

doi:10.11816/cn.ni.2017-171619



• 论 著 •

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

甲型流感病毒的逆转录重组酶介导核酸 扩增快速检测方法研究

陈淑丹¹, 罗鹏¹, 张小平², 蔡玉峰¹, 何蕾¹, 郑伟¹, 吴忠华¹, 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 310003; 2.浙江出入境检验检疫局, 浙江 杭州 310016;
3.江苏奇天基因生物科技有限公司, 江苏 无锡 214135)

摘要: 目的 利用逆转录重组酶介导核酸扩增技术(RT-RAA)建立检测甲型流感病毒的快速方法。方法 通过使用逆转录酶,将甲流病毒 RNA 逆转录为 cDNA,根据 NCBI 基因库中甲型流感病毒保守序列设计引物及探针,用 cDNA 作模板,进行 RT-RAA 检测甲型流感病毒;构建携带甲型流感病毒的质粒,检测已知样本,分析该方法的灵敏度和特异性。结果 采用甲型流感病毒通用型引物和探针,能有效扩增出相应病毒的核酸,而对其他非甲流病毒无交叉反应;RT-RAA 反应过程均在 39℃ 恒温条件下完成,用时 30min 即可得到扩增结果,反应体系中最低扩增拷贝数为 100 copies。结论 建立的 RT-RAA 检测甲型流感病毒方法灵敏度和特异性高,反应快速、操作简单,适用于甲型流感病毒通用型的快速检测。

关键词: 甲型流感病毒;逆转录重组酶介导核酸扩增技术(RT-RAA);分子检测

中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 1005-4529(2017)05-0641-05

Rapid detection of influenza A virus with reverse transcription recombinase-mediated nucleic acid amplification

CHEN Shu-dan*, LUO Peng, ZHANG Xiao-ping, CAI Yu-feng, HE Lei,
ZHENG Wei, WU Zhong-hua, GUO Li-chuan, YING Qing-jie

(* Zhejiang International Travel Healthcare Center, Hangzhou, Zhejiang 310003, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To quickly detect the influenza A virus by using reverse transcription recombinase-mediated nucleic acid amplification (RT-RAA). **METHODS** The influenza A virus RNA was transcribed into cDNA by using reverse transcriptase, the primer and probe were designed based on the conserved sequences of the influenza A virus in NCBI gene pool, the cDNA was used as template, and the influenza A virus was detected by using RT-RAA. The plasmids that carried with the influenza A virus were constructed so as to detect the known samples, and the sensitivity and specificity of the RT-RAA were observed. **RESULTS** The nucleic acids of their matching viruses could be effectively amplified by using the universal primer and probe, which had no cross reaction with non-influenza A viruses. The whole process of RT-RAA was completed under the constant temperature of 39℃, the amplification results could be acquired within 30min, and the minimum amplification copy number was 100 copies in the reaction system. **CONCLUSION** The sensitivity and specificity of the RT-RAA are high in the detection of the influenza A virus, with the reaction rapid, the operation simple, and it is suitable for the rapid detection of the universal influenza A virus.

Key words: Influenza A virus; Reverse transcription recombinase-mediated nucleic acid amplification; Molecular detection

收稿日期: 2017-11-18; 修回日期: 2018-01-15

基金项目: 浙江省科技计划项目公益技术研究社会发展基金资助项目(2016C33201)

国家质量基础的共性技术研究与应用重点专项基金资助项目(2016YFF0203200)

生物安全关键技术研发重点专项基金资助项目(2016YFC1202700)

通信作者: 罗鹏, E-mail: luopeng@ziq.gov.cn

流行性感冒是一种由流行性感冒病毒引起的季节性急性上呼吸道感染疾病,主要通过患者的飞沫、患者与患者之间的接触或与被污染物品的接触迅速传播。这种疾病临床特征通常表现为发热、寒颤、头痛、肌肉酸痛和干咳^[1]。每年流感的发病率均较高,严重者可造成死亡,特别是对婴幼儿、老年人等高危人群造成非常大的危害,被世界卫生组织(WHO)列为全球性监测疾病^[2]。

流行性感冒病毒简称流感病毒,是一种 RNA 病毒,呈球形或丝状,直径 80 nm ~120 nm,分为甲型、乙型、丙型三型,这三型具有相似的生化 and 生物学特征^[3]。流感病毒有一层脂质囊膜,膜上有蛋白质,是由凝血素(H)和神经氨酸酶(N)组成,均具抗原性,易发生变异^[4]。甲型流感病毒主要有 H 和 N 变异,H 有 16 个亚型,N 有 9 个亚型,因此甲型流感病毒又分很多亚型。甲型流感病毒是引起人畜流感的主要病毒,且经常发生抗原变异,传染性强,传播迅速,极易发生大范围流行。

为减少流行感冒的发生率,迫切需要建立快速、准确的检测甲型流感病毒的方法,这对于流感患者的临床诊断和及时有效的治疗具有重大的意义,也能对全球的流感流行趋势起到预见性的作用。

本研究中建立了一种快速、灵敏、操作简便、可适用于现场检测的 RT-RAA 方法检测甲型流感病毒,尤其在临床上对甲型流感病毒的快速检测具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 病毒样本及临床标本 甲型流感病毒质粒,临床样本收集于确诊感染的患者的阳性咽拭子,包括甲型流感病毒临床样本 RNA;乙型流感病毒临床样本 RNA;手足口病毒临床样本 RNA;鼻病毒临床样本 RNA;呼吸道合胞病毒 RNA。以上由浙江国际旅行卫生保健中心实验室提供。

1.2 试剂和仪器 ABI7500 实时荧光 RT-PCR 仪(美国应用生物系统公司);全自动核酸提取仪(Kin-Fisher Flex,美国 Thermo 公司);QT-RAA-F6100 仪器(江苏奇天基因生物科技有限公司)。RAA 试剂盒(江苏奇天基因生物科技有限公司);病毒 RNA 提取试剂盒(Ambion 1836,美国 life technologies 公司);M-MLV 逆转录酶(美国 Promega 公司);引物和探针由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 探针和引物设计 甲型流感病毒根据 H 和 N 抗原不同,又分为许多亚型。本研究目的是设计甲型流感病毒的通用检测引物,为了筛选在甲流病毒

各亚型之间同源性高,而对比其它病毒特异性又强的序列,故选取了甲型流感病毒基质蛋白 M 基因组序列作为靶基因进行比对和设计。从 NCBI 数据库中下载目前已知的不同来源不同甲型流感病毒亚型(H1N1, H3N2, H5N1, H6N2, H3N8, H9N2, H7N2NSB)的 M 基因序列,采用 DNASTAR 7.0 软件进行比对和设计,所比对的甲型流感病毒部分基因组的 GenBank 登录号如下所示: DQ415352.1; AF457712.1; AF144306.1; AF153257.1; AF457710.1; AF457703.1; AF457695.1; AF457687.1; AF457678.1; AF153258.1; DQ124197.1; DQ124188.1; DQ124162.1; DQ124160.1; DQ124152.1; DQ870897.1; DQ098269.1; DQ098268.1; DQ098267.1; DQ098266.1; DQ100424.1; DQ100423.1; DQ100422.1; AF156470.1; AF156469.1; AF156468.1; M65019.1; KF695196.1; KF424077.1; KF424085.1; AF073181.2; EF063508.1; EU743072.1; EU743294.1; AF156464.1; AF156461.1; AF073193.1; AM489446.1; FJ357137.1

1.4 病毒基因组核酸提取 取 70 μ l 咽拭子样本,采用 MagMAX 磁珠净化技术,按 Ambion 1836 RNA 提取试剂盒说明书提取样本 RNA,将提取好的核酸测定核酸浓度后进行分装备用,冻存于 -80 $^{\circ}$ C。

1.5 RAA 反应条件 按照 RAA 荧光反应试剂盒(江苏奇天基因生物科技有限公司)使用说明进行操作。在 1.5ml 离心管中分别加入 25 μ l 反应缓冲液;正向引物、反向引物(10 μ M)各 2.1 μ l; 0.6 μ l 探针(10 μ M);M-MLV 逆转录酶 40U;1 μ l 模板;加 16.5 μ l 双蒸水至 47.5 μ l,混合均匀,然后加入到含有重组酶等扩增所需物质干粉的反应管中,再次混匀。各管加入 2.5 μ l 280mM 醋酸镁溶液并混匀。将上述反应管放置于 QT-RAA-F6100 仪器中,在 39 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。

1.6 灵敏度实验 选取甲型流感病毒检测用的 DNA 序列(222bp),如下所示(5'-3'):

```
CTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTC-
TATCGTCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGC-
CGAGATCGCGCAGAGACTTGAAGAT-
GTCTTTGCAGGGAAGAACACCGATCTT-
GAGGCACTCATGGAATGGCTAAAGA-
CAAGACCAATCCTGTACCTCTGACTA-
AGGGGATTTTAGGATTTGTATTCACGCT-
CACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGA
```

载体质粒为 PUC57,载体大小 2710bp,克隆位点 SmaI,宿主菌为 DH5 α ,带氨苄抗性。合成并提取含有待检测甲型流感病毒 M 基因序列的质粒

pUC57-FluA-M 后,分别稀释为 10^4 copies/ μL 、 10^3 copies/ μL 以及 10^2 copies/ μL ,加入反应体系后,最终模板拷贝数分别为 10^4 copies, 10^3 copies, 10^2 copies 和 0 copies,按照建立的 RAA 体系检测扩增结果。

1.7 特异性检测 特异性检测,选取临床症状类似的病毒种类作检测。使用经实时荧光 PCR 仪检测为阳性的临床样本进行检测,分别对甲型流感病毒、乙型流感病毒、手足口病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒采用 QT-RAA-F6100 仪器进行检测,评价方法的特异性。

1.8 结果判断标准 阴性对照由双蒸水代替模板;阳性对照为含靶序列的核酸作为模板。反应结果应

同时符合以下两个条件,否则此次实验视为无效:(1)阴性对照:曲线为直线或轻微斜线,无明显扩增曲线。(2)阳性对照:曲线相比阴性对照有明显扩增曲线。无扩增曲线,判断为 RAA 检测阴性。有扩增曲线,判断为 RAA 检测阳性。有扩增曲线,且扩增不明显的标本应重做,重做后只要出现明显扩增曲线,则判断为 RAA 检测阳性,否则为阴性。

2 结果及分析

2.1 探针和引物设计 使用 DNASTAR7.0 引物设计软件,比对 NCBI 数据库中 38 条不同甲型流感病毒 M 基因序列,同时根据引物设计相关的原则以及 RAA 反应体系对引物的要求等设计和选择,最终选取的探针和引物的序列如表 1 所示。

表 1 RAA 检测甲型流感病毒通用型引物和探针信息

Table 1 The universal primer and probe used for RAA detection of the influenza A virus

引物/探针	序列(5'-3')	扩增子(bp)
F	CTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTCTATC	222
R	TYTACGCTGCAGTCTCGYTCCTGGGCAC	
P	CTCATGGARTGGCTAAAGACAAGACCAA(FAM-dT) (THF)C(BHQ-dT)GTCACCTCTGACTA	

2.2 灵敏度实验 将合成的甲型流感病毒质粒稀释为 10^4 copies/ μL 、 10^3 copies/ μL 以及 10^2 copies/ μL ,分别作为模板进行扩增,配制反应液时,体系中加入 $1\mu\text{L}$ 模板,故使最终反应体系中模板拷贝数为 10^4 copies, 10^3 copies, 10^2 copies 和 0 copies。在 RT-RAA 反应过程中,首先在反应体系中加入的逆转录酶将 RNA 逆转录成 cDNA,然后在重组酶和引物存在下再以 cDNA 为模板合成目的产物。反应在 39°C 下进行约 30 分钟。随着模板浓度的增高,扩增趋势越明显,最低可以扩增至 10^2 拷贝。扩增结果见图 1。

2.3 特异性检测 特异性结果采用临床样本进行验证。采用 RAA 检测体系对已经通过 PCR 确认的各个分型的甲型流感(13 例),乙型流感(5 例),手足口病毒(2 例),鼻病毒(3 例),呼吸道合胞病毒(7 例),进行检测,结果如表 2 所示。通过进行临床样本检测,可以看出所建立的 RAA 检测方法对甲型流感病毒包括 H1N1, H3N2, H5N6 亚型都有阳性结果扩增,而对乙型流感病毒、手足口病毒、鼻病毒和呼吸道合胞病毒无扩增结果,说明 RAA 方法对甲型流感病毒具有良好的检出效果和特异性。见图 2。

3 讨论

目前,检测甲型流感病毒的方法主要有流感病

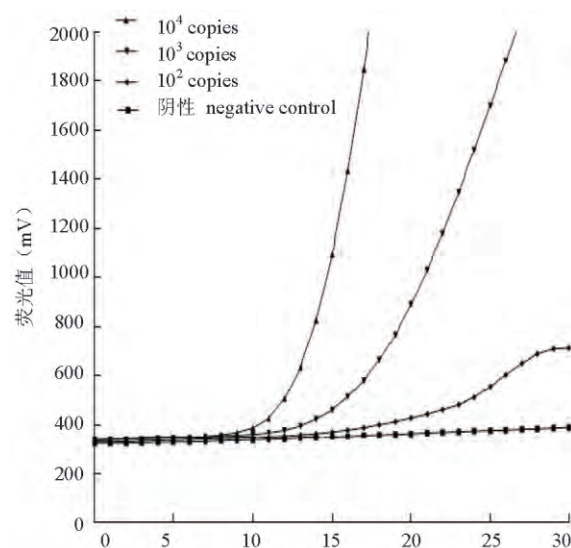


图 1 不同拷贝数甲型流感病毒质粒 DNA 的扩增结果

Figure 1 The amplification of the plasmids DNA that carried with different copy number of influenza A virus

毒分离培养、血清学检测、分子生物学检测、逆转录环介导等温扩增法等。病毒分离法^[5-7]及血清学检测法^[8]操作复杂、检测周期长、漏检率高、特异性不够强,已远远不能满足现代快速准确的检测要求。这不仅给检验部门带来沉重负担,而且还不能及时

表 2 RAA 方法临床样本验证试验

Table 2 The verification test of clinical samples with RAA

样本名称	编号	检测结果	样本名称	编号	检测结果
甲型流感	H1N1-1019	阳性	乙型流感	B-2761	阴性
甲型流感	H1N1-1020	阳性	乙型流感	B-2762	阴性
甲型流感	H1N1-1021	阳性	乙型流感	B-2763	阴性
甲型流感	H1N1-776	阳性	手足口病毒	EV71-3059	阴性
甲型流感	H1N1-782	阳性	手足口病毒	EV71-3061	阴性
甲型流感	H3N2-1261	阳性	鼻病毒	RHI-45	阴性
甲型流感	H3N2-1259	阳性	鼻病毒	RHI-306	阴性
甲型流感	H3N2-1260	阳性	鼻病毒	RHI-362	阴性
甲型流感	H3N2-1262	阳性	呼吸道合胞病毒	RSVB-239	阴性
甲型流感	H3N2-1263	阳性	呼吸道合胞病毒	RSVB-243	阴性
甲型流感	H3N2-1258	阳性	呼吸道合胞病毒	RSVB-246	阴性
甲型流感	H5N6-1	阳性	呼吸道合胞病毒	RSVB-247	阴性
甲型流感	H5N6-2	阳性	呼吸道合胞病毒	RSVB-248	阴性
乙型流感	B-2759	阴性	呼吸道合胞病毒	RSVB-1	阴性
乙型流感	B-2760	阴性	呼吸道合胞病毒	RSVB-2	阴性

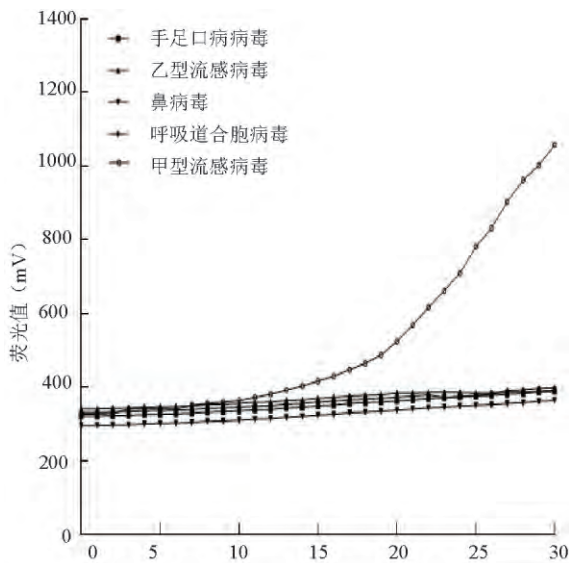


图 2 RT-RAA 方法扩增甲型流感病毒的特异性

Figure 2 The specificity of the RT-RAA in amplification of the influenza A virus

阻止流行性感冒病例的扩散。分子生物学方法如聚合酶链式反应中的 RT-PCR^[9]、RT-多重 PCR^[10-12]、实时荧光定量 PCR^[13]、基因芯片^[14]、核酸依赖性扩增检测技术(NASBA)^[15]以及等温核酸技术中的逆转录环介导等温核酸扩增技术(RT-LAMP)已经建立起来,并且在甲型流感病毒的检测中已得到较好的应用,缩短了检测时间。但是这些方法需要使用复杂的仪器和装备精良的实验室,还需要实验人员花费时间探索稳定反应体系,且反应时间偏长。因此,能够提供便携、操作简单而且耗时短的检测方法尤为紧要。LAMP 技术解决了 PCR 技术昂贵的仪器设备等问题,具有操作简便、结果判断简单等优

点,已应用于甲型流感病毒的检测。

本研究新建立一种新型等温核酸扩增方法,即重组酶介导的等温核酸扩增检测甲型流感病毒通用型方法,可在等温条件下(39℃),对反应体系中含 10⁴ 拷贝质粒进行检测,扩增约 10min 即可完成对目的基因片段的检测。目前本研究达到的灵敏度是最终反应体系中拷贝数为 100copies,对本研究的 50μL 的反应体系而言,最低检出拷贝数为 2copies/μL,希望进一步深入研究,优化反应,能使检出下限达到 1copies/μL。

将 RAA 技术用于甲型流感病毒的检测具有很多优点。由于 RAA 技术要求的引物长度不低于 30bp、探针长度不低于 45bp,因而其特异性较强。因解链和扩增同时进行,在 10 分钟之内可以扩增出共 10⁵ 拷贝的目的基因,因而可实现快速高效扩增。同时加入荧光探针后,在检测过程中可以实时监测扩增结果。与 PCR 法相比,RT-RAA 法是在恒温下反应,操作简单,摆脱了复杂仪器的束缚,不需变温,大大缩短了反应时间。此外本研究采用国内研发的试剂和相关关键酶,降低了生产成本,满足了欠发达地区和室外现场检测的需求。

本研究最主要的难题是,研究对象甲型流感病毒临床样本不足,一些亚型流感病毒没有得到试验验证,也因样本限制,无法将所有可能有交叉反应的病毒进行特异性检测,对未知样本没有与目前已有的 PCR 试剂盒进行方法学比较,本研究初步试验反应的特异性高,但还需要进一步的研究来证实。

西环素)或氨基糖苷类等;各种联合用药方案目前为止只有非对照的小样本的病例研究,均缺乏前瞻性临床对照研究验证其有效性。

参考文献

- [1] Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, et al. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(9): 2941-2945.
- [2] La Forgia C, Franke J, Hacek DM, et al. Management of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit using novel environmental disinfection: a 38-month report[J]. Am J Infect Control, 2010, 38(4): 259-263.
- [3] Lei J, Han S, Wu W, et al. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak cross-transmitted in an intensive care unit and respiratory intensive care unit[J]. Am J Infect Control, 2016, 44(11): 1280-1284.
- [4] Touati A, Achour W, Cherif A, et al. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit: antimicrobial susceptibility and genotyping analysis [J]. Ann Epidemiol, 2009, 19(6): 372-378.
- [5] Loli A, Tzouveleki LS, Gianneli D, et al. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* with chromosomally encoded VIM-1 undetectable by imipenem-EDTA synergy tests[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(5): 1894-1896.

(上接第 644 页)

参考文献

- [1] Chughtai AA, Wang Q, Dung TC, et al. The presence of fever in adults with influenza and other viral respiratory infections [J]. Epidemiol Infect, 2017, 145(1): 148-155.
- [2] 胡云光, 徐兴丽, 王晶晶, 等. 2005—2012 国内报道流感病毒发病情况的 Meta 分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2015, 35(4): 265-270.
- [3] Yang SG, Wo JE, Li MW, et al. Expression of H5N1 influenza virus hemagglutinin protein fused with protein transduction domain in alpha virus replicon system[J]. J Virol Methods, 2010, 163(1): 31-39.
- [4] 徐琦, 何蕾, 罗鹏, 等. 流行性感冒病毒监测及检测技术的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(33): 6597-6600.
- [5] Leonardi GP, Mitrache I, Pigal A, et al. Public hospital-based laboratory experience during an outbreak of pandemic influenza A (H1N1) virus infections[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1189-1194.
- [6] Cheng PK, Wong KK, Mak GC, et al. Performance of laboratory diagnostics for the detection of influenza A(H1N1) virus as correlated with the time after symptom onset and viral load [J]. J Clin Virol, 2010, 47(2): 182-185.
- [7] 朱冰, 钟家禹, 周荣, 等. 2010 年与 2011 年流感病毒广州分离株全基因组序列分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(9):

- [6] Tsiatsiou O, Iosifidis E, Katragkou A, et al. Successful management of an outbreak due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit[J]. Eur J Pediatr, 2015, 174(1): 65-74.
- [7] Hammerum AM, Hansen F, Skov MN, et al. Investigation of a possible outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Odense, Denmark using PFGE, MLST and whole-genome-based SNPs [J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(7): 1965-1968.
- [8] Cristina ML, Spagnolo AM, Cenderello N, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak: an investigation of the possible routes of transmission[J]. Public Health, 2013, 127(4): 386-391.
- [9] Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting[J]. Am J Control, 2008, 36(5): 309-332.
- [10] 李晓勇, 刘易林, 阳时桃. 头孢哌酮钠舒巴坦联合多西环素治疗医院获得性泛耐药鲍曼不动杆菌肺炎临床对照试验[J]. 北方药学, 2016, 13(1): 116-118.
- [11] 国卫办. 抗菌药物临床应用指导原则, 2015.
- [12] 陈佰义, 何礼贤, 胡必杰, 等. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(2): 76-85.
- [13] 吴春苏, 汪艳, 盛瑞玲, 等. 多药耐药鲍氏不动杆菌的临床分布特点及耐药性监测分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(04): 732-734.

- 2012-2014.
- [8] Cappuccio J, Dibarbora M, Lozada I, et al. Two years of surveillance of influenza A virus infection in a swine herd. Results of virological, serological and pathological studies[J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2017, 50: 110-115.
- [9] 李瑾, 申红卫, 秦萌, 等. 新型多重 PCR 方法及其在呼吸道病毒诊断上的应用[J]. 病毒学报, 2013, 29(6): 638-644.
- [10] 王国政, 崔大伟, 谢国良, 等. 四重荧光定量 RT-PCR 检测人感染新型甲型流感 H7N9 病毒[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(11): 801-804.
- [11] 林方, 熊伟, 康晓平, 等. 人类流感病毒多重 PCR 分型方法的建立[J]. 军事医学科学院院刊, 2010, 3(4): 331-344.
- [12] 庞耀珊, 谢芝勋, 许显文, 等. 多重 RT-PCR 快速检测鉴别 H7 亚型禽流感病毒方法的建立[J]. 中国人畜共患病杂志, 2005, 21(7): 595-597.
- [13] 戴玉柱, 崔大伟, 杨先知, 等. 五重荧光定量 RT-PCR 法检测甲型流感病毒[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(9): 641-644.
- [14] Townsend MB, Dawson ED, Mehlmann M, et al. Experimental evaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8): 2863-2871.
- [15] Moore C, Telles JN, Corden S, et al. Development and validation of a commercial real-time NASBA assay for the rapid confirmation of influenza A H5N1 virus in clinical samples [J]. J Virol Methods, 2010, 170(1-2): 173-176.