

猴T淋巴细胞趋向性病毒1型RPA和 荧光RPA检测方法的建立^{*}

熊 炜¹ 林颖峥¹ 魏晓锋² 陈鸿军³ 张 强¹ 王 艳¹ 李 健¹

(1. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135) (2. 上海实验动物研究中心, 上海 201203) (3. 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241)

摘要:目的 为了提高口岸对进出境野生及实验用灵长类动物猴T淋巴细胞趋向性病毒1型(Simian T-cell lymphotropic virus type 1, STLV-1)感染情况的监测和流行病学调查,本研究建立了重组酶聚合酶扩增(RPA)和荧光RPA检测STLV-1的方法。方法 使用软件分析不同国家和地区分离的STLV-1的gag蛋白(gag polyprotein)基因序列,设计RPA引物和探针,建立RPA和荧光RPA检测STLV-1的方法,并对方法的特异性、敏感性和稳定性进行验证。结果 通过将猴其它特定病原体与STLV-1对比检测,证实建立的检测方法具有良好的特异性;通过敏感性试验,证实建立的RPA和荧光RPA方法检测下限与PCR一致;通过对30份STLV-1阳性和阴性核酸样本的检测,证实建立的RPA和荧光RPA方法,具有PCR方法一样的稳定性和可靠性。结论 本研究建立的RPA和荧光RPA检测STLV-1的方法具有良好的特异性、敏感性和可靠性,可应用于STLV-1的监测和流行病学调查。

关键词:猴;猴T淋巴细胞趋向性病毒1型;RPA技术;荧光RPA

中图分类号: R372 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)02-0033-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.02.006

猴T淋巴细胞趋向性病毒(Simian T-cell lymphotropic virus, STLV)为逆转录病毒,其基因组为单链RNA,它与人T淋巴细胞趋向性病毒(Human T-cell lymphotropic virus, HTLV)同属于灵长类嗜T淋巴细胞病毒,是进出境实验用猴筛查的重要病原之一^[1-2]。1982年STLV首次在日本猕猴体内发现,之后在亚洲和非洲超过30种非人灵长类动物中发现了STLV;根据核酸序列和血清学特性,STLV可分为三个亚型,即STLV-1、STLV-2、STLV-3,其中亚洲非人灵长类动物主要感染STLV-1^[3-4]。STLV-1主要侵害猴的免疫系统,与恶性淋巴瘤、淋巴组织增生等疾病密切相关;通常猕猴感染STLV-1后,可较长时间不呈现明显临床症状,期间它作为携带者可将病毒传给其它易感猴,对猴的健康造成影响,干扰实验结果^[5]。目前报道的STLV-1的检测方法主要有免疫荧光、中和试验、蛋白印迹和ELISA等血清学方法,RT-PCR是STLV-1最常用的核酸检测方法^[6-8]。重组酶聚合酶扩增(Recombinase

Polymerase Amplification, RPA),是一种新型的,可以替代PCR的核酸检测技术,它能够在20 min内进行常温下的单分子核酸检测^[9-10]。该技术对硬件设备的要求很低,特别适合野外及检疫现场使用。为了提高口岸对进出境野生及实验用灵长类动物STLV-1感染情况的监测和流行病学调查,本研究建立了RPA和荧光RPA检测STLV-1的方法,并对方法的特异性、敏感性和稳定性进行了验证。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

TRIzol 购自 Invitrogen 公司, Taq 酶、AMV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、dNTP、随机引物、DNA Marker (DL2000) 购自 Takara 公司; RPA 检测试剂购至英国 TwistDx Inc 公司。

1.2 病毒样品来源及处理

STLV-1 阳性组织和血清样为本室保存。阳性组织样品加等体积生理盐水研磨匀浆, 3 000 g 离心

收稿日期: 2018-10-21

^{*} 基金项目: 上海市科委实验动物研究专项(No.17140900300)。

作者简介: 熊 炜(1974—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 病毒检测和分子生物学研究. E-mail: xiongwei@shciq.gov.cn

通信作者: 林颖峥(1989—), 兽医师, 研究方向: 动物检疫. E-mail: 1072166009@qq.com

15 min,收集上清液待检。本研究使用的其他病毒和细菌核酸,如猴 D 型逆转录病毒(Simian type-D retrovirus, SRV)、猴免疫缺陷病毒(Simian immunodeficiency virus, SIV)、猴 B 病毒(Simian B virus, BV)、沙门氏菌、志贺氏菌样本,由本室保存。

1.3 RNA 抽提及 cDNA 模板制备

取 100 μL 待检上清液或血清,加 1 mL TRIzol 试剂,吹打 20 次,加入 200 μL 氯仿,涡旋震荡 30 s 混匀;12 000 r/min 离心 15 min;取上层水相,加 500 μL 异丙醇,颠倒混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min;12 000 r/min 离心 10 min;弃上清,沉淀用 1 mL DEPC 水配制的 75%乙醇清洗;7 500 r/min 离心 10 min;弃上清,沉淀室温干燥 10 min;加 30 μL DEPC 水溶解 RNA 沉淀。取 11 μL RNA 溶液,加 5 倍逆转录酶浓缩缓冲液 4 μL 、dNTP 1 μL 、随机引物 1 μL 、RNA 酶抑制剂 1 μL 、AMV 逆转录酶 2 μL ,置 PCR 仪上 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min,即得 cDNA 模板。

1.4 RT-PCR 检测

引物针对 STLV-1 的 gag 蛋白基因(gag polyprotein)设计,扩增基因片段大小为 348 bp,其上游引物为:5' GCT CAT CAC TGG CTT AAC TTC CTC C 3',下游引物为:5' ATG TGG ATG CAT GAC TGG AAG GAC 3'。在 PCR 薄壁管中,加 cDNA 模板 2 μL 、10 倍 Taq 酶浓缩缓冲液 2.5 μL 、dNTP 0.5 μL 、上下游引物各 0.25 μL 、Taq 酶 0.25 μL ,加水补足总体积至 25 μL 。将 PCR 管置 PCR 仪上,按如下程序扩增:首先 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶成像系统拍摄。

1.5 RPA 引物和探针

使用 Vector NTI Suite 软件分析不同国家和地区分离的 STLV-1 的 gag 蛋白(gag polyprotein)基因的保守序列,用 Primer Express 软件设计 RPA 引物和探针。RPA 正向引物(RPA-STLV1F)序列为 5' ACA CCG GCT TGG ATC TGT CCC ATT AAC TAC TC 3',反向引物(RPA-STLV1R)序列为 5' CCA TGT GGA TGC ATG ACT GGA AGG ACT TGA GG 3'。荧光 RPA 检测的上游引物(RPAY-STLV1F)序列为:5' TGC CAA AGA CCT CCA AGA CCT CCT ACA GTA CC 3',下游引物(RPAY-STLV1R)序列为:5' GAC CGG CTA AGG GGT TAT AAC CTG TAA TAC CTC 3',RPA 探针(RPAY-STLV1P)序列为:5' CTC CCT CCA TCA CCA GCA GCT AGA TAG

CCT TA(FAM-dt)(THF)(BHQ1-dt)AGA GGC CGA A-C3 3'。引物和探针由上海辉睿生物科技有限公司合成。

1.6 RPA 检测

采用 GENIE II 恒温扩增 PCR 仪。反应体系为:25 μL 2 倍反应缓冲液、8.2 μL dNTP、5 μL 10 倍基酶混合物、上下游引物(RPA-STLV1F、RPA-STLV1R)各 2.4 μL ;混匀后,再加入 2.5 μL 20 倍核心反应液、1 μL 50 倍 RT 反应液;混匀后,最后加入 2.5 μL 280 mmol/L 醋酸镁、1 μL 待检核酸溶液。反应条件为:39 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。反应结束后,凝胶电泳分析扩增产物,结果判定。

1.7 荧光 RPA 检测

采用 GENIE II 恒温扩增 PCR 仪。反应体系为:25 μL 2 倍反应缓冲液、7.2 μL dNTP、5 μL 10 倍探针酶混合物、上下游引物(RPA-STLV1F、RPA-STLV1R)各 2.1 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 荧光探针 0.6 μL ;混匀后,再加入 2.5 μL 20 倍核心反应液、1 μL 50 倍 RT 反应液、1 μL 50 倍 Exo 反应液;混匀后,最后加入 2.5 μL 280 mmol/L 醋酸镁、1 μL 待检核酸溶液。反应条件为:39 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 25 min。反应结束后,查看荧光扩增曲线进行结果判定。

2 结果

2.1 RPA 和荧光 RPA 检测 STLV-1 的特异性试验

分析 STLV-1 gag 蛋白基因序列,设计引物及探针,分别建立 STLV-1 的 RPA 和荧光 RPA 方法,并分别使用猴的其它病毒(如 SIV、BV、SRV)作为对照,同时与 PCR 方法进行对比,确认所建立方法的特异性。结果显示,经 RPA、PCR 检测,仅有 STLV-1 阳性样品出现特异性扩增,其它对照病毒样品均呈阴性(图 1、图 2);经荧光 RPA 检测,STLV-1 阳性样品在反应 15~20 min 后荧光信号出现显著增强,而对照病毒样品检测到荧光信号(图 3)。

2.2 RPA 和荧光 RPA 检测 STLV-1 的敏感性试验

为测试所建立的 RPA 和荧光 RPA 方法的敏感性,将 STLV-1 阳性样品 cDNA 进行定量并梯度稀释,制备浓度分别为 10 ng/ μL 、1 ng/ μL 、100 pg/ μL 、10 pg/ μL 、1 pg/ μL 、100 fg/ μL 、10 fg/ μL 、1 fg/ μL 的模板,再分别用建立的两种方法和 RT-PCR 方法进行检测。结果证实,RPA 和荧光 RPA 方法的检测下限与 RT-PCR 相同,均为 1 pg/ μL ~100 fg/ μL (图 4~图 6)。

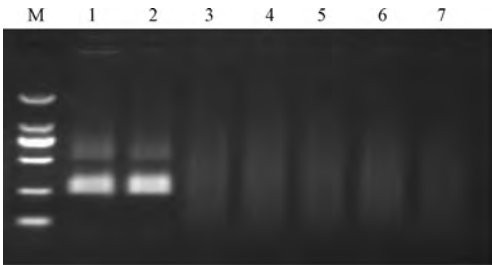


图 1 RPA 检测 STLTV-1 的特异性

注:M:DNA Marker DL2000;1:STLV-1 阳性样品 1;2:STLV-1 阳性样品 2;3:SRV;4:SIV;5:沙门氏菌;6:志贺氏菌;7:空白对照

Fig.1 Specificity test of STLTV-1 by RPA

Note:M:DNA Marker DL2000;1:STLV-1 positive sample 1; 2:STLV-1 positive sample 2;3:SRV; 4:SIV; 5:Salmonella;6:Shigella;7:Blank control

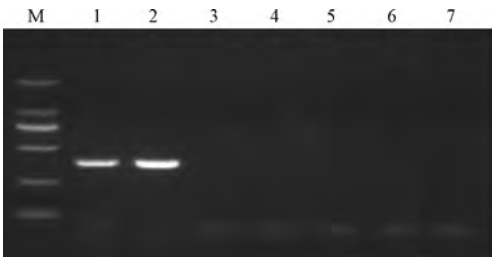


图 2 RT-PCR 检测 STLTV-1 的特异性

注:M:DNA Marker DL2000;1:STLV-1 阳性样品 1;2:STLV-1 阳性样品 2;3:SRV;4:SIV;5:沙门氏菌;6:志贺氏菌;7:空白对照

Fig.2 Specificity test of STLTV-1 by RT-PCR

Note:M:DNA Marker DL2000;1:STLV-1 positive sample 1; 2:STLV-1 positive sample 2;3:SRV; 4:SIV; 5:Salmonella;6:Shigella;7:Blank control

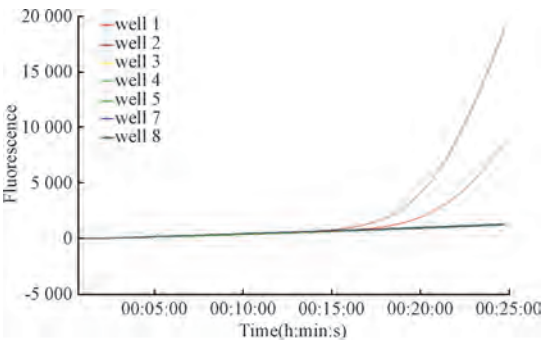


图 3 荧光 RPA 检测 STLTV-1 的特异性

注:M:DNA Marker DL2000;1:STLV-1 阳性样品 1; 2:STLV-1 阳性样品 2;3:SRV;4:SIV; 5:沙门氏菌;6:志贺氏菌;7:空白对照

Fig.3 Specificity test of STLTV-1 by fluorescent RPA

Note:M:DNA Marker DL2000;1:STLV-1 positive sample 1; 2:STLV-1 positive sample 2;3:SRV; 4:SIV; 5:Salmonella;6:Shigella;7:Blank control

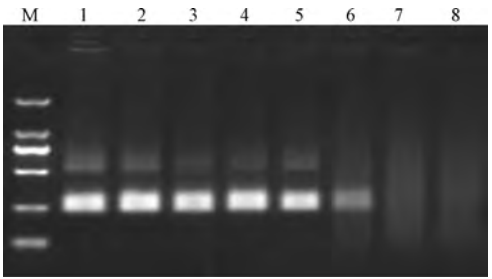


图 4 RPA 检测 STLTV-1 的敏感性试验

注:M:DNA Marker DL2000;1~8:STLV-1 cDNA 模板量分别为 10 ng/μL、1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL、100 fg/μL、10 fg/μL 和 1 fg/μL

Fig.4 Sensitivity test of STLTV-1 by RPA

Note:M:DNA Marker DL2000;1~8:The amount of STLTV-1 cDNA was 10 ng/μL, 1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL and 1 fg/μL

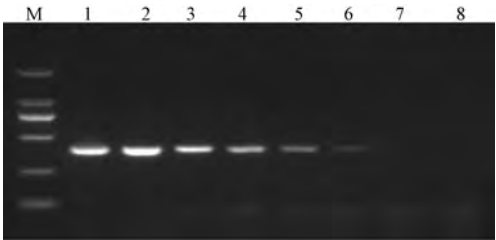


图 5 RT-PCR 检测 STLTV-1 的敏感性试验

注:M:DNA Marker DL2000;1~8:STLV-1 cDNA 模板量分别为 10 ng/μL、1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL、100 fg/μL、10 fg/μL 和 1 fg/μL

Fig.5 Sensitivity test of STLTV-1 by RT-PCR

Note:M:DNA Marker DL2000;1~8:The amount of STLTV-1 cDNA was 10 ng/μL, 1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL and 1 fg/μL

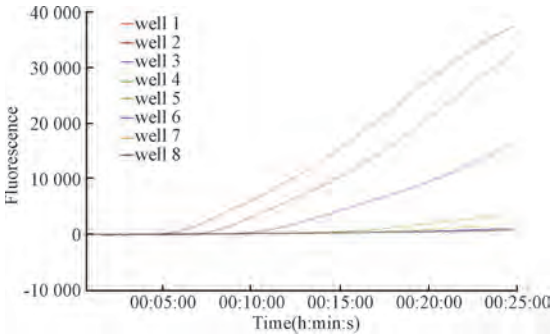


图 6 荧光 RPA 检测 STLTV-1 的敏感性试验

注:扩增曲线从左至右分别为 10 ng/μL、1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL、100 fg/μL、10 fg/μL、1 fg/μL 的 STLTV-1 cDNA 模板

Fig.6 Sensitivity test of STLTV-1 by fluorescent RPA

Note:The amplification curve from left to right is the amount of STLTV-1 cDNA from 10 ng/μL, 1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL to 1fg/μL

2.3 RPA 和 荧光 RPA 检测 STLV-1 的可靠性试验

为进一步验证建立核酸检测方法的可靠性,对将本室保存的经 RT-PCR 确认的 7 份 STLV-1 阳性核酸样本及 23 份 STLV-1 阴性猴血清分别用 RPA 和 荧光 RPA 进行检测,每份样同一方法重复 3 次。结果显示,7 份阳性核酸样本经上述三种方法检测均得到了阳性结果,而阴性样本均未出现特异性扩增,与实际样本的符合率为 100%(图 7、图 8)。

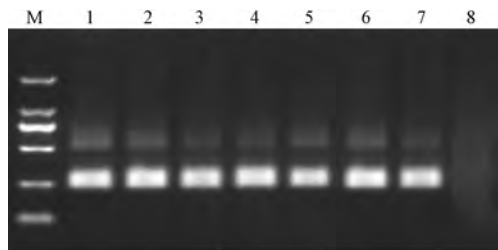


图 7 RPA 检测 7 份不同时期分离的 STLV-1 阳性样品

注:M:DNA Marker DL2000;1~7:7 份 STLV-1 阳性样品;8:空白对照

Fig.7 RPA Detection of seven positive samples of STLV-1 seperated at different time

Note:M;DNA Marker DL2000;1~7:7 positive samples of STLV-1;8:Blank control

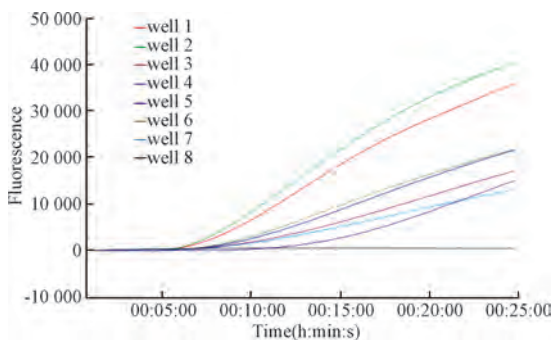


图 8 荧光 RPA 检测 7 份不同时期分离的 STLV-1 阳性样品

注:扩增曲线为 7 份不同时期分离的 STLV-1 阳性样品

Fig.8 Fluorescent RPA Detection of seven positive samples of STLV-1 seperated at different time

Note:The amplification curve shows seven positive samples of STLV-1 seperated at different time.

3 讨论

由于猴在形态、生理、生化、代谢等诸多方面与人类非常相似,因而作为理想的实验动物模型被应用于生物医药研究领域。国际上对无特定病原体

(SPF)猴的定义主要指体内不含 STLV、SIV、SRV、猴 B 病毒(BV)、沙门氏菌、志贺氏菌等特定病原微生物。由于实验用猴进出口贸易的不断扩大,缩短检疫周期,研发简便、快速、特异、敏感的新型检测方法,对提高猴特定病原体筛查的效率,保证进出口实验用猴的健康和质量具有重要意义。

本研究建立了 RPA 和 荧光 RPA 快速检测 STLV-1 的方法,通过将猴其它特定病原体与 STLV-1 对比检测,证实建立的检测方法具有良好的特异性。经灵敏度试验证实,本研究建立的两种 STLV-1 核酸检测方法,与传统 PCR 检测方法一样,均具有很高的敏感性。通过对 30 份 STLV-1 阳性核酸样本及阴性猴血清样本的重复检测,证实建立的 RPA 和 荧光 RPA,具有 PCR 方法一样的稳定性和可靠性。但是与 PCR 方法相比,RPA 检测方法的优势在于检测周期极短(仅需 20 min)、操作简单(只需将核酸与检测体系混合放于恒温设备中即可,RNA 检测不需逆转录过程)、检测设备便携(笔记本大小,一次充电可运行 12 h)、结果判定简便直观,适合于现场及野外操作。

参考文献

- [1] Morton W R, Agy M B, Capuano S V, *et al.* Specific pathogen-free macaques: definition, history, and current production [J]. ILAR J, 2008, **49**(2):137-144.
- [2] 王宏,韦秋奖.食蟹猴 SPF 种群建立过程中病毒抗体的动态监测[J].中国实验动物学报,2015, **23**(6):573-577.
- [3] 张利仙,陈朝银,艾军,等.猴嗜 T 淋巴白血病毒研究进展[J].中国畜牧兽医,2011, **38**(2):174-177.
- [4] Roussel M, Pontier D, Ngoubangoye B, *et al.* Modes of transmission of Simian T-lymphotropic Virus Type 1 in semi-captive mandrills (*Mandrillus sphinx*) [J].Vet Microbiol,2015, **179**(3-4):155-161.
- [5] Locatelli S, Peeters M. Cross-species transmission of simian retroviruses: how and why they could lead to the emergence of new diseases in the human population [J].AIDS, 2012, **26**(6):659-673.
- [6] 熊炜,蒋静,张强,等.猴嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型核酸快速检测方法的建立[J].中国动物检疫,2013, **30**(9):64-67.
- [7] Liao Q, Guo H, Tang M, *et al.* Simultaneous detection of antibodies to five simian viruses in nonhuman primates using recombinant viral protein based multiplex microbead immunoassays[J]. J Virol Methods,2011, **178**(1-2):143-152.
- [8] Van Dooren S, Meertens L, Lemey P, *et al.* Full-genome analysis of a highly divergent simian T-cell lymphotropic virus type 1 strain in *Macaca arctoides* [J]. J Gen Virol, 2005, **86**

- (Pt 7):1953-1959.
- [9] Tan K K, Azizan N S, Yaacob C N, *et al.* Operational utility of the reverse-transcription recombinase polymerase amplification for detection of dengue virus[J]. BMC Infect Dis, 2018, **18**(1): 169-173.
- [10] Du X J, Zang Y X, Liu H B, *et al.* Recombinase Polymerase Amplification Combined with Lateral Flow Strip for *Listeria monocytogenes* Detection in Food[J]. J Food Sci, 2018, **83**(4): 1041-1047.

Establishment of RPA and fluorescent RPA detection methods for Simian T-cell lymphotropic virus type 1

XIONG Wei¹, LIN Yingzheng¹, WEI Xiaofeng², CHEN Hongjun³,
ZHANG Qiang¹, WANG Yan¹, LI Jian¹

(1.Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

(2.Shanghai Lab. Animal Research Center, Shanghai 201203, China)

(3.Shanghai Veterinary Research Institute, CAAS, Shanghai 200241, China)

Abstract: Objective In order to survey and investigate the epidemic character of simian T-cell lymphotropic virus type 1 (STLV-1) transmission among wild and experimental monkeys, method of recombinase polymerase amplification (RPA) and fluorescent RPA to detect STLV-1 were established. **Method** Analysis conservative sequence of STLV-1 gag polyprotein genes separated from different countries and areas, RPA primers and fluorescent probe were designed and RPA methodes were tested by specificity, sensitivity and stability. **Result** Compared with other simian viruses, new RPA and fluorescent RPA methodes had highly specific to STLV-1. The limit of detection of RPA and fluorescent RPA methodes is similar with PCR method. The stability of RPA and fluorescent RPA was confirmed by detection of 30 postive and negative STLV-1 samples. **Conclusion** The RPA and fluorescent RPA methodes to detect STLV-1 were established and proved to be specific with high sensitivity and stability, which could be applied to survey STLV-1 infection among simian.

Key words: simian; simian T-cell lymphotropic virus type 1; recombinase polymerase amplification (RPA); fluorescent RPA