

• 基础实验研究论著 •

A 组轮状病毒 G1 和 G9 亚型的二重 qPCR 检测

徐 垚, 曹以诚[△], 李 晖, 方 苓, 祖冬梅

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘 要:目的 建立快速检测 A 组轮状病毒 G1 和 G9 亚型的二重实时荧光定量 PCR(qPCR)检测法。方法 针对 A 组轮状病毒 G1 和 G9 亚型 VP7 基因的保守区域与高变区域,设计特异的引物、探针。构建含 A 组轮状病毒 G1 和 G9 亚型 VP7 基因的质粒,将其作为该检测系统的阳性标准品,优化 A 组轮状病毒 G1 和 G9 亚型的 qPCR 检测系统。结果 该方法检测 A 组轮状病毒 G1 和 G9 亚型阳性样本的灵敏度为 10^3 copies/ μ L,对其他亚型的标准质粒检测呈阴性。结论 本实验建立的 A 组轮状病毒 G1 和 G9 亚型的二重 qPCR 检测方法具有良好的特异度、敏感度和重复性,该方法的应用有助于 A 组轮状病毒 G1 与 G9 亚型感染的早期快速诊断。

关键词:轮状病毒属; 聚合酶链反应; 核酸探针

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)16-2070-03

The duplex qPCR assay for G1 and G9 subtypes of group A Rotavirus

Xu Yao, Cao Yicheng[△], Li Hui, Fang Ling, Zu Dongmei

(School of biological science and engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: Objective To establish a real-time quantitative PCR(qPCR) assay for G1 and G9 subtypes of group A Rotavirus. **Methods** Primers and probes were designed according to the conservative and hypervariable region of VP7 gene carried by group A Rotavirus. 2 pairs of specific primers and 2 types of TaqMan probes were designed. Standard plasmids carrying VP7 gene of the 2 subtypes of group A Rotavirus were constructed respectively in vitro, which were used as standard template to optimize the duplex qPCR assay. **Results** The sensitivity of the assay was 10^3 copies/ μ L, and negative results were observed when the duplex qPCR assay was applied to positive specimens of other subtypes of group A Rotavirus. **Conclusion** The duplex qPCR assay established for the detection of G1 and G9 subtypes of group A Rotavirus has good specificity, sensitivity and repeatability. The application of this assay is helpful in rapid diagnosis for early infection of G1 and G9 subtypes of group A rotavirus.

Key words: Rotavirus; polymerase chain reaction; nucleic acid probes

轮状病毒是导致婴幼儿腹泻的重要病原体之一,6~24 月龄的婴幼儿是轮状病毒感染的极高危人群^[1]。全世界每年因轮状病毒感染导致的婴幼儿死亡大约为 900 000 例,大多发生在发展中国家。轮状病毒有很多亚型,目前的检验设备与方法只能检出是否感染了该病毒,而不能检测出病毒的亚型。有文献报道,婴幼儿在接种轮状病毒疫苗后仍有感染该病毒的可能,且疫苗对轮状病毒不同亚型的交叉预防性差^[2]。为了使预防和治疗更具有靶向性,对轮状病毒进行分型具有重要意义。轮状病毒基因是由 11 个不连续的双链 RNA 节段组成,分别编码 6 种结构蛋白(VP1~VP4, VP6 和 VP7)和 5 个非结构蛋白(NSP1~NSP5)^[3]。根据轮状病毒内壳蛋白 VP6 抗原性的不同和病毒基因组 RNA 片段电泳条带排列的差异,轮状病毒被分为 A~G 7 组。A 组主要感染婴幼儿^[4],轮状病毒疫苗也是针对 A 组开发的。根据 VP7 基因保守序列与高变序列,将 A 组轮状病毒分为不同的亚型,不同亚型间 VP7 基因的差异存在于 VP7 基因的高变区。在中国, A 组轮状病毒中的 G1、G2、G3、G4、G9 这 5 种亚型较为常见^[5]。本研究选取感染率较高的 G1 和 G9 亚型,参照相关文献设计了用于扩增 VP7 基因的全长的引物^[6],以及对 G1 和 G9 亚型特异的引物和探针^[7-8],建立了 A 组轮状病毒 G1 和 G9 亚型的二重实时荧光定量 PCR(qPCR)快速检测法。

1 材料与方法

1.1 病毒样品来源 A 组轮状病毒 G1、G2、G3、G9 亚型的

RNA 来自广东省疾病预防控制中心,于-80℃冻存。

1.2 仪器与试剂 TaKaRa RNA PCR kit(AMV) Ver. 3.0 反转录试剂盒、PMD18-T 载体试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自大连宝生物公司; HotMaster Taq DNA Polymerase 热启动酶购自 TIANGEN 公司;质粒小提试剂盒 plasmid mini kit I 为 OMEGA 公司产品, ABI7500 型多通道荧光 PCR 仪由 life technologies 公司生产, TC-plus 梯度 PCR 由 Bibby Scientific 公司生产, minispan plus mini 14K 微型离心机购自杭州奥盛仪器有限公司, UV-1800 紫外分光光度计由岛津公司生产。

1.3 方法

1.3.1 引物与 TaqMan 探针的设计 根据 GenBank 数据库中 A 组轮状病毒 G1 和 G9 亚型 VP7 基因的保守序列与高变区,用 DNAMAN 与 primer5.0 软件进行分析比对,参照文献[6]设计用于扩增 VP7 基因的全长的引物(VP7F、VP7R),参考文献[8]设计针对 G1 和 G9 亚型的特异性引物各 1 对(G1F、G1R 与 G9F、G9R), TaqMan 探针各 1 条(G1-探针与 G9-探针)。引物、探针均由 invitrogen 公司合成。VP7 基因全长扩增片段大小为 1 062 bp, G1、G9 特异性扩增片大小分别为 114、132 bp。

1.3.2 二重 qPCR 检测阳性样品的构建 以 A 组轮状病毒 G1、G2、G3、G9 亚型的 RNA 为模板进行反转录,反应体系为 10 μ L(含 50 nmol MgCl₂、1 μ L 10 \times 反转录缓冲液、3.75 μ L 无 RNA 酶的去离子水、10 nmol dNTP 混合物、10 U RNA 酶抑

制剂、2.5 U 的 AMV 反转录酶、5 pmol VP7R 引物、1 μ L 样品 RNA),试剂盒反应条件为 30 $^{\circ}$ C 10min,42 $^{\circ}$ C 30min,99 $^{\circ}$ C 5min,5 $^{\circ}$ C 5 min。然后,将反转录产物(10 μ L)进行 PCR 扩增,反应体系为 50 μ L(含 10 μ L 5 \times PCR 缓冲液,28.75 μ L 去离子水、1.25 U TaKaRa Ex Taq HS、5 pmol VP7F)。PCR 参数设置为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 0.9%的琼脂糖凝胶电泳后,用试剂盒对其进行 DNA 凝胶回收。将得到的 DNA 片段克隆至 pMD18-T 载体中。质粒 pMD18-T-G1、pMD18-T-G2、pMD18-T-G3、pMD18-T-G9 质粒转化得到的阳性克隆菌送 invitrogen 公司进行测序。用紫外分光光度仪测定质粒 DNA 浓度,按照以下公式计算拷贝数:拷贝数(copies/ μ L)= $\frac{NA(copies/mol)\times DNA 浓度(g/\mu L)}{相对分子质量\times 340(g/mol)}$,NA 为阿伏伽德罗常数。

1.3.3 引物和探针浓度的筛选 用质粒浓度为 10⁶ copies/mL 的 pMD18-T-G1 与 pMD18-T-G9 进行 qPCR 检测,将 G1 与 G9 特异性引物和探针终浓度在 0.1~0.6 μ mmol/L 之间进行不同浓度配比,选择引物和探针的最佳浓度。优化后的反应体系:总体积为 25 μ L,其中 G1F 与 G1R 为 10 pmol,G1-探针为 12.5 pmol,G9F 与 G9R 为 12.5 pmol,G9-探针为 7.5 pmol,Mg²⁺ 为 24.75 nmol,甜菜碱 1.875 μ mol,2.5 U 的 HotMaster Taq DNA 聚合酶,2.5 μ L 的 10 \times HotMaster Taq Buffer,dNTP 为 6.25 nmol,余下的用去离子水补齐。qPCR 参数设置:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,62 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,进行 35 个循环。

1.3.4 灵敏度的测定与标准曲线的建立 以 10 倍浓度梯度分别倍比稀释质粒 pMD18-T-G1、pMD18-T-G9,得到从 1 \times 10⁸ copies/ μ L 至 1 \times 10³ copies/ μ L 系列浓度的质粒,将上述浓度梯度的质粒 DNA 作为 qPCR 反应模板,实验重复 3 次。

1.3.5 二重 qPCR 的特异性与抗干扰试验 将质粒 pMD18-T-G1、pMD18-T-G2、pMD18-T-G3、pMD18-T-G9 稀释到 10⁶ copies/ μ L 后按照 1.3.3 中优化后的反应体系进行二重 qPCR 检测,对仪器中的每个检测孔同时收集 FAM 与 JOE 的荧光信号,验证体系对 G1 与 G9 亚型的特异性,G2、G3 亚型作为对照亚型。另外将 G1 亚型和 G9 亚型的质粒按照不同的浓度组合(5 \times 10⁸、5 \times 10⁴ copies/ μ L;5 \times 10⁴、5 \times 10⁸ copies/ μ L)分别进行二重 qPCR 和单重 qPCR 检测,确定浓度相差较大时 G1 亚型与 G9 亚型之间的检测是否存在干扰。

1.3.6 二重 qPCR 的重复性试验 用 5 \times 10⁶ copies/ μ L 和 5 \times 10⁸ copies/ μ L 的 A 组轮状病毒 G1 与 G9 亚型的混合阳性样品,分 2 个标本进行同时检测,来验证荧光定量 PCR 的批内重复性。3 d 后重复检测保存于一 20 $^{\circ}$ C 的模板质粒,同时计算 Ct 值的标准差(s)与变异系数(CV)来验证荧光定量 PCR 的批间重复性。

2 结 果

2.1 引物和探针浓度的确定 用于 A 组轮状病毒 G1 亚型检测的引物(G1F、G1R)浓度为 0.4 μ mol/L,G1-探针浓度为 0.5 μ mol/L;用于 G9 亚型检测的引物(G9F、G9R)浓度为 0.5 μ mol/L,G9-探针浓度为 0.3 μ mol/L,对两种亚型的检测可以获得典型的 S 型曲线,Ct 值稳定在 20 左右。

2.2 灵敏度的测定与标准曲线的建立 G1、G9 亚型的扩增效率分别为 98.21%与 97.02%。对 G1 亚型与 G9 亚型的检测在 10³ copies/ μ L 就能有很明显的荧光曲线,该检测方法对

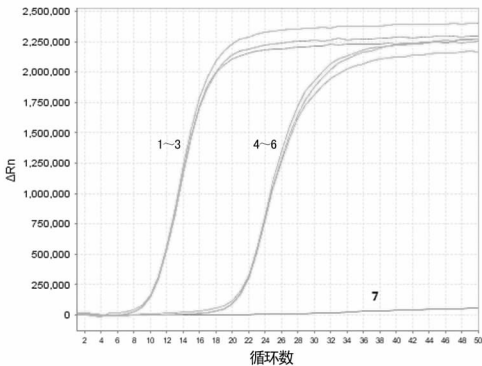
A 组轮状病毒的 G1 和 G9 亚型的检测灵敏度为 10³ copies/ μ L,重复试验结果一致。

2.3 二重 qPCR 的特异性与干扰试验 在反应体系中,加入 G1 或者 G9 亚型的质粒作为模板,以构建好的二重体系进行 qPCR 检测,结果只得到相应亚型的特异性荧光曲线,对照亚型(G2、G3)没有特异的扩增曲线。将 A 组轮状病毒 G1 亚型与 G9 亚型按不同的浓度进行组合,发现一个模板浓度与另一个模板浓度相差 10⁴ 数量级之内时,所建立的方法可以同时检测出 G1 与 G9 亚型,与 G1 亚型单重 qPCR 以及 G9 亚型单重 qPCR 比较,检测的 Ct 值 CV<2%。

2.4 重复性试验 用 5 \times 10⁶ copies/ μ L 的 G1、G9 亚型混合阳性样品和 5 \times 10⁸ copies/ μ L 的 G1、G9 亚型混合阳性样品分别分为 3 个标本同时检测,批内重复性较好,见图 1、2。3 d 后重复检测保存于一 20 $^{\circ}$ C 的模板质粒,CV_{批间}<2%,见表 1。

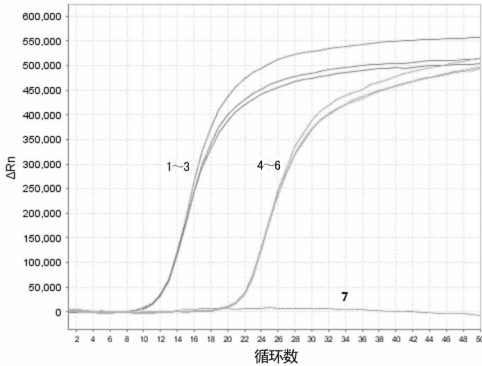
表 2 二重荧光定量 PCR 的批间重复性

模版	不同检测时间的 Ct 值				
	1 d	4 d	7 d	s	CV(%)
G1 亚型质粒					
5 \times 10 ⁶ copies/ μ L	20.25	20.38	20.02	0.182	0.91
5 \times 10 ⁸ copies/ μ L	10.35	10.11	10.32	0.131	1.27
G9 亚型质粒					
5 \times 10 ⁶ copies/ μ L	20.33	19.99	20.66	0.335	0.84
5 \times 10 ⁸ copies/ μ L	10.86	10.75	10.93	0.091	1.11



1~3:5 \times 10⁸ copies/ μ L 的混合质粒样品;4~6:5 \times 10⁶ copies/ μ L 的混合质粒样品;7:空白对照。

图 1 二重 qPCR 检测 G1 亚型的批内重复性试验



1~3:5 \times 10⁸ copies/ μ L 的混合质粒样品;4~6:5 \times 10⁶ copies/ μ L 的混合质粒样品;7:空白对照。

图 2 二重 qPCR 检测 G9 亚型的批内重复性试验

3 讨 论

轮状病毒感染的治疗无特效药,疫苗是控制疾病最重要的措施,能极大地降低轮状病毒在世界范围内,尤其是发展中国家与低收入国家导致的死亡^[9]。快速诊断出某一时间某一地区轮状病毒感染的亚型,再配合相应疫苗进行防控,对抑制疫情的爆发具有重要意义。

现有的轮状病毒检测方法存在诸多不足,例如:电泳法价格昂贵,技术要求高;病毒分离培养法操作繁琐,周期较长;核酸杂交法和酶联免疫法的灵敏度较低;常规的 PCR 方法只能扩增一种模板,扩增产物需电泳鉴定,不仅不能在短时间内完成大批量的检测,还容易造成交叉污染而出现假阳性。光谱学的方法,虽然灵敏有效,但不能同时处理大批量样品^[10]。目前,除常规的 RT-PCR 外,反转录巢式和半巢式 PCR,免疫 PCR 以及 qPCR 已被用于轮状病毒的检测^[11-14]。qPCR 具有灵敏度高,特异性强,实时性好的优点,早已用于分子诊断的开发^[15],并且采用探针法可做多重检测^[16]。多重 qPCR 以单重 qPCR 为基础,在体系中加入多对引物和多条探针,通过探针上不同的发光基团对病毒亚型进行区分,在样品处理量较大时,可以节省成本与时间,能够做到快速、灵敏、高通量。但是,多重荧光定量体系较为复杂,对引物试剂的要求较高,同时还要保证不同探针的荧光基团之间没有互相干扰。

本研究使用的 2 条探针 5'端分别标记荧光基团 FAM 和 JOE,3'端都标记同样的淬灭基团 BHQ1,大大降低了背景值。在 S 型曲线中,平台期的出现主要靠引物和探针的用量来控制。且二重反应中各组分的量都比单重荧光多,某一引物过量,则会夺取反应体系,使另一个反应受到抑制,通过反复筛选,本研究得出了优化后的反应体系。

本研究建立的方法可以通过对标准品绘制标准曲线,采用绝对定量的方法估算出样品中病毒的含量^[17]。轮状病毒感染的患者往往会出现混合感染的情况,且在混合感染中一种亚型的量与另一种亚型的量可能相差较大。本研究所构建的检测体系中,当混合模板浓度相差 10^4 倍时依然可以检测到 2 种亚型,说明此方法适用于 G1 与 G9 亚型的临床检测。同时,此方法的检测限为 10^3 copies/ μ L,结果稳定可靠,有助于 A 组轮状病毒 G1 与 G9 亚型的早期诊断。该方法容易掌握,且所需的时间短,在 2 h 以内即可完成检测过程;特异度高,可准确诊断出 G1 与 G9 亚型的感染情况,适合基层单位使用,同时也为轮状病毒不同亚型展开细致而深入的流行病学调查研究打下了基础。

参考文献

- [1] 王娟,刘寓,李莲.不同年龄段婴幼儿腹泻轮状病毒感染分析[J].价值工程,2011,30(34):278.

- [2] Glass RI,Parashar UD,Bresee JS,et al. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges [J]. Lancet, 2006, 368 (9532):323-332.
- [3] 金奇.医学分子病毒学[M].北京:科技出版社,2001:565-578.
- [4] Parashar UD,Gibson CJ,Bresee JS,et al. Rotavirus and severe childhood diarrhea[J]. Emerg Infect Dis,2006,12(2):304-306.
- [5] 廖扬,陈军华,朱朝敏,等.重庆婴幼儿轮状病毒分子流行病学特征及相关临床资料分析[J].第三军医大学学报,2010,32(1):77-80.
- [6] 陈元鼎,刘晓,熊新宇,等. A 组人轮状病毒全基因组克隆和基因型分析[J].中国生物工程杂志,2008,28(2):25-31.
- [7] Gouvea V,Glass RI,Woods P,et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens[J]. J Clin Microbiol,1990,28(2):276-282.
- [8] Kottaridi C,Spathis AT,Ntova CK,et al. Evaluation of a multiplex real time reverse transcription PCR assay for the detection and quantitation of the most common human rotavirus genotypes [J]. J Virol Methods,2012,180(1/2):49-53.
- [9] Fischer Walker CL,Black RE. Rotavirus vaccine and diarrhea mortality:quantifying regional variation in effect size[J]. BMC Public Health,2011,11(Suppl 3):S16.
- [10] Driskell JD,Zhu Y,Kirkwood CD,et al. Rapid and sensitive detection of rotavirus molecular signatures using surface enhanced Raman spectroscopy[J]. PLoS One.2010,19,5(4):e10222.
- [11] 陈小岳,谈立峰,吉俊敏,等.水体中轮状病毒实时荧光 RT-PCR 法检测[J].中国公共卫生,2009,25(2):242.
- [12] 张德友,何晓青,程莉,等.轮状病毒检测技术概述[J].现代农业科学,2009,16(2):11-12.
- [13] 陈小金,陈建飞,时洪艳,等.猪轮状病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].中国兽医科学,2010,40(2):174-179.
- [14] Modaress S,Rahbarimanesh AA,Edalat R,et al. Human rotavirus genotypes detection among hospitalized children,a study in Tehran,Iran[J]. Arch Iran Med,2011,14(1):39-45.
- [15] Liu Y,Shi ZX,Ma YK,et al. Development of SYBR green I real-time RT-PCR for the detection of Ebola virus[J]. Bing Du Xue Bao,2012,28(5):567-571.
- [16] Vandemeulebroucke E,De Clercq K, Van der Stede Y,et al. A proposed validation method for automated nucleic acid extraction and RT-qPCR analysis: an example using Bluetongue virus[J]. J Virol Methods,2010,165(1):76-82.
- [17] 唐永凯,贾永义.荧光定量 PCR 数据处理方法的探讨[J].生物技术,2008,18(3):89-91.

(收稿日期:2013-03-12)

(上接第 2069 页)

- integrins in poultry litter[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2004, 101(18):7118-7122.
- [10] Xu Z,Li L,Shirtliff ME,et al. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrins in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in southern China[J]. J Clin Microbiol,2009,47(1):230-234.
- [11] Gu B,Pan S,Wang T,et al. Novel cassette arrays of integrins in

clinical strains of Enterobacteriaceae in China[J]. Int J Antimicrob Agents,2008,32(6):529-533.

- [12] Xu H,Su Z,Wang S,et al. Four novel resistance integron gene-cassette occurrences in bacterial isolates from zhenjiang, China [J]. Curr Microbiol,2009,59(2):113-117.

(收稿日期:2013-03-08)