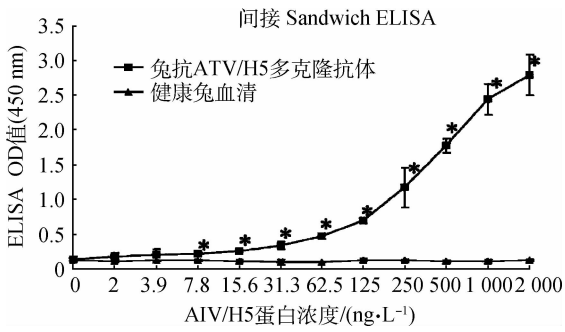
The ELISA was performed by a serial of two-fold dilution of AIV/H5 protein Ranging from $2\ 000$ to $2\ \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ with $100\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ of streptavidin. *. $P < 0.05$, $n=3$. The same as Fig. 4

图3 间接 ELISA 检测 AIV/H5 血凝素蛋白的灵敏性试验

Fig. 3 Sensitivity of indirect ELISA for detecting AIV/H5 protein

2.5 间接免疫 PCR 及间接 Sandwich 免疫 PCR 方法检测禽流感病毒 H5 血凝素蛋白的灵敏性

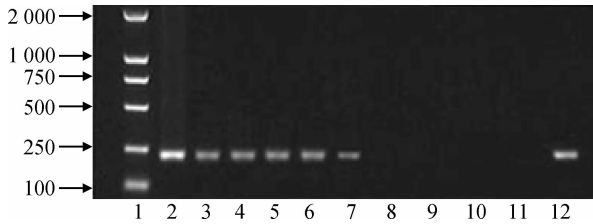
以最适浓度的链亲和素($10\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$),最适浓度的报告 DNA($10\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行的间接免疫 PCR 和间接“三明治”免疫 PCR 进行 AIV/H5 蛋白的检测试验。试验结果显示(图 5、6),2 种免疫 PCR 方法检测 AIV/H5 蛋白的检测限均约为 $1\ \text{fg}$ 。



The ELISA was performed by a serial of two-fold dilution of AIV/H5 protein (Ranging from 2 000 to 2 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$) with $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ of streptavidin. *. $P < 0.05$, $n = 3$. The same as Fig. 4

图 4 间接 Sandwich ELISA 检测 AIV/H5 血凝素蛋白的灵敏度

Fig. 4 Sensitivity of indirect sandwich ELISA for detecting AIV/H5 protein



1~9. 10 倍系列稀释的 H5 蛋白(浓度范围: $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$);10. H5 蛋白空白对照;11. PCR 阴性对照(无报告 DNA);12. PCR 阳性对照(5 μg 报告 DNA); M. DNA marker DL2000;下表同

1-9. AIV/H5 antigen with 10-fold serial dilution (2×10^3 to $2 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$) were used for immuno-PCR assay; 10. Blank control (No AIV/H5 antigen); 11. PCR negative control (No reporter DNA); 12. PCR positive control (5 μg reporter DNA). M. DNA molecular weight markers (DL2000). The same as Fig. 6

图 5 间接 immuno-PCR 检测 AIV/H5 血凝素蛋白蛋白
Fig. 5 Detection limit of AIV/H5 protein using indirect immuno-PCR by analyzing the PCR products through agarose gel electrophoresis

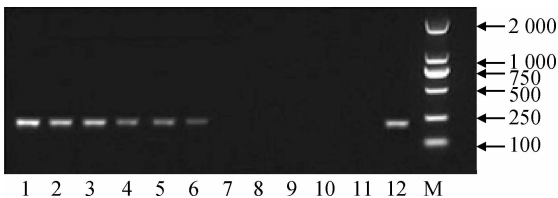


图 6 间接 Sandwich immuno-PCR 检测 AIV/H5 蛋白
Fig. 6 Detection limit of AIV/H5 protein using indirect Sandwich immuno-PCR by analyzing the PCR products through agarose gel electrophoresis

2.6 免疫 PCR 与 ELISA 方法检测禽流感病毒 H5 血凝素蛋白的结果比较

应用传统的 ELISA 方法(间接法和间接 Sandwich 法)对 AIV/H5 蛋白进行检测,其检测限为 780 fg 。应用免疫 PCR 方法(间接法和间接 Sandwich 法)对相同的病原进行检测,该方法的检测限为 1 fg 。通过比较可明显看出,在对相同浓下的 AIV/H5 蛋白的检测中,免疫 PCR 方法比传统的 ELISA 方法的灵敏性高出近 10^3 倍。

2.7 免疫 PCR 检测 H5 血凝素亚型禽流感病毒的特异性

本研究选择最适浓度的链亲和素和报告 DNA 浓度,根据建立的免疫 PCR 方法,分别对灭活 H5 亚型禽流感病毒(AIV/H5)、H7 亚型禽流感病毒(AIV/H7)、H9 亚型禽流感病毒(AIV/H9)、新城疫病毒(NDV)、鸡传染性法氏囊病毒(IBDV)进行检测。结果显示(图 7),本研究建立的免疫 PCR 方法可成功检测出 H5 亚型禽流感病毒,而对照病毒的免疫 PCR 结果均为阴性,免疫 PCR 检测 H5 亚型禽流感病毒的特异性良好。



1~2. 尿囊液对照;3. PCR 阳性对照(5 μg AIV-reporter DNA);4. PCR 阴性对照(无 AIV-reporter DNA);5~6. 鸡传染性法氏囊病毒;7~8. H7 亚型禽流感病毒;9~10. H9 亚型禽流感病毒;11~12. 新城疫病毒;13~14. H5 亚型禽流感病毒;M. DNA marker DL2000

1-2. The allantoic fluid; 3. PCR positive control(5 μg reporter DNA); 4. PCR negative control (No reporter DNA); 5-6. IBDV; 7-8. AIV/H7; 9-10. AIV/H9; 11-12. NDV; 13-14. AIV/H5; M. DNA marker DL2000

图 7 免疫 PCR 检测 H5 血凝素亚型禽流感病毒
Fig. 7 Immuno-PCR for H5 Hemagglutinin subtype AIV

3 讨论

3.1 报告 DNA 的选择

免疫 PCR 中,高纯度且异源性的报告 DNA 也有助于获得良好的试验结果。免疫 PCR 中的报告 DNA 分子应尽可能不选用受检样品中可能存在的 DNA。本试验选用 pUC 19 DNA 作为免疫 PCR 的报告分子是基于该报告分子中含有 amp 抗性基因、lacZ 基因、限制性酶切位点基因等。因为这些基因

与大多生物学物种的基因序列完全不同,因此可大大避免或减少 DNA 交叉污染的问题,从而提高免疫 PCR 检测技术的准确性。

另外,由于报告 DNA 与 AIV 核酸(RNA)都不同源,因此 PCR 检测具有很清晰的检测背景,这也有助于控制假阳性的产生。与常规禽流感病毒 RT-PCR 检测相比,本试验不需要反转录的过程。因此,该技术对快速检测类 RNA 核酸类型的病毒具有很实用的意义。

3.2 外界因素对免疫 PCR 的影响

由于免疫 PCR 检测是基于对抗原的直接或间接捕获在固相载体中,不充分的封闭对检测的灵敏性和特异性有很大影响。与此同时,封闭试剂的选择对非特异性结合的影响非常重要,脱脂奶粉和牛血清白蛋白(BSA)是各研究学者一致认为最好的封闭试剂。本试验通过使用适量的 BSA 结合鲑鱼精 DNA 做封闭剂来饱和检测板中的可吸附位点而大大减小了非特异性结合的可能性。另外,本试验增加洗涤次数,充分保证检测背景的清晰,对提高检测结果的准确性起到良好的效果。ELISA 试验结果显示,在高浓度的链亲和素环境下,ELISA 检测结果出现明显的非特异性反应。在免疫 PCR 检测试验中,为了最大程度上降低非特异性反应,在试验中必须对不同浓度链亲和素下免疫 PCR 的检测效果进行比较和综合评价,选择最佳浓度的链亲和素,进行免疫 PCR 检测试验。

3.3 免疫 PCR 方法在微量禽流感病毒检测中的应用前景

目前,对禽流感病毒的检测大多都针对活禽鼻喉棉拭子或直接对禽类制品进行活毒检测,病毒分离是检测禽流感病毒最传统、最经典的方法。然而,病毒分离周期长,耗时费力,非常不利于农业部及地方兽医机构对禽流感疫情的监控。随着现代分子检测技术的日益成熟,对病料直接进行提取禽流感病毒核酸(RNA),通过体外 RT-PCR 检测技术可快速鉴定禽流感病毒。然而,如果取自禽流感病毒感染禽只鼻喉棉拭子中的病毒含量不足,对样品的储存不当、样品运送时间过长、样品的前处理方法不当,都有可能导导致本来含有病毒的样品 RT-PCR 检测结果呈现阴性现象。如果反转录过程或 PCR 过程质控不严格,也常常会导致本来不含有禽流感病毒的样品 RT-PCR 检测结果呈现假阳性结果。如果禽流感病毒在运送过程中失活,虽然 RT-PCR 初筛

结果阳性,但是病毒分离鉴定也会出现假阴性的现象。

免疫 PCR 检测技术具有高灵敏性的检测特性,而且它可以对活病毒或失活病毒直接进行检测。通过抗体捕获或将微量抗原直接包被在固相载体上,可大大提高禽流感病毒检测的灵敏性和检测结果的准确性。针对禽流感病毒不同亚型病毒蛋白特异性检测抗体的使用又确保了检测结果的特异性。免疫 PCR 检测技术既可检测活毒,又可检测相关病毒蛋白。本研究建立的间接免疫 PCR 和抗体夹心免疫 PCR 技术,可成功检测到 1 fg 的 H5 蛋白,与常规 ELISA 方法比较,灵敏性提高了近 1 000 倍,而且应用该方法对 H5 亚型禽流感病毒检测的特异性良好。因此,该免疫 PCR 检测技术可作为日后大批量样品的禽流感流行病学调查和禽流感疫情的监控以及禽流感疾病诊断的备选方法。同时,该方法的建立也为探索痕量病原微生物的检测奠定了坚实的基础。

参考文献:

- [1] HOFFMANN B, BEER M, REID S M, et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health[J]. *Vet Microbiol*, 2009, 139(1-2):1-23.
- [2] XIANG C Q, SHEN C L, WU Z R, et al. Detection of mutant p53 protein in workers occupationally exposed to benzidine[J]. *Occup Health*, 2007, 49(4): 279-284.
- [3] HOFFMANN B, HARDER T, STARICK E, et al. Rapid and highly sensitive pathotyping of avian influenza A H5N1 virus by using real-time reverse transcription-PCR[J]. *Clin Microbiol*, 2007, 45(2):600-603.
- [4] LU Y Y, YAN J Y, FENG Y, et al. Rapid detection of H5 avian influenza virus by TaqMan-MGB real-time RT-PCR[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2008, 46(1):20-25.
- [5] SANO T, SMITH C L, CANTOR C R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates[J]. *Science*, 1992, 258(5079):120-122.
- [6] SAITO K, KOBAYASHI D, SASAKI M, et al. Detection of human serum tumor necrosis factor-alpha in

- healthy donors, using a highly sensitive immuno-PCR assay[J]. *Clin Chem*, 1999, 45(5):665-669.
- [7] SANNA P P, WEISS F, SAMSON M E, et al. Rapid induction of tumor necrosis factor alpha in the cerebrospinal fluid after intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide revealed by a sensitive capture immuno-PCR assay[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(1):272-275.
- [8] FURUYA D, YAGIHASHI A, YAJIMA T, et al. An immuno-polymerase chain reaction assay for human interleukin-18[J]. *Immunol Methods*, 2000, 238(1-2):173-180.
- [9] MAIA M, TAKAHASHI H, ADLER K, et al. Development of a two-site immuno-PCR assay for hepatitis B surface antigen[J]. *Viol Methods*, 1995, 52(3):273-286.
- [10] MWEENE A S, ITO T, OKAZAKI K, et al. Development of immuno-PCR for diagnosis of bovine herpesvirus 1 infection[J]. *Clin Microbiol*, 1996, 34(3):748-750.
- [11] KAKIZAKI E, YOSHIDA T, KAWAKAMI H, et al. Detection of bacterial antigens using immuno-PCR [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1996, 23(2):101-103.
- [12] LIANG H, CORDOVA S E, KIEFT TL, et al. A highly sensitive immuno-PCR assay for detecting group A *Streptococcus*[J]. *Immunol Methods*, 2003, 279(1-2):101-110.
- [13] CHYE S M, LIN S R, CHEN Y L, et al. Immuno-PCR for detection of antigen to *Angiostrongylus cantonensis* circulating fifth-stage worms[J]. *Clin Chem*, 2004, 50(1):51-57.
- [14] WU H C, HUANG Y L, LAI S C, et al. Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A using immuno-PCR[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 32(5):321-325.
- [15] ZHANG W, BIELASZEWSKA M, PULZ M, et al. New immuno-PCR assay for detection of low concentrations of shiga toxin 2 and its variants[J]. *Clin Microbiol*, 2008, 46(4):1292-1297.
- [16] CHAO H Y, WANG Y C, TANG S S, et al. A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A[J]. *Toxicon*, 2004, 43(1):27-34.

(编辑 白永平)