

论 著
(基础研究)

逆转录环介导等温扩增技术检测 H7N9 禽流感病毒基因

张锦海, 陈文琦, 韩一芳, 张 琪, 叶福强, 王太武, 陈乐如, 王长军

【摘要】 目的 建立检测 H7N9 禽流感病毒基因的逆转录环介导等温扩增(reverse transcription Loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)方法,并初步评估应用。**方法** 设计、合成 H7N9 禽流感病毒血凝素(HA)基因、神经氨酸酶(NA)基因的引物组,通过优化参数,建立 RT-LAMP 反应体系,使用梯度稀释的标准品测试该体系检测灵敏度,并使用对比毒株测试特异性,再对 142 份临床标本进行实样检测。**结果** 成功建立了检测 H7N9 禽流感病毒 HA 基因、NA 基因的 RT-LAMP 方法,可直接肉眼观察判读结果,检测其 HA 基因、NA 基因的敏感性分别达到 10 拷贝每反应、5 拷贝每反应,对其他常见呼吸道病原无交叉反应;在测序证实阳性的临床样本中,对于病毒 HA 基因、NA 基因检出率分别为 100%、92.68%。**结论** 逆转录环介导等温扩增技术检测 H7N9 禽流感病毒基因,具有简单、快速、灵敏度高,检测结果可视化,无需特殊设备等优点,在禽流感病原监测上有一定应用前景。

【关键词】 H7N9 禽流感病毒;逆转录环介导等温扩增;检测**【中图分类号】** R373.1**【文献标志码】** A**【文章编号】** 1672-271X(2019)01-0007-05**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.01.002

Rapid Visual Detection of H7N9 avian influenza virus by use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

ZHANG Jin-hai¹, CHEN Wen-qi², HAN Yi-fang¹, ZHANG Qi¹, YE Fu-qiang¹, WANG Tai-wu¹, CHEN Le-ru¹, WANG Chang-jun¹

(1. Department of Infectious Diseases, Center for Disease Control and Prevention of Eastern Theater Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China; 2. Department of Dermatology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective To develop a one-step RT-LAMP method for rapid detection of HA gene and NA gene of H7N9 virus. **Methods** Two sets of specific primers were designed and synthesized according to HA and NA genes of H7N9 virus. The reaction parameters were optimized to improve the RT-LAMP assay for the rapid detection of H7N9 virus. This study also tested the sensitivity and specificity of the RT-LAMP assay, the minimum detection limit of which was evaluated using the gradient dilution RNA templates in vitro transcription. Moreover, the RT-LAMP was applied to 142 clinical specimens for testing. **Results** The RT-LAMP method for detecting the HA gene and NA gene of H7N9 avian influenza virus was successfully established. The results showed that the detection limit for H7 gene is around 10 copies per reaction, which is similar to that of the real time PCR, whereas counterpart of N9 gene is 5

copies per reaction in 100-folds higher sensitivity than the real-time PCR method. The RT-LAMP assay also had good specificity. In the positive specimens confirmed by sequencing, the RT-LAMP detection rate of viral HA gene and NA gene were 100% and 92.68%, respectively. **Conclusion** Considering RT-LAMP's simplicity in operation and high sensitivity, there is potential use in clinical diagnosis and sur-**基金项目:**军队后勤重大项目(AWS16J020)**作者单位:**210002 南京,东部战区疾病预防控制中心疾病预防控制中心(张锦海、韩一芳、张 琪、叶福强、王太武、陈乐如、王长军);210006 南京,南京医科大学附属南京第一医院皮肤科(陈文琦)**通信作者:**王长军, E-mail: ahoi@163.com

veillance of H7N9 virus.

[Key words] H7N9 Avian influenza virus; reverse transcription loop-mediated isothermal amplification; detection

0 引言

H7N9 禽流感病毒自 2013 年在中国首次发现以来至今,造成养殖业重大经济损失^[1],感染人类所致重症肺炎病死率高^[2],威胁公共卫生安全,且有变异获得持续人际传播能力而造成流行的可能性^[3]。联合国粮农组织、世界卫生组织(WHO)和国际兽疫局已联合呼吁各国做好准备,对禽流感病毒进行病原监测和检测,防止疫情蔓延^[4]。在现有的监测、检测方法中,胶体金免疫层析法敏感性较低,严重限制了其在甲型流感检测中的临床使用^[5]; qRT-PCR 的应用瓶颈在于需贵重的仪器,且对检测环境设施的要求和对操作人员的专业和操作技能要求都较高^[6-7]。因此,有必要建立一种操作简便、灵敏快速,甚至有现场检测潜能的 H7N9 禽流感病毒检测新方法。

本研究针对 H7N9 禽流感病毒,建立了一种操作简便,能实现不开盖(即全封闭反应),可仅需水浴锅或微型恒温金属浴而无需其他贵重设备,能实现肉眼可视化检测的逆转录环介导恒温扩增(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)检测方法,并将其与 WHO 推荐的 qRT-PCR 方法进行灵敏度(检出限)测试比较,再用 142 例临床样本(分离毒株、患者标本、禽类标本)进行验证。

1 材料与方法

1.1 毒株与样本 江苏 H7N9 亚型禽流感病毒毒株(A/Nanjing/1/2013, EpiFlu 数据库 ID 为 EPI_ISL_142305)为本实验室保存; H5N1 亚型、H9N2 亚型禽流感病毒、甲型 H1N1 亚型和 H3N2 亚型病毒等对比毒株,为全军急性呼吸道传染病病原监测中心实验室提供。临床样本: 17 份鼻咽拭子、含漱液和气管分泌物标本于 2013 年 4 月至 2017 年 12 月期间 17 例人感染 H7N9 禽流感确诊患者中采集; 115 份禽咽肛拭子从某大型活禽交易市场采集; 10 份 SPF 鸡肛拭子从本单位动物房采集。上述标本均已编码处理(非实名化处理)。

1.2 主要试剂及设备 主要试剂为: RT-LAMP 扩

增所需的 Bst DNA 聚合酶、AMV 逆转录酶购自 NEB(北京)有限公司。羟基萘酚蓝(hydroxy naphthol blue, HNB), 甜菜碱(Glycine betaine)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。病毒 RNA 提取试剂 QIAamp 及 RNA 酶抑制剂购自德国 QIAGEN 公司。实验中所用其他试剂均为分析纯,所用水均为超纯水。主要设备为: 数显水浴锅(江苏金怡公司)或恒温金属浴(杭州博日公司)、7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)及 Nanodrop 2000 分光光度计(美国赛默飞世尔公司)、LA-320C 浊度仪(日本 EIKEN 公司)。

1.3 引物设计和测试 使用分析软件 ClustalX 2.11 将 A/Nanjing/1/2013 株的血凝素(hemagglutinin, HA)基因和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)基因的序列分别与其他甲型流感病毒对应序列(GISAID 流感信息数据库)比对, 遴选 cDNA 核苷酸序列特异性区域, Primer Explorer V4 software (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>)设计引物, 为了加快反应速度, 额外设计了环引物组 LB 和 LF。使用 LA-320c 浊度仪对加入不同引物组的 RT-LAMP 反应进行测试。通过实时浊度曲线(对扩增产物的实时监控形式)筛选出浊度值上升较快、峰值较高、1 h 内未见非特异性扩增的一组引物作为优选^[8]。

1.4 核酸模板制备与体外转录 用 QIAamp 试剂盒按说明书提取样本病毒基因组 RNA, 额外添加 RNA 酶抑制剂后放置 -80℃ 备用。用于灵敏度测试的 RNA 标准品参照文献制备^[9], 用分光光度计测 3 次浓度并取平均值。

1.5 RT-LAMP 反应 对镁离子浓度、反应温度、反应时间和引物配比等参数进行测试优化, 本研究建立的检测 H7N9 禽流感病毒 H7 基因的 RT-LAMP (H7-RT-LAMP) 和检测 N9 基因的 RT-LAMP (N9-RT-LAMP), 反应体系体积均为 25 μL, 含 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)、10 mmol/L KCl、10 mmol/L 的 (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、8 mmol/L MgSO₄、0.8 mmol/L betaine、1.4 mmol/L dNTPs、8U Bst DNA 聚合酶、10 U AMV 逆转录酶和引物组合(FIP 和 BIP 各 1.6 μmol/L、F3 和 B3 各 0.2 μmol/L、LF 和 LB 各 0.8 μmol/L), 以及模板 3 μL。反应体系在

63 ℃ 恒温孵育 30 min, 再 85 ℃ 2 min 灭活酶以停止反应。

1.6 RT-LAMP 产物检测 可使用浊度仪法和肉眼可视化判定法。为便于反应体系条件摸索, 建立体系时使用 LA-320C 浊度仪, 终止反应后浊度值超过 0.1 时则为阳性判定^[10]。可视化判定方法为: 将 HNB 预加入反应体系(终浓度 120 mM), 反应结束后无需开盖, 直接肉眼观察反应液颜色变化(需设定阴、阳性对照作为比色参考), 如反应后溶液显天蓝色(HNB 为金属离子指示剂, 如有扩增反应, 由于大量焦磷酸根离子的生成并消耗了溶液中的 Mg^{2+} , 颜色将由起始的紫罗兰色变为天蓝色)则为阳性判定^[8]。阳性判定标准: C_t 值 < 38 或浊度值 > 0.1 或溶液由紫罗兰色转天蓝色。

1.7 qRT-PCR 方法 参见 WHO 推荐方法 (http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/en/, Real-time RT-PCR Protocol for the Detection of Avian Influenza A (H7N9) Virus)。检测 HA 基因的反应体系称为 H7-rRT-PCR, 检测 NA 基因的反应体系称为 N9-rRT-PCR。本研究探针、引物为 Takara 公司(大连)合成。

1.8 检测方法灵敏度测试 对制备的 RNA 标准品进行 10 倍梯度稀释, 同时应用本研究建立的 RT-LAMP 反应体系和 qRT-PCR 方法进行测试。

1.9 检测方法特异性测试 应用 RT-LAMP 方法检测 H7N9 禽流感病毒及对对比毒株核酸。

2 结 果

2.1 优选引物 通过实时浊度测试优选的引物组

见表 1, 对应检测 HA 靶基因的反应体系称为 H7-RT-LAMP, 检测 NA 基因的反应体系称为 N9-RT-LAMP。

2.2 RT-LAMP 检测方法灵敏度 对梯度稀释标准品检测结果见图 1。RT-LAMP 体系(结果观察采用了浊度法、可视化显色法)检测 HA 基因的灵敏度为 10^1 拷贝每反应, 与对应 qRT-PCR 方法一致, 见图 1a; 但 RT-LAMP 体系检测 NA 基因的灵敏度为 5×10^0 拷贝每反应, 远优于对应 qRT-PCR 方法(检出限为 5×10^2 拷贝每反应), 见图 1b。RT-LAMP 体系对 HA 和 NA 标准品的检测, 反应最快分别在 12 min 和 13 min 即可获得阳性判定结果(浊度值大于 0.1 或反应溶液颜色变化), 而对于各自最低检出限浓度的样品, 也分别可在 22 min 和 23 min 内完成反应和结果判定。

2.3 RT-LAMP 反应特异性 除 H7N9 禽流感病毒核酸外, 其他常见病原(H5N1、H9N2、H3N2、H1N1 流感病毒, 乙型流感病毒, 腺病毒 4 型, 副流感病毒)核酸在针对 H7N9 禽流感病毒 HA 基因和 NA 基因的 RT-LAMP 检测反应体系中均为阴性, 提示特异性较好。见图 2。

2.4 临床样本检测 针对 HA 核酸的检测, RT-LAMP 与 qRT-PCR 检出率一致, 为相同的 41 份标本阳性(HA 基因检出率为 100%)。而针对 NA 核酸的检测, 检出率却差异较明显: 在经测序验证确认的 HA 核酸阳性的 41 份标本中, RT-LAMP 检出 38 份 NA 核酸亦为阳性, HA 与 NA 的阳性符合率为 92.68%; 而对应 qRT-PCR 只检出 17 份为 NA 核酸阳性, 符合率 41.46%。见表 2。

表 1 测试优选的 H7N9 禽流感 RT-LAMP 引物组

反应体系及引物		序列 (5'→3')	靶基因
H7-RT-LAMP			H7N9 病毒血凝素基因(HA) 登录号 KC896774.1 (GenBank)
B3		GAGCCATTTTCATTTCTGCA	
F3		TGAGAGGCGAGAAGGAAG	
BIP		TGACAAGGAAGCAATGGGATTCTCCTGATCTCCTACATGCA	
FIP		GCCTGATTCTCTGAGAAATTTGCCT-TGATGTCTGTTATCCTGGGA	
LB		TGGAATAAGAACTAATGGAGCAACC	
N9-RT-LAMP			H7N9 病毒神经氨酸酶(NA) 登录号: KC896776.1 (GenBank)
B3		ATAGCAGTCCCCCTTCAGC	
F3		GATGGGGCTAACACTTGG	
BIP		TAGATCAAAGCCCATTC AAGGTC-GTCCATGAAAGATCCACTGTA	
FIP		TCAATGCATTTGGCACTTTTAACAT-TAGGGAGGACAATAAGCAC	
LF		CGTATCCAGACCTCGAGGCT	

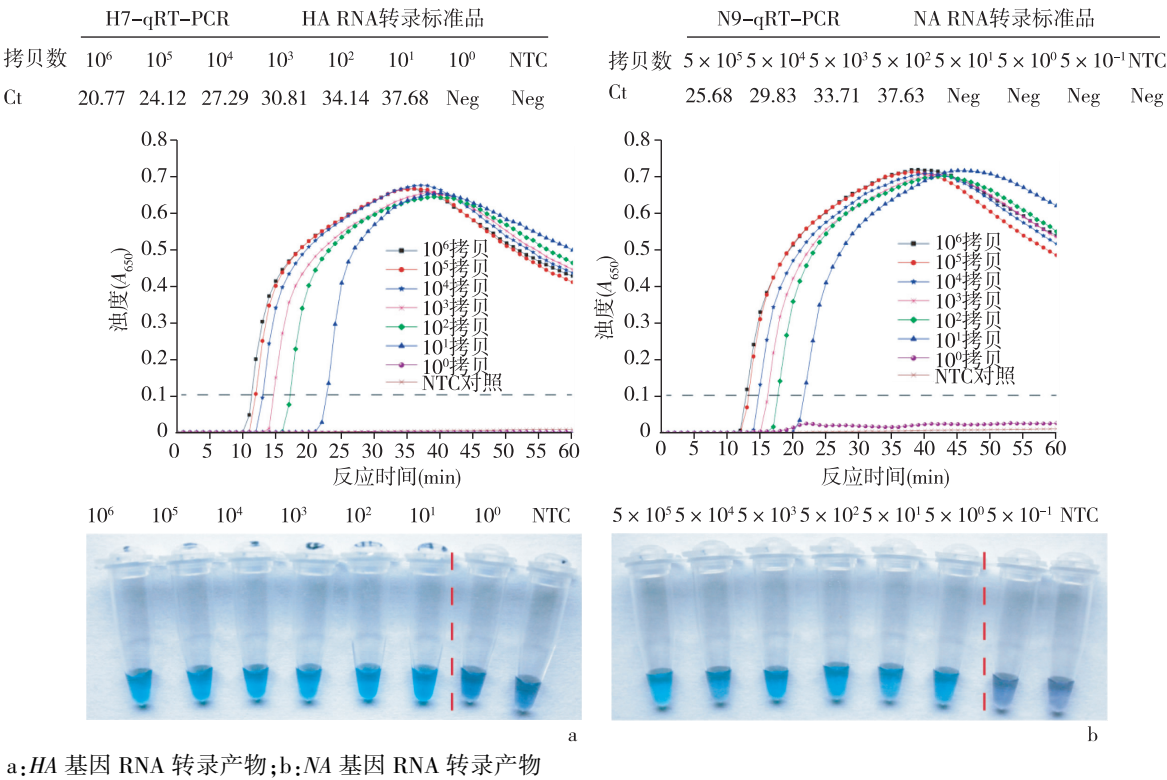
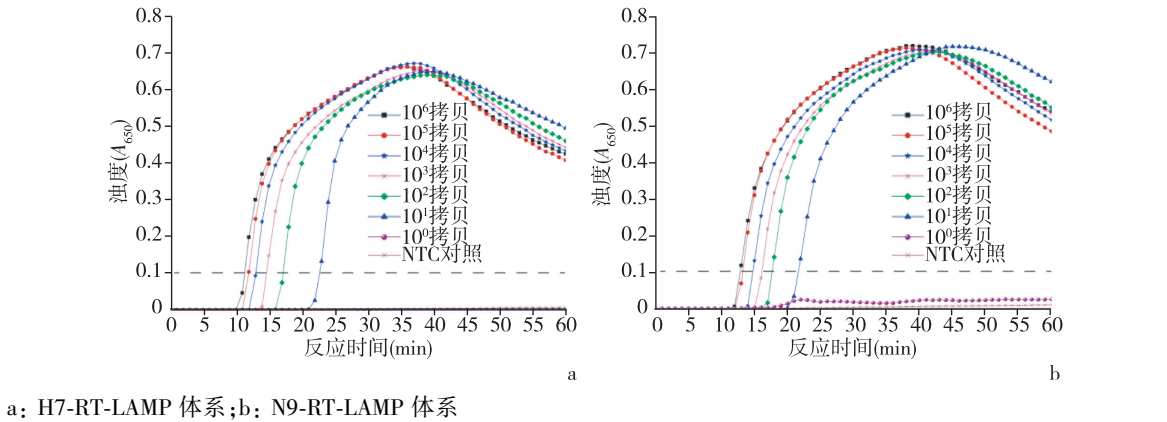


图 1 qRT-PCR、RT-LAMP 浊度法、RT-LAMP 可视法对 H7N9 禽流感病毒体外转录产物 (梯度稀释) 检出限比较



图示检测的常见呼吸道病原核酸中,仅 H7N9 禽流感病毒核酸检测为阳性

图 2 RT-LAMP 特异性测试

表 2 RT-LAMP 及 qRT-PCR 对 142 份临床标本的检出数量比较

标本	n	HA 检测阳性数		NA 检测阳性数	
		H7-qRT-PCR	H7-RT-LAMP	N9-qRT-PCR	N9-RT-LAMP
H7N9 患者咽拭子	13	13	13	8	12
H7N9 患者支气管肺泡灌洗液	4	4	4	4	4
鸡口腔拭子	25	3	3	0	3
鸡泄殖腔拭子	58	15	15	4	14
鸭泄殖腔拭子	20	4	4	1	3
肉鸽泄殖腔拭子	12	2	2	0	2
SPF 鸡泄殖腔拭子	10	0	0	0	0
合计	142	41 *	41	17	38

* :41 份检测阳性标本,在后续经测序确证均含 H7N9 的 HA 基因片段

3 讨 论

每年 12 月至次年 3 月,是人感染禽流感高发时段,这一期间涉禽市场的阳性率也要高于平常时段^[10]。在流行病学史不详的情况下,根据临床表现和实验室检测结果,特别是从患者呼吸道分泌物标本或禽类标本中检测出 H7N9 禽流感病毒核酸阳性,具有重要意义^[11]。环介导等温扩增法(LAMP)具有操作简便、敏感、反应时间短,无需贵重设备的优点^[12],对 H7N9 禽流感病毒的核酸检测具有一定应用前景。

本研究建立了检测 H7N9 禽流感病毒 HA 基因和 NA 基因的一步法 RT-LAMP,在对梯度稀释标准品的检测中,对 HA 基因的检出限与 qRT-PCR 相同,为 10 拷贝每反应;而对 NA 基因的检出限,却对应 qRT-PCR 方法灵敏 100 倍(分别为 5 拷贝、500 拷贝每反应)。应用该 RT-LAMP 方法对临床标本进行检测,41 位已测序确诊的病例标本 HA 基因片段均为阳性,有高灵敏度。RT-LAMP 方法对活禽市场收集的禽类标本进行检测,阳性率为 20.87%(24/115,经测序证实),和既往报道结果相似^[13]。此外,RT-LAMP 对 NA 基因的检出率高于 WHO 推荐的 qRT-PCR 方法,后者在我们流感网络实验室的工作中已造成不便和困惑,存在针对 NA 基因的检出率低且荧光信号偏弱、扩增曲线不典型等问题。本研究建立方法除改善该临床检测实践问题外,对于 N9 基因片段的高辨别力,也可能有助于更准确的检测,即将 H7N9 病毒从其他 H7 亚型病毒(如 H7N1、H7N2、H7N3、H7N7 等)中辨别出来^[14]。该 RT-LAMP 方法可选择 HNB 可视化显色,即通过预添加 HNB 染料在反应体系内,不需开盖,直接肉眼观察反应管溶液的颜色变化来判定结果,与浊度仪实时监测浊度的灵敏度一致,只需廉价的水浴锅等恒温设备孵育反应 32 min 即可,具有快速高效、特异的特点,特异性较好,与其他常见呼吸道病原无交叉反应。可视化反应体系设置了阴性对照、阳性对照,有助于肉眼观察时进行对比,防止假阴性等误判,当然后续还需更多的临床测试(包括多人观察的双盲实验)来验证这种简易判定方法的可靠性。

综上所述,本研究建立了一种检测 H7N9 禽流感病毒核酸的 RT-LAMP 方法,具有快速、灵敏、

无需贵重设备、观察结果简便的特点,尤其对于 N9 亚型的检测,标准品测试灵敏度及临床确诊患者标本检出率,高于目前的 qRT-PCR 方法,有可能为禽流感监测及基层卫生机构的临床病例早期诊断提供一种备选手段。

[参考文献]

- [1] Gao R, Cao B, Hu Y, *et al.* Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20):1888-1897.
- [2] Zhu W, Dong J, Zhang Y, *et al.* A gene constellation in avian influenza A (H7N9) viruses may have facilitated the Fifth Wave outbreak in China[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(3):909-917.
- [3] Quan C, Shi W, Yang Y, *et al.* New threats of H7N9 influenza virus: the spread and evolution of highly and low pathogenic variants with high genomic diversity in Wave Five[J]. *J Virol*, 2018, 92(11).doi: 10.1128/JVI.00301-18.
- [4] Hui DSC, Lee N, Chan PKS. Avian influenza A (H7N9) virus infections in humans across five epidemics in mainland China, 2013–2017[J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9(12):4808-4811.
- [5] 王 洁, 王卫萍, 李晓军, 等. 4 种常见呼吸道病毒快速分子检测方法的建立[J]. *东南国防医药*, 2013, 15(6):551-555.
- [6] 吕 恒, 钟璟浩, 张锦海, 等. 新型布尼亚病毒环介导等温扩增可视化检测方法的建立[J]. *中国病原生物学杂志*, 2016, 11(3):225-228.
- [7] 刘 玉, 陈文琦, 张锦海, 等. 炭疽杆菌双重可视化 LAMP 检测方法的建立[J]. *东南国防医药*, 2016, 18(4):341-345.
- [8] Zhang J, Zhu J, Ren H, *et al.* Rapid Visual Detection of Highly Pathogenic *Streptococcus suis* Serotype 2 Isolates by Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(10):3250-3256.
- [9] 张锦海, 陈文琦, 胡 丹, 等. H7N9 禽流感病毒重组质粒构建及应用[J]. *中国公共卫生*, 2013, 29(12):1868-1870.
- [10] 陈 雅, 朱 进, 冯振卿. 新型人感染 H7N9 型禽流感病毒研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2016, 29(7):759-763.
- [11] 贺甘霖, 颜文娟, 祁 贤, 等. 2013–2017 年中国甲型 H7N9 流感病毒血凝素基因进化分析[J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(10):1029-1034.
- [12] Lamb LE, Bartolone SN, Tree MO, *et al.* Rapid Detection of Zika Virus in Urine Samples and Infected Mosquitos by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):3803.
- [13] Chen Y, Liang W, Yang S, *et al.* Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome [J]. *Lancet*, 2013, 381(9881):1916-1925.
- [14] Li M, Xie Z, Xie Z, *et al.* Simultaneous detection of eight avian influenza A virus subtypes by multiplex reverse transcription-PCR using a GeXP analyser[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):6183.

(收稿日期:2018-05-02; 修回日期:2018-08-31)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:吕镗烽)