

应用实时荧光聚合酶链反应检测婴幼儿腹泻标本中的腺病毒

郑晓群 黄燕燕 彭颖 华科 吕建新

【摘要】 目的 建立实时荧光聚合酶链反应(Real-time PCR)方法检测腺病毒,并分析浙江省温州地区散发性婴幼儿腹泻患者不同型别腺病毒的感染情况。**方法** 根据 GenBank 中腺病毒六邻体基因序列设计一对通用引物,建立 Real-time PCR 方法检测婴幼儿腹泻标本中腺病毒 DNA,并与免疫层析法比较;同时对 Real-time PCR 方法检测阳性的标本进行 PCR 产物测序和病毒分离培养及酶切鉴定。**结果** 建立快速、特异检测婴幼儿腹泻标本中腺病毒 DNA 的 Real-time PCR 技术。157 份婴幼儿腹泻标本中免疫层析法检测阳性 3 份,阳性率为 1.91%;Real-time PCR 检测阳性 5 份,阳性率为 3.18% (5/157);154 份免疫层析法检测阴性标本中,有 2 份 Real-time PCR 法检测为阳性。5 份 Real-time PCR 检测阳性标本经测序鉴定,Ad3 型占 1.91% (3/157), Ad7 型占 1.27% (2/157);经病毒分离培养检出阳性 2 例,酶切鉴定为 Ad3 型。**结论** Real-time PCR 技术结合 PCR 产物直接测序分析具有敏感、特异等优点,适用于腹泻标本中腺病毒的检测及分型。2008 年 2—4 月浙江省温州地区散发性婴幼儿腹泻的腺病毒主要为 Ad3 型和 Ad7 型。

【关键词】 腺病毒; 腹泻; 聚合酶链反应, 实时

Detection of adenoviruses in feces of infants with diarrhea by Real-time PCR ZHENG Xiao-qun*, HUANG Yan-yan, PENG Ying, HUA Ke, LV Jian-xin. *The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China

【Abstract】 Objective A Real-time PCR method was established to study the infection of adenovirus (Ad) in infants with sporadic diarrhea in Wenzhou. **Methods** According to hexon gene of adenovirus, one prime pair was designed as universal primers and applied to detect adenovirus DNA by Real-time PCR. It was also compared with immunochromatographic assay. 157 fecal specimens from diarrhea infants were tested while positive specimens were sequenced and identified by isolate culture and restriction endonucleases. **Results** A rapid and specific Real-time PCR assay for detection adenovirus was set up. The positive rates of adenovirus in fecal specimens by immunochromatographic assay and Real-time PCR were 1.91% (3/157) and 3.18% (5/157), respectively. Out of the 154 specimens with negative result from immunochromatographic assay, 2 showed positive by Real-time PCR. 5 positive specimens, identified by Real-time PCR, were sequenced as Ad3 (3/157, 1.91%) and Ad7 (2/157, 1.27%). 2 of the 5 positive specimens were proved to be Ad3 by cell culture and restriction endonucleases. **Conclusion** Real-time PCR combined with sequence analysis seemed more sensitive and specific so could be used for identifying types of adenovirus in clinical specimens. Ad3 and Ad7 were important pathogens which caused infant sporadic diarrhea in Wenzhou during February and April in 2008.

【Key words】 Adenoviruses; Diarrhea; Real-time polymerase chain reaction

腺病毒是引起婴幼儿病毒性腹泻的重要病原体,仅次于轮状病毒,主要感染 2 岁以下儿童,可通过人与人的接触传播,也可经粪-口途径或呼吸道传播^[1,2]。迄今为止,已发现腺病毒有 41 个基因型,分别属于 A~F 6 个亚组,不同亚组的 DNA 碱基构成不同,同一亚组内病毒核苷酸序列有 70%~90%是

相同的。为了解浙江省温州地区婴幼儿腹泻患者不同型别腺病毒的感染情况,建立了实时荧光 PCR (Real-time PCR)方法快速检测婴幼儿腹泻标本中腺病毒 DNA,并结合 PCR 产物直接测序技术对腺病毒进行分型,现报告如下。

材料与方 法

1. 材料:

(1)标本收集:收集 2008 年 2—4 月温州医学院附属第二医院住院的婴幼儿腹泻标本 157 例,保存于 -70℃。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.04.018

基金项目:温州市科技发展计划基金(Y2006A033);浙江省自然科学基金(Y205188)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院(郑晓群);温州医学院检验医学院 生命科学学院(黄燕燕、彭颖、华科、吕建新)

(2) 主要试剂或溶液: MniBEST Viral DNA Extraction Kit Ver3.0, ExTaq DNA polymerase, DNA Fragment Purification Kit Ver2.0 和 SYBR Green Real-time PCR Kit 均购自大连宝生物公司; Hind III、EcoR I 和 Sal I 等核酸内切酶购于上海生工生物工程有限公司; 腺病毒免疫层析检测试剂盒为比利时 Coris BioConcept 公司产品, 其他常用试剂均为国产试剂。

(3) 主要细胞株: A549 细胞株(人肺癌上皮细胞)购自中国科学院上海细胞库, 使用含 10% FBS 的 F12 培养基(购自 Gibco 公司), 在 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养; Ad7 型腺病毒由本室保存。

(4) 主要仪器和设备: ABI2720 型 PCR 仪; AB7500 型荧光定量 PCR 仪; DYY-III 5 型稳流稳流电泳仪等。

2. 方法:

(1) 腺病毒免疫层析检测: 将腹泻标本移入加有 0.5 ml 抽提液的试管中, 搅拌溶液直至均匀并孵育 1~2 min, 将试剂条按红色箭头方向浸入, 反应 5~10 min 观察结果, 具体操作见试剂盒说明书。

(2) 标本中病毒 DNA 提取: 患儿腹泻标本反复冻融 3 次, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液。上清液经过滤(0.45 μm 滤器)后用于病毒 DNA 提取和细胞培养。病毒 DNA 提取的具体操作参照 MiniBEST Viral DNA Extraction Kit Ver3.0 试剂盒说明书。提取的病毒 DNA 溶液, -70℃ 保存, 用于 PCR 检测。

(3) Real-time PCR 扩增及融解曲线分析: 用于 Real-time PCR 的一对寡核苷酸引物位于腺病毒六邻体基因高度保守区, 扩增片段长度为 300 bp: Hex F: 5'-gcc gca gtc gtc tta cat gca cat c-3', Hex R: 5'-cag cac gcc gcg gat gtc aaa gt-3'; 采用 TaKaRa 公司 SYBR PCR Kit, 在 AB7500 型荧光定量 PCR 仪上扩增并实时检测。反应体系为 25 μl, 各成分参照试剂说明书配置。PCR 循环参数为: 95℃ 1 min 预变性; 95℃ 变性 5 s、55℃ 退火 10 s、72℃ 延伸 35 s 并检测荧光信号, 共 40 个循环; PCR 扩增结束后, 产物先降温到 65℃, 然后以每秒 0.2℃ 的速度连续加热到 95℃, 同时监测获得荧光信号, 进行融解曲线分析。

(4) PCR 产物直接测序: 对于有阳性结果的标本, 用上述引物扩增腺病毒目的片段。反应体积为 50 μl, 含 10× ExTaq buffer 5 μl, 2.5 mmol/L dNTP Mixture 5 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μl, 引物 Hex F 和 Hex R 各 0.5 μl 及 1.5 U ExTaq 酶中加入 2 μl DNA 提取液, 其余用 ddH₂O 补至 50 μl。反应在 ABI2720 型 PCR 仪上进行, 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性

1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后一个循环 72℃ 延伸 10 min, 扩增片段为 300 bp。扩增后, 取 10 μl 反应产物经 1% 琼脂糖(含 EB)电泳, 置凝胶分析系统观察, 拍照。扩增后 PCR 产物, 使用大连宝生物公司的 DNA Fragment Purification Kit Ver2.0(按说明书进行操作)试剂盒纯化 DNA, 送上海捷瑞生物技术有限公司测序。

(5) 病毒的分离培养: 六孔板中 A549 细胞接种于含 10% 胎牛血清, 及双抗(抗生素终浓度: 青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 U/ml)的 F12 培养液中, 37℃ 5% CO₂ 条件下培养。待细胞长成单层后, 吸弃原有培养液, 加入腹泻标本(PCR 检测阳性)的上清滤过液 500 μl 吸附 1.5 h, 每 15 min 轻轻晃动培养液一次, 以混匀, 之后再换以 5% 胎牛血清的培养液维持。37℃、5% CO₂ 条件下培养, 并逐日在倒置显微镜下观察细胞生长情况。一般在感染后 5~7 d 即可看到明显的细胞病变(CPE)现象。当繁殖病毒的细胞出现 80%~100% 的 CPE 时, 收获并反复冻融三次使细胞破裂释放出病毒, 4000 r/min 离心 10 min, 取其上清, 所得病毒上清液用于进一步酶切鉴定。

(6) 病毒 DNA 的限制性内切酶分析: 病毒上清液中加入等量的 PEG-8000(20%, 1 mol/L NaCl)4℃ 过夜, 12 000 r/min 离心 30 min, 去上清, 沉淀溶于 400 μl 蛋白质裂解液(5% SDS, 20 mmol/L EDTA, 50 μg/ml 蛋白酶 K), 56℃ 水浴 1 h 后, 常规酚-氯仿-异戊醇抽提腺病毒基因组 DNA, 分别用 Hind III、EcoR I 和 Sal I 内切酶进行酶切, 产物用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

结 果

1. 腺病毒 Real-time PCR 检测方法的建立: 本研究建立的 Real-time PCR 体系能特异性扩增腺病毒六邻体基因片段, 特异性扩增曲线见图 1; 融解曲线图只有一个 PCR 产物融解峰, 其 T_m 值约为 81℃, 无非特异扩增产物融解峰。PCR 产物经琼脂糖电泳后, 在紫外灯下可出现一条 300 bp 的清晰条带(图 2)。

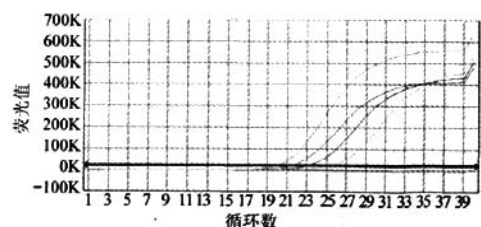
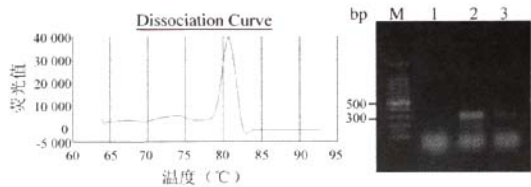


图1 腺病毒 DNA Real-time PCR 扩增曲线



注:M:Marker 100 bp; 1:阴性对照; 2:Ad7阳性对照; 3:临床标本

图2 Real-time PCR产物融解曲线和电泳图

对轮状病毒、星状病毒等阳性标本进行检测,结果均为阴性,说明本法与常见肠道感染相关病毒间无交叉反应。

2. 临床标本腺病毒的检测:157份婴幼儿腹泻标本免疫层析法检测阳性3份,阳性检出率为1.91% (3/157);Real-time PCR法检测阳性5份,阳性检出率为3.18% (5/157)。3份免疫层析法检测阳性标本,

Real-time PCR检测均阳性;154份免疫层析法检测阴性标本中,有2份Real-time PCR检测为阳性,可能是标本中病毒含量低,用常规方法不易检出之故。

3. PCR产物直接测序分析:5份PCR检测阳性标本经产物直接测序,结果经Blast比对后显示其中3份为Ad3型,主要与NCBI上发表的Ad3全基因组序列AY599834.1、AY599836.1、DQ08466.1、DQ099432.4进行比对(图3);2份为Ad7型,主要与Ad7全基因组序列AY495969.1、AY594256.1、AY601634.1比对(图4)。相似度均达到了98%~99%。

4. 腺病毒的分离培养:5份PCR检测阳性标本上清液感染A549细胞5~7d后,有2份出现了典型的细胞病变,即细胞变圆,变肿胀,聚集呈葡萄串珠状(图5)。

5. 腺病毒DNA的限制性内切酶图谱分析:2份

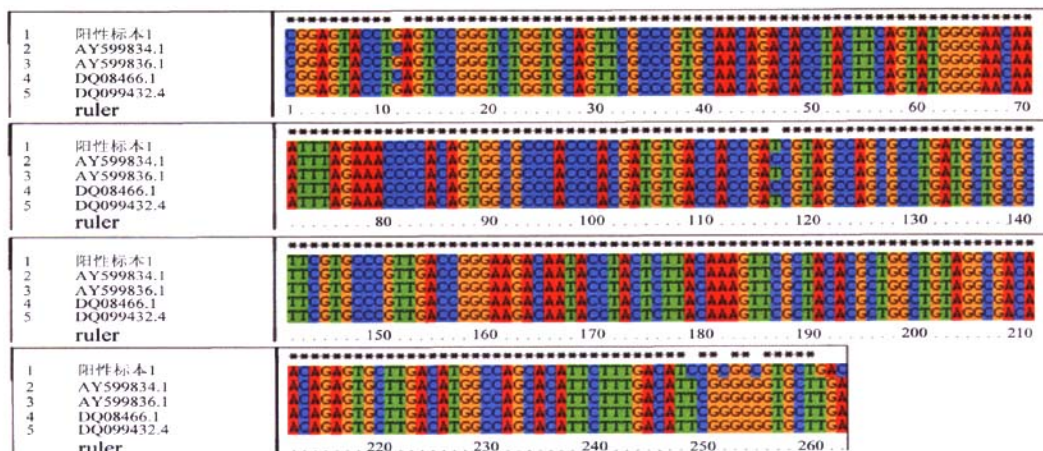


图3 Ad3型腺病毒标本的测序比对结果

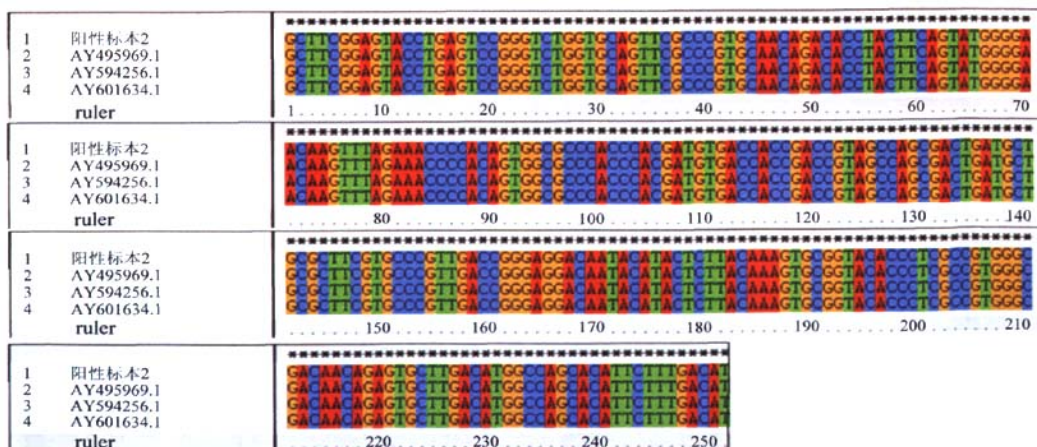
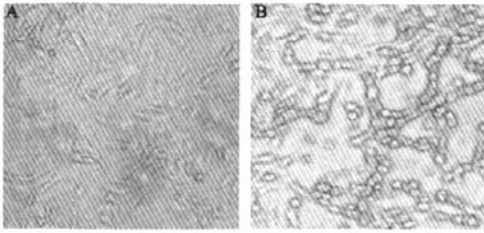


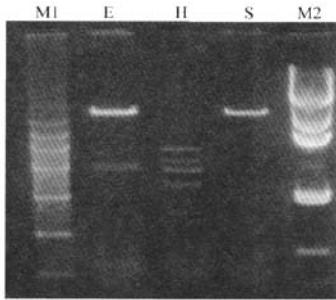
图4 Ad7型腺病毒标本的测序比对结果



注:A:正常 A549 细胞(100×); B:A549 细胞感染后 7 d(100×)

图 5 腺病毒感染 A549 细胞后的细胞病变效应

细胞培养阳性标本,分别提取病毒基因组 DNA,通过一系列的内切酶水解作用后,病毒基因组 DNA 的酶切图谱与报道的图谱相比^[3],进一步鉴定细胞培养阳性标本为 Ad3 型腺病毒(图 6)。



注:M1:15 000 kb DNA Ladder; M2:λDNA Hind III; E:EcoR I; H:Hind III; S:Sal I

图 6 腺病毒基因组 DNA 的酶切图谱

讨 论

婴幼儿腹泻是儿童中的常见病、多发病。据临床资料表明,婴幼儿感染性腹泻中病毒感染占 85%~90%,细菌及其他感染占 10%~15%。因此,病毒性腹泻在急性感染性腹泻中占有重要地位^[1,2]。目前临床上腹泻患儿的病原学检查主要集中在轮状病毒,然而其他病原体的检测并未引起足够的重视,以致于相当一部分腹泻患儿病因诊断不明。因此,对非轮状病毒引起的腹泻患儿进行其他病原学检测显得十分必要。腺病毒是引起婴幼儿病毒性腹泻的又一重要病原体,主要感染 2 岁以下儿童,仅次于轮状病毒,占病毒腹泻病原第二位^[4]。研究表明,腺病毒肠炎无明显的季节特点,全年均可发病,主要由 F 组 40 和 41 型引起,其他腺病毒较少引起婴幼儿腹泻^[5]。

腺病毒的检测方法主要有病毒的分离培养、免疫学检测、常规 PCR 琼脂糖电泳法和 PCR-RFLP 等^[6]。其中病毒的分离培养需特殊实验室,且培养困难,培养时间长,尚不能临床常规应用;由于国内缺乏单克

隆抗体,免疫学检测仅依靠少量的进口试剂,有一定假阳性,且敏感性也欠佳;Real-time PCR 技术由于其简便易行、灵敏特异等优点,已迅速广泛地应用于感染性疾病病原体,即病毒、细菌、衣原体、支原体等的检测研究。SYBR Green Real-time PCR 技术是近年发展起来的一种新的核酸检测技术^[7],与常规 PCR 的不同之处是在 PCR 反应体系中加入了特殊的荧光染料 SYBR Green,通过其发射的荧光信号直接检测 PCR 扩增产物,省去了琼脂糖凝胶电泳等步骤,不需打开反应管,便可给出结果,从而减少了造成污染的机会;同时提高了检测的灵敏度、特异性及整个操作的自动化程度。

本研究选用 Real-time PCR 引物是根据人腺病毒 hexon 的保守序列设计的,能扩增所有型别^[6],并与可识别腺病毒 A、B、C、D、E 和 F 组共同抗原的免疫层析检测方法比较。本次检测 157 份婴幼儿腹泻粪便标本,结果表明,免疫层析法检测腺病毒阳性检出率为 1.91%,Real-time PCR 法阳性检出率为 3.18%。154 份免疫层析法检测阴性标本中,有 2 份 Real-time PCR 检测为阳性,提示 Real-time PCR 法比免疫层析法更为敏感。另外,5 份 Real-time PCR 阳性标本中,只有 2 份经分离培养和酶切鉴定为 Ad3 型,这说明 Real-time PCR 检测的灵敏度也高于病毒分离培养。PCR 产物经纯化后测序,结果经 Blast 比对鉴定后 3 份为 Ad3 型、2 份为 Ad7 型腺病毒,表明 2008 年 2—4 月间浙江省温州地区散发性婴幼儿腹泻的腺病毒主要为 Ad3 型和 Ad7 型。因此,本研究建立的腺病毒 Real-time PCR 快速检测方法,对于婴幼儿肠道腺病毒感染的分子流行病学研究、制定治疗及预防措施具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Li L, Phan TG, Nguyen TA, et al. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol*, 2005, 49(2):121-128.
- [2] Phan TG, Nguyen TA, Kuroiwa T, et al. Viral diarrhea in Japanese children: results from a one-year epidemiologic study. *Clin Lab*, 2005, 51(3-4):183-191.
- [3] Kooloff KL, Losonsky GA, Morris JG Jr, et al. Enteric adenovirus infection and childhood diarrhea: an epidemiologic study in three clinical settings. *Pediatrics*, 1989, 84(2):219-225.
- [4] 何雅青,杨洪,林奕芝,等. 深圳市婴幼儿腹泻中肠道腺病毒感染的流行特点调查. *中华流行病学杂志*, 2001, 22(2):96-98.
- [5] 金玉,叶新华,方肇寅. 婴幼儿肠道腺病毒研究进展. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(5):510-512.
- [6] Allard A, Albinsson B, Wadell GR. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(2):498-505.
- [7] Scipioni A, Mauroy A, Ziant D, et al. A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition. *J Virol*, 2008, 5(1):94-95.

(收稿日期:2008-09-01)

(本文编辑:张林东)