DOI:10.16016/j.1000-5404.201602049

扎伊尔型埃博拉病毒型特异性标签序列鉴定及其荧光定量 PCR 检测

李 泽[1],王松建[2],杨 涛[3],李 旭[4],郭衍志[1],但芸婕[1],徐宝艳[1],邓国宏[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军感染病研究所,感染病研究重庆市重点实验室[1];400030 重庆,重庆大学计算机学院[2];402560 重庆 铜梁,解放军 77128 部队[3];100080 北京,中国科学院计算技术研究所[4])

[摘要] **目的** 建立一种快速准确检测扎伊尔型埃博拉病毒(Zaire ebola virus,ZEBOV)的方法。**方法** 以 2014 年西非新分离的 3 株 ZEBOV 全基因组参考序列及 1976 年从 Mayinga 分离的 ZEBOV 株(NC_002549)为目标,基于 Insignia 系统算法与 GenBank 中 Nt 库比对,求出 ZEBOV 特异性核酸标签序列。设计引物、*Taq*Man 探针和优化反应条件,以 10 倍系列稀释的阳性质粒做标准曲线,做准确性、重复性实验。并以其余 4 个亚型的埃博拉病毒、马尔堡病毒、西尼罗河热病毒、东方马脑炎病毒、西方马脑炎病毒等 8 种病毒对照及临床 48 例患者复杂样本为对照做特异性检测。**结果** 选择比对得到的特异性标签序列(KJ660348,11331 - 11514)设计探针引物,标准曲线相关系数 > 0.99,灵敏度可达 5×10^1 拷贝。准确性重复性实验结果批内变异系数(*CV*)为 0.88% ~2.50%、批间 *CV* 为 1.75% ~3.31%。8 种病毒及临床 48 例患者复杂样本对照均为阴性。**结论** ZEBOV 核酸标签(KJ660348,11331 - 11514)在非编码区,在此基础上建立的荧光定量 PCR 方法可特异性检测 ZEBOV,且灵敏、重复性好。

[关键词] 扎伊尔型,埃博拉病毒;荧光定量 PCR;标签序列;鉴定

[中图法分类号] R373.9; R394.3; R446.9 [文献标志码] A

Identification of Zaire ebola virus specific signature sequence and its fluorescence quantitative PCR detection

Li Ze[1], Wang Songjian[2], Yang Tao[3], Li Xu[4], Guo Yanzhi[1], Dan Yunjie[1], Xu Baoyan[1], Deng Guohong[1] ([1]Institute of Infectious Diseases, Chongqing Key Laboratory of Infections Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]College of Computer, Chongqing University, Chongqing, 400030; [3]No. 77128 Troop of PLA, Tongliang, Chongqing, 402560; [4]Institute of Computing Technology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a rapid and accurate method to detect Zaire ebola virus (ZEBOV). **Methods** According to the 3 new strains of ZEBOV genome-wide reference sequences separated from West Africa in 2014 and the Zaire ebola virus strain isolated from Mayinga (NC_002549) in 1976, specific sequence signature of ZEBOV was calculated out based on Insignia system algorithm comparison with GenBank Nt library. Primers and *Taq*Man probe were designed, and the reaction conditions were optimized. Ten-fold series dilution positive plasmid were used as the standard samples to do amplification plots and standard curve. Also the repeatability and accuracy of the method were tested. The rest of the 4 types of ebola virus, marburg virus, west Nile virus, eastern equine encephalitis virus, and Western equine encephalitis virus, and the 48 clinical comparison samples were employed to contrast for specificity test. **Results** The specific sequence (KJ660348, 11331 - 11514) design probe and primers were designed. Standard curve's correlation coefficient was greater than 0.99 and the sensitivity was up to 5×10^1 copies. Repeatability and accuracy test's results showed that the coefficient of variation (*CV*) of the intra assay reproducibility was 0.88% to 2.50%, and the *CV* of the inter assay reproducibility was 1.75% to 3.31%. Eight strains of

[基金项目] 全军后勤科研"十二五"计划重大项目(AWS11C001);西南医院军事医学预研专项资助课题(SWH2013JS03)

[通信作者] 邓国宏,电话:(023)68765218, E-mail: gh_deng@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160407.0836.014.html(2016-04-07)

viruses and 19 clinical comparison samples were all negative. **Conclusion** The specific sequence signature of Zaire ebola virus in the non-coding regions (KJ660348, 11331 - 11514), was verified to be specific. Our established fluorescence quantitative PCR is a rapid, sensitive and reproducible method for ZEBOV detection.

[**Key words**] Zaire, ebola virus; fluorescence quantitative PCR; signiture sequence; identification

Supported by the Major Project of "Twelfth Five-year Plan" of Logistic Scientific Research of PLA (AWS11C001) and the Special Project of Military Pre-research of Southwest Hospital (SWH2013JS03). Corresponding author: Deng Guohong, E-mail: gh_deng@hotmail.com

埃博拉病毒病是由埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)感染引起的一种烈性传染病,主要以人和非人类灵长类动物易感,致死率高达25% ~90%[1-3]。临床以发热及出血为主要特征,表现为急性起病、发热、肌痛、出血、皮疹和以肝、肾为代表的多器官损伤[4]。EBOV属于丝状病毒科(Filoviridae)埃博拉病毒属(Ebolavirus),有囊膜,为不分节段单链负股RNA。EBOV基因组长约19 kb,含有7个基因,其排列顺序为3′-NP-VP35-VP40-GP/sGP-VP30-VP24-L-5′。EBOV可分为5个亚型:扎伊尔埃博拉病毒(*Zaire*-EBOV)、苏丹埃博拉病毒(*Sudan*-EBOV)、本迪布焦埃博拉病毒(*Bundibugyo*-EBOV)、塔伊森林埃博拉病毒(*Tai Forest*-EBOV)和雷斯顿埃博拉病毒(*Reston*-EBOV)[5]。其中ZEBOV、SEBOV和BEBOV对人具有致命性,又以ZEBOV致死率最高[2]。EBOV实验室确诊手段常用的方法有病毒分离培养,但存在盲目性且操作复杂敏感度不高;IgG-捕获ELISA和IgM-捕获ELISA[6-7],但临床存在窗口期,不能在发病早期快速检出EBOV;荧光定量PCR具有快速、敏感、定量的特点,但之前针对EBOV的荧光定量PCR检测方法,大都针对ZEBOV和苏丹型EBOV糖蛋白设计通用探针引物[8-9],无法区分型特异性。因此,本研究通过比对运算求得ZEBOV型特异性核酸序列,设计引物探针建立了敏感、特异的ZEBOV荧光定量PCR检测方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

荧光定量PCR仪(Rotor-Gene Q,德国QIAGEN公司);荧光定量PCR试剂购自宝生物(大连)工程有限公司(TaKaRa One Step PrimeScript RT-PCR Kit);样本核酸提取试剂购自德国QIAGEN公司(QIAamp Viral RNA Mini Kit)。

1.2 阳性模板合成

从参考序列[10]中截出特异性核酸序列(KJ660348, 11331 - 11514)请英潍捷基(上海)有限公司合成目标片段,构建质粒作为阳性模板。

1.3 引物与探针的设计、合成

通过GenBank数据库,下载2014年从西非患者分离的3株ZEBOV株(KJ660348、KJ660347、KJ660346)[10]及1976年从Mayinga分离的ZEBOV株(NC_002549),并以此为目标,依托中国科学院计算技术研究所的Lambda-ICT系统,运用MUMmer软件进行匹配,再以匹配上的序列区段为基础,基于Insignia算法"同种求交"、"异种求并",得到标签核酸序列,最后再通过BLAST与Nt库比较,筛选出最终的特异核酸标签[11]。从中选出一条序列(KJ660348,11331 - 11514,非编码区)交由英潍捷基(上海)有限公司设计合成*Taq*Man探针、引物,探针的5′端用荧光基团VIC标记,3′端用淬灭基团TAMRA标记(表1)。

1.4 标准曲线的制备

由英潍公司提取交付的阳性质粒浓度为102.6 ng/μL,根据合成序列的A、T、G、C含量计算出其摩尔质量,乘以阿伏伽德罗常数6.02×10^{23}得到病毒拷贝数,再用DEPC水作10倍系列稀释[12],得5×10^{7}、5×10^{6}、5×10^{5}、5×10^{4}、5×10^{3}、5×10^{2}、5×10^{1}拷贝/μL系列标准模板,采用优化好的条件进行扩增标准模板,得到各自的Ct值。以Ct值为纵坐标,起始模板浓度的对数为横坐标,制作扩增曲线和标准曲线。

1.5 准确性和重复性实验

取5×10^{6}、5×10^{5}、5×10^{4}拷贝/μL 3个批次的质粒标准品,同一批次下每个样本作3次重复,再在同一反应条件下做3次重复实验,计算Ct值批内、批间变异系数(*CV*)。

表1 荧光定量PCR引物和探针序列

引物和探针	序列(5′→3′)	长度(bp)	GC(%)	Tm值(℃)
正向引物	CTTCCTCAAGCTTTTTTCTTAACCTACT	28	36	58.4
反向引物	TCACTAGAAATCCAATATACGAAATGGT	28	32	58.5
ZEBOV探针	VIC-TGAAACCTAACACACATGACCTGCGGG-TAMARA	27	52	69.2

1.6 特异性检测

在相同条件下,以上海生工合成的本迪布焦EBOV、科特迪瓦EBOV、莱斯顿EBOV、苏丹EBOV、马尔堡病毒、西尼罗河热病毒、东方马脑炎病毒、西方马脑炎病毒相应区段非编码基因作对照,并随机选择本院感染科、呼吸科、血液科、普外科等科室19例住院患者的痰液或粪便复杂样本RNA、重庆市公共卫生中心住院患者10例痰涂阳性痰液样本DNA、大学城19例不明原因发热患者咽拭子样本RNA作为阴性对照。

2 结果

2.1 引物与探针浓度优化和扩增反应条件

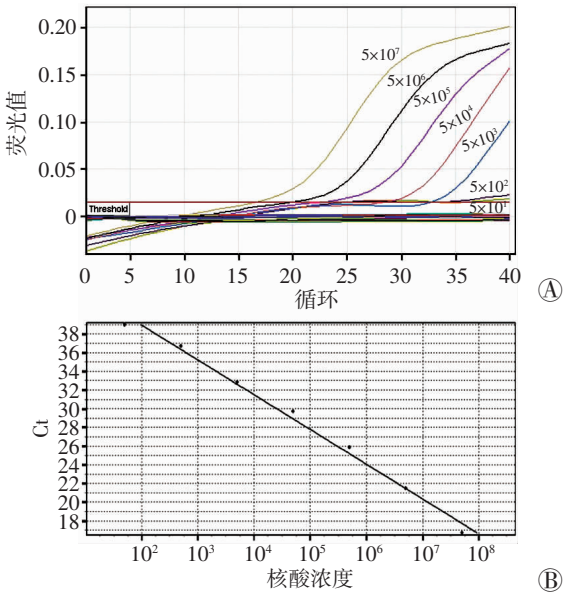
用5×10^7、5×10^6拷贝/μL阳性质粒模板,优选引物与探针的最佳浓度。结果表明,用0.2 μm/μL的引物和0.4 μm/μL的探针对阳性质粒检测所获结果最优。优化的荧光定量PCR循环条件为:42 ℃ 5 min;95 ℃ 10 s;95 ℃ 5 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40个循环。

2.2 标准曲线的建立及荧光定量PCR灵敏性

10倍系列稀释阳性模板质粒进行扩增,建立扩增曲线及标准曲线,标准品范围选5×10^7、5×10^6、5×10^5、5×10^4、5×10^3、5×10^2、5×10^1拷贝/μL。结果显示,阳性模板质粒拷贝数与相应Ct值相关系数$R^2>0.99$,该方法的灵敏性达到5×10^1拷贝(图1)。

2.3 荧光定量PCR的准确性和重复性

批内重复实验:取5×10^6、5×10^5、5×10^4拷贝/μL 3个批次的标准样品,每份样品做3个重复。批间重复实验:对上述3个批次标准样品,在同一反应条件下进行3次独立的荧光定量PCR检测。根据Ct算术平均值计算*CV*,批内*CV*为0.88%~2.50%,批间*CV*为1.75%~3.31%。见表2。



A:扩增曲线;B:标准曲线

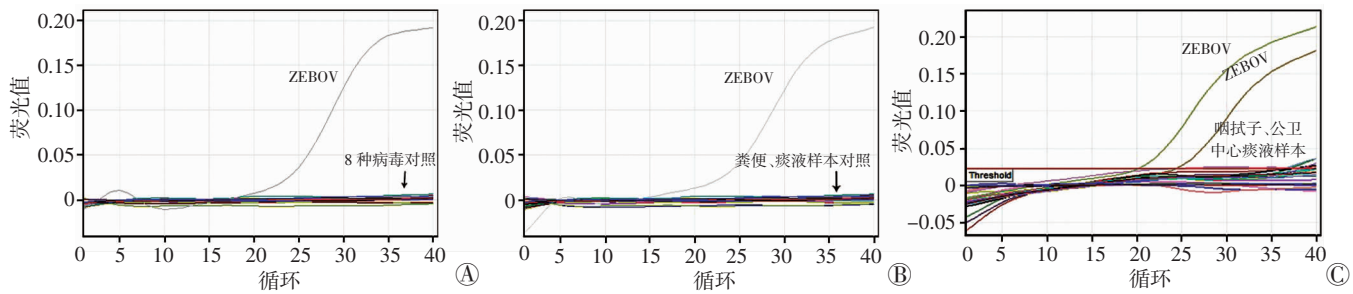
图1 ZEBOV阳性质粒扩增曲线与标准曲线

2.4 荧光定量PCR的特异性

以合成的本迪布焦EBOV、科特迪瓦EBOV、莱斯顿EBOV、苏丹EBOV、马尔堡病毒、西尼罗河热病毒、东方马脑炎病毒、西方马脑炎病毒相应非编码区段重组质粒,及临床48例标本进行荧光定量PCR检测。以浓度为5×10^7、5×10^6拷贝/μL的质粒为阳性对照,再设阴性对照。结果见图2,除ZEBOV阳性质粒有荧光响应起跳外,其余均无荧光起跳为阴性。

表2 批内与批间重复性实验

样本	批内重复实验					批间重复实验				
	Ct值				*CV*(%)	Ct值				*CV*(%)
	1	2	3	$\bar{x}\pm s$		1	2	3	$\bar{x}\pm s$	
5×10^6	21.84	21.94	20.96	21.58±0.54	2.50	21.45	21.79	21.00	21.41±0.40	1.85
5×10^5	26.69	26.75	26.26	26.57±0.27	1.01	25.85	25.88	24.41	25.38±0.84	3.31
5×10^4	30.05	29.55	29.66	29.75±0.26	0.88	30.27	30.79	29.73	30.26±0.53	1.75



A:8种相似病毒对照;B:粪便、痰液RNA检测对照;C:痰液DNA、咽拭子RNA检测对照

图2 8种相似病毒及48例临床样本对照特异性扩增曲线

3 讨论

以往的EBOV核酸检测,大多针对保守糖蛋白或核蛋白作为靶向目标设计探针引物,且方法多为在GenBank上下载多条序列,进而设计通用引物和探针[13-15]。而本研究通过以2014年从西非患者分离的3株ZEBOV株及1976年从Mayinga分离的ZEBOV株全序列为目标,依托中国科学院计算技术研究所超级计算平台,运用相应软件采用同种求交异种求并的方法,得到特异性标签核酸序列[11]。最后选出一条非编码区序列设计成探针引物进行验证,探求一条创新路径。本研究对阳性质粒7个稀释度样品进行扩增,结果显示,起始浓度与Ct值之间具有良好的线性关系,标准曲线相关系数>0.99,表明阳性样品稀释准确且体系稳定高效。特异性检测中,48份临床标本及合成的8种病毒相关序列,仅阳性质粒样品为阳性,表明该探针特异性好。且本方法检测下限达到5×10^1拷贝,具有良好的灵敏性。

综上,本研究采用Insignia算法比对出核酸标签序列特异性强,设计*Taq*Man探针和引物建立的荧光定量PCR方法,灵敏度高、稳定性好,为ZEBOV的快速定性诊断提供了一种新方法,为EBOV病快速临床分子诊断研究提供了一种新的核酸探针区段选择思路。

参考文献:

[1] 刘阳, 马志永, 史子学, 等. 埃博拉出血热[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(11): 1028-1030. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2011.11.019

[2] Wamala J F, Lukwago L, Malimbo M, *et al*. Ebola hemorrhagic fever associated with novel virus strain, Uganda, 2007-2008[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(7): 1087-1092. DOI: 10.3201/eid1607.091525

[3] Diamond M S, Fremont D H. Ebola images emerge from the cave[J]. Cell Host Microbe, 2008, 4(2): 87-89. DOI: 10.1016/j.chom.2008.07.011

[4] Bente D, Gren J, Strong J E, *et al*. Disease modeling for Ebola and Marburg viruses[J]. Dis Model Mech, 2009, 2(1/2): 12-17. DOI: 10.1242/dmm.000471

[5] 饶贤才. 埃博拉病毒病之病原学[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(4): 282-286. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201501182

[6] Ksiazek T G, West C P, Rollin P E, *et al*. ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses[J]. J Infect Dis, 1999, 179(Suppl 1): S192-S198.

[7] Geisbert T W, Bausch D G, Feldmann H. Prospects for immunisation against Marburg and Ebola viruses[J]. Rev Med Virol, 2010, 20(6): 344-357. DOI: 10.1002/rmv.661

[8] 盖微微, 郑学星, 薛向红, 等. 埃博拉病毒检测与分型Real-time PCR方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(3): 208-211, 216. DOI: 10.13350/j.cjpb.2013.03.001

[9] 刘阳, 史子学, 王水明, 等. 一步法MGB荧光定量RT-PCR检测埃博拉扎伊尔亚型和苏丹亚型方法的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(4): 343-346, 350. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2012.04.008

[10] Baize S, Pannetier D, Oestereich L, *et al*. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea[J]. N Engl J Med, 2014, 371(15): 1418-1425. DOI: 10.1056/NEJMoa1404505

[11] Phillippy A M, Mason J A, Ayanbule K, *et al*. Comprehensive DNA signature discovery and validation[J]. PLoS Comput Biol, 2007, 3(5): e98.

[12] Kleines M, Schellenberg K, Ritter K. Efficient extraction of viral DNA and viral RNA by the Chemagic viral DNA/RNA kit allows sensitive detection of cytomegalovirus, hepatitis B virus, and hepatitis G virus by PCR[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(11): 5273-52741.

[13] Leroy E M, Baize S, Lu C Y, *et al*. Diagnosis of Ebola haemorrhagic fever by RT-PCR in an epidemic setting[J]. J Med Virol, 2000, 60(4): 463-467.

[14] Yang Z Y, Duckers H J, Sullivan N J, *et al*. Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury[J]. Nat Med, 2000, 6(8): 886-889.

[15] 贾佳, 康晓平, 李裕昌, 等. 扎伊尔型、苏丹型埃博拉病毒*Taq*Man探针实时定量PCR核酸检测方法的建立[J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42(1): 80-84. DOI: 10.13220/j.cnki.jipr.2015.01.012

(**收稿**:2016-02-18;**修回**:2016-03-19)

(编辑 邓强庭)