

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.09

甲型 H1N1 流感病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

尹 航^{1,2}, 杨焕良¹, 陈 艳¹, 孟沙沙¹, 刘丽萍¹, 辛晓光¹, 陈化兰¹, 乔传玲^{1*}

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 农业部动物流感重点开放实验室 / 兽医生物国家重点开放实验室, 黑龙江 哈尔滨 150001;

2. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 为建立快速检测甲型 H1N1 流感病毒[Influenza A (H1N1) pdm09]的 *TaqMan* 荧光定量 PCR 方法, 本研究根据甲型 H1N1 流感病毒血凝素(HA)基因保守序列, 设计并合成了特异性引物和 *TaqMan* MGB 探针, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测甲型 H1N1 流感病毒。使用含有选定检测序列的重组质粒 pMD-HA 标准品绘制标准曲线, 其相关系数为 0.999, 敏感性可达 50 TCID₅₀。本研究中, 甲型 H1N1 流感病毒 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 方法与经典 H1N1、类禽 H1N1、类人 H1N1、H1N2、H3N2、H5N1 和 H9N2 流感病毒无交叉反应。结果表明, 该方法可以在人类和动物间有效地检测甲型 H1N1 流感病毒。

关键词: 猪流感病毒; H1N1 亚型; *TaqMan* MGB 探针; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)01-0036-04

Establishment of one-step *TaqMan* real time RT-PCR for Pandemic/2009 influenza viruses in swine

YIN Hang^{1,2}, YANG Huan-liang¹, CHEN Yan¹, MENG Sha-sha¹, LIU Li-ping¹, XIN Xiao-guang¹,
CHEN Hua-lan¹, QIAO Chuan-ling^{1*}

(1. Animal Influenza Key Laboratory of the Ministry of Agricultural, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; 2. Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To establish detect method for the Pandemic/2009 influenza virus infection in swine, A *TaqMan* real-time RT-PCR was developed based on primers and *TaqMan* probe derived from pH1N1/09 HA gene. A serial dilution of recombinant plasmid of pMD-H1-HA was prepared and used to generate standard curves. The results showed that the sensitivity of the real-time RT-PCR was 50 TCID₅₀, with a correlation coefficient of 0.999 and no cross-reaction with classical swine H1, Eurasian avian-like H1, human-like H1, or H1N2, H3N2, H5N1, H9N2 influenza viruses. The results demonstrate that this assay is efficient for the diagnosis of pH1N1/09 virus in both human and animal.

Key words: swine influenza virus; H1N1 subtype; *TaqMan* MGB probe; one-step real time PCR

猪流感(Swine influenza, SI)是由 SI 病毒(SIV)引起的一种急性高度接触传染性呼吸道疾病。猪被认为是流感病毒的“混合器”,它能够促进禽、猪和人流感病毒的重组,并产生可能引起在人群中大大

流行的新型病毒株^[1]。不同亚型的 SIV 感染人事件时有发生。2009 年爆发的甲型 H1N1 流感病毒中, SIV 提供了多个基因片段^[2]。近年来在我国分离的 SIV 主要包括:经典型(CS) H1N1、北美三源重组型

*Corresponding author

收稿日期: 2012-08-23

基金项目: 哈尔滨市科技攻关计划(2009AA6BN078); 中欧科技合作项目(1112)

作者简介: 尹 航(1985-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 主要从事动物流感的研究。

* 通信作者: E-mail: qcl@hvri.ac.cn

(TR) H1N2、欧洲类禽(EA)型 H1N1 流感病毒。国内外流行病学调查显示甲型 H1N1 流感病毒(pdm/09)在猪体内已经适应和流行^[34],鉴于猪在流感病毒种间传播中的作用,控制猪群感染甲型 H1N1 流感病毒的数量,是降低人感染甲型 H1N1 流感病毒风险最重要的措施之一,而敏感特异的快速诊断方法是实现这一目标的重要手段。实时荧光定量 PCR 技术(Real-time fluorescent quantitative PCR, RF-PCR)以其特异性强、灵敏度高、检测速度快等优点,在病原的定性定量检测、基因表达水平分析等方面得到了广泛应用^[5]。国外已经开展了 RF-PCR 检测甲型 H1N1 方法的研究^[69],但其流行病学背景与我国有很大不同,国外建立的方法并不能完全适应我国猪群中甲型 H1N1 流感病毒的检测。因此,建立适合我国 SIV 流行状况,快速敏感检测甲型 H1N1 流感病毒的 RF-PCR 方法,以区别于其他亚型 SIV,对于 SI 的控制及人类公共卫生方面具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 病毒株、质粒和病料 甲型 H1N1、古典型猪 H1N1、类禽型 H1N1、类人型 H1N1、H1N2、H3N2、H5N1 和 H9N2 流感病毒由本实验室分离、鉴定并保存;甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因重组质粒由本实验室构建并保存;鼻拭子采集自广西、天津、广东、黑龙江省不同地区的猪场。

1.2 主要试剂和仪器 M-MLV 反转录酶、RNase out 购自 Invitrogen 公司; dNTP、pMD18-T 载体等购自宝生物工程(大连)有限公司; RNA 提取、质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司; StepOne Software v2.0 实时荧光定量 PCR 仪为美国应用生物系统公司产品。

1.3 RF-PCR 方法的建立

1.3.1 引物和探针设计 根据本实验室分离病毒株以及 GenBank 登录的甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因核苷酸序列(JF915184.1),采用 DNASTar 软件进行同源性分析,选出高度保守并且特异的核苷酸区域,用 Primer Ex-press 2.0 软件设计引物: F Primer: 5'-AAATCTAGTGGTACCGAGATATGCA-3' 和 R Primer: 5'-GGGAGGCTGGTGTATTATAGCAC-3', 扩增片段大小为 173 bp; 探针: MGB TaqMan: 5'-CA

ATGGAAAGAAATGCTGG-3'。

1.3.2 RNA 的提取及反转录 按照试剂操作说明提取病毒 RNA。以其为模板,利用流感病毒通用反转录引物 uni12 (序列为: 5'-AGCAAAAGCAGG-3') 进行反转录,反应条件为: 70 °C 10 min, 37 °C 90 min。

1.3.3 Real-time PCR 反应体系的建立及优化 以稀释的标准重组质粒为模板,以获得最小 Ct 值及最高荧光值为指标,采用矩阵法对引物浓度(0.1 μM ~ 0.9 μM)及探针浓度(0.09 μM ~ 0.25 μM)进行优化。同时在 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 反应条件中,选择最佳退火温度(55 °C ~ 65 °C)对相同浓度的标准重组质粒进行检测。

1.3.4 标准曲线建立与结果判定 将 pMD-HA 重组质粒进行 10 倍梯度稀释至 1.92×10^9 copies/μL ~ 19.2 copies/μL,在最佳反应条件下同时扩增,绘制标准曲线。荧光强度增加值为阴性对照的 2 倍 ~ 3 倍及循环阈值 ≤ 0 判定为阳性,反之判定为阴性。

1.3.5 特异性试验 分别选择古典型猪 H1N1、类禽型 H1N1、类人 H1N1、H1N2、H3N2、H5N1 和 H9N2 不同谱系猪流感病毒 cDNA,以及 PRV、PRRSV 核酸为模板进行 RF-PCR 扩增,检测该方法的特异性。

1.3.6 敏感性试验 以 PBS 将 10^8 TCID₅₀/mL 病毒进行 10 倍梯度稀释至 10^{-1} TCID₅₀/mL,分别提取 RNA 并反转录 cDNA,进行灵敏度检测。

1.3.7 重复性试验 将同一样品在相同条件下进行 5 次组内和组间重复试验,测定该方法的重复性。

1.3.8 临床样本检测 将含量为 10^7 TCID₅₀/mL 甲型 H1N1 流感病毒 2 mL,滴鼻接种 40 日龄仔猪 3 头;对照组 2 头接种等体积生理盐水。感染后每天采集猪鼻拭子样品,置于 1 mL DMEM 中;同时于感染后第 3 d、第 5 d 和第 7 d 各迫杀一头猪,采集其肺脏和肺脏灌洗液样品,于 -80 °C 冻存,用于病毒检测。对广东、广西、江苏、黑龙江省等猪场分离的疑似甲型 H1N1 样品 44 份进行 TaqMan 荧光定量 PCR 检测,与最终病毒测序鉴定结果比较,检验该方法的临床检测效果。

2 结果

2.1 反应体系的优化 对引物和探针的浓度、退火温度进行优化,最佳 RT-PCR 反应体系为: 模板

2 μL , F/R (10 pmol/ μL) 各 1.8 μL 、TaqMan 探针 (5 pmol/ μL) 1 μL 、2 $\times$ Premix Ex Taq 10 μL 、dH₂O 3 μL 、ROX Reference Dye (50 $\times$) 0.4 μL 。RT-PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。

2.2 标准曲线的绘制 以 10 倍梯度稀释的阳性重组质粒为模板扩增, 得到相应的动力学曲线, 其浓度 1.92×10^9 copies/ μL ~ 19.2 copies/ μL 检测的 R^2 值达到 0.999, 扩增效率达到 104.27%, 标准曲线方程为 $y = -3.224x + 39.715$ (图 1)。

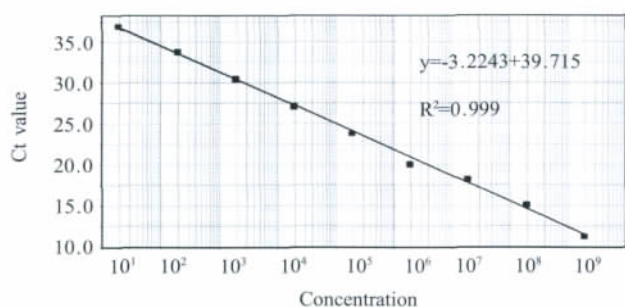
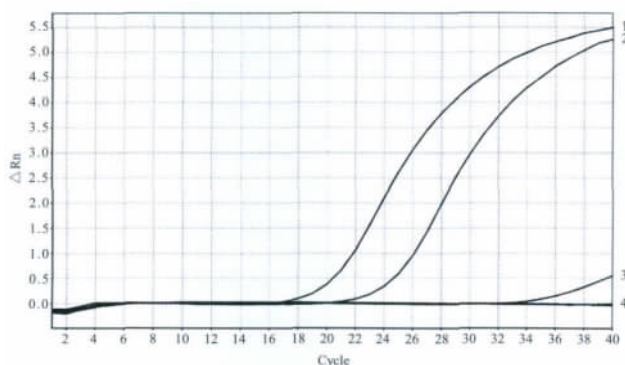


图 1 荧光定量 PCR 的标准曲线

Fig.1 Stablishment of the standard curve with recombinant plasmid

2.3 RF-PCR 特异性试验 分别选择重组质粒、甲型 H1N1 流感病毒 cDNA 为模板, 扩增结果为阳性, 而古典型猪 H1N1、类禽型 H1N1、类人型 H1N1、H1N2、H3N2、H5N1、H9N2 和以 PRV、PRRSV 核酸为模板扩增结果为阴性, 表明该方法具有较好的特异性(图 2)。



1: HA 重组质粒; 2: pH1N1/09 cDNA; 3: 古典型猪 H1N1 cDNA; 4: 类禽型 H1N1、类人型 H1N1、H1N2、H3N2、H5N1、H9N2、PRV、PRRSV cDNA 和阴性对照

1: Recombinant HA plasmid; 2: pH1N1/09; 3: Classical H1N1 SIV; 4: Avian-like H1N1, Human-like H1N1, H1N2, H3N2, H5N1, H9N2, PRV, PRRSV and negative control

图 2 荧光定量 PCR 检测特异性试验

Fig.2 Specific test of the real-time PCR assay for pH1N1/09

2.4 RF-PCR 敏感性试验 将 10^8 TCID₅₀ 病毒进行 10 倍梯度稀释至 10^{-1} TCID₅₀, 分别提取 RNA 并反转录 cDNA, 进行敏感性试验, 结果显示最低可以检

测到 50 TCID₅₀ 的病毒(图 3)。

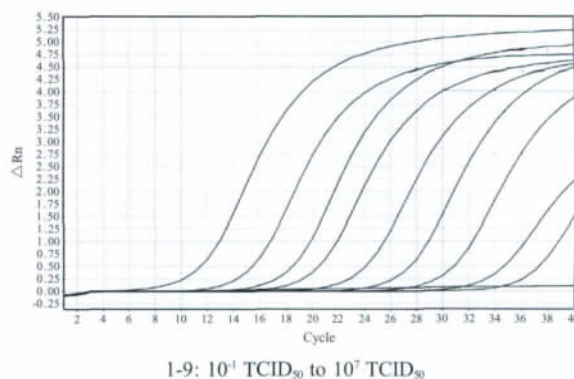


图 3 荧光定量 PCR 检测灵敏性试验

Fig.3 Sensitive test of real-time PCR with serial dilution samples

2.5 RF-PCR 重复性试验 重复扩增试验 Ct 值变异系数小于 3.12%, 表明 RF-PCR 检测方法重复性好、稳定性高(表 1)。

2.6 人工感染及临床样品检测试验 分别于人工感染后 1 d~7 d 采集实验猪鼻拭子样品, 在 3 d、5 d、7 d 迫杀取肺脏和肺灌洗液进行检测, 结果显示, 第 3 d 样品中病毒感染量最高, 其结果与 TCID₅₀ 检测结果一致(图 4)。RF-PCR 检测临床样品结果表明: 44 份样品中 17 份鉴定为甲型 H1N1 阳性样品均出现典型扩增曲线, 并且与实验室最终测序鉴定结果相符。

表 1 实时荧光定量 PCR 的组内、组间重复性试验结果(n=5)

Table 1 Intra-assay and Inter-assay reproducibility test of real-time PCR (n=5)

标准质粒浓度 Concentration of standard	组内变异试验 Intra-assay variability (ct)		组间变异试验 Inter-assay variability (ct)	
	$\bar{X} \pm \text{SD}$ (log)	CV (%)	$\bar{X} \pm \text{SD}$ (log)	CV (%)
10^8	14.14 $\pm$ 0.25	1.774	14.12 $\pm$ 0.20	1.422
10^7	17.82 $\pm$ 0.16	0.887	17.10 $\pm$ 0.11	0.653
10^6	19.26 $\pm$ 0.10	0.519	18.91 $\pm$ 0.11	0.577
10^5	22.23 $\pm$ 0.29	1.306	22.11 $\pm$ 0.30	1.341
10^4	25.75 $\pm$ 0.11	0.446	25.75 $\pm$ 0.12	0.464
10^3	29.15 $\pm$ 0.13	0.441	29.12 $\pm$ 0.14	0.492
10^2	32.54 $\pm$ 0.16	0.491	32.62 $\pm$ 0.22	0.686
10^1	36.37 $\pm$ 0.48	1.311	36.38 $\pm$ 0.48	1.333

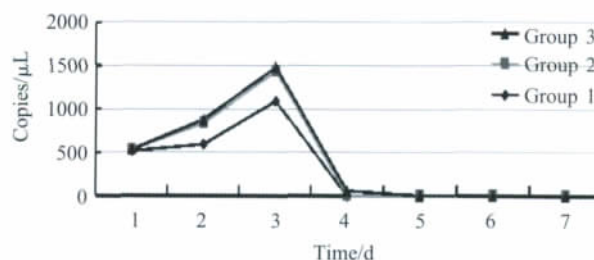


图 4 荧光定量 PCR 检测实验猪攻毒后鼻拭子的病毒载量

Fig.4 Nasal excretion of the viruses in pigs

3 讨论

甲型H1N1流感病毒造成世界范围的人际传播之后,很快就传播到猪群中。研究表明甲型H1N1流感病毒传染性很强,极易发生基因重排。我国是世界上最大的养猪国家,SIV流行亚型众多,为甲型H1N1流感病毒和其他亚型病毒株进行重组提供了有利条件。由于猪和人的种间屏障相对较低,重组病毒株极易由猪传给人,威胁人类的生命安全。流行病学研究表明,我国猪群中甲型H1N1流感病毒的分离鉴定已经有相关的报道。甲型H1N1流感病毒传播能力很强,因此早期的快速诊断对于疫情的控制至关重要。本研究建立并优化了Real-time PCR检测方法,为甲型H1N1类SIV检测和监测提供快速、灵敏、特异的方法。

甲型H1N1流感病毒的HA基因来源于北美三源重组H1N2流感病毒,二者同源性可达95%以上,这为鉴别诊断方法的建立增加了难度。经过反复序列比较后,在有限的保守区域设计特异性引物和探针,利用TaqMan MGB探针增加溶解温度(T_m),以此为基础建立的方法能够有效地将甲型H1N1流感病毒的HA基因与其他谱系H1N1 SIV区分开。采用正交试验方法对试验体系进行了优化,确定检测敏感度可达到50 TCID₅₀。特异性表明,建立的方法可以完全针对我国猪群中流行的主要亚型进行甲型H1N1类流感病毒的鉴别检测。

在44份可疑样品中,有17份结果为RF-PCR试验阳性,与病毒分离和最后测序结果确定甲型H1N1流感病毒阳性样品有高达100%的符合率,但敏感性试验表明检测敏感度可达到50 TCID₅₀,这表明该方法不能完全代替病毒分离鉴定方法来做出疾病的最终诊断,但相对于病毒分离鉴定需要1~2个星期,RF-PCR具有快速的特点,仅需要几个小

时就能完成,为疾病或疫情的早期诊断提供了重要的检测方法,并且该方法具有快速、简单、识别病毒全基因序列和特点,能够帮助我们更好地了解病毒的重组和病毒生长动力学,在对疾病和疫情的诊断中,RF-PCR和病毒分离鉴定可以互为补充,以达到快速、准确检测的目的。

参考文献:

- [1] Scholtissek C, Burger H, Kistner O, et al. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses [J]. *Virology*, 1985, 147(2): 287-294.
- [2] Guan Y. The emergence of pandemic influenza viruses [J]. *Protein Cell*, 2010, 1(1): 9-13.
- [3] Garten R J. Antigenic and genetic characteristics of swineorigin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans [J]. *Science*, 2009, 325(5937): 197-201.
- [4] Smith G J. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic [J]. *Nature*, 2009, 459(7250): 1122-1125.
- [5] CDC. Update: novel influenza A (H1N1) virus infection: Mexico, March-May, 2009 [J]. *MMWR*, 2009, 58(21): 585-589.
- [6] 张超鹏, 师小潇, 哈卓, 等. 猪流感病毒 SYBR Green 定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(10): 768-772.
- [7] 杨林, 马世春, 苏增华, 等. 猪流感病毒基因芯片检测技术的研究[J]. *中国兽医杂志*, 2008, 44(7): 3-5.
- [8] Pol F, Quéguiner S, Gorin S, et al. Validation of commercial real-time RT-PCR kits for detection of influenza A viruses in porcine samples and differentiation of pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs [J]. *J Virol Methods*, 2011, 171(1): 241-247.
- [9] Hiromoto Y, Uchida Y, Takemae N, et al. Real-time reverse transcription-PCR assay for differentiating the Pandemic H1N1 2009 influenza virus from swine influenza viruses [J]. *J Virol Methods*, 2010, 170(1-2): 169-172.

(本文编辑:张朝霞)