论著

文章编号:1000-5404(2010)03-0246-04

建立禽流感 H7 和 H9 亚型荧光定量 PCR 检测方法

王秋泉[1,2],黄 平[1],胡守旺[2],高秀洁[2],杨杏芬[1],李 杰[2] (510300 广州,广东省疾病预防控制中心应急病原学检测重点实验室[1];510665 广州,中山大学达安基因股份有限公司[2])

[摘要] **目的** 建立高致病性禽流感 H7 和 H9 亚型荧光定量 PCR 方法。**方法** 根据禽流感病毒(avian influenza virus,AIV)HA-H7 基因和 HA-H9 基因分别设计特异 AIV H7 和 H9 亚型特异荧光定量 PCR 引物和探针,优化反应体系和反应条件,分析该试剂的敏感性、特异性、重复性等。**结果** 经优化反应体系和反应条件后,AIV H7 试剂和 AIV H9 试剂的敏感性达到 $1\times10^{4.67}$ EID_{50} 和 $1\times10^{3.80}$ EID_{50} 水平,特异性与细胞培养敏感性类似;批内和批间精密度 Ct 值的 *CV* 值均远小于 10%,可重复性良好。**结论** 本项目研制的 AIV H7 和 H9 亚型的敏感性、特异性、重复性均好,适合在禽流感 H7 和 H9 亚型疫情和人类疑似禽流感病例中检测使用。

[关键词] 流感病毒 A 型;基因,病毒;聚合酶链反应;H7;H9;荧光定量 PCR

[中图法分类号] R373.13; R394-33; R446.5 **[文献标志码]** A

Establishment of fluorescence quantitative PCR method for detection of avian influenza virus subtypes H7 and H9

Wang Qiuquan[1,2], Huang Ping[1], Hu Shouwang[2], Gao Xiujie[2], Yang Xingfen[1], Li Jie[2] ([1]Key Laboratory for Emergency Pathogen Detection, Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong Province, 510300; [2]Daan Gene Co. Ltd, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong Province, 510665, China)

[Abstract] **Objective** To establish the fluorescence quantitative PCR method for detection of avian influenza virus (AIV) subtypes H7 and H9. **Methods** Primers and probe of fluorescence quantitative PCR were designed for AIV subtypes H7 and H9, respectively, according to the AIV HA H7 and H9 genes. The reaction system and conditions were optimized. Sensitivity, specificity and reproducibility of the system were analyzed. **Results** After optimization of the reaction system and its conditions, the sensitivity of H7 and H9 assay reached 1 $10^{4.67}$ EID_{50} and 1 $10^{3.80}$ EID_{50} respectively, and their specificity was similar to that of cell culture. The CV values of CT in intra-and inter-batch were far less than 10%, showing that their reproducibility was excellent. **Conclusion** The sensitivity, specificity and reproducibility of AIV subtypes H7 and H9 are rather good. AIV subtypes H7 and H9 can be used in detection of avian epidemic in suspected avian H7 and H9-infected human cases.

[Key words] FQ-PCR; real-time PCR; avian influenza virus; H7 subtype; H9 subtype

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972757) and the Sci & Tech Project of Guangdong Province (2004A2090102). Corresponding author: Huang Ping, Tel: 86-20-84181540, E-mail: pphuang1@163.com

禽流感(avian influenza,AI)是由正粘病毒科流感病毒属的 A 型流感病毒引起的一种禽类或人类感染的传染病,其中 H7 亚型于 1927 年在德国 FPV 中首次发现(H7N7),H9 亚型于 1966 年在美国威斯康星在火鸡中首次发现(H9N0)[1];广东地区于 1998 - 1999 年出现人感染禽流感 H9N2 亚型的事件,曾感染 10 例病例,涉及 3 个市。同时在鸡群中也分离到 H9N2 亚型毒株[2]。针对禽流感 H7N2、H7N7 和 H9N2 亚型给人们健康和兽牧业生产造成的巨大影响和损失,如何快速、准确地检测禽流感病毒已成为目前国内关注的焦点。

传统的禽流感病毒(avian influenza virus,AIV)检测方法采用分离培养方法,如鸡胚或细胞分离培养法,

[基金项目] 国家自然科学基金(30972757);广东省科技项目(2004A2090102)

[通信作者] 黄 平,电话:(020)84181540,E-mail: pphuang1@163.com

其结果具有准确、敏感、可重复的优点,但费时,不利于AIV的快速诊断。近20年兴起的PCR方法为一种快速分子生物学基因诊断技术,与传统的病毒分离培养方法相比具有更好的敏感性和特异性。但由于实验员操作、实验室污染等方面的原因,这些方法存在一定的假阳性。随着分子生物学的深入探索,实时荧光定量PCR技术(real-time fluorescent quantitative PCR, FQ-PCR)得到了应用和发展。由于实时荧光定量PCR技术采取操作一步法,在封闭的体系内完成,明显减少了假阳性发生,具有灵敏度高、特异性强、准确快速的特点[3]。我们在设计禽流感通用和H5亚型实时荧光定量PCR方法的同时[4,5],设计禽流感H7和H9亚型实时荧光定量PCR方法,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株 AIV H1-H15亚型病毒(各1株),H5、H7、H9亚型禽流感病毒(各12株、1株、12株);鸡新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)、传染性法氏囊病病毒(infectious bursal disease virus, BDV)、传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)、鸭肠炎病毒(duck enteritis virus, DEV)、鸡贫血病毒(chicken anaemia virus, CAV)、鹅瘟病毒(goose plague virus, GPV)6种禽病病原(各1株)进行检测;病毒培养法鉴定AIV H5亚型阴性标本(80份),包括咽喉拭子、泄殖腔拭子和脏器标本。标本由哈尔滨兽医研究所和广东省疾病预防控制中心提供。

1.1.2 试剂和仪器 5×RT-PCR buffer、RNA提取液A、溶液B、阴性质控品、H7和H9阳性质控品由本公司检验中心配制,mMLV反转录酶、dNTPs、RNAsin抑制剂、于Promega公司,*Taq*酶购于MBI公司,总RNA提取试剂Trizol购于美国Gbico公司,Glycerol、DEPC购于美国Sigma公司。检测用ABI 7300荧光定量PCR仪,探针引物设计软件由美国ABI公司提供,低温冷冻离心机购于美国Sigma公司,凝胶分析系统购于英国UVP公司。

1.1.3 引物和探针 根据GenBank和LANL的禽流感核苷酸序列,选择HA基因保守序列区作为扩增区域,利用ABI Primer Express软件分别在H7基因设计1对甲型流感通用引物和1个荧光探针、在H9基因设计1对甲型流感通用引物和1个荧光探针,由上海Invitrogen公司合成。HA-H7引物包括AIV-H7-F(5′-ATACAGATAGACCCAGTGAAATTG-3′, 1 504~1 527 nt)和AIV-H7-R(5′-ATACAAATAGTGCACTGCATGTT-3′, 1 633~1 655 nt),扩增片段为152 bp,探针包括AIV-H7-P(5′-FAM-TGGTTTAGCTTCGGGGCATCAT-TAMRA-3, 1 555~1 576 nt);HA-H9引物包括AIV-H9-F(5′-GATAAAATTTGCATTGGATAC-CA-3′,88~110 nt),和AIV-H9-R(5′-GTCCCAGATTTGTTGCA-CATA-3′,209~229 nt),扩增片段为142 bp,探针包括AIV-H9-P(5′-FAM-AACAATGTTCCTGTGACACATGCCA-TAMRA-3′,151~175 nt)。

1.2 方法

1.2.1 RNA的提取 取灭活的样本0.2 ml加入Trizol 0.4 ml,充分振荡混匀15 s,室温静置3 min;加入0.2 ml氯仿,充分混匀;2 000 r/min离心4 min;将上清的移至另一1.5 ml离心管,加入10 μl RNA提取液A(混匀),混匀后8 000 r/min离心1 min,弃去所有液体;加入溶液B 800 μl,混匀后8 000 r/min离心1 min,弃去所有液体;敞开管盖,通风风干15 min;然后加入30 μl DEPC H_2O,白色的悬浊液可直接用于检测,或存于-70 ℃备用。

1.2.2 加样与扩增 取N个(N=阴性质控品+待测样本数+阳性质控品)PCR反应管,每管分别加入RT-PCR反应液15 μl、逆转录酶系2 μl、*Taq*酶系3 μl;于上述PCR反应管中分别加入处理后的阴性质控品、待测样本混浊液(吸打混匀后吸取)、阳性质控品5 μl,水平离心机3 000 r/min离心30 s,放入PCR扩增仪。扩增设置循环条件:40 ℃ 25 min,1个循环;94 ℃ 3 min,1个循环;93 ℃ 15 s→55 ℃ 45 s(收集荧光),40个循环。设置完成后,保存文件,运行程序。

1.2.3 反应体系建立及反应条件的优化 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,调整不同退火温度(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循环阈值(Ct值)和最高荧光强度增加值(△Rn)为标准进行选择与优化。

1.2.4 敏感性、特异性和重复性 ①敏感性:AIV H7亚型和H9亚型病毒株培养原液浓度为$1\times10^{9.67}$ EID_{50},按照10倍梯度依次稀释8个梯度,以稀释后的10^{-1}~10^{-8}8个稀释度作为待测样本,并设盲;同时设3个平行管检测,浓度最低且检测均为阳性的稀释度样本,则判定该浓度为该试剂盒的检测灵敏度或最低检出限量。②特异性:分别用AIV H7试剂和AIV H9检测试剂检测H1-H15亚型禽流感病毒,检测其他鸡禽病毒(NDV、IBDV、IBV、DEV、CAV、GPV),并检测用病毒培养法AIV H5亚型阴性标本(80份),包括咽喉拭子、泄殖腔拭子和脏器标本。③重复性:以1.0×10^{8}拷贝/ml、1.0×10^{6}拷贝/ml、1.0×10^{4}拷贝/ml 3个不同浓度的阳性对照品作为待检样本,各做8个重复管,分别用3批质检合格的禽流感病毒H7和H9亚型核酸扩增荧光检测试剂盒进行检测,操作严格按试剂盒说明书进行,在同台ABI 7500实时PCR系统上检测,计算CT值的变异系数(*CV*值),考察试剂盒的批内和批间精密度即可重复性(判断标准:*CV*值 < 10%)。

1.2.5 保存期和评估 ①保存期:取质检合格的AIV H7试剂和AIV H9检测试剂(批号分别为A、B、C),置于(-20±5)℃冰箱中,分别于第0、3、6、7、8、9、10、11个月每批取出2个试剂盒,以对照品为待检样本。②评估:比较本项目AIV H7试剂和AIV H9试剂检测与病毒培养法检测结果的一致性,并评价;采用农业部批准销售的某公司的禽流感病毒H7和H9亚型荧光RT-PCR检测试剂盒(以下简称P试剂盒)作为对照检

测试剂,盲测,与本研制的检测试剂盒同时进行比较。

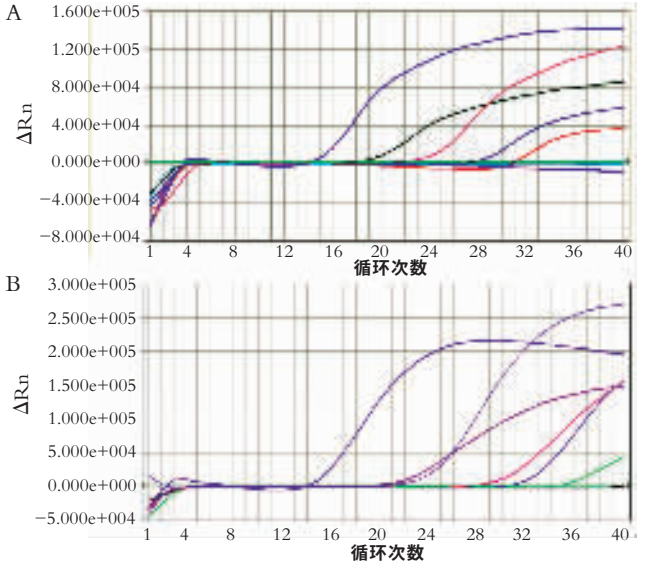
2 结果

2.1 反应体系的建立和反应条件的优化

为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Tm值在45~65 ℃进行选择,优化后AIV H7和AIV-H9试剂反应体系为:引物上下游各10 pmol、探针5 pmol、*Taq*酶5 U/25 μl、逆转录酶100 U/25 μl、Rnasin抑制剂20 U/25 μl;优化后反应条件为:样本用量200 μl,第一阶段反应参数:40 ℃ 25 min,第二阶段反应参数:94 ℃ 3 min、93 ℃ 15 s、55 ℃ 45 s,40个循环。

2.2 敏感性

AIV H7试剂检测1份参考H7毒株、1份H7分离毒株、3份H7阳性标本,重复3次,结果均为阳性,如图1A所示;采用AIV-H7试剂,对1份参考H7毒株的8个稀释度的样本(原液浓度为$1\times10^{9.67}$ EID_{50}),检测敏感度或最低检出限为$1\times10^{4.67}$ EID_{50}。AIV H9试剂检测1份参考H9毒株、1份H9分离毒株、4份H9阳性标本,重复3次,结果均为阳性,如图1B所示;采用AIV-H9试剂,对1份参考H9毒株的8个稀释度的样本(原液浓度为$1\times10^{9.80}$ EID_{50}),检测敏感度或最低检出限为$1\times10^{3.80}$ EID_{50}。

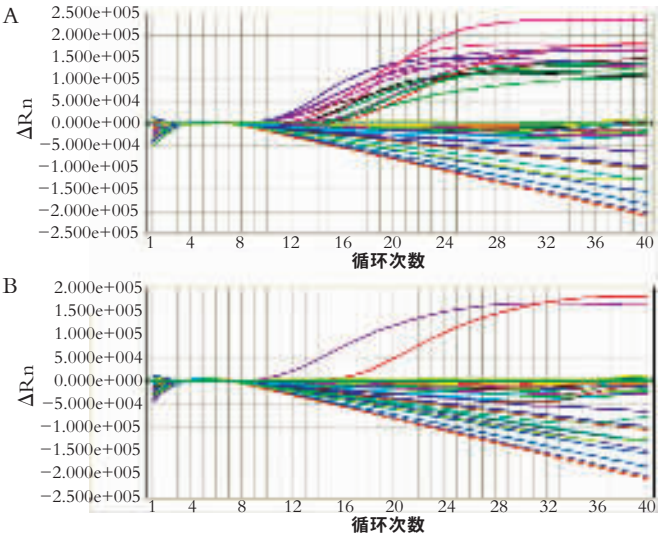


A: AIV H7; B: AIV H9

图1 AIV H7和AIV H9试剂检测敏感性实验结果

2.3 特异性

AIV H7试剂检测结果表明,2份AIV-H7病毒株检测全为阳性,其余38份各亚型的AIV病毒株检测全部为阴性,而NDV、IBDV、IBV、DEV、CAV、GPV及空白对照均为阴性;结果如图2A所示。AIV-H9检测试剂盒结果表明:13份AIV-H9病毒株检测全为阳性,其余27份各亚型的AIV病毒株检测则全部为阴性,而且NDV、IBDV、IBV、DEV、CAV、GPV及空白对照也均为阴性;结果如图2B所示。

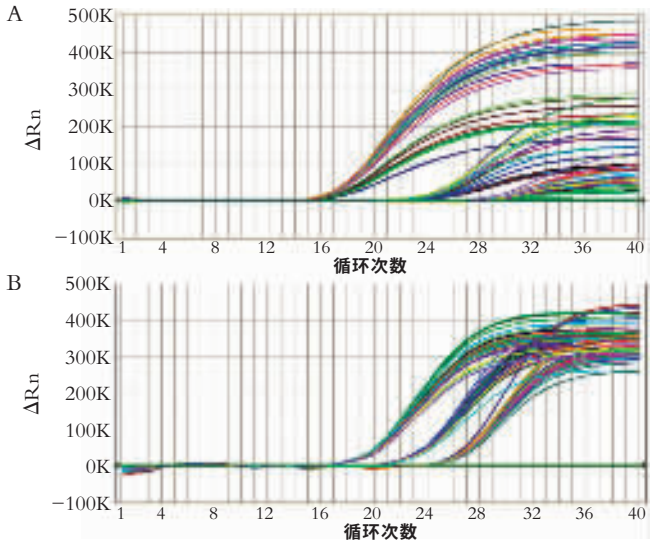


A: AIV H7; B: AIV H9

图2 AIV H7和AIV H9试剂检测特异性实验结果

2.4 重复性

进行批内和批间(A、B、C)精密度评价,用变异系数考查试剂盒的精密度;精密度以Ct值的变异系数*CV*值来计。AIV H7试剂检测结果表明,批内和批间重复性均较好,批内精密度Ct值的*CV*值在1.3%~3.6%,批间精密度Ct值的*CV*值在2.2%~3.3%(批号2007001、2007002、2007003);结果如图3A所示。AIV H9试剂检测结果表明,批内和批间重复性也均较好,批内精密度Ct值的*CV*值在0.25%~4.3%,批间精密度Ct值的*CV*值在0.4%~3.6%(批号2007001、2007002、2007003)。结果如图3B所示。



A: AIV H7; B: AIV H9

图3 AIV H7和AIV H9试剂精密度检测(批内和批间)

2.5 保存期

AIV H7和H9亚型试剂分别在(−20±5)℃保存条件下保存期的检测数据分析,结果表明:本试剂盒在(−20±5)℃条件

下保存 11 个月后各项质量指标均符合要求,因此可以初步确定本试剂盒在(-20±5)℃下至少可以稳定保存 9 个月。

2.6 评估比较

AIV H7 试剂检测 46 份样本,其中包括 2 份 H7 毒株、38 份禽流感其他型别禽流感毒株和 6 份其他禽病毒株;结果表明,2 份 H7 毒株为阳性,其余 44 份其他毒株均为阴性,与病毒培养法的阴阳性检测结果一致,符合率 100%。AIV H9 试剂检测 46 份样本,其中包括 13 份 H9 毒株、27 份禽流感其他型别禽流感毒株和 6 份其他禽病毒株;结果表明,13 份 H9 毒株为阳性,其余 33 份其他毒株均为阴性,与病毒培养法的阴阳性检测结果一致,符合率 100%。

采用农业部批准销售的深圳某公司(以下简称 P 公司)的禽流感病毒 H7 亚型荧光 RT-PCR 检测试剂盒作为对照检测试剂,与本研制的 AIV H7 试剂同时进行比较。检测 46 份样品(2 份阳性,44 份阴性),分别采用本试剂和 P 试剂盲测,结果显示一致,符合率 100%。采用 P 公司 AIV H9 试剂进行比较,检测 46 份样品(13 份阳性,33 份阴性),分别采用本试剂和 P 试剂盲测,结果显示一致,符合率 100%。在敏感性方面,AIV H7 试剂达到 $1\times10^{4.67}$ EID_{50},P 公司同类试剂达到 $1\times10^{5.67}$ EID_{50};AIV H9 试剂敏感性达到 $1\times10^{3.80}$ EID_{50},P 公司同类试剂达到 $1\times10^{4.80}$ EID_{50}。

3 讨论

国内有禽流感 H5 亚型禽流感病毒荧光 PCR 检测方法的报道[4-6],国外也有过通用型 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒荧光 PCR 检测方法的报道[7]。FQ-PCR 利用荧光信号的积累实时监测整个 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。本研究采用 TagMan 探针,即 5′端标记荧光报告基团 FAM 和 3′端标记淬灭基团 TAMRA,具有准确、特异、敏感、可重复的优点。

本研究根据 GenBank 和 LANL 禽流感序列,针对 AIV 的 H7 和 H9 基因分别设计 1 对特异性引物和 1 个荧光探针作为禽流感 H7 和 H9 检测试剂。在引物和探针设计方面,既考虑到引物序列稳定性,又要考虑特异度与敏感度;同时要对引物的最佳浓度、探针浓度、Tm 值进行筛选和优化。一般逆转录酶在 40 ℃时活力最强;94 ℃加热使逆转录酶失活,并使 RNA-cDNA 杂合物变性,使 RT-PCR 的扩增阶段能更有效地合成产物;采用双温度循环,是为了使荧光探针在 DNA 链延伸阶段,仍然稳定结合在 DNA 模板上,直至被酶切断、分离。*Taq* 酶在 55 ℃仍能保持足够高的扩增效率。实际检测显示,选用上述反应条件进行能够很好地扩增病毒核酸,达到较好的敏感性、特异性、可重复性的实验要求。

在敏感性方面,本 H7 和 H9 试剂盒优于农业部指定使用的检测 AIV-H7 和 AIV-H9 P 试剂盒,敏感度均高出 P 试剂盒 1 个数量级;本两套试剂的各自特异性均很强,而如果今后临床和应急中同份标本分别采用通用、H5、H7、H9 试剂特异性检测,可以防止假阴性,提高了检测的敏感性和特异性。AIV H7 和 AIV-H9 检测试剂批内和批间重复性均较好,批内和批间精密度 Ct 值的 *CV* 值均小于 10%,符合试剂盒规定的 Ct 值的 *CV* 值要求。然而,由于禽流感 H7 和 H9 亚型病毒 HA 基因变异频繁,本试剂盒仅适用于已检毒株和标本,是否适合于全球毒株及未来出现毒株还有待于今后的检验。

本实验结果显示,AIV H7 和 AIV-H9 试剂分别在(-20±5)℃条件下 11 个月,我们建议保存 9 个月为佳。根据对禽流感、疑似禽流感系列标本的检测结果,显示本试剂盒的敏感性、特异性、重复性均良好,适合在各级疾控、兽医以及科研机构的禽流感疫情和严重呼吸道感染病例(怀疑禽流感病例)中检测使用。

志谢 感谢哈尔滨兽医研究所李雁冰、曾显营研究员及广东省疾病预防控制中心张永慧主任医师、柯昌文主任技师等对本研究的支持

参考文献:

[1] 黄平,邓峰. 流感[M]. 广州:广东科技出版社, 2004: 20-62.
[2] Huang P, Ni H Z, Shen G Z, *et al*. Analysis of the 1991-2000 influenza epidemic in Guangdong Province, China [J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2001, 32(4): 787-790.
[3] 袁媛,陈强,陈思祇,等. 实时荧光定量 PCR 技术及其在生命科学领域中的应用(一)[J]. 海峡预防医学杂志, 2006, 12(4): 18-20.
[4] 黄平,胡守旺,王秋泉,等. 高致病性禽流感通用和 H5 亚型荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(23): 2869-2872.
[5] 黄平,俞守义,柯昌文,等. 人禽流感 H_5N_1 毒株 PB1 基因突变分析[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(22): 2168-2170.
[6] 侯小强,高玉伟,夏咸柱,等. 荧光定量 RT-PCR 方法检测感染小鼠不同组织中的 H5N1 禽流感病毒[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(9): 820-823.
[7] Monne I, Ormelli S, Salviato A, *et al*. Development and validation of a one-step real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7, and H9 avian influenza viruses[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(5): 1769-1773.

(**收稿**:2009-08-29;**修回**:2009-10-14)
(编辑 吴培红)