

中文摘要

华支睾吸虫 RPA 可视化检测方法的建立与初步应用

华支睾吸虫，又名肝吸虫，是一种危害严重的人兽共患病原，成虫寄生于宿主的肝胆管及胆囊中，引起多种肝胆疾病，严重感染者甚至会导致死亡。世界卫生组织于 2009 年将其列为 I 类生物性致癌因子。目前全球约有 1500 万人感染患病，2015 年公布的我国第三次人体重点寄生虫病现状调查结果显示，我国居民感染人数约为 600 万人。鉴于华支睾吸虫病广泛的危害性，对该病的及时检测和精准医疗具有重要公共卫生意义。

目前诊断华支睾吸虫感染的“金标准”是病原学粪便虫卵检测，但该方法检测难度较高，极易出现漏诊、误诊的问题。因此，临床亟需建立更加高效、准确的华支睾吸虫病检测方法。分子生物学检测具有较高的特异性和敏感性，但目前常用的 PCR、qPCR 等方法存在检测操作繁琐、耗时长等缺点。重组酶聚合酶扩增技术（Recombinase Polymerase Amplification, RPA）作为一种新兴的恒温分子诊断方法，已在多个领域广泛应用，其优势在于能够在恒温条件下进行扩增，耗时短，易于操作，同时具有较高的灵敏性及特异性，因此有望为华支睾吸虫病的防控提供新的检测方法和技术支持。

本研究基于重组酶聚合酶扩增技术，分别与荧光探针及侧向流动层析试纸条结合，建立了针对华支睾吸虫的可视化检测方法。具体内容如下：

1. 华支睾吸虫荧光 RPA（Exo-RPA）检测方法的建立。通过序列对比，筛选出华支睾吸虫特异性线粒体基因 Unit R6 为靶标基因设计引物和探针，建立 Exo-RPA 反应体系，优化反应条件。用所建立的方法检测不同发育阶段的华支睾吸虫，并对其特异性和灵敏度评估。结果表明，Exo-RPA 方法能够在 39°C 条件下 20 min 内实现对华支睾吸虫成虫、囊蚴及虫卵的快速检测，通过绘制实时荧光曲线实现结果判读；该方法与东方次睾吸虫、肝片吸虫、亚洲带绦虫、猪带绦虫、牛带绦虫、隐孢子虫均无交叉反应，特异性良好；对华支睾吸虫基因组 DNA 的最低检测限为 10 fg/ μ L，对含有目的片段的重组质粒的最低检测限为 10^2 copies/ μ L。

2. 华支睾吸虫侧向流动层析试纸条RPA (LFD-RPA) 检测方法的建立。为简化操作流程, 便于基层应用, 本研究进一步建立并优化了LFD-RPA反应体系, 筛选出华支睾吸虫特异性线粒体基因COX1 为靶标基因设计引物和探针, 同样对所建立方法进行华支睾吸虫不同发育阶段的检测、特异性验证和灵敏度评估。结果表明, 所建立的LFD-RPA方法能够在 39°C下 20 min内实现华支睾吸虫DNA的快速扩增, 5 min内完成对试纸条的结果判读; 该方法与东方次睾吸虫、肝片吸虫、亚洲带绦虫、猪带绦虫、牛带绦虫、隐孢子虫均无交叉反应, 特异性良好; 对华支睾吸虫基因组DNA的最低检测限为 100 fg/ μ L, 对含有目的片段的重组质粒的最低检测限为 10^3 copies/ μ L。

3. 华支睾吸虫Exo-RPA、LFD-RPA的初步应用。首先对人工污染的鱼肉样品和粪便样品分别用所建立的Exo-RPA和LFD-RPA方法进行检测, 结果表明Exo-RPA的最低检出限为 1 囊蚴/克鱼肉、1 虫卵/克粪便, LFD-RPA的最低检出限为 1 囊蚴/克鱼肉、2 虫卵/克粪便, 均优于“金标准”。随后应用Exo-RPA、LFD-RPA、PCR和镜检方法对华支睾吸虫病流行区的 50 份鱼肉样品和 50 份人粪便样品进行检测, 并将检测结果联合比对分析, Exo-RPA、LFD-RPA两种方法检测鱼肉样品的阳性率均为 68% (34/50), 检测粪便样品的阳性率均为 44% (22/50), 所建立的两种方法能够准确检测出临床样品中的华支睾吸虫。

综上, 本研究建立了华支睾吸虫Exo-RPA和LFD-RPA两种检测方法, 并对两种方法的初步应用进行了评价。所建立的两种方法均具有良好的特异性和敏感性, 能够实现对华支睾吸虫病原的快速可视化检测, 为华支睾吸虫现场诊断及防控提供技术支持。

关键词:

华支睾吸虫, 重组酶聚合酶扩增, 荧光探针, 侧向流动层析试纸条, 可视化检测

目 录

前 言.....	1
第一篇 文献综述.....	3
第一章 华支睾吸虫概述	3
1 华支睾吸虫的形态特点及生活史.....	3
2 华支睾吸虫流行病学分布特点.....	3
3 华支睾吸虫病临床症状.....	4
4 华支睾吸虫病的治疗及预防.....	5
第二章 华支睾吸虫诊断方法的研究进展	6
1 病原学诊断	6
2 影像学诊断	7
3 免疫学诊断	7
3.1 酶联免疫吸附试验 (ELISA)	7
3.2 间接血凝实验 (IHA)	8
3.3 免疫荧光实验 (IF)	8
4 分子生物学诊断.....	9
第三章 重组酶聚合酶等温扩增技术.....	11
1 RPA 技术原理.....	11
2 RPA 检测方法.....	12
2.1 实时荧光 RPA (Exo-RPA)	12
2.2 侧向流动层析试纸条 RPA (LFD-RPA)	13

2.3 RPA 检测方法的应用	14
第四章 研究的目的是与意义	16
第二篇 研究内容.....	17
第一章 华支睾吸虫 Exo-RPA 检测方法的建立	17
1 实验材料	17
1.1 主要材料.....	17
1.2 仪器.....	18
1.3 试剂.....	18
1.4 主要试剂配制.....	19
2 实验方法	19
2.1 华支睾吸虫囊蚴收集与纯化	19
2.2 华支睾吸虫成虫的收集.....	20
2.3 华支睾吸虫虫卵的收集.....	20
2.4 基因组 DNA 的提取	20
2.5 Exo-RPA 特异性引物、探针的设计与筛选	21
2.6 华支睾吸虫 Exo-RPA 目的质粒构建	22
2.7 Exo-RPA 反应体系的建立与优化	23
2.8 Exo-RPA 方法对不同发育时期华支睾吸虫检测	23
2.9 华支睾吸虫 Exo-RPA 方法特异性检测	23
2.10 华支睾吸虫 Exo-RPA 方法灵敏度检测	24
3 结果	24
3.1 华支睾吸虫成虫、囊蚴、虫卵的收集	24

3.2 Exo-RPA 引物的设计与筛选	25
3.3 Exo-RPA 反应体系优化.....	26
3.4 Exo-RPA 方法对不同发育时期华支睾吸虫检测	27
3.5 华支睾吸虫 Exo-RPA 方法特异性检测	27
3.6 华支睾吸虫 Exo-RPA 方法灵敏性检测	28
4 讨论	29
5 小结	30
第二章 华支睾吸虫 LFD-RPA 检测方法的建立	31
1 实验材料	31
1.1 主要材料.....	31
1.2 仪器.....	32
1.3 试剂及耗材.....	32
1.4 主要试剂配制.....	33
2 实验方法	33
2.1 基因组 DNA 的提取	33
2.2 LFD-RPA 特异性引物、探针的设计与合成	33
2.3 华支睾吸虫 LFD-RPA 目的质粒构建	34
2.4 LFD-RPA 反应体系的建立与优化	34
2.5 LFD-RPA 方法对不同发育时期华支睾吸虫检测	35
2.6 华支睾吸虫 LFD-RPA 方法特异性检测	35
2.7 华支睾吸虫 LFD-RPA 方法灵敏度检测	35
3 结果	35

3.1 LFD-RPA 引物的设计与筛选	35
3.2 LFD-RPA 反应体系优化	36
3.3 LFD-RPA 方法对不同发育时期华支睾吸虫检测	38
3.4 华支睾吸虫 LFD-RPA 方法特异性检测	38
3.5 华支睾吸虫 LFD-RPA 方法灵敏性检测	39
4 讨论	40
5 小结	41
第三章 Exo-RPA 与 LFD-RPA 对临床样品的初步应用	42
1 实验材料	42
1.1 主要材料	42
1.2 仪器	42
1.3 试剂及耗材	43
1.4 主要试剂配制	43
2 方法	43
2.1 华支睾吸虫囊蚴、虫卵收集	43
2.2 样品基因组 DNA 提取	44
2.3 样品镜检方法	45
2.4 人工污染样品的检测	46
2.5 实际临床样品检测	46
3 结果	47
3.1 华支睾吸虫囊蚴镜检	47
3.2 盐酸乙醚离心沉淀法检测华支睾吸虫虫卵	48

3.3 人工污染样品的检测.....	48
3.4 实际临床样品检测.....	50
3.5 检测方法的对比.....	55
4 讨论	55
5 小结	57
结 论.....	59
参考文献.....	60
导师简介.....	72
作者简介及在学期间成果	73
致 谢.....	74

中英文缩写对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
bp	Base pair	碱基对
ddH ₂ O	Double distilled water	双蒸水
RPA	Recombinase polymerase amplification	重组酶聚合酶扩增技术
Exo	Exonuclease III	核酸外切酶 III
nfo	Endonuclease IV	核酸外切酶IV
LFD	Lateral flow dipstick	侧向流动层析试纸条
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	环介导等温扩增
FAM	Carboxy fluorescein	羧基荧光素
THF	Tetrahydrofuran	四氢呋喃
BHQ	Black hole quencher	黑洞猝灭剂
EPG	Egg per gram	每克粪便虫卵数
MPG	Metacercaria per gram	每克鱼肉囊蚴数

前 言

华支睾吸虫病，又称肝吸虫病，是一种危害严重的人畜共患寄生虫病，通常由于人类及其他哺乳动物生食或半生食含有活的囊蚴的淡水鱼虾而引起^[1]，能够对公众健康造成严重危害。华支睾吸虫的生活史相对复杂，在生长发育不同阶段存在多个寄生宿主，成虫主要寄生于终末宿主——哺乳动物的肝胆管中，在人体中最久能存活 26 年，每日大约产生 2000-4000 个虫卵，虫卵随粪便被排出体外后能够被第一中间宿主淡水螺类吞食，在其体内继续发育，最终形成尾蚴逸出，并侵入第二中间宿主淡水鱼虾的肌肉等组织，在其中继续发育为囊蚴，被人类或其他哺乳动物食入后引发感染^[2]。近年来，随着饮食文化的多元化、全球化，人们的饮食结构发生改变，腌制品、生鱼、生虾等的食用范围越来越广，食用人群越来越多，极大增加了人们感染华支睾吸虫的风险。

目前全球约有 1500 万人感染患病，主要分布于中国、越南、老挝、韩国及俄罗斯等国家。我国居民感染人数约为 600 万人^[3]。其中华支睾吸虫流行区主要分布于东南部的广东^[4]、广西^[5]；东北部的黑龙江^[6]、吉林^[7]；中南部的湖南^[8]等地。患者感染程度较轻时，无临床症状或仅出现消化不良、上腹不适等轻微临床症状；中度感染时出现胆管壁增厚、管腔狭窄等症状；重度感染时胆管虫体大量堆积引发胆管阻塞、胆汁滞留，进一步发展为化脓性胆管炎、胆管肝炎，晚期形成肝硬化、胆管细胞癌等。2009 年世界卫生组织将华支睾吸虫感染归于一类致癌物^[9]。

华支睾吸虫生存区域广泛，中间宿主普遍存在，导致华支睾吸虫能够广泛流行并引发长期感染，威胁人民群众健康，因此快速准确地诊断及预防华支睾吸虫具有非常重要的意义。目前，粪便检测是判断是否感染该病的检测“金标准”，但是也存在感染早期不排虫卵、形态鉴别难度较大和虫卵较小易漏检等缺点。近年来，以PCR为代表的分子生物学检测方法因其高敏感性、高特异性的优点被广泛应用于本病的诊断中^[10-12]，但传统的分子生物学检测方法存在检测成本较高、检测时间长、结果判读需大型仪器、难以适应现场实地检测等缺点，因此建立一种成本较低、能够实现快速、可视化检测的华支睾吸虫检测方法十分重要。

本研究将能够实现快速扩增核酸的重组酶聚合酶扩增技术与能够实现可视化判读结果的荧光探针法与试纸条法结合，通过筛选特异性引物及探针，优化反应条件，建立了华支睾吸虫Exo-RPA和LFD-RPA检测方法，所建立的方法快速高效，特异性、敏感性良好，能够实现实际临床样品的检测，为华支睾吸虫现场快速检测提供技术支持。

第一篇 文献综述

第一章 华支睾吸虫概述

1 华支睾吸虫的形态特点及生活史

华支睾吸虫属后睾科支睾属吸虫，生活史相对复杂。成虫体型较小，长约 10-25 mm，宽约 3-5 mm，体形狭长，呈扁平的形状，前端尖细，后部钝圆。成虫的体表有纵向的皱褶，这有助于它们在胆管中固定。成虫有一个口吸盘和一个腹吸盘，能够辅助其附着在胆管上，其中口吸盘略大于腹吸盘，腹吸盘位于虫体前段 1/5 处^[13]。华支睾吸虫成虫每天可产 2000 至 4000 个卵，虫卵能够随粪便排出宿主体外。卵呈椭圆形，形态如芝麻，长约 27-35 μm ，宽约 12-20 μm ，黄褐色，外壳透明，卵的前端较窄有小盖，肩峰明显，后端钝圆有小疣状突起，卵内部有一个正在发育的毛蚴^[14]。虫卵被第一中间宿主吃掉后，能够在宿主肠道中孵化出毛蚴并进入肠壁。毛蚴呈椭圆形，大小约为 100-200 μm 。它们有一个尾部，可以通过游动的方式移动，毛蚴在体内继续发育为胞蚴、雷蚴、尾蚴。约 95 d 后，尾蚴从淡水螺体内逸出，感染淡水鱼虾，约 45 d 后，发育为囊蚴^[15]。囊蚴具有感染性，呈囊状，长约为 120-150 μm ，宽约 85-140 μm ，囊壁由细胞分泌的物质构成，可以保护囊蚴使其免受宿主的免疫攻击，囊内有一卷曲的幼虫，即后尾蚴，在囊内不断做旋转运动，排泄囊中充满钙质黑褐色颗粒。当哺乳动物食入了感染后的鱼虾，在胃液的消化作用下，囊蚴会暴露出来，当囊蚴随消化液进入宿主十二指肠后，在胰蛋白酶与半胱氨酸蛋白酶的联合作用下^[16]，可在 10 min 内脱囊形成童虫^[17]。童虫沿胆汁快速逆行，在宿主肝胆管内继续发育为成虫，终末宿主感染约 30 d 后，即可在粪便中检测到虫卵。

2 华支睾吸虫流行病学分布特点

人感染华支睾吸虫的主要途径是生食或未煮熟食用了感染了华支睾吸虫囊蚴的淡水鱼虾。目前，全世界约有 1500 万人感染^[18]，在中国，华支睾吸虫病是发展最快的食源性寄生虫病之一，我国第三次人体重点寄生虫病现状调查显示^[3]，我国约有 600 万人感染，主要分布于长江流域、珠江流域和黄河流域^[19]，

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/628005016031006140>