

· 临床检验研究论著 ·

汉城病毒的 TaqMan-BHQ 探针实时荧光定量检测方法的建立

刘纯成, 杨鹏飞, 燕清丽, 时玉军

(江苏省淮安市疾病预防控制中心, 江苏淮安 223001)

摘要:目的 建立一种汉城病毒实时荧光定量 RT-PCR 快速的检测方法。方法 用专业软件设计引物和 TaqMan-BHQ 探针, 以人工合成 L 基因的片段作为模板, 进行实时荧光定量 RT-PCR 研究。结果 模板的 Ct 值与模板稀释浓度的对数存在良好的线性关系, 标准曲线为 $Y = -3.607X + 41.84$, $r^2 = 0.998$, PCR 扩增效率为 108.1%, 其最低检出限为 53.2 copies/ μ L。结论 应用 TaqMan-BHQ 探针的实时荧光 RT-PCR 检测汉城病毒核酸, 具有耗时短、灵敏度高等特点。

关键词: TaqMan-BHQ 探针; 实时荧光 RT-PCR; 汉城病毒; 定量检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.014

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)24-3332-02

Establishment of TaqMan-BHQ probe real-time fluorescence RT-PCR for quantitative detection of Seoul virus

Liu Chuncheng, Yang Pengfei, Yan Qingli, Shi Yujun

(Huai'an Municipal Center for Disease Control and Prevention, Huai'an, Jiangsu 223001, China)

Abstract: Objective To establish a rapid method of real-time fluorescence RT-PCR to quantify Seoul virus. **Methods** The professional software was adopted to design the primer and the TaqMan-BHQ probe. With artificially synthesized L gene segment as the template of Seoul virus, the real-time RT-PCR for detecting Seoul virus was researched. **Results** The Ct value of templates had a good linear relationship with the log value of the template diluted concentration. The standard curve was $Y = -3.607X + 41.84$, $r^2 = 0.998$, the PCR amplification efficiency was 108.1%, its lowest detection limit was 53.2 copies/ μ L. **Conclusion** Applying the real-time fluorescence RT-PCR by the TaqMan-BHQ probe for detecting nucleic acid of Seoul virus has the characteristics of short time-consuming and high sensitivity.

Key words: TaqMan-BHQ probe; real-time fluorescence RT-PCR; soul virus; quantitative detection

汉城病毒(SEOV)易起人的肾综合征出血热(HFRS)^[1-2]。我国是世界上受肾综合征出血热危害最严重的国家, SEOV 是我国的流行优势株之一^[3]。SEOV 于 1981 年首次在我国鼠中分离到 SEOV^[4]。SEOV 基因组由大(L)、中(M)、小(S)3 个基因片段组成, 分别编码 RNA 聚合酶、膜表面糖蛋白 Gn 和 Gc 以及核蛋白(NP), 其中编码 RNA 聚合酶的 L 基因在种属间比较保守, 适合于病毒的核酸检测^[5]。

汉坦病毒与宿主存在共进化关系, 在一定程度上存在特定的对应关系, 其中 SEOV 的宿主主要为褐家鼠。随着人类对自然环境的进一步改造及全球贸易交流日益加剧, 使得褐家鼠的迁徙、扩散加快, 使得褐家鼠携带的 SEOV 基因型为全球分布型, 因此极易造成病毒的流行^[6-8]。为适应病原体快速检测的需要, 本研究对汉城病毒的快速检测方法进行设计。

1 材料与方 法

1.1 引物探针的设计与合成 SEOV 的 L 基因片段合成由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成, L 基因的引物探针设计参考 SEOV 流行的 6 个基因亚型的病毒株序列并由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。合成的引物探针为: (1) SEOV P: (5'-3'): FAM-TGC TAT ACG GTC CAG TTA ATT CCC A-BHQ1, (2) SEOV F: ATG TAG AAA AGT GGG TAG AGA TTA G, (3) SEOV R: ATT AGT AGT ATT GTC CGA TTA GTG G。

1.2 方 法

1.2.1 构建载体 将合成的 SEOV 的 L 基因片段, 通过 PCR 扩增、切胶纯化后直接连接于 PCR II 载体, 将构建好的 PCR

II-SEOV-L 转化至感受态细胞 DH5 α , 挑取阳性单克隆测序, 确定序列与实际序列相一致。

1.2.2 模板 RNA 的制备 依次加入转录试剂盒(购自 Promega 公司)中, 按照试剂盒的说明书操作进行转录反应。转录产物用酚氯仿法抽提 RNA, 得到的沉淀用无 RNA 酶水溶解, -80 °C 保存。

1.2.3 鼠肺样本样本的 RNA 提取 将鼠肺制成匀浆液, 取上清液 140 μ L, 按照 Qiagen 公司 Viral RNA Mini Kit 说明书进行操作, RNA 于 -80 °C 保存。

1.2.4 实时荧光 RT-PCR 的体系优化 按照 ABI 公司的实时荧光 PCR 试剂盒中推荐的引物、探针浓度作为初始扩增条件并在此基础上进行体系的优化。主要针对引物浓度(依次为 0.4、0.6、0.8、1.0 μ mol/L)和探针的浓度(依次为 0.12、0.2 及 0.4 μ mol/L)进行优化。

1.2.5 灵敏度检测 将制备的模板 RNA 用 NanoDrop sepectrophotometer 测定浓度, 进行 10 倍倍比稀释, 后者作为模板进行实时荧光 RT-PCR 反应。

1.2.6 特异性检测 选择汉坦病毒的其他基因亚型汉滩型(HTNV)、普马拉型(PUUV)、多布伐-贝尔格莱德型(DOBV)及辛诺柏病毒型(SNV)的 RNA 作为模板来考查本方法的特异性。

2 结 果

2.1 扩增体系优化结果 见表 1,

2.2 SEOV 实时荧光 RT-PCR 的标准曲线的绘制 经检测转录的 SEOV L 基因 RNA 的浓度为 18.943 μ g/ μ L, 按照文献拷

贝数的计算方法,本实验中转录的 RNA 的拷贝数为 5.32×10^9 copies/ μL ^[9]。SEOV 实时荧光 RT-PCR 的扩增图如图 1(上)所示。结果显示,模板中 SEOV RNA 的拷贝数从 5.32×10^1 copies/ μL 到 5.32×10^9 copies/ μL ,均得到了成功的扩增,而且具有良好的重复性,达到了制作标准曲线的要求。从图 1

中可看出,本实验可以检测到的最低拷贝数为 53.2 copies/ μL ,Ct 值为 34.21。以 Ct 值为纵坐标, RNA 拷贝数的对数值为横坐标做标准曲线,见图 1(下),其回归方程为 $Y = -3.607X + 41.84, R^2 = 0.998$,PCR 扩增效率为 108.1%,Ct 值从 9.43~34.21。

表 1 不同浓度引物、探针组合下实时荧光 RT-PCR 的结果

引物浓度	不同探针浓度下的 Ct 值									
	0.12 $\mu\text{mol/L}$			0.2 $\mu\text{mol/L}$			0.4 $\mu\text{mol/L}$			
0.4 μM	29.30	29.21	28.96	26.30	26.28	26.33	28.38	28.39	28.40	
0.6 μM	29.12	29.26	29.19	29.56	29.78	29.60	28.52	28.61	28.60	
0.8 μM	29.60	29.90	29.81	29.38	29.38	29.40	28.33	28.30	28.30	
1.0 μM	28.67	28.58	28.67	27.45	27.39	27.50	28.62	28.61	28.60	

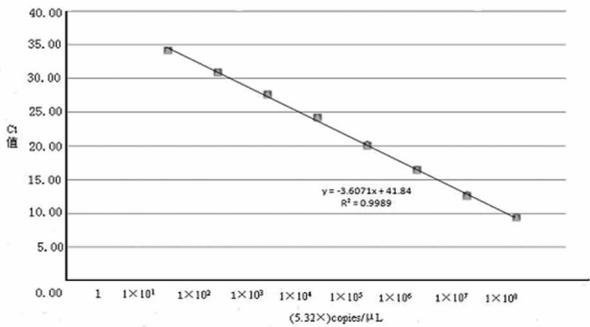
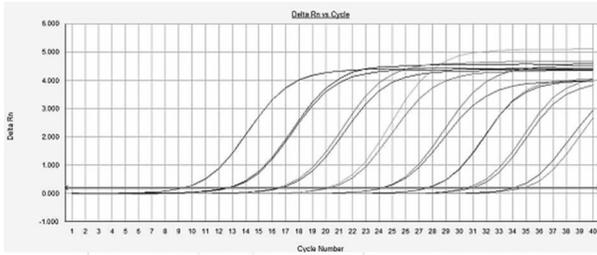


图 1 建立的 SEOV 实时荧光 RT-PCR 的扩增图(上)及标准曲线(下)

2.3 SEOV 实时荧光 RT-PCR 的特异度检测 利用建立的方法对汉坦病毒的其他基因亚型 HTNV、PUUV、DOBV 及 SNV 的 L 基因进行检测,均没有明显的扩增曲线,Ct 值为 0。对 SEOV 宿主褐家鼠的 RNA 检测也为阴性。

3 讨论

随着全球经济一体化和贸易自由化,使得啮齿动物跨境迁徙及繁殖,致使啮齿动物中携带的病毒在宿主间进行跨种传播成为可能。SEOV 主要在褐家鼠中流行,而褐家鼠为全球分布的鼠种并在相应地域发现有人肾综合征出血热病例的报道,危害比较严重^[10]。同时,SEOV 及 HTNV 在我国有比较广泛的疫区,截止目前约有 40 多年的流行史,造成的疾病负担较重。

目前常规的 SEOV 的检测方法主要是基于宿主组织的间接荧光免疫法和基于宿主核酸的巢式 RT-PCR 方法^[11-12],前者主要利用抗原抗体反应同时借助荧光显微镜进行观察,该法比较耗时费力,同时假阳性率偏高,容易造成误判增加不必要的工作量;后者是利用外套引物及内套引物对疑似宿主的 RNA 进行巢式 PCR 反应,该方法可以很好地特异性扩增出目的基因,但耗时较长,一般情况下需要 3~4 h,由于逆转录与

PCR 常是分开进行的,因此比较容易造成样本的污染。实时荧光定量 PCR 技术的出现,大大地加快病原体检测、基因分型及临床诊断等领域的检测速度同时实时荧光 PCR 技术以其高特异性、高灵敏度、低污染及耗时短等特点,已经越来越多地被用于新发传染病病原体检测的第一手段。

参考文献

- [1] Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution [J]. J Gen Virol, 1996, 77 (25): 2677-2687.
- [2] Svetlana F, Khaiboullina, SP Morzunov, et al. Hantaviruses: Molecular biology, evolution and pathogenesis [J]. Current Molecular Medicine, 2005, 5(7): 773-790.
- [3] 邹洋,薛燕萍,陈化新,等. 汉坦病毒生物学特性研究进展 [J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(8): 819-913.
- [4] 张永振,肖东楼,王玉,等. 中国肾综合征出血热流行趋势及其防治对策 [J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(4): 466-469.
- [5] Hitoaki K, Kumiko Y, Jiro A. Hantavirus infection in East Asia. Comp. Immun. Microbiol [J]. Infect Dis, 2007, 30(3): 341-356.
- [6] 鄢燕贞,陈化新,俞永新,等. 汉坦病毒宿主动物生态学与进化研究进展 [J]. 中华预防医学杂志, 2007, 41(1): 134-138.
- [7] CA Heid, J Stevens, KJ Livak, et al. Real-time quantitative PCR [J]. Genome Res, 1996, 6(9): 986-994.
- [8] Cao X, Jiang Z. Two multiplex real time TaqMan polymerase chain reaction systems for simultaneous detecting and serotyping of Ureaplasma parvum [J]. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2007, 59(1): 109-111.
- [9] Sambrook J 著;黄培堂译. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京:北京科学出版社, 2002.
- [10] Khaiboullina SF, Morzunov SP, Jeor SC. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis [J]. Curr Mol Med, 2005, 5 (8): 773-778.
- [11] 范飞能,杨鹏飞,张永振. 浙江省慈溪市啮齿动物中汉坦病毒的分子流行病学研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(4): 365-368.
- [12] 鄢燕贞,姚来顺,扈光伟,等. 吉林省汉城型汉坦病毒的基因分型与分布 [J]. 中国媒介生物学及其控制杂志, 2006, 17(3): 324-326.