



西尼罗病毒的逆转录重组酶介导扩增检测方法

吕沁风¹ 廖静¹ 罗鹏¹ 郑伟^{*1} 刘建礼² 郭利川³ 应清界³

1 浙江国际旅行卫生保健中心 浙江 杭州 310012

2 北京国际旅行卫生保健中心 北京 100088

3 江苏奇天基因生物科技有限公司 江苏 无锡 214135

摘要:【背景】随着西尼罗热在全球范围内广泛流行,西尼罗热传入我国的风险加大。研究西尼罗病毒快速检测方法,为西尼罗病毒检测建立方法储备。【目的】建立西尼罗病毒逆转录重组酶介导扩增(reverse transcription recombinase aided amplification, RT-RAA)检测方法。【方法】根据西尼罗病毒基因保守区序列设计引物和探针,建立西尼罗病毒 RT-RAA 检测方法,并评价该方法的重复性、特异性和灵敏度。【结果】RT-RAA 方法的整个扩增反应过程温度恒定,反应温度为 39 °C,检测时间较短(20 min 内),并且检测限可达 10 copies,与基孔肯雅病毒、登革病毒、乙型脑炎病毒、黄热病毒等蚊媒病毒无交叉反应,具有良好的特异性,样本检测符合预期。【结论】建立的西尼罗病毒 RT-RAA 方法具有快速、特异以及灵敏的特点,可用于西尼罗病毒的口岸快速检测和流行病学监测。

关键词: 西尼罗病毒, 重组酶介导扩增, 检测

Development of a reverse transcription recombinase aided amplification assay for detection of West Nile virus

LÜ Qin-Feng¹ LIAO Jing¹ LUO Peng¹ ZHENG Wei^{*1} LIU Jian-Li² GUO Li-Chuan³ YING Qing-Jie³

1 Zhejiang International Travel Healthcare Center, Hangzhou, Zhejiang 310012, China

2 Beijing International Travel Healthcare Center, Beijing 100088, China

3 Jiangsu Qitian Gene Biotechnology Co. Ltd., Wuxi, Jiangsu 214135, China

Abstract: [Background] West Nile fever is widely prevalent in the world, the risk of West Nile fever spreading to China has increased. The rapid detection method of West Nile virus (WNV) was studied to establish the method reserve for West Nile virus detection. [Objective] To establish a reverse transcription recombinase aided amplification (RT-RAA) assay for detection of WNV. [Methods] The primers and probes were designed based on the conserved genome sequence of WNV. An RT-RAA assay of WNV was constructed, and the reproducibility, specificity and sensitivity of the assay were evaluated. [Results] The RT-RAA assay had a constant temperature throughout the amplification reaction, the reaction temperature was 39 °C. The

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2016YFF0203203, 2016YFC1202700); Beijing Science and Technology Planning (Z161100001116107)

***Corresponding author:** E-mail: zw13588176340@163.com

Received: 15-04-2019; **Accepted:** 10-07-2019; **Published online:** 26-08-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFF0203203, 2016YFC1202700); 北京市科技计划(Z161100001116107)

***通信作者:** E-mail: zw13588176340@163.com

收稿日期: 2019-04-15; **接受日期:** 2019-07-10; **网络首发日期:** 2019-08-26

detection time was less than 20 minutes and the detection sensitivity could reach 10 copies. The method had excellent specificity as it didn't have cross amplification with other arbovirus such as chikungunya virus, dengue virus, Japanese encephalitis virus and Yellow fever virus. The results of sample detection also meet the expectation. **[Conclusion]** The RT-RAA assay of WNV established in our study was rapid, specific and sensitive. It can be used for rapid detection and epidemiological surveillance of WNV at the port.

Keywords: West Nile virus, Recombinase aided amplification, Detection

西尼罗热(West Nile fever, WNF)是一种人畜共患传染病,因感染西尼罗病毒(West Nile virus, WNV)而患病,1937年在乌干达北部尼罗河地区首先发现而命名^[1]。西尼罗病毒属于黄病毒科黄热病毒属,与乙型脑炎、登革热、黄热病、圣路易脑炎、丙型肝炎等病毒同属。近年来西尼罗热在北美、欧洲、中东和东南亚等地引起流行,并成为目前影响美国最大的传染病。西尼罗病毒的传播是以鸟类为储存宿主,人类经库蚊等嗜鸟蚊叮咬传播感染。人、马和其他哺乳动物在被西尼罗病毒感染的蚊虫叮咬后发病,轻者出现发热、头痛等流感样症状,重者可表现为中枢神经系统症状,甚至死亡^[2-4]。

近年来,由于国际间交流与合作的深入,各国间来往频繁,旅行者数量逐年递增,同时因候鸟迁徙等因素,增加了西尼罗热传入我国的概率^[5]。因此,建立该病毒的快速检测方法,并将其应用于口岸西尼罗病毒的监测工作,对防治该病传入我国具有重要的现实意义。重组酶介导扩增(recombinase aided amplification, RAA)技术,利用来自大肠杆菌的重组酶在常温下可以与DNA紧密结合并与引物形成聚合体,在单链结合蛋白和DNA聚合酶的作用下代替传统PCR的热循环解链过程,实现在恒温条件下的核酸快速扩增^[6]。本研究基于RAA技术建立了西尼罗病毒的快速逆转录重组酶介导扩增(reverse transcription recombinase aided amplification, RT-RAA)荧光检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本

西尼罗病毒来自美国病理学家协会(College of

American Pathologists, CAP)室间质评灭活阳性样本;黄热病毒为黄热减毒活疫苗,购自北京天坛生物制品股份有限公司;乙型脑炎病毒为乙型脑炎减毒活疫苗,来自成都生物制品研究有限责任公司;2型登革病毒阳性血清、基孔肯雅病毒阳性血清、健康人血清以及入境发热人员血清由浙江国际旅行卫生保健中心提供,其中2型登革热病毒及基孔肯雅热病毒阳性血清由上海之江生物及达安基因检测试剂盒检测均为阳性。

1.1.2 主要试剂和仪器

引物、探针和质粒由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;西尼罗热病毒荧光定量RT-PCR试剂盒,上海之江生物公司;病毒RNA提取试剂盒、荧光定量PCR仪,Life公司;全自动核酸提取仪,Thermo公司;恒温核酸扩增检测仪、RAA基础反应试剂盒,江苏奇天基因生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建

在GenBank中找到38株来源不同的西尼罗病毒相应的全基因组序列,运用DNASTar软件进行同源性分析和BLAST序列分析,筛出西尼罗病毒高度保守序列,以高度保守序列作为检测目的基因,委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成DNA质粒,目的基因片段250bp,基因序列如下:5'-CTCTAACTTCCAAGGGAAGGTGATGATGACGGTAAATGCTACTGACGTCACAGATGTCATCACGATTCCAACAGCTGCTGGAAAGAACCTATGCTTGTCAGAGCAATGGATGTGGGATACATGTGCATGATACTATCACTTATGAATGCCAGTGCTGTCGGCTGGTAATGATCCAGAAGACATCGACTGTTGGTGCAAAAGTCAGCAGTCTACGTCAGGTATGGAAGATGCACCAAGACACGCCAC-3'。

1.2.2 引物探针合成

经分析比对, 根据共有高度保守区域进行引物和探针设计, RT-RAA 的引物长度一般在 30–35 bp。经过分析比对, 引物和探针序列如表 1 所示。

1.2.3 探针修饰

探针的修饰方法包括: 荧光标记基团为 FAM, 荧光淬灭基团为 BHQ1。荧光报告基团修饰在探针序列距 5'端碱基数 31 bp 的位置上; 荧光淬灭基团修饰在探针序列距 3'端碱基数 17 bp 的位置上, 荧光报告基团与淬灭基团之间间隔 2 个碱基 GA, 其中碱基 A 用四氢呋喃残基替换。经过修饰的探针为: 5'-CAGAGCAATGGAYGTGGGATACA TGTGYGA(BHQ1-dT)G(THF)(FAM-dT)ACTATCAC TTATGAAT-3'。

1.2.4 病毒基因组核酸提取

取 50 μL 血清或疫苗样本, 采用全自动核酸提取仪, 按试剂盒说明书提取样本 RNA, 将提取的 RNA 进行分装, 冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 作为扩增模板备用。

1.2.5 西尼罗病毒 RT-RAA 扩增体系和条件

优化 RT-RAA 扩增反应体系: RAA 干粉管中依次加入 $1\times\text{Buffer}$ 25 μL , M-MLV 逆转录酶(100 U/ μL) 0.2–0.6 μL , 正、反向引物工作浓度 0.05–0.1 mmol/L, 探针工作浓度 0.02–0.05 mmol/L, 模板 5 μL , 最后加入醋酸镁(280 mmol/L) 2.5 μL , DEPC 水补足至 50 μL , 混合均匀, 300 r/min 离心 10 s。将上述反应管放入恒温核酸扩增检测仪中, $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min。阴性对照为不含 RNA 模板的 ddH₂O, 其余成分与阳性样本相同。

表 1 西尼罗病毒 RT-RAA 检测引物和探针核酸序列
Table 1 The primers and probe of WNV RT-RAA

引物/探针	序列
Primer/Probe	Sequences (5'→3')
FP	CACAGATGTCATCACGATTCCAACAGCTGC
TP	CTTCTGGATCATTACCAGCCGACAGCACTG
Probe	CAGAGCAATGGAYGTGGGATACATGTGYGAT GATACTATCACTTATGAAT

1.2.6 特异性实验

采用与蚊媒传染相关或者临床症状相近的病毒样本, 对黄病毒属的黄热病毒、登革病毒、日本脑炎病毒及甲病毒属的基孔肯雅病毒同时进行检测, 评价西尼罗病毒 RT-RAA 检测方法的特异性。

1.2.7 敏感性测定

重组质粒通过转入大肠杆菌培养并提取, 得到质粒后测定浓度并进行拷贝数计算, 按浓度梯度 10 倍比稀释制备成 1.0×10^1 – 1.0×10^{10} copies/ μL 阳性标准备用。利用优化好的 RT-RAA 扩增反应体系依次对上述定量样品进行测定, 考察方法的检出限。同时将西尼罗病毒重组质粒用上海之江生物生产的西尼罗病毒荧光定量 RT-PCR 试剂盒在荧光定量 PCR 仪上按说明书进行检测, 检测时间约为 100 min, 比较两种方法的敏感性。

1.2.8 重复性试验

4 个配制好的 RT-RAA 反应试剂试管中分别加入 5 μL 阴性对照, 其他 3 个反应管中分别加入 5 μL 西尼罗病毒质粒 DNA。加好样后每个反应管进行充分混匀, 每个反应管总体积为 50 μL 。将混匀的 4 个反应管放入恒温核酸扩增检测仪中, 设定反应温度为 $39\text{ }^{\circ}\text{C}$, 反应时间 20 min。

1.2.9 临床样本检测

采用 CAP 提供的西尼罗病毒室间质评样本, 同时收集出入境体检健康人血清样本 20 例及 14 例入境口岸发热人员血清样本, 采用本研究建立的西尼罗病毒 RT-RAA 检测方法进行测试, 观察检测结果。

2 结果与分析

2.1 西尼罗病毒一步法 RT-RAA 扩增体系的建立

优化西尼罗病毒一步法 RT-RAA 扩增体系, 选择最佳引物、探针及逆转录酶浓度。上、下游引物浓度为 0.05–0.1 mmol/L, 经试验 0.08 mmol/L 为最佳引物浓度。探针浓度为 0.02–0.05 mmol/L, 经试验 0.04 mmol/L 为最佳探针浓度。直接在每个 RAA 基础荧光通用反应试中加入逆转录酶 0.2–

0.6 μL , 加入 0.4 μL 反转录酶为最佳。建立扩增效率最优的西尼罗病毒 RT-RAA 检测方法。扩增在 5–10 min 内即开始起峰, 在 20 min 内达到峰值。

2.2 特异性试验

检测结果如图 1 所示, 只有西尼罗病毒质粒 DNA 出现扩增曲线, 为阳性结果, 其他样本如乙脑病毒 RNA、基孔肯雅病毒 RNA、黄热病毒 RNA、2 型登革病毒 RNA 及阴性对照均没有扩增曲线, 均为阴性。结果表明建立的西尼罗病毒 RT-RAA 检测方法具有良好的特异性。

2.3 敏感性检测

西尼罗病毒 RT-RAA 检测结果如图 2 所示, 结果显示最快 5 min 即可出现明显扩增, 10 min 左右所有标准工作品均有扩增, 由此可见最低检出限可以达到 1.0×10^1 copies。根据检测结果显示 RT-PCR 方法的最低检出限可以达到 1.0×10^2 copies。两种方法经过比较, RT-RAA 检测法的敏感性比 RT-PCR 法高 10 倍左右, 说明 RT-RAA 检测法具有较高的敏感性。

2.4 重复性试验

配制好 3 管相同浓度(1.0×10^5 copies/ μL)的西尼罗病毒质粒 DNA 和 1 管阴性对照放入恒温核酸扩增检测仪中进行检测, 检测结果如图 3 所示。结果显

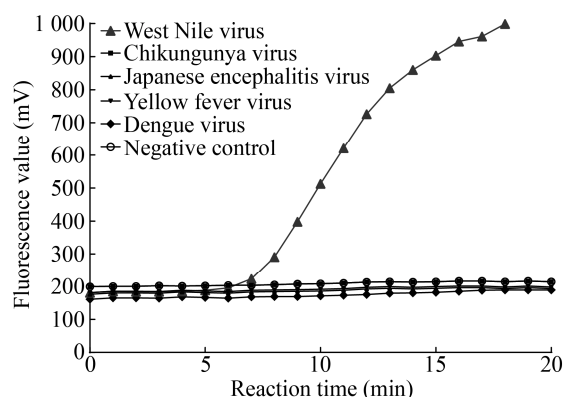


图 1 西尼罗病毒 RT-RAA 特异性试验
Figure 1 The specificity of RT-RAA for WNV

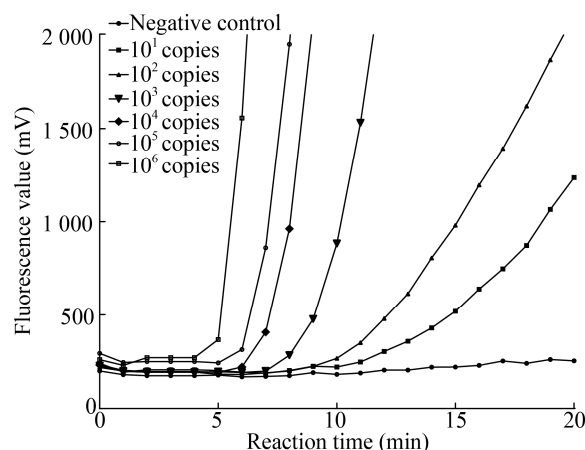


图 2 西尼罗病毒 RT-RAA 敏感性试验
Figure 2 The sensitivity of RT-RAA for WNV

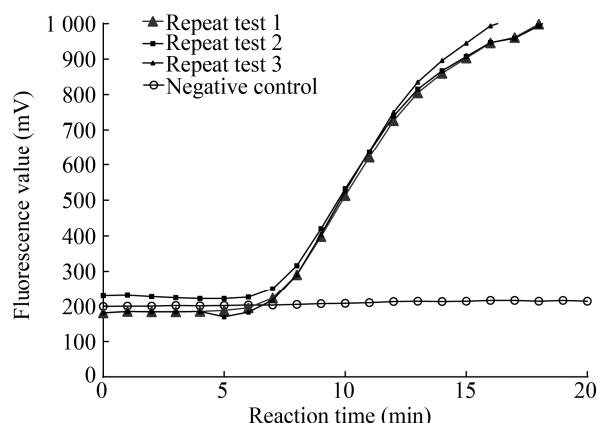


图 3 西尼罗病毒 RT-RAA 重复性试验
Figure 3 The repeatability test of WNV RT-RAA

示扩增反应起峰时间一致, 曲线形态接近, 具有良好的重复性。

2.5 临床样本检测

CAP 提供的西尼罗病毒灭活样本(20 例出入境体检阴性血清样本和 14 例入境口岸发热人员血清样本)采用本研究建立的西尼罗病毒 RT-RAA 检测方法进行检测, 检测结果见图 4。可见 CAP 提供的样本可用本方法扩增, 检测结果为阳性; 20 例出入境体检血清样本均为阴性, 符合实验预期; 14 例入境口岸发热人员血清样本检测结果也为阴性。

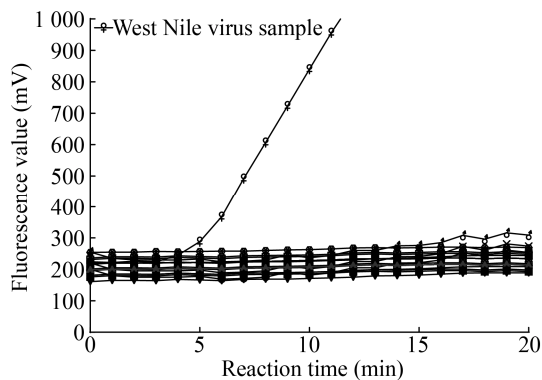


图4 RT-RAA方法样本检测结果

Figure 4 The test results of samples by RT-RAA

3 讨论与结论

西尼罗热在 1999 年侵入美国,在数年间西尼罗病毒感染迅速在美国本土 48 州蔓延,西尼罗热病例报道在 2003 年达到高峰 9 862 例,至 2017 年底,西尼罗热总病例达到 48 070 例,其中死亡 2 138 例^[7]。西尼罗病毒危害极大,不仅给流行地区造成了巨大的经济损失,而且严重威胁公共卫生安全,被世界卫生组织列为全球重大流行病之一。西尼罗病毒的传播媒介在我国分布广泛,同时由于鸟类在全球大规模迁徙扩大了病毒传播的范围,应时刻注意西尼罗病毒的传入。建立未输入我国病原体的高效快速的检测方法,具有重要的现实意义。

诊断西尼罗病毒的方法通常有病毒培养法、血清学诊断法和核酸检测等^[8-9]。病毒培养法和血清学诊断法操作复杂还费时费力,或是敏感度和特异性不高,不能快速得出检测结果。以 RT-PCR 技术为代表的多重 RT-PCR、套式 RT-PCR 以及实时定量 RT-PCR 以其高度的特异性及敏感性在西尼罗病毒检测方面趋于成熟^[10-14],但是这些方法需要投入昂贵的仪器设备,并对实验室环境有较高的要求,且 RT-PCR 反应时间较长,而本研究中 RT-RAA 的反应时间明显较短。等温核酸扩增技术近年来一直是分子生物学领域的研究热点,其中的 LAMP 方法克服了 PCR 技术需要昂贵的仪器设备等缺点,具有操作简便、结果判断简单等优

点,李淑华等、Nyan 等、Kumar 等建立了西尼罗病毒 RT-LAMP 检测方法,已应用于西尼罗病毒的检测^[15-17]。将 RAA 和 LAMP 两种等温扩增技术相比,LAMP 技术要求设计多对引物且对靶基因的要求较高,RAA 则需一对严格配对的引物,对模板的要求不高;LAMP 扩增温度在 60–65 °C,RAA 的工作温度相对低很多;RAA 的扩增效率明显较高,反应在 30 min 内完成,LAMP 一般需要 1 h 左右;RAA 的工作体系需要多个酶协同作用,因此对酶的比例和缓冲体系的要求较高。

本研究基于重组酶介导扩增技术设计特异引物和探针,优化反应体系,并建立基于 RT-RAA 荧光法快速检测西尼罗病毒的试剂盒。实现检测温度保持恒定 39 °C,20 min 内即可完成西尼罗病毒的检测。本研究中西尼罗病毒 RT-RAA 检测法的敏感性比 RT-PCR 高 10 倍左右,RT-RAA 的检测时间仅为 RT-PCR 的 1/5 左右。RT-RAA 检测法具有快速、灵敏、操作简便的特点,不需要昂贵的大型设备,可适用于现场快速检测,尤其在口岸对西尼罗病毒的检测具有重要意义。经过试验研究评价该方法快速、准确、可靠,适合在口岸或基层进一步推广,具有广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] Ludolfs D, Niedrig M, Paweska JT, et al. Reverse ELISA for the detection of anti West Nile virus IgG antibodies in humans[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2007, 26(7): 467-473
- [2] Chancey C, Grinev A, Volkova E, et al. The global ecology and epidemiology of West Nile virus[J]. *Biomed Research International*, 2015, 2015: 376230
- [3] Lü Zhe, Yu YZ, Hu GX, et al. Advancement of West Nile virus disease research[J]. *Journal of Economic Animal*, 2012, 16(1): 55-59 (in Chinese)
吕喆, 于亚洲, 胡桂学, 等. 西尼罗河病毒病的研究进展[J]. *经济动物学报*, 2012, 16(1): 55-59
- [4] Napp S, Petric D, Busquets N. West Nile virus and other mosquito-borne viruses present in Eastern Europe[J]. *Pathogens and Global Health*, 2018, 112(5): 233-248
- [5] Wang SJ, Song XH, Chi TY, et al. The epidemic history and current situation of West Nile fever and its prevention and control[J]. *China Animal Health Inspection*, 2016, 33(12):

- 4-6,21 (in Chinese)
王淑娟, 宋晓晖, 迟田英, 等. 西尼罗河热的流行历史、现状及防控[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(12): 4-6,21
- [6] Lü B, Cheng HR, Yan QF, et al. Recombinase-aid amplification: a novel technology of *in vitro* rapid nucleic acid amplification[J]. Scientia Sinica Vitae, 2010, 40(10): 983-988 (in Chinese)
吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 等. 用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(10): 983-988
- [7] Su TY. From West Nile virus infection in the USA to dengue fever in China[J]. China Tropical Medicine, 2018, 18(3): 199-206 (in Chinese)
苏天运. 从美国的西尼罗河病毒感染到中国的登革热[J]. 中国热带医学, 2018, 18(3): 199-206
- [8] Zheng XL, Zhu LH, Wang Q, et al. Progress on diagnostic techniques of West Nile virus disease[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2014, 35(3): 92-97 (in Chinese)
郑小龙, 朱来华, 王群, 等. 西尼罗病毒病诊断技术研究进展[J]. 动物医学进展, 2014, 35(3): 92-97
- [9] Cao ZG, Wang HL, Li L, et al. Development, verification and application of an indirect ELISA for West Nile virus antibody[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2016, 29(1): 70-74 (in Chinese)
曹增国, 王化磊, 李岭, 等. 西尼罗病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立、验证及其应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(1): 70-74
- [10] Lü B, Cheng HR, Yan QF, et al. The development and recent improvements of *in vitro* nucleic acid amplification technology[J]. China Biotechnology, 2011, 31(3): 91-96 (in Chinese)
吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 等. 体外核酸快速扩增技术的发展 and 不断创新[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(3): 91-96
- [11] Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, et al. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2007, 146(1/2): 355-358
- [12] Song J, Tang TS, Tian LL, et al. Nest RT-PCR to detect the West Nile virus[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2008, 28(12): 1411-1414,1418 (in Chinese)
宋捷, 唐泰山, 田玲玲, 等. 西尼罗病毒套式 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(12): 1411-1414,1418
- [13] Qiu L, Li XL, Jiang J, et al. Detection of West Nile virus by real-time RT-PCR[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 44(9): 4-7 (in Chinese)
邱璐, 李小林, 蒋静, 等. 实时荧光 PCR 检测西尼罗病毒方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(9): 4-7
- [14] Yu BB, Lu YY, Xie XY, et al. Simultaneous detection of West Nile virus and Chikungunya virus by duplex real-time quantitative PCR[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2013, 31(6): 412-414 (in Chinese)
余蓓蓓, 卢亦愚, 谢鑫友, 等. 双重荧光定量 PCR 检测西尼罗病毒和基孔肯雅病毒[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(6): 412-414
- [15] Li SH, Lu WY, Cao GW. Loop-mediated isothermal amplification in detection of West Nile virus genome[J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2010, 31(6): 590-594 (in Chinese)
李淑华, 鹿文英, 曹广文. 利用环介导等温扩增技术检测西尼罗病毒[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(6): 590-594
- [16] Nyan DC, Swinson KL. A novel multiplex isothermal amplification method for rapid detection and identification of viruses[J]. Scientific Report, 2015, 5: 17925
- [17] Kumar JS, Saxena D, Parida M, et al. Evaluation of real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for clinical diagnosis of West Nile virus in patients[J]. Indian Journal of Medical Research, 2018, 147(3): 293-298