

参考文献

- (1) 贡树基, 赵卫, 曹虹, 等. 登革 2 型病毒全长基因组的长链 RT-PCR 法扩增[J]. 中国公共卫生 2006 22(4): 429-430.
- (2) 周永兵, 左丽, 刘伟, 等. 不明原因发热病人血清中登革病毒核酸检测[J]. 中国公共卫生 2008 24(5): 623-624.
- (3) Halstead SB. Dengue[J]. Lancet 2007 370: 1644-1652.
- (4) David M, Morens MD. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever [J]. The Pediatric Infectious Disease Journal 2009 28: 635-636.
- (5) 姚锦绣, 赵卫, 张玲, 等. 实时荧光 PCR 技术检测登革病毒的研究[J]. 华西医学 2009 24(4): 912-914.
- (6) Tanaka M. Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction[J]. Journal of Virological Methods 1993 41: 311-322.
- (7) Leparc-Goffart I, Baragatti M, Temmam S, et al. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the

- detection and typing of dengue viruses [J]. Journal of Clinical Virology 2009 45: 61-66.
- (8) Yang L, Zhang H, Guo J, et al. International collaborative study of the endogenous reference gene LAT52 used for qualitative and quantitative analyses of genetically modified tomato [J]. Agricultural and Food Chemistry 2008 56(10): 3438-3443.
- (9) 朱水荣, 张政, 卢亦愚, 等. 嗜肺军团菌荧光定量 PCR 检测[J]. 中国公共卫生 2008 24(9): 1111-1113.
- (10) Ito M, Takasaki T, Yamada K, et al. Development and evaluation of fluorogenic taqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4 [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004 42(12): 5935-5937.

收稿日期: 2010-10-05

(王奕编辑 郭薇校对)

【检验技校】

人及禽类禽流感病毒蛋白芯片检测方法建立

顾大勇¹, 徐云庆¹, 史蕾¹, 赵纯中¹, 刘春晓¹, 杨燕秋¹, 李永进², 林连成³

摘要:目的 建立可同时检测人及禽类禽流感病毒的蛋白芯片方法。方法 采用醛基化玻璃载体蛋白芯片和双位点模式, 将禽流感病毒 H1、H3、H5、H7、H9、N1、N2、NP、NS1 等 9 种亚型抗原以最佳浓度, 点样于玻璃载体表面, 构建相应抗体的检测芯片, 分别用于禽类不同类型禽流感病毒血清及随机选择的人血清检测, 并对特异性、敏感性及重复性进行测试, 与血凝抑制法进行双向验证比较。结果 探针 H1、H3、H5、N1、N2、NP、NS1 亚型抗原的最佳浓度为 1 mg/mL, H7、H9 亚型抗原最佳浓度为 0.5 mg/mL; 检测禽类禽流感病毒及人禽流感病毒使用的酶标抗体浓度分别为 1:1 000 和 1:1 500; 方法具有较好的特异性, 对 H7N7 阳性血清的检测限为 1:40 稀释度; 重复性检测的变异系数均 <2%; 血凝抑制法和蛋白芯片法的检测结果一致。结论 所建立的蛋白芯片法可用于人类和禽类禽流感病毒的检测。

关键词: 蛋白芯片; 禽流感; 病毒; 检测

中图分类号: R 373.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)01-0071-03

Detection of avian influenza virus in birds and human using protein chip GU Da-yong, XU Yun-qing, SHI Lei, et al. Research Institute of Disease Control and Prevention, International Travel Health Care Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (Shenzhen 518033, China)

Abstract: Objective To develop a protein chip-based method for simultaneous detection of avian influenza virus (AIV) from birds and human. **Methods** Protein chip was constructed by immobilizing the positive control (PC), negative control (NC) and different antigen subtypes with the optimal concentration onto the aldehyde glass slide according to the predesigned pattern. Then the prepared protein chip was used to detect the serum samples from the different AIV subtype and human. The parameters for the performance of protein chip such as specificity, sensitivity and repeatability were tested in details. In addition, interactive validation experiment was performed using the protein chip-based method and avian influenza virus (H subtype) hemagglutination inhibition test kit. **Results** To construct protein chip, the optimal probe concentrations of H1, H3, H5, N1, N2, NP, NS1 and H7, H9 subtype were 1 mg/mL and 0.5 mg/mL, respectively. The optimal concentrations of horseradish peroxidase enzyme labeled antibody for AIV from birds and human were 1:1000 and 1:1500 dilution. The specificity of prepared protein chip was confirmed by testing the samples of H5N1, H7N7, H9N2 positive serum and normal serum. The results were consistent with the expected and there was no cross-reactivity observed. The prepared protein chip had a detection limitation of 1:40 dilution for H7N7 positive serum and showed excellent repeatability validated by consecutive test of 10 times for H5, H7, and H9 positive serum with a variation coefficient of <2%. The results of the interactive validation experiments using protein chip-based method were consistent with those of hemagglutination inhibition test. **Conclusion** The prepared protein chip has a good specificity, sensitivity and repeatability and could be used to detect AIV from birds and human simultaneously.

Key words: protein chip; avian influenza; virus; detection

禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 属于正黏病毒科

流感病毒属, 是一种 A 型流感病毒⁽¹⁾。根据血凝素 (H) 和神经氨酸酶 (N), 可将 A 型流感病毒分为不同亚型⁽²⁾, 目前已发现的 16 种血凝素 H 亚型 (H1~H16) 和 9 种神经氨酸酶 N 亚型 (N1~N9) 中, 禽流感病毒 H1、H3、H5、H7、H9、N1、N2 亚型带有致病性, 并有感染禽类和人类的情况发生; 核蛋白 NP 是 A 型流感的标志, 非结构蛋白 NS1 是病毒复制和急性感染

作者单位: 1. 深圳出入境检验检疫局国际旅行卫生保健中心疾病预防控制中心预防控制研究室, 广东深圳 518033; 2. 长江大学生命科学学院; 3. 深圳市赛尔生物技术有限公司

作者简介: 顾大勇 (1972-) 男, 江苏人, 副研究员, 博士, 研究方向: 微生物分子诊断技术及传感器技术。

的表现⁽³⁾。由于其病毒亚型众多,抗原性变异极快,毒株的致病性也相差很大,早期快速检测禽流感病毒成了预防和控制禽流感的前提条件⁽⁴⁾。目前,用于禽流感检测的方法较多⁽⁵⁻¹⁰⁾,但大多需时较长、操作技术复杂、仪器设备昂贵。禽流感抗原变异较大,由 H1-H16、N1-N9 的不同组合可有几十甚至上百种亚型,采用上述方法对如此多的型别进行鉴定既费时又费力。为了对人和禽类禽流感病毒抗体进行多型别同时快速鉴别诊断,直观了解禽流感病毒感染情况,为禽流感的防治创造前提条件,本研究建立了针对人及禽流感病毒 9 种抗原的蛋白芯片检测方法,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清标本与蛋白芯片 禽类禽流感病毒检测用阳性对照血清、正常对照血清、待检血清标本(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所);人类禽流感病毒检测用随机收集的血清标本 30 份(深圳市人民医院检验科);醛基化蛋白芯片玻璃载体(深圳市赛尔生物技术有限公司)。

1.1.2 主要试剂与仪器 鸡感染禽流感病毒 H5N1、H7N7、H9N2 阳性血清标本, A 型流感病毒 H1、H3、H5、H7、H9、N1、N2 亚型(重组抗原, 1 mg/mL; 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所);核蛋白 NP(重组抗原, 1 mg/mL; 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所动物流感研究室);非结构蛋白 NS1(重组抗原, 1 mg/mL; 扬州大学畜牧兽医学院);兔抗鸡 IgG-辣根过氧化物酶(HRP)、葡萄球菌 A 蛋白(SPA)-HRP、兔抗鸡 IgM-HRP、抗人 IgM-HRP(纯化多抗, 1 mg/mL; 美国 Sigma 公司);血清标本稀释液、兔抗鸡 IgG-HRP 酶标稀释液、显色剂(深圳市赛尔生物技术有限公司提供);禽流感病毒 H 亚型血凝抑制试验检测试剂盒(哈尔滨兽医研究所)。Personal Arrayer 16 型生物芯片点样仪(北京博奥生物公司), COE-DEK 芯片阅读仪(中科院光电所和深圳市赛尔生物技术有限公司联合研发)。

1.2 方法

1.2.1 醛基化蛋白芯片玻璃载体及预处理 醛基化蛋白芯片玻璃载体其表面修饰有活性的醛基,抗原分子可通过其氨基与玻璃载体表面的醛基形成亚胺(schiff)碱。醛基化蛋白芯片玻璃载体经蒸馏水清洗后风干备用。

1.2.2 禽流感病毒抗原固定浓度筛选 采用双位点设计,禽流感病毒各抗原设计点样浓度为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625 mg/mL。按设计浓度,采用 pH 9.6、浓度 0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液对抗原进行稀释。将稀释好的抗原固定于预处理过玻璃载体的不同位点,另根据实际情况设计 PC 位点(兼地标和质控作用)。采用血清标本稀释液,分别将已知阳性对照血清和正常对照血清按 1:5 稀释, 300 μL/孔, 37℃温育 30 min;加入 1:1 000 稀释的兔抗鸡 IgG-HRP, 100 μL/孔, 37℃温育 30 min;加入显色剂, 100 μL/孔, 37℃显色 12 min, 观察结果。结果判定: PC 位点及阳性结果位点显蓝色。若双位点中只有 1 个位点显色,另 1 位点未显色,则需要重复实验。正常血清(阴性对照)不显色,仅为芯片基质双位点的背景色。双位点同时显色即为阳性标本,根据显色深浅可粗略判定阳性强弱,显色深度一般不超过质控点。采用芯片阅读仪进行灰度扫描,灰度临界值 1.0;灰度值 ≥ 1.0 为阴性, < 1.0 为阳性(灰度值与双位点显色与否成反比)。根据结果,筛选各抗原最佳固定浓度。

1.2.3 SPA-HRP 浓度筛选 按上述各抗原最佳固定浓度稀释抗原,按双位点模式固定于预处理过的玻璃载体的不同位点,建立禽流感蛋白芯片双位点检测模式;用酶标稀释液将 SPA-HRP 稀释为 1:1 000、1:2 000、1:4 000。分别将随机选择的人血清标本 2 份(1 号 2 号)按照 1:20 进行稀释, 300 μL/孔, 37℃温育 30 min;加入不同浓度的 SPA-HRP, 100 μL/孔, 37℃温育 30 min;加入显色剂, 100 μL/孔, 37℃显色 12 min, 观察结果,结果判定同 1.2.2。根据结果微量调整 SPA-HRP 稀释浓度,测定过程同前,筛选最佳浓度。

1.2.4 蛋白芯片方法验证 按双位点模式,将各抗原固定于预处理过的玻璃载体的不同位点。(1)特异性测试:加入已知的鸡感染禽流感病毒 H5N1、H7N7、H9N2 阳性血清标本和正常血清标本进行检测,观察结果。H5、H7、H9、N1、N2、N7 位点及阳性质控位点出现蓝色,其他位点不显色则表明具有良好的特异性;(2)灵敏度测试:将 H7N7 阳性血清标本按照 1:5、1:10、1:20、1:40、1:50、1:80 进行梯度稀释后加入各位点,观察结果。能观测到显色的最低浓度即为检测灵敏度;(3)重复性测试:取 H5、H7、H9 亚型阳性血清标本,连续检测 10 次,观察结果。芯片检测步骤按 1.2.2。

1.2.5 双向对照验证 分别采用禽流感病毒 H 亚型血凝抑制试验试剂盒法和蛋白芯片法,对 H1、H3、H5、H7、H9 亚型阳性对照血清、H5N1、H7N7、H9N2 阳性对照血清、正常对照血清、随机选择的 30 份鸡血清和 30 份人血清同时进行检测,比较 2 种方法检测结果。蛋白芯片检测方法同 1.2.2;血凝抑制试验按产品说明书操作,血凝抑制滴度 ≤ 3 log₂ 判定为阴性; = 4 log₂ 为可疑,需重复进行试验; ≥ 5 log₂ 为阳性。

1.2.6 禽流感病毒 IgM 抗体检测 为进一步验证本方法检测 IgM 抗体的可行性,应用已点样的 9 种抗原蛋白芯片,使用酶标稀释液将兔抗鸡 IgM-HRP 稀释为 1:500、1:1 000、1:2 000,对随机选择的 5 份鸡血清标本及 30 份人血清标本检测;兔抗鸡 IgM-HRP 按 1:500 稀释,对 H1、H3、H5、H7、H9 亚型阳性血清标本、H5N1、H7N7、H9N2 阳性血清标本、正常鸡血清和另外随机选择的 25 份鸡血清标本进行检测。

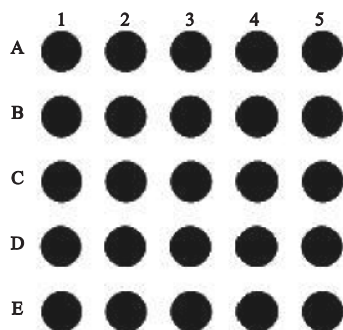
2 结果

2.1 抗原最佳固定浓度 筛选结果显示,当 HRP 标记的兔抗鸡 IgG 浓度一定时, H1、H3、H5、N1、N2、NP、NS1 等 7 种亚型以 1 mg/mL 的浓度点样,反应结果最好,已知阳性对照血清检测为阳性,正常对照血清检测为阴性; H7、H9 亚型为 1 mg/mL 浓度时,阳性对照血清检测为阳性,正常(阴性)对照血清则显示为阳性。0.5 mg/mL 浓度时,正常对照血清检测为阴性,提示 H7、H9 亚型以 0.5 mg/mL 浓度点样时反应模式最好。芯片阅读仪扫描结果可见,阳性对照血清灰度值为 0.90~0.98,正常对照血清灰度值除 H7、H9 亚型以 1 mg/mL 浓度点样时分别为 0.97 和 0.98 外,其他均 > 1.0 (1.02~1.10;包括 H7、H9 亚型 0.5 mg/mL 浓度点样位点),与定性显色结果一致。因此,分别选择 1 mg/mL 和 0.5 mg/mL 作为 9 种抗原的最佳固定浓度。

2.2 蛋白芯片双位点模式(图 1、2) 按图 1 建立了禽流感病毒各亚型抗原双位点模式,采用这一模式制备的芯片,对禽流感病毒 H5、H7、H9 亚型阳性血清和正常血清进行检测,检测结果与实际相符(图 2)。

2.3 HRP 浓度选择 筛选结果显示,当各抗原点样浓度一定时,SPA-HRP 1:1 000 时,随机选择的 1 号标本显示 H9 弱

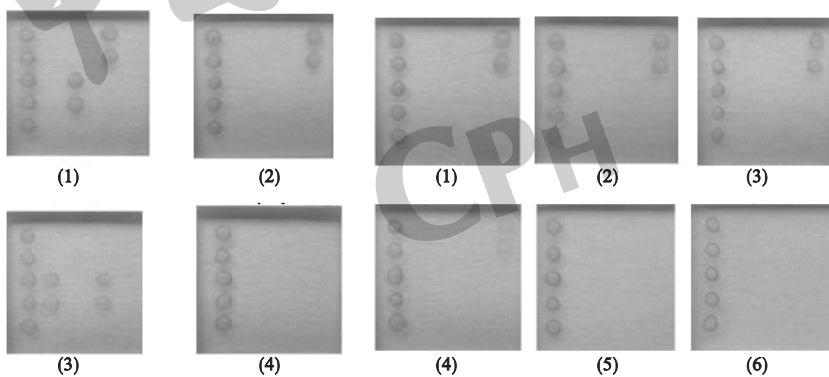
阳性;2 号标本为阴性。SPA-HRP 1:2 000、1:4 000 时 2 份血清标本全部为阴性。微调 SPA-HRP 浓度为 1:1 500、1:1 700, 1 号标本在 1:1 500 时为阴性;2 号标本在 2 种浓度下均为阴性,因此选择 SPA-HRP1:1 500 作为本方法最适浓度。



注: A1~E1: PC 位点; A2、B2: H1 抗原位点; A3、B3: H3 抗原位点; A4、B4: H5 抗原位点; A5、B5: H7 抗原位点; C2、D2: H9 抗原位点; C3、D3: N1 抗原位点; C4、D4: N2 抗原位点; C5、D5: NS1 抗原位点; E2、E3: NP 抗原位点; E4、E5: NC 位点。

图 1 蛋白芯片探针固定模式

2.4 蛋白芯片法验证(图 3) 本方法不存在交叉反应,检测结果具有较高特异性(图 1A);检测 H7 亚型阳性血清、H7N7



注: (1) H5N1; (2) H7N7; (3) H9N2; (4) 正常血清; (1)~(6) H7N7 稀释度 1:5、1:10、1:20、1:40、1:50、1:80。

图 3 蛋白芯片法特异性与灵敏度验证

2.5 双向对照验证 结果显示,血凝抑制试验和蛋白芯片法对 H1、H3、H5、H7、H9 亚型阳性血清、H5N1、H7N7、H9N2 阳性血清及正常血清的检测结果一致,对 30 份随机选择的鸡血清检出率一致,均检出 2 例阳性。对 30 份随机选择的人血清检测均为阴性。

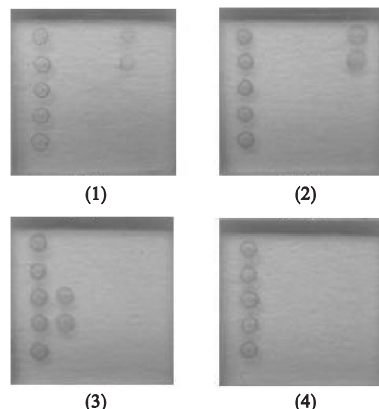
2.6 禽流感病毒 IgM 抗体检测 在试验给出的 IgM 抗体不同稀释度下,实验结果全部为阴性,蛋白芯片上除 PC 显色外,其他位点均未显色,即标本中未发现有禽流感病毒 IgM 抗体。

3 讨论

本研究将 H1、H3、H5、H7、H9、N1、N2、NP、NS1 亚型抗原及阳性质控和阴性质控固定在芯片表面构建了针对不同禽流感病毒的检测芯片,该芯片具有良好的检测特异性、灵敏度及重复性,与血凝抑制法相比,蛋白芯片检测试剂包含更多的禽流感病毒亚型,更具有针对性,可以用于禽类不同亚型及人禽流感病毒的同时检测,对禽流感病毒的诊断及流行状况的调查提供更为精准的数据。

参考文献

(1) 甘孟侯. 禽流感[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2002: 138-156.
 (2) Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a



注: (1) H5 亚型(A4、B4); (2) H7 亚型(A5、B5); (3) H9 亚型(C2、D2); (4) 正常血清。

图 2 H5、H7、H9 亚型阳性血清和正常血清标本的检测

阳性标本的最低检测限为 1:40; 芯片阅读仪灰度扫描结果显示, H5 阳性血清 10 次重复检测灰度值为 0.896~0.948, 变异系数 1.61%; H7 型血清 10 次检测值为 0.881~0.925, 变异系数 1.60%; H9 阳性血清 10 次检测值为 0.919~0.951, 变异系数 1.71%。变异系数均 <2%, 表明本方法重复性较好。

novel influenza A virus hemagglutinin subtype(H16) obtained from black-headed gulls[J]. Journal of Virology, 2005, 79(5) : 2814-2822.
 (3) Krug RM, Yuan W, Noah DL, et al. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein[J]. Virology, 2003, 309(2) : 181-189.
 (4) 朱启镛. 人类高致病性禽流感病毒感染的研究进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2009, 24(2) : 81-83.
 (5) Amano Y, Cheng Q. Detection of influenza virus: traditional approaches and development of biosensors[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 381(1) : 156-164.
 (6) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12) : e63.
 (7) 敖艳华, 邱筱妍, 任涛, 等. H5 和 H7 亚型禽流感多重 RT-PCR 快速鉴别诊断方法的建立[J]. 养禽与禽病防治, 2007, 5(5) : 6-8.
 (8) 肖运才, 李自力, 胡思顺, 等. 禽流感病毒 ELISA 检测方法的建立及诊断试剂盒的研制与应用[C]. 中国畜牧兽医学会 2004 学术年会暨第五届全国畜牧兽医青年科技工作者学术研讨会论文集(下册), 2004.
 (9) 张锦海, 王忠灿, 王长军. 禽流感快速检测技术研究进展[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(7) : 865-867.
 (10) 赵慧颖, 赵立红, 乔健, 等. 禽流感病毒检测免疫组织化学染色改良方法的建立[J]. 实验动物科学, 2008, 25(002) : 48-51.