

反向斑点杂交检测泰泽病原体

赵婷婷¹, 严磊¹, 魏立雯², 韦莉³, 王会娟¹, 赖国旗¹, 谭毅¹

(1. 重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016; 2. 泸州医学院科技处实验动物中心, 四川 500016;
3. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

【摘要】 目的 建立一种简洁稳定、特异灵敏的检测泰泽病原体(Tyzzler's organism)的反向斑点杂交方法(reverse dot blot, RDB)。方法 根据泰泽病原体16S rDNA保守基因组序列设计引物和特异性探针,上游引物用生物素标记,进行PCR扩增,建立反向斑点杂交方法,用此法进行了特异性和灵敏度实验,同时,用RDB、ELISA和IFA对41只小鼠、38只大鼠进行了检测。结果 RDB特异性强,最低检测限为4.5 ng/ μ L。对79例实验动物的检测中,与ELISA检测结果一致性为100%,阳性率是7.59%(6/79);与IFA一致性为92.4%(73/79),IFA阳性率是0%。结论 建立了PCR扩增与分子杂交相结合的准确、灵敏、特异的泰泽病原体反向斑点杂交检测方法。

【关键词】 泰泽病原体;反向斑点杂交;实验动物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014)03-0072-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.015

Application of reverse dot blotting for detection of Tyzzler's organism

ZHAO Ting-ting¹, YAN Lei¹, WEI Li-wen², WEI Li³, WANG Hui-juan¹, LAI Guo-qi¹, TAN Yi¹

(1. Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;
2. Experimental Animal Center, Division of Science and Technology, Luzhou Medical College,
Sichuan 500016; 3. Chongqing Institute of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400016)

【Abstract】 Objective To establish a simple, stable, specific and sensitive method for detection of Tyzzler's organism by reverse dot blotting (RDB). **Methods** Primers and specific probes were designed according to the conservative sequence of Tyzzler 16S rDNA. The forward primer was labeled with biotin. The reverse dot blotting method was established followed by PCR amplification. The specificity and sensitivity of this method were determined. Next, 41 mice and 38 rats were examined by RDB, ELISA and IFA. **Results** The RDB method showed a high specificity, and in the testing of the 79 laboratory animals, its limit of detection was 4.5 ng/ μ L. Compared the results of ELISA and IFA, its consistence with ELISA was 100% and the positive rate was 7.59% (6/79), the consistence with IFA was 92.4% (73/79), and the positive rate was 0%. **Conclusions** An accurate, sensitive and specific method in combination with PCR and RDB in detection of Tyzzler's organism is established in this study.

【Key words】 Tyzzler's organism; Reverse dot blot; Laboratory animals

泰泽病原体属毛状芽孢杆菌(*Bacillus piliformis*),由日本学者 Ernest Tyzzler 于1917年首次在华尔兹小鼠群中发现并命名^[1]。其宿主范围较广,能感染大鼠、小鼠、豚鼠、地鼠、沙鼠、仓鼠、兔、猫、狗、马、牛、恒河猴、狐狸、袋鼠、熊猫、鸚鵡等动物,甚至可能感染人,特别是实验动物饲养人员^[2,3]。泰泽

病原体主要呈隐形或亚临床性感染,啮齿动物可成为其长期的携带者^[4]。当动物处于应激状态(环境条件改变、过度拥挤、长途运输等)、使用高蛋白饲料喂养或实验中使用免疫抑制剂,均会导致本病的流行,其对实验动物的健康和动物实验的顺利进行是一潜在威胁。国家标准规定泰泽病原体是清洁级

【基金项目】 重庆市科委科技创新能力建设项目《重庆市啮齿类实验动物工程技术研究中心》CSTC,2010CB5013。

【作者简介】 赵婷婷(1989-),女,硕士研究生。E-mail: zttmtt@sina.cn

【通讯作者】 赖国旗, E-mail: a68895078@21.cn.com。谭毅, E-mail: tanyee66@hotmail.com

及以上实验动物必须排除的病原体之一。

目前,可用于泰泽病原体检测的方法很多,如,组织病理学诊断、PCR 扩增、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫荧光试验(immuno fluorescence assay, IFA)等^[5]。其中 ELISA 法和 IFA 法是实验动物微生物质量检测国家标准。组织病理学诊断不够客观,PCR 法非特异性高,ELISA 法和 IFA 法检测灵敏度低。因这些检测方法的局限,使得泰泽病原体的检测成为了实验动物质量控制中的一个难题。

本实验尝试将反向斑点杂交和 PCR 扩增相结合,建立一种检测泰泽病原体的新方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物

实验动物为 38 只 SD 大鼠和 41 只小鼠(品种有 C₅₇BL/6、KM、BALB/c),来自重庆地区各实验动物中心,清洁级;沙门菌(*Salmonella sp.*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由重庆医科大学实验动物中心保存;小鼠肝炎病毒 A₅₉(mouse hepatitis virus, MHV-A₅₉)购自美国菌种保藏中心(ATCC)。Taq DNA 聚合酶、DH5 α 感受态细胞、pMD18-T 载

表 1 引物及探针

Tab. 1 The primers and probes used in this study

引物名称 Names of primers	引物序列 Sequences of primers
F1(外上游引物 Outside forward primer)	5'-AAC AGG ATT AGA TAC CC-3'
R1(外下游引物 Outside reverse primer)	5'-TGA CCG GCG GTG TGT ACA A-3'
F2(内上游引物 Inside forward primer)	5'-Biotin-GTG CTA GGT GTT GGG AAG-3'
R2(内下游引物 Inside reverse primer)	5'-TAC TTT ACG TAG CCT GTC AA-3'
探针 1 Probe 1	5'-dC-AGT GCT TAT TGC GTTT-dC-3'
探针 2 Probe 2	5'-dC-CGT TGC TTC GAA TTAA-dC-3'

1.2.2 泰泽病原体 DNA 提取

根据基因组 DNA 提取试剂盒使用说明,提取泰泽病原体阳性小鼠新鲜肝组织基因组 DNA。

1.2.3 外引物 PCR 扩增及 T 载体连接

(1)外引物 PCR 扩增

扩增体系为 5 \times Primix Taq 25 μ L, 20 μ mol/L 的 F1/R1 各 1 μ L, 模板 DNA 150 ng, ddH₂O 补足至 50 μ L。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 51 $^{\circ}$ C 退火 2 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 扩增产物进行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳及 NANODROP 2000 定量。

(2)pMD18-T-Tyzyer 连接并测序

按 pMD18-T 连接试剂盒使用说明,将 F1/R1

体、胶回收试剂盒、RNA 提取试剂盒(均为 TaKaRa 公司,日本)、基因组 DNA 提取试剂盒、碱性磷酸酶 SA-AP(均为 Promega 公司,美国)、蛋白胨、琼脂糖等(均为北京鼎国生物试剂公司,中国)、硝酸纤维素膜(Millipore 公司,美国)、BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,中国)、牛血清白蛋白(BSA)(Spain 公司,西班牙)、酶联免疫吸附试验试剂盒(江苏西山,中国)、免疫荧光试验试剂盒(中国医学科学院,中国)。

1.1.2 仪 器

1000-Series Thermal Cyclers PCR 仪、GelDocXR + 凝胶成像分析系统(BioRad 公司,美国)、NANO-DROP 2000(Thermo 公司,美国)、恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司,中国)、杂交槽(北京明威派胜医药科技有限公司,中国)。

1.2 方 法

1.2.1 引物和探针的设计

根据泰泽病原体 16S rDNA 序列设计 PCR 扩增引物^[5-7]和特异性探针(表 1),其中外引物为细菌 16S rDNA 通用引物,内引物根据泰泽病原体 16S rDNA 序列保守区设计,内引物的上游引物在 5' 端标记生物素,由 Invitrogen 公司合成。

PCR 扩增产物亚克隆到 pMD18-T 载体上,方法如下:pMD18-T 载体 1 μ L, PCR 产物 124 ng, ddH₂O 1 μ L, Solution 5 μ L。16 $^{\circ}$ C 连接 2 h, 全量加至 50 μ L DH5 α 感受态细胞,冰上放置 30 min, 42 $^{\circ}$ C 热激 45 s, 冰上放置 1 min, 加 450 μ L 不含氨苄抗性的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 振荡培养 60 min。9000 \times g 离心后弃上清, 均匀涂布于氨苄抗性的 L-琼脂平板培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h, 挑取单菌落于含氨苄抗性的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 16 h, 提取质粒 DNA, 送 Invitrogen 公司测序。

1.2.4 内引物 PCR 扩增

扩增体系为 5 \times Primix Taq 25 μ L, 20 μ mol/L 的 F2/R2 各 1 μ L, pMD18-T-Tyzyer DNA 150 ng,

ddH₂O 补足至 50 μL。扩增条件与外引物 PCR 扩增相同。扩增产物进行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳及 NANODROP 2000 定量。

1.2.5 杂交膜制备

将硝酸纤维素膜先后于 ddH₂O 和 2 × SSC、0.1% SDS 中浸泡 10 min, 挑选浸泡均匀的膜, 120℃ 烘烤 30 min, 后裁剪为约 4 mm 宽、4.5 cm 长的试剂条备用。以 pMD18-T-Tyzzzer 为模板, 用内引物进行 PCR 扩增, 将 PCR 扩增产物(含生物素标记)稀释成 3 ng/μL 作为阳性对照, 将生物素标记的内引物上游引物配制成 0.1 μmol/L 作为通用探针, 将探针 1 和探针 2 (poly-10C、15C、20C) 配制成 50 μmol/L。按阳性对照、通用探针、探针 1 和探针 2 的顺序各取 1 μL 点膜(图 1), 自然晾干后于 1500 × 0.1 mJ/cm² 进行紫外交联, 120℃ 烘烤 30 min 后室温干燥保存。

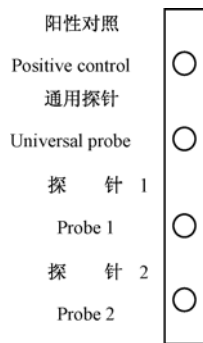


图 1 泰泽病原体检测试剂条示意图

Fig. 1 Diagram of the test strip of Tyzzzer's organism

1.2.6 反向斑点杂交条件优化

(1) 杂交条件优化

将制备好的杂交膜浸泡于 2 mL 杂交液(2 ×

SSC、0.1% SDS)中, 加入 40 μL PCR 变性产物(F2/R2 PCR 扩增产物 10 μL 和 0.4 mol/L NaOH 变性液 30 μL 于室温混合作用 15 min), 43℃、45℃ 或 48℃ 40 r/min 振荡杂交 1 h、1.5 h 或 2 h。

(2) 洗膜、孵抗和显色条件优化

杂交完毕后, 用杂交液室温漂洗 2~3 次, 3 分/次, 洗膜液(0.5 × SSC、0.1% SDS) 45℃ 或 50℃ 洗脱 20 min; TBS 室温漂洗 3 min, 将杂交膜浸泡于 2 mL SA-AP 液(TTBS 2 mL + BSA 0.1 g + SA-AP 1:2000、1:5000 或 1:7000), 37℃ 孵育 0.5 h、1 h 或 1.5 h; TBS 室温漂洗 3 min, 生物素缓冲液室温漂洗 3 min, 将杂交膜浸入 2 mL NBT/BCIP 显色工作液(碱性磷酸酯酶显色缓冲液 2 mL + 150 × NBT 13 μL + 300 × BCIP 6 μL 避光配制), 避光显色 20 min, 最后将杂交膜浸入蒸馏水中终止显色反应, 根据紫色斑点出现的位置直接判断杂交结果。

1.2.7 反向斑点杂交灵敏度及特异性检测

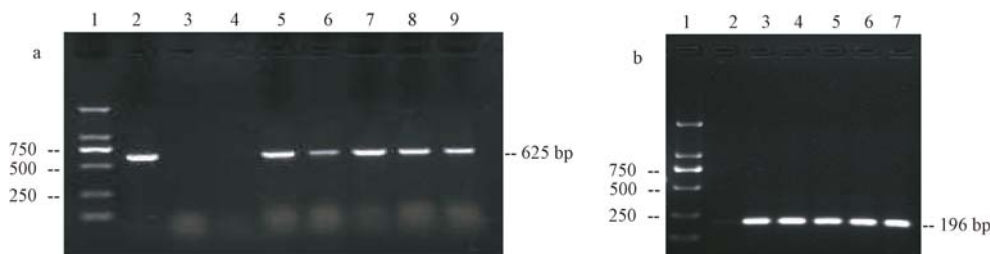
用 ddH₂O 稀释泰泽病原体 PCR 产物至 18 ng/μL、9 ng/μL、4.5 ng/μL 和 2.25 ng/μL, 按优化的 RDB 方法进行反向斑点杂交, 判断检测下限; 按参考文献^[8-10]方法分别扩增小鼠肝炎病毒、*Staphylococcus aureus* 和 *Salmonella sp.*, 并进行 RDB。

1.2.8 反向斑点杂交的应用

用 ELISA、IFA 和优化后的 RDB 对重庆地区 38 只大鼠和 41 只小鼠进行泰泽病原体检测, 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2.9 统计学分析

用软件 SSPS 17.0 对实验数据进行统计学分析。若 $P < 0.05$, 则有统计学差异。



注: a. 外引物 PCR 扩增结果。1. 2000 marker; 2-9. 样本 PCR 扩增结果。b. 内引物 PCR 扩增结果。1. 2000 marker; 2. 阴性对照; 3-7. 样本 PCR 扩增结果。

图 2 泰泽病原体 16S rDNA PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Note: a. Results of PCR amplified with outer primer 1. 2000 marker; 2-9. Results of samples. b. Results of PCR amplification with internal primer 1. 2000 marker; 2. Negative control; 3-7. Results of samples.

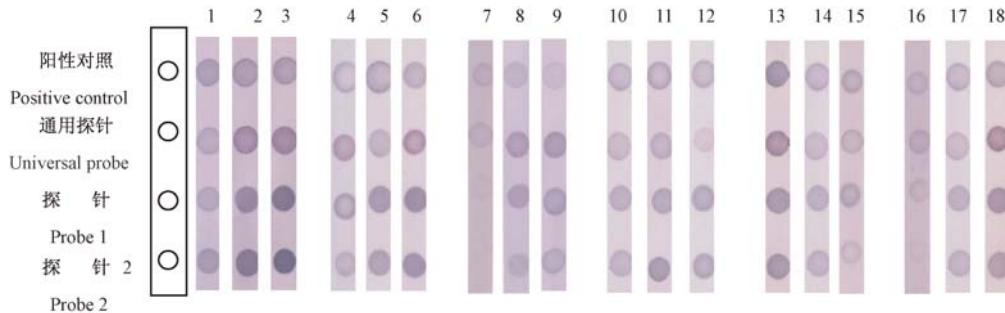
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of the PCR amplification products of Tyzzzer's organism 16S rDNA

2 结果

2.1 内外引物 PCR 扩增结果

泰泽病原体用外引物(F1/R1)PCR 扩增后目的片段为 625 bp(图 2 a);用内引物(F2/R2)PCR 扩增后目的片段为 196 bp(图 2 b),经测序后与泰泽病原体 16S rDNA 序列进行同源性比较,匹配率为 100%。

2.2 反向斑点杂交条件优化



注: 1. 探针均修饰 10C; 2. 探针均修饰 15C; 3. 探针均修饰 20C; 4. 探针浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$; 5. 探针浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$; 6. 探针浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$; 7. 杂交温度为 42 $^{\circ}\text{C}$; 8. 杂交温度为 45 $^{\circ}\text{C}$; 9. 杂交温度为 48 $^{\circ}\text{C}$; 10. 杂交时间为 1 h; 11. 杂交时间为 1.5 h; 12. 杂交时间为 2 h; 13. AP 浓度为 1:2000; 14. AP 浓度为 1:5000; 15. AP 浓度为 1:7000; 16. 孵育时间 0.5 h; 17. 孵育时间 1 h; 18. 孵育时间 1.5 h。

图 3 泰泽病原体反向探针斑点杂交条件优化

Note: 1. Probes modified 10C; 2. Probes modified 15C; 3. Probes modified 20C; 4. Concentration of the probe was 20 μM ; 5. Concentration of the probe was 50 μM ; 6. Concentration of the probe was 100 μM ; 7. Temperature of hybridization was 42 $^{\circ}\text{C}$; 8. Temperature of hybridization was 45 $^{\circ}\text{C}$; 9. Temperature of hybridization was 48 $^{\circ}\text{C}$; 10. Time of hybridization was 1 h; 11. Time of hybridization was 1.5 h; 12. Time of hybridization was 2 h; 13. Concentration of AP was 1:2000; 14. Concentration of AP was 1:5000; 15. Concentration of AP was 1:7000; 16. Time of antibody incubation was 0.5 h; 17. Time of antibody incubation was 1 h; 18. Time of antibody incubation was 1.5 h.

Fig. 3 Optimization of the conditions of Tyzzer's organism RDB detection

2.3 反向斑点杂交灵敏度和特异性

将 PCR 扩增后的产物用 ddH₂O 梯度稀释后,进行反向斑点杂交检测,当 PCR 产物浓度最低为 4.5 ng/ μL 时,可检测出泰泽病原体(图 4)。将泰泽病原体、小鼠肝炎病毒、*Staphylococcus aureus* 和 *Salmonella sp.* PCR 扩增产物分别进行反向斑点杂交检测,仅泰泽病原体检测结果为阳性(图 5)。

表 2 大、小鼠泰泽病原体检测结果

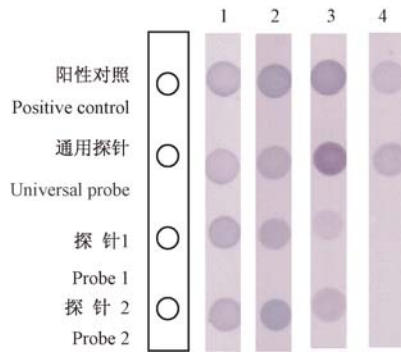
Tab. 2 Detection results of the rat and mouse Tyzzer's organism

检测结果(The results of examination)		RDB	ELISA	IFA
小鼠(n = 41) Mice	阳性数 Number of positive mice/只	1	1	0
	阴性数 Number of negative mice/只	40	40	41
	阳性率 Positive rate/%	2.44	2.44	0
大鼠(n = 38) Rats	阳性数 Number of positive rats/只	5	5	0
	阴性数 Number of negative rats/只	33	33	38
	阳性率 Positive rate/%	13.16	13.16	0
合计 Total	阳性数 Number of positive animals/只	6	6	0
	阴性数 Number of negative animals/只	73	73	79
	阳性率 Positive rate/%	7.59	7.59	0

将探针 1 和探针 2 在 3'端和 5'端分别用 10C、15C、20C 修饰,并将探针按 20、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度稀释后分别点样,在 42 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 和 48 $^{\circ}\text{C}$ 温度下分别杂交 1 h、1.5 h、2 h,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 与 1:2000、1:5000、1:7000 浓度的 SA-AP 孵育 0.5 h、1 h、1.5 h,结果发现探针 1 和探针 2 均修饰 15C、浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$,杂交温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 、杂交时间为 1 h,抗体浓度为 1:2000、孵育时间为 1 h 时,各斑点信号强度较好,并无非特异性染色(图 3)。

2.4 反向斑点杂交反应的应用

应用 ELISA、IFA 和 RDB 同时检测大、小鼠共 79 只,结果见表 2。ELISA 法和 RDB 法检测结果一样,均检测出 6 个阳性样本,阳性率均为 7.59%, $P > 0.05$,差异无显著性;而 IFA 法和 RDB 法检测结果差异有显著性, $P < 0.05$,差异有显著性。

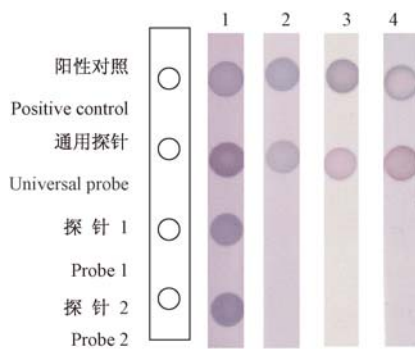


注: 不同 PCR 扩增产物浓度 1. 18ng/ μ L; 2. 9ng/ μ L; 3. 4.5ng/ μ L; 4. 2.25 ng/ μ L。

图 4 泰泽病原体反向斑点杂交灵敏度检测

Note: Different concentrations of PCR amplification products. 1. 18 ng/ μ L; 2. 9 ng/ μ L; 3. 4.5 ng/ μ L; 4. 2.25 ng/ μ L.

Fig. 4 Sensitivity of the RDB detection of Tyzzer's organism



注: 不同样本检测结果 1. 阳性对照; 2. MHV-A59; 3. 金黄色葡萄球菌; 4. 沙门菌。

图 5 泰泽病原体反向斑点杂交特异性检测

Note: Detection result of different samples. 1. Positive control; 2. MHV-A59; 3. *Staphylococcus aureus*; 4. *Salmonella* sp.

Fig. 5 Specificity of the RDB detection of Tyzzer's organism

3 讨论

泰泽病原体为专性胞内寄生菌,有嗜肝细胞性,对生长环境要求苛刻,不能在无细胞的人工培养基上生长,在无活体组织和活细胞时极易自溶。泰泽病原体可通过卵黄囊途径接种鸡胚进行增殖,但是该方法成功率较低,推广应用困难,严重制约了对泰泽病原体生物学特性,遗传致病机制,检测方法的研究。

目前,用于检测泰泽病原体的方法主要是 ELISA、IFA、可的松激发试验和 PCR 扩增。日本实验动物中央研究所、我国台湾及内陆研究人员均先

后发现并证实:在使用 ELISA 或 IFA 检测泰泽病原体时,梭菌会和泰泽病原体发生交叉反应而出现假阳性,故不能用于确诊实验动物泰泽病原体感染^[5]。并且 ELISA 和 IFA 等血清学检测方法对泰泽病原体的抗原抗体要求较高,病原体分离培养难度大,成本高,有效期短,不适合小样本筛检,故血清学方法的应用推广也变得困难。而可的松激发试验操作繁琐,周期长,大规模检测时可实施性较小,而 PCR 扩增灵敏度高,快速,但特异性较难保证。

反向斑点杂交的原理是将已知的特异性探针固化到硝酸纤维膜上,与 5' 端修饰有生物素的引物扩增的 PCR 产物进行杂交,通过对生物素显色,直观的判断杂交信号,即得出检测结果。该方法因快速、简便、特异、灵敏等优点,已广泛应用于病原体检测、基因突变、基因分型的研究^[11-14]。

本实验合成的两个寡核苷酸探针与基因库进行同源性比对,发现与之互补序列均为泰泽病原体所特异,与其他生物无同源性。结果判断:当显色对照和通用探针成立的前提下,两条探针检测结果均为阳性,则结果判为阳性;两条探针中有一条为阳性,则结果判为可疑;两条探针均为阴性,则结果判为阴性。此过程保证了该方法检测结果的可靠性。使用寡聚多胸腺嘧啶(dC)加尾,并用紫外交联、高温烘烤方式使探针牢固的固定于硝酸纤维膜上,确保了该检测方法的稳定性。经过杂交条件优化,确定了当探针均修饰 15C,浓度为 50 μ mol/L;杂交温度为 45 $^{\circ}$ C,杂交时间为 1 h;抗体的浓度为 1:2000,孵育时间为 1 h 时杂交信号最好,且无非特异性信号出现。通过对 79 例实验动物进行检测,并与 ELISA、IFA 进行比较,检测结果一致率分别为 100% 和 92.4%,RDB 与 ELISA 阳性检出率均为 7.59% (6/79),而 IFA 阳性检测率为 0% (0/79)。

本实验使用了线性试剂条,可用阅读卡进行阅读,相比于其他斑点杂交实验,其实验结果更为简洁、清晰^[11,12]。并且,建立的 RDB 克服了 ELISA、IFA 血清学检测方法成本高、不利于各单位小样本自检等缺点。将 PCR 扩增与反向斑点杂交相结合,并设计两条通用探针,弥补了 PCR 扩增的假阳性的不足。检测结果简洁直观、可靠稳定,可用于实验动物泰泽病原体的检测。

综上,本实验所建立的反向斑点杂交检测方法用于检测泰泽病原体,具有简洁、灵敏、特异、准确等优点,便于基层单位推广应用。同时,为探索实验动

物其他病原微生物的 RDB 方法的建立提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Fujiwara K. Tyzzer's disease [J]. Jap J Exp Med, 1978, 48: 467 - 480.
- [2] 姚菊芳. 某实验动物科技机构人员泰泽病原体感染血清学的调查 [J]. 上海实验动物科学, 1999, 19(4): 218.
- [3] Smith KJ, Skelton HG, Hilyard EJ. *Bacillus piliformis* infection in a patient infected with HIV-1: confirmation with 16s ribosomal RNA sequence analysis [J]. J Am Acad Dermatol, 1996, 34: 343 - 348.
- [4] Fujiwara K, Takagaki Y, Naiki M, et al. Tyzzer's disease in mice: effects of corticosteroids on the formation of liver lesions and the level of blood transaminases in experimentally infected animals [J]. Jpn J Exp Med, 1964, 34: 559 - 575.
- [5] 高正琴, 邢进, 王春玲, 等. 实验大鼠泰泽菌检测方法的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(3): 142 - 146.
- [6] Wilson KH, Blichington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction [J]. J Clin Microbiol, 1990, 28: 1942 - 1946.
- [7] Goto K, Itoh T. Detection of *Bacillus piliformis* by specific amplification of ribosomal sequences [J]. Exp Anim, 1994, 43(3): 389 - 394.
- [8] 赖国旗, 何明忠, 谭毅, 等. 小鼠肝炎病毒 RT-PCR 检测方法的研究 [J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2004, 26(6): 762 - 764.
- [9] 魏立雯, 韦莉, 张文露, 等. 反向线性探针杂交在检测试验动物沙门菌中的研究 [J]. 四川动物, 2013, 32(2): 195 - 198.
- [10] 韦莉, 魏立雯, 赖国旗, 等. 金黄色葡萄球菌反向线性杂交探针检测方法的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(6): 85 - 88.
- [11] 樊慧珍, 于化鹏, 黄少杰. 反向斑点杂交快速检测肺炎支原体 [J]. 实用医学杂志, 2005, 21(21): 2349 - 2351.
- [12] 赖国旗, 张文露, 胡源, 等. 反向线性探针杂交技术检测慢性乙型肝炎病毒拉米夫定耐药研究 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2012, 37(3): 113 - 119.
- [13] 赵丽, 张文露, 胡源, 等. 反向斑点杂交法快速检测 HBV 基因型反应条件的优化和建立 [J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(12): 85 - 89.
- [14] 田永强, 朱中元, 王海波. 人乳头瘤病毒线性杂交分型技术的建立及评价 [J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(3): 389 - 392.

[收稿日期] 2013-11-19

(上接第 71 页)

参 考 文 献

- [1] 方肇勤, 潘志强, 卢文丽, 等. 大鼠、小鼠常见证候计量化辨证方法的建立及其评价 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(7): 502 - 505.
- [2] 方肇勤. 大鼠/小鼠实验辨证论治方法学 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 56 - 86.
- [3] 方肇勤. 辨证论治实验方法学——实验小鼠证法和辨证 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006, 45: 132 - 153.
- [4] Bruix J, Cheng A, Kang Y, et al. Effect of macroscopic vascular invasion (MVI), extrahepatic spread (EHS), and ECOG performance status (ECOGPS) on outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) treated with sorafenib: analysis of two phase, randomized, double-blind trials [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(15): 4580.
- [5] 张志明, 黎乐群, 刘剑勇, 等. 索拉非尼治疗晚期原发性肝癌的疗效和安全性分析 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15(4): 352 - 354.
- [6] 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会, 中华医学会肝病学会肝癌学组. 原发性肝癌规范化诊治的专家共识 [J]. 临床肝胆病杂志, 2009, 25(2): 83 - 92.
- [7] 姜纯莲, 王广举, 李凤武. 中晚期肝癌及转移性肝癌灌注化疗、疗效观察 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2008, 11(8): 1160 - 1161.
- [8] 刘波, 刘乾贵, 越太迁, 等. 原发性肝癌介入化疗灌注与化疗栓塞疗效评价 [J]. 现代医药卫生, 2010, 26(16): 2469 - 2470.
- [9] Okusaka T, Kasugai H, Shioyama Y, et al. Transarterial chemotherapy alone versus transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma; a randomized phase III trial [J]. J Hepatol, 2009, 51(6): 1030 - 1036.
- [10] Yu YQ, Xu DB, Zhou XD, et al. Experience with liver resection after hepatic arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer, 2000, 71(1): 62 - 65.
- [11] 刘保延, 李洪蛟, 何丽云, 等. 证候疗效评价的研究进展 [J]. 中医杂志, 2009, 50(5): 397 - 399.
- [12] 方肇勤, 侯俐, 卢文丽, 等. 荷瘤小鼠证候的发生、演变、兼证及预后 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(1): 57 - 62.

[收稿日期] 2013-11-18