

重组酶介导扩增方法快速检测黄热病毒

郑伟¹, 徐琦¹, 罗鹏¹, 冯娟², 郭利川³, 应清界³

1. 浙江国际旅行卫生保健中心, 浙江 杭州 310016; 2. 西藏国际旅行卫生保健中心, 西藏 拉萨 850002;
3. 江苏奇天基因生物科技有限公司, 江苏 无锡 214135

摘要: 目的 本研究采用重组酶介导的等温核酸扩增方法(RAA), 通过使用逆转录酶, 建立黄热病毒的一步法等温核酸扩增(RT-RAA)方法。**方法** 根据黄热病毒基因组保守序列设计引物和探针, 建立并分析 RT-RAA 的重复性、特异性、灵敏度; 以所建立方法对黄热病毒样本进行检测, 同时以基因测序进行验证。**结果** 黄热病毒一步法 RT-RAA 扩增, 体系中加入 40 U 的逆转录酶扩增效果最佳。该方法检测时间短 (< 20 min), 并且灵敏度高, 检测下限可达 100 copy, 与登革病毒、西尼罗病毒、日本乙型脑炎病毒、基孔肯雅热病毒等蚊媒病毒无交叉反应, 具有良好的特异性。**结论** 构建的黄热病毒 RT-RAA 方法具有快速、特异以及灵敏的特点, 适应于黄热病毒的口岸快速检测。

关键词: 重组酶介导扩增; 黄热病毒; 分子检测

中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 1004-8685(2016)01--03

Rapid detection of yellow fever virus with recombinase aid amplification

ZHENG Wei*, XU Qi, LUO Peng, FENG Juan, GUO Li-chuan, YING Qing-jie

* Zhejiang International Travel Health-care Center, Hangzhou, Zhejiang 310006, China

Abstract: Objective In this study, we establish a one-step reverse transcriptase recombinase aid amplification(RT-RAA) assay for YFV detection based on recombinase aid amplification(RAA). **Methods** According to the conserved genome sequence design and probes of astrovirus, a RT-RAA was constructed, and the repetitiveness, specificity and sensitivity of it were evaluated. Yellow fever virus(YFV) sample was detected by the constructed method and the results were verified with gene sequencing. **Results** The YFV was amplified with one-step RT-RAA, and 40 U reverse transcriptase was added into system for amplification in the best. RT-RAA was performed with a short detection time (<20 minutes) and low detection limit (100 copy). This method had no cross-reaction with dengue virus, West Nile virus, Japanese encephalitis virus and chikungunya virus, which showed good specificity. **Conclusion** This RT-RAA assay was rapid, specific and sensitive. It can be used for the rapid detection of YFV on port.

Key Words: Recombinase aid amplification; Yellow fever virus; Molecular detection

黄热病(yellow fever)是由黄热病毒引起的急性传染病,经蚊媒传播。临床特征有发热、剧烈头痛、黄疸、出血和蛋白尿等^[1]。近年来由于环境破坏、国际旅游增加以及黄热病疫情国家的疫苗覆盖率降低,据世界卫生组织估计,每年至少有 20 万黄热病病例,造成 3 万人死亡,其中 90% 以上发生在非洲^[2]。黄热病仍然是一个重要的公共健康问题。

黄热病毒(yellow fever virus)属于黄病毒科、黄病毒属成员,是引起人类黄热病的病原体^[3]。黄热病毒是 20 面体的球形颗粒,直径为 40 nm ~ 60 nm,为单一血清型。其基因组长约为 11 kb, 包含一个短的 5' (118 个核苷酸)和 3' (511 个核苷酸)非编码区及一个 5' 帽子结构^[4], 由 80 多种单股正链 RNA 病毒组

成,包括其他的人类病原体,如登革热、西尼罗河病毒、乌苏土病毒、寨卡病毒、日本脑炎病毒和蜱传脑炎病毒等^[5]。

近年来,随着黄热病病例不断的增加,这种疾病可能会引入新的地区。虽然目前我国未见黄热病的大规模流行,但是在我国南方的某些地区地理条件与黄热病高发区域相似,也存在发病的可能性^[6],同时随着国际间的人群交往更为便利,使得病毒和传播媒介更易在各个国家之间传播^[7]。因此,探讨其快速诊断方法对黄热病毒的疫情监控,从而采取相应的措施具有重要意义。

本研究建立了一步法等温核酸扩增(RT-RAA)法检测黄热病毒。在 RT-RAA 反应过程中,黄热病毒 RNA 首先通过反转录酶合成 cDNA,在重组酶和等温核酸扩增方法(RAA)引物存在下再以 cDNA 为模板合成目的产物。反应在 39 °C 下进行 20 min。

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2014IK062); 浙江出入境检验检疫局科技计划项目(ZK2014034)

作者简介: 郑伟(1977-),男,博士,副主任医师,主要从事蚊媒传染病检测工作。

1 材料与方法

1.1 标本 黄热病毒(黄热减毒活疫苗,北京天坛生物制品股份有限公司);乙型脑炎病毒(乙型脑炎减毒活疫苗,成都生物制品研究所有限责任公司);西尼罗病毒(美国病理学家协会);登革热阳性血清及基孔肯雅热阳性血清收集于确诊感染的归国劳务人员标本,由浙江国际旅行卫生保健中心提供。

1.2 仪器与试剂 ABI 7500 实时荧光 RT-PCR 仪(美国);全自动核酸提取仪(KinFisher Flex,美国 Thermo);RAA-Flow 仪器(江苏奇天基因生物科技有限公司)。病毒 RNA 提取试剂盒(ambion 1836,批号:1412056);鼠白血病逆转录酶(M-MLV,#M1701);RAA 试剂盒(批号:150301);引物和探针由上海生物工程技术有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 病毒基因组核酸提取 取 50 μl ~ 70 μl 疫苗溶液或血清样本,采用 MagMAX 磁珠净化技术,按 ambio 1836 RNA 提取试剂盒说明书提取样本 RNA,将提取好的核酸进行分装,冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,作为模板备用。

1.3.2 RT-RAA 引物和探针设计 在 NCBI 数据库中查找多条黄热病毒全基因组序列,GenBank 登录号分别为 AY640589.1、JX898871、JX898876、JX898869、JX898870、JX898873、AY603338.1 和 AF094612.1。应用 DNAMAN 7.0 软件进行序列比对,找出共有保守区域,进行引物和探针设计 RT-RAA 的引物长度一般在 30 bp ~ 35 bp。经过分析比对,根据其保守区序列设计引物和探针,序列如表 1 所示。

表 1 引物和荧光探针的核苷酸序列

引物/探针	序列(5'-3')	扩增子长度 (bp)
正向引物	AAATCCTGKGTGCTAATTGAGGTYATTGG	119
反向引物	ACATDWTCTGGTCARTTCTCTGCTAATCGC	
探针	GCAAATCGAGTTGCTAGGCAATAAACACATT (FAM - dT) G (dSpacer) A (BHQ1 - d) TA- ATTTRATCGTTC (phosphate)	

1.3.3 黄热病毒 RT-RAA 扩增体系和条件 经优化的 RT-RAA 反应扩增体系:RAA 干粉管中依次加入 $1 \times$ RT-RAA buffer 25 μl ; M-MLV 逆转录酶 40 U;正向引物、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 2.1 μl ;探针(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.6 μl ;模版 1 μl ;最后加入醋酸镁(280 mmol/L) 2.5 μl ;DEPC 水补足至 50 μl ,混合均匀,瞬时离心。将上述反应管放入 RAA-Flow 仪器中,39 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min。阴性对照为不含 RNA 模板,其余成分与阳性样本相同。

1.3.4 灵敏度实验 合成含有待检测黄热病毒基因

序列的质粒,分别稀释为 10^7 copy/ μl 、 10^6 copy/ μl 、 10^5 copy/ μl 、 10^4 copy/ μl 、 10^3 copy/ μl 、 10^2 copy/ μl ,利用优化好的 RT-RAA 反应扩增体系依次对上述定量样品进行测定,考察方法的灵敏度。

1.3.5 特异性实验 分别对黄病毒属的黄热病毒、登革热病毒、西尼罗病毒、日本脑炎病毒及甲病毒属的基孔肯雅热病毒进行检测,评价 RT-RAA 方法的特异性。

2 结果

2.1 黄热病毒 RT-RAA 扩增体系的确立 在 RAA 体系中分别加入 20 U、40 U、60 U 和 100 U 的逆转录酶时的扩增情况,从结果可以看出,在 RAA 体系中加入逆转录酶后,可以对黄热病毒的 RNA 进行扩增。不同的逆转录酶量对 RT-RAA 扩增也有较大的影响,从图 1 中可以看出,酶的使用量为 40 U 时,起峰时间最短,并且荧光值也较高,扩增效果最佳。因此,可通过在 RAA 荧光反应体系中加入逆转录酶,实现对黄热病毒(RNA 病毒)的 RT-RAA 扩增,本研究中用量为 40 U 时,扩增效果最佳。

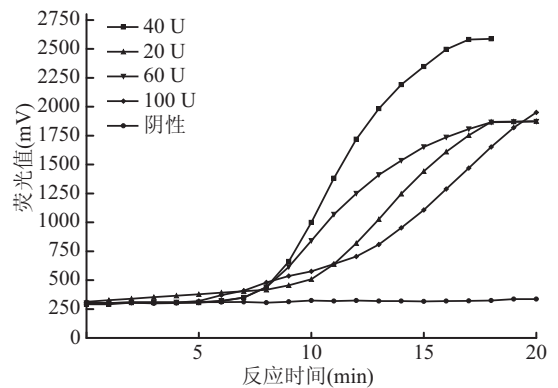


图 1 RAA 在加入不同 M-MLV 浓度的扩增结果

2.2 方法的灵敏度 不同拷贝数下的质粒 DNA 的扩增,在 8 min 时即可观察到扩增,灵敏度高,不同拷贝数的扩增在 20 min 之内完成;随着拷贝数的不断降低,扩增起峰时间也随之延长;最低可以扩增出 100 copy 的质粒 DNA 分子(图 2)。

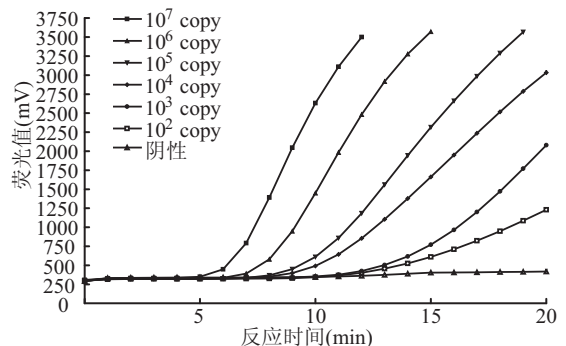


图 2 不同拷贝数的扩增结果

2.3 特异性 利用 RT-RAA 方法分别对黄热病毒、西尼罗病毒、基孔肯雅热病毒、登革热病毒、日本乙型脑炎病毒进行检测。扩增结果表明,只有黄热病毒所在的检测通道出现相应的特异性荧光扩增曲线,其他病毒未见有相应的扩增,无交叉反应(图3)。

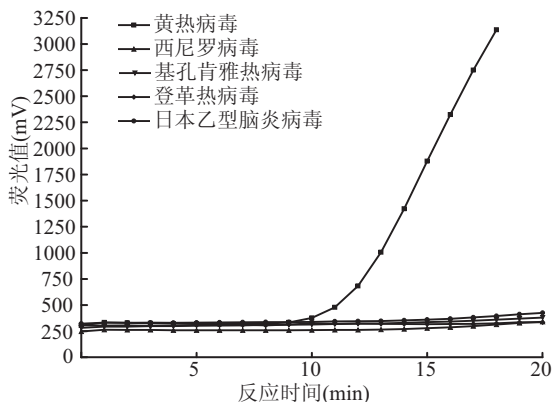


图3 RT-RAA 扩增的特异性

3 讨论

目前,黄热病的实验室诊断方法主要有血清学诊断、病毒分离培养和分子生物学检测方法。一般来说,用动物或细胞培养分离病毒最为可靠,但费时、费力,常用的血清学方法对少量病毒抗原的检测灵敏度较低^[8]。PCR法可直接对病毒遗传物质进行检测,操作简便,对原始材料要求不高,已在微生物检测领域有了广泛的应用^[9],依据PCR检测黄热病毒的分子方法如RT-PCR、实时荧光RT-PCR和巢式PCR已经建立起来^[10],但是这些方法需要使用复杂的仪器和装备精良的实验室^[11-14]。因此,在直接检测黄热病毒的情况下,能够提供便携、操作简单而且可靠的方法来适用于低资源配置和现场检测至关重要,尤其是对于应对疫情。重组酶介导的核酸扩增技术是一种在恒温下使核酸快速扩增的方法。该方法在常温下就能实现DNA解链并快速扩增(15 min~30 min完成),反应快速、专一性好、灵敏度高^[15-16]。

本研究建立了黄热病毒的RT-RAA法,经过优化,体系中加入40 U的逆转录酶扩增效果最佳。反应条件为39℃ 20 min,在8 min时即可观察到扩增,灵敏度高,检测下限可达100 copy,并且该方法特异性强,对其他蚊媒传播的病毒检测均为阴性,与PCR法相比,RT-RAA法是在恒温下反应,大大缩短了反应时间,操作简单,摆脱了复杂仪器的束缚,可做大量样品的快速检测。该方法快速、准确、可靠,适合在国境口岸进一步推广应用,具有巨大的应用前景。

参考文献

[1] Onyango CO, Ofula VO, Sang RC, *et al.* Yellow fever outbreak, Imatong, southern Sudan[J]. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(6):

1063-1068.

- [2] Organization WH. Yellow fever fact sheet[J]. *Weekly Epidemiol Rec*, 2010, 85(5):33-36.
- [3] 候云德. 分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 75-84.
- [4] 邓永强. 黄热病及其病原的研究近况[J]. *国外医学: 微生物学分册*, 2003, 5:5-6.
- [5] Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses[J]. *The Lancet*, 2008, 371(9611):500-509.
- [6] 任瑞文, 郝丽, 方美玉, 等. 套式逆转录聚合酶链反应在黄热病毒快速检测中的应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(4):397-399.
- [7] 师永霞, 郑夔, 李小波, 等. 黄热病病毒的实时荧光RT-PCR检测方法研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(5): 1003-1006.
- [8] 彭文明, 邓永强, 于曼, 等. 黄热病毒的一步RT-PCR法检测[J]. *微生物学杂志*, 2004, 23(4):8-10.
- [9] 姜拥军, 尚红. 人免疫缺陷病毒I型gag, env, rev mRNA检测[J]. *中华检验医学杂志*, 2002, 25(5):296-298.
- [10] 苏艳丽, 王树祥. 黄热病病毒检测技术研究进展[J]. *旅行医学科学*, 2011, 17(2): 1-4.
- [11] Weidmann M, Faye O, Faye O, *et al.* Improved LNA probe-based assay for the detection of African and South American yellow fever virus strains[J]. *J Clin Virol*, 2010, 48(3):187-192.
- [12] Nunes MR, Palacios G, Nunes KN, *et al.* Evaluation of two molecular methods for the detection of Yellow fever virus genome[J]. *J Virol Meth*, 2011, 174(1-2):29-34.
- [13] Dash PK, Boutonnier A, Prina E, *et al.* Development of a SYBR green I based RT-PCR assay for yellow fever virus: application in assessment of YFV infection in *Aedes aegypti*[J]. *Virol J*, 2012, 9:27.
- [14] Bae H-G, Nitsche A, Teichmann A, *et al.* Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay[J]. *J Virol Meth*, 2003, 110(2):185-191.
- [15] 吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 等. 用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸[J]. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40(10):983-988.
- [16] 吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 等. 体外核酸快速扩增技术的发展和不断创新[J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(3): 91-96.

收稿日期:2015-08-24