

实时荧光 PCR 技术快速鉴别检测 H5、H9、H7 亚型禽流感灭活疫苗的研究

Research of Real-time Fluorescent PCR in the Rapid Differential Detection of H5、H9、H7 Subtype Avian Influenza Inactivated Vaccines

韩剑锋, 宁宜宝*, 宋立, 杨承槐

HAN Jian-Feng, NING Yi-Bao*, SONG Li and YANG Cheng-Huai

中国兽医药品监察所农业部兽药创新与生物安全评价重点开放实验室 北京 100081

Key Laboratory of Veterinary Drug Innovation and Biosafety Evaluation, Ministry of Agriculture, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

摘 要 选取 H5、H9、H7 亚型禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)血凝素(hemagglutinin, HA)基因保守序列,利用 Primer Express 2.0 软件设计了各自亚型的特异性引物和 Taqman MGB 探针,利用实时荧光 RT-PCR 一步法建立了 H5、H9、H7 亚型禽流感灭活疫苗的鉴别检测方法,该方法特异性好,重复性佳,对其他疫苗无交叉反应。结果表明实时荧光 PCR 方法为禽流感灭活疫苗提供了一种特异、敏感、快速和简洁的鉴别检测方法。

关键词 实时荧光 PCR, 禽流感灭活疫苗, 鉴别检测

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0953-05

Abstract Specific primers and TaqMan MGB probes were designed with Primer Express 2.0 software according to the conserved region of the H5, H9, H7 subtype AIV hemagglutinin gene to make research of real-time fluorescent one-step PCR in the differential detection of H5, H9, H7 subtype avian influenza inactivated vaccines. The result showed that the method was specific and reproducible. No cross-reaction was discovered with other avian disease vaccines. Real-time fluorescent PCR provided a specific, sensitive, rapid and convenient method for the subtype identification of avian influenza inactivated vaccines.

Key words real-time fluorescent PCR, avian influenza inactivated vaccine, differential detection

禽流感是严重威胁养禽业生产的烈性病毒性传染病,并危及人类健康^[1]。疫苗免疫是我国控制禽流感的一项重要措施,我国政府对禽流感灭活疫苗的质量非常重视,建立快速、敏感、特异的疫苗质量检测方法,特别是各亚型的鉴别检测方法,对及时进行产品质量控制和市场监管有着重要意义。本实验

旨在利用实时荧光 PCR 方法对 H5、H9、H7 亚型禽流感灭活疫苗进行亚型快速鉴别检测,为该产品的质量控制和市场监管提供技术支持。

禽流感灭活疫苗的常规鉴别检验是采用免疫后 3 周测 HI 抗体类型,该方法经典可靠,但耗时间,成本高,易散毒^[2]。采用普通 PCR 技术检测禽流感灭

Received: January 16, 2007; Accepted: March 20, 2007.

This work was supported by a grant from HPAIV Prevention and Control Fund, Ministry of Science and Technology(No.2004BA519A24).

* Corresponding author. Tel: +86-10-62103674; Fax: +86-10-62103674; E-mail: ningyibao@ivdc.gov.cn

科技部高致病性禽流感防治专项(No.2004BA519A24)

活疫苗抗原,其灵敏性太差,无法对不同基因亚型禽流感灭活疫苗进行鉴别检测,因此,如何快速、准确进行亚型特异性检验是疫苗质量控制,市场监管所面临的主要难题之一。

近年发展起来的实时荧光 PCR 技术(Real-time Fluorescent PCR, RF-PCR)以其灵敏度高、速度快、特异性强等优点在基因表达水平分析^[3]、病原体的定性和定量检测^[4-7]等方面得到了广泛应用。本文将 RF-PCR 技术和 ABI 7500 荧光 PCR 检测系统相结合,通过优化方案,反复试验,建立了 H5、H9、H7 亚型禽流感灭活疫苗鉴别检测的方法。该方法可以用于疫苗的质量控制和市场真假疫苗的认识。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 禽流感灭活疫苗: H5、H9、H7 亚型兽用禽流感灭活疫苗由哈尔滨维科生物技术开发有限公司,乾元浩生物股份有限公司郑州生药厂、青岛易邦生物工程有限公司等提供。

1.1.2 毒株: H5、H9 亚型 AIV 尿囊液由本室保存, H7 亚型没有保存毒株(国内没有毒株)。

1.1.3 主要试剂: RNA 提取试剂 TRIZOL Reagent 购自 Invitrogen 公司, Ready-To-Go RT-PCR Beads 购自 Amersham Biosciences 公司, RNase Free Water, RNA 酶抑制剂 Rnasin 等购自天根生化科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 亚型特异性引物和探针的设计与合成: 根据 GenBank 上公布的 AIV HA 基因序列,利用 DNASTar 软件进行比对,找到其保守区,根据 Primer Express 2.0 软件,分别设计 H5、H9、H7 亚型特异性引物和 MGB 探针, H5 亚型: P51(上游引物)、P52(下游引物)、P53(MGB 探针); H9 亚型: P91、P92、P93; H7 亚型: P71、P72、P73,引物和探针由上海基康生物技术有限公司合成,探针 5' 端标记的荧光报告基团是 FAM, 3' 端标记的荧光淬灭基团是 MGB。以下是引物和探针序列:

P51: 5'- CCCAACAAATAAAGAGGAGCTACAATA -3'

P52: 5'- TGAATCCCCCACAGTACCAAAA-3'

P53: 5'- TACCAACCAAGAAGATC-3'

P91: 5'- CTACCAATCAACAAACTCCACAGAA -3'

P92: 5'- TGGCATGTGTCACAGGAACA -3'

P93: 5'- TGTAGACACGCTAACAGA -3'

P71: 5'- TTTCATACTTCTGGCCATTGCA -3'

P72: 5'- CGCATGTTTCATTCTTCACA -3'

P73: 5'- TGGGCCTTGTCTTC -3'

1.2.2 疫苗的破乳及 RNA 的提取: 禽流感灭活疫苗是油乳剂疫苗,水相和油相是混合在一起的,必须将水相和油相分开,才能有效地从水相中提取 RNA。经过摸索,本实验所采取的破乳方法是使用 TRIZOL 和氯仿破乳,可以和 RNA 提取一并进行,油水相可以有效分离。该破乳方法简捷有效。

试验时取禽流感灭活疫苗 200 μ L,按 TRIZOL 试剂说明提取病毒 RNA,溶于 20 μ L DEPC 水中。

1.2.3 禽流感灭活疫苗的检测: RF-PCR: 管中依次加入 RNA 5 μ L, RT-PCR Beads 0.5 颗, P51 (20 μ mol/L), P52 (20 μ mol/L) 各 1 μ L, P53 (10 μ mol/L) 1 μ L, 补 DEPC 水至 30 μ L。瞬时离心后,小心放入 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪中,记录样本摆放顺序,在模板文件中填写被检样品,阴阳性对照,设置探针类型,按下列反应参数进行: 第一阶段,逆转录 42 $^{\circ}$ C, 30min。第二阶段,预变性 95 $^{\circ}$ C/3min, 第三阶段, 95 $^{\circ}$ C/15s, 60 $^{\circ}$ C/1min, 扩增 40 个循环,在第三阶段的退火延伸结束时收集荧光。

在设计过程中,三种亚型的引物、探针的 T_m 值相当接近,因此经过摸索, H9、H7 疫苗的实验参数与 H5 疫苗相同。

禽流感疫苗核酸的相对定量可通过各疫苗样品的 C_t 值相比较得出。循环阈值(C_t)是 PCR 循环首先进入指数增长期的循环数, C_t 值与起始模板数成反比例关系, C_t 值越小,起始模板数越多, C_t 值越大,起始模板数越少。

1.2.4 RF-PCR 的重复性: 用不同厂家的疫苗样品 (H5、H9、H7 亚型) 分别作组间和组内试验,组内实验是任取每一批次疫苗各一份,在同一反应条件下一次进行 5 个重复,组间实验是对上述样品分 5 次重复。

RF-PCR 的特异性: 用建立的 AIV RF-PCR 方法检测常见的其他禽病疫苗和病毒,验证该方法的特异性。包括另外两种亚型禽流感灭活疫苗及尿囊液毒, IBV (M41), IBV 活疫苗 (H120), IBV 活疫苗 (H52), NDV 活疫苗 (Lasota), NDV 活疫苗 (I 系), NDV (B1), EDS 灭活苗 (京 911 株), IBDV 活疫苗 (Gt 株), MDV 活疫苗, 鸭瘟活疫苗, 鸡痘活疫苗等,其中 AIV、IBV、NDV、IBDV 为 RNA 病毒, EDSV、鸭瘟病毒、鸡痘病毒为 DNA 病毒。对于前者用 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 对于后者用 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 并且省去逆转录步骤。

2 结果

表 1 和表 2 显示变异系数都在 5% 以下,表明该检测体系稳定,具有良好的重复性。

2.1 H5 亚型禽流感灭活疫苗检测重复性试验结果

表 1 3 批 H5 亚型禽流感灭活疫苗组内重复性试验数据

Table 1 Intra-assay reproducibility data of 3 batches of H5 subtype AI inactivated vaccine

Batch number n	Intra-assay result (Ct value)					Statistic result		
	1	2	3	4	5	Avg	SD	CV
A	25.26	25.78	25.99	25.51	24.75	25.46	0.48	1.89%
B	25.78	25.39	25.31	25.22	25.63	25.47	0.23	0.91%
C	24.97	25.10	24.80	25.65	25.23	25.15	0.32	1.28%

表 2 3 批 H5 亚型禽流感灭活疫苗组间重复性试验数据

Table 2 Inter-assay reproducibility data of 3 batches of H5 subtype AI inactivated vaccine

Batch number	Inter-assay result (Ct value)					Statistic result		
	1	2	3	4	5	Avg	SD	CV
A	24.47	24.60	24.98	25.12	24.90	24.81	0.27	1.09%
B	25.50	25.32	25.45	24.97	25.70	25.39	0.27	1.07%
C	25.48	26.12	24.70	25.98	25.79	25.61	0.56	2.20%

2.2 H5 亚型禽流感灭活疫苗检测特异性试验结果

图 1 中荧光曲线阳性曲线从上至下依次是 AIV H5 阳性对照(感染性尿囊液),AIV H5 亚型灭活疫苗 阴性曲线分别是 AIV H9 尿囊液、AIV H9 灭活疫苗、AIV H7 灭活苗、其他禽病疫苗和病毒以及阴性质控(蒸馏水)。结果显示建立的 H5 亚型实时荧光 PCR 方法特异性强。

2.3 H9 亚型禽流感灭活疫苗检测重复性试验结果

表 3 和表 4 结果显示变异系数都在 5% 以下,表明该检测体系稳定,具有良好的重复性。

表 3 3 批 H9 亚型禽流感灭活疫苗组内重复性试验数据

Table 3 Intra-assay reproducibility data of 3 batches of H9 subtype AI inactivated vaccine

Batch number	Intra-assay result (C _t value)					Statistic result		
	1	2	3	4	5	Avg	SD	CV
A	25.36	25.76	25.94	25.53	24.80	25.48	0.44	1.72%
B	25.75	25.45	25.26	25.20	25.60	25.45	0.23	0.90%
C	24.95	25.17	24.85	25.55	25.28	25.16	0.28	1.10%

表 4 3 批 H9 亚型禽流感灭活疫苗组间重复性试验数据

Table 4 Inter-assay reproducibility data of 3 batches of H9 subtype AI inactivated vaccine

Batch number	Inter-assay result (C _t value)					Statistic result		
	1	2	3	4	5	Avg	SD	CV
A	24.55	24.50	24.81	24.75	24.83	24.69	0.15	0.62%
B	25.44	25.53	25.63	24.57	25.85	25.40	0.49	1.93%
C	25.41	26.02	24.56	25.97	25.81	25.55	0.61	2.37%

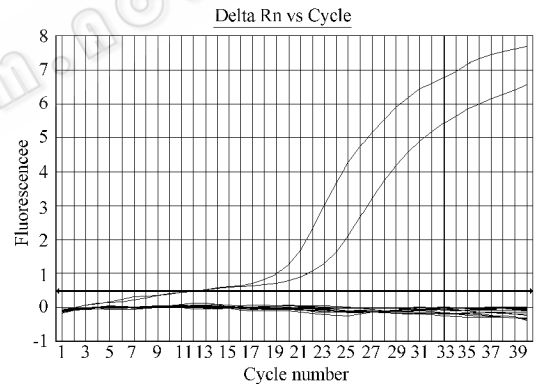


图 1 H5 亚型禽流感灭活疫苗荧光 PCR 特异性试验

Fig. 1 RF-RCR specificity assay of H5 subtype AI inactivated vaccine

2.4 H9 亚型禽流感灭活疫苗检测特异性试验结果

图 2 中荧光曲线阳性曲线从上至下依次是 AIV H9 阳性对照(感染性尿囊液), AIV H9 亚型灭活疫苗 阴性曲线分别是 AIV H5 尿囊液、AIV H5 灭活疫苗、AIV H7 灭活疫苗、其他禽病疫苗和病毒以及阴性质控(蒸馏水)。结果显示建立的 H9 亚型实时荧光 PCR 方法特异性强。

2.5 H7 亚型禽流感灭活疫苗检测重复性试验结果

(该亚型疫苗只有一个批次,因为国内没有正式生产)

表 5 和表 6 结果显示变异系数都在 5% 以下,表明该检测体系稳定,具有良好的重复性。

表 5 H7 亚型禽流感灭活疫苗组内重复性试验数据

Table 5 Intra-assay reproducibility data of H7 subtype AI inactivated vaccine

Batch number	Intra-assay result (C_t value)					Statistic result		
	1	2	3	4	5	Avg	SD	CV
A	25.49	25.65	25.84	25.23	25.81	25.60	0.25	0.98%

表 6 H7 亚型禽流感灭活疫苗组间重复性试验数据

Table 6 Inter-assay reproducibility data of H7 subtype AI inactivated vaccine

Batch number	Inter-assay result (C_t value)					Statistic result		
	1	2	3	4	5	Avg	SD	CV
A	24.35	24.16	24.82	24.35	24.73	24.48	0.28	1.14%

2.6 H7 亚型禽流感灭活疫苗检测特异性试验结果

图 3 中荧光曲线阳性曲线是 AIV H7 亚型灭活疫苗, 阴性曲线分别是 AIV H5 感染性尿囊液、AIV H5 灭活疫苗、AIV H9 感染性尿囊液、AIV H9 灭活疫苗、其他禽病疫苗和病毒以及阴性质控(蒸馏水)。结果显示建立的 H7 亚型实时荧光 PCR 方法特异性强。(国内没有 H7 亚型毒株,故没有用病毒阳性质控)

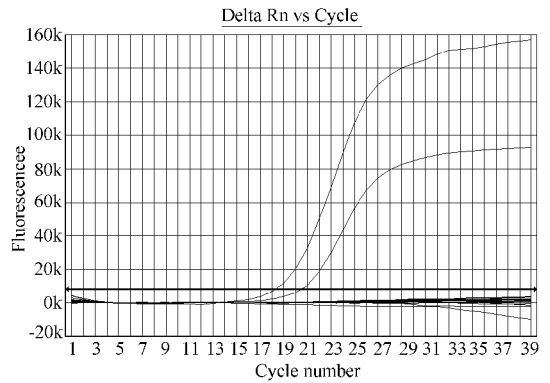


图 2 H9 亚型禽流感灭活疫苗荧光 PCR 特异性试验

Fig. 2 RF-RCR specificity assay of H9 subtype AI inactivated vaccine

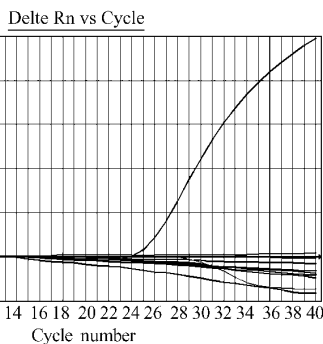


图 3 H7 亚型禽流感灭活疫苗荧光 PCR 特异性试验

Fig. 3 RF-RCR specificity assay of H7 subtype AI inactivated vaccine

3 讨论

国内有过通用型、H5 亚型禽流感病毒荧光 PCR

检测方法的报道^[8,9],国外有过 H5、H7 亚型禽流感病毒荧光 PCR 检测方法的报道^[10],但是没有将该方法用于禽流感灭活疫苗检测的报道。笔者运用实时荧光 PCR 技术,结合 ABI 7500 荧光 PCR 检测系统,建立了一种新的 H5、H9、H7 亚型禽流感灭活疫苗的鉴别检测方法,可以用于疫苗的质量控制和市场监督。该方法同样适用于不同亚型禽流感病毒的鉴别检测。

该系统主要由一条两端标记有荧光基团的探针和一对引物组成,在探针完整时,两基团在空间结构上互相互靠近,5'报告基团产生的荧光因为荧光共振能量转移(FRET)而被 3'端淬灭基团淬灭,故体系中并没有荧光信号的产生,在 PCR 退火和延伸过程中,探针与模板特异性结合,随着引物的延伸,Taq DNA 聚合酶利用其 5'→3'外切活性对探针进行切割^[11],释放出报告基团,这样破坏了两基团之间的 FRET,报告基团所释放出的荧光可以被 ABI 7500 内的光学系统检测出来,荧光量的增加与 PCR 产物的积累量呈正比例关系^[12]。

与传统检测方法相比,实时荧光 PCR 方法特异性好,因为检测过程中上下游引物与探针同时保证

了特异性,有“双保险”的优点,而且探针与模板结合所要求的特异性更强。此外实时荧光 PCR 方法灵敏度高,重复性好,定量准确,操作步骤简单、自动化程度高、检测速度快,PCR 结束后由系统自带软件直接给出结果,实现了实时、在线检测过程,而无需对 PCR 扩增产物进行后处理,从而克服了传统 PCR 技术易污染的特点。定量检测过程仅需 2h,加上样品制备的整个过程也仅需 3h。ABI 7500 荧光定量 PCR 仪有 96 个反应孔,可同时进行大量样本的检测,实现了高通量,节省了人力物力。

在试验中笔者使用的是 TaqMan MGB 探针,不同于一般的 TaqMan 探针,MGB 探针的淬灭基团采用非荧光淬灭基团(non-fluorescent quencher),本身不产生荧光,而且淬灭效率更高,可以大大降低本底信号的强度,同时探针上还连接有 MGB(Minor Groove Binder)修饰基团,可以将探针的 T_m 值提高 10℃左右,这样大大加强了定量 PCR 反应过程中的特异性^[13]。而且在设计过程中,三种亚型的引物、探针的 T_m 值相当接近,因此可以使用同一反应参数,大大简化了检测过程。

在疫苗检测中,如何有效破乳是一个瓶颈,通常采用的方法是 -70℃反复冻融 3 次、5 000r/min 离心 10min 取水相,或者采用 2mol/L 硫酸镁:疫苗:十二烷基肉豆蔻脂(1:4:16)的体积比例进行萃取,笔者对禽流感灭活疫苗的破乳方法进行了比较探索,试验中采取的破乳方法是使用 TRIZOL 试剂和氯仿破乳,可以和 RNA 提取一并进行,油水相可以有效分离。比通常破乳方法简便有效。

笔者建立的 3 种亚型疫苗的检测方法反应参数相同,完全可以同时进行,只需把同一疫苗样品提取的核酸加入 3 个管中,然后分别加入 3 种亚型的引物和探针,试验结束后即可以知道该疫苗亚型,检测过程方便快捷。国内有过 3 种亚型禽流感病毒多重 PCR 检测方法的报道^[14],但是多重 PCR 反应时各亚型引物和探针会相互干扰,而且各亚型 PCR 会共同竞争酶、镁离子、dNTP 等资源,势必会影响检测灵敏度,本试验建立的方法避免了多重 PCR 的缺点,而且同样快捷简便,有利于疫苗的快速鉴别检测。

综上所述,本试验建立的实时荧光 PCR 鉴别检测禽流感灭活疫苗的方法,特异性好,重复性佳,而且与以往检测方法相比,更加安全、省时、省力,在疫苗的质量控制和市场监督中具有很大的实用价值。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Lu CP(陆承平). Highly pathogenic avian influenza and influenza virus. *Virologica Sinica* (中国病毒学),2004,19(2):204-207.
- [2] Tian GX(田国斌),Yu KZ(于康震),Tang XY(唐秀英),et al. Research of standardization of avian influenza inactivated vaccine. *Chinese Journal of Veterinary Drug* (中国兽药杂志),2002,36(4):41-44.
- [3] Nellemann C, Vinggaard AM, Dalgaard M, et al. Quantification of antiandrogen effect determined by LightCycler technology. *Toxicology*, 2001,163:29-38.
- [4] Desire N, Dehee A, Schneider V, et al. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2001,39:1303-1310.
- [5] Martell M, Gomez J, Esteban JI, et al. High-throughput real-time reverse transcription PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol*, 1999,37:327-332.
- [6] Kearns AM, Turner AJL, Eltringham GJA, et al. Rapid detection and quantification of CMV DNA in urine using Lightcycler-based real-time PCR. *J Clin Virol*, 2002,24:131-134.
- [7] Florence KP, Glaucia PB, Mireille S, et al. Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. *J Virol Methods*, 2001,95:111-119.
- [8] Zhang HX(张鹤晓),Lai PA(赖平安),Liu H(刘环),et al. Research of fluorescent RT-PCR in the detection of avian influenza virus in the live birds and their products. *Inspection and Quarantine Science*(检验检疫科学)2004,14(1):1-5.
- [9] Zhu WS(朱文斯),Lai PA(赖平安),Huang QH(黄茜华),et al. Research of fluorescent RT-PCR in the rapid assay of H5 subtype avian influenza virus. *Chinese Journal of Medicinal Guide*(中国医药导刊)2003,5(1):27-30.
- [10] Lee CW, Suarez DL. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. *J Virol Methods*, 2004,119(2):151-158.
- [11] Holland PM, Abramson RD, Watson R, et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci*, 1991,88:7276-7280.
- [12] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996,6:986-994.
- [13] Ouyang SY(欧阳松应),Yang D(杨冬),Ouyang HS(欧阳红生),et al. Real-time fluorescent quantitative PCR and its application. *Chemistry of Life*(生命的化学),2004,24(1):74-76.
- [14] Qin ZF(秦智锋),Li JQ(吕建强),Xiao XL(肖性龙),et al. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase PCR assay for simultaneous identification of avian H5, H7 and H9 hemagglutinin subtypes. *Chinese Journal of Virology*(病毒学报),2006,22(2):131-136.