

TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 技术快速检测

H5 亚型禽流感病毒*

卢亦愚**, 严菊英, 冯 燕, 徐昌平, 史 雯, 茅海燕

(浙江省疾病预防控制中心, 浙江杭州 310009)

Rapid Detection of Avian Influenza virus H5 by Real-Time RT-PCR and TaqMan-MGB probe*

LU Yi-yu**, YAN Ju-ying, FENG Yan, XU Chang-ping, SHI Wen, MAO Hai-yan

(Center for Disease Control and Prevention of Zhejiang province, Hangzhou 310009)

Abstract. A real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RRT-PCR) assay based on TaqMan-MGB probe was developed to rapidly detect avian influenza virus subtype H5. The assay, which was based on primers and TaqMan-MGB probes selected from highly conserved regions of the hemagglutinin gene of avian influenza virus subtype H5, was optimized in a reaction system and a condition to improve the sensitivity, specificity and accuracy. In addition, clone technology was used to develop a quantitative PCR format with virus copies amount. The results showed that the best concentration of primers and probe was 640nmol/L and 480nmol/L, respectively. None of the negative control samples showed false-positive reactions when done in duplicates. The detection limit of the assay was 100 copies per reaction. A linear standard curve was obtained between 10^2 and 10^7 DNA copies/reaction. It took only three hours from viral RNA extraction to complete the detection. The assay was simple and highly reproducible. This real-time RT-PCR assay is an excellent method suitable for rapid and quantitative detection of avian influenza virus H5 under clinical conditions.

Key words: Real-time RT-PCR; TaqMan-MGB probe; Avian influenza virus subtype H5(AIV H5)

摘要: 建立以 TaqMan-MGB 荧光探针为特点的荧光定量 RT-PCR 方法, 用于检测 H5 亚型禽流感病毒。针对 H5 亚型禽流感病毒血凝素 (HA) 基因保守区域设计特异性引物与 TaqMan-MGB 荧光探针, 筛选并优化荧光定量 RT-PCR 反应体系与反应条件, 用以提高方法的特异性、敏感性与准确性; 并通过体外克隆技术建立病毒基因拷贝数进行定量分析。结果表明: 引物与探针的优化浓度分别 640nmol/L 和 480nmol/L, 体系具有良好的保守性和特异性, 与其他呼吸道病毒均无交叉反应。方法检测灵敏度为 100 拷贝/反应, 标准曲线线性范围为 $10^7 \sim 10^2$ 拷贝/反应, 从病毒核酸提取至检测完成仅需 3h 左右, 操作简便, 重现性好。本研究建立的 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 方法特异、敏感、快速, 适合于临床实验室进行 H5 亚型禽流感病毒的快速定量检测。

关键词: 荧光定量 RT-PCR; TaqMan-MGB 探针; H5 亚型禽流感病毒(AIV H5)

中图分类号: S831.7

文章标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)05-0472-05

由 H5N1 亚型禽流感病毒引起的高致病性禽流感(Highly pathogenic avian influenza, HPAI), 其发病率和

收稿日期: 2006-13-16, 修回日期: 2006-04-24

* 基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目 (Z303909)

** 通讯作者: 卢亦愚(1948-), 男, 博士, 教授, 主要从事病毒学研究。Corresponding author. Tel: 0571-87235034; E-mail: Luyiyuzjh@yahoo.com.cn

死亡率极高,是危害禽类的主要烈性传染病之一,被国际兽疫局定为 A 类传染病。近年来研究发现,高致病性禽流感病毒 H5N1 可突破种族屏障,感染人类致病甚至死亡。至 2003 年以来,亚洲与我国因感染禽流感 H5N1 病毒而死亡的人数已达 64 人,使之成为严重危害人类健康的恶性传染病之一,而且随着禽流感病毒 H5N1 对人类的不断适应与快速变异,已对人类的健康构成了极大的威胁。因此,建立快速准确的 H5 禽流感病毒诊断技术,对预防和控制 HPAI 具有重要意义。

目前,对 H5N1 病毒的诊断方法,以针对人类流感检测为基础发展起来的主要有病毒分离、血清学诊断以及分子生物学方法。病毒分离时间长,要求条件高,分离率低,而采集患者急性期与恢复期双份血清进行抗体测定来确认,又不能及时进行诊断,因此,使这两种方法在使用中受到很大的限制^[1]。

近年来发展起来的荧光定量 PCR 检测技术,具有灵敏度高、特异性强、准确快速且可以实时定量的特点,适合用于疾病的早期快速诊断,而且闭管式操作从根本上杜绝了污染与假阳性结果的出现^[2]。本研究在已建立 H5 禽流感病毒 RT-PCR 检测方法的基础上,利用最新的荧光探针技术建立了 TaqMan-MGB 定量 PCR 方法,用于 H5 禽流感病毒核酸的检测,取得了满意的结果,现将结果报道如下:

1 材料与方法

1.1 病毒株和临床标本

禽流感病毒 H5N1 及 H7、H9 对照抗原由 WHO 提供;流感病毒株甲 1/北京/53/97、甲 3/悉尼/5/97、乙/深圳/12/97 由国家流感中心提供;麻疹病毒沪 191、呼吸道合胞病毒 Long 株由卫生部上海生物制品研究所和中国药品生物制品检定所提供;SARS 病毒株为本实验室 2003 年 SARS 暴发期间分离的 ZJ01 病毒株。临床标本为 2006 年 2 月浙江省疑似人感染高致病性禽流感疫情中,采集的患者含漱液、咽拭子标本,于 -80℃ 条件保存。

1.2 引物与探针

本研究从 GenBank 上下载不同年代与地区的禽源与人源的 H5 禽流感病毒血凝素基因序列,用 DNAMAN 软件进行同源性分析,采用 Primer Express 2.0 软件,在其保守区域设计特异性引物和 TaqMan-MGB 荧光探针。探针 5'端标记的荧光报告基团是

FAM, 3'端标记荧光淬灭基团 Non-fluorescent quencher 和 Minor Groove Binder (MGB)。TaqMan-MGB 探针序列为 5'-FAM-TGTGTGACGAATTCA T-3'MGB,引物序列分别为 sense primer: 5'-TGGA TGGCTCCTCG GRAAC-3', antisense primer: 5'-ARGACCATTCCGGC ACATT-3', 扩增片段长度为 58 bp。

1.3 病毒核酸的提取

在 P2 级生物安全实验室全排式生物安全柜内,对相关样本进行核酸提取,用于核酸提取的 Rneasy Mini Kit 为 QIAGEN 公司产品,按试剂盒操作说明书进行。

1.4 荧光定量 RT-PCR 反应体系与反应条件的优化

在相同浓度模板与反应体系中,采用矩阵法优选引物和探针的最佳浓度。同时在 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 反应条件中,调整不同 Tm 值 (45℃~65℃),对相同浓度的阳性核酸模板进行检测。整个筛选过程中以最低 Ct 值和最高荧光强度增加值 ΔRn 值为标准进行选择与优化。

1.5 荧光定量 RT-PCR 反应的特异性

对 H5N1 及 H7、H9 对照抗原,流感病毒株甲 1/北京/53/97、甲 3/悉尼/5/97、乙/深圳/12/97、呼吸道合胞病毒 Long 株以及 SARS 病毒 ZJ01 株等呼吸道病毒提取核酸,用 TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 反应系统进行检测,验证方法的特异性。

1.6 荧光定量 RT-PCR 定量分析模型的构建

针对 H5 亚型禽流感病毒血凝素基因全序列设计特异性 PCR 扩增引物,扩增片段克隆技术参照杨爱梅等方法进行^[3,4]。通过 A/T 载体,连接到 pGE M-T 载体上,转化至 DH5 α 大肠埃希氏菌中,PCR 鉴定挑取阳性克隆,并通过序列测定分别进行验证,然后抽出质粒 DNA,测定核酸浓度,作为定量的外标准品。10 倍系列稀释外标准品,取终浓度为 10^7 copies~ 10^2 copies/反应的 DNA 6 个样品进行标准曲线的绘制,通过标准曲线对未知样品定量。采用 Takara Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time) DNA Kit 对质粒 DNA 进行荧光定量 PCR 扩增,反应体系为每 20 μ L 反应液其中包括: Premix Ex TaqTM 10.0 μ L; 上、下游引物 (20pmol/ μ L) 各 0.8 μ L; 探针 (20pmol/ μ L) 0.6 μ L; DNA 模板 5 μ L; 补 DEPC 水至 20 μ L。然后用 Roche LightCycler 荧光检测系统按下列反应参数进行检测: 95℃ 10s 预变性, 95℃ 5s, 50℃ 20s 扩增 40 个循环,在 50℃ 进行单点荧光检测。

1.7 荧光定量 RT-PCR 反应的重复性

选择 3 个浓度的外标准品, 进行 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 反应, 并对每个浓度外标准品同时进行 5 个重复反应, 通过变异系数验证方法的重现性。

2 结果

2.1 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 反应的条件优化

本研究以提高反应的扩增效率与敏感度为标准, 采用矩阵法对引物与探针浓度进行优化, 同时采用荧光定量 PCR 仪上的梯度功能对 T_m 值在 $45^{\circ}\text{C}\sim 65^{\circ}\text{C}$ 之间进行选择, 结果表明当引物浓度为 640nmol/L , 探针浓度为 480nmol/L 且 T_m 温度为 50°C 时, 可获得最低 Ct 值和最高荧光强度增加值 (ΔR_n), 优化后反应体系为每 $25\mu\text{L}$ 反应液包括: Buffer ($5\times$) $5\mu\text{L}$; dNTPmix (各 0.2mmol/L) $2\mu\text{L}$; DTT $1.25\mu\text{L}$; RNeasy Inhibitor $0.5\mu\text{L}$; 上、下游引物 ($20\text{pmol}/\mu\text{L}$) 各 $0.8\mu\text{L}$; 探针 ($20\text{pmol}/\mu\text{L}$) $0.6\mu\text{L}$; Emix $0.5\mu\text{L}$, 模板 RNA $5\mu\text{L}$, 补 DEPC 水至 $25\mu\text{L}$ 。然后用 MJ DNA Engine OpticonTM 2 或 Roche LightCycler 荧光检测系统按下列反应参数进行检测: 45°C 30min 逆转录, 94°C 变性 2min, 以 95°C 15s, 50°C 1min 扩增 40 个循环, 在 50°C 进行单点荧光检测。

2.2 方法特异性评价

选择 H5、H7、H9 禽流感病毒及其他呼吸道病毒核酸检测结果表明: 除 H5 亚型禽流感病毒出现很好的阳性结果外, H7、H9 亚型禽流感病毒、流感病毒甲 1、甲 3、乙型等其它呼吸道病毒及反应所设置的空白对照, 检测结果均呈阴性, 说明本方法具有良好的检测特异性。

2.3 定量分析模型的构建

对 10 倍系列稀释外标准品, 即每个反应体系含模板数分别为 $10^7\text{copies}\sim 10^2\text{copies}$ 的质粒 DNA 进行

定量 PCR 检测, 在 Ct 值为 40 以内得到方法的检出限约为 100 拷贝/反应。选择 10^7 拷贝/反应至 10^2 拷贝/反应 6 点, 以反应 Ct 值对质粒 DNA 拷贝数制作标准曲线, 得到标准曲线方程为 $y = -3.284x + 43.20$, 见图 1 和图 2。

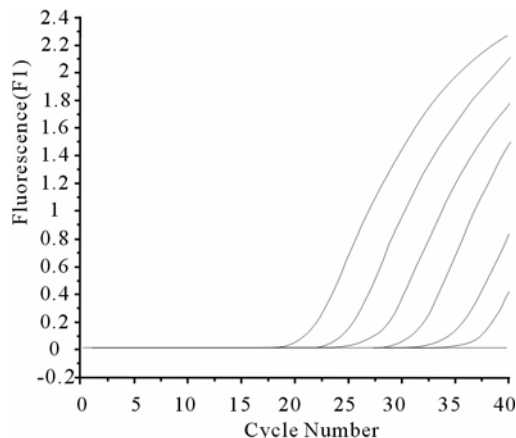


图 1 荧光定量 PCR 方法标准品扩增曲线

Fig.1 Amplification curve of AIV H5 standard samples using Real-time PCR

From left to right, the positive amplification is 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 copies per reaction respectively.

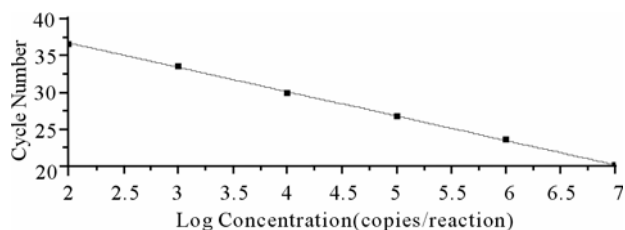


图 2 荧光定量 PCR 方法标准曲线

Fig.2 Standard curve of AIV H5 standard samples with Real-time PCR

2.4 方法重现性评价

选择不同浓度的三个外标准品进行定量 PCR 检测, 每个样本作 5 次重复, 通过计算同一样本 Ct 值的差异来验证方法的准确性, 见表 1。

表 1 荧光定量 RT-PCR 检测禽流感病毒 H5 的重现性
Table1 Reproducibility for detection of AIV H5 using Real-time PCR

Sample	Ct					Average	Coefficient of Variation (CV)
	1	2	3	4	5		
1	22.55	22.41	22.51	22.62	22.32	22.48	0.58
2	26.18	26.15	26.24	26.38	26.63	26.32	0.75
3	29.81	29.97	29.64	29.98	29.74	29.83	0.49

2.5 临床标本的检测

利用本研究建立的 TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 方法对浙江省 2006 年 2 月发生的疑似 H5

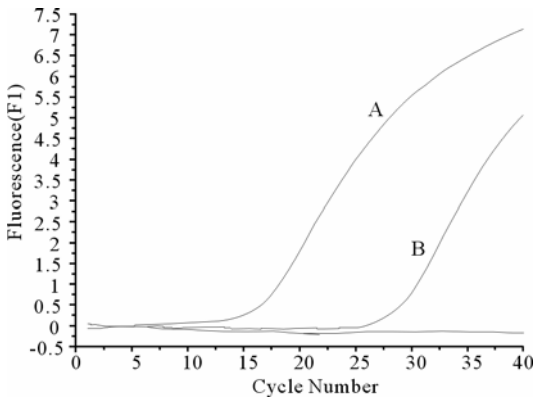


图3 荧光定量 RT-PCR 人检测感染 AIV H5N1 临床标本
Fig.3 Detection of AIV H5N1 clinical samples using RT-PCR

The A is positive controls, the positive amplication B is clinical sample, no positive amplications were observed in inner and outer negative controls.

3 讨论

为了预防与应对人感染高致病性禽流感 H5N1 的发生, 并进一步及时进行早期鉴别确诊, 达到早诊断、早隔离、早治疗的目的, 本研究建立了 TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 快速诊断方法, 用于 H5N1 高致病性禽流感病毒核酸的实验室检测。该方法灵敏、快速, 检出限可达 100 拷贝/反应。该方法由于设置了荧光探针, 增加了检测的特异性。此外, 与普通 RT-PCR 比较, 该方法操作简单、结果直观, 省去了电泳分析结果的步骤, 缩短了检测时间, 有利于疾病预防控制工作中对高致病性禽流感 H5N1 疑似疫情的快速诊断与对类似症状其他患者的排除, 在实际工作中发挥了很好的作用。

本研究采用新一代 TaqMan-MGB 探针, 由于 TaqMan-MGB 探针的淬灭基团采用了非荧光淬灭基团 (Non-Fluorescent Quencher), 本身不产生荧光, 可以降低 PCR 反应荧光本底信号的强度, 进一步增强方法的特异性; 同时探针上还连接着 MGB (Minor Groove Binder) 修饰基团, 可以将探针 T_m 温度提高 10°C 左右, 在获得相同 T_m 值的条件下, MGB 探针所需的碱基序列比普通 TaqMan 探针更短, 在目标序列中可选择范围更广, 有利于设计出灵敏度特异性更好的探针, 这也是本方法最大的优点。此外, MGB 探针在错

高致病性禽流感患者的下呼吸道吸出物标本 1 份进行检测, 结果阳性 (该样本经中国疾病预防控制中心复检, 证实为 H5N1 阳性) 见图 3。

配碱基的识别与信噪比方面, 也都优于非 MGB 的荧光探针^[5]。当然, 荧光定量 PCR 技术相对普通 PCR, 在探针与引物的 T_m 温度差异, GC 含量的要求, 引物与探针的碱基兼并, 探针与引物在序列上的位置等等都提出了更高、更严格的要求^[6,7]。本研究对禽流感 H5N1 亚型的 H 基因处设计荧光定量 PCR 引物与探针发现, 设计的普通 TaqMan 探针虽然特异性很好, 但在检测的灵敏度上与普通 RT-PCR 相似, 不够理想。采用 MGB 探针后, 在获得相同 T_m 温度的情况下, 设计得到得分值较低、长度仅为 16bp 的荧光探针, 大大提高了方法的灵敏度与特异性, 检测结果令人满意。检测的下限可达 100 拷贝/反应, 灵敏度较 Erica 等人报道的采用普通 TaqMan 探针的 10^3 - 10^4 拷贝/反应要高^[8]。在此基础上, 本研究还对体系的引物、探针浓度与 T_m 温度作了优化, 达到了荧光信号强、背景噪音低、重复性好的结果。另外, 为了对不同 H5 亚型禽流感基因型进行快速诊断, 追踪病毒来源, 本研究在设计引物与探针时, 从 NCBI 上分别下载人源与禽源的 H5 亚型代表株血凝素基因序列, 结合特异性与灵敏度的要求, 采用兼并个别特异性引物的碱基, 用以保证本方法适用于各种不同来源禽流感 H5 亚型病毒的快速诊断。

本研究采用已知标准品作标准曲线来推算未知样品的量, 即根据质粒模板的拷贝数 (拷贝数 = $(\text{DNA 质量}/\text{DNA 摩尔质量}) \times 6.02 \times 10^{23}$) 制作标准曲线, 用于临床标本的定量检测^[4]。并设立了阴性、阳性的内外对照, 严格控制污染以及可能出现的假阳性、假阴性现象, 并选择 6 点构建标准曲线, 进行 3 次重复以减小误差, 使定量方法更加稳定准确。在完成此项研究的同时, 正遇上浙江省发生一例疑似 H5N1 感染的禽流感患者, 立即采用该方法进行了检测, 从收到患者下呼吸道吸出物标本至确认为阳性结果, 仅用了不到三个小时, 该标本后又送中国疾控中心复检得到确认; 在此同时, 我们对该患者标本作了禽流感病毒各片段的序列测定, 也证实为禽流感强毒株 H5N1。此外, 我们也曾对从浙江省农科院所获得的 20 余份禽源 H5N1 亚型禽流感病毒的核酸用

该方法进行验证, 效果同样令人满意。

本研究建立的 H5 亚型禽流感病毒核酸 TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 方法既可以准确、快速的对 H5 亚型禽流感病毒进行早期诊断, 还能够定量检测出病毒拷贝数量, 为该疾病的早期快速诊断、减少漏检以及观察药物疗效等方面提供了可靠的科学依据。

References

- [1] Gan M H (甘孟候). Avian Influenza (禽流感) [M]. Beijing: Chinese Agriculture Press 2004.
- [2] Zhao J R, Bai Y J, Zhang Q H, *et al.* Detection of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using TaqMan-MGB probe technology [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(4): 508-510.
- [3] Yang A M, Chen F Y, Zhao X X (杨爱梅, 陈福勇, 赵西星). Molecular Cloning and Sequencing of HA Gene of Avian Influenza Virus [J]. Chin J Pre Veter Med (中国预防兽医学报), 2001, 23(2): 91-94.
- [4] Li W, Hai R, Yu D Z, (李伟, 海荣, 俞东征) *et al.* Establishment and application of real-time fluorescence polymerase chain reaction based on the TaqMan probes for detection of *Yersinia pestis* [J]. Chin Infect Epidemiol (中华流行病学杂志), 2005, 26 (8): 613-616.
- [5] Lew A E, Bock R E, Molloy J B, *et al.* Sensitive and specific detection of proviral bovine leukemia virus by 5' Taq nuclease PCR using a 3' minor groove binder fluorogenic probe [J]. J Virol Methods, 2004, 115(2): 167-175.
- [6] Emery S L, Erdman D D, Bowen M D, *et al.* Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus [J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10(2): 311-316.
- [7] Van Eladen L J R, Nijhuis M, Schipper P, *et al.* Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39 (1): 196-200.
- [8] Spackman E, Senne D A, Myers T J, *et al.* Development of a Real-time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40 (9): 3256-326.