

实时荧光定量 PCR 快速检测人鼻病毒

赖建辉¹, 周建明¹, 李惠卿²

1.龙岗区疾病预防控制中心, 广东 深圳 518172 ; 2.龙岗区人民医院, 广东 深圳 518172

摘要:目的 应用实时荧光定量 PCR 方法快速检测 HRV, 为 HRV 实验室早期诊断、HRV 流行病监测和应急处理提供快速诊断手段。方法 以 HRV 的 5'UTR 为检测靶基因, 设计引物和探针, 评价方法的特异性、灵敏性和重复性, 并用该方法对 384 份临床呼吸道感染样本进行检测。结果以 HRV、H1N1、HcoV、流感等病毒进行实时荧光定量 PCR, 只有 HRV 出现荧光信号, 证明该法特异性强; 以已知浓度 HRV 标准品稀释后进行实时荧光定量 PCR, 灵敏性达 10copies/ μ L, 重复性试验 Ct 平均值变异系数 0.58%~2.41%, 384 份临床样本中检测 HRV 阳性为 21 份, 检测耗时比传统方法短。

结论 HRV 实时荧光定量 PCR 法有着快速、敏感、特异性强等优点, 适用于 HRV 早期诊断、分子流行病学调查研究。

关键词:人鼻病毒; 实时荧光定量 RT-PCR; 快速检测

Rapid detection of human rhinovirus real-time fluorescence quantitative PCR

LAI jian-hui*, ZHOU jian-ming, LI hui-qing

*.Longgang Center for Disease Control and Prevention, Guangdong, Shenzhen 518172, China;

Abstract: Objective To establish a real time fluorescent quantitative RT-PCR assay for the simultaneous identification of human rhinovirus (HRV) so as to provide a rapid diagnosis method for the virus laboratory detection, epidemiological surveillance and emergency treatment. **Methods** The specific primers and probes were designed according to the target gene of 5'UTR of HRV. The specificity, sensitivity and repeatability of the real time RT-PCR assay in detecting HRV were analyzed. HRV were detected in 384 clinical respiratory infection samples by this newly establish method. **Results** The newly establish real time fluorescent quantitative RT-PCR shows strong specificity in identifying HRV, but not in HRV, H1N1, HCoV and influenza virus. The result of standard concentration HRV product tested by real time quantitative PCR was prove that the sensitivity of detecting HRV was 10 copies/ μ L. Ct average coefficient of variation was 0.58%~2.41% in the repeated test. The newly establish method was faster than the traditional method in detecting HRV of 384 clinical respiratory infection samples and total 21 positive strains of HRV were found. **Conclusion** This real-time fluorescence RT-PCR assay can simultaneously, rapidly, sensitively and specifically detect HRV. It is capable of early diagnosis and molecular epidemiology investigation of HRV.

Key words: Human rhinovirus; real time fluorescence quantitative RT-PCR : Rapid detection

基金:深圳市龙岗区科技计划医疗卫生项目 (ys2012035)

作者简介: 赖建辉 (1979~), 主管技师, 男, 学士, 主要从事卫生检验工作。

通讯作者: 李惠卿, E-mail: lihuiqing397@126.com

Corresponding author: LI hui-qing, E-mail: lihuiqing397@126.com

人鼻病毒（human rhinovirus, HRV）属小核糖核酸病毒，是引起呼吸道感染最主要病毒之一，且易诱发哮喘、鼻窦炎、中耳炎等疾病^[1]。而鼻病毒传统的检测方法受制于其血清型多(至少有100多个)^[2]，从采样到报告结果至少需2个星期，往往会延误病程和疫情的控制。随着分子生物学检测技术的不断发展，实时荧光定量PCR方法近年被认为是简便、快速、灵敏、特异性强的病毒检测方法，本研究对快速检测HRV具有重要意义。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 以深圳市龙岗区人民医院为监测哨点，每周采集流感样病例5~10名患者咽拭子，4℃保存，48 h内送至龙岗区疾病预防控制中心实验室进行检测。

1.2 方法

1.2.1 病毒RNA提取 取鼻咽拭子样本200 μL，用Roche公司High Pure Viral RNA Kit提取病毒RNA，具体操作参见试剂盒说明书。

1.2.2 引物和探针设计 从Gen-Bank数据库下载20条HRV的5'UTR(非编码区) 基因序列，利用DNASTar5.0和Oligo 6.22进行比对和优化，选择同源性高的保守区域设计引物和探针。以NCBI数据库中的Blast验证引物和探针序列的特异性，引物和探针由Invitrogen公司合成(见表1)。

表1 实时荧光定量RT-PCR的引物和探针

引物	目标基因	序列(5'-3')	扩增长度 (nt)	荧光基团
HRVU-F	5'UTR	TCCTCCGGCCCCTGAAT	119	FAM,BHQ-1
HRVU-R		GAAACACGGACACCCAAA		
		GTAGT		
HRVU-Probe		TGGCTAACCCAAACCC		

1.2.3 实时荧光定量PCR反应体系及反应条件 用大连宝生物公司的One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect RealTime)试剂盒进行实时荧光定量RT-PCR试验，反应体系总共25 μL，包括5mmol/LMg²⁺、150 μmol/LdNTPs、0.2 μmol/L引物、0.4 μmol/L探针、1xPCR buffer、2U Taq酶和2U逆转录酶。

实时荧光定量PCR反应条件的优化主要是退火温度的优化，根据引物和探针的T_m值确定退火温度的优化范围为50℃~62℃，梯度为1℃。用Roche公司LightCycler Real Time PCR 480 检测优化条

件为:42℃逆转录5 min，预变性95℃、10s，40个循环为95℃变性5s、60℃延伸35s时采集荧光信号。

1.2.4 标准品的制备和标准曲线的建立 用天根公司的Universal DNA纯化回收试剂盒纯化回收扩增产物，委托北京天根生化科技有限公司制备质粒标准品。用Beckman DU 730核酸蛋白仪在260nm/280nm测定测得质粒浓度，使用前进行1/10倍比稀释，稀释梯度浓度为 10^5 copies/ μ L~ 10^0 copies/ μ L作为标准品进行实时荧光定量PCR，生成标准曲线。

1.2.5 实时荧光定量PCR的特异性试验 以HRV标准品，甲型H1N1亚型，季节性H1N1亚型、季节性H3N2亚型、B型流感Victoria亚型、B型流感Yamagata亚型、人冠状病毒HcoV-HKU1、人冠状病毒HcoV-OC43等常见呼吸道病毒进行实时荧光定量PCR，评价反应体系的特异性。

1.2.6 实时荧光定量PCR的灵敏度和重复性试验 对已知浓度HRV进行1/10倍比稀释，稀释梯度浓度为 10^5 copies/ μ L~ 10^0 copies/ μ L，按步骤1.2.3进行试验，并自动生成病毒模板的标准曲线，评价系统最低检测下限。重复试验3次，评价检测方法的重复性。

1.2.7 常规监测工作的应用 用HRV实时荧光定量PCR方法检测龙岗区流感监测医院收集的384份标本，评价该方法在常规工作中的可靠性。

2. 结果

2.1 实时荧光定量PCR的特异性试验 按建立的实时荧光定量PCR反应条件，对本实验室保存的不同呼吸道病毒阳性监测标本和HRV转录RNA标准品进行检测，结果除HRV出现相应的荧光信号外，步骤1.2.5的其他呼吸道病毒均为阴性，没有出现交叉反应。而HRV转录RNA标准品出现对应荧光号见

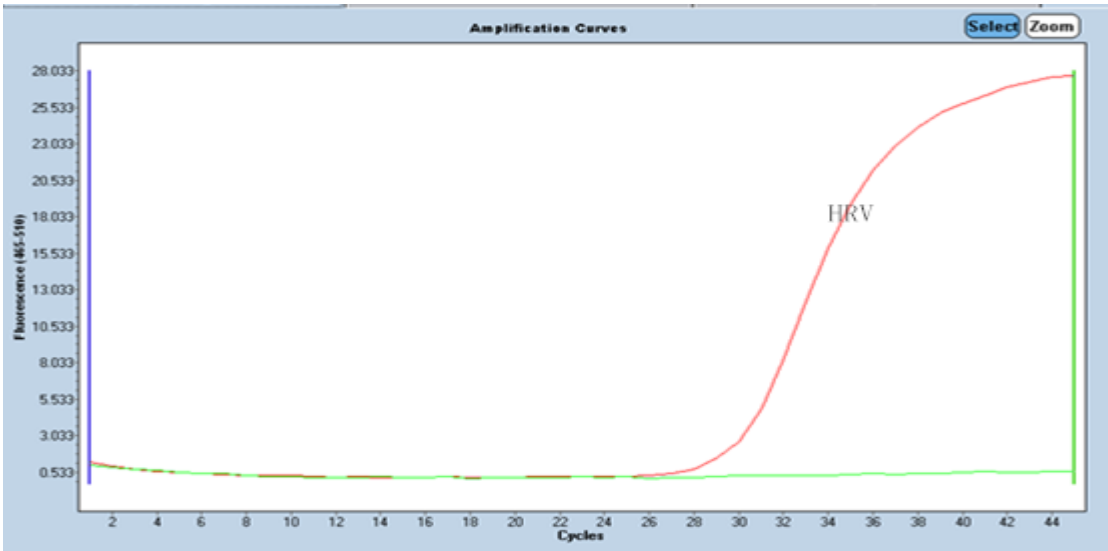


图1。

图1 HRV实时荧光定量PCR特异性分析

2.2 实时荧光定量PCR的灵敏度试验 对已测浓度的HRV转录RNA标准品进行系列浓度梯度稀释 10^0 copies / μ L $\sim 10^5$ copies / μ L，应用建立的实时荧光定量PCR反应体系检测，表2显示HRV的最低检出限均达10copies/ μ L，病毒的梯度稀释反应的相关系数(r)0.991。

表2 HRV实时荧光定量PCR重复性

模板copies/ μ L	Ct值			平均Ct值	变异系数 (%)
	1	2	3		
10^5	24.67	24.01	24.79	24.49	1.71
10^4	26.75	26.93	26.62	26.77	0.58
10^3	30.71	29.98	30.06	30.25	1.32
10^2	33.42	34.78	33.91	34.04	2.02
10^1	37.27	35.58	36.03	36.29	2.41
10^0	—	—	—	—	—

2.3 实时荧光定量PCR的重复性试验 对梯度稀释浓度标准品进行3次重复测定，分析浓度梯度内的Ct值均数(S)和变异系数(CV)。如表2所示，HRV的测定Ct值变异系数0.58%~2.41%，在合理范围内(<5%)，表明结果具有良好的稳定性。

2.4 常规监测工作的检测情况 龙岗区流感哨点监测医院共上送疑似鼻咽拭子384份，应用实时荧光定量PCR对临床样本进行检测，结果显示，HRV的阳性率为5.5% (21 /384)，这与其他文献报道一致[3-4]。

3. 讨论

据文献报道[3]，HRV 是龙岗区呼吸道感染病例中检测阳性率第二高的病毒，仅次于流感病毒，以 0~15 岁的儿童和青年检测阳性率高，可能成为我国儿科医师对呼吸感染治疗中抗生素过度应用的原因之一[5]。为此，必须建立一种简便、快速、灵敏、特异性强的 HRV 检测方法。HRV 最经典的检测方法是病毒分离加上耐酸试验，但这种方法存在耗时长、劳动强度大、对样本的运输及存储有较高的要求，且分离阳性率低。免疫胶体金快速诊断试剂盒检测虽快速、简便，但其敏感性低，存在一定的假阴性结果。近年发展起来的实时荧光定量 PCR 已在病原体检测中得到广泛的应用，具有灵敏度高、特异性强、准确快速等特点[6-8]，为临床快速检测 HRV 提供了可行性。

本方法的建立是利用Roche LightCycle 480 和ABI 7500平台，引物设计选择5'UTR效果明显[9]，实验结果证实，该引物可特异性扩增HRV，而甲型H1N1亚型，季节性H1N1亚型、季节性H3N2亚型、B型流感Victoria亚型、B型流感Yamagata亚型、人冠状病毒HcoV-HKU1、人冠状病毒HcoV-OC43等

常见呼吸道病毒均为阴性，具有良好的特异性。应用本方法建立的HRV定量分析模型，可对样品中的病毒含量进行定量分析，其最低检测下限为10copies/μL，可满足绝大多数原始标本的检测要求。测定病毒核酸的重复性判定指标CV值在0.58%~2.41%之间，证明该方法具有良好的重复性。通过本方法对龙岗区流感哨点监测医院收集的384份样本进行检测，检出阳性标本21份，并可在4h内完成检测，可实现病原的早期诊断。

本实时荧光定量PCR方法能快速、敏感、特异地检测HRV,不仅适用于HRV的早期诊断，而且可通过定量分析了解HRV的感染程度，同时也可用于HRV的分子流行病学调查研究。

参考文献:

- [1]Turner RB. Epidemiology , pathogenesis and treatment of the common cold [J] .Ann Allergy Asthma Immunol,1997,78:531-539.
- [2] Palmenberg AC, Rathe JA, Liggett SB. Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus [J] . J Allergy ClinImmunol,2010,125 (6) :1190 -1199.
- [3] 李惠卿, 陈日炳, 李静媚, 等. 2011-2013年龙岗区常见7 种呼吸道病毒监测结果分析 [J] . 热带医学杂志, 2014, 14(5):674-676.
- [4][3] 周一平, 陆学东, 陈小可, 等. 呼吸道病毒和非典型病原体与下呼吸道感染的相关性研究 [J] . 实用预防医学, 2010, 17(11):2278-2280.
- [5] 董永绥,方峰.在诊治小儿病毒性疾病中亟待解决的问题 [J] .中华儿科志,2002 ,40:387-390 .
- [6] J Sellis, DM FiLem ing, MC Zam bon.Mu ltip lexreverse transcription -PCR for surveillance of influenzaA and B viruses inEngland and Wales in1995 and 1996[J]. J C linMicrobio,1997, 8(35) : 2076-2082.
- [7] Tem p leton KE, Schelt inga SA, B eersma MF, et al.Rapid and sens-it ivemethod using multip lex real-time PCR for diagns is of infectionsby influenzaA and influenza B viruses, respiratory syn cytial virus, andparain fluen zaviruses1, 2, 3, and 4 [J] . J C lin Microbio, 2004, 42(4):1564-1569.
- [8] Stone B, Burrows J, S chepetiuk S, et al.Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real time PCR[J]. JV irolMeth, 2004, 117(2):103- 112.
- [9] Lee WM, Grindle K, Pappas T, et al. High _throughput,sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses [J] . J Clin Microbiol, 2007, 45(8): 2626-2634.