

文章编号:1002-2694(2005)02-0169-04

TaqMan 荧光定量 RT-PCR 快速检测甲 3 型流感病毒^{*}

严菊英, 卢亦愚, 冯 燕, 史 雯, 茅海燕

摘要: 目的 建立一种特异、灵敏、快速的荧光定量 RT-PCR 方法用于检测甲 3 型流感病毒核酸。方法 根据 GenBank 登录的流感毒株序列, 应用生物学软件进行序列比对, 在甲 3 型流感病毒血凝素(HA)基因的保守区设计引物和 TaqMan 探针, 并进行筛选。对荧光 RT-PCR 反应条件进行优化, 检测该方法的特异性和灵敏度。并对疑似流感含漱液标本进行检测。**结果** 该方法对甲 3 型流感病毒的检测有高度的特异性, 对甲 1 型、乙型、禽流感病毒 H5、SARS 病毒及其他呼吸道病毒均无交叉反应, 检测的灵敏度达 0.01 TCID_{50} , 可从疑似流感患者含漱液中直接检测流感病毒核酸, 从病毒核酸提取至完成检测仅需 3 h 左右。**结论** 本研究建立的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 是一种快速检测甲 3 型流感病毒特异、敏感的新方法。

关键词: 荧光定量 RT-PCR; TaqMan 探针; 甲 3 型流感病毒; 临床标本; 检测**中图分类号:**R373.1 **文献标识码:**A

Rapid detection of influenza A3 virus by TaqMan-based real-time RT-PCR assay

YAN Ju-ying, LU Yi-yu, FEN Yan, SHI Wen, MAO Hai-yan

(Zhejiang Center for Disease Prevention and Control 310009, China)

ABSTRACT: To establish a specific, sensitive method of TaqMan-based real time RT-PCR assay for the rapid detection of influenza A3 virus, the hemagglutinin (HA) gene of influenza virus down-loaded from Genbank was aligned by using the biologic software, and the specific primers and probes were designed in the conserved regions of HA gene. The primers and probes as well as the reaction condition were optimized to improve the sensitivity and specificity of the assay. The throat swab specimens used in this assay were taken from patients with acute respiratory tract infections. It was found that the specificity of this assay was high without any cross-reactions with influenza A1, A5, B viruses, SARS virus and other commonly encountered viruses. The sensitivity of this assay was 0.01 TCID_{50} , and the viral RNA could be detected directly from the clinical specimens. It took only 3 hours to complete the whole course of reaction including extraction of viral RNA and the real - time PCR. It concludes that the TaqMan-based real-time RT-PCR assay is a rapid, sensitive and specific method for the detection of influenza A3 virus.

KEY WORDS: real-time PCR; TaqMan-based probe; influenza A3 virus; clinical specimen; detection

流行性感冒(流感)的临床症状易与普通感冒相混淆, 最终必须通过实验室方法来进行确诊, 在实验室诊断手段中, 最原始也是最直接的是: 采取患者的含漱液, 接种鸡胚与狗肾传代细胞(MDCK)进行病毒分离、定型来进行判断^[1-2]。但采用这种方法常常需要花费较长的时间(5 天以上), 而目前常用流感病毒治疗药物的最佳使用时期是在发病 2 天以内, 尤其对暴发疫情来讲, 诊断更是越快越好, 因此开展流感病毒的快速诊断是很有必要的^[3]。

近年来, 国外开发出流感病毒快速诊断试剂盒, 其原理有荧光法, 酶标法, 金标法等等, 虽能达到快速诊断的目的, 但其敏感度远低于病毒分离法, 假阴性较高, 加上价格昂贵, 在我国实际上很少使用。流感病毒的 RT-PCR 检测较经典的病毒分离方法更

为敏感, 而且 6~7 h 就可得出结果, 但其存在着检测易污染与假阳性率高的缺点。近几年发展起来的荧光定量 PCR 技术, 它利用了 PCR 对 DNA 的高效扩增, 探针技术的高特异性和光谱技术的敏感性以及定量的特点, 不仅克服了常规 PCR 定性检测的不足, 而且具有直观, 重复性好, 特异性强, 敏感性高和易操作等优点。我们在原来建立 RT-PCR 方法与 MRT-PCR 方法快速检测甲 1、甲 3 型流感病毒核酸的基础上^[4-5], 建立了检测甲 3 型流感病毒的 Taq-Man 荧光定量 RT-PCR 方法, 用该法对甲 3 型流感病毒与相关的临床标本进行了检测, 获得了满意的结果。

^{*} 浙江省自然科学基金重点项目(Z303909)

作者单位:浙江省疾病预防控制中心病毒研究所, 杭州 310009

1 材料与方法

1.1 病毒株、细胞与临床标本 流感病毒株甲3/悉尼/5/97、甲3/沪防/1/98、甲3/汉防/359/95、甲1/北京/53/97、乙/深圳/12/97、乙/京防/184/93由国家流感中心提供, 麻疹病毒株沪191与Endmoston株、风疹病毒Gos株、流行性腮腺炎病毒Terylynn株、呼吸道合胞病毒Long株分别由卫生部上海生物制品研究所、中国药品生物制品检定所提供。流感病毒甲3/浙江/10/98、甲3/浙江/6/99、甲3/浙江/10/2002、甲3/浙江/78/03、甲3/浙江/92/03、甲3/浙江/89/04、甲3/浙江/108/04、甲1/浙江/18/02、乙/浙江/1/99与乙/浙江/1/02等分离株由本实验室从临床流感病例标本中分离并经国家流感中心实验室确认。SARS病毒由本实验室分离(NCBI GenBank登录号AY297028), 禽流感病毒H5由WHO提供。流感病毒效价滴定采用的MDCK细胞由国家流感中心提供。临床疑似流感患者的含漱液标本由浙江省流感监测点医院和地/市疾控中心采集送检。

1.2 引物与探针 选择甲3型流感病毒HA基因的保守区域, 设计多对引物。引物长度一般为20个碱基左右, GC含量为40~80%, 引物内无二级结构, 引物间与引物内无互补序列, 引物间的Tm值差异小于2℃。探针长度在20~25 bp之间, 其Tm值比引物Tm值高5~10℃左右, 探针5'端标记的荧光报告基团是FAM, 3'端标记的荧光淬灭基团为TAMRA, 扩增目标片段的长度为85 bp, 引物和探针由上海博亚生物科技有限公司合成。引物和探针的序列:

FluA3(YG) F: 5' - TGAACCGCAGCAAAG-CYTACA - 3'

FluA3(YG) R: 5' - CGGATGGAGGCAAC-TAGTGACCTA - 3'

FluA3 Probe: 5' - ATGTGCCGGATTAT-GCCTCCC - 3'

1.3 病毒RNA的提取与定量标准 病毒RNA的提取, 采用德国QIAGEN公司的Reansy Mini Kit, 按试剂盒说明书提取病毒RNA。甲3型流感病毒株经滴定后作为参考株, 将其稀释至100, 10, 1, 0.1, 0.01 TCID₅₀每个反应管。

1.4 反应体系与反应条件 本研究中所采用的荧光定量RT-PCR反应体系为25 μl。各反应物的终浓度为: 0.2 mmol/L dNTP混合物(each)、7.5 mmol/L MgCl₂、0.4 μmol/L引物、0.2 μmol/L探针、0.5 μl酶混合物(5 u/μl)、10 μl模板RNA、最后

用DEPC水补至25 μl。用矩阵法优选引物和探针的最佳浓度, 以0.4 μmol/L的引物浓度与0.2 μmol/L的探针浓度获得的Ct值较小而荧光强度(ΔRn)最大。

用MJ Research Option 2荧光检测系统与Roche lightcycle荧光检测系统分别进行检测, 并按下列反应参数进行: 45℃ 30 min逆转录, 94℃变性2 min, 以93℃ 15 s, 60℃ 1 min扩增40个循环, 在60℃进行单点荧光检测。

1.5 RT-PCR反应 采用Roche公司的RT-PCR system 1854476试剂盒进行, 反应体系为50 μl, 其中20.5 μl DEPC处理的双蒸水, 10 μl 5×RT-PCR缓冲液, 4 μl dNTP混合物(10mmol/L), 2.5 μl DTT(100mmol/L), 1 μl RNase抑制剂, 20 μmol/L引物1与引物2各0.5 μl, 0.5 μl酶混合物(5 u/μl), 10 μl模板RNA。反应条件为50℃ 30 min, 94℃ 2 min进行逆转录, 然后94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 68℃ 1 min进行扩增, 35个循环后转入68℃ 7 min, 取8 μl产物进行电泳判断有无85bp的特异性条带出现。

1.6 荧光RT-PCR的特异性和重复性 对已标定TCID₅₀的甲3型流感病毒稀释后分别提取RNA, 平行进行RT-PCR与TaqMan荧光定量RT-PCR反应, 比较其灵敏度、重复性。此外, 提取流感病毒甲1型、乙型, 禽流感病毒H5, SARS病毒, 麻疹病毒, 风疹病毒, 腮腺炎病毒与呼吸道合胞病毒核酸, 用甲3型流感TaqMan荧光定量RT-PCR系统进行检测, 比较其检测的特异性。

2 结 果

2.1 荧光RT-PCR的特异性 对流感病毒甲3/悉尼/5/97, 甲1/北京/56/97, 乙/深圳/12/97, 甲3/浙江/78/03, 甲3/浙江/52/04等20余株流感标准株和分离株、麻疹病毒沪191, 风疹病毒GOS株, 流行性腮腺炎病毒TeryLyn株, 呼吸道合胞病毒Long株, 禽流感病毒H5和SARS病毒分别提取病毒RNA, 采用甲3型流感病毒TaqMan荧光定量RT-PCR方法进行检测, 除甲3型流感病毒出现很好的阳性结果外, 其它所有病毒的检测结果均呈阴性。

2.2 荧光RT-PCR的敏感性 对流感病毒株甲3/悉尼/5/97株, 采用MDCK细胞进行病毒效价滴定(10⁵ TCID₅₀/ml), 然后稀释成100、10、1、0.1、0.01 TCID₅₀, 提取病毒RNA, 用本研究建立的甲3型流感病毒TaqMan荧光定量RT-PCR法进行检测。并与常规RT-PCR方法相比较, 结果见表1。

2.3 荧光RT-PCR的重复性 对流感病毒株甲3/悉尼/5/97株按10倍系列稀释成不同的病毒浓度,

对每一个浓度的样本,都作三个重复,通过计算 Ct 值的差异来验证检测的准确性,见表 2、图 1。

表 1 荧光 RT-PCR 方法检测甲 3 型流感病毒的敏感性

方 法	病毒浓度(TCID ₅₀ /管)				
	100	10	1	0.1	0.01
荧光 RT-PCR 法 (Ct 值)	17.41	20.45	23.55	27.36	30.54
常规 RT-PCR 法 (条带)	+	+	+	+	-
病毒分离(CPE)	+	+	+	-	-

表 2 荧光 RT-PCR 检测甲 3 型流感病毒的准确性*

病毒浓度 TCID ₅₀ /管	样本 Ct 值			平均值	标准差
	1	2	3		
100	17.47	17.47	17.29	17.41	0.08
10	20.52	20.87	19.97	20.45	0.37
1	23.70	22.97	23.99	23.55	0.43
0.1	27.27	27.06	27.76	27.36	0.29
0.01	30.70	30.55	30.37	30.54	0.13

* 平均值与标准差采用 stata 8.0 软件处理

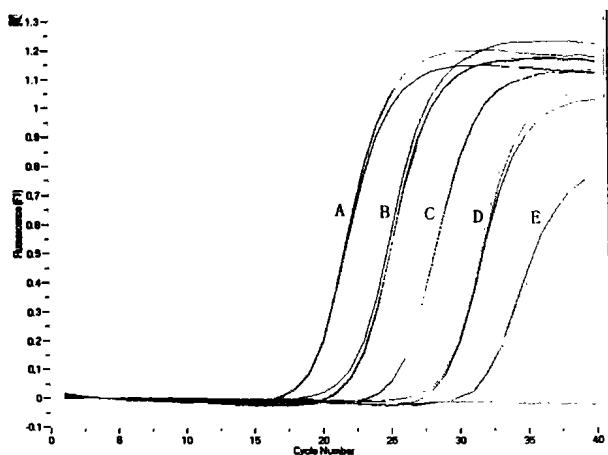


图 1 荧光定量 RT-PCR 对甲 3 型流感病毒核酸检测的敏感度和准确性

A: 100 TCID₅₀/管; B: 10 TCID₅₀/管; C: 1 TCID₅₀/管;
D: 0.1 TCID₅₀/管; E: 0.01 TCID₅₀/管

2.4 流感疑似患者临床样本的检测 对我省疑似流感暴发疫情及流感监测医院送检的 60 份患者含漱液应用 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法,常规 RT-PCR 方法与病毒分离方法进行检测,其中病毒分离阳性 22 份(36.67%), RT-PCR 阳性 25 份(41.67%), TaqMan RT-PCR 阳性 30 份(50.00%),这三者检测的阳性患者结果一致。对于荧光 RT-PCR 阳性而病毒分离阴性的病例为了排除荧光 RT-PCR 结果假阳性的可能,我们对患者发病早期和恢复期双份血清进行流感病毒血凝抑制抗体(HI)测定,结果甲 3 型流感病毒 HI 抗体均 ≥ 4 倍增

长,血清学与 TaqMan RT-PCR 结果完全一致。见图 2。

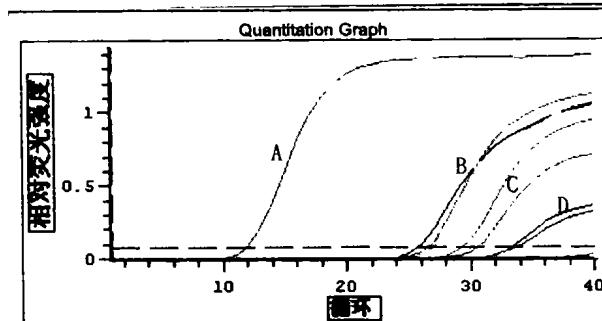


图 2 荧光定量 RT-PCR 对疑似流感患者部分含漱液样本的检测

A: 甲 3 型流感病毒阳性对照; B~D: 为临床含漱液样本阴性对照没有出峰

3 讨 论

有关甲 3 型流感病毒 RT-PCR 检测方法,国内外已有报导,它具有灵敏度高,特异性强,所需时间短的优点,目前已在流感病毒的核酸检测中得到应用^[6-7],但其检测时间仍需 6~7 h,且容易由于 PCR 扩增产物污染而产生假阳性的可能。近几年发展起来的以特异性荧光探针为特点的荧光定量 PCR 技术,实行完全闭管式操作,不仅能大大减少扩增产物污染的机会,而且较常规 RT-PCR 技术,无论从敏感性,特异性与速度上都更具有优势,当然它对引物和探针的设计也提出了更高的要求^[8-9]。通常对流感病毒相关基因检测的引物设计上,有人

采用 HA 区域, 也有人采用 NP、NS、M 等区域。由于 HA 区域在流感病毒侵入人体后起着诱导产生保护性中和抗体的主要功能, 因此在逃避中和抗体的攻击中 HA 基因的变异尤为活跃, 尤其是 HA1 区域的变异, 对新一轮流感流行密切相关, 受到人们的普遍关注。本试验采用 TaqMan RT-PCR 方法, 由于 TaqMan 探针对序列的变化非常敏感, 我们从美国的 NCBI、日本的 DDBT 与欧洲的 EBI 基因库上下载了近二十年来世界各地的甲 3 型流感病毒代表株数十株, 对其 HA1 区域进行了同源性比较, 设计出若干对引物与 Taqman 探针对该区域进行特异性扩增, 从中筛选出最佳的引物和探针。经标准毒株与临床样本的检测比较, 发现它不仅特异性高, 除了甲 3 型流感病毒标准株和分离株出现阳性结果外, 其他甲 1 型、乙型、禽流感病毒 H5、SARS 病毒和呼吸道合胞病毒等均未见交叉反应, 而且比常规 RT-PCR 和病毒分离法更敏感, 快速, 也更简便。通常流感病毒的 RT-PCR 检测敏感度在 0.1 TCID₅₀ 左右, 从病毒核酸提取, RT-PCR 反应与电泳, 整个过程大约需 6~7 h 左右。而采用本方法从核酸提取至完成检测, 仅需 3 h 左右, 敏感度可达 0.01 TCID₅₀, 可直接从疑似患者含漱液标本中检测甲 3 型流感病毒, 而且 PCR 产物不污染环境。

本研究中采用 Roch lightcycle 与 MJ Research Opticon2 两种机器, 以 25 μl 反应体系进行了平行比较, 检测该系统反应的敏感度, 发现二者的敏感性无显著差异, 本实验建立的检测甲 3 型流感病毒 Taq-Man 荧光定量 RT-PCR 方法, 在使用毛细管与 0.2 ml PCR 反应管两种类型的机器中, 均能获得满意的结果。由于 Roch 公司的荧光定量系统采用的是毛细管形式, 升温降温速度更快, 故在反应时间上较 MJ 公司的更为迅速。此外, 有文献报导, 对于某一固定浓度的病毒, 采用病毒 RNA 抽提后进行稀释要比先稀释病毒后再提取 RNA 的 Ct 值更低, 认为后者由于稀释了病毒使抽提 RNA 效率降低。我们采用 QIAGEN 公司的 Reansy Mini Kit, 对甲 3 型流

感病毒株从 10²~10⁻² TCID₅₀ 浓度, 分别对二者进行了验证, 发现虽然样本先稀释再提取 RNA 的方法, 要比前者每个浓度的 Ct 值约高 0.5 左右, 但对实验结果并不会造成任何影响。我们从临床实际出发, 在实验中采用先稀释病毒再提取 RNA 的方法, 对本荧光定量 RT-PCR 方法的敏感性, 重复性, 进行了验证与研究, 使之更符合临床的实际情况。

我们建立的检测甲 3 型流感病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法, 具有高特异性、高灵敏度, 为疑似流感暴发疫情的实验室应急诊断提供了一种快速、有效的实验室检测手段。

参考文献:

- [1] 郭元吉, 程小斐. 流行性感冒病毒及其实验技术 [M]. 中国三峡出版社, 1997.
- [2] 長島真美. 定量の PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの遺伝子検出法. 東京衛生研究 [J], 1997, 48: 30.
- [3] J. Sellis, D. M. Fleming and M. C. Zambon, . Multiplex Reverse Transcription-PCR for surveillance of Influenza A and B Viruses in England and wales in 1995 and 1996 [J], J. Clin. Microbiol. 1997, 8(35):2076~2082.
- [4] 卢亦愚, 严菊英, 周敏, 等. 甲 3 型流行性感冒病毒基因的快速检测 [J]. 中国计划免疫, 2002, 8(6): 333~336.
- [5] 张严峻, 卢亦愚, 严菊英, 等. 用两种聚合酶链反应方法检测流感病毒 [J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(1): 6~8.
- [6] Robert L, Atmar, Barbarad, D Baxter, et al. Comparison of Reverse Transcription-PCR with Tissue Culture and other Rapid Diagnostic Assays for Detection of Type A Influenza Virus [J]. J Clin. Microbiol, 1996, 10: 34; 2604~2610.
- [7] Poddar SK, Espina R, Schnurr DP. Evaluation of a single-step multiplex RT-PCR for influenza virus type and subtype detection in respiratory sample [J]. J Clin Lab Anal, 2002, 16(3): 163~166.
- [8] Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, et al. Rapid and sensitive method using multiplex real - time PCR for diagnosis of infections by influenza a and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(4):1564~1569.
- [9] Stone B, Burrows J, Schepetuk S, et al. Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real time PCR [J]. J Virol Methods. 2004, 117(2):103~112.

收稿日期: 2004-09-12