

· 论 著 ·

## 多重逆转录聚合酶链反应检测常见呼吸道病毒\*

帅维正, 李琦<sup>△</sup>, 王长征, 戴福云, 陈华萍, 魏征华, 李瑾  
(第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所, 重庆 400037)

**摘要:**目的 建立一种可同时快速检测引起人呼吸道感染的重要病毒病原的检测方法。方法 通过对 PCR 反应条件的优化, 建立同时检测季节性甲型流感病毒(INFA)、乙型流感病毒(INFB)、人鼻病毒(HRV)和甲型 H1N1 流感病毒(H1N1)的多重 RT-PCR 方法。结果 该法可同时或分别扩增 INFA 212 bp、INFB 489 bp、HRV 380 bp 和 H1N1 153 bp 的基因片段。检测的敏感性分别为  $10^4$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  copies/mL。采用相同的反应体系和条件, 分别对其他 6 种常见病原体(包括肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和粪肠球菌核酸)进行扩增, 均未检测出扩增产物。结论 此种多重 RT-PCR 法适用于 4 种重要呼吸道病毒的快速甄别。

**关键词:**多重 RT-PCR; 流感病毒; 人鼻病毒; 甲型 H1N1 流感病毒

中图分类号: R562; R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)11-1372-03

## Development of a multiplex RT-PCR to detect four important respiratory viruses\*

SHUAI Wei-zheng, LI Qi<sup>△</sup>, WANG Chang-zheng, et al.

(Institute of Respiratory Diseases of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract: Objective** To develop a technique of simultaneously and rapidly detecting important viral pathogens which may cause respiratory infections. **Methods** Under optimized PCR conditions, a multiplex PCR technique was developed to simultaneously detect seasonal influenza A virus (INFA), influenza B virus (INFB), Human rhinovirus (HRV) and Novel Swine-Origin Influenza A Virus (H1N1). **Results** Four specific PCR products, 212 bp for INFA, 489 bp for INFB, 380 bp for HRV and 153 bp for H1N1, were amplified respectively. The LOD of INFA, INFB, HRV and H1N1 were  $10^4$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  copies/mL. The specificity of the technique was verified in detecting another 6 common pathogens including Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Enterococcus faecalis, and none of these was found positive in the same multiplex PCR conditions. **Conclusion** The multiplex RT-PCR assay may be used as a rapid, sensitive and specific diagnostic method for the differentiation of INFA, INFB, HRV and H1N1.

**Key words:** multiplex RT-PCR; influenza virus; Human rhinovirus; Novel Swine-Origin Influenza A Virus

自 2009 年甲型 H1N1 流感病毒暴发以来, 其传染性强、传播快, 对人类健康造成了严重威胁<sup>[1]</sup>。多重 RT-PCR 可同时检测多种病毒病原, 敏感性好, 特异性高, 适合于多种呼吸道病毒的快速鉴定。本实验针对季节性甲型流感病毒(INFA)、乙型流感病毒(INFB)、人鼻病毒(HRV)和甲型 H1N1 流感病毒(H1N1)基因的保守序列设计了 4 对引物, 建立了检测此 4 种重要呼吸道病毒的多重 RT-PCR 方法, 并对检测方法的敏感性和特异性进行了评估。

## 1 材料与方

**1.1 病毒样本** 季节性 INFA、INFB、HRV 和 H1N1 均为本实验室保存的临床分离标本。肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和粪肠球菌核酸由第三军医大学西南医院检验科刘春江惠赠。

**1.2 主要试剂** 核酸提取试剂盒(QIAamp Viral RNA Mini Kit)由 QIAGEN 公司提供, 逆转录试剂盒(PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit)、普通 PCR 试剂盒(Premix Taq<sup>®</sup> Version2.0)、多重 RT-PCR 试剂盒(Multiplex PCR Assay Kit)均由宝生物工程(大连)有限公司提供, pBS-T II 快速连接试剂盒由天根生化科技(北京)有限公司提供。

**1.3 引物** 经查找文献, 同时利用 Primer primer5.0 软件设计引物并筛选多重 RT-PCR 引物, BLAST 序列比对([http://](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/))以初步验证引物的特异性<sup>[2-3]</sup>。引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

**1.4 病毒核酸获取及核酸标准品制备** 上呼吸道感染患者咽拭子标本, 按 QIAamp Viral RNA Mini Kit 核酸提取试剂盒(QIAGEN)说明书操作, 得到纯化的 RNA 溶液。将 RT-PCR 扩增的目的片段与 PBS-T II 载体连接并转化入 TOP10 感受态细胞中, 培养, 提取质粒, 经 PCR 和测序鉴定, 使用分光光度计测定浓度, 计算其拷贝数值。

## 1.5 多重 RT-PCR 反应体系的建立

**1.5.1 逆转录合成 cDNA** 逆转录反应体系如下:  $5 \times$  PrimeScript<sup>TM</sup> Buffer 2  $\mu$ L; PrimeScript<sup>TM</sup> RT Enzyme Mix I 0.5  $\mu$ L; Oligo dT Primer (50  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L; Random 6 mers (100  $\mu$ M) 2  $\mu$ L; RNA 3  $\mu$ L; RNase Free H<sub>2</sub>O 补齐至 10  $\mu$ L。反转录反应条件: 37  $^{\circ}$ C、15 min; 85  $^{\circ}$ C、5 s。产物即可加入 PCR 反应液。

**1.5.2 多重 RT-PCR 反应** 逆转录反应体系如下: Multiplex PCR Mix 2, 25  $\mu$ L, 引物 INFA F 0.5  $\mu$ L, INFA R 0.5  $\mu$ L, INFB F 1  $\mu$ L, INFB R 1  $\mu$ L, HRV F 1  $\mu$ L, HRV R 1  $\mu$ L, H1N1 F 1.5  $\mu$ L, H1N1 R 1.5  $\mu$ L, Multiplex PCR Mix I 0.25  $\mu$ L, cDNA 模板 5  $\mu$ L, 补水至总体积 50  $\mu$ L。在 BIO-RAD PTC-200 PCR 扩增仪上进行 PCR 扩增。循环条件: 94  $^{\circ}$ C、60 s, 而后 94  $^{\circ}$ C、30 s; 55  $^{\circ}$ C、90 s; 72  $^{\circ}$ C、90 s 反应 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C、10 min。反

\* 基金项目: 第三军医大学青年创新人才基金资助项目(2007D164)。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: oliverliqi@sina.com。

表 1 采用的多重 RT-PCR 引物

病毒	目的片段长度(bp)	引物序列(5'-3')	目的基因
INFA	212	F:CAGAGACTTGAAGATGTCTTTGC R:GCTCTGTCCATGTTATTTGGATC	M 基因
INFB	489	F:GGGATATACGTAATGTGTTGT R:GCACTGCCTGCTGTACACTT	NS 基因
HRV	380	F:CGGACACCCAAAGTAG R:GCACTTCTGTTTCCCC	5' UTR 基因
H1N1	153	F:AATAACATTAGAAGCAACTGG R:AGGCTGGTGTATTATRGACC	HA 基因

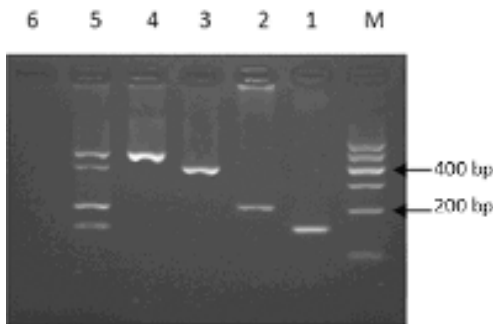
应完毕,2.5%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

**1.6 特异性检测** 分别以肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和粪肠球菌 DNA 溶液 5 μL 为模板,以同样的反应体系和循环参数进行多重 RT-PCR 扩增,同时采用 H1N1 RNA 模板作为阳性对照,评估多重 RT-PCR 的特异性。

**1.7 敏感性检测** 针对各自目的基因构建质粒,提取质粒 DNA 后使用分光光度计测定 DNA 浓度,用公式换算出模板拷贝数,并以 10 倍稀释后,采用相同反应体系和循环条件进行多重 RT-PCR 扩增,以评估多重 RT-PCR 分别检测 4 种病毒的敏感性,并与单一 RT-PCR 检测的敏感性进行比较。

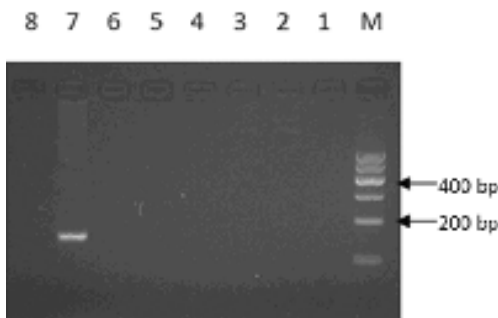
**2 结 果**

**2.1 4 种呼吸道病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立** 经过优化的多重 RT-PCR 体系从 4 种病毒 RNA 混合模板以及单一模板中均可扩增出特异条带,与预期大小(INFA:212 bp,INFB:489 bp,HRV:380 bp,H1N1:153 bp)一致。PCR 产物测序结果亦显示扩增产物序列为这 4 种病毒的特异序列。表明所建立的多重 RT-PCR 法可用于 INFA、INFB、HRV 和 H1N1 的检测(图 1)。



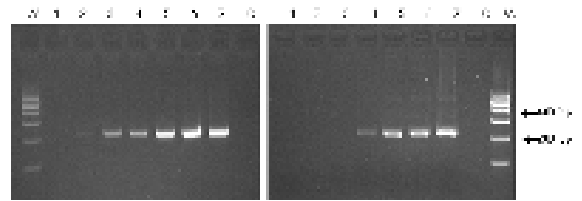
M:600 DNA marker;1:H1N1;2:INFA;3:RV;4:INFB;5:INFA+INFB+RV+H1N1;6:阴性对照。

图 1 多重 RT-PCR 检测 H1N1、INFA、HRV 和 INFB 结果



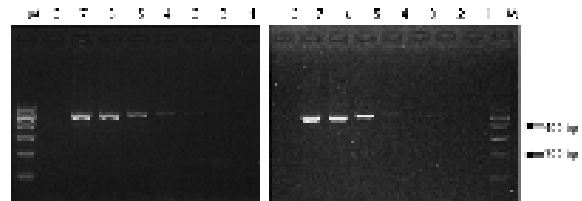
M:600 DNA Marker;1:肺炎链球菌;2:肺炎克雷伯菌;3:铜绿假单胞菌;4:金黄色葡萄球菌;5:大肠杆菌;6:粪肠球菌;7:H1N1;8:阴性对照。

图 2 多重 RT-PCR 特异性检测



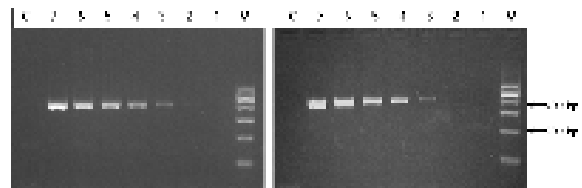
左:单一 RT-PCR 电泳图;右:多重 RT-PCR 电泳图。M:Marker 600;C:阴性对照;1~7:梯度浓度为 10<sup>1</sup>~10<sup>7</sup> copies/mL 模板扩增产物。

图 3 多重 RT-PCR 检测 INFA 的敏感性



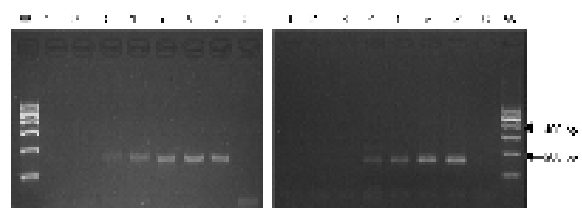
左:单一 RT-PCR 电泳图;右:多重 RT-PCR 电泳图。M:Marker 600;C:阴性对照;1~7:梯度浓度为 10<sup>1</sup>~10<sup>7</sup> copies/mL 模板扩增产物。

图 4 多重 RT-PCR 检测 INFB 的敏感性



左:单一 RT-PCR 电泳图;右:多重 RT-PCR 电泳图。M:Marker 600;C:阴性对照;1~7:梯度浓度为 10<sup>1</sup>~10<sup>7</sup> copies/mL 模板扩增产物。

图 5 多重 RT-PCR 检测 HRV 的敏感性



左:单一 RT-PCR 电泳图;右:多重 RT-PCR 电泳图。M:Marker 600;C:阴性对照;1~7:梯度浓度为 10<sup>1</sup>~10<sup>7</sup> copies/mL 模板扩增产物。

图 6 多重 RT-PCR 检测 H1N1 的敏感性

**2.2 多重 RT-PCR 的特异性检测** 以所建立的多重 RT-PCR 方法对其他常见病原体核酸进行检测,结果均未观察到扩增

条带,表明所建立的多重 RT-PCR 方法具有很好的特异性(图 2)。

**2.3 多重 RT-PCR 的敏感性检测** INFA、INFB、HRV 和 H1N1 的多重 RT-PCR 最低检测浓度分别为  $10^4$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  copies/mL。而单一 RT-PCR 则分别为  $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^3$ 、 $10^3$  copies/mL。多重 RT-PCR 检测的敏感性略低于单一 RT-PCR(图 3~6)。

### 3 讨 论

2009 年初墨西哥甲型 H1N1 流感暴发,疫情迅速在全球范围内蔓延<sup>[4]</sup>。2009 年 6 月 11 日,WHO 宣布将流感大流行警告级别提升为 6 级。进入冬季以来,已进入第 2 个疫情高峰,截至 2009 年 12 月 4 日,WHO 共接到报告因甲型 H1N1 流感死亡病例 8 768 例。截止 2009 年 11 月 30 日,中国内地累计报告 92 904 例甲型 H1N1 流感确诊病例,因甲型 H1N1 流感所致的死亡病例达 200 例。

有效防控疫情必须坚持早发现、早诊断、早隔离和早治疗的原则,因此,及时进行实验室诊断,对临床治疗和疫情防控工作至关重要。目前,呼吸道病毒的实验室诊断主要包括病毒分离培养、血清学诊断、病毒抗原荧光检测和核酸检测等方法。病毒分离培养设备和技术要求高,鉴定周期长,不利于疫情的应急处理。血清学诊断需采取急性和恢复期的血液标本,只能起到回顾性诊断作用。病毒抗原荧光检测其敏感性和特异性较低,且不能区分季节性流感和新型甲型 H1N1 流感,不能用于确诊。核酸检测与病毒分离、血清学诊断、病毒抗原快速检测等方法相比,具有检测灵敏度高、特异性强、检测时间短等优点,已被卫生部定为确诊的检测方法之一。

现阶段上呼吸道感染的流行病学呈甲型 H1N1 流感暴发为主、季节性流感和常见呼吸道病毒流行并存的特点,急需可以有效分辨患者致病病原体的检测方法。目前,多种病原体核酸筛查技术有多重 RT-PCR、多重 real-time PCR 和基因微阵列检测技术<sup>[5-6]</sup>。多重 real-time PCR 技术核酸扩增和检测在同一反应密封管中同时进行,具有灵敏度高、特异性强、准确快速的特点,但是其引物和探针设计较为困难,并且需要具备多通道检测能力的 real-time PCR 仪<sup>[7]</sup>。基因微阵列检测技术作为一种检测新技术,最大的特色在于其高通量检测,可以分析海量信息,而其研制、运行成本高昂,也限制了其大规模应用<sup>[8-9]</sup>。虽然多重 RT-PCR 检测方法仅为定性检测,但其发展较为成熟,在保持了较高特异性和敏感性的同时,研制周期和成本明显低于 real-time PCR 和基因芯片,有利于在临床的广泛应用<sup>[3]</sup>。

本研究利用多重 RT-PCR 技术,建立了 INFA、INFB、HRV 和 H1N1 4 种呼吸道病毒的检测方法。在设计中根据减小各引物间 Tm 值差、目的片段在 500 bp 以下、引物长度保持在 20~25 mer、GC 含量在 50%~60%的原则<sup>[10]</sup>,设计了 4 对

引物。在实验中针对引物与模板的浓度比例,酶量及缓冲液离子浓度,变性、退火、延伸时间等影响因素进行优化,检测结果特异性高,仅敏感性稍低于单一 RT-PCR 检测技术,完全满足临床诊断的需要。因此,本研究的多重 RT-PCR 技术,为甲型 H1N1 流感病毒暴发流行时期,呼吸道感染的病原学诊断提供了有效的实验室检测手段。

### 参考文献:

- [1] Smith GD. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic [J]. *Nature*, 2009, 459(7250):1122.
- [2] 曾凡胜,陆学东,王琼. 多重 RT-PCR 技术检测儿童呼吸道标本中的常见病毒[J]. *现代检验医学杂志*, 2009, 24(3):121.
- [3] Lam WY. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(11):3631.
- [4] 代涛,池慧,许培扬. 甲型 H1N1 流感疫情进展与应对策略综述[J]. *中国健康教育*, 2009, 25(8):602.
- [5] Ieven M. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections [J]. *Journal of Clinical Virology*, 2007, 40(4):259.
- [6] Fox JD. Nucleic acid amplification tests for the detection and analysis of respiratory viruses; the future for diagnostics [J]. *Future Microbiology*, 2007, 2(2):199.
- [7] Brittain LR. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections [J]. *Journal of Clinical Virology*, 2008, 41(1):53.
- [8] Kumar S. Detection of 11 common viral and bacterial pathogens causing community-acquired pneumonia or sepsis in asymptomatic patients by using a multiplex reverse transcription-PCR assay with manual (enzyme hybridization) or automated (electronic microarray) detection [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(9):3063.
- [9] Quan PL. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by GreeneChipResp oligonucleotide microarray [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(8):2359.
- [10] 赵海龙,姜涛,陈水平. 重要呼吸道病毒病原的多重 RT-PCR 检测 [J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31(9):890.

(收稿日期:2010-01-25 修回日期:2010-04-26)

(上接第 1371 页)

et al. Myocardial protection from ischemia reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106:1511.

- [7] Azuma J, Taniyama Y, Takeya Y, et al. Angiogenic and

antifibrotic actions of hepatocyte growth factor improve cardiac dysfunction in porcine ischemic cardiomyopathy [J]. *Gene Ther*, 2006, 13:1206.

(收稿日期:2010-01-25)