

巢式多重聚合酶链反应在腺病毒检测及分型中的应用

邓洁 钱渊 赵林清 朱汝南 王芳 孙宇

【摘要】 目的 建立一种快速、敏感、特异的腺病毒检测及分型方法。方法 根据编码腺病毒六邻体基因的核苷酸序列设计一对外引物(即通用引物),扩增产物为1278 bp;再分别设计针对腺病毒六邻体基因3、7、11和21型特异性序列的4对内引物,扩增产物分别为502、311、880和237 bp。应用多重巢式聚合酶链反应(nest-PCR)技术将这4对引物用于同一聚合酶链反应管中,根据扩增产物在琼脂糖凝胶电泳上的大小,即可鉴别所测毒株的型别。结果 3、7、11和21型腺病毒标准株和分离株分别产生预期的特异性扩增片段,与其他常见的呼吸道病毒等无交叉反应。118份经病毒分离和/或间接免疫荧光法确定为腺病毒阳性的急性呼吸道感染患儿临床标本中,腺病毒3型占64.4%(76/118),7型占31.4%(37/118),11型占2.5%(3/118),未检测到21型;2份病毒分离和间接免疫荧光法均为腺病毒阳性的标本中,用该方法未能鉴定出型别,可能是3、7、11、21型以外的腺病毒,占1.7%(2/118)。33份经病毒分离和/或间接免疫荧光法均未检测到腺病毒的标本中,有3份为PCR阳性(包括1份7型,2份3型)。结论 该方法鉴别3、7、11、21型腺病毒具有快速、简便、特异等特点,适用于腺病毒型别鉴定,可以为急性呼吸道感染的临床或群体公共卫生事件提供病原学诊断依据。

【关键词】 腺病毒;多重聚合酶链反应;分型

Identification and typing for adenovirus by multiplex nest-PCR DENG Jie, QIAN Yuan, ZHAO Ling-qing, ZHU Ru-nan, WANG Fang, SUN Yu. Laboratory of Virology, Beijing Municipal Laboratory of Infection and Immunity, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

Corresponding author: QIAN Yuan, Email: yqianbjc@263.net

【Abstract】 Objective To develop a rapid, sensitive and specific method in identifying and typing on adenovirus from clinical specimens. Methods Primers were designed using hexon gene of adenovirus as target. One primer pair was designed as universal primers for amplifying a 1278 bp gene fragment located at the hexon gene of adenovirus from all types. Four primer pairs located within the region of this 1278 bp were specifically designed for amplifying types 3, 7, 11 and 21 of adenoviruses, which were used for multiplex nest-PCR in a single tube. The products from this multiplex nest-PCR were 502 bp (for type 3), 311 bp (for type 7), 880 bp (for type 11) and 237 bp (for type 21), respectively. Type of the adenovirus tested could then be determined after agarose electrophoresis analysis of the PCR products. Results PCR products with predicted sizes were visualized in the agarose gel for prototype strains of adenovirus types 3, 7, 11 and 21, but not for other respiratory viruses, indicating that the technique was specific without cross reaction with other viruses. Out of the 118 clinical specimens which had been proved to be adenovirus positive by tissue culture and/or immunofluorescence assay, 76 belonged to adenovirus type 3 (76/118, 64.4%), 37 to adenovirus type 7 (37/118, 31.4%), 3 to adenovirus type 11 (3/118, 2.5%) but no adenovirus type 21 was detected. Two of the 118 positive specimens which were positive by both tissue culture and immunofluorescence could not be identified, suggesting that these 2 strains (1.7%) were with the types other than types 3, 7, 11 and 21. Out of the 33 specimens which were negative by both tissue culture and immunofluorescence, 3 showed positive by this multiplex PCR (2 of type 3 and 1 of type 7), suggesting this method was more sensitive than tissue culture and immunofluorescence. Conclusion This multiplex nest-PCR method had the benefit of rapid, sensitive and specific nature so could be used for identifying types of adenoviruses in the clinical specimens.

【Key words】 Adenovirus; Multiplex nest-PCR; Typing

基金项目:北京市自然科学基金基础性研究资助项目(JS96004);北京市科委新星计划资助项目(2004B34)

作者单位:100020 北京,首都儿科研究所病毒研究室北京市感染与免疫中心实验室

通讯作者:钱渊,Email: yqianbjc@263.net

腺病毒(ADV)是双链 DNA 病毒,主要免疫蛋白是六邻体和五邻体,六邻体含型、组和亚组抗原决定簇,在感染中起重要作用^[1]。迄今为止,已发现 ADV 有 51 个血清型,分属于 6 个不同的亚组^[2],不同亚组的 ADV 其分子量和碱基构成不同,同一亚组内病毒核苷酸序列有 70%~90% 是相同的,不同组 ADV 的 DNA 仅有 10%~25% 是同源的^[1]。ADV 感染人类,可引起多种疾病,如肺炎、眼结膜炎、脑炎、膀胱炎等^[3]。某些型别的 ADV 引起的肺炎往往很严重,特别是在婴幼儿中可引起严重的甚至是致命的肺炎或支气管炎^[4]。在婴幼儿下呼吸道感染病例中,有 5% 与 ADV 有关^[5],与呼吸道感染有关的是 B、C 和 E 组,尤其是 B 亚组可引起严重的呼吸道疾病^[6]。在我国引起呼吸道感染主要是 3、7、11 型等^[1],也有文献报道 3、7、21 型曾引起过严重的致死性肺炎、眼结膜炎等暴发流行^[7],因此我们针对六邻体蛋白设计了 3、7、11 和 21 型特异性 ADV 引物,以期对临床标本同时进行 ADV3、7、11、21 型检测,对保存的临床标本进行回顾性研究。

材料与方 法

1. 材料:

(1)毒株来源:标准病毒株(ADV3、7、11、21)来自美国疾病预防控制中心(CDC);巨细胞病毒(CMV)Ad169 和疱疹病毒(HSV)SM44 株由中国药品生物制品检定所提供;EB 病毒(EBV)B95-8 株由中国 CDC 病毒病预防控制所提供;鼻病毒(HRV)14 型标准株 1059 株来自美国 CDC,由首都儿科研究所张震研究员赠送;呼吸道合胞病毒株(RSV)、甲型流感病毒(INF-A)株、乙型流感病毒(INF-B)株和副流感病毒(PIV)分离株为本研究组分离鉴定。

(2)引物:根据文献中 ADV 的核苷酸序列设计 1 对外引物 AD-A 和 AD-B,为 3、7、11、21 型的通用引物,用于第一次 PCR 的扩增,预期扩增一个 1278 bp 的片段;利用不同型别在六邻体基因的核苷酸序列的差异,合成能分别扩增 3、7、11、21 型 ADV 特异的 4 对内引物(Ad3a、Ad3b、Ad7a、Ad7b、Ad11a、Ad11b、Ad21a、Ad21b),用于第二次 PCR,预期扩增产物分别为 502 bp(Ad3)、311 bp(Ad7)、880 bp(Ad11)和 237 bp(Ad21)的片段(表 1)。其中 3、7、21 型 3 对内引物参照文献[7]设计,通用引物和 11 型引物为本研究根据序列自行设计。引物由 Invitrogen 公司合成。

表 1 本研究中用于不同型 ADV 分型的引物

引物	序列 5'~3'	预期扩增产物(bp)
AD-A	CGCGCCCAATACATCTCAGT	1278
AD-B	ACTTGATGTGGAAAGGCAC	
Ad3a	GGTAGAGATGCTGTTGCAGGA	502
Ad3b	CCCATCCATTAGTGTTCATCGGT	
Ad7a	GGAAAGACATTACTGCAGACA	311
Ad7b	AATTCAGCGCAAAAAGCGTCA	
Ad11a	AAATACAACCTGGTGAGGAACA	880
Ad11b	CGCATTGTCTCCATTTGGAAC	
Ad21a	GAAATTACAGACGCGCAAGCC	237
Ad21b	AACCTGCTGGTTTTGCGGTTG	

(3)标本的收集和处理:本研究中的 151 例标本来自于 2002 年 4 月至 2006 年 12 月从本所附属儿童医院门诊、病房收集的急性呼吸道感染的咽拭子及鼻咽分泌物标本,其中 118 例是经病毒分离和/或间接免疫荧光法确定为 ADV 阳性的标本,33 例是从病毒分离和/或间接免疫荧光法确定为 ADV 阴性的标本中选取的。

(4)试剂:DNA 提取液 DNAzol,购自 Invitrogen 公司;Taq 酶,5 U/ μ l,购自天为时代公司。

2. 方法:

(1)病毒 DNA 或 RNA 提取:选取标准株(ADV3、7、11、21)和 6 株分离株及临床标本 151 份(病毒分离和/或间接免疫荧光法检测阳性标本 118 份,阴性标本 33 份),各取 100 μ l,使用 DNAzol(Invitrogen 公司产品)提取标本中的 DNA,操作按说明书进行,最后用 20 μ l 8 mmol/L NaOH 溶 DNA。RSV、INF-A、INF-B、PIV 病毒株使用 Trizol 提取标本中的 RNA,再经反转录为 cDNA。

(2)巢式多重 PCR 扩增:①第一次 PCR 扩增:25 μ l 反应混合液包括上述 cDNA 合成反应液 2.5 μ l, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100, 10 mmol/L (pH 值 9.0) Tris-HCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 加入 200 μ mol/L dNTPs, Taq 酶 1 U, 引物 AD-A 和 AD-B 各 0.2 μ mol/L, 样本 DNA 1 μ l。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 扩增 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。②第二次 PCR 扩增:取第一次 PCR 反应产物 1 μ l 进行第二次 PCR, 反应体系与第一次 PCR 相同, 所不同的是引物为 Ad3a、Ad3b、Ad7a、Ad7b、Ad11a、Ad11b、Ad21a、Ad21b, 各 0.2 μ mol/L, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 扩增 25 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取 PCR 产物 5 μ l 在含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭(EB)的

2%的琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下观察扩增后的 DNA 条带。

(3)多重巢式 PCR 特异性检测:分别取 ADV3、ADV7、ADV11、ADV21、CMV、HSV 和 EBV 株的 DNA,RSV、INF-A、INF-B、PIV 的 cDNA,用合成的 ADV 基因引物进行多重巢式 PCR 扩增试验。

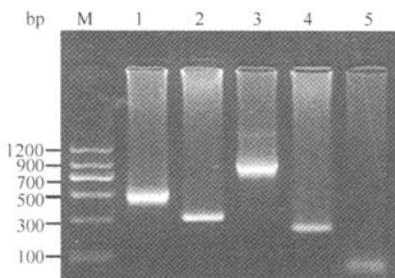
(4)ADV 分离株 PCR 扩增及测序:首先将 6 株 ADV 分离株进行多重巢式 PCR 分型筛选,再选取不同型别的 ADV 用本研究设计合成的型特异性引物进行 PCR 扩增,其扩增产物进行测序鉴定。

(5)ADV 质粒的制备:选取 3 型和 7 型 ADV 分离株各 1 株,用本研究设计的通用引物 AD-A 和 AD-B 进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后,与载体 PCF-T 进行连接,连接产物转化大肠埃希菌 DH5a 感受态细胞,用 PCR 筛选出阳性克隆,作为临床标本 PCR 检测时的阳性对照。

(6)临床标本 PCR 检测:对 151 份临床标本(118 份 ADV 检测阳性,33 例阴性)进行多重巢式 PCR 分型检测,分别以 ADV 质粒和无菌水作为阳性和阴性对照。

结 果

1. PCR 特异性检测:用 ADV 基因特异引物经巢式 PCR 扩增后,只有 3、7、11 和 21 型 ADV 毒株产生预期的 502、311、880 和 237 bp 的特异性片段,而 CMV、HSV、EBV、HRV、EV、RSV、INF-A、INF-B、PIV 和 MV 株均未见到扩增条带,说明该方法特异性好,与其他常见呼吸道病毒等无交叉反应(图 1)。



注:M: Marker II; 1:ADV3; 2:ADV7; 3:ADV11; 4:ADV21; 5:阴性对照(水)

图1 ADV 标准株的多重 PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上的检测结果

2. 分离株鉴定:分离株 H5695、H9049、F311、F454、F379、F521 经多重 PCR 分型,初步确定 F521、H9049 为 3 型 ADV, H5695、F379 为 7 型

ADV, F311、F454 为 11 型 ADV, 选取 1 株 3 型 ADV 分离株(H9049)、1 株 7 型 ADV 分离株(F379)和 1 株 11 型 ADV 分离株(F311),分别用 3、7、11 型特异性引物进行扩增,扩增产物进行序列测定。序列分析显示, H9049 与 GenBank 序列 ADV3 (x76549) 比较,核苷酸同源性为 96.7%, F379 与 GenBank 序列 ADV7 (z48571) 核苷酸同源性为 94.5%。F311 与 GenBank 序列 ADV11 (AC_000015) 比较,核苷酸同源性为 97.6%,说明该分型引物确实能扩增到相应型别的病毒。

3. ADV 克隆及质粒提取:3 型 ADV 分离株(H9049)和 7 型 ADV 分离株(F379)分别用 AD-A 和 AD-B 进行 PCR 扩增,得到 1278 bp 核苷酸片段,与载体 PCF-T 进行连接,连接产物转化大肠埃希菌 DH5a 感受态细胞,用 PCR 筛选出阳性克隆,对阳性克隆进行了质粒提取。

4. 多重巢式 PCR 检测临床标本:118 份经病毒分离和/或间接免疫荧光法确定为 ADV 阳性的标本中,经本方法检测有 116 份为阳性。其中 ADV3 型 76 份,占 64.4% (76/118); ADV7 型 37 份,占 31.4% (37/118); ADV11 型 3 份,占 2.5% (3/118); 未检测到 ADV21 型。2 例经病毒分离和间接免疫荧光检测均为 ADV 阳性的标本中,用本方法未能鉴定出型别,可能是除 3、7、11、21 型以外的其他型(1.7%, 2/118)。33 份经病毒分离和间接免疫荧光法均未检测到 ADV 的标本中,有 3 份经多重 PCR 检测为阳性(包括 1 份 7 型,2 份 3 型),但是凝胶电泳检测时条带较弱,可能是因为标本中的病毒含量低,用常规方法不易检出之故。

5. ADV 感染与临床症状之间的关系:在 118 例患儿的 ADV 阳性标本中,114 例有明确诊断。其中支气管炎、扁桃体炎等急性上呼吸道感染 49 例(43.0%),肺炎、毛细支气管炎等下呼吸道感染 65 例(57.0%)。在 76 例 ADV 3 型患儿的标本中,74 例有明确诊断,其中 38 例为上呼吸道感染(51.4%),36 例为下呼吸道感染(48.6%);在 37 例 ADV 7 型患儿的标本中,35 例有明确诊断,其中 10 例为上呼吸道感染(28.6%),25 例为下呼吸道感染(71.4%);3 例 ADV 11 型患儿的标本均为下呼吸道感染,且均为年龄小于 1 个月的新生儿。

6. 多重巢式 PCR 与病毒分离和/或免疫荧光法的阳性符合率:在 118 份经病毒分离和/或免疫荧光法检测为 ADV 阳性标本中,116 份经多重巢式 PCR

检测分别为 3、7 或 11 型 ADV, 2 份 PCR 阴性的标本也可能是除外 3、7、11、21 型的其他型别 ADV, 二者的阳性符合率至少为 98.3% (116/118)。

讨 论

B 组 ADV 可以引起婴幼儿严重的甚至是致死性呼吸道感染, 但由于 ADV 感染与其他呼吸道病毒甚至细菌感染难以区别, 而不能得到及时准确诊断和治疗, 因此对其进行早期诊断十分必要^[8]。目前, ADV 感染的实验室诊断主要依靠病毒分离或免疫荧光法检测。由于病毒分离费时费力, 不能提供快速的病原学诊断, 其临床应用受到限制; 免疫荧光快速检测则需要采集鼻咽分泌物标本, 对年龄较大的儿童和非住院患儿难以采集。多重 PCR 在呼吸道病毒检测中灵敏度高、特异性好, 并能同时对检测到的病毒进行型别鉴定。

本研究中我们首先用 3、7、11、21 型 ADV 标准株进行多重 PCR 扩增, 得到了预期的目的扩增片段, 证明该引物设计合理; 对 6 株分离株的多重 PCR 扩增确定了该方法的可行性; H9049、F379 和 F311 的序列测定结果与 GenBank 序列比较, 同源性分别为 96.7%、94.5% 和 97.6%, 证明我们所检测到的目的片段确实是 ADV3、ADV7 和 ADV11; 与其他常见的呼吸道病毒的交叉扩增试验结果显示该方法特异性好, 无交叉反应。

对临床标本的多重巢式 PCR 检测结果提示: 近年来我国 ADV 感染主要以 3、7 型为主, 且 3 型多于 7 型 ADV, 11 型比较少, 21 型较为罕见。ADV 的感染往往很严重, 不仅可以引起上呼吸道感染, 也多见于严重的下呼吸道感染。我们的研究显示感染 3 型 ADV 的患儿中有 48.6% 是严重的下呼吸道感染, 感染 7 型 ADV 的患儿中 71.4% 是严重的下呼吸道感染, 感染 ADV11 型的患儿均为下呼吸道感染, 且均为年龄小于 1 个月的新生儿, 提示 7 型和 11 型 ADV 更易引起严重的下呼吸道感染, 与国外报道的结果一致^[2,4]。在 118 份经病毒分离和/或间接免疫荧光法确定为 ADV 阳性的标本中 2 份 PCR 为阴性, 我们认为这 2 份可能是 3、7、11、21 型以外的其他型 ADV, 或是建立的多重巢式 PCR 检测还有一

定的局限性, 还有待于检测更多临床标本进一步验证。在 33 份经病毒分离和/或间接免疫荧光法检测为 ADV 阴性的标本中 3 份 PCR 为阳性, 提示 PCR 方法比病毒分离和间接免疫荧光法更为敏感。因为病毒分离受细胞状态、标本保存和运送等诸多条件影响; 间接免疫荧光法也与标本取材有很大关系, 相比之下 PCR 方法就显得更为敏感和特异。但值得注意的是需要小心操作, 避免实验室污染而出现假阳性。

本研究所建立的方法可为临床诊断和早期治疗提供病原学依据, 避免滥用抗生素; 同时还适宜对分离到的病毒株进行回顾性研究, 提供流行病学资料, 更可以为急性呼吸道感染暴发的公共卫生事件及时提供病原学依据。

参 考 文 献

- [1] 刘庚起. 腺病毒感染//黄祯祥. 医学病毒学基础及技术. 北京: 科学出版社, 1990:743-751.
- [2] Noda M, Tetsuya Y, Takemasa S, et al. Molecular and epidemiological analyses of human adenovirus type 7 strains isolated from the 1995 nationwide outbreak in Japan. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 140-145.
- [3] Carballal G, Videla C, Espinosa M, et al. Multi-centered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of argentina, 1993 - 1994. *J Medical Virology*, 2001, 64(2):164-167.
- [4] Fujimoto T, Chikahira M, Kase T, et al. Single-tube multiplex PCR for rapid and sensitive diagnosis of subgenus B and other subgenera adenoviruses in clinical samples. *J Microbiol*, 2000, 44 (10):821-826.
- [5] 朱汝南, 邓洁, 王芳, 等. 2000 年秋冬至 2002 年夏北京地区急性呼吸道感染病毒病原学研究. *临床儿科杂志*, 2003, 21(1), 25-28.
- [6] Bruzzone MS, Fuentes L, Spencer E. Specific subgroup B adenovirus diagnosis by PCR of the fibre gene. *J Infect*, 2000, 40: 154-159.
- [7] Xu WH, Erdman DD. Type-specific identification of human adenovirus 3, 7 and 21 by a multiplex PCR assay. *J Medical Virology*, 2001, 64:537-542.
- [8] Na BK, Kim JH, Shin GC, et al. Detection and typing of respiratory adenoviruses in a single-tube multiplex polymerase chain reaction. *J Medical Virology*, 2002, 65:512-517.

(收稿日期:2007-03-26)

(本文编辑:张林东)