

流感病毒的核酸检测新进展

浙江省绍兴市疾病控制中心 (312000) 赵丹燕

流行性感冒 (简称“流感”) 至今人类仍然未能控制住它, 在 20 世纪人类遭受了 4 次流感大流行, 致使数千万人失去了生命, 流感已成为现在直到将来公共卫生所要面临的挑战^[1]。随着现代分子生物学技术飞速发展, 运用分子生物技术检测流感病毒对于快速诊断疾病、病毒基因突变、分析疾病机制以及研究流感病毒流行株等提供了重要的技术保障。

流感病毒属正黏病毒科, 为单链负股 RNA 病毒, 基因组呈节段状, 根据核糖核蛋白 (RNP) 和基质蛋白 (M 蛋白) 不同可分为甲、乙、丙三型, 甲、乙型流感病毒基因组均含 8 个节段, 而丙型流感病毒仅含 7 个分子节段, 三型均可引起人类急性呼吸道疾病, 甲型病毒是引起世界性大流行的主要病原。目前对流感病毒病原学诊断经典的方法有: 鸡胚、组织细胞分离培养病毒, 然后用血凝和血凝抑制试验鉴定流感病毒, 培养分离病毒时间周期长, 不利于快速诊断。近几年有商品化的试剂有双抗体夹心、免疫荧光检测病毒抗原, ELISA 法或补体结合检测受感染者的病毒抗体, 但这些方法灵敏度和特异性不够, 现在许多实验室运用核酸检测快速诊断流感。

一、定性 PCR 扩增

PCR 是 20 世纪 80 年代中期发展起来的一种人工体外 DNA 扩增技术, 自建立以来, 分子生物学技术得到了飞速的发展, 同时也为病毒性疾病的诊断提供了一个崭新的手段。它具有特异、敏感、产率高、快速、简便、重复性好易自动化等优点。PCR 原理类似于 DNA 的天然复制过程, 其特异性依赖于靶序列两端互补的寡核苷酸引物, PCR 由变性—退火—延伸三个基本反应步骤构成。检测流感病毒可以采用逆转录 PCR、巢式 PCR、多重 PCR 等^[2], 检测的目的基因可以是流感病毒各个基因节段, 一般 RNP 和 M 蛋白基因区为保守区, 鉴别的病毒的型, 编码病毒血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 基因易变异, 检测的是流感病毒的亚型。

逆转录 PCR (RT-PCR): RT-PCR 是为扩增 RNA 而设计。首先, 反转录酶将 RNA 转录为 cDNA 之后进行 PCR。Palkokefalos 等应用 RT-PCR 对 150 份临床标本进行了流感病毒的检测, 并与鸡胚培养进行了对比, 证实 RT-PCR 的敏感性高达 100%, 远高于 ELISA, 特异性为 97%, RT-PCR 的阳性符合率 86%, 阴性符合率 100%, 说明 RT-PCR 灵敏度高, 可用于流感的快速检测。巢式 PCR (nested PCR): nPCR 用两对引物对同一基因序列进行两次扩增, 可以提高敏感性和特异性。第一次扩增用外引物进行, 以处理的标本 DNA 为模板, 而第二次扩增以第一次的产物为模板, 扩增用内引物

进行。增加污染的可能性是此法的最大不足之处。Herrmann 等应用 nPCR 检测甲型流感 H₁ 和 H₃ 与细胞分离培养病毒、直接免疫荧光 (IF) 检测抗原法对疑似流感病毒感染的患者鼻咽拭子进行了对比研究, 215 份标本中 nPCR 检测到 83 份阳性, 细胞分离到 66 份阳性, IF 检测到 68 份阳性, nPCR 最为敏感。

多重 PCR (MPCR): MPCR 又称多重引物 PCR, 它是在同一 PCR 反应体系中引入两对或两对以上的特异引物, 同时扩增检测一份标本中的不同基因序列, 在临床诊断中, MPCR 可以用于同时检测一份标本中的多种病原体, 省时省力, 经济节约。Coiras^[3]等设计应用单管 MPCR 同时检测呼吸道合胞病毒、甲、乙、丙型流感病毒、腺病毒, 对 290 份呼吸道分泌物进行了检测, 并作了可行性研究。检测水平甲型流感病毒达到 0.1 TCID₅₀、乙型流感病毒 0.01 TCID₅₀, 另外的几种病毒可以检测到 1~10 个拷贝。

核酸扩增产物测定的固相杂交酶联显色法 (RT-PCR-ELISA) 检测流感病毒, 将标记有生物素的寡核苷酸引物所扩增的病毒基因产物, 与微孔反应板上的特异性探针进行快速杂交, 通过辣根过氧化物酶标记的链亲和素进行酶联显色, 与 RT-PCR 相比提高了特异性和灵敏度。Lioliou 等应用 RT-PCR-ELISA 检测甲、乙型流感病毒与常规培养方法比较, 143 份呼吸道样品阳性率 11.9%, 而培养法仅 5.6%, 灵敏度 100%, 特异性 93%。

异源双链体迁移率技术 RT-PCR-HMA: 指扩增出某个基因的核酸片段, 然后与已知各标准亚型的对照基因相同片段 PCR 产物进行杂交, 使样品 DNA 与标准对照片段同源部位配对形成异源双链体, 根据其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的泳动率可确定其亚型。Joanna 等用 RT-PCR 先扩增出流感病毒 M 蛋白基因区, 然后应用 HMA 技术可用于从人或不同动物标本中检测出是否是人流感病毒、猪流感或禽流感病毒, 实践证明, 这种方法是一种快速、灵敏的检测手段。

限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析: 常用于病毒或细菌的型内差异性和基因突变分析, 是鉴别 PCR 扩增产物特异性的一种简便方法, 根据目的基因的已知序列资料可以查出所包含的酶切位点, 用限制性内切酶消化扩增产物后进行电泳观察片段大小和位置的不同, 从而确定产物的特异性。史雯等利用 RFLP 技术鉴别乙型流感病毒的巴拿马株与维多利亚株, 对乙型流感病毒血凝素 (HA) 基因采用 RT-PCR 扩增后, 用 Hind 做酶切结果显示乙型流感病毒 HA 基因 (巴拿马株) 在电泳谱上出现 603bp 与 242bp 的 2 个片段, 而维

多利亞株该片段无 Hind 酶切位点, 仍呈 872bp 的一个片段, 可快速敏感地从临床标本中直接对两类乙型流感毒株进行鉴别。

二、荧光定量 PCR

传统的 PCR 技术不能准确定量, 且操作过程中易污染而使得假阳性率高等缺点, 使其在许多的领域上应用受到限制, 鉴于此, 对 PCR 产物进行准确定量便成为迫切的需要。荧光定量 PCR 是近年来新出现的 PCR 定量技术, 该技术是建立在荧光能量传递技术 (FRET) 的基础之上, 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 当外来光源激发供体荧光染料发出荧光, 其发射波长与受体荧光染料的吸收波长部分重叠, 且两者距离很近时, 受体荧光染料吸收供体荧光传递的能量而激发出另一波长的荧光, 同时将供体荧光淬灭, 利用荧光信号累计实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。与定性 PCR 相比, 扩增和检测可以在同一管内进行, 不需要开盖, 不易污染且特异性好, 灵敏度高。

Taqman 荧光技术: 该技术是利用 Taq 酶的 5' - 3' 外切酶活性, 在传统 PCR 技术一对特异性引物的基础上增加了一条荧光双标记探针。该探针可与上、下游引物之间的 DNA 模板序列特异性结合。该探针可与上、下游引物之间的 DNA 模板序列特异性结合。探针的 5' 端标以荧光报告基团, 3' 端标以荧光淬灭基团, 当探针保持完整时, 两个基团的空间距离非常接近, 构成荧光能量传递 (FRET) 关系, 5' 端荧光报告基团发出的荧光信号被 3' 端淬灭基团吸收, 使其不能被仪器检测。当两个基团发生分离后, 两者间的 FRET 关系被破坏, 淬灭基团的抑制作用解除, 报告基团的荧光信号便得到释放。在 PCR 退火复性期, 探针与 DNA 模板特异性结合。在 PCR 延伸阶段, Taq 酶在引物的引导下, 以四种脱氧核苷酸为底物, 按碱基配对原则沿着模板合成新链, 可标记的荧光染料有 FAM、TET、VIC、HEX 等。严菊英^[4]等应用荧光定量 RT-PCR 方法用于检测甲 3 型流感病毒核酸, 检测的灵敏度可达 0.01TCID₅₀, 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 3h 左右, 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。

多重 Taqman 荧光技术: 在同一反应管中加入多种检测不同病毒的引物及探针, 优化反应条件可同时检测出样本中的不同病原体, 既经济又省时、省力, 同时灵敏度和特异性又高。Boivin 等设计两对引物及两条探针加入一个反应管中检测甲型和乙型流感病毒, 根据每型病毒的熔链温度 (T_m) 值不同, 最低检出限可达 50 个拷贝, 灵敏度和特异度与抗原检测法相比, 前者为 100% 和 97.7%, 后者仅为 43.6% 和 98.5%。Hindiyeh 等则设计流感病毒甲型和乙型的探针标记不同的荧光染料分别为 FAM、VIC, 用多重 Taqman 荧光技术和细胞培养与 RT-PCR 检测 370 份标本作比较, 灵敏度和特异度为 98.4% 和 85.5%。

三、非 PCR 扩增

依赖核酸序列的扩增 (NASBA): 是一种常温核酸扩增方法, 主要用于 RNA 的扩增、检测及测序。反应需要 AMV 逆转录酶、T7RNA 多聚酶和核酸酶 H (RNaseH) 共同协作而完成。此外需要两种特殊的引物, 引物 1 3' 末端与靶序列互补, 5' 端含 T7RNA 多聚酶的启动子; 引物 2 的碱基序列与 cDNA 的 5' 末端互补, 反应时, 引物 1 与 RNA 模板复性, AMV 逆转录酶催化合成 cDNA, RNaseH 水解 cDNA 上的 RNA, 形成一条单链的 DNA, 引物 2 随即与此 cDNA 的 5' 末端结合, 逆转录酶在此 DNA 模板的指导下合成第二条 DNA 链, T7RNA 多聚酶以此 DNA 为模板, 转录出与样品 RNA 序列相同的 RNA 链, 每条 DNA 模板在该酶的作用下可合成约 100 个拷贝的 RNA。新的 RNA 又可作为逆转录酶的模板合成 cDNA。如此反复进行, 反应液中待检 RNA 的数量以 10 的指数方式扩增, 反应在 90min 内就可完成。Collins 等用 NASBA 技术检测甲型流感病毒凝集素基因 H₁ - H₅, 从核酸提取、扩增、检测只需 6h, 灵敏度和特异性都很高。

即环介导等温扩增 (LAMP): 该技术依赖于能够识别靶序列上 6 个特异区域的 4 条引物和一种具有链置换特性的 DNA 聚合酶, dNTP、适宜的缓冲液和模板 DNA, 引物为 2 条内引物和 2 条外引物, 在 LAMP 反应的初始过程中, 需要 4 条引物, 但在后来的循环反应中, 仅需将内引物用于链置换 DNA 合成反应。反应物在 95℃ 加热 5min, 冷却后加 DNA 聚合酶, 65℃ 孵育 1h, 即可终止反应。在等温条件下有效、快速、高特异地扩增靶序列。LeoL 等应用 LAMP 技术用于流感病毒 H₁ 和 H₃ 型的检测, 结果与 IF 法一致。

微粒连接核酸 PCR (Particle - Associated Nucleic Acid PCR): 该技术是最近发展起来的, 是基于随机 PCR 能扩增标本中的所有核酸基础上的。病毒经组织细胞培养后, 培养液中可能存在多种病毒或一些未知病毒, 用常规的检测方法有可能漏检, 为了更灵敏地检测未知病毒, Stang 等发展了一种不依赖核酸序列扩增的 PCR 方法, 设计随机引物 3' 末端是变性的序列 MNMNM, 模板 DNA 变性后, 随机引物在 T4DNA 聚合酶作用下, 退火延伸扩增出许多长短不同的核酸片段, 把这些核酸片段克隆入大肠杆菌, 然后测序网上分析核酸片段来源。

参 考 文 献

- 1 Webby RJ, Webster RG Are we ready for pandemic influenza? Science, 2003, 302 (5650): 1519 - 1522.
- 2 Jungkind D, et al. Molecular testing for infectious disease. Science, 2001 294 (5546): 155321555.
- 3 Coiras MT, et al. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested - PCR assay [J]. J Med Virol. 2003, 69 (1): 132 - 44.
- 4 严菊英, 卢亦愚, 冯燕等. TaqMan 荧光定量 RT-PCR 快速检测甲 3 型流感病毒 [J]. 中国人兽杂志, 2005, 21 (2): 169 - 172.

(收稿: 2005 - 11 - 06)