

· 论著 ·

磁珠提取法和离心柱提取法在实时荧光定量聚合酶链反应中幽门螺杆菌核酸提取效果的对比研究

彭贤慧^{1,2}, 周丽雅³, 何利华^{1,2}, 宋志强³, 张建中^{1,2}

【摘要】 目的 比较磁珠提取法和离心柱提取法在实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 中幽门螺杆菌 (HP) 核酸提取效果、重复性及临床标本检测能力。方法 将 $10^0 \sim 10^{-6}$ 系列梯度稀释的 HP 标准菌株作为模板, 分别采用磁珠提取法和离心柱提取法平行提取 HP 核酸, 比较两种提取方法的核酸提取效果、变异系数 (CV); 将 35 份胃液标本作为模板, 分别采用磁珠提取法和离心柱提取法平行提取 HP 核酸, 比较两种提取方法对临床标本的检测能力。结果 两种核酸提取方法提取 10^0 、 10^{-5} 浓度 HP 标准菌株核酸的 CT 值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 离心柱提取法提取 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 浓度 HP 标准菌株核酸的 CT 值低于磁珠提取法 ($P < 0.05$)。两种提取方法提取 HP 标准菌株核酸的 CV 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。两种提取方法提取胃液 HP 核酸的 CT 值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 磁珠提取法在实时荧光定量 PCR 中的 HP 核酸提取效果优于离心柱提取法, 而其重复性及临床标本检测能力与离心柱提取法相当。

【关键词】 聚合酶链反应; 幽门螺杆菌; 磁珠提取法; 离心柱提取法

【中图分类号】 R 349.82 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2017.04.y01

彭贤慧, 周丽雅, 何利华, 等. 磁珠提取法和离心柱提取法在实时荧光定量聚合酶链反应中幽门螺杆菌核酸提取效果的对比研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2017, 25 (4): 51-55. [www.syxnf.net]

PENG X H, ZHOU L Y, HE L H, et al. Comparison of nucleic acid extraction effect on *H. pylori* in real-time fluorescence quantitative PCR between magnetic bead method and spin column method [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2017, 25 (4): 51-55.

Comparison of Nucleic Acid Extraction Effect on *H. pylori* in Real-time Fluorescence Quantitative PCR between Magnetic Bead Method and Spin Column Method PENG Xian-hui^{1,2}, ZHOU Li-ya³, HE Li-hua^{1,2}, SONG Zhi-qiang³, ZHANG Jian-zhong^{1,2}

1. Prevention and Control Institute for Infectious Disease, Chinese Center for Disease Control and Prevention (National Key Laboratory for Infectious Disease), Beijing 102206, China

2. Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Hangzhou 310003, China

3. Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100191, China

Corresponding author: ZHANG Jian-zhong, E-mail: zhangjianzhong@icdc.cn

【Abstract】 Objective To compare the nucleic acid extraction effect, repeatability and clinical specimens detection ability on *H. pylori* in real-time fluorescence quantitative PCR between magnetic bead method and spin column method.

Methods Standard strains of *H. pylori* with diluted concentration from 10^0 to 10^{-6} were prepared as templates and nucleic acid of *H. pylori* was parallelly extracted by magnetic bead method and spin column method, then nucleic acid extraction effect and coefficient of variation were compared between the two methods; meanwhile 35 specimens of gastric fluid were prepared as templates and nucleic acid of *H. pylori* was parallelly extracted by magnetic bead method and spin column method, then nucleic acid extraction effect was compared between the two methods. **Results** No statistically significant differences of nucleic acid CT value was found in standard strains of *H. pylori* with 10^0 or 10^{-5} diluted concentration between the two methods ($P > 0.05$),

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAI06B02)

1. 102206 北京市, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 (传染病控制国家重点实验室)

2. 310003 浙江省杭州市, 感染性疾病诊治协同创新中心

3. 100191 北京市, 北京大学第三医院消化科

通信作者: 张建中, E-mail: zhangjianzhong@icdc.cn

while nucleic acid CT value extracted by spin column method was statistically significantly lower than that extracted by magnetic bead method in standard strains of *H. pylori* with 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-6} diluted concentration, respectively ($P < 0.05$). No statistically significant differences of coefficient of variation was found in nucleic acid extraction of standard strains of *H. pylori* between the two methods ($P > 0.05$). No statistically significant differences of nucleic acid CT value of *H. pylori* was found in specimens of gastric fluid ($P > 0.05$). **Conclusion** Magnetic bead method has better nucleic acid extraction effect on *H. pylori* than spin column method in real-time fluorescence quantitative PCR, while the two methods have similar coefficient of variation and clinical specimens detection ability.

【Key words】 Polymerase chain reaction; *Helicobacter pylori*; Magnetic bead extraction; Spin column extraction

幽门螺杆菌 (*helicobacter pylori*, HP) 是导致慢性胃炎、胃溃疡、胃癌等胃肠道疾病的重要病原体。近年研究发现, HP 感染可能还与胃肠道之外疾病密切相关,特别是心血管疾病^[1-3]和脑血管疾病^[4-6];此外, cagA 基因型 HP 感染与冠心病发病有关^[7]。因此,早期准确检测特定基因型 HP 并给予及时有效的治疗对预防心脑血管疾病具有重要的临床意义。以往临床筛查胃肠道疾病患者 HP 主要采用快速尿素酶检测、呼气试验、抗原抗体检测等方法,但上述方法准确率不高。因此,建立一种准确、简便的 HP 检测方法对开展 HP 与心脑血管疾病相关性研究至关重要。

实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 是一种灵敏、特异、快速、准确的核酸定量检测技术,目前已广泛用于医学^[8]、食品^[9]、微生物学^[10]等领域。核酸提取是分子生物学的基础和关键, DNA 模板的浓度和纯度直接影响荧光定量 PCR 结果的准确性,因此选择合适的核酸提取方法非常重要。提取核酸的传统方法主要包括胍盐裂解法^[11]、碱裂解法^[12]、CTAB 裂解法^[13]及酚抽提法^[14]等,但上述核酸提取方法需大量生物样本,且操作步骤繁杂、耗时长、提取效率低、自动化程度低。随着分子生物学及高分子材料学的快速发展,传统核酸提取方法已逐渐被固相吸附载体为主的新方法取代,尤其是离心柱提取法、二氧化硅基质法、阴离子交换法及磁珠提取法等。目前,应用较广泛的核酸提取方法是离心柱提取法,但该方法对实验仪器依赖性高、成本昂贵,不适合大样本筛查研究。磁珠提取法有效解决了以上问题,且磁珠提取法还具有操作步骤简单、耗时少、自动化程度高等特点。本研究旨在比较磁珠提取法和离心柱提取法在实时荧光定量 PCR 中 HP 核酸提取效果、重复性及临床标本检测能力,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验标本 HP 标准菌株 (ATCC26695) 由传染病所诊断室保存,培养 48 h 后采用 0.85% 氯化钠溶液稀释至浓度为 OD_{600} ($OD_{600} = 1.0$), 将 HP 标准菌株分别稀释为 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ; 随机选取 35 份快速尿素酶试验阳性的胃液标本,由北

京大学第三人民医院提供。

1.1.2 实验试剂 EmerTher 磁珠法基因组 DNA 提取试剂盒 (上海医脉赛科技有限公司) 和 QIAamp DNA Mini Kit (德国 QIAGEN 公司)。

1.1.3 引物与探针 用于实时荧光定量 PCR 的 HP 引物和探针由传染病控制国家重点实验室设计,检测灵敏度为 101 copies/ μ l (构建质粒)。

1.1.4 仪器 实时荧光定量 PCR 采用 Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System 荧光检测系统。

1.2 方法

1.2.1 胃液预处理 取 1 ml 胃液加入 1.5 ml 离心管中,加入等量 Tris 缓冲液 (0.67 M, pH 值 7.4), 振荡均匀,室温下放置 2 h。13 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液留沉淀。

1.2.2 离心柱提取法 按照 QIAamp DNA Mini Kit 说明书进行操作,具体步骤如下: (1) 在经预处理的胃液沉淀中加入 180 μ l 组织裂解液 (ATL) 和 20 μ l 蛋白酶 K, 振荡混匀,置于金属浴或空气摇床中, 56 $^{\circ}$ C 振荡 2 h; (2) 从金属浴或空气摇床中取出离心管,进行短暂离心,在离心管中加入 200 μ l 细胞裂解液 (AL), 振荡混匀; (3) 离心管置于金属浴中, 70 $^{\circ}$ C 振荡 10 min, 8 000 r/min 离心 10 s; (4) 在离心管中加入 200 μ l 新鲜无水乙醇, 振荡混匀, 短暂离心; (5) 将离心管中的液体全部转入到离心柱中, 8 000 r/min 离心 1 min, 弃去废液, 保留柱子; (6) 将柱子转入到一个新的废液收集管中, 加缓冲液 AW 1 500 μ l, 之后 8 000 r/min 离心 1 min, 弃去废液, 保留柱子; (7) 将柱子转入到一个新的废液收集管中, 加缓冲液 AW 2 500 μ l, 之后 13 000 r/min 离心 3 min, 弃去废液, 保留柱子; (8) 将柱子转入到一个新的废液收集管中, 13 000 r/min 离心 1 min, 将柱子转入到一个新的 1.5 ml 离心管中, 在生物安全柜中打开盖晾 2 min; (9) 在柱子中加入 100 μ l DNA 溶解液——buffer AE, 盖上盖放置 5 min, 8 000 r/min 离心 1 min, 收集洗脱出含 DNA 的液体; (10) 将收集的含 DNA 的液体重新加入柱子中, 盖上盖放置 5 min, 8 000 r/min 离心 1 min, 收集 DNA, 弃去柱子, 置于 -80 $^{\circ}$ C 环境中保存。

1.2.3 磁珠提取法 按照 EmerTher 磁珠法基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行操作, 具体步骤如下: (1) 在经预处理的胃液沉淀中加入 700 μl 裂解吸附液, 混合均匀, 裂解细胞 6 min; (2) 加入 50 μl 磁珠悬浮液, 振荡混合 10 min; (3) 用磁分离架吸附磁珠, 弃上清液; (4) 加入 1.0 ml 洗涤液 I 洗涤磁珠, 吸附磁珠, 弃上清液; (5) 再次加入 1.0 ml 洗涤液 I 洗涤磁珠, 吸附磁珠, 弃上清液; (6) 加入 850 μl 洗涤液 II 洗涤磁珠, 吸附磁珠, 弃上清液; (7) 再次加入 850 μl 洗涤液 II 洗涤磁珠, 吸附磁珠, 弃上清液后静置 3~6 min, 去除乙醇残留; (8) 加入 100 μl 无核酶水 (nuclease-free water), 混合均匀后洗脱 5 min; (9) 吸附磁珠, 回收含基因组 DNA 的洗脱液至另一离心管中。以上操作均在同批实验中完成, 提取 3 次取平均值。

1.3 实时荧光定量 PCR 体系及热循环参数 实时荧光定量 PCR 体系采用 invitrogen Platinum[®] Taq DNA Polymerase Kit。PCR 体系为 20 μl , 其中 10 \times buffer 2 μl , 0.4 mM dNTP, 2 mM Mg^{2+} , 0.5 mM 上、下游引物, 0.2 mM Taqman 探针。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s (采集荧光), 40 个循环。采用 CT 值反映 HP DNA 含量。

1.4 观察指标 以 $10^0 \sim 10^{-6}$ 系列梯度稀释的 HP 标准菌株作为模板, 分别采用两种提取方法平行提取 HP 核酸, 比较两种提取方法核酸提取效果、变异系数 (CV); 将 35 份胃液标本作为模板, 分别采用两种提取方法平行提取 HP 核酸, 比较两种提取方法核酸提取效果。

1.5 统计学方法 应用 SAS 9.0 统计软件进行数据处理, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用两独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种核酸提取方法对不同浓度 HP 标准菌株核酸提取效果比较 两种核酸提取方法提取 10^0 、 10^{-5} 浓度 HP 标准菌株核酸的 CT 值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 磁珠提取法提取 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 浓度 HP 标准菌株核酸的 CT 值高于离心柱提取法, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见表 1)。两种核酸提取方法提取的不同浓度 HP 标准菌株核酸的拷贝数指数见表 2, 将离心柱提取法提取的不同浓度 HP 标准菌株核酸的拷贝数指数作为参照 (均定义为 100%), 两种核酸提取方法提取不同浓度 HP 标准菌株核酸的相对拷贝数指数见图 1。

2.2 两种核酸提取方法提取 HP 标准菌株核酸的重复性比较 磁珠提取法提取 HP 标准菌株核酸的 CV 为

(1.32 ± 0.79), 离心柱提取法提取 HP 标准菌株核酸的 CV 为 (0.98 ± 0.64), 两种提取方法提取 HP 标准菌株核酸的 CV 比较, 差异无统计学意义 ($t = 1.675$, $P = 0.361$, 见表 3)。

表 2 两种核酸提取方法提取不同浓度 HP 标准菌株核酸的拷贝数指数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of copy number index in standard strains of *H. pylori* with different diluted concentration between the two methods

方法	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
磁珠提取法	7.95	6.66	5.20	3.58	2.05	1.04	0.36
离心柱提取法	7.90	7.10	5.83	4.38	3.35	1.99	1.45

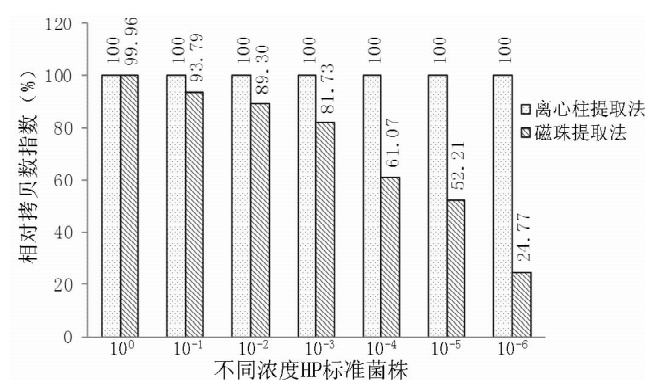


图 1 两种核酸提取方法提取不同浓度 HP 标准菌株核酸相对拷贝数指数的柱形图

Figure 1 Column chart for relative copy number index in standard strains of *H. pylori* with different diluted concentration between the two methods

表 3 两种核酸提取方法提取不同浓度 HP 标准菌株核酸的 CV

Table 3 CV in standard strains of *H. pylori* with different diluted concentration of the two methods

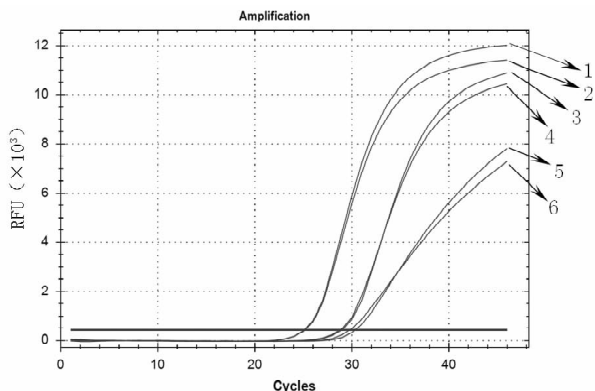
方法	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
磁珠提取法	1.08	0.58	2.17	2.03	2.22	0.49	0.70
离心柱提取法	2.04	1.03	1.18	0.70	0.21	1.41	0.31

2.3 两种核酸提取方法临床标本检测能力比较 磁珠提取法提取胃液 HP 核酸的 CT 值为 (24.32 ± 4.76), 离心柱提取法提取胃液 HP 核酸的 CT 值为 (23.41 ± 3.56), 两种提取方法提取胃液 HP 核酸的 CT 值比较, 差异无统计学意义 ($t = 0.369$, $P = 0.924$)。对于 HP 含量较高的样本 1 和样本 2, 两种核酸提取方法所得 CT 值无差异, 但磁珠提取法荧光强度较高; 对于 HP 含量较低的样本 3, 离心柱提取法所得 CT 值稍高, 但磁珠提取法荧光强度较高, 见图 2。

表1 两种核酸提取方法提取不同浓度 HP 标准菌株核酸的 CT 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of nucleic acid CT value in standard strains of *H. pylori* with different diluted concentration between the two methods

方法	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
磁珠提取法	14.01 ± 0.15	17.82 ± 0.10	22.12 ± 0.48	26.91 ± 0.55	31.43 ± 0.70	34.40 ± 0.17	36.41 ± 0.25
离心柱提取法	14.00 ± 0.28	16.52 ± 0.17	20.28 ± 0.24	24.55 ± 0.17	27.58 ± 0.06	31.59 ± 0.45	33.19 ± 0.10
t 值	2.560	6.637	1.629	0.989	0.947	14.422	9.554
P 值	0.889	0.001	0.003	0.001	<0.001	0.053	0.020



注：1、2 分别为磁珠提取法、离心柱提取法提取样本 1；3、4 分别为磁珠提取法、离心柱提取法提取样本 2；5、6 分别为磁珠提取法、离心柱提取法提取样本 3

图2 两种核酸提取方法提取胃液 HP 核酸的实时荧光定量 PCR 扩增曲线

Figure 2 Amplification curve of real-time fluorescence quantitative PCR for nucleic acid extraction of *H. pylori* in specimens of gastric fluid

3 讨论

近年来，HP 感染与心脑血管疾病的相关性已引起国内外广泛关注^[15-16]，但检测 HP 尚缺乏合适的方法，特别是 HP 分型及其样品处理。实时荧光定量 PCR 技术因敏感、快速、特异、准确等优点而广泛用于病原微生物核酸检测^[17-19]，其中 DNA 模板的质量和纯度对扩增结果具有重要影响，而选择合适的核酸提取方法对实验结果亦很重要^[20-21]。本研究从实际情况出发，旨在评价磁珠提取法和离心柱提取法在实时荧光定量 PCR 中 HP 核酸提取效果。

本研究结果显示，离心柱提取法提取 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁶ 浓度 HP 标准菌株核酸的 CT 值低于磁珠提取法，提示磁珠提取法在提取低浓度样本时核酸提取效果优于离心柱提取法。本研究结果还显示，两种核酸提取方法重复性及临床标本检测能力相当。目前，离心柱提取法应用较广泛，该方法是利用高分子硅材料吸附 DNA 的特征，通过高盐酸性缓冲液去除样品中 RNA 和蛋白质等杂质，通过低盐碱性缓冲液洗脱结合在吸附柱上的 DNA。离心柱提取法虽具有较高的核酸提取效果，但因需反复离心而对仪器设备依赖性较高，不利于

大规模样品筛查及突发疫情的现场监测和控制。磁珠提取法能有效解决离心柱提取法的缺点，其通过纳米磁珠特异性吸附 DNA 的原理而实现对核酸的简单高效提取，具有其他方法无可比拟的优势：（1）自动化程度高：不需要有机溶剂，也不需要反复离心，仅以核酸结合磁珠为基础，极大地减少了对操作人员的危害，并降低了对仪器设备的要求；（2）高通量：能同时对多样本进行核酸提取，现有许多自动化工作站能同时对 96 个样品进行处理，如 MagNA Pure LC 2.0 System (Roche)、BioRobot MDx Workstation (QIAGEN)、LabTurbo (Thermo Fisher) 等；（3）操作步骤简单、人工耗时短：整个操作流程大概需要 30 min；（4）成本低廉，适用于大规模样品筛查及检测。

综上所述，磁珠提取法在实时荧光定量 PCR 中的 HP 核酸提取效果优于离心柱提取法，而其重复性及临床样本检测能力与离心柱提取法相当，但磁珠提取法具有操作简单、耗时少、成本低廉及自动化程度高等特点，适合大规模样品筛查及检测。

作者贡献：彭贤慧进行试验设计、撰写论文、成文并对文章负责；彭贤慧、何利华进行试验实施、评估、结果整理；周丽雅、何利华、宋志强进行资料收集整理；张建中进行质量控制及审核。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] AIELLO A E, DIEZ - ROUX A, NOONE A M, et al. Socioeconomic and psychosocial gradients in cardiovascular pathogen burden and immune response: the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. Brain Behav Immun, 2009, 23 (5): 663 - 671. DOI: 10. 1016/j. bbi. 2008. 12. 006.
- [2] TAMER G S, TENGIZ I, ERCAN E, et al. Helicobacter pylori seropositivity in patients with acute coronary syndromes [J]. Dig Dis Sci, 2009, 54 (6): 1253 - 1256. DOI: 10. 1007/s10620 - 008 - 0482 - 9.
- [3] JHA H C, PRASAD J, MITTAL A. High immunoglobulin A seropositivity for combined Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori infection, and high-sensitivity C-reactive protein in coronary artery disease patients in India can serve as atherosclerotic marker [J]. Heart Vessels, 2008, 23 (6): 390 - 396. DOI: 10. 1007/s00380 - 008 - 1062 - 9.
- [4] DE BASTIANI R, GABRIELLI M, UBALDI E, et al. High

- prevalence of Cag - A positive *H. pylori* strains in ischemic stroke: a primary care multicenter study [J]. *Helicobacter*, 2008, 13 (4): 274 - 277. DOI: 10. 1111/j. 1523 - 5378. 2008. 00610. x.
- [5] DIOMEDI M, STANZIONE P, SALLUSTIO F, et al. Cytotoxin - associated Gene - A - positive *Helicobacter pylori* strains infection increases the risk of recurrent atherosclerotic stroke [J]. *Helicobacter*, 2008, 13 (6): 525 - 531. DOI: 10. 1111/j. 1523 - 5378. 2008. 00627. x.
- [6] WASAY M, JAFRI W, KHEALANI B, et al. *Helicobacter pylori* gastritis and risk of ischaemic stroke [J]. *J Pak Med Assoc*, 2008, 58 (7): 368 - 370.
- [7] 曹平良, 刘小强, 唐琼珍, 等. 不同基因型幽门螺杆菌与冠心病的相关性研究 [J]. *中国医药导报*, 2011, 8 (29): 24 - 26. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673 - 7210. 2011. 29. 010.
- [8] 鲍鑫, 刘向国, 刘茜. 实时荧光定量 PCR 技术研究及其在医学领域的应用 [J]. *医学理论与实践*, 2013, 26 (12): 1579 - 1580, 1583. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001 - 7585. 2013. 12. 018.
- [9] 程海星, 郭月英, 任霆, 等. 实时荧光定量 PCR 技术原理及在食品检测中的应用 [J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41 (3): 243 - 247.
- [10] 李春娟, 张一兵, 罗喜钢, 等. 荧光定量 PCR 技术在临床微生物检测中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2011 (2): 66 - 69.
- [11] ULLRICH A, SHINE J, CHIRGWIN J. Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences [J]. *Science*, 1977, 196 (4296): 1313 - 1319.
- [12] BIRNBOIM H C, DOLY J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1979, 7 (6): 1513 - 1523.
- [13] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic acids research*, 1980, 8 (19): 4321 - 4325.
- [14] BLIN N, STAFFORD D W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes [J]. *Nucleic Acids Res*, 1976, 3 (9): 2303 - 2308.
- [15] 肖文平, 孙素芳, 张建中. 风湿性心脏病患者血管组织中幽门螺杆菌相关抗原的检测 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 20 (5): 430. DOI: 10. 3760/j. issn: 0254 - 5101. 2000. 05. 014.
- [16] 孙素芳, 肖文平, 赵玲, 等. 红细胞表面幽门螺杆菌相关抗原免疫组化分析 [J]. *中华内科杂志*, 2000, 39 (11): 764 - 765. DOI: 10. 3760/j. issn: 0578 - 1426. 2000. 11. 021.
- [17] BREEDING K M, RAGIPANI B, LEE K D, et al. Real - time PCR - based serotyping of *Streptococcus agalactiae* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38523. DOI: 10. 1038/srep38523.
- [18] FERNÁNDEZ - ÁLVAREZ C, GONZÁLEZ S F, SANTOS Y. Development of a SYBR green I real - time PCR assay for specific identification of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100 (24): 10585 - 10595.
- [19] SIKAZWE C T, CHIDLOW G R, IMRIE A, et al. Reliable quantification of rhinovirus species C using real - time PCR [J]. *J Virol Methods*, 2016, 235: 65 - 72. DOI: 10. 1016/j. jviromet. 2016. 05. 014.
- [20] 王玉倩, 薛秀花. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其在应用 [J]. *生物学通报*, 2016, 51 (2): 1 - 5.
- [21] 李金明. 实时荧光 PCR 技术 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2007.
- (收稿日期: 2017 - 01 - 15; 修回日期: 2017 - 04 - 12)
(本文编辑: 谢武英)

(上接第 50 页)

- [5] 中华医学会呼吸病学分会. 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南 (2016 年版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39 (4): 253 - 279.
- [6] 迟磊, 黄燕, 崔振泽. 隐源性机化性肺炎 [J]. *国际呼吸杂志*, 2015, 35 (24): 1890 - 1893.
- [7] DAVISON A G, HEARD B E, MCALLISTER W A, et al. Cryptogenic organizing pneumonitis [J]. *Q J Med*, 1983, 52 (207): 382 - 394.
- [8] CORDIER J F. Update on cryptogenic organising pneumonia (idiopathic bronchiolitis obliterans organising pneumonia) [J]. *Swiss Med Wkly*, 2002, 132 (41/42): 588 - 591.
- [9] LEE J W, LEE K S, LEE H Y, et al. Cryptogenic organizing pneumonia: serial high - resolution CT findings in 22 patients [J]. *Am J Roentgenol*, 2010, 195 (4): 916 - 922. DOI: 10. 2214/AJR. 09. 3940.
- [10] PARDO J, PANIZO A, SOLA I, et al. Prognostic value of clinical, morphologic, and immunohistochemical factors in patients with bronchiolitis obliterans - organizing pneumonia [J]. *Hum Pathol*, 2013, 44 (5): 718 - 724.
- [11] HISATOMI K, SAKAMOTO N, MUKAE H, et al. Elevated levels of tenascin - C in patients with cryptogenic organizing pneumonia [J]. *Intern Med*, 2009, 48 (17): 1501 - 1507.
- [12] OKADA F, ANDO Y, HONDA K, et al. Comparison of pulmonary CT findings and serum KL - 6 levels in patients with cryptogenic organizing pneumonia [J]. *Br J Radiol*, 2009, 82 (975): 212 - 218. DOI: 10. 1259/bjr/72775434.
- [13] KATO H, ISHII N, NOBUMOTO A, et al. Galectin-9 inhibits CD44 - hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176 (1): 27 - 35.
- [14] EPLER G R. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia, 25 years: a variety of causes, but what are the treatment options? [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2011, 5 (3): 353 - 361. DOI: 10. 1586/ers. 11. 19.
- [15] 梁关艳, 鲁艳明, 张瑶, 等. 宫颈癌患者血清中半乳糖素 9 的检测及临床意义 [J]. *中华医学杂志*, 2008, 88 (39): 2783 - 2785. DOI: 10. 3321/j. issn: 0376 - 2491. 2008. 39. 013.
- (收稿日期: 2017 - 01 - 15; 修回日期: 2017 - 04 - 11)
(本文编辑: 谢武英)