

重组酶介导的等温扩增法检测 H7N9 禽流感病毒

赵康辰¹, 崔仑标¹, 葛以跃¹, 陈银¹, 朱小娟¹, 刘宾², 史智扬¹, 朱凤才¹, 周明浩¹

1. 江苏省疾病预防控制中心, 卫生部肠道病原微生物重点实验室, 南京 210009;

2. 南京医科大学生物医学工程系, 南京 210029

摘要:目的 建立 H7N9 禽流感病毒一步法逆转录重组酶介导的等温扩增的检测方法(RT-RAA)。方法 根据 H7N9 禽流感病毒 HA 片段和 NA 片段的保守区序列分别设计引物、探针, 建立 RT-RAA 方法, 研究其特异性、敏感性, 并与 Real-time RT-PCR 方法进行比较。结果 成功建立了 H7N9 禽流感病毒 RT-RAA 检测方法, H7 反应体系和 N9 反应体系的最低检出限分别为 10 copy/ μ L 和 100 copy/ μ L, 且与其他呼吸道病原无交叉反应。H7N9 RT-RAA 体系检测结果与 Real-time RT-PCR 一致性较高, Kappa 检验 u 系数为 0.933。结论 建立的 RT-RAA 检测方法具有快速、特异及灵敏的特点, 为 H7N9 禽流感病毒的快速检测提供了新的分子工具。

关键词: H7N9 禽流感病毒; 逆转录-重组酶介导的等温扩增技术; 快速检测

中图分类号: R511.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-9070(2016)05-0524-04

Detection of a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus by recombinase aided amplification

ZHAO Kang-chen*, CUI Lun-biao, GE Yi-yue, CHEN yin, ZHU Xiao-juan,

LIU Bin, SHI Zhi-yang, ZHU Feng-cai, ZHOU Ming-hao

* Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratories of Enteric Pathogenic Microbiology (Ministry of Health), Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To establish a one-step reverse transcription recombinase aided amplification (RT-RAA) assay for the detection of avian-origin influenza A (H7N9) virus. **Methods** The RT-RAA primers and probes were designed based on conservative regions of haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes of H7N9 virus. Sensitivity and specificity of the assay were evaluated. The performances of the assay were compared with Real-time RT-PCR using suspected clinical specimens. **Results** RT-RAA was established for H7N9 detection. The limits of detection for H7N9 were 10 copy/ μ L and 100 copy/ μ L of RNA molecules, respectively. No cross reaction with other pathogens were observed. H7 and N9 RT-RAA assay showed good correlation with Real-time RT-PCR assay with Kappa Coefficient u of 0.933 for detection H7N9 for clinical samples. **Conclusion** The developed RT-RAA assay has characteristics of high sensitivity, specificity and rapidity, which made it a new molecular tool for rapid detection of avian-origin influenza A (H7N9) virus.

Key words: Avian-origin influenza A (H7N9) virus; Reverse transcription recombinase aided amplification; Rapid detection

禽流感病毒在禽类及环境中可以长期存在, 从 2013 年开始, 高致病型禽流感病毒 H7N9 亚型感染人事件被不断报道^[1], 具有感染人类的潜在威胁^[2], 有必要进行长期监测。目前, H7N9 禽流感病毒检测方法主要为病毒分离培养、动态急性期和恢复期双份血清抗体及 Real-time RT-PCR (或 RT-PCR) 检测。病毒分离培养工作和血清学检测必须在 BSL-3 级生物

安全实验室中进行, 工作量巨大、耗时长, 不利于大规模检测, 也无法达到早期检测的目的。因此, 基于 PCR 的分子检测方法已成为 H7N9 禽流感病毒监测的主要手段。近年来, 基于等温扩增的分子检测方法由于具有快速、灵敏且不需要温度循环仪器的特点, 在病原检测中发挥越来越重要的作用^[3-6]。最近, 一种名为重组酶介导的等温扩增 (Recombinase aided

DOI: 10.13668/j.issn.1006-9070.2016.05.04

基金项目: 国家自然科学基金(81501785, 61401217); 江苏省自然科学基金(BK20141030, BK20140900); 江苏省重大新发传染病综合防控科技示范工程(BE2015714)。

作者简介: 赵康辰(1988—), 男, 江苏南京人, 技师, 研究方向: 传染病分子诊断。

通讯作者: 崔仑标, 研究员, E-mail: cui_lb@163.com

amplification, RAA)技术逐渐被大众所认知,该方法利用重组酶,在恒定温度下使引物和模板 DNA 发生链置换反应,并在 30 min 内即可大量扩增模板 DNA^[7]。本研究通过逆转录酶将 H7N9 禽流感病毒 RNA 逆转录为 cDNA,结合 RAA 建立 H7N9 禽流感病毒快速检测方法。

1 材料与方 法

1.1 临床样本及毒株

禽流感病毒(A/H7N9、A/H5N1、A/H9N2)、季节性流感病毒(A/H3N2、A/H1N1)、甲型 H1N1 病毒(H1N1 09pdm)、副流感病毒(PIV 1~4 型)、冠状病毒(HCOV-OC43、HCOV-HK)、呼吸道合胞病毒(RSV)、支原体(MYP)、腺病毒(ADV)、鼻病毒(RHD)毒株或阳性样本均为本实验室分离、鉴定、保存。80 份疑似 H7N9 禽流感感染病例咽拭子或痰样本收集于 2013—2015 年,冻存于-80℃。

1.2 仪器与试剂

Rotor Gene RG-3000 型荧光定量 PCR 仪购自 Cobett 公司, MagNA Pure LC 全自动核酸提取仪及配套试剂购自 Roche 公司; RAA 核酸扩增检测试剂盒购自江苏奇天基因生物公司, 逆转录酶 AMV 购自 TaKaRa 公司, 人感染 H7N9 禽流感病毒核酸检测试剂盒购自江苏硕世生物科技有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 病毒核酸提取

取 200 μ L 样本,按照 MagNA Pure LC 全自动核酸提取仪以及 MagNA Pure LC Total Nucleic acid Isolation Kit 的使用要求提取样本 RNA,冻存于-80℃,作为模板备用。

1.3.2 RT-RAA 引物以及探针设计

从 GenBank 中查找并下载 H7N9 禽流感病毒 HA 片段和 NA 片段的核酸序列,根据序列优化设计 2 套独立的 RT-RAA 引物及探针^[8],见表 1。引物、探针均由上海生工生物有限公司合成。

表 1 H7N9 RT-RAA 法扩增 H7N9 的引物和荧光探针序列

引物/探针	序列(5'-3')
H7-RAA-F	CACAGCAARTACAGRGRAGAGGCAATGCAAAATAG
H7-RAA-R	GAAGTATGAAACATGATGCCCGAAGCT
H7-RAA-P	CAAAGTATYACATCTT(BHQ1-dT)(THF)(FAM-dT)AGCCDCTRCTTAGTTTGACTGGRTCAATCTG(SpC3)
N9-RAA-F	CAGAGGGAAACAYTCAAAYGGAACRATACAC
N9-RAA-R	CTAGTRCTTGACCACCCAATGCATTTCYACYCTGC
N9-RAA-P	CTGCTRTTGTAYAC(BHQ1-dT)(THF)(FAM-dT)GGGYGGTGATGAYAGTGCCAGCTTATCAG(SpC3)

注:修饰方式为 FAM-dT(thymidine nucleotide-carrying fluorophore),BHQ1-dT(thymidine nucleotide carrying Black Hole Quencher-1),THF(tetrahydrofuran spacer),SpC3(3'端加 C3 Spacer)

1.3.3 H7N9 病毒 RT-RAA 扩增体系及条件

根据 RAA 核酸扩增检测试剂盒说明分别配制 H7、N9 扩增体系:RAA 干粉管中加入 2 \times RAA Buffer 25 μ L;逆转录酶 AMV 6 U;正向引物、反向引物(21 μ mol/L)各 1 μ L;探针(6 μ mol/L)1 μ L;模板 1 μ L;DEPC H₂O 补足至 50 μ L 混合均匀后短暂离心;最后加入醋酸镁(280 mmol/L)2.5 μ L 启动反应。将上述反应管放入 Rotor Gene Real-time PCR 仪中,42℃反应 20 min,设置荧光通道为 FAM 进行荧光监测。

1.3.4 敏感性实验

以带有 T7 启动子序列的引物扩增 H7N9 禽流感病毒毒株 A/Nanjing/1/2013(H7N9)的 HA 片段和 NA 片段,使用 T7 RNA 聚合酶进行体外转录合成 RNA,纯化、定量后将 RNA 10 倍稀释至 1.0 \times 10⁵~10 copy/ μ L。以优化好的 RT-RAA 方法进行检测,评价 RT-RAA 方法的敏感性。

1.3.5 特异性实验

分别对禽流感病毒(A/H7N9、A/H5N1、A/H9N2)、季节性流感病毒(A/H3N2、A/H1N1)、甲型 H1N1 病毒(H1N1 09pdm)、副流感病毒(PIV 1~4 型)、冠状病毒(HCOV-OC43、HCOV-

HK)、呼吸道合胞病毒(RSV)、支原体(MYP)、腺病毒(ADV)、鼻病毒(RHD)进行 RT-RAA 检测,评价 RT-RAA 方法的特异性。

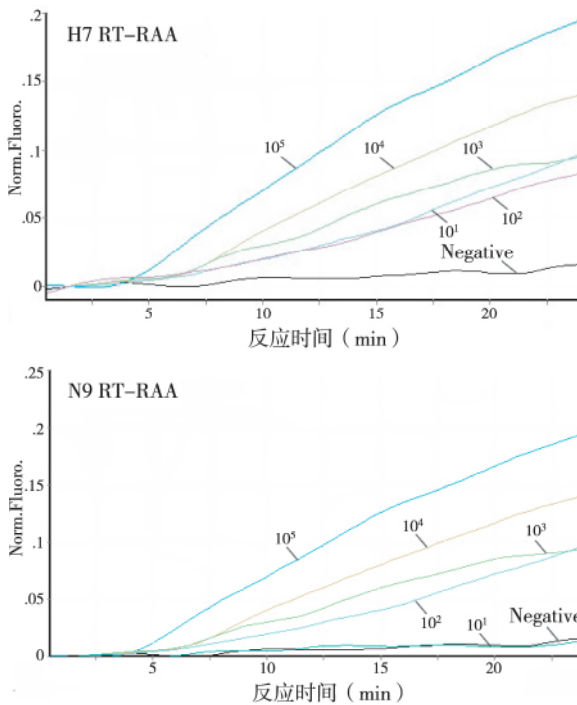
1.3.5 与 Real-time RT-PCR 与 RT-RAA 法一致性检测

80 份 H7N9 禽流感疑似病例临床样本,提取样本核酸后用 Real-time RT-PCR 法检测,以样本 HA 基因和 NA 基因检测 Ct 值均<35,判定为阳性,其结果作为参考标准用于评价 H7 RT-RAA 和 N9 RT-RAA 反应体系,Real-time RT-PCR 法按硕世公司提供的人感染 H7N9 禽流感病毒核酸检测试剂盒使用说明操作。

2 结 果

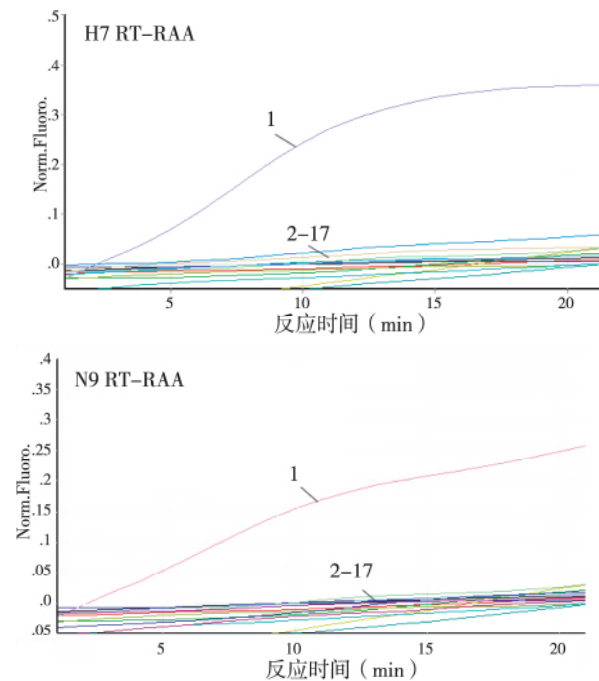
2.1 RT-RAA 检测 H7N9 方法建立及敏感性

RT-RAA 方法检测 H7 扩增体系和 N9 扩增体系均可在 5 min 左右出现扩增荧光信号,为清晰分辨扩增结果,设定检测时间为 20 min。H7 扩增体系最低检出限(LOD)为 10 copy/ μ L, N9 扩增体系最低检出限为 100 copy/ μ L。见图 1。



注: H7N9模板浓度为 $1.0 \times 10^5 \sim 10$ copy/ μ L, 阴性对照为去离子水。
图 1 RT-RAA 检测不同载体 H7N9 病毒核酸的扩增曲线

2.2 特异性实验结果 对各种呼吸道病原进行 RT-RAA 检测, H7 扩增体系和 N9 扩增体系中只有 H7N9 禽流感病毒株出现特异性荧光扩增信号, 其他病原均未见有效扩增, 结果提示建立的 H7N9 禽流感病毒 RT-RAA 检测方法与其他病原无交叉反应。见图 2。



注: 禽流感病毒 (1.A/H7N9、2.A/H5N1、3.A/H9N2)、季节性流感病毒 (4.A/H3N2、5.A/H1N1)、甲型 H1N1 病毒 (6.H1N1 09PDM)、副流感病毒 (7~10.PIV 1~4 型)、冠状病毒 (11.HCoV-OC43、12.HCoV-HK)、呼吸道合胞病毒 (13.RSV)、支原体 (14.MYP)、腺病毒 (15.ADV)、鼻病毒 (16.RHI) 毒株核酸, 17.H₂O (阴参)

图 2 RT-RAA 检测不同呼吸道病原的扩增曲线

2.3 Real-time RT-PCR 法与 RT-RAA 方法检测样本的一致性 80 份临床样中 Real-time RT-PCR 检测阳性 21 份, H7 RT-RAA 体系检出阳性样本 21 份, N9 RT-RAA 体系检出阳性样本 19 份。H7 RT-RAA 体系检测结果与 Real-time RT-PCR 比较的 Kappa 检验 κ 系数为 1, N9 RT-RAA 体系检测结果与 Real-time RT-PCR 比较的 Kappa 检验 κ 系数为 0.933, 2 种方法一致性极高。

表 2 2 种方法检测 H7N9 禽流感病毒疑似样本结果比较

RT-RAA 法	Real-time RT-PCR 法			
	阳性	阴性	合计	
H7	阳性	21	0	21
	阴性	0	59	59
	小计	21	59	80
N9	阳性	19	0	19
	阴性	2	59	61
	小计	21	59	80

3 讨论

快速、特异、灵敏的检测 H7N9 禽流感病毒能够帮助临床诊断、治疗, 控制病毒传播, 并为流行病学调查提供依据。相较于病毒分离和血清学诊断这类传统检测技术, 基因检测方法拥有更加快速、灵敏, 操作简单, 试验周期短等优点。目前, 以 PCR 技术为基础检测 H7N9 禽流感病毒的方法如多重 RT-PCR 法, Real-time RT-PCR 法^[9-12]; 以恒温扩增技术为基础检测禽流感病毒 H7N9 的方法如逆转录环介导等温扩增法 (RT-LAMP) 均已建立^[3-4]; 上述方法在 H7N9 禽流感病毒的检测中发挥了重大作用^[9-12], 然而检测时间一般需要 2 h 左右, 无法满足现场快速检测和大规模监测的需求。

近年来, 新型核酸等温扩增技术极大缩短了核酸扩增检测时间, 如环介导的等温扩增 (LAMP) 技术可在 1 h 内完成检测^[3]。重组酶介导等温扩增技术是最近发展的一种等温扩增技术, 该技术利用重组酶, 在恒定温度下使引物和模板 DNA 发生链置换反应, 并在不到 30 min 的时间内大量扩增模板 DNA, 具有反应快速, 特异性好, 灵敏度高特点^[7]。与 RT-LAMP 法相比, RT-RAA 法的引物设计较为简单, 反应时间也更短^[3-4]。本研究建立的 H7N9 禽流感病毒 RT-RAA 扩增方法反应温度为 42℃, 在 5 min 时即可观察到扩增信号, 为清晰分辨扩增结果, 我们设定检测时间为 20 min, H7、N9 基因的 LOD 检出限可达到 10 copy/ μ L, 100 copy/ μ L, 且与其他呼吸道病原无交叉反应, 与 Real-time RT-PCR 检测方法的一致性较高, 提示该方法可作为 Real-time RT-PCR 检测的替代工具。另外, RT-RAA 法检测 (下转第 530 页)

原体分离进行确诊的传统方法的补充。基于 StxII 分子在 STEC 致病过程中的重要作用及在我国流行状况的特殊性,我们以 StxII 为靶标分子,采用镧系离子作为标记物,以大量稳定的单克隆抗体进行包被和标记,建立了 StxII 的两步法时间分辨荧光免疫分析法。实验表明,该法具有零本底、高特异性、高灵敏性、标记物存放时间长、重复性好、标准曲线稳定性高、分析时间短(<3 h)、无放射性污染和可以实现全自动化操作等优点;其准确度、平均回收率等结果均令人满意。本方法不仅可快速诊断、及时追踪传染源,还可以用于 STEC 的流行病学调查,掌握自然界及宿主动物 STEC 的带毒状况及分子进化趋势,有助于潜在疫情的预测预警,具有重要的公共卫生意义。

参考文献

- [1] AHMED W, GYAWALI P, TOZE S. Quantitative PCR measurements of Escherichia coli including shiga toxin-producing E. coli (STEC) in animal feces and environmental waters[J]. Environ Sci Technol, 2015, 49(5):3084.
- [2] KIELSTEIN JT, BEUTEL G, FLEIG S, et al. Best supportive care and therapeutic plasma exchange with or without eculizumab in Shiga-toxin-producing E. coli O104: H4 induced haemolytic-uraemic syndrome: an analysis of the German STEC-HUS registry[J]. Nephrol Dial Transplant, 2012, 27(10):3807.

(上接第 526 页)方式多样,既可使用恒温荧光检测系统,也可结合测流试纸条法检测^[13]。最重要的是,RT-RAA 法摆脱了变温装置的束缚,不需要复杂昂贵的仪器,使用恒温荧光系统即可检测,并且反应效率极高,适合用于禽流感病毒 H7N9 的快速检测。如采用测流试纸条检测,则仅需一台简单的水浴锅即可完成扩增和检测,进一步降低了对昂贵仪器的依赖,适合在基层单位推广。

参考文献

- [1] GAO R, CAO B, HU Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J]. N Engl J Med, 2013, 368(20):1888.
- [2] LI Q, ZHOU L, ZHOU MH, et al. Epidemiology of human infections with avian influenza A(H7N9) virus in China[J]. N Engl J Med, 2014, 370(6):520.
- [3] NAKAUCHI M, TAKAYAMA I, TAKAHASHI H, et al. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection[J]. J Virol Methods, 2014, 204:101.
- [4] GE Y, WU B, QI X, et al. Rapid and sensitive detection of novel avian-origin influenza A (H7N9) virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow device[J]. PLoS One, 2013, 8(8):e69941.
- [5] 陈银, 赵康辰, 崔仑标, 等. 逆转录-环介导等温扩增技术结合横向流动试纸条法快速检测肠道病毒[J]. 江苏预防医学, 2013, 24

- [3] MELTON-CELSA AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function[Z]. Microbiol Spectr, 2014, 2(4):EHEC-0024-2013.
- [4] PAGE AV, LILES WC. Enterohemorrhagic escherichia coli infections and the Hemolytic-Uremic syndrome[J]. Med Clin North Am, 2013, 97(4):681.
- [5] SLAYTON RB, TURABELIDZE G, BENNETT SD, et al. Outbreak of shiga toxin-producing escherichia coli (STEC) O157:H7 associated with romaine lettuce consumption, 2011 [J]. PLoS One, 2013, 8(2):e55300.
- [6] BIN Z, KAI Z, JUE Z, et al. A novel and sensitive method for the detection of enrofloxacin in food using time-resolved fluoroimmunoassay[J]. Toxicol Mech Methods, 2013, 23(5):323.
- [7] 陈帅, 罗鹏飞, 王静. 2010—2013 年宿迁市新生儿先天性甲低及苯丙酮尿症筛查结果[J]. 江苏预防医学, 2015, 26(3):111.
- [8] ZHENG H JH, XU J. Stx2vha is the dominant genotype of shiga toxin-producing Escherichia coli O157: H7 isolated from patients and domestic animals in three regions of China[J]. Microbiol Immunol, 2005, 49(12):1019.
- [9] KARCH H DE, VICENTE M. The enemy within us: lessons from the 2011 European Escherichia coli O104: H4 outbreak[J]. EMBO Mol Med, 2012, 4(9):841.
- [10] HERMOS CR JM, MCADAM AJ. Shiga toxin-producing Escherichia coli in children: diagnosis and clinical manifestations of O157: H7 and non-O157: H7 infection[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(3):955.

收稿日期:2016-06-20 编辑:彭海燕

(6):1.

- [6] 葛以跃, 赵康辰, 崔仑标, 等. 基于逆转录-环介导等温扩增技术快速检测发热伴血小板减少综合征病毒方法的建立[J]. 江苏预防医学, 2014, 25(4):1.
- [7] PIEPENBURG O, WILLIAMS CH, STEMPLE DL, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biol, 2006, 4(7):e204.
- [8] ABD EL WAHED A, WEIDMANN M, HUFERT FT. Diagnostics-in-a-Suitcase: development of a portable and rapid assay for the detection of the emerging avian influenza A (H7N9) virus[J]. J Clin Virol, 2015, 69:16.
- [9] 莫秋华, 罗宝正, 杜田, 等. 四重 RT-PCR 快速检测 2013 新型 H7N9 禽流感病毒[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2013, 36(5):296.
- [10] ZHU Z, FAN H, QI X, et al. Development and evaluation of a SYBR green-based real time RT-PCR assay for detection of the emerging avian influenza A (H7N9) virus[J]. PLoS One, 2013, 8(11):e80028.
- [11] WONG CK, ZHU H, LI OT, et al. Molecular detection of human H7N9 influenza A virus causing outbreaks in China[J]. Clin Chem, 2013, 59(7):1062.
- [12] FAN J, CUI D, LAU S, et al. Detection of a novel avian influenza A (H7N9) virus in humans by multiplex one-step real-time RT-PCR assay[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14:541.
- [13] KERSTING S, RAUSCH V, BIER FF, et al. Rapid detection of Plasmodium falciparum with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis[J]. Malar J, 2014, 13:99.

收稿日期:2016-06-05 编辑:彭海燕