·技术与方法·

五种主要上呼吸道病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立

陈 勇 李耀辉△ 阎 芳 邵建新 王小柯

(潍坊医学院 山东 潍坊 261053)

摘要 目的：建立甲型、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒 A 型、B 型(RSV-A、RSV-B)和腺病毒(ADV)五种主要上呼吸道病毒的多重 RT-PCR 检测方法。方法：利用 Primer premier5.0 分别针对甲型流感病毒的 M 基因、乙型流感病毒的 PB1 基因、RSV-A 和 RSV-B 的 F 基因及 ADV 的 hexon 基因设计五对特异性引物，对 Mg^{2+}、dNTP、引物浓度及退火温度等进行优化，建立同时检测甲型、乙型流感病毒、RSV-A、RSV-B 和 ADV 的多重 RT-PCR 方法，并验证该检测方法的灵敏性。结果：所建立的五种病毒的多重 RT-PCR 方法可以同时或者分别扩增甲型、乙型流感病毒、RSV-A、RSV-B 及 ADV 的 141bp、635bp、525bp 、377b 和 283bp 基因片段，敏感度分别达到 770PFU/ml、800PFU/ml、680PFU/ml、970PFU/ml 和 850PFU/ml，且五种病毒间无交叉反应。结论：所建立的多重 RT-PCR 方法可以迅速准确地检测甲型、乙型流感病毒、RSV-A、RSV-B 和 ADV，为五种病毒的检测提供了一种方便易行的方法。

关键词：流感病毒；呼吸道合胞病毒；多重 RT-PCR

中图分类号：R373.1 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273(2012)07-1342-04

Establishment of Multiplex RT-PCR for Detecting Five Kinds of Main Respiratory Viruses

CHEN Yong, LI Yao-hui△, YAN Fang, SHAO Jian-xin, WANG Xiao-ke

(Weifang medical college, Shandong Weifang, 261053, China)

ABSTRACT Objective: To establish multiplex RT-PCR method for detecting five kinds of main respiratory viruses such as influenza A and B virus, respiratory syncytial virus (RSV) types A and B and adenovirus(ADV). Methods: Five pairs of specific primers were designed with the Primer Premier 5.0 to detect M gene of influenza A virus,PB1 gene of influenza B virus, F gene of RSV-A、RSV-B and hexon gene for ADV; the optimal reaction conditions of Mg^{2+} concentration and annealing temperature were optimized to establish a stable and specific multiplex RT-PCR reaction for the rapid detection of four kinds of main respiratory viruses; then the specificity and sensitivity of the RT-PCR reaction were checked. Results: The multiplex RT-PCR reaction established could amplify 141bp, 635bp, 525bp, 377bp and 283bp of influenza A and B virus, respiratory syncytial virus (RSV) types A and B and ADV; the sensitivity were 770PFU/ml, 800PFU/ml, 680PFU/ml, 970PFU/ml and 850PFU/ml and there was no cross-reactivity between the four types. Conclusion: The multiplex RT-PCR reaction established could differential diagnosis of influenza A and B virus, RSV-A, RSV-B and ADV rapidly. It supplied an easy method for detecting five kinds of main respiratory viruses.

Key words: Influenza virus;Respiratory syncytial virus; Multiplex RT-PCR

Chinese Library Classification(CLC): R373.1 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)07-1342-04

前言

上呼吸道感染属于最常见的感染性疾病，其中高达 90%以上由病毒引起，甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒 A 型、B 型、腺病毒及副流感病毒等是上呼吸道感染的主要病毒[1]。目前国内外常见的检测方法有细胞瓶分离培养，血清学方法及多重 RT-PCR 检测方法等[2]。其中多重 RT-PCR 技术可以在一个反应体系中同时扩增多个目的基因，尤其是对于具有相似临床症状和流行病学特征的病原体的鉴别诊断具有重要意义[3,4]。本研究建立了一种可以同时检测甲型流感病毒、乙型流感病毒、RSV-A、RSV-B 和 ADV 五种主要呼吸道病毒的多重 RT-PCR 检测方法，为五种病毒的鉴别诊断提供了迅速、准确的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 甲型流感病毒、乙型流感病毒、RSV-A、RSV-B 和 ADV 五种病毒均为哨点医院送检的阳性咽拭子样本。

1.1.2 试剂 RNA 提取试剂盒(QIAGen RNeasy Mini Kit)、逆转录试剂盒(PROMEGA，USA)、dNTP 、$MgCl_2$、Taq 酶及 PCR 缓冲液(Takara，大连)、DNA-marker (Takara，大连)、琼脂糖粉(OXOID，England)、Gold-View 染色液(赛百盛，北京)。

作者简介：陈勇(1973-)，男，硕士研究生，主要研究方向：生物化学与分子生物学，Tel:13955008650，E-mail:chenyong13456@yahoo.cn

△通讯作者：李耀辉，E-mail：aabbccd11660582@sina.com

(收稿日期：2011-08-30 接受日期:2011-09-23)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.1.3 主要仪器 9700 型 GeneAmp PCR 仪（ABI, USA），电泳仪（BIO-RAD, USA）、凝胶成像系统（FUJIFLIM, Japan）、低温高速离心机（EPPENDORF, Germany）、电子天平（赛多利斯，北京）、超低温冰箱（SANYO, Japan）。

1.1.4 引物设计 根据 Genbank 公布的甲型流感病毒、乙型流感病毒、RSV-A、RSV-B 和 ADV 的基因序列，利用 Blast 软件筛选出各病毒的保守序列，然后利用 primer primeir 5.0 软件设计五对特异性引物，引物由英潍捷基（上海）贸易有限公司合成（见表 1）。

表 1 用于 RT-PCR 扩增的五种病毒的引物

Table 1 Primes of five viruses be used for RT-PCR

病毒 Virus	靶基因 Target gene	引物序列（5'~3'） Primer sequence(5'~3')	扩增片段长度(bp) Amplication size(bp)
Influenza A virus	M	F: ARA ACA CMG ATC TTG AGG C	141
		R: TYT GGA CAA AGC GTC TAC G	
Influenza B virus	PB1	F: TTA CCC GAA GAY AAT GAG C	635
		R: TTT GAC AGT TTG GCT TTC T	
RSV-A	F	F: TCA GTA TCT TTY TTC CCA CA	525
		R: GGT KGA TTT ACC AGC ATT TA	
RSV-B	F	F: TGC AAT CTT CYT AAC TCT T	377
		R: GTT TCC TCT TCT TGC TTA T	
ADV	Hexon	F: TGG GCG TAC ATG CAC ATC G	283
		R: GGA TGT CAA AGT AAG TGC T	

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取 病毒 RNA 提取依据 QIAamp Viral RNA Mini Kit 使用说明书进行。

1.2.2 cDNA 的反转录 先取 5μl 病毒 RNA、2μl 灭菌双蒸水和 1μl random primer 加入 0.2ml 反应管中，置于 95℃，2min，冰浴 2min，然后加入 $Mgcl_2$（25mM）4μl、dNTP mix（10mM）2μl 和 Reverse Transcription 10× buffer 2μl，AMV 逆转录酶 1μl，Rnasin 0.5μl，使终体积为 20μl，42℃ 90min，72℃ 10min，将 cDNA 放于 -20℃冰箱备用。

1.2.3 五种病毒单重 RT-PCR 扩增反应 经过多次实验确定 PCR 反应在 25μl 的体系中进行：10× buffer2.5 μl，$Mgcl_2$（25mM）1.5μl，dNTP（2.5mM）2.5μl，引物（20μM）1.0μl，cDNA 模板各 2μl，TaqDNA 聚合酶 2.5U，用双蒸水补足至 25μl。反应条件为：94℃预变性 5min；94℃ 30s；47.0℃ 40s；72℃ 1min；35 个循环；72℃延伸 10min。取 7μl PCR 产物，与 1μl 6× 加样缓冲液混合上样，1.5%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.2.4 多重 RT-PCR 的特异性实验 分别应用四种病毒的单一引物检测四种病毒的混合模板；混合引物检测单一病毒模板来验证引物的特异性。

1.2.5 多重 RT-PCR 最佳反应条件的优化 由于 PCR 反应体系中主要的影响因素有引物浓度、Mg^{2+} 浓度和退火温度等，因此本实验在初步建立的多重 RT-PCR 反应的基础上分别对引物浓度、Mg^{2+} 浓度、dNTP 和退火温度进行了优化。

1.2.6 多重 RT-PCR 检测敏感性实验 将五种病毒阳性样本接种于 BHK21 细胞，待病毒病变到 80%～90%的时候收获，并于 -80℃冰箱反复冻融三次后 10 倍系列稀释，加入 96 孔板内，每孔加 100μl，每个稀释度加入 4 孔，最后 4 孔加入正常细胞作对照，置 37℃培养箱孵育 1h，取出培养板吸取病毒液，加入维持液 150μl 后 37℃培养箱培养，逐日观察并记录细胞病变情况，一共观察 10 天，重复 3 次，然后采用 Reed-Muench 法计算甲型、乙型流感病毒、RSV-A、RSV-B 和 ADV 的滴度分别为 7.7 × 10^6PFU/ml、8.0 × 10^6PFU/ml、6.8 × 10^6PFU/ml、9.7 × 10^6PFU/ml 和 8.5× 10^6PFU/ml。五种病毒液各取 100μl 混合，10 倍倍比稀释，每个稀释度取 140μl 提取病毒 RNA，然后应用优化好的多重 RT-PCR 反应体系来评估所建立的多重 RT-PCR 方法检测五种病毒的敏感性。

2 结果

2.1 五种病毒单重 RT-PCR 反应

甲型流感病毒、乙型流感病毒、RSV-A、RSV-B 和 ADV 五种病毒的 RT-PCR 反应体系分别能扩增出 141bp、635bp、525bp、377bp 和 283bp 的目的片段，见图 1-5。

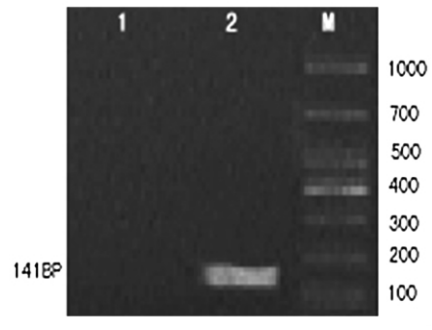

图 1 甲型流感病毒 RT-PCR 结果

Figure 1 RT-PCR result of influenza A

1:Negative control;2: Influenza A

M :DL1000 DNA Marker

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

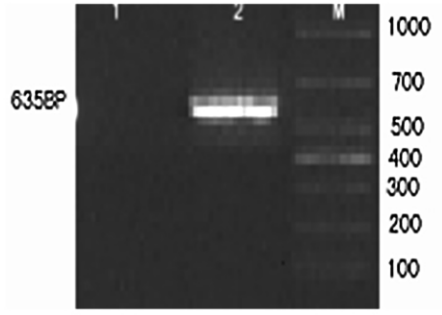

图 2 乙型流感病毒 RT-PCR 结果

Figure 2 RT-PCR result of influenza B

1:Negative control;2: Influenza B

M :DL1000 DNA Marker

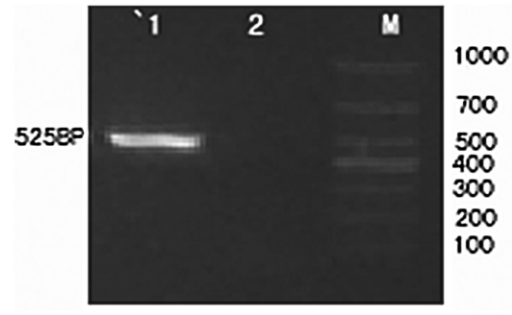

图 3 RSV-A RT-PCR 结果

Figure 3 RT-PCR result of RSV-A

1 :RSV-A; 2:Negative control

M :DL1000 DNA Marker

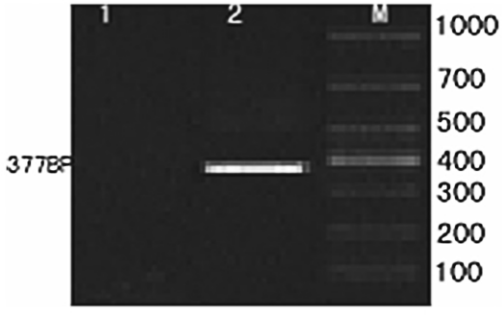

图 4 RSB-B RT-PCR 结果

Figure 4 RT-PCR result of RSV-A

1 :Negative control; 2:RSV-B

M :DL1000 DNA Marker

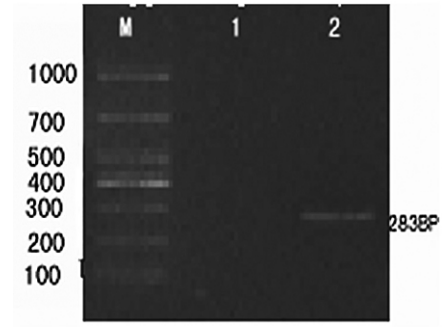

图 5 ADV RT-PCR 结果

Figure 5 RT-PCR result of ADV

1:ADV;2:Negative control

M:DL1000 DNA Marker

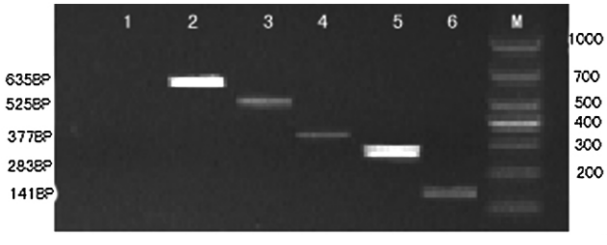

图 6 单一引物检测混合病毒模板

Figure 6 To detect mixture virus templates with single primer

1 :Negative control;2 :Influenza B virus;3:RSV-A;4 :RSB-B;

5 :ADV;6 :Influenza A virus; M :DL1000 DNA Marker

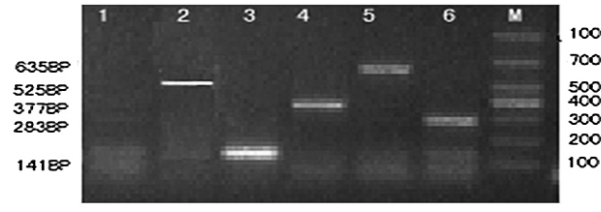

图 7 混合引物检测单一病毒模板

Figure 7 To detect single virus template with mixed primers

1 :Negative control;2 :RSV-A ;3 :Influenza A virus;4 :RSB-B ;

5 :Influenza B virus ;6 :ADV ;M :DL1000 DNA Marker

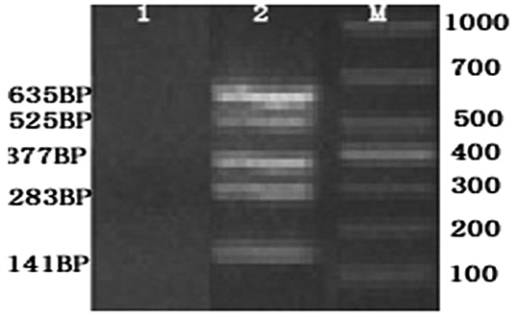

图 8 优化好的五重 RT-PCR 反应体系

Figure 8 Optimization of five-RT-PCR reaction system

1:Negative control;2 :result of five RT-PCR

M :DL1000 DNA Marker

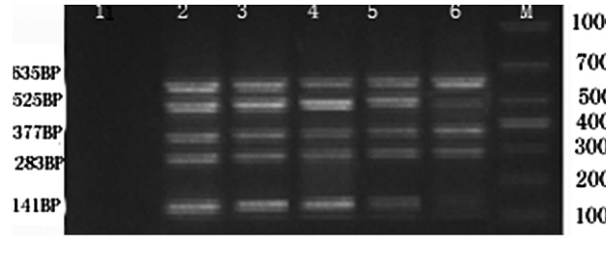

图 9 五种病毒 RT-PCR 反应灵敏度检测结果

Figure 9 Sensitivity of RT-PCR for detection of five viruses

1 :Negative control; 2:100; 3 :10-1; 4 :10-2; 5 :10-3; 6 :10-4;

M :DL1000 DNA Marker

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 多重 RT-PCR 的特异性实验

四种病毒的单一引物只能从混合模板中检测出相应的病毒核酸，四种病毒的混合引物只能分别检测出相应的单一病毒核酸模板的目的片段，见图 6、7。

2.3 多重 RT-PCR 反应条件的优化

经过多次摸索最终确定多重 RT-PCR 反应体系的最佳条件（25 μl）：dNTP（2.5mM）3.0 μl，10 × buffer2.5 μl，$Mgcl_2$（25mM）2.0μl，引物（20μM）各 1.0μl，混合模板为 4.0μl，退火温度为 47.0℃，40s，总循环数为 35 个循环，如图 8。

2.4 优化后多重 RT-PCR 反应敏感性测定

将五种病毒的混合病毒液分别倍比稀释为 10^0、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}，以优化好的多重 RT-PCR 体系进行扩增检测，每个稀释度同时做三个重复实验，结果甲型流感病毒、乙型流感病毒、RSV-A、RSV-B 和 ADV 五种病毒均可以检测到 10^{-4} 的样品，即灵敏度分别为 770PFU/ml、800PFU/ml、680PFU/ml、970PFU/ml 和 850PFU/ml，如图 9。

3 讨论

上呼吸道感染可以由多种病毒引起，如流感病毒、呼吸道合胞病毒（RSV）、副流感病毒、腺病毒等，在临床上有很高的发病率和死亡率[5]，因此准确、迅速地对上呼吸道病毒感染做出鉴别诊断，有助于改善症状，降低发病率和死亡率[6]。常见的检测方法为病毒的细胞培养或者抗原检测，但是这几种方法存在不足：由于病毒感染有一定的潜伏期，因此标本的采集有时间限制；而抗原检测敏感性和特异性较低，容易产生假阴性结果，导致漏诊[7]。研究表明，利用分子生物学方法对呼吸道病毒进行检测可以有效提高病毒的检出率及特异性，有实验证明，PCR 比病毒分离培养所侦测到的阳性高 5 倍以上，且与血清学检测方法比较，可以直接对抗原进行检测，有助于早期诊断。多重 RT-PCR 技术是在常规的 PCR 技术上经过改进所发展起来的新型 PCR 扩增技术，能够在一个 PCR 反应体系内同时扩增多个目的 DNA 片段，以实现对多种病原体的同时检测[8-10]。

人群中常见的甲型流感病毒为 H1N1、H3N2 和 H5N1 等，因此我们主要选取了三种亚型病毒的 M 基因序列进行了设计引物；腺病毒目前已知有 52 种亚型，不同亚型间变异较大，查阅相关文献后，我们选取了腺病毒高度保守的 hexon 基因进行了引物设计。本研究针对五种主要上呼吸道感染病毒设计了五对特异性引物，分别用于在同一个 PCR 反应体系中同时对五种病毒进行检测。研究中主要对多重 RT-PCR 的反应条件进行了优化，以保证在最低的成本和时间下，对五种病毒目的基因进行高效扩增，而多重 RT-PCR 反应中的主要影响因素为引物浓度、Mg^{2+} 浓度和退火温度[11]。Mg^{2+} 离子浓度对 PCR 扩增效率影响很大，浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性，浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败而不出扩增条带；引物浓度过高，容易产生二聚体导致扩增效率下降，而浓度过低则扩不出目的条带；退火温度是另一个最重要的调整条件，如果多重 RT-PCR 扩增产生非特异性的条带，就应该适当的增加引物的退火温度，反之则减少反应的退火温度。其中通常在单重 RT-PCR 的基础上将退火温度降低 4～6℃ 对于多重 RT-PCR 中扩增出同样的片段是必要的[12-13]，经过优化，确定 $Mgcl_2$（25mM）2.0μl，引物（20μM）各 1.0μl，退火温度为 47.0℃，退火时间 40s。

特异性和敏感性是评价多重 RT-PCR 的主要指标，我们分别应用四种病毒的单一引物检测四种病毒的混合模板来验证引物的特异性，结果证明所建立的多重 RT-PCR 检测四种病毒的方法特异性很好；敏感性是评价 RT-PCR 的另一重要指标，我们首先利用了 BHK21 细胞对五种病毒进行了培养，然后测定每种病毒液的滴度，并各取 100μl 混合，10 倍倍比稀释，每个稀释度取 140μl 提取病毒 RNA，以优化好的多重 RT-PCR 体系进行扩增检测，每个稀释度同时做三个重复实验，结果五种病毒检测灵敏度分别达到 770PFU/ml、800PFU/ml、680PFU/ml、970PFU/ml 和 850PFU/ml，与报道的多重 RT-PCR 检测方法检测各种病原体所取得的灵敏度较一致[9,14-15]。

本研究还存在不足之处，一方面本研究需要利用建立好的五重 RT-PCR 体系对样本进行检测，来评价该体系；此外本研究只针对甲型流感病毒的 M 基因设计了一对通用引物，下一步应该进行各亚型如新型 H1N1、季节性 H1N1、H3N2、H5N1 等的检测；还需要进一步对更多的上呼吸道病毒如副流感病毒、鼻病毒等进行检测，从而为临床上鉴别诊断各种上呼吸道病毒感染提供理论依据。

参 考 文 献(References)

[1] 居丽雯,蒋露芳,甘愉,等.多重逆转录聚合酶链反应检测主要上呼吸道病毒[J].中国公共卫生,2003,19 (3) :305-307
Ju L-wen, Jiang Lu-fang, Gan Yu, et al. Main respiratory viruses detected by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction [J]. Chin J Public Health Mar, 2003,19 (3): 305-307

[2] Stockton J,Ellis JS,Saville M,et al.Multiplex PCR for Typing and Subtyping Influenza and Respiratory Syncytial Viruses [J]. Journal of Clinical Microbiology,1998, 36: 2990-2995

[3] Druce J, Tran T, Kelly H, et al. Laboratory diagnosis and surveillance of human respiratory viruses by PCR in Victoria, Australia, 2002-2003[J]. JMed Virol, 2005, 75: 122

[4] Heikkinen T, Marttila J, Salmi AA, et al. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40: 4337

[5] Thompson,W.W, Shay, D.K., Weintraub, E., Brammer, L., Cox, N., Anderson, L.J., Fukuda, K., 2003. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States [J]. JAMA, 289, 179-186

[6] Barenfanger,J., Drake, C., Leon,N., et al, 2000. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viru- ses: an outcomes study [J]. J.Clin. Microbiol, 38: 2824-2828

[7] Bellau-Pujol, S.,Vabret, A., Legrand, L., et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses[J]. J.Virol.Methods, 2005, 126: 53-63

[8] Chen HW Wang CH.A multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the genotyping of avian infectious bronchitis viruses [J]. J Avian Dis. 2010, 54(1): 104-108

[9] 王军军,李歆,任瑞文. 4 株蚊媒病毒多重 RT-PCR 快速检测方法的建立[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(8): 918-920
Wang Jun-jun, Li Xin, Ren Rui-wen. Development of Multiplex RT-PCR Methods for Detection of Arboviruses [J]. Journal of Tropical Medicine, 2010, 10(8): 918-920

（下转第 1368 页）

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

481-482

[8] 李沈凯妮. 护士对肿瘤化疗药物的防护与对策[J]. 中华现代护理学杂志, 2008, 5(4): 295- 296
LI Shen-kai-ni. Nurses on the cancer chemotherapy drug prevention and response[J]. China Modern Nursing, 2008, 5(4): 295-296

[9] 初丽妍,贾风铃,管淑荣.护士化疗防护现状调研分析[J].齐鲁护理杂志, 2006, 12(1): 47-48
Chu Li-yan,Jia Feng-ling,Guan Shu-rong. Protection status of investigation and analysis of chemotherapy nurses[J]. Qilu Nursing, 2006, 12(1): 47-48

[10] 石开发.化疗护士的职业防护现状调查及对策[J].护理实践与研究, 2009,6 (15) :124-126
Shi Kai-fa.Chemotherapy nurses occupational protection and counter measures survey[J]. Nursing Practice and Research, 2009, 6 (15) :124-126

[11] Fuchs J, Hengstler JG, Jung D,et al.DNA damage in nursing handling antineoplastic agents[J]. Mutation Reasearch,1995,342: 17-23

[12] Krstev S, Perunicic B,Vidakovic A. Work practice and some adverse health effects in nurses handing antineoplastic drugs [J]. Med Lav, 2003, 94(5): 432-439

[13] 张慧兰,陈荣秀.肿瘤护理学[M].天津:天津科学技术出版社,2000: 18l-184
Zhang Hui-lan, Chen Rong-xiu. Oncology Nursing [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 2000: 18l-184

[14] Yanagawa C. Measures for the disposal of non-regulated alternative medical wastes safe of handling of cytotoxic drugs [J]. Rinsho Byori, 2000,12(Suppl): 120-128

[15] 薛幼华.抗癌化疗药物配制的防护[J].中华临床护理学杂志,2005, 21(1): 31
Xue You-hua. Preparation of protective anti-cancer chemotherapy drugs[J]. Chinese Journal of Clinical Nursing, 2005, 21(1): 31

[16] 贾晓燕,于秀芳,李荣香,等.对护士职业接触化疗药物防护干预的效果评价[J].现代护理,2004,10 (4):326-327
Jia Xiao-yan,Yu Xiu-fang, Li Rong-xiang, et al.Occupational exposure to chemo- therapy drugs for protective effect of intervention evaluation Nurses[J]. Modern Nursing, 2004, 10(4): 326-327

[17] 李哑洁,赵俊文,钟华荪,等.职业接触化疗药物妊娠并发症及结局流行病学调查[J].护理研究,2007, 21(2A):322-323
Li Ya-jie, Zhao Jun-wen, Zhong Hua-sun, et al. Occupational exposure to chemotherapy and outcome of pregnancy complications, epidemiological investigation [J]. Nursing Research, 2007, 21(2A): 322-323

[18] 陈晓铮,吴锦明.化疗药物对护士的职业危害和防护现状及对策[J].中国误诊学杂志, 2007, 7(8): 1751-1752
Chen Xiao-zheng, Wu Jin-ming. Chemotherapy for the occupational hazards and pro- tection of nurses and Countermeasures [J]. Misdiagnosis of China, 2007, 8: 1751- 1752

(上接第 1345 页)

[10] Aradaib IE, Mohamed EH, Abdalla TM, et al. Serogrouping of Unite d States and some Afri can serotypes of bluetongue virus using RT-P CR[J].Vet Microbiol, 2005, 111(324): 1452-1500

[11] Elnifro EM,Ashshi AM,Cooper RJ, et al. Multiplex-PCR:optimization and application in diagnostic virology [J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(4): 559-570

[12] Robertson JM,J Walsh-Weller.An introduction to PCR primer design and optimisation of amplification reactions [J]. Methods MolBiol. 1998, 98: 121-154

[13] Henegariu o, Heerema NA, Dlouhy SR, et al. Multiplex PCR:critical parameters and step-by-step protocol[J]. Biotechniques, 1997, 23 (3): 504-511

[14] Zimmermann K, Schögl D, Plaimauer B, et al. Quantitative multiple competitive PCR of HIV-1 DNA in a single reaction tube [J]. Biotechniques, 1996, 21(3): 480-484

[15] Yang D.K., Kweon C.H., Kim B.H., et al. TaqMan reversetranscription polymerase chain reaction for the detection of Japanese encephalitis virus[J]. J Vet Sci, 2004, 5(4): 345-351

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net