文章编号:1000-5404(2011)02-0177-05

论著

RCA技术检测甲型H1N1流感病毒耐药基因单碱基突变的应用研究

贾双荣,张可珺,陈 伟,邓少丽,唱 凯,李发科,陈 鸣 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科)

【摘要】 **目的** 建立一种检测甲型H1N1流感病毒耐药基因单碱基突变的滚环扩增技术(rolling cycle amplification,RCA)。**方法** 以甲型H1N1流感病毒耐药基因M2基因和NA基因为研究对象,设计检测该基因突变位点的环化探针,环化探针通过与发生单碱基突变的基因特异性结合并被连接成闭合环状,进行滚环扩增后从而特异性地检测单碱基突变。**讨论** 用于该检测的RCA技术的合适反应条件,通过对人工合成的野生型和突变型靶序列检测,确定该方法的特异性和灵敏度。最后通过对临床标本的检测及与测序结果比对,验证该方法的准确性。**结果** 检测单碱基突变需要严格的反应条件,采用热循环连接法和提高连接温度(65 ℃),保证了检测特异性。通过对含有不同浓度突变靶序列标本的检测确定了该方法能检测出最低1%含量的突变株。RCA技术检测结果与测序方法结果一致。**结论** 成功建立检测甲型H1N1流感病毒耐药基因单碱基突变的RCA技术。

【关键词】 滚环扩增;甲型H1N1流感病毒;单碱基突变;耐药
【中图法分类号】 Q754;R373.13;R446 **【文献标志码】** A

Detection of single base mutations of influenza A H1N1 resistance gene using rolling circle amplification

Jia Shuangrong, Zhang Kejun, Chen Wei, Deng Shaoli, Chang Kai, Li Fake, Chen Ming (Department of Clinical Laboratory Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

【Abstract】 Objective To establish a rolling circle amplification (RCA) method for detection of single base mutations of influenza A H1N1 resistance genes. Methods M2 and NA resistance gene of H1N1 were target gene in this research. Two circularizable probes (C-probe) were designed to detect these genes. C-probes were ligated to closed rings by DNA ligase when they specifically bond to target genes which had single base mutation. After the rolling circle amplification, the single base mutations were specifically detected. Optimal conditions for RCA method were studied, and the specificity and sensitivity of the method were determined by testing wild and mutation type artificial template. The specimens from clinic were detected and compared with sequencing method to confine its accuracy. Results Strict reaction conditions were needed for detection of single base mutation. Adopting heat cycle ligation and increasing the temperature (65 ℃) could make sure ligation fidelity. Through series detection of the target sequences with different concentrations, the lowest level of mutations detected by RCA was 1% of the total. RCA detection results were consistent with the sequencing method. Conclusion RCA technique is successfully used to detect single base mutation of influenza A H1N1 resistance genes.

【Key words】 rolling circle amplification; influenza A H1N1; single base mutation; resistance

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2007AA02Z416), the National Natural Science Foundation of China (30400107, 81071428). Corresponding author: Chen Ming, Tel: 86-23-68757601, E-mail: chenming1971@yahoo.com

甲型流感病毒(influenza A virus)是具有包膜的负RNA病毒,临床上常可引起严重的大爆发流行。随着抗病毒药物的广泛使用,流感病毒对抗病毒药物的耐药性增加,这给流感病毒爆发流行的防控带来了挑战。单碱基突变引起的单个氨基酸的置换,成为病毒产生耐药的原因,对单碱基突变的检测,可成为检测病毒是否耐药的标志。目前甲型H1N1流感病毒常在M2蛋

【基金项目】 国家高技术研究发展计划(863计划,2007AA02Z416);国家自然科学基金(30400107,81071428)
【通信作者】 陈 鸣,电话:(023)68757601,E-mail:chenming1971@yahoo.cn

白发生 V27A 和 S31N 突变导致对金刚烷胺耐药[1-2]，NA 蛋白 H274Y 突变导致对奥塞米韦耐药(商品名达菲)[3]。目前，通过运用滚环扩增技术(rolling cycle amplification，RCA)技术来进行基因分型和检测单核苷酸多态性[4-6]的研究已经取得了很大的突破。RCA 技术中的环化探针[7]能够并行地，高通量地检测单核苷酸突变。环化探针是一人工合成的寡核苷酸单链，探针两端分别有 15～30 个与 DNA 或 RNA 靶分子互补的核苷酸序列，单碱基突变位点设置在探针的 3′末端，探针的 5′端磷酸化。当探针与靶序列特异性结合后，探针的 3′端和 5′端处于毗邻的位置[8]，如果 3′端末碱基能与突变的碱基互补配对，那么环化探针能够在 DNA 连接酶的作用下，两端形成磷酸二酯键被封闭成环。环化后的探针可以通过一对引物进行恒温滚环支链扩增[9]，形成不同大小的 DNA 分子。扩增产物可在琼脂凝胶上形成梯级条带。相反，如果单碱基突变位点不能互补配对，那么环化探针不能被封闭成环，也不能进行滚环支链扩增。本研究利用 RCA 技术对甲型 H1N1 流感病毒耐药基因 M2 的 V27A 和 NA 基因的 H274Y 突变位点进行检测，初步验证该方法的特异性、灵敏度和准确性。

1 材料与方法

1.1 材料

人工合成的环化探针、引物和 DNA 靶序列由大连 TaKaRa 生物技术公司合成。甲型 H1N1 流感病毒总 RNA 由重庆市疾控中心提供。T_4 DNA ligase，Exonuclease Ⅰ，Revert Aid ™ First Strand cDNA Synthesis Kit #1621 (MBI 公司)；*Taq*DNA ligase，*Bst*DNA polymerase(NEB 公司)；PrimerSTAR DNA polymerase，dNTPs，DL1000™ DNA 标准(TaKaRa 公司)；常规 PCR 扩增仪(Mycycler，Bio-Rad，USA)；凝胶成像系统 VersarDoc1000(Bio-Rad，USA)。

1.2 方法

1.2.1 甲型 H1N1 流感病毒 M2、NA 蛋白序列及 cRNA 序列比对 进入 NCBI 网站，在流感病毒资源信息库中共搜索了以下序列，M2：ADD52540、ACY39828、ACR54998、ACR33000、BAG28205、ACR15317、ACV53893、ACU53893、ACU79994；NA：ACR54996、ACR57246、ACB32213、ACF33787、ACQ84460、ACA33538、ACF41870。利用 Clustalx 1.83 软件进行多序列比对。

1.2.2 环化探针、扩增引物设计及人工靶序列的合成 由于甲型流感病毒为易发生变异的负 RNA 病毒，各次爆发流行的病毒基因序列发生变异较大，这给环化探针的设计带来了难度。通过我们对各年份及地区病毒株序列分析，2009－2010 年爆发流行的病毒株之间序列保守，因此我们根据 2009 年世界各地流行的 H1N1 病毒株序列设计了检测探针。环化探针的设计按照 Zhang 等[10]的综述中关于环化探针的设计原则进行。探针的两端分别有 15～25 个碱基与靶序列互补，中间无关序列设计了 1 对通用扩增引物，使用 DNAMAN version. 6 软件对环化探针进行了二级结构分析，保证二级结构最小。并在NCBI 数据库中进行同源性比对，保证其特异性。为了更精确的验证 RCA 反应的特异性和灵敏性，采用人工合成的突变株靶序列和野生株靶序列作为检测模板。

1.2.3 环化探针的连接 T_4 DNA 连接酶连接法：反应总体积 10 μl，含有 ddH_2O 6 μl，100 nmol/L 的环化探针 1 μl，100 nmol/L 的检测模板 1 μl，10 × T_4 DNA ligase Buffer 1 μl，5 U/μl 的 T_4 DNA 连接酶 1 μl。混匀低速离心，置 37 ℃反应 60 min 后 70 ℃ 5 min 灭活。热循环连接法[11-12]：反应总体积 10 μl，含有 ddH_2O 6.75 μl，100 nmol/L 的环化探针 1 μl，100 nmol/L 的检测模板 1 μl，10 × *Taq*DNA ligase Buffer 1 μl，40 U/μl 的 *Taq*DNA 连接酶 0.25 μl。混匀低速离心，94 ℃ 4 min；94 ℃ 30 s，65 ℃ 5 min，15 个循环；95 ℃ 15 min 灭活 *Taq*DNA 连接酶。反应结束后立即将反应管冰浴 5 min。

1.2.4 核酸外切酶消化 向上述每 1 管中继续加入 10 μl 核酸外切酶Ⅰ混合液(含有 10 × Exonuclease I buffer 2 μl；20 U/μl 核酸外切酶Ⅰ 0.5 μl；ddH_2O 7.5 μl)，37 ℃保温 2 h 以彻底消化未连接的线型探针单链，再于 80 ℃反应 15 min 以灭活核酸外切酶。

1.2.5 RCA 反应 反应体积 25 μl：10 × *Bst* DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μl，10 μmol/L 的通用引物 Primer1 和 Primer2 各 1 μl，10 mmol/L dNTPs 1 μl，8 U/μl *Bst* DNA 聚合酶 0.5 μl，ddH_2O 14 μl，连接反应产物 5 μl。置 65 ℃反应 1 h。反应结束后取 8 μl 扩增产物于 2.0% 的琼脂糖凝胶上电泳 30 min，电压 100 V。凝胶成像仪下观察结果。同时检测突变株靶序列、野生株靶序列、其他不同基因的靶序列和未加入靶序列的蒸馏水样本。观察电泳图条带情况。以总含量为 10^{11} 拷贝数的检测模板，分别按突变株/野生株为 0∶100、0.1∶99.9、1∶99、10∶90、100∶0 的比例配置成突变株靶序列浓度为 0%、0.1%、1%、10%、100% 的溶液样本。检测 RCA 反应灵敏度，观察电泳结果。

1.2.6 M2 基因、NA 基因 RT-PCR 在 M2 基因和 NA 基因的保守区域设计了 2 对引物，保证扩增片段覆盖了突变位点。M2 正义链：5′-CAGCGATTCAAGTGATCCTCTC-3′，反义链：5′-CGTCAACATCCACAGCACTC-3′，扩增片段长度为 206 bp。NA 正义链：5′-CAACGGCATAATAACAGACACT-3′，反义链：5′-AGAATCAGGATAACAGGAGCAT-3′，扩增片段长度为 232 bp。将重庆市疾控中心提供的病毒总 RNA，用 RT-PCR 试剂盒反转录成 cDNA，操作过程严格按照说明书进行。cDNA PCR 反应体系：5 × PrimerStar 缓冲液 5 μl，10 mmol/L dNTPs 1 μl，10 μmol/L 的上下游引物各 0.5 μl，2.5 U/L 的 PrimerStar 高保真 DAN 聚合酶 0.25 μl，cDNA 模板 1 μl，ddH_2O 17.75 μl。M2 基因 PCR 反应条件：98 ℃ 10 s，68 ℃ 30 s，30 个循环。NA 基因 PCR 反应条件：98 ℃ 10 s，55 ℃ 5 s，72 ℃ 30 s，30 个循环。PCR 产物送 TaKaRa 公司测序。

1.2.7 临床标本验证 对 PCR 产物用 RCA 方法检测，操作过程同前，检测结果与测序结果比对。

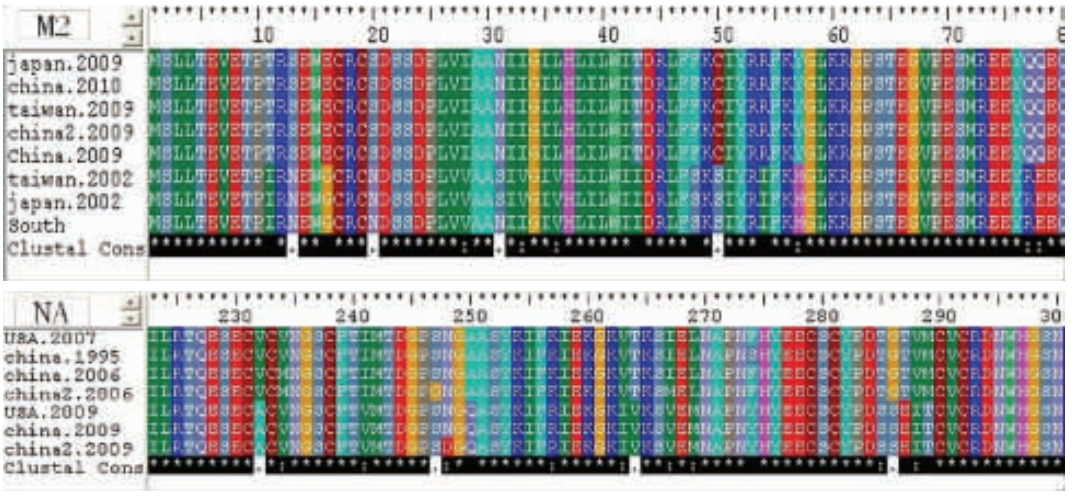


图 1　甲型 H1N1 病毒 M2、NA 蛋白氨基酸序列比对

2　结果

2.1　甲型 H1N1 流感病毒 M2、NA 蛋白氨基酸序列比对

比对结果(图 1)显示 2009－2010 年爆发流行的病毒株 M2 和 NA 蛋白序列几乎未发生改变,但与往年流行的甲流病毒比较存在很大变异,并且发现与耐药有关的 M2 蛋白中 S31N 的突变。由于甲流病毒变异较快,我们以 2009 年爆发流行的病毒基因序列设计检测探针(表 1)。

表 1　RCA 所用的环化探针及扩增引物

名称	序列	片段长度
M2 环化探针	5′-p-CGAGAGGATCACTTGAATCGCTTCATAGGTCTAC AGGTCTGCCATCATGCTGGAGCAAAAAGCTAGCCGT TCCTCACATCAGACGATATTTGCTGCAATGG-3′	101 bp
NA 环化探针	5′-p-ATAATTAGGGGCATTCATTTCGTCATAGGTCTAC AGGTCTGCCATCATGCTGGAGCAAAAAGCTAGCCGT TCCTCACATCAGACAGCATTCCTCATAGTA-3′	100 bp
引物 1	5′-TGGCAGACCTGTAGACCTATGA-3′	22 bp
引物 2	5′-AGCCGTTCCTCACATCAGAC-3′	20 bp

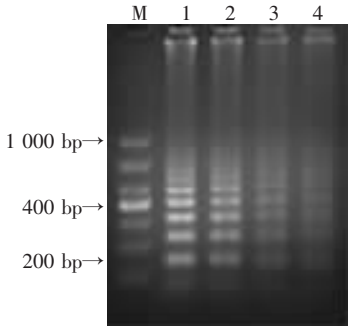
下划线表示探针两端与靶序列结合的检测序列。3′端末碱基与相应的突变碱基互补配对

2.2　RCA 反应体系建立及优化

采用 T_4 连接酶和 *Taq*DNA 连接酶热循环法两种方法连接环化探针,并将两者结果进行比较(图 2)。采用热循环连接法,梯级条带明显比采用 T_4 连接酶法的清晰,说明采用热循环法连接法能够提高环化探针的连接效率,从而提高检测的灵敏度。运用两种方法对 M2 野生株和 M2 突变株进行检测,野生株出现了假阳性结果。分析原因是由于连接温度过低,有突变碱基错配的可能性。本实验的 *Taq*DNA 连接酶的连接温度采用 60 ℃,T_4 连接酶采用温度 37 ℃。为了提高 RCA 的特异性,必须再提高连接温度。由于 T_4 DNA 连接酶不是耐热连接酶,因此在特异性方面也弱于 *Taq*DNA 连接酶。

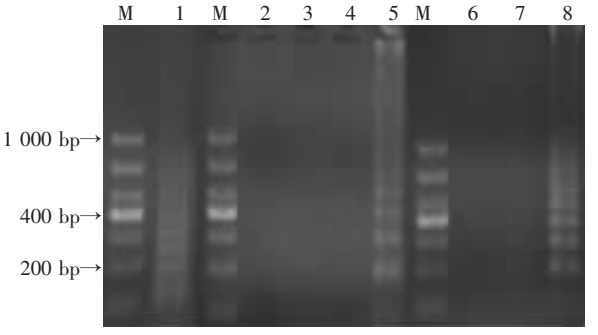
2.3　RCA 反应的特异性研究

采用 *Taq*DNA 连接酶热循环连接法,提高连接温度至 65 ℃,可保证单碱基突变检测的特异性。经过外切酶消化步骤后的检测结果背景更低,可消除 RCA 的非特异性扩增。未经消化步骤的检测结果显示,未被连接的环化探针单链可在引物的作用下出现非特异性扩增,电泳呈密集条带(图 3 中 1),虽然条带位置与阳性结果有差别,但造成了检测结果背景偏高的缺点。通过利用核酸外切酶消化掉未被连接的环化探针单链和其他靶序列单链,可明显降低 RCA 的非特异性扩增(图 3)。



M:DNA 标准(1 000 bp);1、3:M2 突变株;2、4:M2 野生株;1、2:采用热循环法连接;3、4:采用 T_4 DNA 连接酶连接

图 2　热循环连接法与 T_4 DNA 连接酶法检测 M2 基因突变位点

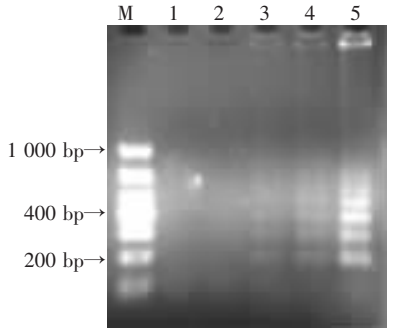


M:DNA 标准(1 000 bp);1:未加入靶序列(未经消化步骤处理);2、6:未加入靶序列(经消化步骤处理);3、8:M2 突变株;4:NA 野生株;5:NA 突变株;7:M2 野生株;2～5:使用 NA 环化探针检测;6～8:使用 M2 环化探针检测

图 3　反应条件优化后 RCA 技术检测 M2、NA 基因突变位点

2.4　RCA 反应的灵敏度

检测发现设计的 RCA 方法能够检出最低 1% 的突变株(图 4)。

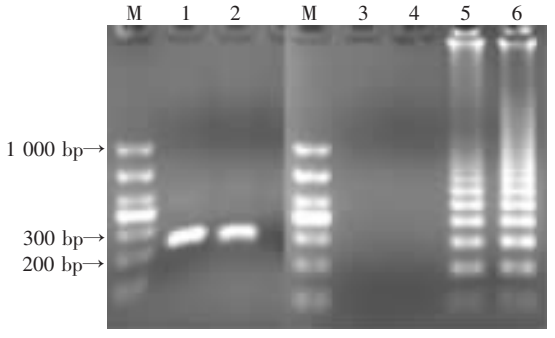


M:DNA 标准(1 000 bp);1~5:分别为0%、0.1%、1%、10%、100%的M2突变株

图4 反应条件优化后不同浓度突变株检测

2.5 临床标本初步验证

对重庆市疾控中心提供的甲型H1N1流感病毒NA基因、M2基因进行PCR扩增,PCR产物电泳条带清晰,无杂带干扰,位置位于200~300 bp(图5)。经RCA技术检测PCR产物发现病毒株M2基因V27A突变阴性,NA基因H274Y突变阴性(图5),并与测序结果(图6)比较,结果一致。说明本实验所优化设计的RCA技术能够保证检测的准确性。



M:DNA标准(1 000 bp);1:NA基因PCR产物;2:M2基因PCR产物;3:M2 V27A突变检测;4:NA H274Y突变检测;5:M2基因突变阳性对照;6:NA基因突变阳性对照

图5 临床标本耐药基因突变位点检测

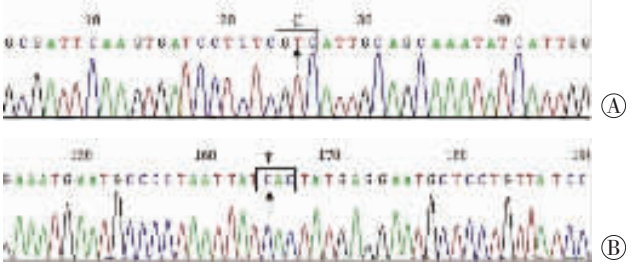


图6 M2(A)与NA(B)基因突变测序分析 (箭头示未发生突变的碱基)

3 讨论

在传统的流感病毒耐药性的检测中,需要先用细胞培养的方法来分离病毒株,然后进行基因型分型,对突变的基因进行测序。该方法的缺点是对低浓度病毒载量的临床标本检测灵敏度低,且费用较高,不适于高通量、快速地临床检测。RCA技术是借鉴自然界中环状DNA分子滚环式的扩增机制而新近发展起来的一种核酸扩增技术,通过使用2个引物就可以实现指数滚环扩增,通过环化探针的设计特异性检测靶DNA或RNA分子,具有操作简单,无需特殊昂贵仪器,灵敏度高,特异性好,检测时间短的优点。因此在病原体及SNP的检测方面有着良好的应用前景。在对单碱基突变的检测应用中,环化探针的设计需要更加讲究,因为环化探针不只要特异地区分出15~30个与待检靶序列互补的碱基,最重要的是要能区别出设置在3′末端的突变单碱基,在实验条件控制上需要更加严格。为了提高检测的特异性,采用不对称方法[11-14]设计环化探针会明显提高检测的特异性。本研究设计的M2环化探针3′端检测序列的碱基数为17 bp,Tm值为46.4 ℃。5′端检测序列碱基数为22 bp,Tm值为61.0 ℃。NA环化探针3′端检测碱基数为16 bp,Tm值为38.4 ℃,5′端检测序列碱基数为22 bp,Tm值为58.3 ℃。为了将两个探针用于同一反应条件,因此在设计探针两端检测臂时,Tm值尽量接近。研究[10]报道连接温度如果靠近5′端检测臂Tm值,又比3′检测臂Tm值高15 ℃左右,可提高检测的特异性。本实验表明采用65 ℃可保证检测的特异性。

在RCA的特异性研究中采用了T_4 DNA连接酶和*Taq*DNA连接酶两种方法,并进行了比较。在使用T_4连接酶时,由于T_4连接酶不耐热,反应温度为37 ℃,在检测野生株时,出现了假阳性结果。检测的失真可能与这些因素有关,由于存在碱基错配的可能性,要求酶的保真性要好。Nilsson等[7]认为T_4 DNA连接酶的特异性取决于NaCl的浓度。NaCl在50~150 mmol/L最适合酶的反应活性,随着NaCl浓度的提高,酶的保真度越高,当在250 mmol/L时,能够区别出最常见的T/G之间的错配。本实验用于检测V27A的M2探针,如果发生突变碱基错配,将会发生T/G之间的错配,因此比较难区别。为了克服上述问题,Luo等[15]证明提高了连接反应温度的耐热DNA连接酶比T_4 DNA连接酶保真度高,与本实验结果一致,因此本实验最终采用了*Taq*DNA连接酶,能够更好地区分出碱基错配,与突变碱基的设置位置也有关。通常DNA连接酶区分3′端的错配要比5′端效率高[15]。本实验设计的突变位点均设置在3′末端,通过实验验证设计的探针满足该检测实验的要求。

滚环扩增阶段,Zhang等[16]证明只有phi29DNA聚合酶和*Bst*DNA聚合酶能在滚环上形成超过8 kb的

DNA 单链。在预实验中,我们也采用了 phi29DNA 聚合酶,但未形成支链扩增,电泳显示未见梯级条带。由于环化探针与靶序列结合时会形成螺旋拓扑结构,这对滚环复制会带来障碍,而 phi29DNA 聚合酶克服该障碍的能力弱于 *Bst*DNA 聚合酶[17],在支链扩增时不容易形成不同大小的 DNA 分子,因而在胶上形成不了梯级条带。Wu 等[6]在检测 HIV cDNA 点突变时也得出了同样的结果,认为是 phi29DNA 聚合酶形成的产物分子量过大,不能在琼脂糖凝胶上形成条带。至于 *Bst*DNA 聚合酶能够克服拓扑结构的影响,原因尚不清楚。RCA 技术的另一问题就是非特异性扩增问题。理论上讲,未被连接的环化探针单链在引物的作用下是不能形成支链扩增的,但实验结果却显示密集的梯级条带。至于未连接的环化探针单链形成非特异性扩增的原因还不明确,不过通过核酸外切酶的消化作用,可以明显降低 RCA 的非特异性扩增[5]。

RCA 有着优越的信号放大功能,能够检测到小于 10 个靶分子的水平。本实验将突变株靶序列配制成不同的百分含量,能够检测出最低 1% 的标本,与国外报道一致[18]。本研究临床标本检测结果与测序结果一致,说明本实验设计的 RCA 方法适于检测相应的突变位点。我们对病毒株 M2 基因和 NA 基因的测序结果与其他病毒株比对后,发现该毒株与 2009 年爆发流行的病毒株基因序列一致,与所设计的检测探针完全吻合,且在 M2 基因上发现了 S31N 突变,说明 2009 年爆发的病毒株基本完全对金刚烷胺药物耐药。但并未发现 M2 基因 V27A 突变和 NA 的 H274Y 突变,说明该毒株对奥塞米韦(达菲)仍敏感。

WHO 检测结果显示,2008 – 2009 年美国几乎 100% 的 H1N1 病毒株对奥塞米韦产生耐药。最近报道日本 2008 – 2009 年分离的 H1N1 病毒株 100% 携带了 H274Y 突变,对奥塞米韦产生耐药[19]。达菲在我国批准上市时间不长,且价格较贵,尚未在人群中大范围推广,但是未来该药的广泛使用也必将会导致高耐药率的发生。希望我们设计的 RCA 技术在检测甲流病毒耐药中会起到一定的作用,能够为临床上合理用药做出有意义的指导。

参考文献:

[1] Schnell J R, Chou J J. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus [J]. Nature, 2008, 451(7178): 591 – 595.

[2] Saito R, Sakai T, Sato I, *et al*. Frequency of amantadine-resistant influenza A viruses during two seasons featuring cocirculation of H1N1 and H3N2 [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5): 2164 – 2165.

[3] Gubareva L V. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors [J]. Virus Res, 2004, 103(1/2): 199 – 203.

[4] Lizardi P M, Huang X H, Zhu Z, *et al*. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification [J]. Nat Genet, 1998, 19(3): 225 – 232.

[5] Cheng Y, Li Z, Zhang X, *et al*. Homogeneous and label-free fluorescence detection of single-nucleotide polymorphism using target-primed branched rolling circle amplification [J]. Anal Biochem, 2008, 378(2): 123 – 126.

[6] Wu L, Liu Q, Wu Z, *et al*. Detection of HIV cDNA point mutations with rolling-circle amplification arrays [J]. Molecules, 2010, 15(2): 619 – 626.

[7] Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, *et al*. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection [J]. Science, 1994, 265(5181): 2085 – 2088.

[8] Wang B, Potter S J, Lin Y, *et al*. Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5): 2339 – 2344.

[9] Baner J, Nilsson M, Mendel-Hartvig M, *et al*. Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication [J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(22): 5073 – 5078.

[10] Zhang D Y, Liu B. Detection of target nucleic acids and proteins by amplification circularizable probes [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2003, 3(2): 237 – 248.

[11] Wang H, Kong F, Sorrell T C, *et al*. Rapid detection of ERG11 gene mutations in clinical Candida albicans isolates with reduced susceptibility to fluconazole by rolling circle amplification and DNA sequencing [J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 167.

[12] 黄冠军, 殷幼平, 张仑, 等. 柑桔溃疡病菌滚环扩增检测体系的建立[J]. 微生物学报, 2008, 48(3): 375 – 379.

[13] Pickering J, Bamford A, Godbole V, *et al*. Integration of DNA ligation and rolling circle amplification for the homogeneous, end-point detection of single nucleotide polymorphisms [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(12): e60.

[14] 范东瀛, 陈俊英, 张新文, 等. 流感病毒在不同细胞中适宜培养条件的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(6): 510 – 512.

[15] Luo J, Bergstrom D E, Barany F. Improving the fidelity of Thermus thermophilus DNA ligase [J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(15): 3071 – 3078.

[16] Zhang D Y, Brandwein M, Hsuih T, *et al*. Ramification amplification: a novel isothermal DNA amplification method [J]. Mol Diagn, 2001, 6(2): 141 – 150.

[17] Kuhn H, Demidov V V, Frank-Kamenetskii M D. Rolling-circle amplification under topological constraints [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(2): 574 – 580.

[18] Steain M C, Dwyer D E, Hurt A C, *et al*. Detection of influenza A H1N1 and H3N2 mutations conferring resistance to oseltamivir using rolling circle amplification [J]. Antiviral Res, 2009, 84(3): 242 – 248.

[19] Baranovich T, Saito R, Suzuki Y, *et al*. Emergence of H274Y oseltamivir-resistant A (H1N1) influenza viruses in Japan during the 2008 – 2009 season[J]. J Clin Virol, 2010, 47(1): 23 – 28.

(收稿 2010-08-31 修回 2010-10-10)

(编辑 龙 亮)