

# KingFisher 磁珠提取纯化系统 在新流感及动物致病性疫病快速检测中的应用

编译：欧阳志坚 高莹

近年来,全球不断有新的流感及动物性疫病的发生,从2003年的非典到2009年甲型H1N1流感病毒在墨西哥、美国等快速传播感染数千人,新型流感及致病性疫病的快速检测与诊断成为防止大规模疫病传播和感染的重要环节,目前正在全球各地传播的甲型H1N1流感是猪或人的一种急性、人畜共患呼吸道传染性疾病,属新型甲型流感病毒,该毒株包含有猪流感、禽流感和人流感三种流感病毒的基因片段,是一种新型流感病毒,可以人传染人,根据世界卫生组织最新报道,全球甲型H1N1流感蔓延至全球超过70个国家和地区,接近3万人感染,有超过140人死亡。目前世卫组织已经正式公布甲型H1N1流感已经蔓延全球,流感大流行的警戒级别已经提升到最高的第六级。

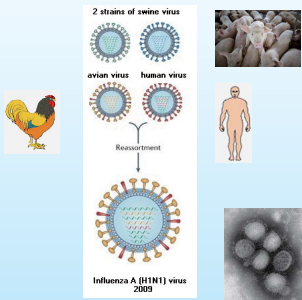


图1：新型甲型H1N1病毒结构

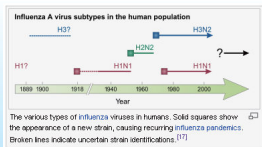


图2: 甲型H1N1病毒核酸基因分析图: 显示为新型流感病毒

快速诊断和确诊甲型 H1N1 流感病毒成为全球各国控制甲型流感疫情的重点。根据世界卫生组织 (WHO), 美国 CDC 及中国卫生部公布《人感染猪流感诊疗方案 (2009 版)》中确定甲型流感 H1N1 确诊方法均为核酸诊断的方法, 即从呼吸道标本 (咽拭因子) 或血清中分离病毒 RNA; 通过荧光定量 RT-PCR 对上述标本检测确认是否有感染甲型 H1N1 病毒。在整个诊断和确诊过程中, 最重要的步骤之一是从呼吸道标本 (咽拭因子) 或者血清中分离病毒 RNA, 也是快速诊断疫情的重要环节。世界卫生组织 (WHO) 于 2009 年 4 月 28 日公布的 CDC qRT-PCR 检测方法中分为两个步骤, 第一步待检样品中病毒核酸的提取, 即病毒 RNA 的提取。在此步骤中 WHO 推荐了两种核酸纯化方法: 磁珠法和硅胶膜离心柱法。第二步进行荧光定量 RT-PCR,

确定是否含有甲型 H1N1 型病毒的特异性片段。同时, 核酸诊断的方法也大量用于动物致病性疫病如禽流感、新城疫病毒、牛痘疾病病毒、猪瘟、蓝耳病、狂犬病、牛海绵状脑病 BSE 等疫情的流调和诊断。

KingFisher 磁珠提取纯化系统非常适合于新型流感病毒和动物致病性疫病的快速检测。通过专利的 KingFisher 技术, 通过特制的磁棒吸附、转移和释放磁珠, 从而实现磁珠 / 样品的转移。避免液体处理过程, 提高自动化程度和提取的速度, 可从不同的来源的样品如咽拭因子、血清、血浆、细胞培养物等获得高质量和高重复性的 DNA/RNA 样品。获得的样品可以直接用于 PCR、qRT-PCR 等试验。

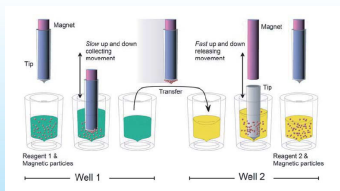


图3: 专利的KingFisher技术工作原理: 移动磁珠/样品, 而非液体

KingFisher 磁珠提取纯化系统是一个开放磁珠纯化平台，商业化的磁珠试剂盒都可以在该系统上运行，如用以下用于病毒 RNA 提取的各种试剂盒均可在 KingFisher 磁珠提取纯化系统，并有相应的经确认的磁珠纯化程序供大家下载，下载地址为 [www.thermo.com/kingfisher](http://www.thermo.com/kingfisher)。

- ◆ NucleoMag Virus, Macherey-Nagel\*
- ◆ InviMag Virus RNA, Invitex\*
- ◆ MagMAX Viral Ambion (ABI)\*
- ◆ Magna Pure RNA or total NA, Roche\*
- ◆ Chemagic Viral, chemagen\*
- ◆ Viral RNA extraction kit, Bioeasy

根据样品的起始量及处理样品的量，KingFisher 磁珠提取纯化系统提供三种不同的选择：



20-200  $\mu$ l for KingFisher  
24 sample



200-5000  $\mu$ l for KingFisher Flex  
24-96 sample



50-1000  $\mu$ l for KingFisher mL  
15 sample

图4：KingFisher磁珠提取纯化平台3种机型选择

#### KingFisher磁珠提取纯化系统流感病毒高通量检测中的应用举例：禽流感病毒的检测

**实验材料：**收集的待检测因子 1290 个样本，每 3 个来自于同一取样点的样品汇集 (pool) 于一孔，成为 430 份样品。

**实验仪器及耗材：**KingFisher 96 (KingFisher Flex 的前身) 和 Ambion MagMax Viral RNA Extraction Kit，禽流感特异性引物，RT-PCR 试剂盒

**实验流程：**430 份样品分别置于 96 孔 Kingfisher 板中提取 RNA，每板设阴阳对照，共 5 板，通过 Kingfisher 96，15 分钟内提取纯化 96 份样品的 RNA。提取得到的 RNA，用禽流感特异性引物，加入 RT-PCR 试剂，进行 RT-PCR，结果通过凝胶电泳。

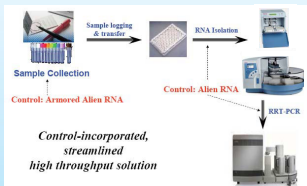


图5：KingFisher 磁珠纯化系统结合 Ambion MagMax Viral RNA Extraction Kit 工作流程

### 实验结果:

1、病毒敏感性实验: 200ul起始样品; 洗脱于10ul洗脱液; 取2ul作RT-PCR  
数据显示KingFisher方法提取的病毒RNA比常规方法具有更高的灵敏度。

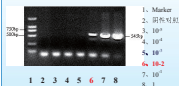


图6. 氯仿/异戊醇提取样品RT-PCR电泳图

2、1290个样品中, 检出2个阳性, 后经病毒学方法确认, 而另一禽流感检测实验室平行检测的1290个样本结果, 未检出阳性, 结果可见该方法可检出阳性, 具有更高的敏感度和可靠性。

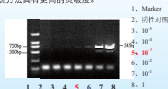


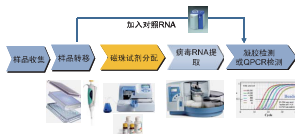
图7. Kingfisher 96提取的样品RT-PCR电泳图

该方法也被美国农业部用于禽流感检测, 详细资料可见美国联邦政府总务署网站 <http://www.fbo.gov/>

### 小结: KingFisher磁珠提取纯化系统用于禽流感病毒检测优点:

- ◆ 极高灵敏度: 可从100-400ul样品中分离到至少10拷贝的病毒RNA
- ◆ 检测速度快: 对于96个样品, 整个磁珠提取纯化病毒RNA过程为15-30分钟, 整个A型流感检测过程不超过4个小时
- ◆ 衡量样品的线性检测: 真实反映衡量病毒样品的含量, 避免假阴性
- ◆ 线性纯化效率低至50转录子
- ◆ 经美国国家兽医服务实验室(NVSL)认证可用于AI/ND病毒

赛默飞世尔动物物流感快速筛查全面解决方案: 无 RNase 超纯水系统, Multidrop 自动分液器, KingFisher 全自动磁珠提取纯化仪, Finnpiptette 移液器, Nunc 采样管及微孔板



### 目前全球多个实验室利用KingFisher磁珠提取纯化系统进行禽流感及动物致病性疫病快速检测:

- ◆ 美国农业部购买15套KingFisher用于禽流感检测
- ◆ 日本国立传染病研究所刚购买5套 KingFisher Flex和Ambion (ABI) 病毒RNA试剂盒共同用于甲型H1N1流感检测
- ◆ 韩国的Catholic University 刚刚购买KingFisher mL用于病毒RNA检测。
- ◆ 世卫组织 (WHO) 越南实验室: KingFisher用于病毒检测
- ◆ 澳大利亚和新西兰的KingFisher也主要应用于病毒RNA检测。
- ◆ 中国农业部兽医CDC KingFisher 96 用于禽流感病毒RNA提取检测
- ◆ 中国农业部中国兽医监察所 KingFisher 96 用于猪瘟病毒DNA及RNA提取
- ◆ 广东省动物防疫监督总站 KingFisher 96 用于动物疫病检测

### 致谢

KingFisher磁珠提取纯化系统流感病毒高通量检测中的应用举例: 禽流感病毒的检测, 所有实验数据均由农业部兽医CDC友情提供, 深表感谢!