

戊型肝炎病毒荧光定量 RT-PCR 快速检测技术的建立和初步应用

乔彩霞, 张鹤晓, 赖平安, 高志强, 汪琳, 蒲静, 吴丹, 柏亚铎, 谷强, 张伟, 段向英

北京出入境检验检疫局, 北京 101113

摘要: 利用 DNAMAN 软件对 GenBank 登录的戊型肝炎病毒四个主要基因型代表株的序列进行分析, 选择其高度保守的 ORF2 区域设计合成引物和探针, 并用包含有扩增区域的核苷酸片段进行体外转录制备标准品 cRNA。在对荧光定量 RT-PCR 的反应条件优化的基础上, 建立了适用于戊型肝炎病毒主要基因型检测的荧光定量 RT-PCR 检测技术。该检测技术可以有效检测 I 型和 IV 型戊型肝炎阳性病料, 而对猪的其它几种疫病阳性病料则为阴性结果, 证实本技术的特异性强、可靠性好。对阳性标准品的检测结果表明, 所建立的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 灵敏度可达 2.0×10^1 拷贝/反应, 相比于巢式 RT-PCR 方法, 其灵敏度高 10~100 倍以上。在对 54 份临床样品的检测中, 进一步证实了该方法快速、灵敏且重复性好, 可满足戊型肝炎病毒早期快速诊断的需要。

关键词: 戊型肝炎病毒, 实时定量 RT-PCR, TaqMan 荧光探针

Development and Application of Real-time Quantitative RT-PCR Assay for the Detection of Hepatitis E Virus

Caixia Qiao, Hexiao Zhang, Ping'an Lai, Zhiqiang Gao, Lin Wang, Jing Pu, Dan Wu, Yaduo Bai, Qiang Gu, Wei Zhang, and Xiangying Duan

Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 101113, China

Abstract: Hepatitis E virus (HEV) sequences including four major genotypes representative strains available in GenBank were aligned with the DNAMAN software. The highly conserved internal region of ORF2 was then subjected to design primers and a probe. Furthermore, a 0.3 kb fragment of HEV ORF2 containing the amplification region was transcribed *in vitro* to synthesize cRNA standard and a universal real-time TaqMan PCR assay was optimized and developed to detect and quantify main genotypes RNA of HEV. The specificity and reliability of the real-time RT-PCR was confirmed by testing genotype I HEV, genotype IV HEV and clinical samples. The detection limit of real-time RT-PCR was found 2.0×10^1 copies per reaction using *in vitro* transcribed cRNA. Compared with nested RT-PCR in diagnosis of HEV, the real-time RT-PCR developed was 10 to 100-fold more sensitive than the nested RT-PCR. The detection results from 54 clinical specimens indicated real-time RT-PCR was a rapid, sensitive and reproducible diagnostic method for HEV. This assay will be useful as an early and rapid diagnostic assay for HEV.

Keywords: Hepatitis E virus, real-time quantitative RT-PCR, TaqMan fluorescence probe

戊型肝炎病毒(HEV)是 1982 年发现的一种新型肝炎病毒, 是发展中国家发生急性肝炎的主要病因之一^[1,2]。人类对 HEV 普遍易感, 孕妇感染可导致流产和死亡, 可经粪口途径传播引起急性病毒性肝炎,

Received: September 21, 2007; Accepted: November 16, 2007

Corresponding author: Caixia Qiao. Tel: +86-10-58648632; Fax: +86-10-61506779; E-mail: qiaocx@bjciq.gov.cn

病死率高达 20%~30%。同时戊型肝炎病毒广泛分布于多种动物和禽类,并可在家猪和人之间相互传播,是危害养猪业和人类健康的一种重要病原^[2,3]。

HEV 是无包膜的单股正链 RNA 病毒,其基因组长约 7.5 kb,有 3 个开放阅读框。根据 HEV 各分离株的基因组序列分析,可将其分为 4 个主要的基因型。I 型主要发生于亚非多数国家;II 型分离于墨西哥;III 型发生于美国和一些欧洲国家;IV 型发生于亚洲,可感染人、猪和其它动物,在我国发生的戊型肝炎主要是由 I 型和 IV 型病毒引起的^[1,4-6]。

目前为止,对戊型肝炎尚没有有效的疫苗用于预防,采取的控制措施主要是及早发现,并随时监测疫区的流行情况以阻断该病的传播。这就需要建立一种通用的,高度敏感、特异和快速的检测方法用于 HEV 的诊断^[7]。同时,HEV 主要经污染的水源和环境传播,高度敏感的病原检测技术也将有助于分子流行病学调查和病毒溯源^[8]。在本研究中,我们利用 TaqMan 技术建立了 HEV 的荧光定量 RT-PCR 检测方法,并验证了该方法对不同基因型样品和临床样品的检测能力。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

TRIZOL, 购自 Invitrogen 公司; Taq DNA 聚合酶、反转录试剂盒、Wizard PCR Preps DNA Purification System (Cat#A7170、Lot#11356102)、PGEM-T Easy Vektor System II (Cat# A1380、Lot#86893)、Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Cat#A7100、Lot#10454011)、Ribo MAXTM Large Scale RNA Production System-T7 (Cat# P1300、Lot#125575)、X-Gal 和 IPTG 购自 Promega 公司; RT-PCR 固体酶颗粒(Beads), 购自 Amersham 公司。

主要仪器为台式冷冻高速离心机(Eppendorf Centrifuge 5417R); 常规 PCR 仪(GeneAmp PCR System 9700, ABI); 荧光 PCR 检测仪(Roche LightCycler II); 凝胶成像仪(UVP, Bioimaging Systems); 电泳仪(BIORAD PowerPac Basic-041BR)。

1.2 引物和探针的设计和合成

从 GenBank 登录的 HEV 分离株全序列中查询获得 26 株猪源或人源的不同基因型代表毒株的序

列,利用 DNAMAN 基因分析软件对其进行同源性分析,选择序列中高度保守的区域作为荧光定量 RT-PCR 扩增的区域,利用 Oligo6.3 软件设计合成引物和探针,并由大连宝生物公司合成。

1.3 样品的制备和病毒 RNA 的提取

从北京万泰生物药业有限公司试验感染猴采集两份 I 型和 IV 型 HEV 感染的阳性粪便;从北京某规模化养猪场采集 10 份猪粪拭子、4 份猪胆汁和 10 份猪肝、30 份猪血清,并采用 IgG-ELISA 及常规巢式 RT-PCR 对所采集的样品进行检测,以分析戊型肝炎在北京周边地区的分布。对所采集样品按照 Invitrogen TRIzol Reagent 说明书进行 RNA 提取,并溶于无 Rnase 的去离子水中,-70℃ 保存备用。

1.4 体外转录合成 cRNA 标准模板

对所提取的 RNA 按购自 Promega 公司反转录试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA,并利用特异性引物扩增约 0.3 kb 核苷酸片段(包含有荧光定量 RT-PCR 扩增区域),将扩增片段回收后克隆于 PGEM-T Easy 载体中,转化 Top10 大肠杆菌感受态细胞。挑取经 PCR 鉴定为阳性的单菌落,用 3~5 mL 液体 LB 培养基培养后,用 Promega 公司的 Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Cat#A7100、Lot#10454011)试剂盒进行质粒的提纯。将提纯的质粒用限制性内切酶 PvuII 消化处理后制备末端为平端的 DNA 片段,利用 Promega 公司的 Wizard PCR Preps DNA Purification System (Cat#A7170、Lot#11356102)试剂盒进行纯化回收,之后将其作为模板按照 Promega 公司的 Ribo MAXTM Large Scale RNA Production System-T7 (Cat# P1300、Lot#125575)试剂盒进行体外转录。转录产物经无 RNase 的 Dnase (1 u/μg 样品 DNA, Promega)消化除去其中的 DNA 模板后,75℃ 10 min 将 DNase 灭活,经 RT-PCR 验证所合成的 cRNA,测定其 A260 吸收值并计算浓度为 2.0×10^8 拷贝/10 μL,保存于-70℃ 备用。

1.5 HEV 荧光定量 RT-PCR 反应条件的优化

按照 Amersham 公司 RT-PCR 固体酶颗粒说明书,以合成的 cRNA 为模板进行反应体系的优化。对所合成的引物浓度从 0.1~0.8 μmol/L,探针浓度从 0.025~0.2 μmol/L, Mg^{2+} 浓度从 1.5~6.0 mmol/L 及不同的循环参数进行优化实验,以得到最佳的荧光定量 RT-PCR 反应条件。

2 结果

2.1 引物和探针的设计

为建立可同时用于不同基因型 HEV 检测的通用荧光定量 RT-PCR 方法, 从 GenBank 中分析了 26 株具有代表意义的 HEV 基因组全序列, 结果发现在基因组 1~150nt, 5000~5500nt 和 6300~6700nt 等区域的序列高度保守。进一步分析这些保守序列进行 PCR 反应时的适合程度, 结果位于 ORF2 内部 (6260~6551nt) 之间的序列 G+C 含量为 50%~60%, 且不易形成影响退火扩增的二级结构, 最为适合 PCR 扩增 (结果见图 1)。所合成的引物 HEV-F、HEV-R 和探针 HEV-P 见表 1。进一步将合成的引物和探针与 GenBank 中的序列进行比对, 证实引物和探针的高度特异性。

2.2 HEV 荧光定量 RT-PCR 反应的条件

利用体外转录生成的 cRNA 作为模板, 从多次重复性试验中发现, 该检测方法最适反应总体积 25 μ L, 其中模板 10 μ L; 最适的引物浓度为 0.2 μ mol/L, 探针浓度为 0.1 μ mol/L, Mg^{2+} 浓度为 3.5 mmol/L; 最适

循环参数为 42°C/30 min, 94°C/3 min; 之后 92°C/10 s, 45°C/30 s, 72°C/60 s, 5 个预扩增循环; 92°C/10 s, 60°C/60 s; 40 个循环。

表 1 引物、探针的名称、序列及基因组位置
Table1 Primers and probe used for the detection of HEV by real-time PCR assay

Primer or probe	Sequence (5'-3')	Location
HEV-F	acHctRttta aYcttgctgaYac	Nt.6260-6279
HEV-R	ccttRtcctgctgagcRttctc	Nt.6444-6463
HEV-P	FAM-ccgacagaattgatttcgtcggc-TAMRA	Nt.6296-6316

The probe was labeled with 6-carboxyfluorescein (FAM) at the 5' terminal and carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA) at the 3' terminal. It was designed so that the predicted melting temperature was at least 5°C~8°C higher than that of the primers. H: A or C or T, Y: C or T, R: A or G

2.3 标准曲线的建立和检测极限的测定

通过测定每一稀释度标准品的 Ct 值, 进而与标准品浓度的对数值线性回归作图。结果如图 2, 在所测定的浓度范围内, 标准品的浓度与对应的 Ct 值呈现明显的线性相关关系, 其回归曲线的斜率为 -4.014, 截距为 30.52, 相关系数 R^2 为 0.998。所建

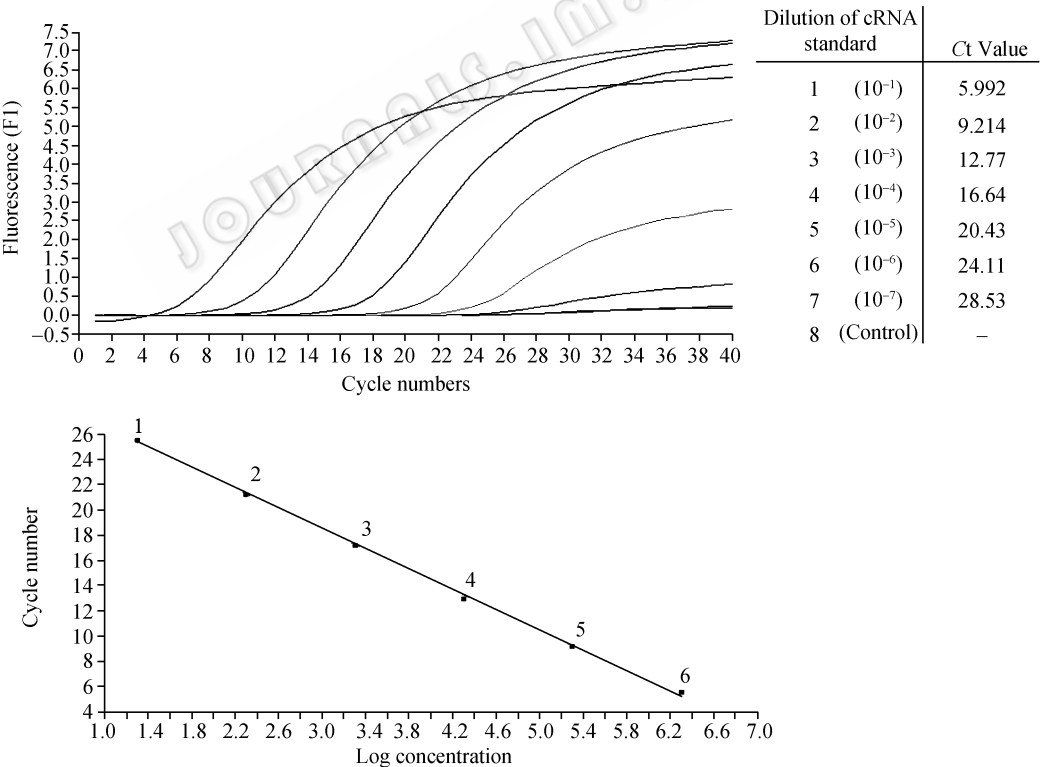


图 2 荧光定量 RT-PCR 对 10 倍梯度稀释 cRNA 标准品的检测和标准曲线的建立

Fig. 2 Quantification of serially diluted suspension (10^{-1} ~ 10^{-9} molecules) of quantified HEV cRNA standard obtained by transcribed in vitro by Ribo MAXTM large scale RNA production system-T7 (Promega)

A: fluorescence curve of F1/F2 signal formation during the amplification of a 189 bp fragment of HEV gene; B: standard curve constructed from the data in (A)

立方法的检测极限为 1×10^{-3} pg(约 2.0×10^1 拷贝)每次反应,同时在对阴性样品的扩增中没有出现非特异的荧光反应。

2.4 特异性和重复性检测

用优化后的荧光定量 RT-PCR 对灭活的猪传染性胃肠炎病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪伪狂犬病病毒、口蹄疫病毒、猪瘟病毒进行检测,结果

均为阴性;而对 I 型和 IV 型猪戊型肝炎阳性样品检测时,均有良好的扩增反应,验证了所建立检测技术与其他病毒无交叉反应。

对标准品 10 倍稀释后按 HEV 荧光定量 RT-PCR 进行重复检测,结果如表 2,不同试验获得的 Ct 值标准差位于 0.21~0.86,变异系数为 2.6%~8.7%,证实所建立的方法重复性、稳定性可以满足检测的需要。

表 2 HEV 对不同拷贝数的 cRNA 标准品检测的重复性
Table 2 Reproducibility of different copies HEV cRNA standard by real-time RT-PCR assay

Ct for different copies cRNA	Ct Value of serially diluted cRNA standard				
	2.0×10^2	2.0×10^3	2.0×10^4	2.0×10^5	2.0×10^6
1	22.39	17.45	12.29	9.196	5.884
2	21.24	17.17	12.86	8.313	5.522
3	21.74	18.20	13.98	9.894	5.898
Mean±SD	21.79±0.58	17.61±0.53	13.04±0.86	9.134±0.79	5.767±0.21
CV/%	2.6	3.0	7.7	8.7	3.6

2.5 与巢式 RT-PCR 检测方法的对比及对临床样品的检测

设计合成的用于巢式 RT-PCR 扩增的引物如表 3,对不同稀释度 cRNA 标准品的巢式 RT-PCR 检测发现,巢式 RT-PCR 的检测极限位于 $2\times10^2\sim2\times10^3$ 个拷贝每次反应(结果如图 3),相比之下,荧光定量 RT-PCR 的检测灵敏度要高出 10~100 倍。对北京万泰生物药业有限公司提供的 I 型和 IV 型 HEV 阳性样品,荧光定量 RT-PCR 和巢式 RT-PCR 均可以检出。进而对 54 份采集自北京周边的样品检测发现,荧光定量 RT-PCR 可以检测出 4 份阳性样品,不仅检出了巢式 RT-PCR 检测为阳性样品,且检出了一份巢式 RT-PCR 检测为阴性的样品(结果如表 4),说明荧光定量 RT-PCR 不仅可以用于对现地样品的检测,且敏感性优于巢式 RT-PCR。

表 3 巢式 RT-PCR 所用引物的名称、序列及基因组位置
Table 3 Primers used for the detection of HEV by nested RT-PCR assay

Primer or probe	Sequence	Location
Forward primer of the first PCR: E1	ctgtttaaycttgctgacac	Nt.6260-6279
Reward primer of the first PCR: E5	WgaRagccaaagcacatc	Nt.6568-6551
Forward primer of the second PCR: E2	gacagaattgatttcgtcg	Nt.6298-6316
Reward primer of the second PCR: E4	tcRtgYtgRttatcataatcctg	Nt.6486-6467

W: A or T, Y: C or T, R: A or G

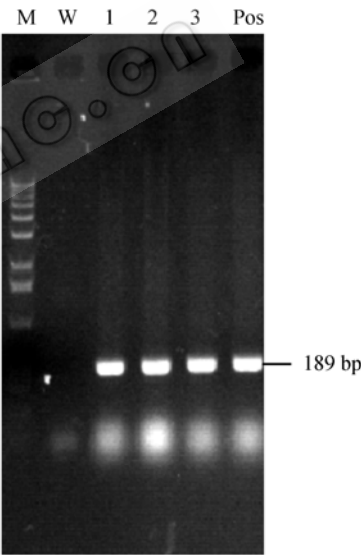


图 3 采用巢式 RT-PCR 对不同稀释度 cRNA 的检测结果
Fig. 3 Nested RT-PCR analysis of serially HEV cRNA standard

Pos: positive; W: water control; M: DNA marker; 1~3: $2\times10^5\sim2\times10^3$ copies cRNA

表 4 荧光定量 RT-PCR 和巢式 RT-PCR 对 54 份临床样品的检测结果
Table 4 Analysis of 54 clinical Samples by both nested and Real-Time RT-PCR

Samples	Real-time RT-PCR		Nested RT-PCR		Total
	Positive	Negative	Positive	Negative	
Stool	2	13	1	14	15
Livers	1	9	1	9	10
Bile	1	3	1	3	4
Serum	0	30	0	30	30

3 讨论

戊型肝炎是一种主要通过污染的水和食物传播的疾病, 因而快速灵敏的检测特别是对环境中微量病毒的检测具有重要的意义^[8]。用于戊型肝炎感染检测的实验室方法有病原学诊断方法和血清学诊断方法^[6]。由于 HEV 的感染可能并不产生抗 HEV 的 IgG 和 IgM 抗体, 所以病原学诊断就十分重要, 常用的方法有免疫电泳法和传统 RT-PCR 技术。这些方法在应用中均存在灵敏度低、不能定量的缺陷, 难以满足在潜伏感染期和急性感染早期病毒的检测。而荧光 RT-PCR 却能克服这些缺陷, 不仅有着更高的特异性和灵敏度, 而且大大缩短了检测用时, 有效避免了因操作导致的交叉污染。目前, 荧光 RT-PCR 已成功应用于对传染性乙型肝炎病毒、衣原体、艾滋病毒等的检测, 特别是在环境微生物检测中也已得到了应用^[9]。荧光 RT-PCR 技术主要有 SYBR Green 染料技术和 TaqMan 探针技术两种, 两种方法相比, TaqMan 探针技术具有更好的特异性, 且花费更低、易于设计^[10]。

本研究利用 Taqman 技术建立了戊型肝炎病毒荧光 RT-PCR 快速检测技术, 其关键问题是用于检测的引物和探针的筛选。除了要遵循常规的引物设计要求, 诸如避免引物二聚体、发夹结构的形成等^[11]。引物和探针还应尽量设计在病毒基因组中最为保守的区域, 并且引物 GC 含量应与 AT 保持相当^[3,10]。在对 HEV 全基因组序列分析中发现, 虽然位于 HEV ORF2 的 N 末端与 ORF3 融合的序列保守性很高, 但因富含 GC, 不利于 PCR 的扩增, 其检测结果往往不是很理想^[11]。而位于 ORF2 序列内部的序列不仅相对保守, 且 GC 的含量也有利于 PCR 扩增。在引物设计中, 主要以 I、IV 型为主, 同时兼顾 II、III 型, 合成了简并的通用引物, 并初步应用于对送检样品的检测。

此外, 在本研究中, 我们通过体外转录, 制备了荧光 RT-PCR 的阳性标准样品, 并对荧光 PCR 技术的各项条件进行了优化, 测定了该技术的最低检测极限, 验证了检测的特异性和重复性。而对 I 型和 IV 型 HEV 阳性样品的检测结果也证实了该方法可有效用于这两种基因型 HEV 的检测, 对 II 型和 III 型 HEV 的检测能力尚有待于进一步研究的证实。与巢式 RT-PCR 检测技术相比, 在对送检样品的检测中证实该方法更为敏感、特异, 其结果更为可信。

该技术的推广应用将为 HEV 的检验检疫奠定重要的基础。

REFERENCES

- [1] Qu LC, Guo ZR, Wang YZ, *et al.* Recent advances in hepatitis E virus. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, **22**(8): 26–29.
曲立春, 郭志儒, 王远志等. 戊型肝炎病毒之研究进展. 中国农学通报, 2006, **22**(1): 26–29
- [2] Ma X, Lu CP, Meng JH, *et al.* Epidemic investigation of swine hepatitis E virus infection in Xinjiang region. *Virologica Sinica*, 2004, **19**(3): 285–287.
马勋, 陆承平, 孟继鸿. 新疆地区猪戊型肝炎血清流行病学调查. 中国病毒学, 2004, **19**(3): 285–287.
- [3] Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, *et al.* A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods*, 2006, **131**(1): 65–71.
- [4] Chen Y, Tian DY, Xia NS. Epidemiology and genotypes of HEV in Wuhan. *Chin J Dig Dis*, 2005, **6**(4): 182–188.
- [5] Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, *et al.* Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol*, 2002, **40**(4): 1326–1332.
- [6] Mitsui T, Tsukamoto Y, Suzuki S, *et al.* Serological and molecular studies on subclinical hepatitis E virus infection using periodic serum samples obtained from healthy individuals. *J Med Virol*, 2005, **76**: 526–533.
- [7] Ahn JM, Rayamajhi N, Gyun Kang S, *et al.* Comparison of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nested or commercial reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of hepatitis E virus particle in human serum. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2006, **56**(3): 269–274.
- [8] Enouf V, Dos Reis G, Guthmann JP, *et al.* Validation of single real-time TaqMan PCR assay for the detection and quantitation of four major genotypes of hepatitis E virus in clinical specimens. *J Med Virol*, 2006, **78**(8): 1076–1082.
- [9] Mahony JB, Richardson S. Molecular diagnosis of severe acute respiratory syndrome: the state of the art. *J Mol Diagn*, 2005, **7**(5): 551–559.
- [10] Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol Aspects Med*, 2006, **27**(2-3): 254–298.
- [11] Ge SX, Guo QS, Li SW, *et al.* Design and preliminary application of a set of highly sensitive universal RT-PCR primers for detecting genotype I/IV hepatitis E virus. *Chinese Journal of Virology*, 2005, **21**(4): 181–187.
葛胜祥, 郭清顺, 李少伟等. 基因 I、IV 型戊型肝炎病毒高灵敏度通用引物的设计和初步应用. 病毒学报, 2005, **21**(4): 181–187.