

# 用液相芯片方法同时检测流感病毒 H5N1 和 H7N9 亚型

袁静, 鲍琳琳, 魏强, 秦川, 许黎黎

(中国医学科学院 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,  
国家中医药管理局 人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

**摘要:**基于液相芯片(Multi-analyte suspension array, MASA)技术建立一种同时对 H5N1 和 H7N9 亚型流感病毒进行快速检测的新方法。对国家生物技术信息中心(National center for biotechnology information, NCBI)和欧洲生物信息学中心(The european bioinformatics institute, EBI)核酸数据库中已有的 H5、N1、H7 和 N9 核酸片段进行对比分析,并参考世界卫生组织,美国疾病预防控制中心和中国疾病预防控制中心等的相关资料,设计简并引物和探针,将合成的探针与荧光编码微球进行偶联,建立检测方法。利用该方法检测 H5N1 和 H7N9 亚型流感病毒和其它常见亚型(H1N1、甲流 H1N1、H5N2、BH3N2 和 H9N2)的标本。建立了一种快速的流感病毒分型方法。这种方法可以同时检测 H5N1 和 H7N9,用已知基因型的样本对这种方法进行验证显示它的特异性很好。灵敏度分析实验也表明这种方法具有很高的灵敏度,可以对含有 5 个拷贝的样本进行有效的检测。利用液相芯片技术研制的 H5N1 和 H7N9 亚型流感病毒检测方法能够用于流感病毒 H5N1 和 H7N9 亚型的快速、灵敏、特异性的检测及鉴定。

**关键词:**液相芯片技术; 流感病毒; H5N1 亚型; H7N9 亚型

**中图分类号:**R373.1,Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8721(2015)06-0607-08

**DOI:**10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002819

流行性感是由流感病毒引起的急性呼吸道感染病,其流行特点是传播迅速,波及范围广。迄今为止,流感病毒已引起四次世界流感大流行,给人类社会的经济及健康造成了巨大损失<sup>[1]</sup>。

流感病毒属于正黏病毒科,其基因组为分节段负链 RNA,根据病毒核衣壳蛋白(NP)和基质蛋白(M)不同可分为甲、乙和丙三种型别,均可感染人。甲和乙型流感病毒是人群中主要的流行病毒,甲型流感病毒根据病毒表面血凝素抗原的不同分为 16 个 HA 亚型;根据神经氨酸酶抗原的不同分为 9 个 NA 亚型<sup>[2]</sup>。H5N1 和 H7N9 是近年来对人类威胁最大的两种禽流感病毒,H5N1 病毒自 1997 年首次感染人类后,在全球 60 多个国家肆虐,死亡率高达 60%<sup>[3-4]</sup>。2013 年 2 月底 H7N9 在中国长三角地区首次出现,2014 年 1 月末重新来袭,席卷中国 12 个省市,整个流行期发现了 347 人感染,其中 128 人死亡,死亡率高达 35%<sup>[5-6]</sup>,而且还有随时发生大规模

流行的可能。有文献报道,一位患者同时感染了两种甲型流感病毒株:H7N9 和 H3N2<sup>[7]</sup>。另外,我们前期的实验过程中还发现从家禽体内分离的病毒样本其实是多亚型的混合物,而且环境中存在 H5N1 和 H7N9 共存的现象。这些情况都迫切要求对流感病毒 H5N1 和 H7N9 亚型做出早期、快速的实验室诊断。

流感病毒检测主要有四大部分<sup>[8]</sup>:病毒培养分离;血清学诊断;病毒抗原检测;病毒核酸检测。其中病毒培养分离,血清学检测和分型是常规方法,但此类方法花费时间比较长,无法快速的对流感病毒进行检测和分型;在对病毒核酸检测和分型中,出现了很多快速特异的方法<sup>[9-10]</sup>。

液相芯片(Multi-analyte suspension array, MASA)作为一种新型低密度基因芯片技术,具有高通量、敏感性高、速度快的特点<sup>[11-12]</sup>。本实验利用 MASA 技术,设计针对 H5N1 和 H7N9 亚型的特异性引物和探针,通过使用荧光编码微球(beads)偶联的特异性检测探针对 H5N1 和 H7N9 亚型进行快速的鉴定和分型。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 病毒** 本研究中所使用的所有 H5N1、H7N9、

收稿日期:2014-12-08;修回日期:2015-08-24

基金项目:十二五科技重大专项(2012ZX10004501-004-003, 2012ZX10004501-004-004),国家自然科学基金(31370203),北京市自然科学基金(7142106)和青年教师培养项目(2012Y2)。

作者简介:袁静(1986-),博士研究生,主要从事流感的比较医学和病原生物学研究,Tel: 15210721698,E-mail: yuanjing\_19860922@163.com

\*通讯作者:许黎黎(1982-),副研究员,主要从事流感的比较医学和病原生物学研究,Tel: 13717792011,E-mail: xull@cnilas.org

H1N1、甲流 H1N1、H5N2、BH3N2、H3N2、H10N8、H6N6 和 H9N2 流感病毒毒株均由本实验室保存,并经过纯化、测序进行鉴定和分型。含有 EV71 病毒的样本也是本实验室前期保存的 cDNA 样本。前期方法摸索的过程中,主要使用 A/Shenzhen/406H/2006 (H5N1) 和 A/Anhui/1/2013 (H7N9) 病毒液。实验中用来验证该方法的样本均来自本实验室在实验过程中采集的实际样本,并且经过 Real-timePCR 方法验证。

**1.2 主要试剂和材料** RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN 公司,逆转录试剂盒 SuperScript III First-Strand Synthesis System 购自 Invitrogen 公司。荧光染料 Power SYBR Green PCR Master Mix, 48 孔 0.2ml PCR 反应管 Fast Optical 48-well RXN Plate, 及光学反应盖膜 48-Well Optical Adhesive Film 25PK 均购自 ABI 公司,实时荧光定量 PCR 仪为 ABI 公司 StepOne 系列产品。探针、引物均由英潍捷基(中国)贸易有限公司合成制备。PCR 试剂(DBI bioscience 产品规格 DBI-2040) 购自上海星汉生物科技有限公司。链霉亲和素藻红蛋白(SA-PE)购自 invitrogen 公司。多功能流式点阵仪(Luminex100™)购自 Luminex 公司。

## 2 方法

由于这部分工作申请了专利,所以引物和探针序列暂不在本论文中公布,申请号或专利号为: 201410777884.1

**2.1 病毒 RNA 的提取及定量** 16 只雪貂感染 H5N1 和 H7N9 病毒后,第 1~14 天每天采取存活雪貂鼻甲分泌物和咽拭子于 1ml 病毒培养液,第 5 天安乐其中的 8 只雪貂后取肺组织,取动物新鲜肺组织 20mg,放入流式管中,加入 1ml 病毒培养液,使用电动研磨器将组织样品研磨成匀浆。取 100 $\mu$ l 肺匀浆上清或鼻甲分泌物或咽拭子,按照 RNeasy Mini Kit 说明书提取病毒 RNA,溶于 30 $\mu$ l RNase-free H<sub>2</sub>O 中。取 8 $\mu$ l 病毒 RNA, 50ng/ $\mu$ l random hexamers 1 $\mu$ l, 10 mM dNTP mix 1 $\mu$ l 于 0.2 ml PCR 管中, 65 $^{\circ}$ C 5min, 然后加入(10 $\times$  RT buffer 2 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ l, 0.1 DTT 2 $\mu$ l, RNaseOUT (40U/ $\mu$ L) 1 $\mu$ l, SuperScript III RT (200U/ $\mu$ L) 1 $\mu$ l) 混合物 10 $\mu$ l, 按照 SuperScript III First-Strand Synthesis System 说明书合成第一链 cDNA。定量采用基于 SYBRGreen 荧光染料的荧光定量 PCR 的方法。所用引物定位于 M 基因,引物序列为: InfA-F 5' GACCRATCCTGTACCTCTGAC 3'

InfA-R5' AGGGCATTYTGACAAAKCGTCTA3', 定量所用标准品为本实验室前期制备,具体制备方法参考文献<sup>[16]</sup>。PCR 反应的最佳条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min; 然后是 35 个循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 每个循环结束后收集荧光信号。熔解曲线从 60 $^{\circ}$ C 至 95 $^{\circ}$ C, 每 0.3 $^{\circ}$ C 读取一次吸光值。

**2.2 PCR 方法** 取 1 $\mu$ l 逆转录的 cDNA 为模板进行 PCR, PCR 反应的体系为 20 $\mu$ l, PCR 预混液 10 $\mu$ l, DNA Polymerase 0.8 $\mu$ l, 混合引物(终浓度 0.2 $\mu$ M) 2 $\mu$ l, 注射用水 6.2 $\mu$ l。PCR 反应的条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 10min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30sec, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 总共 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10min。

**2.3 分子杂交及 Luminex 检测** 首先,按照 Luminex 公司提供的 protocol,把针对不同基因型的探针以共价方式结合到特定颜色编码的微球上。再将结合有探针的微球与 PCR 产物进行分子杂交,杂交体系 28 $\mu$ l; 杂交液 22 $\mu$ l, 微球 0.1 $\mu$ l, PCR 产物各 3 $\mu$ l, 杂交反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 5min, 43 $^{\circ}$ C 温育 60min, 加入荧光染料 75 $\mu$ l, 再在 43 $^{\circ}$ C 温育 15min。杂交反应结束后,用 Luminex100 系统读取微球的平均荧光强度值,判断实验结果。

**2.4 Luminex 检测结果分析** ① 信号值小于 150, 判定为阴性; 信号值在 150~200 之间, 判定为可疑, 需要继续实验证实; 信号值大于 200, 判定为阳性; ② H5-P7 和 H5-P9 都是针对 H5N1 中的 H5, 只要一个探针阳性信号, 即可确认 H5 阳性。至于是否 H5N1, 还要同时确认 N1 阳性; ③ N1-P1 和 N1-P2 都是针对 H5N1 中的 N1, 只要一个探针阳性信号, 即可确认 N1 阳性。至于是否 H5N1, 还要同时确认 H5 阳性; ④ H7-P7 和 N9-P1 分别针对 H7N9 中的 H7 和 N9, 同一待测样品, 流感病毒表面血凝素抗原 H7 亚型和流感病毒神经氨酸酶抗原 N9 亚型同时被判定为阳性, 则含有流感病毒 H7N9 亚型; ⑤ 同一待测样品, 仅流感病毒表面血凝素抗原 H7 亚型或仅流感病毒神经氨酸酶抗原 N9 亚型被判定为阳性, 则非含有流感病毒 H7N9 亚型。

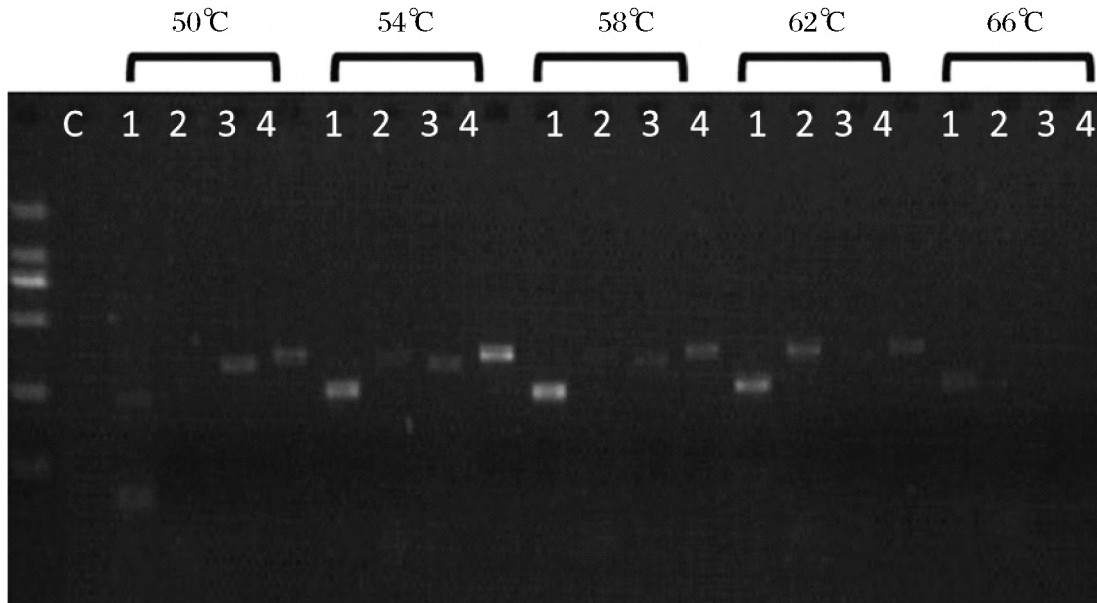
## 结 果

### 1 PCR 实验的优化

采用 DBI Bioscience 公司的热启动 PCR 试剂(购自上海星汉生物科技有限公司)。PCR 组分体系已经优化, 不再重复优化。本实验中 PCR 实验条

件优化是指优化退火温度。以流感病毒 H5N1 亚型或 H7N9 亚型的 cDNA 为模板,温度梯度 PCR 扩增,退火温度设置 50℃~66℃,4℃ 一个梯度。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1 所示。

从电泳结果看,54℃ 到 58℃ 都能有效扩增,考虑到不同病毒亚型之间序列相似,避免非特异性扩增,所以选取较高的退火温度。



Note: C: control, 1: H5 PCR product, 2: N1 PCR product, 3: H7 PCR product, 4: N9 PCR product.

图 1 退火温度的优化

Figure 1 The optimization of the annealing temperature

## 2 杂交温度的优化

将探针包被在微球上,将退火温度为 58℃ 条件下扩增得到的产物与包被探针的微球进行结合,以 40℃、43℃、46℃ 为杂交温度进行杂交。然后进行染色。结果如表 1 所示。从杂交结果看,40℃ 和 43℃ 都能进行有效的杂交,但为了防止非特异性杂交。我们会选择高一点的温度,即 43℃。从染色情况来看,43℃ 孵育的结果最佳。

## 3 特异性和重复性分析

使用该方法对不同亚型流感病毒样本进行检测,以证明本方法的特异性。并对其中一个 H5N1 亚型的样品,和一个 H7N9 亚型的样品重复 3 次检测,鉴定重复性。检测结果见表 2。结果显示,对 H7N9 亚型和 H5N1 亚型的检出率可达 100%,对其他亚型的流感病毒则显示阴性。说明本方法具有良好的特异性,检测结果不受其他亚型流感病毒的干扰。并且,在对同时含有 H5N1 和 H7N9 的样本检测中,本方法表现出高准确性。对其中一个 H5N1 亚型和 H7N9 亚型样品的高中低浓度分别重复 3 次检测,获得的信号值差异不大,具有良好的重复性。

## 4 分析灵敏度的确定

分析了 H5N1 和 H7N9 引物及探针的灵敏度。灵敏度分析方法如下:将 H5N1 亚型病毒液、H7N9 亚型病毒液和感染 H7N9 的雪貂模型的肺组织 cDNA 分别 10 倍梯度稀释,获得  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  倍稀释的样本。然后用 real-time PCR 方法进行定量。同时使用本方法,将梯度稀释的 cDNA 进行 PCR,分子杂交及上机检测,以鉴定本方法的灵敏性,结果如表 3 所示。结果显示,该方法可以对含有 5 个拷贝的样本进行有效的检测。

## 5 实验样本的检测

应用建立的方法对实验室存留的大量感染雪貂模型的鼻拭子,咽拭子,解剖时各组织,以及含有 EV71 的临床样本共 115 份 cDNA 样品进行检测。其中 H7N9 37 份中的 20 份,H5N1 31 份中的 15 份来源于文中的动物实验。表格中标注其它的 44 份样本中,有 28 份临床样本,16 份为文中动物实验的阴性样本。剩余的样本均为实验室前期保存)。这些样本都是该实验室经过 real-time PCR 方法验证过的。检测结果见表 4。结果显示,检测结果与预期完全一致,对 H7N9 亚型和 H5N1 亚型的检出率可达 100%,检测阴性样品未见假阳性,与用其它方

法检测的结果完全吻合。其中, H5N2 亚型病毒液样品中, H5 亚型的探针之一信号值呈现阳性, 但同时 N1 亚型的探针的信号值则呈阴性。感染 H1N1 亚型流感病毒的雪貂咽拭子样品中, N1 亚型的探针

之一信号值呈现阳性, 但同时 H5 亚型的探针的信号值则呈阴性。说明本发明提供的试剂盒具有良好的准确性和特异性, 检测结果不受其他亚型流感病毒的干扰。

表 1 杂交温度的优化

Table 1 The optimization of hybrid temperature

	H5-P7	H5-P9	H7-P7	N1-P1	N1-P2	N9-P1	stain temperature	hybrid temperature
H5	<b>885</b>	<b>799</b>	61	88	30	47	SA-PE incubated at room temperature	40°C
N1	34	33	46	<b>283</b>	<b>716</b>	39		
H7	45	50	<b>284</b>	67	46	16		
N9	60	48	47	110	82	<b>500</b>	SA-PE incubated at 40°C	40°C
H5	<b>888</b>	<b>756</b>	61	85	46	36		
N1	58	47	47	<b>218</b>	<b>623</b>	38		
H7	57	36	295	90	57	51	SA-PE incubated at 43°C	43°C
N9	59	45	53	90	62	<b>515</b>		
H5	<b>486</b>	<b>424</b>	50	143	37	57		
N1	34	32	54	148	<b>608</b>	35	SA-PE incubated at room temperature	43°C
H7	53	51	<b>211</b>	76	66	34		
N9	56	40	34	83	41	<b>540</b>		
H5	379	373	41	103	30	37	SA-PE incubated at 46°C	46°C
N1	41	34	56	<b>251</b>	<b>620</b>	43		
H7	51	44	<b>227</b>	86	57	24		
N9	36	34	43	90	46	<b>516</b>	SA-PE incubated at room temperature	46°C
H5	147	128	70	131	84	75		
N1	64	99	65	138	<b>609</b>	77		
H7	79	71	<b>242</b>	77	112	60	SA-PE incubated at 46°C	46°C
N9	81	88	84	98	68	<b>476</b>		
H5	114	109	58	141	80	74		
N1	66	76	52	130	<b>539</b>	78	SA-PE incubated at 46°C	46°C
H7	68	75	<b>205</b>	116	93	80		
N9	86	79	62	118	69	<b>417</b>		

Note: Bold show positive results

Each data showed are the average of three times

表 2 引物及探针的特异性和重复性分析

Table 2 Specificity and repeatability analysis of primers and probes

sample	H5-P7	H5-P9	H7-P7	N1-P1	N1-P2	N9-P1
blank	31	27	42.5	52	57.5	49
H5N1	<b>1 189</b>	<b>1 449</b>	8	<b>1 891</b>	<b>2 087</b>	23
H7N9	74	82.5	<b>1 831</b>	52	120	<b>355.5</b>
H7N9	57	42	<b>2 208</b>	47	133	<b>274</b>
H7N9	11	15	<b>2 840</b>	56	123	<b>257</b>
H5N1	<b>719</b>	<b>847</b>	22	<b>1 431</b>	<b>1 898</b>	42.5
H5N2	<b>723</b>	<b>918</b>	64	50	48	31.5
BH3N2	62	22	36	52.5	122	39
H1N1	53	36	49	51.5	<b>2 752</b>	19
H9N2	88	53.5	65	83	91.5	9
EV71	72.5	37	39.5	40	78	32
H10N8	17	47	8	16	50	12
H6N6	6	96	55	13	72	55
H3N2	24	67	24	31	47	28
H5N1andH7N9	<b>289</b>	<b>281</b>	<b>1 973</b>	<b>241</b>	<b>1 025</b>	<b>1 311</b>

续表 2

sample	H5-P7	H5-P9	H7-P7	N1-P1	N1-P2	N9-P1
H5N1throat swab	<b>303</b>	56	42	<b>1 183</b>	<b>1 715</b>	24
H5N1 throat swab	<b>525, 5</b>	127	35	<b>721, 5</b>	<b>1161</b>	23
H5N1lung tissue	<b>616</b>	<b>628</b>	44	<b>1 453</b>	<b>1 990</b>	24, 5
	<b>1 105</b>	<b>1 150</b>	41	<b>2 442</b>	<b>2 514</b>	32
H5N1(高)	<b>1 190</b>	<b>1 084</b>	35	<b>2 308</b>	<b>2 499</b>	15
	<b>1 270</b>	<b>1 233</b>	33	<b>2 324</b>	<b>2 366</b>	34
	<b>885</b>	<b>799</b>	61	<b>283</b>	<b>716</b>	47
H5N1(中)	<b>888</b>	<b>756</b>	61	<b>218</b>	<b>623</b>	36
	850	789	<b>56</b>	226	692	<b>54</b>
	<b>486</b>	<b>424</b>	50	248	<b>608</b>	57
H5N1(低)	<b>379</b>	<b>373</b>	41	<b>251</b>	<b>620</b>	37
	453	407	<b>20</b>	267	634	<b>38</b>
	35	35	<b>2 492</b>	39	100	<b>1 203</b>
H7N9(高)	38	29	<b>2 275</b>	29	123	<b>1 322</b>
	39	48	<b>2 178</b>	46	128	<b>1 400</b>
	133	130	<b>1 963</b>	25	79	<b>449</b>
H7N9(中)	134	139	<b>1 750</b>	67, 5	86	<b>478</b>
	146	133	<b>2 002</b>	43	59	<b>536</b>
	22	31	<b>892</b>	33	50	<b>991</b>
H7N9(低)	18	35	<b>871</b>	19	73	<b>990</b>
	16	38	<b>847</b>	15	66	<b>981</b>

Note: bold show positive results

表 3 引物及探针的灵敏度分析

Table 3 Sensitivity analysis of primers and probes

	H5-P7	H5-P9	H7-P7	N1-P1	N1-P2	N9-P1	
H5N1	10 <sup>-1</sup>	<b>1 503</b>	<b>1 515</b>	44	<b>1 089</b>	<b>2 639</b>	29
	10 <sup>-2</sup>	<b>1 788</b>	<b>1 825</b>	5	<b>1 148</b>	<b>2 647</b>	12
	10 <sup>-3</sup>	<b>1 772</b>	<b>1 774</b>	6	<b>1 055</b>	<b>2 421</b>	22
	10 <sup>-4</sup>	<b>1 907</b>	<b>1 889</b>	23	<b>859</b>	<b>2 456</b>	28
	10 <sup>-5</sup>	<b>2 000</b>	<b>1 849</b>	6	<b>469</b>	<b>2 100</b>	23
	10 <sup>-6</sup>	<b>1 676</b>	<b>1 511</b>	47	153	<b>1 049</b>	23
	10 <sup>-7</sup>	<b>394</b>	<b>411</b>	6	49	<b>382(9, 57)</b>	7
H7N9 ferrets lung tissue	10 <sup>-1</sup>	34	0	<b>555</b>	47	51	<b>295</b>
	10 <sup>-2</sup>	64	23	<b>526</b>	93	68	<b>985</b>
	10 <sup>-3</sup>	57	39	<b>546</b>	14	32	<b>715</b>
	10 <sup>-4</sup>	58	12	<b>215(5, 68)</b>	44	26	<b>248</b>
	10 <sup>-5</sup>	82	23	18	35	23	22
	10 <sup>-6</sup>	67	39	15	44	49	20
	10 <sup>-7</sup>	85	34	19	67	21	9
H7N9	10 <sup>-1</sup>	45	29	<b>2 551</b>	99	68	<b>1 111</b>
	10 <sup>-2</sup>	20	37	<b>2 414</b>	81	58	<b>921</b>
	10 <sup>-3</sup>	41	24	<b>2 532</b>	40	114	<b>1 256</b>
	10 <sup>-4</sup>	28	24	<b>1 649</b>	57	111	<b>1 503</b>
	10 <sup>-5</sup>	29	13	<b>2 184</b>	50	130	<b>1 347</b>
	10 <sup>-6</sup>	24	11	<b>572</b>	60	36	<b>956</b>
	10 <sup>-7</sup>	46	30	<b>246(9, 82)</b>	64	39	<b>597</b>

Note: bold show positive results

\* In parentheses are the corresponding real-time PCR copy number

表 4 大量已知样本的检测

Table 4 The test of large numbers of the known samples

Total number of samples subtype	Subtype	Sample numbers	Positive samples by probe detection					
			H5-P7	H5-P9	H7-P7	N1-P1	N1-P2	N9-P1
85	H7N9	37	0	0	<b>37</b>	0	0	<b>37</b>
	H5N1	21	<b>31</b>	0	0	0	<b>31</b>	0
	H5N2	1	0	<b>1</b>	0	0	0	0
	H1N1	2	0	0	0	0	<b>2</b>	0
	others	44	0	0	0	0	0	0

## 讨 论

流感病毒的实验室诊断方法包括病毒细胞培养、血清学诊断以及抗原检测。病毒通过感染敏感的组织细胞可以被分离鉴定出来,这可以作为流感病毒感染最直接,最可靠的依据。另外,急性期血清较恢复期血清抗体有 4 倍增加也是流感病毒感染的标准。但是前者耗时长,一般来说细胞培养需要 3~4d,而后者需采集患者急性期及恢复期双份血清进行抗体测定,且很容易出现与其他亚型的交叉反应,这些缺陷限制了两种方法在临床上的快速诊断。抗原的直接检测包括对病毒结构蛋白以及核酸的检测。病毒结构蛋白的检测基于抗原抗体的反应、偶联酶或者化学生色原或者荧光染料,包括免疫荧光(Immunofluorescence, IF)、酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assays, ELISA)。直接或间接免疫荧光试验的敏感度波动在 40%~100%,特异性在 86%~99%,但是由于需要荧光显微镜特殊仪器而限制了其在临床上的应用。特别是 PCR 技术的应用,对于流感病毒鉴定和分型发挥着越来越大的作用。这些方法如:逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)、多重逆转录聚合酶链反应(multiplex reverse transcription-PCR, MRT-PCR)、酶免 PCR(PCR-enzyme immunoassay, PCR-EIA)、实时 PCR(real-time PCR, RT-PCR)等都大大的提高了检测的速度和灵敏度<sup>[13-16]</sup>。然而,尽管越来越多的方法用于检测流感病毒,但尚未有一种方法能够快速简便的对流感病毒各种亚型进行区分。因此建立一种对流感病毒各种型别进行快速鉴定的方法十分重要。

液相芯片技术是一种新型基因芯片技术。该技术的核心是把微小的乳胶颗粒分别染成上百种不同的荧光色。应用时,把针对不同检测物的乳胶颗粒混合后再加入微量标本,在悬液中与微粒进行特异

性地结合。结合的结果可以在瞬间经激光判定后由电脑以数据信息的形式记录下来。该技术已经在基因分型、组织分型、感染性疾病的检测等方面广泛应用<sup>[17-18]</sup>。

本研究中我们设计了针对 H5N1 和 H7N9 亚型的四对特异性简并引物和 6 条探针,使用六种不同编号的微球,利用液相芯片技术对同时检测 H5N1 和 H7N9 亚型流感病毒进行了初步尝试。

引物探针的设计和特异性的验证是本实验的关键。我们对下载的所需基因序列进行了大量分析,包括同源性比对和保守区域的寻找,并且确定保守区域,特别是设计探针所在区域在被检测亚型中具高度保守性,从而最大限度的避免了实际应用中可能出现的假阳性、假阴性结果。

在特异性试验中用 N1-P2 探针检测 H1N1 标本有较高的荧光强度,而用 H5-P7 和 H5-P9 探针检测皆为阴性,同样用 H5-P9 探针检测 H5N2 标本有较高的荧光强度,而用 N1-P1 和 N1-P2 探针检测皆为阴性。我们设计引物和探针时选取的只要是 NCBI 和 EBI 核酸数据库中 H5N1 和 H7N9 的 H5、N1、H7 和 N9 核酸片段进行比对分析,而我们能够利用的研究标本来源有限,至于设计的引物和探针能不能完全检测出其它亚型中包含的 H5、N1、H7 或 N9,还需要在实际检测中大规模应用。这种方法具有很高的灵敏度,可以对含有 5 个拷贝数的样本进行有效的基因分型。此外,这些引物和探针可以用于多重检测,可以在一个反应管中同时检测出 H5N1 和 H7N9。

如果进一步研制出针对所有常见流感亚型的检测试剂盒,会具有更大价值。而针对实际检测,由于此方法从样本 RNA 的提取到最后结果的判断可以在一个工作日(8 h)内完成,除具有高敏感性和特异性以外,还具有检测速度快的特点,因此该方法在流感病毒的快速诊断中将会发挥重要的作用。

## 参考文献

- [1] Cheung T K, Poon L L. " Biology of influenza a virus. " *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1102: 1-25.
- [2] Tang J W, Shetty N, Lam T T, Hon K L. " Emerging, novel, and known influenza virus infections in humans. " *Infect Dis Clin North Am*, 2010, 24(3): 603-617.
- [3] Wallace R G, Hodac H, Lathrop RH, Fitch WM. " A statistical phylogeography of influenza A H5N1. " *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(11): 4473-4478.
- [4] WHO. " WHO-confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) infection, November 2003-May 2008. " *Wkly Epidemiol Rec*, 2008, 83(46): 415-420.
- [5] Li Q, Zhou L, Zhou M, Chen Z, Li F, Wu H, Xiang N, Chen E, Tang F, Wang D, Meng L, Hong Z, Tu W, Cao Y, Li L, Ding F, Liu B, Wang M, Xie R, Gao R, Li X, Bai T, Zou S, He J, Hu J, Xu Y, Chai C, Wang S, Gao Y, Jin L, Zhang Y, Luo H, Yu H, He J, Li Q, Wang X, Gao L, Pang X, Liu G, Yan Y, Yuan H, Shu Y, Yang W, Wang Y, Wu F, Uyeki TM, Feng Z. " Epidemiology of human infections with avian influenza A (H7N9) virus in China. " *N Engl J Med*, 2014, 370(6): 520-532.
- [6] 秦川. " H7N9 禽流感的研究现状及对未来的思考. " *中国实验动物学报*, 2014, 22(1): 1-6.
- [7] Zhu Y1, Qi X, Cui L, Zhou M, Wang H. " Human co-infection with novel avian influenza A H7N9 and influenza A H3N2 viruses in Jiangsu province, China. " *Lancet*, 2013, 381(9883): 2134.
- [8] Ellis JS, Zambon MC. " Molecular diagnosis of influenza. " *Rev Med Virol*, 2002, 12(6): 375-389.
- [9] Román-Bravo P, López-Cardoso M, y García PG, Höpfl H, Cea-Olivares R. " Template-assisted self assembly of two lipophilic polyion aggregates derived from sodium tetraphenyl imidodiphosphinate-complexes containing sodium ions in four different coordination environments. " *Chem Commun (Camb)* 2004, 7(17): 1940-1941.
- [10] Moore C, Hibbitts S, Owen N, Corden SA, Harrison G, Fox J, Gelder C, Westmoreland D. " Development and evaluation of a real-time nucleic acid sequence based amplification assay for rapid detection of influenza A. " *J Med Virol*, 2004, 74(4): 619-628.
- [11] Lipatov A S, Govorkova E A, Webby R J, Ozaki H, Peiris M, Guan Y, Poon L, Webster RG. " Influenza: Emergence and Control. " *J Virol*, 2004, 78 (17): 8951-8959.
- [12] Li K S, Guan Y, Wang J, Smith G J, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepongstie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long H T, Hanh N T, Webby R J, Poon L L, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS. " Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. " *Nature*, 2004, 430 (6996): 209-213.
- [13] Carr M J, Gunson R, Maclean A, Coughlan S, Fitzgerald M, Scully M, O'Herlihy B, Ryan J, O'Flanagan D, Connell J, Carman WF, Hall WW. " Development of a real-time RT-PCR for the detection of swine-lineage influenza A (H1N1) virus infections. " *J Clin Virol*, 2009, 45(3): 196-199.
- [14] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) Virus - United States, 2009 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2009, 58(30): 826-829.
- [15] Jiang T, Kang X, Deng Y, Zhao H, Li X, Yu X, Yu M, Qin E, Zhu Q, Yang Y, Qin C. " Development of a real-time RT-PCR assay for a novel influenza A (H1N1) virus. " *J Virol Methods*, 2010, 163(2): 470-473.
- [16] 许黎黎, 鲍琳琳, 秦川. " 季节性流感病毒 H1N1 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立. " *中国比较医学杂志*, 2011, 21(7): 66-70.
- [17] Armstrong B, Stewart M, Mazumder A. Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping. *Cytometry*, 2000, 40 (2): 102-108.
- [18] Borucki MK1, Reynolds J, Call DR, Ward TJ, Page B, Kadushin J. Suspension microarray with dendrimer signal amplification allows direct and high-throughput subtyping of *Listeria monocytogenes* from Genomic DNA. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (7): 3255-3259.

## Determination of Influenza Virus H5N1 and H7N9 Using MASA Technology

YUAN Jing, BAO Linlin, WEI Qiang, QIN Chuan, XU Lili\*

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science;  
Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

**Abstract:** To set up a new rapid method for the rapid determination of influenza virus H5N1 and H7N9 basing on the Multi-Analyte Suspension Array (MASA) technology. Sequence analysis and design of degenerate primers and specific probes were set in the comparison and analysis of H5, N1, H7 and N9 genes. In combination with MASA technology, these primers and probes were used for the determination of samples of H5N1 and H7N9 and other subtypes (H1N1, PH1N1, H5N2, H3N2 and H9N2). We developed a rapid determination method. This method had high specificity and sensitivity that could detect H5N1 and H7N9 at one time, and could detect samples that containing 10 copies of H5N1 and H7N9. This determination method could be used for rapid determination of influenza virus H5N1 and H7N9 at one time.

**Key words:** Multi-Analyte Suspension Array technology; Influenza virus; H5N1; H7N9

\*Corresponding author: XU Lili, E-mail: xull@cnilas.org