

高灵敏可视化核酸试纸条法快速检测 HBV DNA*

杨 贤¹ 黄 欢² 殷竹君³ 武海萍² 周国华^{1△}

(1 南京医科大学基础医学院 江苏南京 210029 2 华东医学生物技术研究所 江苏南京 210002 ;

3 江苏出入境检验检疫局 江苏南京 200001)

摘要 目的 本研究旨在建立一种基于试纸条的快速、灵敏及可视化检测乙型肝炎病毒核酸的方法。方法 利用聚合酶链反应扩增乙肝病毒的保守区,其中上、下游引物的 5' 端分别修饰异硫氰酸荧光素和生物素。核酸试纸条上的胶体金以及检测线处分别标记有链霉亲和素以及抗荧光素抗体。将扩增产物与展开液混合后点样,10 min 后即可用肉眼判读结果。在优化了展开液成分、上样体积以及上样浓度之后,对该方法的灵敏度进行了评价。最后收集 15 例阴性样本及 33 例 HBsAg 阳性样本,按血清标志物结果进行分类后使用核酸试纸条进行检测,并与实时荧光 PCR 的结果进行了比较。结果:试纸条检测乙肝病毒核酸的灵敏度为 250 copies/mL。在临床样本的测定中,该方法与实时荧光定量 PCR 的特异性均为 100%。且两种方法检测不同血清标志物类型的阳性检出率无差异。结论 核酸试纸条技术能够用于乙肝病毒核酸的可视化检测,与实时荧光 PCR 相比检测速度快,具有较好的灵敏度和特异性,适合流行病学调查以及在基层医院体检使用。

关键词 核酸试纸条法;聚合酶链反应;乙肝病毒 DNA

中图分类号 R446.5 文献标识码 B 文章编号 1673-6273(2011)07-1277-05

Development of a sensitive, visual nucleic acid dipstick assay for rapid detection of hepatitis B virus DNA*

YANG Xian¹, HUANG Huan², YIN Zhu-jun³, WU Hai-ping², ZHOU Guo-hua^{1△}

(1 School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, 210029, Nanjing, China;

2 Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnology, 210002, Nanjing, China;

3 Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, 200001, Nanjing, China)

ABSTRACT Objective: We aimed to develop a nucleic acid dipstick assay (NADA) for rapid and visual detection of Hepatitis B virus (HBV) with a high specificity and sensitivity. **Methods:** PCR amplification of HBV conserved sequences was carried out by a pair of primers labeled with FITC and biotin at the 5' end respectively. The gold nanoparticles and test zones in the dipstick were modified with anti-fluorescein and streptavidin respectively. PCR products mixed with developing buffer were applied to the sample-loading area of the dipstick and the detection result can be observed 10 min afterward with naked eyes. As the buffer migrates along the strip by capillary action, the PCR products were captured at the test zones by immobilized anti-fluorescein and detected by streptavidin-functionalized gold nanoparticles, thus generating characteristic red lines. The excess nanoparticles were captured by immobilized biotinylated albumin at the control zone of the strip and then form another red line. We have optimized the developing buffer as well as the volume and concentration for sample-loading. The sensitivity of the optimized NADA has also been evaluated. To demonstrate the utility of NADA, a total of 48 clinical samples containing 15 negative control and 33 HBsAg positive cases were detected. The results from NADA were further compared with that from qPCR. **Results:** The sensitivity of NADA for visual detection of HBV was 250 copies/mL. In the clinical tests, the specificity of DADA and qPCR was 100%, respectively. There were no differences for the detection rates of discriminating the different serum-marker patterns by NADA and qPCR. **Conclusions:** Our newly developed NADA could be applied for visual detection of HBV. Compared with qPCR, NADA have the advantages of the rapidity, higher sensitivity and specificity, holding a great promise for wide applications in epidemiological surveys and routine physical examinations in hospitals.

Key words: Nucleic acid dipstick assay; Polymerase chain reaction; Hepatitis B virus DNA

Chinese Library Classification: R446.5 **Document code:** B

Article ID: 1673-6273(2011)07-1277-05

前言

乙型病毒性肝炎是由乙肝病毒 (Hepatitis B virus, HBV)引

起的一种广泛流行的传染病,以肝脏为靶器官并可引起多种器官的损害,主要经血液传播。在我国法定规定的传染病中,乙肝的发病数和发病率多年来一直高居前列。乙肝给个人、家庭以

* 基金项目 江苏省自然科学基金(BK2010111) ;国家自然科学基金项目(21005088)

作者简介 杨贤(1985-) 男 硕士研究生,主要研究方向为分析生物化学。E-mail yangxian-gp4@163.com

△通信作者 周国华 电话: +86-025-84514223 E-mail gzhzhou@nju.edu.cn

(收稿日期 2011-01-28 接受日期 2011-02-22)

及社会造成沉重的经济负担,同时也引发一系列社会问题,是我国现阶段最为突出的公共卫生问题之一^[1]。

目前,临床上主要依靠实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-Time PCR, qPCR)测定病毒核酸拷贝数来检测乙肝病毒^[2,3]。然而 qPCR 由于检测需要较高的技术要求,许多单位尚不能开展。且存在荧光探针、仪器价格昂贵以及难以实现快速检测等问题。

胶体金免疫层析(Gold Immunochromagrapghy Assay, GICA)法是 20 世纪 80 年代末发展起来的一种快速的免疫学测定方法^[4],它是胶体金标记技术和免疫层析技术相结合的产物。基本原理是利用微孔滤膜的渗滤浓缩和毛细管作用,使抗原抗体反应在固相膜上快速进行,然后用胶体金标记的抗体来直接显色,阳性反应在膜上呈现红色,阴性反应则不形成红色,GICA 全过程只需 10 min 左右。

本文结合聚合酶链反应与胶体金免疫层析技术的各自优点,建立了一种核酸试纸条(Nucleic acid dipstick assay, NADA)检测乙肝病毒核酸的方法。病毒核酸扩增产物无需纯化,和展开液混合后直接滴加在试纸条加样孔处,10 min 后即用肉眼判读出阴、阳性结果,具有方便快捷、灵敏度高、特异性强的特点,适用于流行病学普查和广大基层单位进行初步筛查。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本的收集 15 例正常人血清、34 例乙肝病毒表面抗原(HBsAg)阳性血清及相应血清标志物结果均来自江苏出入境检验检疫局,所有样本分装后置于 -20℃ 保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 Taq DNA 聚合酶以及 PCR 试剂均购自 TaKaRa 公司,本实验所需引物由 Invitrogen 公司合成;乙肝病毒(HBV)核酸提取试剂盒购自北京索奥生物医药科技有限公司;乙肝病毒(HBV)实时荧光定量检测试剂盒购自深圳匹基生物工程有限公司;核酸试纸条购自南京黎明生物制品有限公司;PCR 仪(EDC-810 基因扩增仪)购自北京东胜创新生物科技有限公司;实时荧光定量 PCR 仪(DNA Engine Opticon 2)、电泳仪(POWPAK 200)均购自 Bio-Rad 公司;凝胶成像系统购自 Syngene 公司;紫外分光光度计购自 Naka Instrument 公司;微量离心机(Pico17)购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.1.3 引物 以 NCBI 上发布的各类乙肝病毒亚型的 S 基因为模板,使用 Clustal X 进行序列比对,从中选择保守区段作为靶序列设计通用引物,其中上游引物的 5' 端修饰有异硫氰酸荧光素,下游引物的 5' 端修饰有生物素。引物设计使用 Primer Premier 5.0 软件,引物序列如表 1 所示。

1.2 病毒核酸的提取

取 100 μL 血清,按乙肝病毒(HBV)核酸提取试剂盒说明书进行操作,最终得到约 10 μL 提取液。

1.3 聚合酶链反应

反应体系为 25 μL,包括 1 μL 提取液、2.5 μL 10× PCR Buffer、1.5 μL MgCl₂ (25mM)、0.5 μL dNTP Mix (10 mM)、上下游引物各 1 μL (10 pmol/μL)、Taq DNA 聚合酶 0.125 μL (5 U/μL)、用去离子 H₂O 补至 25 μL。热循环参数: 94℃ 2 min, 90℃ 10s, 70℃ 15s, 72℃ 15s, 45 个循环, 72℃ 2 min。

1.4 试纸条检测方法及其定性判读

将试纸条平放,取 6 μL 扩增产物与 94 μL 展开液(PBS + 0.1% BSA, pH 7.4)混合,混匀离心后将 100 μL 混合液(无气泡)滴加到检测孔中,室温下 10 min 后判读结果,T 线显色,结果为阳性,T 线不显色,结果为阴性,若 C 线不显色,则试纸条无效。

1.5 试纸条的定量判读

使用 Syngene 凝胶成像系统的可见光光源拍摄试纸条,之后通过编辑软件 "GeneTools from Syngene" 定位检测线及相应背景,使用背景校正功能扣除背景信号带来的影响后,计算检测线的光密度值。

2 结果

2.1 检测原理

核酸试纸条检测乙型肝炎病毒的原理如图 1。使用一对特异性引物扩增从血清中提取得到的病毒基因组,上、下游引物的 5' 端分别修饰有荧光素(F)和生物素(B)。扩增产物无需纯化,与展开液混合后点在试纸条的加样孔处,混合液通过毛细作用向前流动。当有扩增产物存在时,扩增产物一端修饰的生物素首先与金标垫上修饰有异硫氰酸荧光素(SA)的胶体金结合,接着液相继续流动到达检测线,固定在检测线上的抗荧光素抗体(Anti-F)将一端修饰有荧光素的扩增产物捕获,这样就使被扩增产物一端结合的胶体金都停留在检测线处,产生红色的条带。多余的胶体金继续层析,最终被质控线上的生物素(B)捕获,使质控线同样显色。当扩增产物不存在时,胶体金颗粒无法停留在检测线处,而被质控线上的生物素捕获,所以质控线的显色情况可以用来对试纸条进行质控。

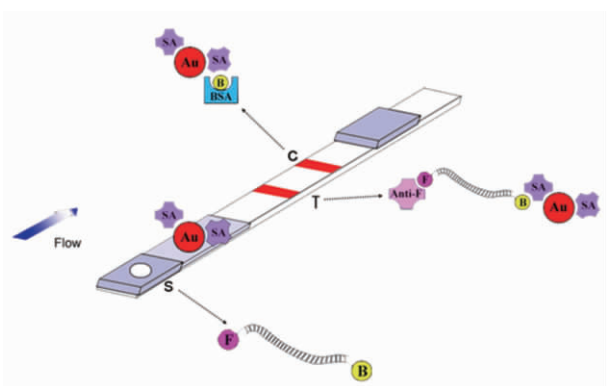


图 1 核酸试纸条法检测原理

Fig.1 Schematic illustration of the nucleic acid dipstick assay. S: sample application area; T: test zone for HBV; C: control zone; F: fluorescein isothiocyanate; B: biotin; Au: gold nanoparticles; SA: streptavidin; Anti-F: anti-fluorescein; BSA: bovine serum albumin.

2.2 基因特异性引物的设计及选择

由于特异性引物分别修饰有异硫氰酸荧光素及生物素,因此扩增过程中产生的引物间二聚体(Cross dimers, CDs)也会带有相同修饰,可能导致试纸条在检测空白或是阴性样本时出现信号,产生假阳性。为此,我们考察了二聚体是否会对试纸条的检测结果产生影响。使用引物对 FITC-P1/ Biotin-P2 (表 1) 37℃

孵育 1 h 后扩增空白模板,电泳图有明显二聚体,而核酸试纸条上也出现了肉眼可见的假阳性信号(图 3,CDs 条带),并且与阳性样本的结果一致(图 3,PC 条带)。这一结果表明引物间的二聚体会对试纸条的判读产生影响。为了避免扩增过程中产生 CDs,需要预先设计合成不带修饰的引物,测试其是否满足核酸试纸条检测的要求。为了筛选到合适的引物,设计时应遵循以下原则:①上下游引物的 3' 末端不能互补;②如 3' 末端不可避免发生互补,其二级结构的自由能变化值绝对值($|\Delta G|$)应尽可能小; $|\Delta G|$ 越小引物的二级结构越不稳定;③选择的引物对应应具有较高的 T_m 值,接近 Taq 酶的最适延伸温度。

按照这一原则,我们又设计了引物对 FITC-P3/ Biotin-P4 (表 1),该引物对的 $|\Delta G|=6.2$,且 T_m 值较高。测试结果表明(图 3,泳道 1-4),该引物对在不同 PCR 循环数下均不会产生明显的二聚体条带,且试纸条也无假阳性信号产生(图 3,试纸条带 1-4)。

表 1 引物名称及序列
Table 1 Primer sequences used in this study

Primer	Sequences (5'→3')	T_m (°C)
FITC-P1	FITC-GATCTCCTCGACACCGCCTCAG	67.4
Biotin-P2	Biotin-GGTCTTCCAAATTACTTCCACCCA	66.3
FITC-P3	FITC-GCAGTCCCCAACCTCCAATCAC	66.9
Biotin-P4	Biotin-GAAGTAGAGGACAAACGGGCAACATA	66.1

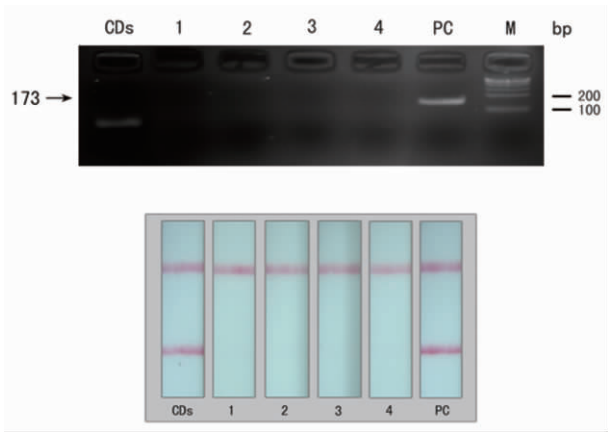


图 2 检测引物二聚体的电泳图(上)及试纸条图(下)

Fig.2 Electrophoregrams (up) and dipstick-images (down) of cross dimers at different PCR thermal cycling conditions. 1: 30 cycles; 2: 35 cycles; 3: 40 cycles; 4: 45 cycles; CDs: Cross dimers; PC: Positive control; M: Maker.

2.3 抗体 / 半抗原对的特异性考察

本文使用的两对抗体 / 半抗原均具有极高的亲和力,为了验证链霉亲和素以及抗荧光素抗体是否能在层析过程中特异性地捕获对应的生物素以及异硫氰酸荧光素,我们采用四种不同方式标记引物:即上下游引物都不修饰(图 4 条带 1)、仅上游引物修饰异硫氰酸荧光素(图 4 条带 2)、仅下游引物修饰生物素(图 4 条带 3),以及上下游引物分别修饰异硫氰酸荧光素与生物素(图 4 条带 4),并使用试纸条对扩增产物进行检测。实验结果如图 4 表明只有同时标记有生物素和异硫氰酸荧光素的引物才能扩增出肉眼可见的信号,其余不同引物组合得到的扩增产物均未产生阳性信号,表明两对抗体 / 半抗原系统具有较好的特异性。

2.4 检测条件的优化

2.4.1 展开液考察 上样缓冲液的成分对试纸条的检测性能有

较大影响。合适的缓冲液一方面可以避免非特异性信号的出现,同时也能提高试纸条的灵敏度及重复性。我们考察了几种常用的展开液,包括 0.01 mol/L PBS(磷酸盐)缓冲液(pH 7.4),PBS + 0.1% BSA(牛血清白蛋白),PBS + 0.1% Tween 20,以及 Tris EDTA (TE, pH 8.0)。取 96 μ L 展开液与 4 μ L 扩增产物(1010 copies/ μ L)混合后点样,定量扫描发现以 PBS + 0.1 % BSA 为展开液时,试纸条的显色强度较强(图 5a)。这可能和 BSA 能够减轻不利环境因素如温度变化引起的蛋白变性,从而稳定胶体金 - 生物素复合物的作用有关。

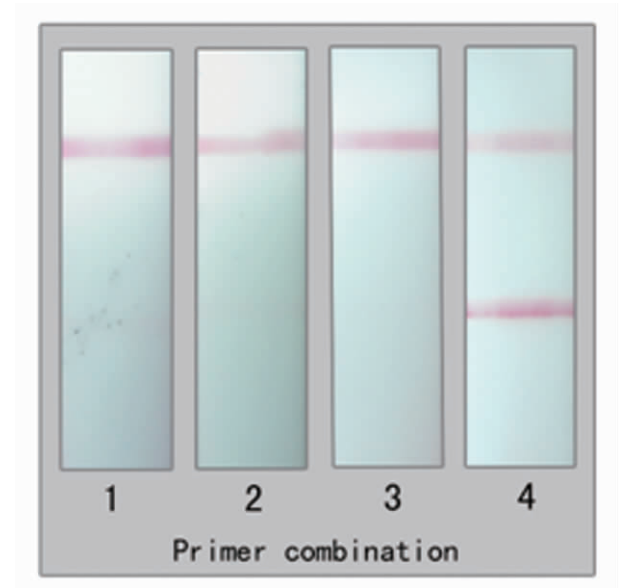


图 3 抗体 / 半抗原对的特异性考察

Fig.3 Evaluation of specificity of antibody/hapten pairs. 1: P3/ P4; 2: FITC-P3/ P4; 3: P3/ Biotin-P4; 4: FITC-P3/ Biotin-P4.

2.4.2 扩增产物点样体积考察 从理论上分析,增加扩增产物的点样量可以使更多的靶分子与胶体金结合,从而使检测线附近聚集的胶体金数量增多,提高检测线的显色强度。分别取 1 μ L、2 μ L、4 μ L、6 μ L、8 μ L 扩增产物(1010 copies/ μ L)与

展开液混合,将终体积 100 μL 的混合液滴加到检测孔中进行检测。定量扫描显示,随着上样体积的增加,试纸条的显色强度也有所增强。扩增产物体积为 6 μL 时,试纸条显色强度最佳(图 5b),之后提高点样体积,由于金标垫上的胶体金或者检测线处的抗荧光素抗体被饱和,显色强度没有明显增强。

2.4.3 扩增产物点样浓度考察 将 1011 copies/ μL 的扩增产物以 10 倍梯度稀释,并点试纸条。结果表明,当稀释 100 倍后肉眼仍能观察到阳性检测线,所以试纸条的显色灵敏度为 109 copies/ μL 。据文献报道,PCR 的平均扩增效率为 85%,反应到达平台期时^[5],其扩增产物的拷贝数往往能够达到 1010 copies/ μL ~1011 copies/ μL ,因此使用核酸试纸条作为扩增产物的检测平台是可以满足实际需求的。同时,由检测线定量扫描结果可知,无模板样品(NC)的检测信号只有扩增产物(1010 copies/ μL)的 1.9%,结合肉眼观察,证明核酸试纸条的特异性较好,可以用于 PCR 产物的可视化检测。

2.5 灵敏度

为了考察方法的灵敏度,在上述优化的条件下采用 PCR 法扩增 107、106、105、104、103、500、250、100 和 0 copies/mL 的乙肝阳性样本,并用试纸条进行检测,结果见图 6,表明核酸试

纸条的检测灵敏度可达 250 copies/mL。现阶段供临床使用的商品化实时荧光检测试剂盒,其检测下限一般为 500 copies/mL。因此核酸试纸条法同样可以满足检测低拷贝病毒血样的要求。

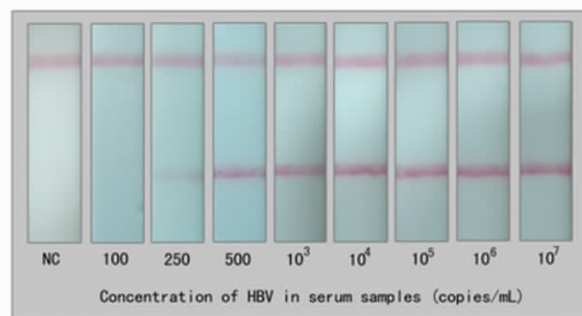


图 4 核酸试纸条法检测条件的优化

Fig.4 Optimization of the conditions in nucleic acid dipstick assay.

(a) Effect of buffer components on the signal intensity of the test zone in the dipstick. (b) Effect of sample-loading volume on the signal intensity of the test zone in the dipstick. (c) Evaluation of the sensitivity using different amount of PCR amplicons as the loading sample. TE: Tris EDTA; NC: Negative control.

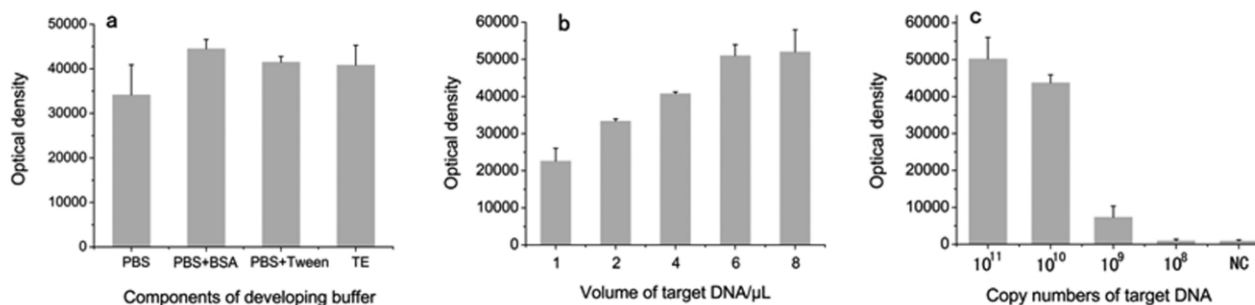


图 5 PCR 扩增结合核酸试纸条检测乙肝病毒的灵敏度

Fig.5 The sensitivity of nucleic acid dipstick coupled with PCR amplification for HBV detection. NC: Negative control.

2.6 临床样品的检测

为了考察方法的准确性和特异性,收集了 15 例正常人的血清以及 33 例 HBsAg 阳性血清,首先按血清标志物的检测结果对样本分成四类(见表 2),然后对这些样本进行 PCR 扩增,并使用核酸试纸条检测扩增产物。同时用 qPCR 作为对照,检测结果见表 2。结果表明,类 15 例正常人样本在核酸试纸条上都没有出现阳性信号,试纸条法与试剂盒法结果完全一致。

类(大三阳)为急性或慢性乙型肝炎感染样本,传染性强,理论上 HBV 病毒载量应较大,核酸试纸条与 qPCR 的检测结果相同,阳性检出率均为 88.2%,其中 2 例患者使用两种方法均未检出 HBV DNA。推测可能和扩增区域碱基发生突变有关,据文献报道,乙肝病毒 7 种亚型总的突变率在 8%~15%之间^[6],其中前 C/C 区、X 区、前 S 区和 S 区等处均存在变异的可能性^[7,8];也不排除由于药物治疗对病毒核酸的复制产生了抑制作用,使血清中病毒浓度低于 PCR 法的检测下限。类为“小三阳”,核酸试纸条和定量 PCR 的检出率均为 72.7%,过去认为“小三阳”的传染性小,病毒载量低,本文的结果表明这种认识是片面的,“小三阳”样本中 HBV-DNA 的检出率依然很高。11

例中有 3 例未检出。这可能与乙肝病毒发生前 C 区基因突变或机体发生特异性的免疫耐受有关^[9],因此,第 类患者应定期检查肝功能、HBV-DNA 等,并结合临床表现,确定是否进行抗病毒治疗。对其它两类少见类型样本(IV 类和 V 类),虽然病例不多,但两种方法均给出了 100% 的检出率,表明对于除大、小三阳以外的血清型,我们仍应给予足够重视,及时进行病毒核酸的筛查并制定相应的治疗措施。

3 讨论

本研究通过将聚合酶链反应与胶体金免疫层析技术相结合,建立了一种试纸条可视化检测乙肝病毒核酸的方法。目前使用 qPCR 检测乙肝病毒,虽然热循环时同样将退火延伸步骤合并,但由于读板温度设定在 60 $^{\circ}\text{C}$,因此升降温的时间较长,需运行约 90 分钟。而我们通过优化引物设计,使引物的退火温度达到 70 $^{\circ}\text{C}$,接近 Taq 酶最适延伸温度,同时将变性温度降低至 90 $^{\circ}\text{C}$,这些改进使 PCR 扩增时间缩短了 45 min,由于试纸条的检测时间约 10 min,所以本文建立的方法可以在 60 min 内完成检测,比实时荧光 PCR 的检测速度快了 30 min。其次特

异性好 ,使用的两对抗体 / 半抗原系统在亲和力极高的同时并不出现交叉反应现象 ,检测 15 例阴性样本时无一例假阳性出现。在特异性较高的基础上 ,试纸条的灵敏度并无降低 ,核酸试纸条最高能检测 250 copies/mL 的阳性样本。据文献报道 ,窗口期 HBV DNA 在血清中的载量为 50 copies/mL ~5 × 10⁴

copies/mL^[10]。我们通过增大提取血样的体积 ,使用 500 μ L 的血清提取病毒核酸 ,证明试纸条也能够成功检测 50 copies/mL 的病毒血样 ,即对处于窗口期的患者也能够进行快速可视化筛查。

表 2 临床样本的检测结果

Table 2 Detection results of different clinical samples by NADA and qPCR

Sample groups	HBV serum-markers					No. of samples	No. of samples (%) detected by:	
	HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HBcAb		NADA	qPCR
-	-	-	-	-	-	15	15 (100)	15 (100)
+	-	+	-	+	+	17	15 (88.2)	15 (88.2)
+	-	-	+	+	+	11	8 (72.7)	8 (72.7)
+	-	-	-	+	+	4	4 (100)	4 (100)
+	-	+	+	+	+	1	1 (100)	1 (100)

本文成功建立了一种乙肝病毒核酸试纸条检测方法。初步的临床应用结果证明 ,该方法灵敏度高 ,特异性好 ,操作简单快速 ,结果能够用裸眼判读 ,无需特殊检测仪器。本方法的建立为乙肝病毒的流行病学调查及预防控制奠定了一定的基础。

参 考 文 献(References)

[1] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中国病原生物学杂志, 2011,1: 67-77
Chinese Society of Hepatology and Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B, Journal of Pathogen Biology [J]. 2011, 1: 67-77(In Chinese)

[2] Guirgis BS, Abbas RO, Azzazy HM. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications [J]. Int J Infect Dis, 2010, 14 (11): e941-e953

[3] Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Laperche S, et al. Performance of version 2.0 of the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan real-time PCR assay for hepatitis B virus DNA quantification [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(10): 3641-3647

[4] Brada D, Roth J. "Golden blot"--detection of polyclonal and monoclonal antibodies bound to antigens on nitrocellulose by protein

A-gold complexes [J]. Anal Biochem, 1984, 142(1): 79-83

[5] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia [J]. Science, 1985, 230(4732): 1350-1354

[6] Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses [J]. J Gen Virol, 2002, 83(6): 1267-1280

[7] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Sequence analysis of pre-S/surface and pre-core/core promoter genes of hepatitis B virus in chronic hepatitis C patients with occult HBV infection [J]. J Med Virol, 2002, 68 (2): 216-220

[8] De Mitri MS, Morsica G, Cassini R, et al. Low replication and variability of HBV pre-core in concomitant infection with hepatitis B and hepatitis C viruses [J]. Arch Virol, 2007, 152(2): 395-404

[9] De Mitri MS, Cassini R, Morsica G, et al. Virological analysis, genotypes and mutational patterns of the HBV precore/core gene in HBV/HCV-related hepatocellular carcinoma [J]. J Viral Hepat, 2006, 13(9): 574-581

[10] Biswas R, Tabor E, Hsia CC, et al. Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection [J]. Transfusion, 2003, 43(6): 788-798