

人偏肺病毒基因芯片检测方法的建立及初步应用*

刘爱玲¹, 刘淑燕¹, 刘爱胜¹, 刘军², 朱彩云¹, 郭龙华¹ (1. 深圳市龙华区人民医院检验科, 广东深圳 518109; 2. 广东医科大学病原生物学实验室, 广东湛江 524023)

摘要:目的 建立深圳地区人偏肺病毒(human metapneumovirus, hMPV)核苷酸的快速、特异和敏感的基因芯片检测方法, 为 hMPV 检测和诊断提供有效的诊疗手段。方法 针对 hMPV 病毒高度保守区域基因序列, 应用引物设计软件 Primer5 设计 hMPV 的荧光 PCR 引物; 应用探针设计软件 Array Designer4.20 设计 hMPV 的寡核苷酸检测探针, 将寡核苷酸探针点样至醛基玻片上制备 hMPV 基因芯片, 并与常规反转录酶-聚合酶链锁反应(RT-PCR)平行比较, 对其灵敏度、特异度和重复性, 以及用于临床样本的适用性等进行评价。结果 hMPV 基因芯片法检测 hMPV 的特异度为 96.23% (230/239), 灵敏度可达 2.0×10^1 个/ μ l, 线性范围为 $2.0 \times 10^1 \sim 2.0 \times 10^7$ 个/ μ l, 且重复性好; 初步检测深圳地区 300 份临床鼻咽拭子标本, 基因芯片法检出率为 20.3% (61/300), 明显高于常规 RT-PCR 法的 9.7% (29/300), 两方法检测的灵敏度之间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 39.205$, $P < 0.05$); 两种方法检测结果一致性一般 ($\kappa = 0.3607$)。结论 建立了 hMPV 基因芯片检测法, 基因芯片法检测 hMPV 具有很高的特异度和灵敏度, 且检测线性范围广, 为实验室开展 hMPV 的流行监测和早期诊断提供了新的检测技术。

关键词:人偏肺病毒; 基因芯片; 常规反转录酶-聚合酶链锁反应; 建立; 应用

中图分类号: Q503; R373.1 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)06-019-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.06.005

Establishment and Preliminary Application of the Gene Chip Detection Method of Human Pneumosis Virus

LIU Ai-ling¹, LIU Shu-yan¹, LIU Ai-sheng¹, LIU Jun², ZHU Cai-yun¹, GUO Long-hua¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen

Longhua District People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518109, China; 2. Pathogen Biology Laboratory, Guangdong Medical University, Guangdong Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To establish human metapneumovirus (hMPV) nucleotide rapid, specific and sensitive gene chip detection method, and provide effective diagnostic methods for hMPV detection and diagnosis in shenzhen area. **Methods** The fluorescence PCR primer of hMPV was designed for the highly conservative regional gene sequence of hMPV virus. Application of array probe design software designer 4.20 hMPV oligonucleotide detection probe design, oligonucleotide probe sample points to aldehyde slides on the preparation of hMPV gene chip, and parallel compared with conventional reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), the sensitivity, specificity and repeatability, and was used to evaluate the clinical applicability of the samples. **Results** hMPV gene chip method to detect hMPV specificity was 96.23% (230/239), the sensitivity was 2.0×10^1 / μ l, linear range was $2.0 \times 10^1 \sim 2.0 \times 10^7$ / μ l, and the repeatability was good. Initial tests in shenzhen area 300 clinical specimens on a nasopharyngeal swab, gene chip method detection rate was 20.3% (61/300), significantly higher than the conventional RT-PCR method 9.7% (29/300), the difference was statistically significant between the sensitivity of two methods ($\chi^2 = 39.205$, $P < 0.05$). The results were consistent in two methods ($\kappa = 0.3607$). **Conclusion** Established hMPV microarray assay, gene chip method to detect hMPV has high specificity and sensitivity, wide linear range and detection. The popularity of hMPV monitoring for laboratory provides a new detecting technology and early diagnosis.

Keywords: human pneumovirus; gene chip; conventional reverse transcriptase polymerase chain reaction; set up; application

流行病学调查显示, 人偏肺病毒(human metapneumovirus, hMPV)易与其他呼吸道病毒混合感染, 且临床和影像学改变很相似及 hMPV 流行病学特点、发病机理和临床表现等方面目前了解不多。目前检测 hMPV 方法主要有实时定量 RT-PCR 和常规反转录酶-聚合酶链锁反应(RT-

PCR), 虽然实时定量 RT-PCR 比常规 RT-PCR 具有更好的灵敏度、可重复性、特异度及能进行定量等优点^[1], 但不能在短时间内准确、快速地分析大量样本, 给临床 hMPV 快速诊断带来极大困难^[2,3]。因此, 建立一种特异度强、灵敏度高、快速且高通量的 hMPV 检测方法显得尤为重要, 本文

* 基金项目: 广东医科大学校院联合科研基金立项项目(编号: L2016008)。

作者简介: 刘爱玲(1983—), 女, 医学硕士, 主管技师, 主要从事微生物和分子生物学检验工作, E-mail: liuailing1983@163.com。

就此建立了一种基于 hMPV 核酸特异的基因芯片法,在临床使用中取得了较好的效果,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2016 年 3 月~2017 年 4 月在深圳市龙华区人民医院和福田人民医院因急性下呼吸道感染(ALRTI)住院患儿的鼻咽拭子标本 300 份。急性呼吸道感染(ARTIs)性疾病临床诊断标准均依据诸福棠主编的《实用儿科学》^[4]第 7 版。标本采集均经患儿家长的知情同意并签定知情同意书。

1.2 试剂与仪器 AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit 由美国 AxyPrep 生物技术有限公司提供;One-step RT-PCR 试剂盒(QIAGEN);RNA 酶抑制剂(美国 Promega);琼脂糖(西班牙 BIOWEST);DNA Marker (TIAN-GEN);CEQ8800 测序仪由美国 BECKMAN 公司提供;PowerPacHC 型电泳仪由美国 BIORAD 公司提供;White/Uhrviolet Transilluminator(美国 UVP)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集:ALRTI 住院患儿入院 24 h 内由临床医生或护士用一次性的咽拭子刮取患儿咽部分泌物于无菌管内,及时送检。

1.3.2 标本处理:将采集的咽拭子置于 3.0 ml 病毒保护液(含 100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素,2 000 U/ml 两性霉素 B),置于-80℃冰箱中待检。解冻后置涡旋振荡器上充分振摇 2 min 混匀,然后置离心机 13 400r/min 离心 15 min,取沉淀作病毒核酸提取。

1.3.3 hMPV 核酸提取:用 AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit 提取病毒核酸。具体操作严格按说明书进行,提取的病毒核酸于-80℃冻存备用。

1.3.4 hMPV 序列分析及探针设计:针对 hMPV 病毒高度保守区域基因序列,应用引物设计软件 Primer 5 设计 hMPV 的荧光 PCR 引物;应用探针设计软件 Array Designer 4.20 设计 hMPV 的寡核苷酸检测探针,同时设计阳性坐标探针用于阳性对照。

1.3.5 hMPV 基因芯片的制备:hMPV 基因芯片设计微矩阵见图 1,9 个 1 号位均为阳性探针,2~5 号位为检测探针,每个位均设有 4 个重复位。选择常用的醛基玻片作为载体,采用原位合成法将寡核苷酸探针点样至玻片上。

1.3.6 hMPV 基因芯片检测 hMPV 病毒基因:以 hMPV 阳性质粒为模板,使用 PCR 对其进行扩增与标记。将荧光标记的 PCR 产物做变性处理后,

点样至芯片,即刻将芯片放入杂交盒内,在预设杂交温度下处理一定时间,清洗芯片,采用 GenePix4100 芯片扫描仪扫描信号,采用 GenePix Pro 6.0 软件分析信号。

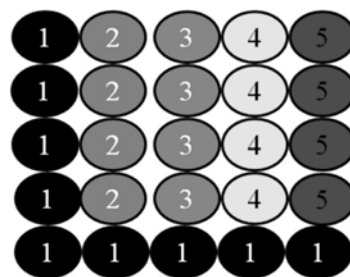


图 1 hMPV 基因芯片设计微矩阵

1.3.7 RT-PCR 检测 hMPV 筛查引物参照国际参考株序列,用 Primer5.0 软件设计,并通过 Internet 在 NCBI 上 BLAST 初步验证其特异性。引物均由 Invitrogen 公司合成。上游引物:GTTGC-CATAGAGAATCCTGTTA,下游引物:CAT-TCAGACTRTTGCTTACCCA。用 One-step RT-PCR Kit 进行 hMPV 核酸片段扩增。扩增条件:50℃30 min→95℃15 min,然后 94℃45 s→55℃45 s→72℃1 min 循环 40 次,最后 72℃10 min。

1.3.8 hMPV 基因芯片法特异性:利用经典 Trizol 法提取已确认的 hMPV 病毒 RNA,反转录获得 cDNA。采用 AxyGen 质粒小量提取试剂盒提取 hMPV 阳性质粒共 10 例,并以水或混有其它呼吸道病毒而 hMPV 病毒阴性的鼻咽拭子标本作为阴性对照共 10 例。分别利用 PCR 对其进行荧光标记,再将荧光标记物与芯片进行杂交、洗涤、扫描。

1.3.9 hMPV 基因芯片法灵敏度:使用核酸微量测定仪测定含有 hMPV 病毒阳性质粒的浓度,然后将 hMPV 病毒浓度稀释至 $2.0 \times 10^1 \sim 2.0 \times 10^7$ 个/ μ l,每个稀释度标本平行检测 5 次,每批次检测 3 个以水为模板的阴性对照。将不同浓度的样本进行 PCR 荧光标记后分别与芯片进行杂交、洗涤、扫描。

1.3.10 hMPV 基因芯片法重复性:将 5 例 hMPV 阳性标本,经 PCR 扩增产物标记后与 5 个不同批次的基因芯片在相同的实验条件下进行杂交,进而评估芯片的重复性。

1.3.11 基因芯片法的初步应用:收集 2016 年 3 月~2017 年 4 月深圳市龙华区人民医院和福田人民医院因 ALRTI 住院患儿的鼻咽拭子标本 300 份。使用 AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit 提取病毒 RNA,同时采用 hMPV 基因芯片法和 RT-PCR 法进行 hMPV 平行检测。

1.4 统计学分析 所有数据采用 SPSS22.0 统计

软件进行处理,计数资料采用率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义;结果一致性比较采用 kappa 分析。

2 结果

2.1 灵敏度 用基因芯片法检测含 $2.0\times 10^1\sim 2.0\times 10^7$ 个/ μl 不同浓度 hMPV 阳性标本,结果基因芯片法都为阳性,基因芯片法检测灵敏度达到 2.0×10^1 个/ μl ,检测线性范围为 $2.0\times 10^1\sim 2.0\times 10^7$ 个/ μl 。

2.2 重复性 将5例 hMPV 阳性标本,经 PCR 扩增标记后与5个不同批次的基因芯片在相同的实验条件下进行杂交、洗涤和扫描。结果显示5例阳性标本与5个不同批次的基因芯片杂交检测均为阳性,但有2例出现弱阳性反应,说明该方法具有很好的重复性。

2.3 特异度 基因芯片法检测10例已确认 hMPV 病毒的 RNA 和10例以水或混有其它呼吸道病毒而 hMPV 病毒阴性的鼻咽拭子标本,结果显示 hMPV 阳性标本基因芯片法检测结果均为阳性(+),而阴性对照检测结果均为阴性(-),说明该方法具有很好的特异度。

2.4 初步应用 分别采用 hMPV 基因芯片法和 RT-PCR 法同时对300例鼻咽拭子临床标本进行 hMPV 检测。结果显示,基因芯片法 hMPV 阳性检出率为20.3%(61/300),RT-PCR 法阳性检出率为9.7%(29/300),明显低于芯片法,差异有统计学意义($\chi^2=7.620, P<0.05$);通过 kappa 一致性分析, kappa 值为0.3607,说明两种方法检测结果的一致性很一般,结果见表1。

表1 hMPV 基因芯片法与常规 RT-PCR 法检测 hMPV 结果比较(n)

RT-PCR	芯片法		合 计
	hMPV(+)	hMPV(-)	
hMPV(+)	20	9	29
hMPV(-)	41	230	271
合 计	61	239	500
χ^2	7.205		
P	<0.05		

3 讨论 人偏肺病毒(human metapneumovirus, hMPV)自2001年由荷兰 van den Hoogen 等学者首次从荷兰地区急性呼吸道感染(ARTIs)患儿鼻分泌物中分离出来后,国内外各医疗机构和专家对 hMPV 进行了大量的临床研究,均发现其的存在^[5~8]。荷兰学者研究结果显示, hMPV 已感染人类至少50年以上,2岁以下婴幼儿大部分感染过 hMPV,特异性 hMPV 抗体检测结果显示,5岁以上儿童几乎都感染过 hMPV。2003年我国发现 hMPV 是我国急性呼吸道病毒感染之一。随后我

国各地相继对 hMPV 的流行病学进行了调查,结果显示,我国各地 hMPV 感染均有一定的阳性率,如长沙 hMPV 阳性率为6.25%^[9],北京阳性率高达30%^[10],成都阳性率为10.26%^[11],说明儿童 hMPV 呼吸道感染情况比较严重,应引起重视。但各地 hMPV 流行病学调查都为地区性小规模检测,目前未见大规模的流行病学调查报道,这可能与目前缺乏一种简单、快速、灵敏、特异、稳定且高通量的 hMPV 检测方法^[3]有关。因此,建立一种可行的 hMPV 检测方法极为必要,对 hMPV 感染早期诊断、治疗及预防具有重要的临床意义。

目前检测 hMPV 的方法有体外培养后病毒分离、病毒核酸检测和血清学检测^[12,13]。但由于 hMPV 在大部分的呼吸道病毒宿主细胞中生长速度极其缓慢,较难有效复制。因此,体外培养后病毒分离难以成为日常诊断手段,这也是该病毒迟迟未被发现的主要原因^[14]。ELISA 和免疫荧光等血清学检测是利用抗原抗体特异度结合的检测原理,对抗体的灵敏度和特异度要求非常高,在未探清各地区 hMPV 的基因分型前,也较难广泛使用。病毒核酸检测技术主要包括 RT-PCR 和基因芯片技术。其中 RT-PCR 具有敏感度高,特异度强的优点^[15],但 RT-PCR 法存在一次试验只能检测一种病毒核酸和 hMPV 感染初期呼吸道分泌物中病毒载量较低时,RT-PCR 因灵敏度低而出现漏检现象等问题^[16,17],而 hMPV 基因芯片检测技术具有快速、灵敏且可同时检测病毒及病毒的多种基因型,开拓了高通量基因检测的新局面,具有其它检测技术无法比拟的优势。

本课题研究选择 hMPV 基因高度保守区域来设计引物和探针,选用醛基玻片作为载体,采用原位合成法将寡核苷酸探针点样至玻片上制成基因芯片,建立了检测速度快、高通量、高灵敏度、高特异度和重复性好的基因芯片法。本研究结果显示,基因芯片法检测灵敏度高达 2.0×10^1 个/ μl ,线性范围宽,且重复性好。用基因芯片法检测已鉴定为 hMPV 阳性的标本结果均为阳性,排除了检测结果中出现漏检,同时检测混合其它呼吸道病毒的 hMPV 阴性咽拭子标本,基因芯片法均未检测出阳性,说明其特异度很高。

基因芯片法初步应用结果显示,基因芯片法 hMPV 阳性检出率明显高于 RT-PCR 法,比 RT-PCR 法具有更高的灵敏度和特异度,但通过 kappa 一致性分析结果显示两种方法的一致性不够理想,只具有一定的相关性,这可能与标本反复冻融导致 hMPV 病毒载量降低及 RT-PCR 法灵敏度低等有关。

综上所述,本课题研究选择 hMPV 基因高度保守区域来设计引物和探针并建立的基因芯片法能够显著提高鼻咽拭子标本中 hMPV 的检出率,检测时间短、针对性强、灵敏度高、特异度和重复性好,且通量高,为临床大量标本检验提供一种快速的检测方法,值得临床推广应用。

参考文献:

- [1] 郭鑫,崔玉霞,诸葛姝芮,等. Real-time PCR 与 RT-PCR 检测儿童人偏肺病毒[J]. 贵阳医学院学报, 2015,40(8):834-837,840.
Guo X, Cui YX, Zhuge SR, et al. Comparative study on real time PCR and RT-PCR testing methods for detecting human metapneumo virus[J]. Journal of Guiyang Medical College, 2015,40(8):834-837,840.
- [2] 刘爱玲,陆学东,王琼,等. 人偏肺病毒 N 蛋白的原核表达及抗原活性的初步研究[J]. 检验医学与临床, 2013,10(8):946-948.
Liu AL, Lu XD, Wang Q, et al. Analysis of prokaryotic expression and antigenicity of hMPV N protein[J]. Laboratory Medicine and Clinical, 2013,10(8):946-948.
- [3] 刘爱玲,谭辉赞,陈明艳. 人偏肺病毒的国内外研究现状[J]. 现代检验医学杂志, 2013,28(1):97-99.
Liu AL, Tan HY, Chen MY. Overseas and domestic research status of hMPV[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013,28(1):97-99.
- [4] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1171-1180.
Hu YM, Jiang ZF. Zhu Futang Practice of Pediatrics [M]. 7th Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002:1171-1180.
- [5] Chang A, Masante C, Buchholz UJ, et al. Human metapneumovirus(hMPV) binding and infection are mediated by interactions between the hMPV fusion protein and heparan sulfate[J]. J Virol, 2012, 86(6):3230-3243.
- [6] 寇宇,于新芬,李钧,等. 儿童呼吸道感染标本人偏肺病毒的分子检测与分型[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2016,30(2):161-165.
Kou Y, Yu XF, Li J, et al. Molecular detection and typing human metapneumo virus in children with respiratory tract infection[J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2016,30(2):161-165.
- [7] 王蕾. 儿童呼吸道感染标本中人偏肺病毒的分子检测与分型[J]. 临床医药文献杂志(电子版), 2016,3(35):6916-6917,6920.
Wang L. Molecular detection and typing of human partial lung virus in childrens with respiratory tract infection[J]. Journal of Clinical Medical (Electronic Edition), 2016,3(35):6916-6917,6920.
- [8] 汪天林,陈志敏,汤宏峰. 儿童人偏肺病毒下呼吸道感染的临床特征分析[J]. 浙江实用医学, 2012,17(2):92-93.
Wang TL, Chen ZM, Tang HF. Children are partial analysis the clinical features of pulmonary viral lower respiratory infection[J]. Zhejiang Practical Medicine, 2012,17(2):92-93.
- [9] 梁沫,张兵,黄寒,等. 长沙地区急性下呼吸道感染儿童呼吸道合胞病毒、偏肺病毒临床特征及流行状况分析[J]. 实用预防医学, 2012,19(7):968-972.
Liang M, Zhang B, Huang H, et al. Analysis of epidemiological characteristics and clinical respiratory of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in children with acute lower respiratory tract infection in changsha[J]. Practical Preventive Medicine, 2012,12(7):968-972.
- [10] 朱汝南,钱渊,邓洁,等. 北京地区六岁以下儿童急性呼吸道偏肺病毒感染[J]. 中华儿科杂志, 2003,41(6):441-444,插图 6-1.
Zhu RN, Qian Y, Deng J, et al. Human metapneumovirus may associate with acute respiratory infection in hospitalized pediatric patients in Beijing, China [J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2003,41(6):441-444, ill6-1.
- [11] 李天舒,潘明,杨慧萍,等. 成都地区急性呼吸道感染病例人偏肺病毒感染状况研究[J]. 现代预防医学, 2012,39(3):698-700,705.
Li TS, Pan M, Yang HP, et al. Study of the human metapneumovirus infection of acute respiratory infections in chengdu [J]. Modern Preventive Medicine, 2012,39(3):698-700,705.
- [12] Kukavica-Ibrulj I, Boivin G. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal aspirates using an enzyme immunoassay [J]. J Clin Virol, 2009,44(1):88-90.
- [13] Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, et al. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages[J]. J Clin Microbiol, 2004,42(3):981-986.
- [14] 黄文博,伍时冠,刘文宽,等. 从呼吸道标本中分离人偏肺病毒及病毒培养方法比较[J]. 中国病毒病杂志, 2013,3(2):106-111.
Huang WB, Wu SG, Liu WK, et al. Comparison of three different methods for the culture of isolated human metapneumoviruses from patients with acute respiratory tract infections [J]. Chinese Journal of Viral Disease, 2013,3(2):106-111.
- [15] 朱娜,崔丽瑾,陆柔剑,等. 2 种检测人偏肺病毒感染的荧光定量 PCR 方法的应用比较[J]. 生物技术通讯, 2015,26(3):363-366.
Zhu N, Cui LJ, Lu RJ, et al. Evaluation of two real-time RT-PCR assays for optimal detection of human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates from children in Beijing, China [J]. Letters in Biotechnology, 2015,26(3):363-366.
- [16] 刘爱玲,陆学东,吴润香,等. 人偏肺病毒亚克隆的构建与鉴定[J]. 现代检验医学杂志, 2012,27(3):26-29.
Liu AL, Lu XD, Wu RX, et al. Construction and identification of subclones of hMPV [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012,27(3):26-29.
- [17] 卢桂兰,刘医萌,崔淑娟,等. 北京地区 2015 年 11 至 12 月人呼吸道合胞病毒与人偏肺病毒感染及遗传特征研究[J]. 中国病毒病杂志, 2016,6(6):459-466.
Lu GL, Liu YM, Cui SJ, et al. The infection status and genetic feature of human respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in Beijing [J]. Chinese Journal of Viral Disease, 2016,6(6):459-466.

收稿日期:2017-06-07

修回日期:2017-07-06