

# 实时荧光重组酶介导核酸扩增 在疟原虫快速检测中的应用研究

郑伟<sup>1</sup>, 麻慧君<sup>2</sup>, 鲁婕<sup>3</sup>, 郭利川<sup>4</sup>, 应清界<sup>4</sup>

1. 浙江国际旅行卫生保健中心 浙江 杭州 310016; 2. 丽水出入境检验检疫局 浙江 丽水 323000;  
3. 萧山出入境检验检疫局 浙江 杭州 311208; 4. 江苏奇天基因生物科技有限公司 江苏 无锡 214135

关键词: 重组酶介导扩增; 疟原虫; 分子检测; 疟疾

中图分类号: R531.3 文献标识码: C 文章编号: 1004-8685(2017)02-0295-03

疟疾是严重危害人类健康的全球性虫媒传染病之一,遍及全球 90 多个国家和地区,主要分布在热带和亚热带,世界上超过一半的人口生活在疟疾流行区<sup>[1]</sup>。据统计,疟疾每年感染数千万人,仅在非洲,每年有 50 万 5 岁以下儿童死于疟疾,已成为全球最重要的公共卫生问题之一<sup>[2]</sup>。疟疾的早期诊断和治疗是其防治的关键<sup>[3]</sup>。

目前,诊断疟疾的优选并且最可靠的方法是厚、薄血膜镜检法。但该方法对镜检者技术要求较高,镜检阳性率非常主观化,疟原虫密度较低时易引起假阴性的出现<sup>[4]</sup>。利用免疫色谱技术开发的多种检测方法,快速、简便,适用于一线筛查<sup>[5-6]</sup>。但在特异性及灵敏度上的缺陷却一直限制其应用发展。随着分子生物学的发展,PCR 技术以其高度的特异性及敏感性在疟原虫检测方面取得了重大的突破,特别是实时定量 PCR、多重 PCR 和巢式 PCR<sup>[7-12]</sup>。但这些方法必须在实验室内完成,对仪器的要求较高并需要专业的技术人员操作,且耗时较长。等温核酸扩增技术不需要热循环仪器,非常适合疟疾的快速检测需求,如环介导等温扩增法(LAMP)<sup>[13-15]</sup>,但是 LAMP 产物经琼脂糖凝胶电泳检测呈梯度条带,不易与非特异性扩增区分,且需要多对引物。

本研究中采用一种新型的等温核酸扩增技术——重组酶介导扩增技术(RAA)检测疟原虫。在 RAA 反应过程中,采用重组酶代替 PCR 的高温变性,完成对双链的解链,解开的双链被单链结合蛋白结合,防止 DNA 链复性,再由聚合酶完成链的延伸,实现扩增<sup>[16-17]</sup>。反应在 39 °C 下进行,由于不需要热循环解链,反应时间短(<20 min),操作简单,非常适合

疟原虫的快速检测。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 疟疾阳性样本来源于被确诊为疟疾感染的非洲归国劳务人员全血样本,由浙江国际旅行卫生保健中心提供。抗凝血分装后置 -70 °C 冰冻保存。采集血样和临床资料调查已获得血样供体本人知情同意。阴性对照采用本单位职工健康查体采集的抗凝血样。

**1.2 仪器与试剂** ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国); KinFisher Flex 全自动核酸提取仪(美国 Thermo); QT-RAA-F6100 RAA 荧光检测仪(江苏奇天基因生物科技有限公司); 干浴器(杭州博日); 凝胶成像系统(德国 IMPLEN)。DNA 提取试剂盒(批号: 1507056); 疟原虫核酸测定试剂盒; RAA 基础扩增试剂盒(批号: 150301); 引物和探针由上海生工生物工程有限公司合成。

## 1.3 方法

**1.3.1 疟原虫阳性样本确认** 样本均涂片镜检,按照国家标准 WS 259-2006 标准流程进行疟原虫显微镜检。制备厚、薄血膜,吉氏染色,在 1 000 倍数下观察至少 500 个油镜视野,观察厚、薄血膜中的虫体形态判断感染与否。显微镜检后样本经荧光定量 PCR 检测复核。

**1.3.2 疟原虫 DNA 提取** 取 100 μl 全血样本,采用 MagMAX 磁珠净化技术,按 ambion 1840 DNA 提取试剂盒说明书提取样本 DNA,将提取好的核酸进行分装,冻存于 -70 °C,备用。

**1.3.3 引物和探针设计** 在 NCBI 数据库中找出多条疟原虫 18S rDNA 基因组序列,进行比对和设计。

**1.3.4 实时荧光重组酶介导核酸扩增(real-time RAA)反应** 反应在 50 μl 体系中进行,按照 RAA 荧光反应试剂盒使用说明进行操作。反应体系包括反应缓冲液、420 nmol/L 正向引物、420 nmol/L 反向引

基金项目: “国家质量基础的共性技术研究与应用”重点专项(2016YFF0203200); 国家质检总局科技计划项目(2014IK062)

作者简介: 郑伟(1977-),男,博士,副主任医师,主要从事蚊媒传染病检测工作。

物、120 nmol/L 探针、1 μl DNA 模板,将上述混合均匀,加入到 RAA 荧光反应单元干粉管中,使干粉重悬均匀,瞬时离心。再向每个反应管中加入 2.5 μl 280 mmol/L 醋酸镁溶液,混合均匀,瞬时离心。将上述反应溶液放入到 RAA 荧光检测仪中,39 °C 反应 20 min。阴性对照为健康人血 DNA 模板,其余成分与阳性样本相同。使用 RAA 基因检测分析系统(V 1.0 版)进行操作。

**1.3.5 灵敏度实验** 合成目的 DNA 序列,构建含有目的检测片段的质粒 DNA,提取质粒 DNA,并计算其拷贝数,分别稀释到 10<sup>7</sup> copy/μl、10<sup>6</sup> copy/μl、10<sup>5</sup> copy/μl、10<sup>4</sup> copy/μl、10<sup>3</sup> copy/μl、10<sup>2</sup> copy/μl,测试检测的灵敏度。

**1.3.6 特异性验证** 将 RAA 的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,对电泳的 DNA 进行割胶回收,送上海生工生物工程有限公司测序,产物序列与 GenBank 参考序列标准进行 Blast 同源性比对分析,验证目的扩增片段与预期结果的一致性。

**1.3.7 实际样本检测** 6 例疟疾阳性样本为被确诊为疟疾感染的归国非洲劳务人员的全血标本,由浙江国际旅行卫生保健中心提供。

**2 结果**

**2.1 引物设计和筛选** 经过 NCBI 数据库中多条疟原虫 18S rDNA 基因组序列比对,共设计引物 4 条正向引物(RAA - Fa、RAA - Fb、RAA - Fc、RAA - Fd)、3 条反向引物(RAA - Ra、RAA - Rb、RAA - Rc)和 1 条探针(RAA - P),可组合成 12 个引物组合。以疟原虫 DNA 为模板,分别对这些引物组合进行测试,选取扩增信号强、扩增时间短的引物组合(RAA - Fd/RAA - Rc),作为最终选定的引物,进行之后的实验(表 1)。

表 1 引物和探针信息

引物/探针	序列(5'-3')
RAA - Fa	CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGAGCTG
RAA - Fb	CGATCAGATACCGTCGTAATCTTAACCAT
RAA - Fc	TATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGG
RAA - Fd	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTCACT
RAA - Ra	CCGCTAATTAGCAGGTTAAGATCTCGTTCC
RAA - Rb	TTATCGGAATTAACCAGAGAAATCATATTCACG
RAA - Rc	CTAATTAGCAGGTTAAGATCTCGTTCTTATCCG
RAA - P	TTGACAGATTRAKAGCTCTTTCTTGATTCTCT( FAM - dT) G( THF) A( BHQ - dT) GGTGATGCATGGC( phosphate)

**2.2 灵敏度实验** 为了更好地检测该 real - time RAA 方法的灵敏性,合成了目的基因片段,并亚克隆到质粒中,进行拷贝数的计算。如图 1 所示,不同的质粒 DNA 拷贝数所扩增的结果也不一样,从结果可

以看到,所有的扩增在 20 min 之内完成;随着拷贝数的降低,起峰的时间延迟,起峰的强度也逐渐减少。最低可对 100 个拷贝的质粒 DNA 分子进行扩增。

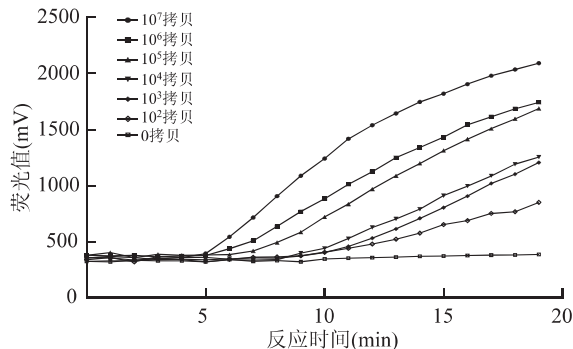


图 1 real - time RAA 法对不同拷贝数质粒 DNA 的扩增结果

**2.3 特异性验证** Blast 同源性比对分析结果显示,所扩增的目的片段的序列与 GenBank 中疟原虫的 18S rDNA 基因序列相应部分同源性为 100%,表明 RAA 扩增产物序列与预期目的片段序列一致,说明该方法具有很好的特异性。

**2.4 实际样本扩增** 对 6 例确诊为疟疾感染的归国非洲劳务人员的全血标本进行 DNA 提取,检测 real - time RAA 方法对实际样本的检测情况。结果显示,对其中 5 例全血标本的 DNA 扩增信号显著,1 例全血标本的 DNA 扩增信号偏弱,但相比阴性对照,仍然有较高的扩增信号,可以断定为阳性扩增(图 2)。

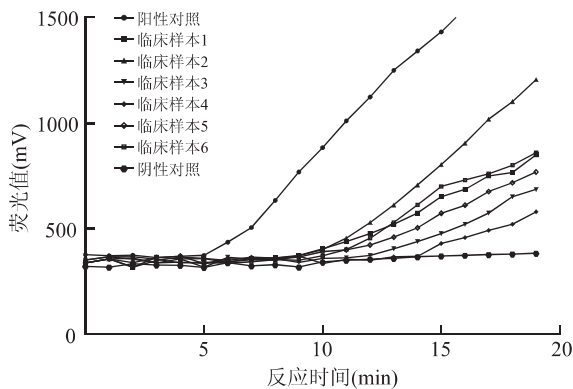


图 2 实际样本扩增曲线

**3 讨论**

随着国际交往的日益频繁,我国云贵、海南等地区也存在着疟疾的流行,每年均有死亡病例报告。因此,准确、及时诊断当前亟待解决的问题,是安全有效地治疗疟疾的基础。目前的检测方法大多仅适合在实验室进行。

本研究新建立一种新型等温核酸扩增方法即重组酶介导的等温核酸扩增法检测疟疾,可在等温条件下(39 °C) 20 min 内扩增出目的基因片段,可对 100 个拷贝的目的基因进行扩增,并且具有较好的特异性 (下转第 304 页)

[20] 陈双红,王发锁,田力,等. 胶体金免疫层析法检测结核杆菌抗体的研究[J]. 海军医学杂志,2005,26(2): 104-105.

[21] 李玥明,郭明日,张立. DNA 与结核抗体联合检测对结核性胸膜炎的诊断意义[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(12): 1612-1613.

[22] 闫国蕊,王勇鸣,杨萍,等. 结核抗体联合检测对结核病诊断价值分析[J]. 中国防痨杂志,2013,35(4): 286-287.

[23] 曾年华,王志斌,彭桂福,等. 新型重氮胶乳凝集试验快速检测抗结核杆菌抗体的研究[J]. 中国人兽共患病杂志,2001,17(3): 65-67.

[24] 张翎,卢建平. 四种结核分枝杆菌检测方法的临床应用评价[J]. 中国防痨杂志,2006,28(1): 16-17.

[25] 弓显凤,孙惠平,任郭侠. PCR 技术在结核病诊断中的价值[J]. 临床肺科杂志,2008,13(9): 1155-1156.

[26] El-Hajj HH, Marras SA, Tyagi S, et al. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with molecular beacons[J]. J Clin Microbiol, 2011, 39(11): 4131-4137.

[27] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance[J]. N Engl J Med, 2010, 363(11): 1005-1015.

[28] Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study[J]. Lancet, 2011, 377(9776): 1495-1505.

[29] Kwak N, Choi SM, Lee J, et al. Diagnostic accuracy and turnaround time of the Xpert MTB/RIF assay in routine clinical practice[J]. PLoS ONE, 2013, 8(10): e77456.

[30] 邓振利,杨洪毅,欧喜超,等. 环介导等温扩增法诊断初诊肺结核病研究[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22(7): 1608-1610.

[31] 刘朝军,沈定霞. 16S rDNA 序列测定在细菌鉴定中的应用[J]. 军医进修学院学报,2011,32(7): 774-776.

[32] 李玉静,孙志平,张彦坤,等.  $\gamma$ -干扰素释放试验(T-SPOT.TB)及结核蛋白芯片检测对结核病诊断价值的对比分析[J]. 医学动物防制,2016,32(10): 1063-1066.

[33] 李丹,杜德兵,陈玉龙,等. T 细胞斑点试验、结核蛋白芯片、抗酸染色涂片和结核菌素试验对肺结核病诊断价值的比较[J]. 中国现代医学杂志,2015,25(11): 38-42.

[34] 何莉,任薇,梁雪妮,等. DNA 芯片检测分支杆菌的临床应用价值[J]. 中华临床医师杂志,2013,7(23): 178-180.

[35] 张俊仙,吴雪琼,张琼,等. 用 DNA 芯片检测结核分枝杆菌耐乙胺丁醇基因突变的研究[J]. 中国抗生素杂志,2006,31(4): 225-228.

[36] Pang Y, Xia H, Zhang Z, et al. Multicenter evaluation of genechip for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(6): 1707-1713.

收稿日期:2016-09-30

(上接第 296 页)

性。在对实际样本检测时,对有些样本的扩增信号偏弱,这可能主要有两方面原因,一方面是由于在 DNA 提取过程中,DNA 浓度偏低,可通过优化核酸提取方法进行提高;另一方面是由于所使用引物的灵敏度不是特别强,可进一步筛选出更好的引物。

与 PCR 法相比,RAA 法是在等温下反应,大大缩短了反应时间,操作简单,摆脱了复杂仪器的束缚。在检测过程中可以实时监测扩增结果,而且检测设备体积较小,可随身携带,使用锂电池即可进行操作,非常适合现场操作。如果结合核酸的快速提取,在 10 min 之内将核酸提取出来,20 min 进行扩增,从抽血到出检测结果,整个检测过程在 1 h 之内即可完成,非常适合在基层进一步推广应用,具有巨大的应用前景。

参考文献

[1] 李欢,孙菲,文岚,等. 多重 PCR 快速检测恶性疟和间日疟的研究[J]. 中国人兽共患病学报,2014,30(3): 288-291.

[2] 王真瑜,江莉,蔡黎,等. 环介导等温扩增技术检测间日疟原虫方法的建立及应用分析[J]. 热带医学杂志,2012,12(2): 157-161.

[3] 汪圣强,周华云,李宗,等. SYBR Green I 染料法定量 PCR 用于人体疟原虫定量检测及虫种鉴别的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2012,23(6): 677-681.

[4] Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level[J]. Bull World Health Organ, 1988, 66(5): 621-626.

[5] 蒙锋,王善青,徐华章. 双重免疫色谱技术检测恶性疟和间日疟的初步观察[J]. 中国寄生虫病防治杂志,2000,13(2): 90-91.

[6] 王龙英,张述义,王克泰,等. 免疫色谱技术(ICT)用于疟疾诊断的探讨[J]. 实用寄生虫病杂志,1999,7(4): 189.

[7] Sethabutr O, Brown AE, Panyim S, et al. Detection of *Plasmodium falciparum* by polymerase chain reaction in a field study[J]. J Infect Dis, 1992, 166(1): 145-148.

[8] Link L, Bart A, Verhaar N, et al. Molecular detection of *Plasmodium knowlesi* in a Dutch traveler by real-time PCR[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(7): 2523-2524.

[9] Taylor BJ, Martin KA, Arango E, et al. Real-time PCR detection of *Plasmodium* directly from whole blood and filter paper samples[J]. Malar J, 2011, 10: 244.

[10] Kamau E, Tolbert LS, Kortepeter L, et al. Development of a highly sensitive genus-specific quantitative reverse transcriptase real-time PCR assay for detection and quantitation of *Plasmodium* by amplifying RNA and DNA of the 18S rRNA genes[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(8): 2946-2953.

[11] 江莉,王真瑜,马晓疆,等. 多重 PCR 种特异性检测恶性疟原虫和间日疟原虫方法的建立[J]. 国际医学寄生虫病杂志,2009,36(2): 78-82.

[12] Gene A, Eroglu F, Koltas IS. Detection of *Plasmodium vivax* by nested PCR and real-time PCR[J]. Korean J Parasitol, 2010, 48(2): 99-103.

[13] Poon LL, Wong BW, Ma EH, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification[J]. Clin Chem, 2006, 52(2): 303-306.

[14] 杨秋林,许丽芳,沈元琼,等. 环介导等温扩增技术检测恶性疟原虫的研究[J]. 中国人兽共患病学报,2008,24(11): 1045-1046.

[15] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.

[16] 吕蓓,程海荣,严庆丰,等. 用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸[J]. 中国科学. 生命科学,2010,40(10): 983-988.

[17] 吕蓓,程海荣,严庆丰,等. 体外核酸快速扩增技术的发展和不断创新[J]. 中国生物工程杂志,2011,31(3): 91-96.

收稿日期:2016-08-17