综 述 文章编号:0253-3626(2008)s1-0105-02

# 核酸序列依赖性扩增技术(NASBA)概述

张英英 综 述,谢 鹏 审 校

(重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R34 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

随着分子生物学技术的快速发展,体外核酸扩增技术已逐步应用于科研和临床。最近几年才兴起的核酸序列依赖性扩增法(Nuleic and sequerce based amplipicain,NASBA)同传统的实验方法相比有灵敏性高,特异性强,快速,高通量等优点,而倍受中外学者的青睐。本文就NASBA方法作一综述。

## 1 NASBA概述

NASBA即"核酸序列依赖性扩增",是在PCR基础上发展起来的一种新的扩增技术。该技术首先在1990年由Guatelli提出[1]。1991年,Compton J对此进行了详细的描述[2]。与普通PCR不同的是NASBA是由一对引物引导的,连续均一的体外特异性核苷酸序列等温扩增的酶促反应。NASBA最适合于单链RNA的扩增、检测及测序[3]。目前NASBA作为一种诊断方法已广泛应用于临床。

## 2 NASBA的扩增反应原理

该反应有赖于禽源成髓细胞瘤逆转录酶(Avrien myeloblastosis virus reverse transcripts,AMV-RT)、RNaseH和T7 RNA聚合酶,在3种酶的共同作用下,以单链RNA为模板进行核苷酸序列的扩增[4]。

NASBA反应体系中除含有上述3种酶外,还含有两种特殊的引物,DNTP(脱氧核糖核苷酸),NTP(核糖核苷酸)和缓冲液,引物Ⅰ3'末端与靶序列互补,5'端含T7RNA多聚酶的启动子,这一引物是用于合成cDNA的。引物Ⅱ的碱基序列与cDNA的5'末端互补[5]。

尽管NASBA是一个连续的反应过程,但是为了更好的描述,通常NASBA被分为非循环相和循环相两个时相。经过非循环相,产生双链DNA,它含有T7 RNA聚合酶的识别序列,并且作为循环相的模板进行RNA的指数扩增。NASBA的最终反应产物为单链RNA[6]。

作者介绍:张英英(1982- ),女,博士,
研究方向:中枢神经系统感染。
通讯作者:谢 鹏,男,教授,E-mail:pengxie58@gmail.com。

## 3 NASBA的信号检测方法

### 3.1 定量NASBA

NASBA的特点使得它特别适合于分析高通量样本,并且完全自动化。但是扩增之后的产物分析却是一个费时费力的工作,早期采用琼脂糖凝胶电泳,印记技术或固相杂交法,随后NASBA检测技术有了改进,出现了电化学发光反应(Electrochem iluminescence,ECL),酶联凝胶分析(Enzyme-linRe gelassay,ELGA)等方法。

目前使用最多的定量检测NASBA产物的方法为ECL法。该方法需要两个与NASBA产物互补的寡核苷酸探针,分别是捕获探针和检测探针,捕获探针3',端携带链霉亲和素包被的顺性磁珠,检测探针5',末端标记有TAG(Tris aminomethane ruthenium)。扩增反应完成后,产物加入含有捕获探针和检测探针的杂交溶液中。在温育过后,磁珠被仪器的磁体吸附到电极表面,因此TAG也被吸附到电极表面,对电极施以一定的低电压,钌金属离子发生周期性的氧化还原反应,从而产生光子, ECL阅读器将检测到的光能量转换成数字输出,光能量和扩增反应产生的RNA扩增子总量成比例对应[7]。

另外,ELGA法也被用来检测NASBA产物。它是一种快速、非放射性的用5'端标记辣根过氧化物酶(HRP)的种特异的寡聚核苷酸探针"在溶液中"杂交的分析方法。杂交反应后,过剩的未杂交ELGA探针通过垂直凝胶电泳从杂交产物中析出,聚丙烯酰胺凝胶经与针对HRP的底物液孵育后显色[8]。

### 3.2 实时定量NASBA

上述方法是在扩增之后进行检测,与扩增阶段不同步,需要对扩增后的样品进行处理,增加了携带污染,对高通量也产生一定的负面影响。随着实时荧光定量PCR的出现,Taqman检测技术的出现, 实时荧光定量检测方法逐渐应用到NASBA,从而产生了实时定量NASBA。实时定量NASBA是一种结合NASBA扩增技术和实时分子灯塔 (Molecular beacons)检测技术的方法[9]。分子灯塔是具有"发夹"样结构的单链寡核苷酸探针,一般为含20~30个核苷酸,环状部与目标链形成特异的互补结合,茎部的2条核苷酸链互补,形成双链分子,茎部的末端分别与荧光素(5'端)和淬火物质(3'端)结合,茎部的双链互补结构使末端的荧光素和淬火物质紧靠在一起,因荧光素共振能量转移作用而使荧光被吸收,这样荧光素就不能发光。当分子灯塔的环状部分与目标链特异性结合时,所形成的杂交分子比茎部双链结构更稳定,使得茎部双链分子

分离，也就使荧光素和淬火物质相分离，通过自发构型重组作用，在室温下就可使荧光素发光得以恢复，通过荧光仪或合适配置的显微镜可观察到。“分子灯塔”技术需低温反应，而NASBA技术最佳反应温度为41℃，因此，两项技术结合可形成适宜搭配，达到完美的匹配。该检测方法与其他方法相比，具有相同的特异性和敏感性，与RNA扩增阶段同步，操作简单且省时，减少了携带污染，特别适合于分析高通量样本。

3.3 多重实时定量NASBA

在实时定量NASBA的基础上，多重实时定量NASBA也在流行病学和疫苗研究领域得到应用。de Baar MP将不同的荧光基团标记在HIV-1不同亚型的分子信标上，进行多重实时定量NASBA反应，从而达到在同一个反应就能检测不同的亚型[10]。Loens K也用多重实时定量NASBA同时检测肺炎支原体，肺炎衣原体和军团杆菌[11]。由于多重实时定量NASBA的敏感性相对较低，从而限制了它在临床方面的应用。

## 4 NASBA的优点和不足

NASBA用于检测具有以下的一些优点：①简单性和快速性：NASBA反应在41℃进行，经过1.5h的孵育，NASBA将模板RNA扩增到$10^{12}$倍[12]。②敏感性和特异性强。Shipitsyna E分别用NASBA和培养方法同时检测有症状病人尿液的淋病奈瑟菌，两种方法的特异性均为100%，对女性病人来说，NASBA和培养方法的敏感性分别为90.9%和31.8%，而对男性病人来说，两种方法的敏感性分别为100%和50%[13]。③适用于检测样品的范围广：由于NASBA技术的反转录过程被直接合并到扩增反应中，因此NASBA最适合分析RNA样品。④安全性：与PCR的产物DNA分子不同，RNA分子不易对实验仪器和环境造成污染，避免了产物交叉污染实验仪器、操作环境导致的假阳性结果。

NASBA方法也有一些缺点，如在进行NASBA时很多因素使结果出现假阳性或假阴性结果。基质相关的抑制剂能影响目的基因的扩增从而出现假阴性结果，相反的，基质相关的某些成分出现非特异性扩增，从而出现假阳性结果。当目的基因水平很低时，上述现象更容易出现[14]。

## 5 NASBA的应用

由于NASBA方法有上述诸多优点，该技术在科研和临床方面得到了越来越多的应用。NASBA方法对科研，临床诊断、治疗和预后都起到了重要作用。到目前为止已成功应用于病毒、细菌、支原体、衣原体、霉菌、寄生虫和细胞因子等的检测。Tauriainen S 通过NASBA方法扩增肠道病毒、胰岛素、G蛋白和干扰素的RNA，作为RT-PCR的阳性对照[15]。van der Meide WF通过检测药物治疗前后6周皮肤利什曼病人利什曼原虫的载量，从而判断药物疗效和临床预后[16]。Wat D对囊性纤维化病呼吸道症状加重病人进行实时定量NASBA，从而检测出了低载量的呼吸道病毒，如流感病毒A、流感病毒B、鼻病毒等，从而对临床诊断和抗病毒和抗生素的及时应用起到了极大作用。

总之，NASBA作为一种定性，定量检测RNA的方法，操作简便，自动化水平高，敏感性高，特异性强，快速，高通量，弥补了PCR技术的很多缺点。该技术已成功应用于病毒、细菌、霉菌、寄生虫和细胞因子等的检测，而且它的应用范围也越来越广。因此，NASBA技术是核酸扩增技术的重大改进，它将会有更好的应用前景。

## 参 考 文 献


[1] D'Souza DH, Jaykus LA. Nucleic acid sequence based amplification for the rapid and sensitive detection of Salmonella enterica from foods[J]. J Appl Microbiol, 2003; 95(6): 1343-1350.

[2] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification[J]. Nature, 1991; 350(6313): 91-92.

[3] Deiman B, van Aarle P, Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)[J]. Mol Biotechnol, 2002; 20(2): 163-179.

[4] Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability[J]. J Microbiol Methods, 2003; 53(2): 175-183.

[5] Gore HM, Wakeman CA, Hull RM, et al. Real-time molecular beacon NASBA reveals hblC expression from Bacillus spp. in milk [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003; 311(2): 386-390.

[6] Romano JW, Williams KG, Shurtliff RN, et al. NASBA technology: isothermal RNA amplification in qualitative and quantitative diagnostics[J]. Immunol Invest, 1997; 26(1-2): 15-28.

[7] Collins RA, Ko LS, Fung KY, et al. Rapid and sensitive detection of avian influenza virus subtype H7 using NASBA[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003; 300(2): 507-515.

[8] Samuelson A, Westmoreland D, Eccles R, et al. Development and application of a new method for amplification and detection of human rhinovirus RNA[J]. J Virol Methods, 1998; 71(2): 197-209.

[9] Lanciotti RS, Kerst AJ. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses[J]. J Clin Microbiol, 2001; 39(12): 4506-4513.

[10] de Baar MP, Timmermans EC, Bakker M, et al. One-tube real-time isothermal amplification assay to identify and distinguish human immunodeficiency virus type 1 subtypes A, B, and C and circulating recombinant forms AE and AG[J]. J Clin Microbiol, 2001; 39(5): 1895-1902.

[11] Loens K, Beck T, Ursi D, et al. Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of Myc oplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, and Legionella spp. in respiratory specimens[J]. J Clin Microbiol, 2008; 46(1): 185-191.

[12] Kievits T, van Gemen B, van Strijp D, et al. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection[J]. J Virol Methods, 1991; 35(3): 273-286.

[13] Shipitsyna E, Guschin A, Maximova A, et al. Comparison of microscopy, culture and in-house PCR and NASBA assays for diagnosis of Neisseria gonorrhoeae in Russia[J]. APMIS, 2008; 116(2): 133-138.

[14] D'Souza DH, Jaykus LA. Nucleic acid sequence based amplification for the rapid and sensitive detection of Salmonella enterica from foods[J]. J Appl Microbiol, 2003; 95(6): 1343-1350.

[15] Tauriainen S, Dadu E, Oikarinen M, et al. Amplifying control RNA for RT-PCR applications by nucleic acid sequence based amplification (NASBA)[J]. J Virol Methods, 2006; 132(1-2): 222-226.

[16] van der Meide WF, Peekel I, van Thiel PP, et al. Treatment assessment by monitoring parasite load in skin biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis, using quantitative nucleic acid sequence-based amplification[J]. Clin Exp Dermatol, 2008.