

冯丽萍,熊炜,高诚,等. 建立仙台病毒实时荧光重组酶等温扩增检测方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 94-97,121.

Feng LP, Xiong W, Gao C, et al. Establishment of an isothermal real-time fluorescence recombinase polymerase amplification assay for detection of Sendai virus [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(12): 94-97,121.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 12. 014

建立仙台病毒实时荧光重组酶等温扩增检测方法

冯丽萍¹,熊 炜²,高 诚¹,魏晓锋^{1*}

(1. 上海实验动物研究中心,上海 201203; 2. 上海海关,上海 200135)

【摘要】 目的 国标标准规定清洁级和 SPF 级小鼠必须排除仙台病毒(Sendai virus, SeV)。为了提升效率,简化操作步骤,本研究建立了一种新型分子检测方法——实时荧光重组酶等温扩增技术(real-time RPA)用于检测 SeV。**方法** 针对 SeV 融合蛋白编码基因的保守序列,设计特异性扩增引物及探针并建立检测方法,并评价该检测方法的特异性、敏感性、稳定性和可靠性。最后将该检测方法和团标 PCR 方法进行优势比较。**结果** 该方法具有很好的特异性,与小鼠肝炎病毒等六种病原微生物无交叉反应。其敏感性、稳定性和可靠性均可,并能够在 25 min 内完成,远远快于 PCR 方法。**结论** 本研究建立的 SeV 实时荧光 RPA 是一种操作简单,高效直观且特异性好的检测方法。

【关键词】 实时荧光重组酶等温扩增;仙台病毒;快速可视化监测

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 12-0094-04

Establishment of an isothermal real-time fluorescence recombinase polymerase amplification assay for detection of Sendai virus

FENG Liping¹, XIONG Wei², GAO Cheng¹, WEI Xiaofeng^{1*}

(1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China.

2. Shanghai Customs, Shanghai 200135)

【Abstract】 Objective The Standardization of the People's Republic of China stipulated that Sendai virus (SeV) must be excluded from clean and SPF grade mice. To simplify the detection and improve its efficiency, a novel real-time fluorescence recombinase polymerase amplification assay (real-time RPA) was developed for the detection of SeV in this study. **Methods** The specific primers and probes were designed against a conserved sequence of the gene encoding the SeV fusion protein, allowing the establishment of this detection method. The specificity, sensitivity, stability and reliability of the assay were evaluated. Finally, the superiority of this detection method was compared with the standard PCR method. **Results** The assay was highly specific, showing no cross-reactions with six other pathogenic microorganisms such as mouse hepatitis virus. The sensitivity, stability and reliability were acceptable, and this assay was completed within 25 minutes, much faster than the routinely used PCR. **Conclusions** In this study the SeV real-time RPA detection method is successfully established and found to be a simple, efficient, intuitive and specific detection method.

【Keywords】 real-time fluorescence recombinase polymerase amplification assay; Sendai virus; rapid and visual detection

[基金项目]上海市科委项目(17140900304)。

[作者简介]冯丽萍(1985—),女,硕士,助理研究员,研究方向:为病原体检测。E-mail: flp2013@foxmail.com

[通信作者]魏晓锋(1980—),男,硕士,副研究员,研究方向:病毒检测和分子生物学研究。E-mail: wei.xf@outlook.com

20 世纪 50 年代在日本仙台发现仙台病毒,该病毒是一种小鼠副流感病毒 1 型,首先从用于传代人类患者样本的小鼠中分离到,引起病毒起源的混淆。现在普遍认为仙台病毒是小鼠的病原体,而不是人类的。仙台病毒是副粘病毒属的成员,与其他副粘病毒一样,它也是一种包膜病毒,具有非分段的负链 RNA 基因组^[1]。仙台病毒可自然感染小鼠并引起小鼠肺炎或呈隐性感染,干扰实验结果,需要被严格控制。国标规定清洁级和 SPF 级实验小鼠必须定期检测仙台病毒,目前国标检测方法主要是血清学检测方法,包括酶联免疫吸附试验(ELISA),免疫酶试验(IEA),血凝抑制试验(HAI)和免疫荧光试验(IFA)等^[2]。这些方法通常耗时费力,灵敏度低。随着分子检测技术的进步,大量基于基因扩增的分析应用于检测仙台病毒^[3-5],如逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),实时 PCR,环介导等温扩增(LAMP)等。此类方法需要昂贵的热循环仪和经验丰富的技术人员,检测时间较长很难在现场实施。

本研究中实时荧光重组酶等温扩增(real-time fluorescence recombinase polymerase amplification, real-time RPA)是一种快速灵敏的分子检测方法,适用于现场检测。近年来已经成功开发多种实时荧光 RPA 检测方法,用于快速检测不同病原体检测,如空肠弯曲杆菌、猪圆环病毒 2 型、口蹄疫病毒、猪流行性腹泻病毒、单核细胞增生李斯特氏菌等^[6-10]。该方法可通过简单的仪器在 25 min 甚至更短的时间内进行实时检测。

1 材料和方法

1.1 实验材料

SeV 及阳性核酸来自本实验室保存。本研究中使用其他病原微生物如小鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV)、呼肠孤病毒 III 型(reovirus type III, Reo-3)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)、嗜肺巴斯德杆菌(*Pasteurella pneumotropica*, PP)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)等来自本实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器

DNA Marker(DL1000)、RNA 酶抑制剂、dNTP、反转录试剂盒等购自 TaKaRa 公司;病毒 RNA 快速抽提试剂盒购自生工生物公司;TwistAmp exo 试剂

盒购自英国 TwistDx 公司;Genie® II 等温扩增荧光检测系统购自英国 OptiGene 公司;PCR 仪 Biometra T-gradient Thermoblock;凝胶成像系统 Bio-Rad Universal Hood II。

1.3 实验方法

1.3.1 核酸提取及模板制备

核酸提取:取 0.2 mL 待检上清液或血清,加 0.6 mL buffer Rlysis-VG 试剂进行 RNA 提取,室温放置 10 min,震荡后加入 0.7 mL 异丙醇;离心 15 min 后移除上清;加入 1 mL 70%乙醇,震荡后离心 5 min,移除上清;加入 0.2 mL RNase-free 水溶解 RNA 沉淀,样品可直接取用,也可以保存于 -80℃ 备用。

模板制备:取 2 μL RNA 溶液, dNTP Mixture 1 μL、随机引物 1 μL、RNase-free H₂O 6 μL,PCR 仪上变性、退火反应:65℃ 5 min;4℃。在此反应液中加入 buffer 4 μL、RNA 酶抑制剂 0.5 μL、RTase 0.5 μL、RNase-free H₂O 5 μL,再次放回 PCR 仪进行反转录反应:30℃ 10 min;42℃ 30 min;95℃ 5 min;4℃,即得 cDNA 模板,样品可直接取用,也可以保存于 -20℃ 备用。

1.3.2 实时荧光 RPA 引物及探针设计

针对 SeV 融合蛋白编码基因的保守序列设计引物及探针^[1],实时荧光 RPA 检测引物和探针由上海辉睿生物科技有限公司合成。上游引物 SENV-FP: 5'-AAA TCT ATA GAA CTG CTG CAA AAC GCT GTG GG-3';下游引物 SENV-RP: 5'-TTG TGT CAG TTT TAT CCC CAG TCT TAA AGC GG-3';RPA 探针 SENV-P: 5'-GAA CAA ATT CTT GCT CTA AAG ACG CTC CAG GAT (FAM) -T-T(BHQ1) CGT GAA TGA TGA GAT CAA AC-PO4-3'。

1.3.3 实时荧光 RPA 反应体系及程序

反应体系为:使用 TwistAmp exo 干粉试剂盒,总体积 50 μL,29.5 μL 反应缓冲液、上下游引物各 2.1 μL、10 μmol/L 荧光探针 0.6 μL、模板 2 μL、水 11.2 μL,将预混液混合均匀;使用微型旋转离心机快速离心,混匀后加入干粉中;最后加入 2.5 μL 280 mmol/L 醋酸镁,小心关闭盖子,上下颠倒混合 10 次,离心 20 s。参照说明书 TwistAmp exo quick guide part number: TAEXO02Guide/ Revision B 即可。

反应程序为:39℃ 孵育 25 min。反应中即可同步呈现荧光扩增曲线,根据曲线进行结果判定。

1.3.4 SeV 实时荧光 RPA 方法特性的分析

特异性分析:将 SeV cDNA 和其他对照病原微生物(小鼠肝炎病毒、呼肠孤病毒Ⅲ型、肺炎克雷伯杆菌、嗜肺巴斯德杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌等),以及空白对照组(双蒸水替代模板),使用 SeV 实时荧光 RPA 方法扩增,观察结果。

敏感性分析:将 SeV cDNA 进行 10 倍倍比稀释,获得浓度范围是 100 ng/μL 到 100 fg/μL 的浓度梯度,和空白对照组同时使用 SeV 实时荧光 RPA 方法扩增,观察随时间推移的荧光信号累积。

稳定性和可靠性分析:在不同时间进行 7 次独立的实时荧光 RPA 检测,模板浓度范围是 100 ng/μL 到 100 fg/μL 的 10 倍倍比稀释的浓度梯度,观察检出浓度及检出时间,并进行统计分析。检出率应用 SPSS 在线 Probit 回归分析。峰值时间应用 Microsoft Excel 软件线性回归分析。

1.3.5 实时荧光 RPA 方法的优势比较

选择实验动物仙台病毒 PCR 检测方法的团体标准进行优势比较^[3],实时荧光 RPA 方法与团体标准 PCR 方法使用相同浓度的模板进行扩增,比较其两种方法检出浓度的下限,以及检测全程所需的时间。

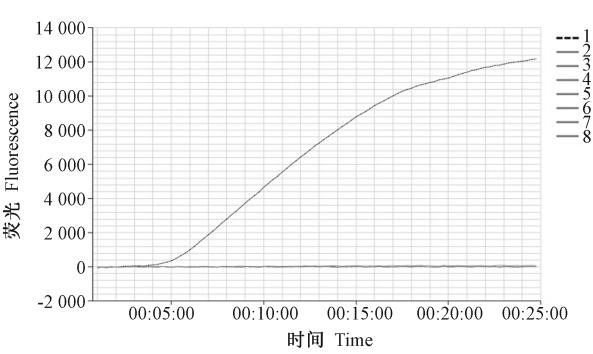
团体标准中的方法,PCR 上游引物 Sev-F180:5'-ATG AAG GAC AAA GCA TTA TCG CCT A-3';上游引物 Sev-R180:5'-CAA CCA GTC TCC TGA TTC CAC GTA-3'。PCR 反应体系和反应程序均参照团体标准^[3]。

2 结果

2.1 实时荧光 RPA 检测 SeV 的特异性和敏感性

SeV 核酸为单股负链 RNA,选择其融合蛋白编码基因,设计特异性扩增引物及探针并建立 SeV 实时荧光 RPA 检测方法。为了评估方法的有效性 & 特异性,选用小鼠易感的小鼠肝炎病毒等六种病原微生物作为对照。将所有的对照组和 SeV 组同时扩增,SeV 在反应 6 min 30 s 之后荧光信号迅速增强,而其他组在整个反应中均未观察到可见的荧光信号(图 1)。实验结果表明实时荧光 RPA 能特异性检测 SeV,无交叉反应。

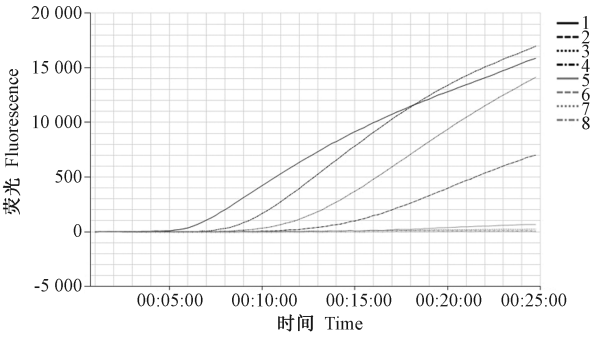
本研究评估实时荧光 RPA 的敏感性,使用 10 倍倍比稀释 SeV cDNA 制备浓度梯度 100 ng/μL 到 100 fg/μL,作为反应的模板。实时荧光 RPA 反应中,前四个梯度能随着时间的推移有大量的荧光信号累积(图 2)。



注:1:仙台病毒;2:小鼠肝炎病毒;3:呼肠孤病毒Ⅲ型;4:肺炎克雷伯杆菌;5:嗜肺巴斯德杆菌;6:金黄色葡萄球菌;7:绿脓杆菌;8:空白对照。

图 1 实时荧光 RPA 扩增中不同病原微生物的荧光信号
Note. 1, SeV; 2, MHV; 3, Reo-3; 4, KP; 5, PP; 6, SA; 7, PA; 8, blank control.

Figure 1 Fluorescence data of different pathogenic microorganisms in real-time RPA amplification



注:反应孔依次为 SeV 浓度梯度从 100 ng/μL 到 100 fg/μL,如 1:100 ng/μL;2:10 ng/μL;3:1 ng/μL;4:100 pg/μL;5:10 pg/μL;6:1 pg/μL;7:100 fg/μL;8:空白对照。

图 2 实时荧光 RPA 扩增中 SeV 稀释梯度的荧光信号
Note. The reaction wells were SeV concentration gradients from 100 ng/μL to 100 fg/μL sequentially, such as 1, 100 ng/μL; 2, 10 ng/μL; 3, 1 ng/μL; 4, 100 pg/μL; 5, 10 pg/μL; 6, 1 pg/μL; 7, 100 fg/μL; 8, blank control.

Figure 2 Fluorescence data of a dilution series of SeV in real-time RPA amplification

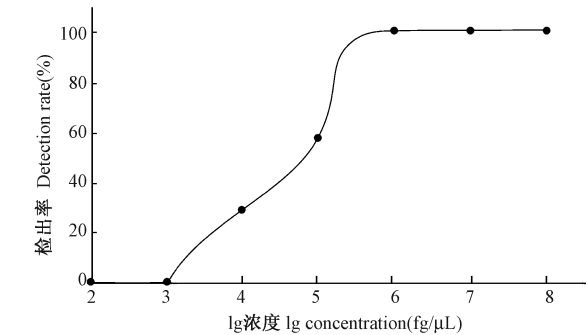
2.2 实时荧光 RPA 检测方法的稳定性和可靠性

基于 7 次不同时间独立的实时荧光 RPA 检测结果,建立回归分析模型。实验中浓度范围是 100 ng/μL 到 100 fg/μL 的浓度梯度,不同实验中最低检出浓度有一定波动,波动范围在 1 ng/μL 到 10 pg/μL 之间,应用 SPSS 在线 Probit 回归分析,预测浓度 185 pg/μL 能达到 95%检出率(图 3),预测准确率为 92.59%,达到此浓度水平实时荧光 RPA 检出率能有很好的稳定性。

峰值时间建立线性回归分析模型,大约出现在 6~20 min 之间(图 4)。从峰值时间来看,只要能检出均在 20 min 内获知结果,超过 20 min 还没有起峰则全部未检出,故本实验设计 25 min 可以覆盖所有有效结果,不会错失阳性结果,故结合之前特异性实验结果很好,可见达到其检出浓度实时荧光 RPA 方法不会错判和漏判,可靠性很好。

2.3 实时荧光 RPA 方法的优势比较

本研究 PCR 方法为团体标准中的方法,反应模板浓度梯度 100 ng/μL 到 100 fg/μL 和实时荧光 RPA 模板浓度梯度相同。PCR 产物电泳图中,前四个泳道可见目标条道(图 5)。因此,如图 2 和图 5 所示这两种方法检测下限一致。PCR 反应完成需要 100 min,跑胶及拍照耗时 30 min,总计 130 min,

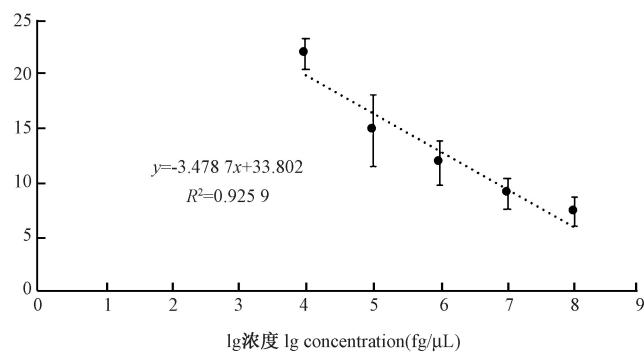


注:使用 SPSS 在线软件进行 Probit 回归分析,95% 概率的检测下限是 185 pg/μL。

图 3 SeV 实时荧光 RPA 方法的检出率

Note. Probit regression analysis using SPSS online software, the detection limit at 95% probability was estimated to be 185 pg/μL.

Figure 3 Positive detection rate of the SeV real-time RPA assay

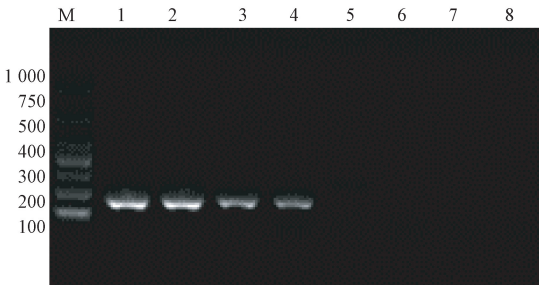


注:使用 Excel 软件进行线性回归分析,峰值时间为 5 min 58 s 到 19 min 53 s 之间。

图 4 SeV 实时荧光 RPA 方法的峰值时间

Note. Linear regression analysis was performed using Excel software, and the peak time was between 5 min 58 s to 19 min 53 s.

Figure 4 Peak time of the SeV real-time RPA assay



注:反应孔依次为 SeV 浓度梯度从 100 ng/μL 到 100 fg/μL,如 M:DL1000;1:100 ng/μL;2:10 ng/μL;3:1 ng/μL;4:100 pg/μL;5:10 pg/μL;6:1 pg/μL;7:100 fg/μL;8:空白对照。

图 5 PCR 扩增 SeV 稀释梯度的电泳结果

Note. The reaction wells were SeV concentration gradients from 100 ng/μL to 100 fg/μL sequentially, such as M, DL1000; 1, 100 ng/μL; 2, 10 ng/μL; 3, 1 ng/μL; 4, 100 pg/μL; 5, 10 pg/μL; 6, 1 pg/μL; 7, 100 fg/μL; 8, blank control.

Figure 5 Electrophoretic results of a dilution series of SeV in PCR amplification

而实时荧光 RPA 扩增和检测信号是实时呈现,全程仅需 25 min,通常在 6~20 min 之间即可观察到结果,大大缩短了检测时间。另外,比起 PCR 仪,实时荧光 RPA 检测仪 Genie II,更加小巧轻便且自带电池,适合现场检测。

3 讨论

实时荧光 RPA 已被广泛用于多种病原体的分子检测,便于实地检测^[11-12]。本研究中开发了 SeV 实时荧光 RPA 方法,其特异性、敏感性、稳定性和可靠性均可,该方法能够快速灵敏的检测出仙台病毒。实验中 SeV 实时荧光 RPA 和 PCR 方法检测下限一样,然而所需的时间相差很大,其中实时荧光 RPA 全程仅需 25 min,一般在 6~20 min 内即可观察到结果,而 PCR 则需要 130 min 才能知晓结果。此外,研究中使用的便携式检测仪 Genie II,小巧轻便,无需连接电脑,仪器自带电池,可全天候户外无电环境工作。实时荧光 RPA 干粉试剂盒操作简单,仅需将引物、探针和模板 DNA 伴随反应混合液和缓冲液加入干粉中即可,减少污染。重组酶将寡核苷酸引物与模板退火,形成稳定的单链结合蛋白(SSB)结合的引物-重组酶复合物,不需要初始热变性步骤来解开双链 DNA^[13]。总而言之,SeV 实时荧光 RPA 方法简单,快速,便携等特性,使其特别适用于在资源有限的环境中对可疑样品的现场筛查,对于实验动物质量控制具有重要的意义。