

树鼩腺病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用

宋庆凯, 李晓飞, 苗雨润, 张志成, 王璇, 袁圆, 代解杰, 孙晓梅*

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 中国医学科学院医学生物学研究所实验树鼩标准化与应用研究省创新团队, 昆明 650118)

【摘要】 目的 通过建立树鼩腺病毒(tree shrew adenovirus, TAV) TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法, 快速准确地检测树鼩腺病毒。**方法** 根据 TAV 全基因组 3' 端保守序列设计合成特异性引物; 用含目的基因片段的重组质粒作为标准品进行标准曲线绘制, 建立 TAV TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法。**结果** 建立的 TAV 实时荧光定量 PCR 检测方法特异性好, 与树鼩源及其他物种常见病毒无交叉反应; 方法的最低检测限度为每微升 3.7 拷贝, 灵敏性强; 相关检测系数 R^2 为 0.998, 扩增效率为 95.7%; 扩增结果具有良好的线性关系, 且重复性检测效果好。**结论** 成功建立了 TAV TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法, 灵敏度高, 重复性好, 可用于 TAV 感染的早期快速检测。

【关键词】 树鼩腺病毒; 3' 保守区域; TaqMan; 实时荧光定量 PCR

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 03-0072-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.03.014

Establishment and application of a TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR for detection of tree shrew adenovirus (TAV)

SONG Qingkai, LI Xiaofei, MIAO Yurun, ZHANG Zhicheng, WANG Xuan, YUAN Yuan, DAI Jiejie, SUN Xiaomei*
(Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College; Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases; Yunnan Innovation Team of Standardization and Application Research in Tree Shrew, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To establish a quick and accurate method for detection of tree shrew adenovirus (TAV) using TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR. **Methods** Based on the published TAV genome sequence, a 3' conserved sequence was used to design specific probe primers. A standard curve was prepared using a recombinant plasmid containing the target gene fragment. A real-time fluorescence quantitative PCR method was established for detecting TAV based on TaqMan probe. **Results** The detection method was specific and was not cross-reactive with other common pathogens. The detection limit of the method was 3.7 copies/ μ L, showing a high sensitivity. The correlation coefficient was 0.998, and the efficiency was 95.7%. The amplification result showed a fine linear relationship, and the repeatability test effect was good. **Conclusions** The TAV real-time quantitative PCR detection method based on TaqMan probe has been successfully established. It has high sensitivity and reproducibility and can be applied to early detection of TAV infection.

【Key words】 tree shrew adenovirus; 3' conserved region; TaqMan; real-time fluorescence quantitative PCR

【基金项目】 国家科技支撑计划(编号:2014BAI01B00); 云南省联合支持国家计划项目(编号:2015GA009); 云南省科技人才和平台计划项目(编号:2017HC019)。

【作者简介】 宋庆凯(1991—), 男, 硕士, 研究方向: 病原生物学。E-mail: 869188548@qq.com

【通信作者】 孙晓梅(1963—), 女, 主任技师, 研究方向: 实验动物质量监控。E-mail: sxm@imbcams.com.cn

树鼩(*Tupaia belangeri*)作为与灵长类动物亲缘关系最近的新型模式动物,在人类疾病模型尤其是感染性疾病模型研究中发挥着不可或缺的作用,已逐步成为生物医学研究的热点^[1]。前期开展的相关研究表明,野生来源树鼩中腺病毒携带率较高,并有疑似病例发生,被列为树鼩实验动物微生物质量控制的检测指标之一。因此,建立一种高效、快速,可反应个体病毒载量的实时荧光定量 PCR 方法势在必行。

树鼩腺病毒(tree shrew adenovirus, TAV)属于腺病毒科,哺乳动物腺病毒属。迄今,已发现有 100 多种腺病毒能感染人、哺乳动物和禽类。腺病毒感染会引起急性上呼吸道感染、急性眼结膜炎、急性出血性膀胱炎、腹泻等疾病^[2]。目前,在树鼩腺病毒(TAV)检测方面,已有普通 PCR 方法报道^[3],但此类方法只可用于 TAV 定性检测且灵敏度低。本研究根据 TAV 的 3' 保守区域设计特异性引物,通用性好,稳定性高,适用于不同型别病毒株检测,建立了操作简便、敏感性高、特异性强、重复性好、可实时定量分析 TAV 感染程度的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法^[4-8],以期为 TAV 的分子流行病学调查和早期感染研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

野生来源成年树鼩,性别不限,在普通级环境设施中仅饲养了 3 个月,体重 120 ~ 150 g。饲养环境:温度 18℃ ~ 28℃,相对湿度 30% ~ 60%,噪音 ≤ 60 dB,光照强度 100 ~ 150 lx。实验动物来源于医学生物学研究所树鼩种质资源中心[SCXK(滇)K2013-0001],实验操作在医学生物学研究所树鼩种质资源中心实验设施进行[SYXK(滇)K2013-0001]。

1.2 主要试剂与仪器

Viral DNA Kit(购自 Omega),iTaq™ Universal Probes One-Step Kit(购自 Bio-Rad)。CFX96™ 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad),核酸蛋白检测仪, Vortex QL-902, 制冷机(雪科),台式微量高速离心机,恒温水浴锅,离心管。

1.3 实验方法

1.3.1 样本来源及 DNA 提取

树鼩腺病毒、树鼩呼肠孤病毒、EV71、人单纯疱疹病毒 1 型来自本实验室保存。使用 Viral DNA Kit 提取病毒 DNA。详细操作根据产品说明书进行。

1.3.2 TaqMan 实时荧光定量 PCR 的建立

(1)引物设计合成:从 NCBI 中检索获得 TAV 的全基因组,利用 DNA Star 软件设计扩增病毒株 3' 保守区域(22 989 bp ~ 23 476 bp)特异性引物,引物序列为:TAVF:5'-AAAGAATGCCCACCTCCCAT-3' 和 TAVR:5'-CAGTGGCAGGCCATTAAAGC-3',扩增的目的片段为 122 bp。根据测序所得目的基因序列设计荧光探针引物:5'-Fam-CTCGCCGCCGCGCGTTTCAC-Tamra-3'。委托昆明硕擎生物科技有限公司合成。

(2)阳性标准品的构建:以本实验室保存的阳性 TAV DNA 作为模板,进行目的基因片段扩增。反应体系:金牌 Mix (green) 20 μL, 10 μM TAVF 1 μL, 10 μM TAVR 1 μL, DNA 模板 3 μL, 终体积 25 μL。试剂盒参考退火温度为 55℃ ~ 60℃,优化后的反应条件:98℃ 2 min; 98℃ 10 s, 58℃ 15 s, 72℃ 15 s, 共 35 个循环; 72℃ 5 min。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定;胶回收纯化;将目的基因片段与 PUC57 载体进行连接;连接后产物转化 DH5α 感受态细胞;测序验证。采用紫外分光光度计测定 $A_{260/280}$ 数值,计算质粒浓度,将其换算为质粒拷贝数[每微升拷贝数 = 质粒浓度 × $(6.02 \times 10^{23}) \times (A_{260/280} \times 10^{-9}) / (\text{DNA 碱基数} \times 660)$],式中, $A_{260/280}$ 单位为 ng/μL。

(3)绘制标准曲线:将(2)中的质粒标准品 10 倍倍比稀释至每微升 10^1 拷贝。用梯度稀释的标准品作为模板,进行扩增。以每微升 $10^8 \sim 10^1$ 拷贝共 8 个梯度标准品建立标准曲线,设置复孔及阴性对照。扩增体系(20 μL): $2 \times \text{iTaq}^{\text{TM}}$ Universal Probes One-Step Reaction Mix 10 μL, 10 μM TAVF 1 μL, 10 μM TAVR 1 μL, 10 μM 探针引物 2 μL, 标准 DNA 模板 3 μL, Easy Dilution 3 μL。优化后的扩增条件为:95℃ 2 min, 95℃ 10 s, 58℃ 30 s, 共 40 个循环。通过软件自动绘制出标准曲线。

(4)灵敏性检测:以(3)中梯度稀释的质粒标准品为模板,进行 TaqMan 实时荧光定量 PCR 扩增反应,检测试验的灵敏性。

(5)重复性及特异性检测:用梯度稀释的质粒标准品作为模板,每个标准品做 3 个平行管,通过计算 Ct 均值、变异系数(即相对标准差:指标准差除以平均值,以百分数表示)分析试验的重复性。以树鼩呼肠孤病毒、EV71、人单纯疱疹病毒 1 型、TAV 作为样品,测定 TaqMan 实时荧光定量 PCR 特异性。

1.3.3 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的初步应用

采取 48 份人工饲养 3 个月野生来源树鼩粪便,并用 Viral DNA Kit 提取 DNA 作为模板,进行荧光定量 PCR 检测。

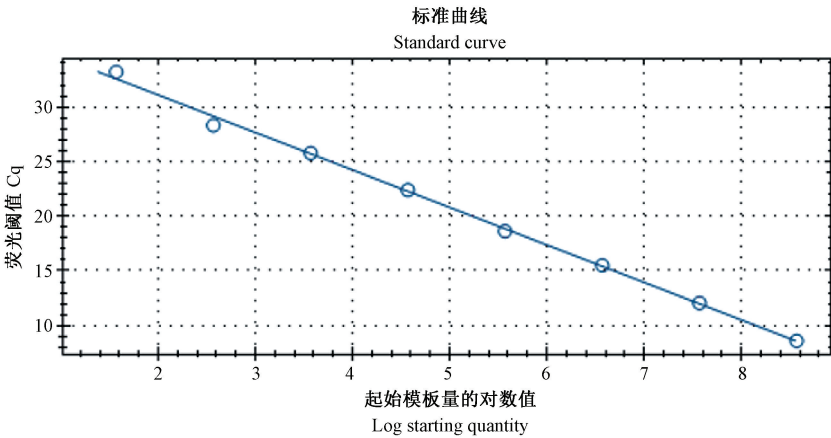
2 结果

2.1 目的片段的鉴定

重组质粒用 *Pvu* II 酶切,结果见图 1A,酶切后获得两个片段,长度相加即为质粒及插入片段大小。对重组质粒标准品进行 PCR 鉴定,扩增获得一条约 122 bp 的特异片段,结果见图 1B,与预期扩增结果相符。对目的基因片段进行测序分析,NCBI 比对结果同 TAV 3' 保守区域(22 989 bp ~ 23 476 bp)序列完全一致,表明目的基因片段已成功接入载体中。

2.2 TaqMan 实时荧光定量 PCR 标准曲线

重组质粒标准品经核酸分析仪检测结果: $A_{260/280}$ 值为 1.93,浓度为 50 ng/ μ L,即拷贝数为每微升 3.7×10^9 拷贝。以 10 倍梯度稀释的重组质粒标准品为模板进行扩增,绘制标准曲线(图 2),相关系数 R^2 为 0.998,扩增效率为 95.7%,以起始模板量的对数值为 X 轴,循环数(C_t 值)为 Y 轴做回归曲线,即标准曲线($Y = -3.430lg^x + 37.951$),具有良好的线性关系。

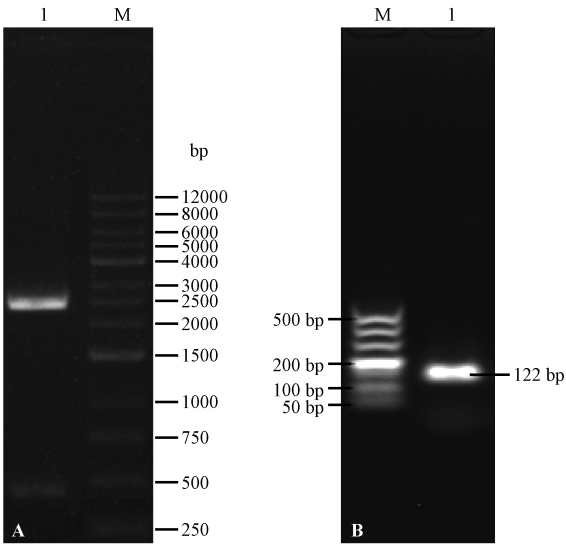


注:从左到右标准品拷贝数依次为:每微升 $3.7 \times 10^1, 3.7 \times 10^2, 3.7 \times 10^3, 3.7 \times 10^4, 3.7 \times 10^5, 3.7 \times 10^6, 3.7 \times 10^7, 3.7 \times 10^8$ 拷贝。图中“○”代表标准品。

图 2 不同稀释度阳性质粒扩增形成的标准曲线

Note. The number of copies of the standard from left to right is: $3.7 \times 10^1, 3.7 \times 10^2, 3.7 \times 10^3, 3.7 \times 10^4, 3.7 \times 10^5, 3.7 \times 10^6, 3.7 \times 10^7, 3.7 \times 10^8$ copies per microliter, respectively. “○” represents standard values.

Fig.2 Standard curve of plasmid DNA in different dilutions



注:A;M:1 kb DNA marker,I:酶切后的 PUC57 重组质粒;B: M:500 bp DNA marker,I:重组质粒 PCR 产物。

图 1 目的片段的扩增

Note. A; M: 1 kb DNA marker; I: PUC57 recombinant plasmid after digestion. B; M: 500 bp DNA marker; I: PCR product of recombinant plasmid.

Fig.1 Amplification of target fragment

2.3 TaqMan 实时荧光定量 PCR 灵敏性

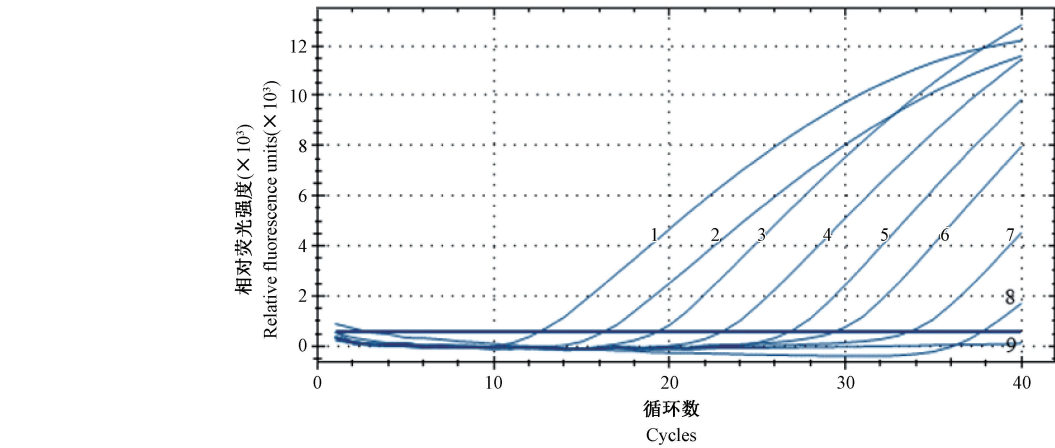
灵敏性检测试验扩增结果如图 3,1 ~ 8 为不同稀释浓度的阳性质粒,当阳性质粒拷贝数为每微升 3.7 拷贝,才出现特异性扩增曲线且阴性对照无特异性扩增,表明该方法的最低检测灵敏度可达每微升 3.7 拷贝。

2.4 TaqMan 实时荧光定量 PCR 重复性

分别以每微升 3.7×10^5 、 3.7×10^6 和 3.7×10^7 拷贝的重组质粒标准品为模板进行扩增,每份标准品设置 3 个平行管,通过计算 Ct 值的变异系数对试验重复性进行评价,结果详见表 1,变异系数不足 0.5%。

2.5 TaqMan 实时荧光定量 PCR 特异性

特异性试验检测结果(图 4)显示,在 40 个反应循环内,以每微升 3.7×10^6 拷贝的质粒标准品和 TAV 为模板的 PCR 反应有特异性扩增曲线。以树鼩呼肠孤病毒、EV71、人单纯疱疹病毒 1 型为模板



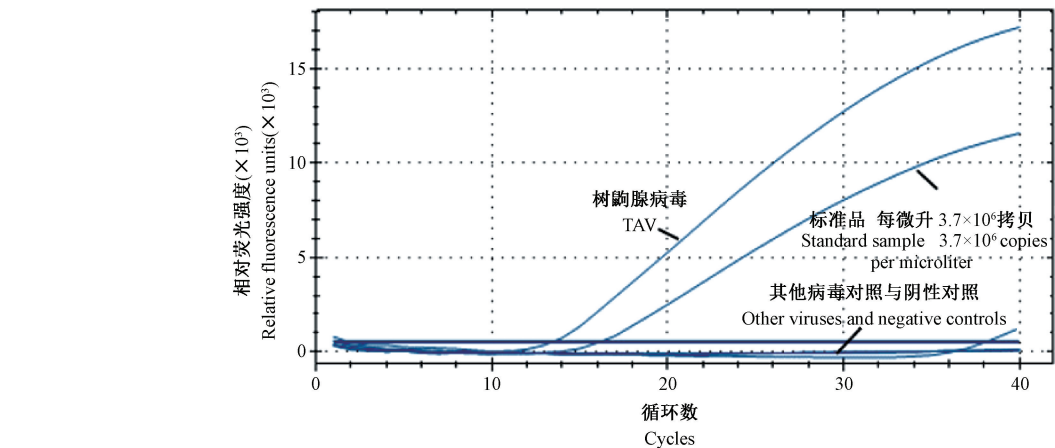
注:1~8:每微升 3.7×10^7 、 3.7×10^6 、 3.7×10^5 、 3.7×10^4 、 3.7×10^3 、 3.7×10^2 、 3.7×10^1 、 3.7×10^0 拷贝;9:阴性对照。
图 3 TaqMan 实时荧光定量 PCR 灵敏性检测结果
Note. 1~8: 3.7×10^7 , 3.7×10^6 , 3.7×10^5 , 3.7×10^4 , 3.7×10^3 , 3.7×10^2 , 3.7×10^1 , 3.7×10^0 copies per μL , respectively; 9: Negative control.

Fig.3 Sensitivity of the TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR

每微升拷贝数 Copies per microliter	Ct 值 Ct value			平均 Ct 值 Average of Ct value	变异系数(%) Coefficient of variation
	1	2	3		
3.7×10^7	13.18	13.19	13.21	13.19	0.11
3.7×10^6	16.53	16.57	16.59	16.56	0.18
3.7×10^5	20.01	20.09	20.11	20.07	0.26

表 1 重复性检测结果

Tab.1 Reproducibility of the TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR



注:图中“其他病毒”指树鼩呼肠孤病毒、EV71、人单纯疱疹病毒 1 型。
图 4 TaqMan 实时荧光定量 PCR 特异性检测结果
Note. “Other viruses” in the figure are tree shrew reovirus, EV71, human herpes simplex virus type 1.
Fig.4 Specific test results of the TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR

的 PCR 反应均无扩增曲线。表明建立的基于 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法具有高度特异性。

2.6 TaqMan 实时荧光定量 PCR 初步应用

如图 5 所示,在反应的 35 个循环内,48 份样品中有 19 份阳性,阳性率为 39.58%,最低检出浓度为每微升 3.92 拷贝。传统方法检测阳性率仅为 25% (12/48)。因此,建立的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法更加灵敏且高效,可更好地运用于树鼩腺病毒的检测,为其防控提供更精准的检测方法。

3 讨论

树鼩腺病毒是无囊膜线性单分子双股 DNA 病毒,归类于腺病毒科哺乳动物腺病毒属。在前期饲养观察中,发现该病毒可普遍感染树鼩并引起急性上呼吸道感染、急性眼结膜炎、急性出血性膀胱炎、腹泻等多种疾病。Darai 等早在 1980 年报道,在 38 份树鼩肾组织培养物中分离获得 1 株 TAV^[9-10],病毒可凝集大鼠及人“O”型红细胞。陈元鼎等^[11] 1987 年报道,在 90 份成年云南源树鼩大便中检测到 12 份腺病毒阳性,阳性率为 3%。吴小闲等^[12] 1990 年报道,从云南野生树鼩咽拭子、肾细胞培养物和粪便中分离到 10 株 TAV,并鉴定为 2 个血清型 (TAV-1 和 TAV-2)。王淑菁等^[3] 建立了树鼩腺病毒 PCR 检测方法,检测了 56 份刚从野外捕获来源的树鼩粪便 DNA,有 24 份阳性,检出的阳性率达到 42.85%,结果显示野生树鼩具有较高的携带率。

迄今,在腺病毒检测方面已有多种方法。其中,间接免疫荧光检测方法适用于细胞培养物中 TAV 的检测;ELISA 检测方法主要适用于对 TAV 抗

体的筛查,其缺点是检测结果假阳性偏高;PCR 检测法具有快速方便、灵敏性好、特异性强等特点,其中实时荧光定量 PCR^[13-14] 方法与传统 PCR 方法比较又具有更大的优势,最大的优势是可实时检测反应早期到终点过程中 PCR 的扩增情况,此外还具有灵敏性好、所需样品少、特异性强、可精确进行定量分析等特点,被认为是病原学检测的金标准。

本研究根据 TAV 的 3' 保守区域设计特异性扩增引物^[15-17],采用传统 PCR 方法扩增目的片段并胶回收纯化连接载体,构建出重组质粒标准品,并探索优化反应条件及扩增体系,成功建立了高效、特异、灵敏性强的 TAV TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法。重复性检测试验中以 3 个梯度标准品进行 3 次重复,变异系数检测结果均小于 0.05%,即试验重复性好。采用此方法检测树鼩源呼肠孤病毒以及其他引起腹泻、急性眼结膜炎等疾病的病毒均无交叉反应,表明建立的检测方法具有良好的特异性。研究中应用此方法检测人工饲养 3 个月的野生来源树鼩 TAV 携带情况,检测结果显示,此方法可定性及定量分析不同个体病毒载量情况,灵敏度高,在 35 个循环内最低检测限度达每微升 3.92 拷贝。阳性检出率为 39.58%,略低于王淑菁等^[3] 报道的野生源树鼩病毒检测结果,原因可能与样品来源有关。

本研究建立的基于 TAV 的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法具有高效、灵敏度高、特异性和重复性好的优点,既可定性分析又可定量分析^[18]。该检测方法的构建为 TAV 的致病^[19]、溶瘤^[20] 机理研究提供了详细可靠的技术支持,同时也对 TAV 防控具有重要作用。

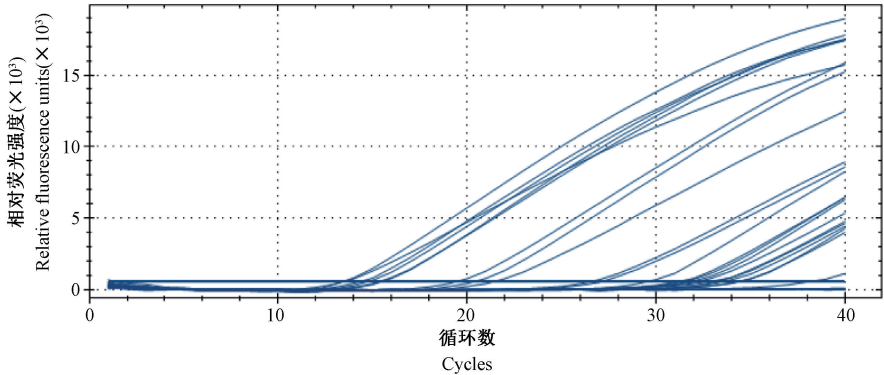


图 5 初步应用检测结果

Fig.5 Preliminary application of the TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR

参考文献:

- [1] 向征, 杨照青. 树鼩寄生虫研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(9): 955 – 959.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 1104 – 1129.
- [3] 王淑菁, 付瑞, 李晓波, 等. 树鼩腺病毒(TAV)PCR 方法的建立及初步应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 42 – 46.
- [4] Jothikumar N, Cromeans TL, Hill VR, et al. Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41 [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(6): 3131 – 3136.
- [5] 万春和, 陈翠腾, 傅秋玲, 等. 禽坦布苏病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(8): 49 – 54.
- [6] 邱丽叶. 禽腺病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立与初步应用 [D]. 东北农业大学, 2016.
- [7] 曹伟伟, 郭抗抗, 许信刚, 等. 猪圆环病毒 II 型 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(1): 13 – 18.
- [8] 熊建英. 荧光定量 PCR 快速检测登革 1 型病毒 [D]. 南方医科大学, 2012.
- [9] Darai G, Matz B, Flügel RM, et al. An adenovirus from *Tupaia* (tree shrew): growth of the virus, characterization of viral DNA, and transforming ability [J]. Virology, 1980, 104(1): 122 – 138.
- [10] Schöndorf E, Bahr U, Handermann M, et al. Characterization of the complete genome of the *Tupaia* (tree shrew) adenovirus [J]. J Virol, 2003, 77(7): 4345 – 4356.
- [11] 陈元鼎, 戴国珍, 李军, 等. 树鼩大便中腺病毒的实验研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 1987, 3(3): 2 – 4.
- [12] 吴小闲, 唐恩华, 张新生, 等. 树鼩腺病毒(I 和 II 型)的生物学性状、抗原关系和血清抗体的研究 [J]. 中国医学科学院学报, 1990, 12(2): 153 – 156, 15.
- [13] 宋爽, 赵柏林, 曲萍, 等. 牛病毒性腹泻病毒、牛传染性支气管炎病毒和口蹄疫病毒多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(2): 133 – 136.
- [14] Tam S, Clavijo A, Engelhard EK, et al. Fluorescence-based multiplex real-time RT-PCR arrays for the detection and serotype determination of foot-and-mouth disease virus [J]. J Virol Methods, 2009, 161(2): 183 – 191.
- [15] 李晓飞, 殷安国, 张媛, 等. 树鼩呼肠孤病毒 RT-nPCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(6): 63 – 68.
- [16] 王楷宸, 邱源, 纪海旺, 等. 通用引物扩增甲型流感病毒基因组及其高通量测序 [J]. 中国动物检疫, 2017, 34(1): 90 – 93.
- [17] 任少堂, 秦一中, 汪伟业, 等. 用高度保守区引物和套式 PCR 扩增丙型肝炎病毒 [J]. 第二军医大学学报, 1993, 14(5): 424 – 427.
- [18] 胡丹, 郝丽娜, 李丙军, 等. 汉坦病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 27(4): 347 – 350.
- [19] 刘娟. 人呼吸道腺病毒 55 型的基因组学与病原学特征研究 [D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2014.
- [20] Kim D. Replication-selective oncolytic adenoviruses; virotherapy aimed at genetic targets in cancer [J]. Oncogene, 2000, 19(56): 6660 – 6669.

[收稿日期] 2017 – 08 – 25