

单管双重巢式聚合酶链反应及基因测序技术 鉴别呼吸道合胞病毒 A, B 亚型*

吴意¹, 金嫻¹, 樊春卉¹, 陆学东², 赵毅¹ (1. 深圳市第七人民医院检验科, 广东深圳 518081;
2. 中山大学附属第八医院检验医学部, 广东深圳 518033)

摘要:目的 建立呼吸道合胞病毒(RSV)A, B亚型的鉴别方法, 以供临床科研应用。方法 运用荧光定量聚合酶链反应技术(FQ-PCR)筛选出2015~2017年50例住院儿童咽拭子RSV阳性标本; 根据RSV的G蛋白编码基因核苷酸序列设计单管双重巢式PCR引物进行基因分型; 其A, B亚型产物经测序与GeneBank库中核苷酸序列进行比对分析鉴定; 采用卡方检验对结果进行统计学分析。结果 50例咽拭子RSV阳性患儿呼吸道合胞病毒A, B亚型及混合感染率分别为82.00%, 14.00%和4.00%, 差异有统计学显著性意义($\chi^2=81.06, P<0.01$); RSV分型结果与基因测序结果完全符合。结论 深圳东部地区以A亚型流行为主, 混合感染并存; 单管双重巢式聚合酶链反应(PCR)及基因测序技术适用于RSV的A, B亚型鉴别, 具有灵敏度高、特异度强和准确率高的特点。

关键词:巢式PCR; 基因测序; 呼吸道合胞病毒; 亚型

中图分类号: R373.14; Q503 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)01-044-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.01.011

Identification of Respiratory Syncytial Virus A and B Subtypes by Tube Double Nested Polymerase Chain Reaction and Gene Sequencing Technology

WU Yi¹, JIN Xian¹, FAN Chun-hui¹, LU Xue-dong², ZHAO Yi¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Seven People's Hospital,
Guangdong Shenzhen 518081, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Eighth
Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong Shenzhen 518033, China)

Abstract: Objective Objective to establish a method for identification of respiratory syncytial virus (RSV) A and B subtypes for clinical research and application. **Methods** Using fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) screened 50 cases of throat swab that RSV were positive in hospitalized children from 2015 to 2017. The genotyping was performed according to the nucleotide sequence of G protein coding gene, and a single tube double nested PCR primers was designed for it. A and B subgroup by sequencing to conduct comparative analysis with nucleotide sequence in the Genbank. The results were analyzed by chi-square test. **Results** In the 50 cases of throat swab RSV positive children, respiratory syncytial virus A and B subtype and mixed infection rates were 82.00%, 14.00% and 4.00%, respectively. The difference was statistically significant ($\chi^2=81.06, P<0.01$). The RSV fractal results were consistent with the gene sequencing results. **Conclusion** The eastern part of shenzhen was dominated by respiratory syncytial virus A subtype epidemic and mixed infection. Single tube double nested polymerase chain reaction (PCR) and gene sequencing technique is suitable for the identification of A and B subtypes of RSV. It is characterized by high sensitivity, specificity and high accuracy.

Keywords: nested PCR; gene sequencing; respiratory syncytial virus(RSV); subgroup

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)为有包膜的单股负链RNA病毒, 属于副黏病毒科, 肺炎病毒属, 基因组有15 222个核苷酸。编码8个结构蛋白和2个非结构蛋白。病毒呈圆形或丝状, 大小100~350 nm, 其核酸不分片段, 核衣壳螺旋对称, 含RNA依赖的RNA多聚酶。有F, G, P和N四种蛋白, 其中包膜上F蛋白能引起病毒包膜之间的融合, 包膜上G蛋白对宿主细胞有吸附作用。NS1和NS2为非结构蛋白, 是干扰素系统的拮抗物; N是核壳蛋白; P是磷酸蛋白, 是聚合酶复合物的成分; M是基质蛋白; SH是

一种小疏水横跨膜表面糖蛋白; G是一种N端和O端糖基化的II型横跨膜黏附糖蛋白; F是N端糖基化的I型横跨膜糖蛋白, 与细胞质膜融合, 在物质通过胞膜时产生作用。RSV根据F和G蛋白上的抗原组分不同, 分为A和B两种亚型^[1]。四种蛋白均具有抗原变异性, 以G蛋白的可变性最高。目前RSV基因检测技术有巢式PCR, RT-PCR, 实时荧光定量PCR, DNA测序、核酸杂交技术、基因芯片技术和多重基因表达遗传分析系统等。本次实验建立了单管双重巢式PCR及基因测序技术鉴定RSV的A, B亚型, 现报告如下:

* 基金项目: 深圳市盐田区科技局科技计划资助项目(20160102)。

作者简介: 吴意(1982-), 男, 大学本科, 主管检验师, 主要从事病原微生物分子诊断学研究, E-mail: 845007571@qq.com。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择2015年10月~2017年5月因呼吸道感染在深圳市第七人民医院儿科住院治疗的儿童,筛选出咽拭子RSV阳性患儿50例,年龄为10天~9岁。男患儿23例,女患儿27例。根据临床疾病诊断标准,按临床症状、影像学 and 体征三者结合共确诊四种疾病分别为急性喉气管支气管炎、支气管肺炎、急性支气管炎和急性上呼吸道感染。

1.2 试剂和仪器 RSV试剂盒购于中山大学达安基因股份有限公司,PCR引物和酶混合物由华大基因武汉分公司合成,微量加样器购于德国Eppendorf公司,漩涡振荡混匀器购于美国Vortex公司,C1301型迷你离心机购于美国Labnet公司,BSC-1100A2X型生物安全柜购于济南鑫贝西公司,DW-FL253低温冰箱购于中科美菱低温科技股份有限公司,Mastercycler ep realplex2荧光定量PCR仪购于德国Eppendorf公司,DYCP-31F核酸电泳仪购于北京六一仪器厂,凝胶成像系统购于美国伯乐公司,ABI3730XL型DNA测序仪购于美国Applied Biosystems公司。

1.3 方法

1.3.1 样本的收集:用鼻咽拭子取患者咽部分泌物,将标本密封立即送检,运送采用0℃冰壶。标本未及时检测可保存于-20℃,保存期为12个月。

1.3.2 RSV-RNA的提取:在咽拭子标本管内加入1000 μl生理盐水震荡洗脱分泌物,转入1.5 ml的离心管内;12 000 r/min离心5 min,吸掉上层液体留管底沉淀物100 μl;加入200 μl Trizol和100 μl RNA氯仿,震荡20 s后,放置3 min,12 000 r/min离心2 min,吸取无色上层液体转入新的1.5 ml离心管内;加入10 μl RNA提取液A,充分震荡混匀,8 000 r/min离心1 min;去上清液再加入400 μl溶液C(已加入18 ml无水乙醇),震荡混匀,8 000 r/min离心1 min;开盖60℃干浴5 min,加30 μl DEPC水溶解沉淀备用。

1.3.3 PCR扩增筛选阳性标本:加10 μl RSV-RNA模板进PCR试剂盒反应管内,高速离心数秒后上机进行扩增。扩增循环条件为:40℃30 min,94℃3 min,然后93℃15 s,55℃45 s共10个循环,93℃15 s,55℃45 s共30个循环,采集荧光信号。结果分析及质量控制:每次实验设置阴性质控品、强阳性质控品和临界(弱)阳性质控品作为质量控制,保证实验结果的准确可靠性。RSV阴性质控品荧光信号无增长,且无明显S型扩增曲线;RSV强阳性和临界阳性质控品荧光信号增幅明显,呈典型S型扩增曲线;且RSV强阳性质控品Ct值在9

~12范围,临界阳性质控品Ct值在17~20范围,此三项要求必须在同次实验中同时满足,否则实验无效,需重新检测。

1.3.4 RSV-RNA模板逆转录为cDNA模板:在0.5 ml PCR反应管内加入2 μl Random 6 mers,1 μl dNTP Mixture和10 μl RNA模板,上机65℃5 min,取出放置冰盒内1~2 min;在反应管内再加入4 μl的5× PrimeScript Buffer,0.5 μl的RNase Inhibitor,1 μl的PrimeScript RTase和1.5 μl的RNase Free dH₂O,上机30℃10 min,42℃40 min,70℃15 min结束,逆转录的cDNA模板于-20℃保存备用。

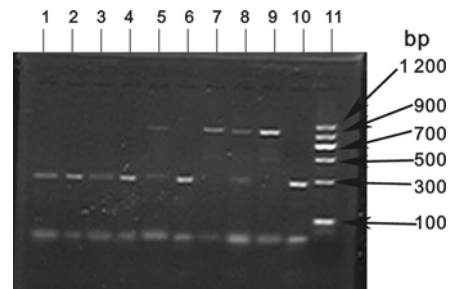
1.3.5 RSV亚型PCR扩增:RSV通用引物序列为:GGGGCAAATGCAAACATGTCC,A亚型特异性引物序列为:GGGGTTGTGTTCTTGATC,B亚型特异性引物序列为:GCTGTGGGTATTTGTGTG。在0.5 ml PCR反应管内加入12.5 μl 2× mix酶混合物,通用引物和A,B亚型引物各1 μl,cDNA模板2 μl,再加ddH₂O至25 μl,高速离心10 s后上机扩增。PCR反应扩增条件为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,52℃复性30 s,72℃延伸60 s,共32个循环;72℃延伸10 min,最后4℃forever。

1.3.6 电泳及测序:2 g/dl的琼脂糖凝胶120V电压电泳45 min,在凝胶成像系统下观察电泳结果。PCR产物测序由华大基因武汉分公司和广州分公司共同完成。

1.4 统计学分析 采用卡方检验对结果进行统计学分析,应用SPSS11.0统计软件进行数据处理,以P<0.05为差异有统计学显著性意义。

2 结果

2.1 RSV亚型的检测结果 RSV通用引物与A亚型特异性引物扩增产物目的片段为277 bp,RSV通用引物与B亚型特异性引物扩增产物目的片段为863 bp,RSV的A,B亚型及混合感染产物电泳见图1。



注:1,2,3,4,6,10为A亚型;7,9为B亚型;5,8为AB混合型;11为Marker。

图1 RSV亚型及混合感染电泳图

2.2 A亚型扩增产物正向核苷酸序列及测序峰图
RSV的A亚型扩增产物正向核苷酸序列:CCAGTTCACGCACCGCCAGACACTAGAAGAACCTGGACACTCTCAATCATCTATTATTCATATCATCGTGCTTATACAAGTTAAATCTTAAATCTATAGCACAAATCACATTATCTATTTT

GGCAATGATAATCTCAACCTCACTTATAATTGCAGCCATCATATTTCATAGCCTCGGCA AACCACAAAGTCACACTAACAACTGCAATCATACAAGATGCAACGAACCAGATCAAGAACACAACCC。部分测序峰图见图2。

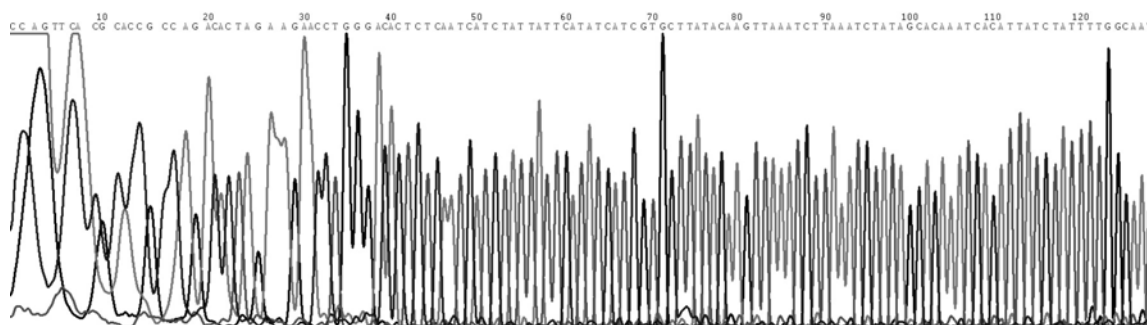


图2 A亚型扩增产物正向核苷酸序列测序峰图

2.3 A亚型扩增产物反向核苷酸序列及测序峰图
RSV的A亚型扩增产物反向核苷酸序列:AGATGAGATGCAGTTGTTAGTGACTTTGTGGTTATGCCGAGGCTATGAATATGATGGCTGCAATTATAAGTGAGGTTGAGATTATCATTGCCAAAATAGATAATGTGATTTGTGCTA

TAGATTTAAGATTTAACTTGTATAAGCACGATGATATGAATAATAGATGATTGAGAGTGTCCCAGGTTCTTTCTAGTGTCTTGCGGTGCGTTGGTCCTTGGTTTTGGACATGTTTGCATTTGCCCC。部分测序峰图见图3。

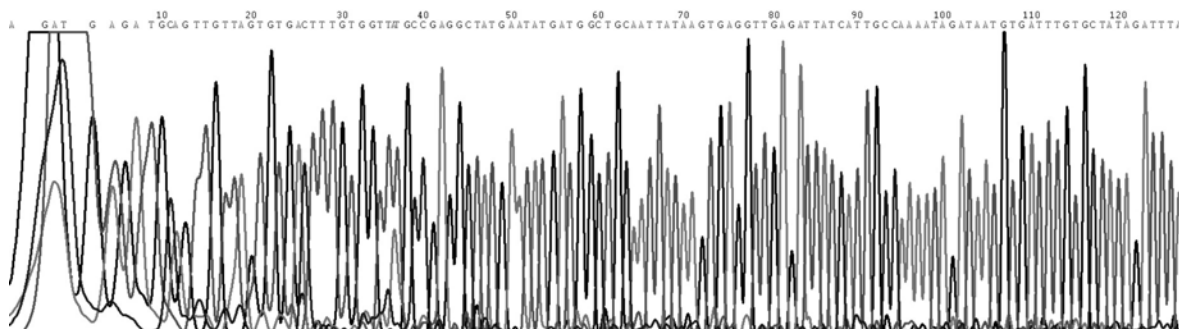


图3 A亚型扩增产物反向核苷酸序列测序峰图

2.4 B亚型扩增产物正向核苷酸序列及测序峰图
B亚型扩增产物正向核苷酸序列:CCGGGTCACGGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTTATAATTGCAGCCATAATATTGCCAATCACAAAGTTACACTAACAACTGTCACAGTTCAAACAATAAAAAACCACACTGAGAAAAACATAACCACTTACCTTACTCAGGTCTCACCAGAAA GGGTTGGCCCATCCAAACAACCCACAGCCACACCACCAATCCACACAACTCAGCCACAATATCACCCAATACAAAATCAGAAACACACCATACAACAGCACAAACCAAAGGCACAACCTCTATTCCAACACAGAACAAACAAGCCAAGCACAAAACCACGTCCAAAAAATCCACCAAAAAAGATGATTACCATTTTGAAGGTTTCAACTTTGTTCCCTGTAGTATATGTGG

CAACAATCAACTCTGCAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAACCAACTACAAAACCCACAAACAAACCACCTACCAAAACCACAAACAAAAGAGACCCCCAAAACACTAGCCAAAACACCGAAAAGAAAAGAAACCACCATTAACCCAACAAAAAACCAACCCCCAAGACTACAGAAAGAGACACCAGCACCTCACAATCCATTGCGCTTGACACAACCACATCAAAACACACAGAAAGGGACACCAGCACCTCACAATCCATTGCGCTTGACACAACCACATCAAAACACACAACCCAACAGCAATCTCTCTACTCAACCATCCCCGAAAACACACCCCACTCCACACAATTTCCCCCCCAGCA。部分测序峰图见图4。

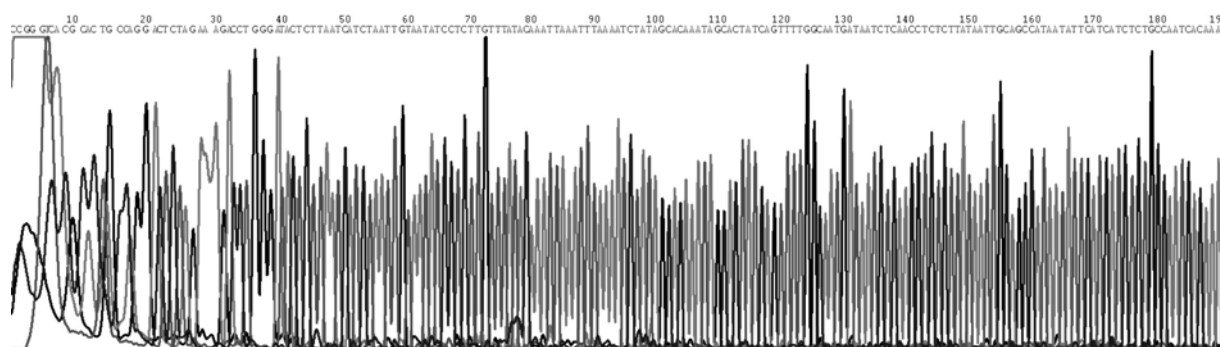


图4 B亚型扩增产物正向核苷酸序列测序峰图

2.5 B亚型扩增产物反向核苷酸序列及测序峰图

B亚型扩增产物反向核苷酸序列: CATTTTCGAC CAGGTTGAGTAGAGAGTTGCTGTTGGGTT GTGTGTTTTGATGTGGTTGTGTCAAGCGC AATGGATTGTGAGGTGCTGGTGTCCCTTT CTGTGTGTTTTGATGTGGTTATGTCGAGC ACAGTGGATTGTGGGGTGTGGTGTCTCT TTCTGTAGTCTTGGGGGTTGGTTTTTTTG TTGGGTTAATGGTGGTTTTCTTTTTTCGGT GTTTTGGCTAGTGTGTTTTGGGGTCTCTTTT GTTTGTGGTTTTGGTAGGTGGTTTGTGTTG TGGGTTTTGTAGTTGGTTTTTTCTTTGGT TTATTGCTTGGTATTGTTTTTGCAAATGGA TTTGCAGAGTTGATTGTTGCCACATATAC TACAGGGAACAAAGTTGAACACTTCAAAA TGGTAATCATCTTTTTTTTGGTGGATTTTT

TGGACGTGGTTTTGTGCTTGGCTTGTGTTGT TCTGTGTTGGAATAGAGGTTGTGCCTTTG GTTTGTGCTGTTGTATGGTGTGTTTCTGA TTTTGTATTGGGTGATATTGTGGCTGAGT TTGTGTGGATTGGTGGTGTGGCTGTGGGT TGTGTTGGATGGGCCAACCCTTTCTGGTGA GACCTGAGTAAGGTAAGTGGTTATGTTTT TCTCAGTGTGGTTTTTTTATTGTTTGAAC GTGACAGTTGTTAGTGTAACTTTGTGATT GGCAGAGATGATGAATATTATGGCTGCA ATTATAAGAGAGGTTGAGATTATCATTGC CAAACTGATAGTGCTATTTGTGCTATAG ATTTTAAATTTAATTTGTATAAACAAGAG GATATTACAATTAGATGATTAAGAGTATC CCAGGTCTTCTTCTAAAGTCCTGGCAGTGC GTTGA。部分测序峰图见图5。

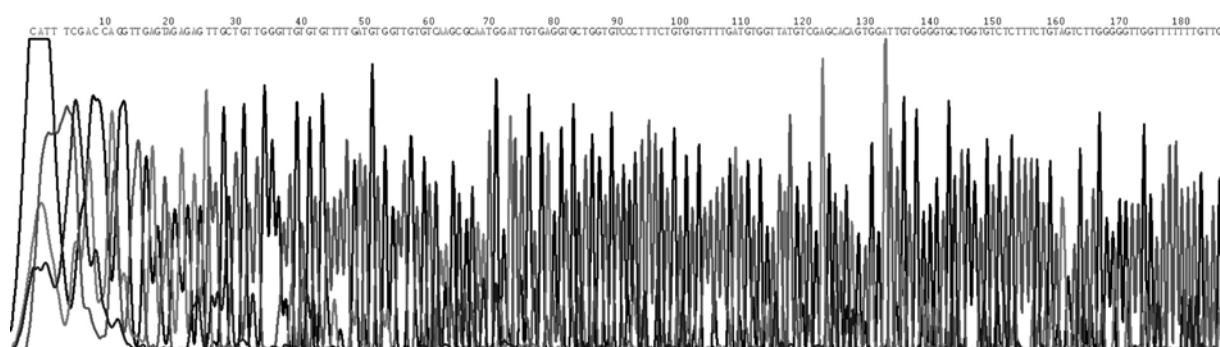


图5 B亚型扩增产物反向核苷酸序列测序峰图

2.6 呼吸道合胞病毒 A, B 亚型及混合感染率

50例咽拭子RSV阳性患儿呼吸道合胞病毒A, B亚型及AB亚型混合感染率分别为82.00%(41/50), 14.00%(7/50)和4.00%(2/50), 各亚型之间感染率差异有统计学显著性意义($\chi^2 = 81.06$, $P < 0.05$)。

3 讨论 呼吸道合胞病毒是临床常见的引起婴幼儿下呼吸道感染与院内感染的重要病原菌之一^[2,3], 发病率高, 传染性强^[4]。RSV为有包膜单股负链RNA病毒, 主要是通过呼吸道、手和污染

物品传播, 临床症状主要表现为发热、咳嗽、喘息和呼吸困难, 重症病例还可造成多系统损害。由于G蛋白基因在不同亚型间, 甚至在同一亚型内均明显变异, 半数以上儿童可发生反复感染。病毒的分离培养一直是诊断RSV感染的金标准, 但该方法繁琐, 周期时间长, 且不能鉴定其亚型, 难以广泛应用于临床检测中。

目前RSV的检测方法有直接免疫荧光法、间接免疫荧光法、桥联酶标免疫法、ELISA, RT-PCR, 实时定量PCR、免疫层析分析技术等。郭虹

等^[5]报道了直接免疫荧光法比金标法检测 RSV 灵敏度高,但结果基本一致。张允奇等^[6]运用 GeXP 多重 RT-PCR 技术检测呼吸道病毒具有快速、高通量等特点。本次实验研究先运用 FQ-PCR 技术筛选出 RSV-RNA 阳性标本,再根据 RSV 的 G 蛋白编码基因核苷酸序列设计了单管双重巢式 PCR 引物进行基因分型;其 A、B 亚型产物经电泳后观察其片段大小,再经 DNA 测序与 GeneBank 库中核苷酸序列进行比对分析鉴定,其结果完全吻合,说明其特异度、重复性和准确度都非常高,解决了常规 PCR 存在的假阴性和假阳性。同时我们单管一次能检测出 A、B 亚型双重感染,无需分两管进行扩增。PCR 产物电泳后所剩标本还可以进行 DNA 测序分析,对不同亚型之间的核苷酸同源性进行比对,同时可以发现突变的碱基。此次实验研究过程中未发现非特异性扩增片段,再次证明其方法技术具有很高的特异度。

此次研究主要是以 A 亚型为主,同时也检出混合感染 2 例,这与周平等^[7]报道的 A 亚型 35.5% 和刘文宽等^[8]报道的 15.0% 差异甚远,但与季健等^[9]报道的 80.15% 比较接近,其原因可能是与地域、温度气候及流行季差异有关。近年来 RSV 的流行病学研究发现,A、B 两个亚型在一个地区的某个流行季节里以一个亚型占优势,两个亚型交替流行。RSV 表面的 G 蛋白是刺激机体产生保护性抗体最主要的病毒抗原之一,而不同的 RSV 亚型 G 蛋白所产生的保护性抗体不能有效的提供交叉保护作用,因此 RSV 亚型的存在可能就是引起反复感染的重要原因。乔瑞娟等^[10]研究发现 A、B 亚型优势交替进行,这与 Cui 等^[11]对北京地区和 Agoti 等^[12]对肯尼亚地区的监测结果一致。有人推测,之所以世界大部分国家和地区总表现以 A 基因型流行为主,可能是由于 B 基因型致病力较 A 基因型弱,因此 B 基因型往往表现为亚临床状态或隐性无症状感染,但这个结论目前还存在许多争议。还有学者认为可能是由于 A 基因型内部的变异要多于 B 基因型内部的变异,造成了大部分时间和大部分地区以 A 基因型流行占优势。此次测序结果未发明明显突变基因序列。混合感染在国内少见报道,可能是由于其方法学局限性的原因,而单管双重巢式 PCR 弥补了常规 PCR 技术的不足,实现了一管两项结果的检测,充分体现其高效性。

此方法学的建立可运用于 RSV 的分子流行病学研究,对疫苗的研制可提供一定的实验数据,综上所述,单管双重巢式聚合酶链反应及基因测序技术适用于 RSV 的 A、B 亚型鉴别,具有灵敏度高、

特异度强和准确率高的特点。

参考文献:

- [1] Shi T, McLean K, Campbell H, et al. Aetiological role of common respiratory viruses in acute lower respiratory infections in children under five years; A systematic review and meta-analysis [J]. J Glob Health, 2015, 5(1): 010408.
- [2] Goldstein E, Greene SK, Olson DR, et al. Estimating the hospitalization burden associated with influenza and respiratory syncytial virus in New York City, 2003~2011 [J]. Influenza and Other Respiratory Viruses, 2015, 9(5): 225-233.
- [3] Chen K, Jia R, Li L, et al. The aetiology of community associated pneumonia in children in Nanjing, China and aetiological patterns associated with age and season [J]. BMC Public Health, 2015, 15(1): 113.
- [4] 徐晶晶, 刘 斌. 中草药治疗呼吸道合胞病毒感染研究概况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 326-330.
- [5] Xu JJ, Liu B. Overview of Chinese herbal medicine in treatment of respiratory syncytial virus infection [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formu, 2012, 18(21): 326-330.
- [6] 郭 虹, 金正江, 胡兴文. 金标法和直接免疫荧光法检测呼吸道合胞病毒的比较 [J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(3): 51-52.
- [7] Guo H, Jin ZJ, Hu XW. Comparison of immuno-gold method and direct immunofluorescence to detect respiratory syncytial virus [J]. J Mod Lab Med, 2013, 28(3): 51-52.
- [8] 张允奇, 王 琼, 张银辉, 等. GeXP 多重 RT-PCR 技术在呼吸道病毒检测中的应用 [J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(2): 94-97, 102.
- [9] Zhang YQ, Wang Q, Zhang YH, et al. Detection of respiratory viruses by multiplex RT-PCR with a GeXP analyzer [J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(2): 94-97, 102.
- [10] 周 平, 秦 弦, 谭忠友, 等. 小儿呼吸道合胞病毒 A、B 亚型的流行病学特征及临床表现 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(14): 115-118.
- [11] Zhou P, Qin X, Tan ZY, et al. Epidemiological features and clinical manifestations of children with respiratory syncytial virus of subtype A and B [J]. China Medical Herald, 2016, 13(14): 115-118.
- [12] 刘文宽, 周 荣, 陈德晖, 等. 呼吸道合胞病毒 A 与 B 亚型多重荧光 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 临床检验杂志, 2016, 34(10): 751-754.
- [13] Liu WK, Zhou R, Chen DH, et al. Establishment and application of a novel multiplex real-time PCR for detection of respiratory syncytial virus subgroup A and B [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2016, 34(10): 751-754.
- [14] 季 健, 邵雪君, 张学兰, 等. 急性呼吸道感染患儿鼻咽分泌物中呼吸道合胞病毒亚型的检出分析 [J]. 临床儿科杂志, 2014, 32(4): 375-378.
- [15] Ji J, Shao XJ, Zhang XL, et al. Subgroup analysis of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretion of children with acute respiratory infection [J]. J Clin Pediatr, 2014, 32(4): 375-378.
- [16] 乔瑞娟, 汪 鹏, 康 倩, 等. 白银地区 5 岁以下住院儿童 RSV 感染流行病学分析 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2015, 29(6): 510-514. (下转 51 页)

(上接 48 页)

- Qiao RJ, Wang P, Kang Q, et al. Epidemiological analysis of respiratory syncytial virus in pediatric patients under 5 years in hospital with pneumonia in Baiyin district[J]. Chinese J Exp Clin Virol, 2015, 29(6):510-514.
- [11] Cui GL, Zhu RN, Qian Y, et al. Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups A and B in children in re-

cent five consecutive years[J]. PLoS One, 2013, 8(9):e75020.

- [12] Agoti CN, Mayieka LM, Otieno JR, et al. Examining strain diversity and phylogeography in relation to an unusual epidemic pattern of respiratory syncytial virus(RSV) in a long-term refugee camp in Kenya[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(1):178.

收稿日期:2017-06-10

修回日期:2017-12-15