

禽流感病毒 H7N9 型 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的研究*

陈勉乔, 于浩洋 (深圳市晋百慧生物有限公司, 广东深圳 518055)

摘要:目的 建立一种快速准确诊断禽流感病毒 H7N9 型的实时荧光定量 RT-PCR 检测方法。方法 参照国家生物技术信息中心(NCBI)公布的 H7N9 基因 HA 序列,设计特异性引物及 TaqMan 探针;构建阳性重组质粒,验证其最低检测拷贝数、重复性及特异性。结果 试验构建的阳性重组质粒,线性关系在 6×10^2 copies/ μ l $\sim 6 \times 10^8$ copies/ μ l 范围内检测结果良好;用该方法测得最低拷贝数为 600 copies/ μ l,特异度和重复性(CV<1%)良好,无交叉反应;用该荧光定量 RT-PCR 检测方法检测 8 份阳性样品和 8 份阴性样品,准确率为 100%(16/16)。结论 实验建立的实时荧光定量 RT-PCR 检测方法可用于禽流感病毒 H7N9 型的快速检测。

关键词:禽流感病毒 H7N9 型;实时荧光定量;RT-PCR;检测

中图分类号:R373.13;Q503 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)03-048-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.013

Development of Real-time Fluorescence Quantitative RT-PCR Detection for Avian Influenza Virus H7N9 Type

CHEN Mian-qiao, YU Hao-yang

(Shenzhen GeneBioHealth Co., LTD, Guangdong Shenzhen 518055, China)

Abstract: **Objective** To establish a rapid and accurate method of fluorescent quantitative PCR detection for Avian Influenza Virus H7N9 type. **Methods** A pair of primers and TaqMan fluorescent probes were designed specifically for H7N9 gene according to the published nucleotide sequence from National Center for Biotechnology Information. Positive recombinant plasmid was built and the minimum copies of detection, repeatability and specificity were tested. **Results** The results showed that this assay obtained positive recombinant plasmid, the linear relation was fine in the range from 10^2 to 10^8 copies/ μ l. The minimum copies was 500 copies/ μ l with this method, specificity and repeatability(CV<1%) were fine, no cross reaction with other viruses. The precision was 100% (16/16) with this method for detecting 8 positive samples and 8 negative samples. **Conclusion** The establishment methods of fluorescent quantitative PCR detection could be used for the rapid diagnosis Avian Influenza virus H7N9 types.

Keywords: avian influenza virus H7N9; real-time fluorescence quantitative; RT-PCR; detection

流感病毒可分为甲(A)、乙(B)、丙(C)三型。其中,甲型流感依据流感病毒血凝素蛋白(HA)的不同可分为 1~16 种亚型,根据病毒神经氨酸酶蛋白(NA)的不同可分为 1~9 种亚型,HA 的不同亚型可以与 NA 的不同亚型相互组合形成不同的流感病毒。禽类,特别是水禽,是所有这些流感病毒的自然宿主^[1,2]。

H7N9 甲型禽流感病毒是 2008 年从西班牙东北部加泰罗尼亚的小水鸭中首次被分离出来的,后来在中欧、北美等许多国家也相继被发现,属于流感病毒的一种^[3,4]。H7N9 型禽流感病毒自 2013 年 3 月在上海、安徽两地暴发,到 2013 年 4 月 21 日,我国共报告 102 例确诊病例,死亡 20 例,12 人康复,涉及上海、江苏、安徽、浙江等省市^[5]。针对

疫情的不断蔓延,国家卫生和计划生育委员会迅速出台了人感染 H7N9 禽流感诊疗方案,相关省市卫生主管部门也纷纷启动疫情防控应急预案,力争将疫情控制到最小范围,最大限度地减轻疫情危害^[6,7]。

根据以往经验及本次病例流行病学调查推测,可能由携带 H7N9 禽流感病毒的禽类及其粪便、羽毛、呼吸道分泌物、血液等,经呼吸道、接触等方式传播给人类,尚未发现在人与人之间进行传播。目前传统的病毒诊断方法有病毒分离、血清学检测和核酸电泳分析等,其操作繁琐、耗时、灵敏性低、特异性差,不适宜作为禽流感病毒的早期诊断^[8]。荧光定量 RT-PCR 检测方法采用 TaqMan 技术,该技术在普通 PCR 基础上加入一条特异性的荧光

* 基金项目:深圳市技术创新计划(CYZZ20140605154742155);深圳市南山技术研发和创意设计项目(KC2014JSJS0018A)。

作者简介:陈勉乔(1983-),男,硕士研究生,主要从事疾病快速诊断试剂盒的开发,Tel:15914069189,E-mail:mianqiaochen@yeah.net。

通讯作者:于浩洋(1971-),男,德籍博士,高级工程师,深圳大学客座教授,主要从事医学分子学研究,E-mail:guixuanyu@hotmail.com。

双标记探针,该探针能与目标基因特异性结合,在实时荧光定量 PCR 反应中,随着 PCR 反应的进行,探针中的荧光信号释放出来,通过荧光强度变化监测产物量的变化,从而得到一条扩增曲线图,根据扩增曲线图的 C_t 值,判定是否受其病毒感染^[9]。

试验针对 H7N9 病毒的 HA 基因中一段高度保守的基因序列,设计一对特异性引物和探针,建立良好的检测反应体系,为禽流感病毒 H7N9 型快速诊断提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象 禽流感病毒 H7N9 型 RNA 由深圳市疾病预防控制中心惠赠(禽流感病毒 H7N9 型 RNA 由深圳市疾病预防控制中心提取及保存);大肠埃希菌 DH5a 由实验室保存,禽流感病毒 H5N1 和 H1N1 灭活毒株均购买于哈尔滨维科生物技术开发公司。

1.2 试剂和仪器 pMD18 T 载体、Taq 酶、反转录酶、DNA Marker DL 2000, DNA 纯化回收试剂盒(离心柱型)、高纯质粒小量制备试剂盒(离心柱型)均为宝生物工程(大连)有限公司产品;RNA 提取试剂盒(磁珠法)为本公司产品。紫外可见分光光度计(2000/2000C 型)为北京普析通用仪器有限公司产品;ABI 7500 荧光 PCR 仪为 Applied Biosystems 公司生产品。

1.3 方法

1.3.1 引物和探针的设计:参照 GenBank 数据库中近三年禽流感病毒 H7N9 型的基因 HA 序列,设计一对特异性引物和探针,由上海生英维捷基贸易有限公司合成,引物和探针序列如下:上游引物序列(H7N9-F)为 5'-TGCAGAATAGAATA-CAGATAGAC-3',下游引物序列(H7N9-R)为 5'-ACCGCATGTTTCCATTCT-3',探针引物序列(H7N9-B)为 FAM5'-TGATGCCCGAAGCTAAACCA-3'BHQ1。

1.3.2 阳性重组质粒的制备:

1.3.2.1 荧光 RT-PCR 扩增条件:42℃ 30 min, 95℃ 3 min, 1 个循环;95℃ 30 s, 60℃ 40 s, 40 个循环;72℃ 10 min。RT-PCR 反应结束后,取 5 μ l PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳鉴定。

1.3.2.2 目的基因的纯化及回收:PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后,在紫外灯下切取目的片段,用 DNA 纯化回收试剂盒回收目的 cDNA,回收后置 -20℃ 冰箱保存备用。

1.3.2.3 目的基因的克隆及鉴定:将回收的 DNA 片段连接到 pMD18-T 载体上,再转入到感受态细胞 DH5a 中进行培养,挑取单克隆菌落到液体培养

基中扩大培养,然后用高纯质粒小量制备试剂盒提取质粒,进行荧光定量 PCR 鉴定及琼脂糖凝胶电泳鉴定,最后将阳性重组质粒送到上海英维捷基贸易有限公司测序鉴定。

1.3.3 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立:

1.3.3.1 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的优化:以阳性重组质粒为模板,选用不同的引物浓度、退火温度、反应时间进行 RT-PCR 反应,不断地优化其反应条件,得到最佳的 RT-PCR 反应条件。

1.3.3.2 标准曲线的建立及最低检测拷贝数确定:以 6×10^8 , 6×10^7 , 6×10^6 , 6×10^5 , 6×10^4 , 6×10^3 , 6×10^2 , 6×10 copies/ μ l 的阳性重组质粒作为模板,进行荧光定量 PCR 扩增,建立荧光定量 PCR 标准曲线,确定最低检测限的拷贝数。

1.3.3.3 重复性试验:选取 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 copies/ μ l 浓度梯度的阳性重组质粒,每个稀释浓度进行 3 个重复检测。根据每个稀释浓度的 C_t 值计算变异系数,判定该检测方法的重复性是否良好。

1.3.3.4 特异性试验:用 RNA 提取试剂盒提取禽流感灭活病毒 H5N1 型和 H1N1 型两种病毒 RNA,用 H7N9 型病毒作对照进行荧光定量 PCR 检测。

1.3.3.5 临床样品检测试验:利用建立的禽流感病毒 H7N9 型荧光定量 PCR 检测方法,对经深圳市疾病预防控制中心确诊为 H7N9 型病毒感染的 8 份 RNA 样本和 8 份非禽流感 RNA 样本进行检测,评价其临床实用性。

1.4 统计学分析 采用 SPASS17.0 统计学软件处理重复性 C_t 值变异系数, C_t 值变异数 $CV \leq 5\%$,差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 目的基因的克隆和重组质粒的鉴定 PCR 产物经回收后,与 pMD18 克隆载体连接构建成重组质粒,用 1.2 中的引物对和探针针对重组质粒进行 PCR 扩增,得到一条大小约 105 bp 的 DNA 片段(DNA Marker DL2 000),与连接前的 PCR 产物大小一致(图 1)。将经 PCR 鉴定的阳性重组菌株送到上海英维捷基贸易有限公司进行测序鉴定,测序结果与目的片段序列完全一致。

2.2 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

荧光定量 RT-PCR 反应条件的优化:优化后的荧光定量 RT-PCR 反应体系为 20 μ l,其中 20 \times buffer 2.5 μ l, 10 μ mol 上游引物 1.2 μ l, 10 μ mol 下游引物 1.2 μ l, 10 μ mol 探针 0.55 μ l, RNA 模板 5 μ l, 25 μ mol Mg 离子 2 μ l, 25 μ mol dNTP 0.6 μ l, 5 U/ μ l 反转录酶 0.3 μ l, 5 U/ μ l Taq 酶 0.55 U/ μ l,

加去离子水至 20 μl 。荧光定量 PCR 反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 35 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 35 s, 40 个循环, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 接收荧光。

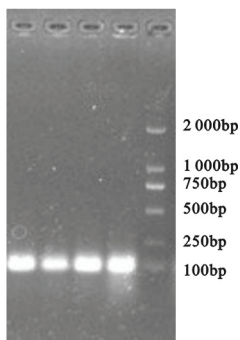


图1 PCR产物电泳结果

标准曲线的建立和最低检测拷贝数的确定: 以梯度倍释的阳性质粒为模板进行 real-time RT-PCR 扩增, 得到 H7N9 荧光定量 PCR 检测的标准曲线(图 2), 阳性质粒的起始模板浓度与 C_t 值呈现良好的线性关系, 相关系数 R^2 值为 0.99, 斜率为 -3.11, 扩增效率为 95.51%。模板的起始浓度越低 C_t 值则越大, 试验结果表明, 实时荧光定量 PCR 能检测出的最低模板拷贝数为 600 copies/ μl 。

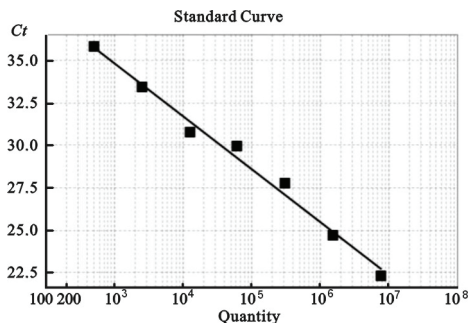


图2 荧光定量 PCR 标准曲线

重复性试验结果分析: 将 H7N9 阳性重组质粒按倍数梯度稀释成 6 个浓度, 重复性试验扩增结果见图 3。 C_t 值批内变异系数(coefficient of variation, CV) $CV < 1\%$, 见表 1。结果表明: 实时荧光定量 PCR 检测方法重复性良好。

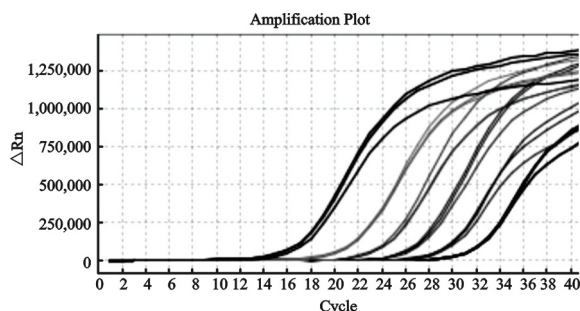


图3 实时荧光定量 PCR 的重复性检测

表1 实时荧光定量 PCR 的重复性分析

阳性质粒浓度 (copies/ μl)	三次重复性检测 C_t 值			重复性 C_t 值分析	
	1	2	3	$\bar{x} \pm s$	CV(%)
10^3	32.96	32.91	32.92	32.93 ± 0.27	0.82
10^4	30.66	30.44	30.27	30.46 ± 0.20	0.66
10^5	27.39	27.60	27.88	27.62 ± 0.25	0.91
10^6	24.91	24.64	24.90	24.81 ± 0.15	0.60
10^7	22.08	22.09	22.03	22.07 ± 0.03	0.14
10^8	17.92	17.99	18.19	18.03 ± 0.14	0.78

特异性试验结果分析: 以禽流感 H5N1 和 H1N1 灭活毒株 RNA 作为检测模板, 进行实时荧光定量 PCR 反应, 检测结果为阴性, 而禽流感病毒 H7N9 型 RNA 检测结果为阳性, 无交叉反应。结果表明: 所建立的 PCR 检测方法具有很好的特异性。

2.3 临床检测结果分析 用该建立的荧光定量 PCR 检测方法对 8 份阳性样本和 8 份阴性样本进行检测, 荧光定量 PCR 检测结果与实际诊断结果一致, 检测准确率达 100%。

3 讨论 禽流感病毒由 8 个基因片段组成, 包括 HA, NA, PB2, PB1, PA, NP, M 和 NS, 其中, 血凝素(HA)基因是用来打开及入侵人类或牲畜的细胞的钥匙, 神经氨酸酶(NA)可以破坏细胞的受体, 帮助病毒在宿主体内自由传播, 这两个基因的变异性较大, 可用于不同亚型的鉴别。由于禽流感患者没有特异的临床症状, 需要借助实验室检测结果与其他严重急性呼吸道感染疾病进行鉴别诊断, 所以快速准确的实验室检测方法是有效控制疫情和临床救治的关键。试验研究根据禽流感 H7N9 型 HA 基因特点, 在其保守的区设计了一对特异性引物的同时再加入一条特异性探针, 从而提高了特异性和准确度, 确保能够准确测出禽流感 H7N9 型病人, 有效地避免假阳性问题^[10]。

据国家卫生和计划生育委员会通报, 2013 年 3 月 31 日在上海市和安徽省发现 3 例人感染 H7N9 禽流感病例, 其中两例抢救无效死亡, 这也是全球首次发现的新亚型流感病毒, 而目前国内外都没有针对 H7N9 禽流感病毒的疫苗^[11]。H7N9 禽流感病毒危害人类的健康, 目前极需要一种有效快速的诊断方法, 防止 H7N9 禽流感病毒进一步的传播, 减少其对社会的危害性, 促进社会的健康发展。目前常用诊断禽流感的方法有很多, 如血清检测、病毒分离鉴定、核酸分析等, 存在易交叉反应、假阳性和检测灵敏度低等问题, 无法从根本上对禽流感 H7N9 进行快速检测诊断。采用所建立的一步法荧光 PCR 检测技术, 能够有效地 (下转 54 页)

- Jiang MJ, Xiao ZJ, Yang XZ, et al. Correlation between pepsinogens and gastric cancer[R]. China Nuclear Information Centre, 2001.
- [6] Mohamadkhani A, Darvish Moghaddam S, Salman-roghani H, et al. Are the serum biomarkers pepsinogen I and II good predictors for the detection of subjects with atrophic gastritis in areas that have different gastric cancer incidence? [J]. Archives of Iranian Medicine (AIM), 2013, 16(4): 208-212.
- [7] Kang JM, Kim N, Yoo JY, et al. The role of serum pepsinogen and gastrin test for the detection of gastric cancer in Korea[J]. Helicobacter, 2008, 13(2): 146-156.
- [8] Shikata K, Ninomiya T, Yonemoto K, et al. Optimal cutoff value of the serum pepsinogen level for prediction of gastric cancer incidence: the Hisayama Study [J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2012, 47(6): 669-675.
- [9] Cao XY, Jia ZF, Jin MS, et al. Serum pepsinogen II is a better diagnostic marker in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(48): 7357-7361.
- [10] Lomba-Viana R, Dinis-Ribeiro M, Fonseca F, et al. Serum pepsinogen test for early detection of gastric cancer in a European country[J]. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2012, 24(1): 37-41.

收稿日期: 2016-01-02

修回日期: 2016-02-23

(上接 50 页) 将禽流感 H7N9 型与 H5N1 型、H1N1 型鉴别开来, 避免交叉污染和假阳性的产生^[12]。通过优化 PCR 反应条件, 大大缩短了检验时间, 降低生产成本, 能够有效、快速、方便、安全地检测出 H7N9 型病毒, 具有重要的临床诊断意义和应用前景。

参考文献:

- [1] 姜国平, 李显东, 张昭勇. 多种探针的 RT-PCR 检测 H5N1 病原体方法的建立及应用[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(5): 73-76.
- Luo GP, Li XD, Zhang ZY. Establishment and application of methods for detecting H5N1 pathogen with multiple probe RT-PCR[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5): 73-76.
- [2] Lopez-Martinez I, Balish A, Barrera-Badillo G, et al. Highly pathogenic avian influenza A(H7N3) virus in poultry workers, Mexico, 2012[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(9): 1531-1534.
- [3] 卫明, 邱庆丰, 张宏斌, 等. 一种用于以荧光 RT-PCR 检测样品中禽流感病毒的引物对、探针和包含其的试剂盒: 中国, 201310216523. 5 [P]. <http://www.google.com/patents/CN103320529B?cl=en>, 2013-06-03.
- Wei M, Qiu QF, Zhang HB, et al. A method for detecting fluorescent RT-PCR avian influenza virus sample primer pair, a probe and a kit comprising the same. China, 201310216523. 5 [P]. <http://www.google.com/patents/CN103320529B?cl=en>, 2013-06-03.
- [4] Chen LM, Rivallier P, Hossain J, et al. Receptor specificity of subtype H1 influenza A viruses isolated from swine and humans in the United States[J]. Virology, 2011, 412(2): 401-410.
- [5] Wang W, Peng H, Tao Q, et al. Serologic assay for avian-origin influenza A (H7N9) virus in adults of Shanghai, Guangzhou and Yunnan, China[J]. J Clin Virol, 2014, 60(3): 305-308.
- [6] 苏明权, 杨柳, 马越云, 等. 甲型 H1N1 流感病毒临床实验室诊断策略[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(2): 19-22.
- Su MQ, Yang L, Ma YY, et al. Clinical laboratory diagnostic strategies of influenza A/H1N1 virus [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2011, 26(2): 19-22.
- [7] Bai T, Zhou J, Shu Y. Serologic study for influenza A (H7N9) among high-risk groups in China[J]. N Engl J Med, 2013, 368(24): 2339-2340.
- [8] 高洁, 韩亦非, 李姝霖, 等. 2009 年~2011 年汉中地区甲型流感监测分析[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(2): 125-127.
- Gao J, Han YF, Li SL, et al. Surveillance of a virus in Hanzhong from 2009~2011 [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(2): 125-127.
- [9] Xu X, Bao H, Ma Y, et al. Simultaneous detection of novel H7N9 and other influenza A viruses in poultry by multiplex real-time RT-PCR[J]. Virology Journal, 2012(12), 69-75.
- [10] Meixell BW, Borchardt MA, Spencer SK, et al. Accumulation and inactivation of avian influenza virus by the filter-feeding invertebrate daphnia magna [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(23): 7249-7255.
- [11] Nellia RK, Dunhama SP, Kuchipudia SV, et al. Mammalian innate resistance to highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infection is mediated through reduced proinflammation and infectious virus release [J]. Journal of Virology, 2012, 86(17): 9210-9210.
- [12] Zhang YJ, Mao HY, Yan JY, et al. Development of novel AllGlo-probe-based one-step multiplex qRT-PCR assay for rapid identification of avian influenza virus H7N9 [J]. Arch Virol, 2014, 159(7): 1707-1713.

收稿日期: 2016-01-09

修回日期: 2016-02-16