



一种利用 RT-PCR 特异扩增甲型流感病毒 HA 基因多变区片段并测序确定分型的方法

流感研究上海协作组

(严安^{*}, 丁国徽^{*}, 周正峰, 董辉, 张亚坤, 祝雷, 何云刚, 边超, 张国庆, 李亦学, 孙兵, 黄忠, 蓝柯, 金力, 王红艳, 王小宁, 杨忠, 钟扬, 戴建新, 郭亚军, 王皓, 车小燕, 吴凡, 袁政安, 张曦, 曹志伟^①, 周晓农^②, 周佳海^③, 马志永^④, 童光志^④, 赵国屏[†], 金维荣[†], 熊慧[†])

国家人类基因组南方研究中心, 省部共建国家重点实验室培育基地-上海市疾病与健康基因组学实验室, 上海 201203;

中国科学院上海生命科学研究院 CAS-MPG 计算生物学伙伴研究所计算基因组学实验室、系统生物学重点实验室生物信息中心、植物生理生态研究所合成生物学实验室、巴斯德研究所, 上海 200031;

生物芯片上海国家工程研究中心, 上海 201203;

上海生物信息技术研究中心, 上海 200235;

复旦大学生命科学学院, 上海 200433;

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510640;

第二军医大学肿瘤研究所, 上海 200433;

抗体药物国家工程研究中心, 上海 201203;

南方医科大学珠江医院, 广州 510282;

上海市疾病预防控制中心, 上海 200336;

① 同济大学生命科学学院, 上海 200092;

② 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 上海 200025;

③ 中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032;

④ 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241;

* 同等贡献

† 联系人, E-mail: gpzhao@sibs.ac.cn, xionghui@chgc.sh.cn, weirong_jin@shbiochip.com

2009-05-20 收稿, 2009-05-26 接受

摘要 针对甲型流感病毒 HA 基因的 H1, H2, H3, H5, H7 和 H9 亚型的序列特征, 设计专用 PCR 引物, 通过 RT-PCR 特异扩增相应片段并测定序列, 可以准确地区分 H1 和 H3 感染人类的流感病毒及其亚型。这种基于流感病毒核酸序列测定的特异性检测方法, 不仅可以用于新型甲型 H1N1 病毒的快速确诊和分型, 并且还可推广应用于今后其他流感病毒或具有爆发潜力的新型流感病毒的监测。

关键词

甲型 H1N1 流感病毒

HA 基因

亚型 H1 及 H3

RT-PCR 特异扩增

DNA 测序

目前, 新型甲型 H1N1 流感病毒正在墨西哥、美国、加拿大等国肆虐, 并在世界范围内传播 (http://www.who.int/csr/don/2009_05_15/en/index.html)。随着我国四川、山东、北京和

广东等地新型甲型 H1N1 流感患者的确诊, 表明新型甲型 H1N1 流感病毒已输入我国, 也不排除在我国一定范围、部分人群内传播甚至流行的可能性。由于流感病毒基因(特别

是 HA 和 NA 基因)的高变异性和变异的不确定性^[1], 相关诊断和治疗方法一直滞后于流行时的防控或其可能的爆发。因此, 在较短的时间内研制出快速、特异、灵敏的确诊检测

引用格式: 流感研究上海协作组. 一种利用 RT-PCR 特异扩增甲型流感病毒 HA 基因多变区片段并测序确定分型的方法. 科学通报, 2009, 54: 1648~1651
Consortium for influenza study at Shanghai. Subtyping of type A influenza by sequencing the variable regions of HA gene specifically amplified with RT-PCR. Chinese Sci Bull, 2009, 54: 2164~2167, doi: 10.1007/s11434-009-0433-7

方法和诊断试剂,是有效防控新型甲型 H1N1 流感病毒的首要任务之一。

随着现代生物技术的发展,分子生物学技术已被大量应用于甲型流感病毒的快速诊断。世界卫生组织(WHO)陆续公布的针对新型甲型 H1N1 流感病毒的分子诊断检测方法均是以荧光定量 RT-PCR 检测技术为基础的核酸诊断(<http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptcr/en/index.html>)。该试剂易于制备,且具有快速、灵敏、易于在基层推广的优点。但是均普遍存在引物和探针序列的特异性低所造成的问题,即难以与以往的甲型 H1N1 流感病毒明确区分,造成假阳性;难以对当前新型甲型 H1N1 流感病毒的基因组散在的多处变异进行特异性诊断,造成不能扩增出在引物或探针位置出现变异的新型甲型 H1N1 流感病毒株,导致假阴性结果^[2]。因此,WHO 不将其作为确诊的诊断方法,而推荐具有特异、准确优势的基因测序技术作为诊断新型甲型 H1N1 流感的确诊方法。我们根据以往的流感病毒和 WHO 最新公布的新型甲型 H1N1 流感病毒的 HA 基因序列,在甲型流感病毒各 HA 亚型基因的相对保守区域设计特异引物,使用 RT-PCR 扩增其序列,然后将测得序列与已知亚型特征序列作相似性聚类分析,鉴定序列对应的病毒亚型。

基于上述策略,相关引物设计原则是:()引物选在 H1, H3 等病毒亚型某个相对保守的位置;()引物间扩增片段为序列相对多变区域,其序列变异信息可用以区分 H1, H2, H3, H5, H7 和 H9 共 6 种亚型,特别是能区分 2009 年北美新型甲型流感病毒和常规 H1N1 流感病毒;()引物应符合常规的 PCR 引物设

计原则。我们选择 H1, H2, H3, H5, H7 和 H9 作为区分对象,因为这几种亚型已经发现可以感染人群(http://en.wikipedia.org/wiki/Human_influenza),现在或者将来已经或可能在人间传播,有的还具有突发流行的潜力。

从 NCBI 的 Influenza Virus Resource 下载了最新的流感病毒序列数据及相关的描述信息(截至 2009 年 5 月;共 187327 个序列条目,涉及到的样本为 23094 个),同时构建了本地的流感综合信息系统(<http://lifecenter.sgst.cn/flu>)。由于流感序列很多,并且各种亚型在数据库里面存储的数目不一致,因此,为保证计算上可行,我们通过本地系统,对 6 种亚型中的每一种,均分别按时间顺序选择了最近的 50 条样本信息详细且具有完整数据的 HA 序列,总计 300 条基准 HA 序列(http://lifecenter.sgst.cn/flu/doc/flu_1_2_3_5_7_9-1.htm),其中,宿主是禽类的 197 个,人的 69 个,猪的 15 个,鼠兔(*Platypus*)的 1 个以及宿主标注为环境的 18 个。我们没有专门选择宿主为人或猪的流感病毒,而是将人、猪、禽流感病毒的序列综合使用,因为所选亚型流感病毒在人、禽、猪之间已证明可能交叉感染。随后,利用并行化的 Clustalw^[3]对这 300 条序列进行多重序列联配(multiple sequence alignment),在相对保守的 HA 序列 750 和 1100 nt 区域附近选取用于合成正向和反向引物的候选序列(图 1)。

在本次研究中,由于仅获得了 H1 型和 H3 型的病毒 RNA 样本,因此,我们仅描述和检验这两种亚型的引物(表 1)。

本文设计的甲型流感病毒的鉴定方法基于对正反引物所扩增的 HA 基因中相对多变区域的 DNA 片段的序列测序,所以,我们对所选区域的序列根据序列相似性绘制聚类树以判断此段序列对病毒分型的效果(图

2)。本文没有采用任何进化模型以校正序列之间的相似性,直接采用平均距离法聚类(average distance clustering),因为研究目的是利用原始序列相似性来对病毒进行分型。图 2 显示,对所选取的 300 条序列,选取的处于“相对保守区域”引物间“相对多变区域”的序列可以全部正确地区分 H1, H2, H3, H5, H7 和 H9 等亚型。另外,2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒独立分成一簇,明显区分于其他 H1 亚型病毒。这说明在该区域两侧设计保守引物,对相应产物的序列进行测序可以把 H1, H2, H3, H5, H7 和 H9 区分开,特别是还可以鉴定出新型甲型 H1N1 流感病毒。

为进一步确证引物(H1F722, H1F721)和 H1R1062 的 PCR 产物序列对新旧 H1N1 流感病毒的区分能力,我们随机选取了 100 条 2009 年北美甲型 H1N1 流感病毒 HA 序列和 100 条 2009 年前的 H1N1 流感病毒 HA 序列。序列的选取原则同前(样本信息详细且具有完整数据的 HA 序列)。通过多重联配和聚类树的绘制,确证(H1F722, H1F721)和 H1R1062 的 PCR 产物序列可以很好地区分新旧 A 型 H1N1 流感病毒(数据未显示)。

我们选取了 6 份常见的人和猪流感病毒样品,验证设计的引物,优化 PCR 条件。图 3 显示,针对流感病毒 H1 亚型的引物对,可以特异性扩增出来自于人和猪的目的片段,并且没有非特异性条带出现,针对 H3 亚型的引物对亦如此,显示该组引物具有较高的特异性。虽然由于时间紧迫,所使用的病毒 RNA 样品都是尚未纯化定量的粗提物,我们还是对该组引物的灵敏度进行了初步的检验。我们用 H1 和 H3 亚型来源 RNA 各 2 μg 参与 40 μL 总体积的逆转录反应;将 cDNA 产物进行浓度倍比稀释,分别为 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ,

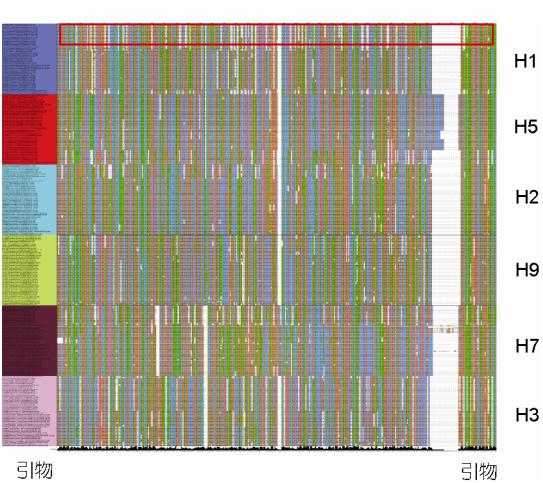


图 1 HA 联配位置 750~1100 nt 之间相对多变区域的序列对比及其两侧的相对保守区域
红框所包括的序列对应 2009 年新甲型 H1N1 流感病毒

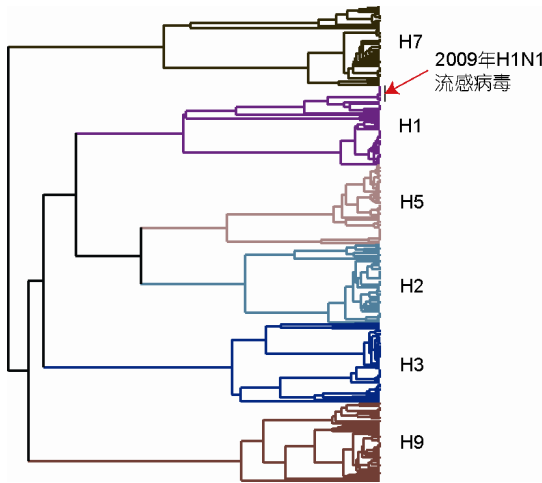


图 2 利用引物间多变区域序列相似性聚类分析对病毒分型的效果
主类之间分支的 Bootstrapping 值都是 100%。2009 年新型 H1N1 流感病毒独立成为一个分支(箭头所示)

表 1 H1 和 H3 特异性扩增引物^{a)}

| 亚型 | 引物名称 | 引物位置 | 引物序列 | 片段大小/bp |
|----|---------|-----------|--------------------------------|---------|
| H1 | H1F722 | 722~744 | 5'-AAGGGAGAATGAAC TATTACTGG-3' | 341~342 |
| | H1F721 | 721~744 | 5'-GAAGGAAGAATCAACTACTACTGG-3' | |
| | H1R1062 | 1046~1062 | 5'-AATGAAACCGCAATGG-3' | |
| | H3F731 | 731~752 | 5'-GCAGAATAAGCATCTATTGGAC-3' | |
| H3 | H3R1064 | 1048~1064 | 5'- ATGAAACCCGCGATTGC-3' | 334~337 |
| | H3R1067 | 1048~1067 | 5'- TCTATAAACCCGGCTATTGC-3' | |

a) 实验中引物 H1F722 和 H1F721 等比例混合, 作为 H1 分型反应上游引物; 引物 H3R1064 和 H3R1067 等比例混合, 作为 H3 分型反应下游引物

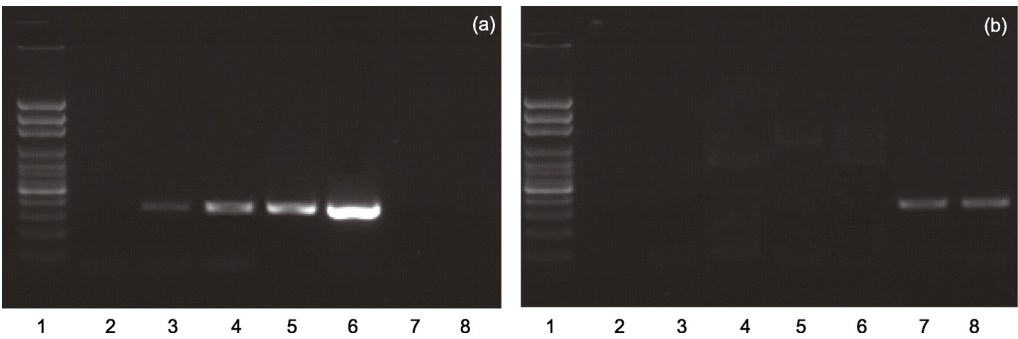


图 3 H1 和 H3 分型引物以不同标本为模板的 PCR 产物

(a) H1 分型引物对应的 PCR 产物; (b) H3 分型引物对应的 PCR 产物. 1, 100 bp DNA Ladder; 2~8, 不同模板的 PCR 产物: 2, 去离子水(对照); 3, 人 H1 亚型标准株 cDNA; 4, 人 H1 亚型病毒株 cDNA; 5, 猪 H1N1 亚型标准株 cDNA; 6, 猪 H1N1 亚型 HA 基因克隆质粒; 7, 人 H3 亚型标准株 cDNA; 8, 猪 H3N2 亚型 HA 基因克隆质粒

10^{-5} , 10^{-6} , 并且分别取 2 μ L 作为模板, 在体积为 20 μ L 的 PCR 反应体系中扩增. 如图 4 所示, 在 10^{-5} 稀释度, 仍可见清晰目标条带, 并可以作

为模板获得清晰的测序结果. 结果显示该组引物具有较高的灵敏度. 我们对上述从常见的人和猪流感病毒扩增得到的 PCR 片段进行了

序列测定和生物学分析(数据未显示). 这些序列与 300 条基准 HA 序列进行聚类分析可以看出(图 5), 3~8 号病毒株可以准确地归类到预想的聚

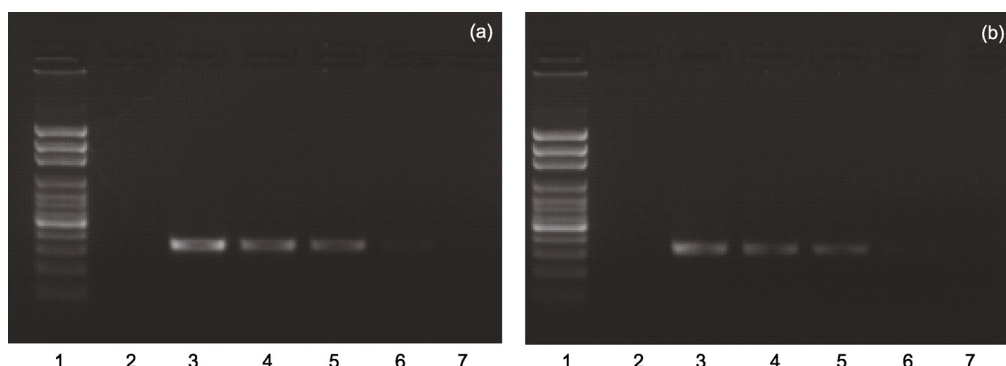


图4 引物敏感度检测

(a) H1 分型引物对不浓度的人 H1 亚型标准株 cDNA 扩增效果图; (b) H3 分型引物对不浓度的人 H3 亚型标准株 cDNA 扩增效果图. 1, 100 bp DNA Ladder; 2, 以去离子水为模板的阴性对照; 3~7, cDNA 稀释为 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 及 10^{-6} 倍数 cDNA 模板 PCR 产物

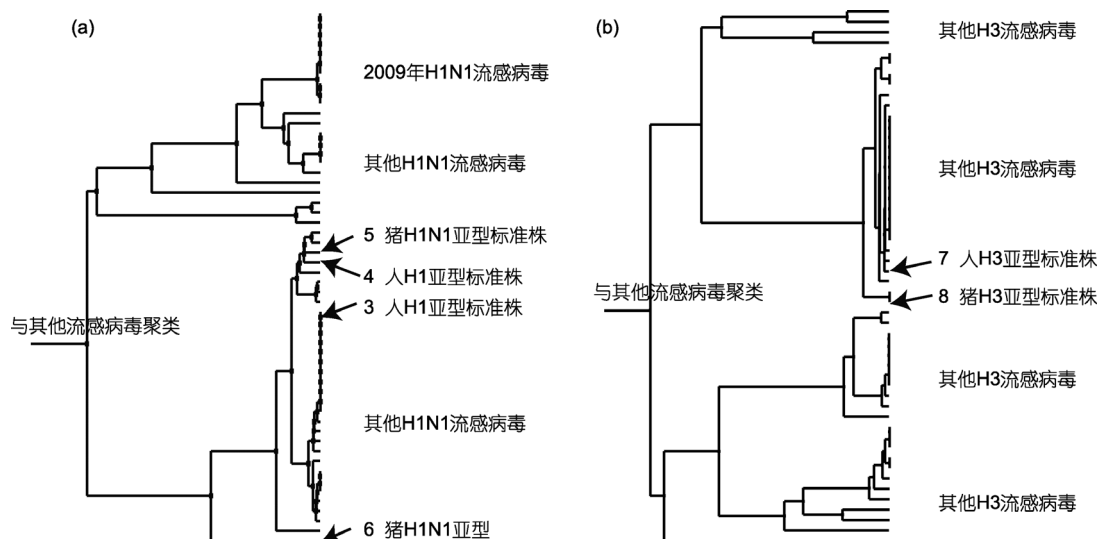


图5 常见人和猪甲型流感病毒(H1 和 H3)多变区域测序后的分型情况

(a)和(b)是测试病毒的多变区域序列和基准序列的相应区域绘制的分类树(网络版附录 1)中的 H1 和 H3 分支. 箭头指向的分支是测试病毒所定位的分支. 通过序列相似性聚类, 我们可以把测试用的病毒株准确无误地归类到预想的分支中. 各个分支所对应的病毒株详见网络版附录 1 中的完整图. 3~8 代表若干毒株, 名称与图 3 中标本号码一致

类树位置上. 因此, 应用该系列引物不仅可以对此次流行的新型甲型 H1N1 流感病毒进行确诊, 而且有可能对其他人易感的甲型流感病毒 HA

亚型(如 H3 型)进行确诊. 此外, 这种方法还应该可以发现在甲型流感病毒 HA 亚型中的新变异株, 通过生物信息学分析此类“新”变异的进化

规律, 对于认识和预测病毒的变异和流行趋势具有潜在的应用价值; 长期积累数据和研究, 可能为国家制定有效防控措施提供科学依据.

参考文献

- Ghedini E, Sengamalai N A, Shumway M, et al. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature*, 2005, 437: 1162—1166
- Leutenegger C M, Higgins J, Matthews T B, et al. Real-time TaqMan PCR as a specific and more sensitive alternative to the branched-chain DNA assay for quantitation of simian immunodeficiency virus RNA. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001, 17: 243—251
- Li K B. ClustalW-MPI: ClustalW analysis using distributed and parallel computing. *Bioinformatics*, 2003, 19: 1585—1586