

# 流感病毒基因分型流式荧光法的建立及临床应用研究

陈东杰 李鸿茹 王大璇 李小钦 黄丽萍 黄珊珊 黄艺娜 陈愉生

福建省立医院呼吸科, 福州 350001

通信作者: 陈愉生, Email: 94731696@qq.com, 电话: 0591-88217530

**【摘要】 目的** 基于流式荧光技术建立一种对流感病毒及其亚型进行快速检测的方法, 并进行临床标本检测。**方法** 通过序列比对, 设计简并引物及特异性探针, 合成质粒, 利用 Luminex 平台建立检测方法并进行 430 份临床标本的检测, 检测结果与福建省疾病预防控制中心的检测结果进行比较。**结果** 建立了一种快速的流感病毒分型检测方法, 可同时检测 A、B、C3 种流感病毒及亚型 (H1-H16、N1-N9), 耗时 3.5 h, 特异性好、灵敏度高, 稳定性可行, 430 份临床标本检测结果与福建省疾病预防控制中心结果进行比较, 显示高度的一致性。**结论** 利用流式荧光技术建立的流感病毒及亚型分型检测方法灵敏度、特异性、稳定性高。

**【关键词】** 流感病毒; 亚型; 基因分型; 流式荧光法

**基金项目:** 国家科技重大专项课题 (2017ZX10103004); 福建省科技厅引导性项目 (2016Y0015); 福建省医学创新项目 (2017-CX-3); 福建省医学创新联合项目 (2016Y9005)

DOI: 10. 3760/cma.j.issn.1003-9279. 2019. 06. 021

## Establishment and application of rapid detection method for influenza virus and subtypes based on flow fluorescence technology

Chen Dongjie, Li Hongru, Wang Daxuan, Li Xiaoqin, Huang Liping, Huang Shanshan, Huang Yina, Chen Yusheng

Department of Respiratory Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China

Corresponding author: Chen Yusheng, Email: 94731696@qq.com, Tel: 0086-591-88217530

**【Abstract】 Objective** To develop a method for rapid detection of influenza virus and its subtypes based on flow fluorescence technology, and then detect the clinical specimens by our established method. **Methods** We designed degenerate primers and specific probes, synthesized plasmids, used Luminex platform to establish detection method and later detected 430 clinical specimens, and compared the result with those of Fujian Center for Disease Control and prevention. **Results** A method for the simultaneous determination of influenza viruses A, B, C and its subtypes (H116, N19) was established. The time consumption was 3.5 hours, with good specificity, high sensitivity and feasible stability. The detection result of 430 clinical specimens showed high consistency with the result of Fujian Center for Disease Control and Prevention. **Conclusions** We established a method for simultaneous determination of influenza viruses and its subtypes, high sensitivity, specificity and stability.

**【Key words】** Influenza virus; Subtypes; Genotyping; Flow fluorescence technology

**Fund programs:** National Major Science and Technology Project (2017ZX10103004); Guiding projects of Fujian Science and Technology Department (2016Y0015); Scientific Innovation Project of Fujian Provincial Health and Family Planning Commission (2017-CX-3); Fujian Medical Science and Technology Innovation Project (2016Y9005)

DOI: 10. 3760/cma.j.issn.1003-9279. 2019. 06. 021

流行性感冒是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 其流行特点是传播速度快, 波及范围广。迄今为止, 流感病毒已引起 4 次世界流感大流行, 给人类社会的经济及健康造成了巨大损失, 急需

流感病毒的快速检测技术。目前流感病毒分子生物学诊断方法主要包括常规 RT-PCR、套式 RT-PCR、多重 RT-PCR、荧光定量 RT-PCR、环介导等温扩增、核酸测序等<sup>[1-3]</sup>, 但其均未能高通量, 多指

标进行检测。流式荧光,又称悬浮阵列、液相芯片等,是近 20 多年逐渐发展起来的多指标联合诊断技术,主要由美国 Luminex 公司研发,具有高通量、高灵敏度、并行检测等特点,因此,本研究拟依托该检测平台,建立可快速检测流感病毒及其亚型的分子生物学方法。

## 1 材料与方 法

**1.1 研究对象** 实验室冻存的流感病毒阳性标本及构建的流感病毒各型质粒,福建省立医院呼吸科标本库收集的 430 份入院当天或第 2 天采集的社区获得性肺炎(CAP)住院患者的鼻咽拭子或咽拭子(2015/07/01-2016/12/31)。

**1.2 主要仪器与试剂** Luminex200 多功能流式点阵仪(美国 Luminex 公司),荧光定量 PCR 仪 7500(美国 ABI 公司),自动化核酸提取仪 NP968(上海透景生命科技有限公司),PCR 试剂盒(上海之江生物技术有限公司)。

### 1.3 方 法

**21.3.1 所选病毒株与序列:** 实验室-70℃冻存的阳性标本及近年来 GenBank 流感病毒数据库公布的流感病毒株序列(09H1N1、H1N1、H3N2 为冻存标本, H2-KX394376、H4-KT589212、H5-KX652135、H6-KP767652、H7-KU143282、H8-LC029898、H9-KT220419、H10-KP285949、H11-KX351573、H12-KM244060、H13-CY185633、H14-KX024583、H15-CY098540、H16-KT338585、N3-LC042059、N4-KF357768、N5-KP284895、N6-KT245145、N7-KP412453、N8-KX867859、N9-KU143378、IFC-LC123481.1)。

**1.3.2 引物、探针的筛选及质粒的构建:** 参照参考文献[4-5]的基础上,在血凝素(hemagglutinin, HA)、神经氨酸(neuraminidase, NA)通用简并引物的 5' 端进行生物素标记;利用 Megalin 软件将通用引物与 1.3.1 所述各型流感序列进行匹配,确定序列长度,依据该序列,委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行流感亚型质粒的合成;利用 Primer Premier 5 在产物特异区设计探针,探针 5' 端进行氨基修饰,探针也由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**1.3.3 PCR 扩增及电泳:** 扩增体系:模板 2.0 μl 逆转录及扩增酶混合 0.6 μl,引物/条 0.2 μl(原浓度 20 μmol/L),5×buffer 5.0 μl,DEPC 水补足 25.0 μl。45.0℃逆转录 15 min;95.0℃10 min;95.0℃10,

45.0℃30 s,72.0℃10 s,40 个循环;72℃2 min。2.5%的琼脂糖凝胶进行电泳。

**1.3.4 测序:** 将扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果进行 Blast 比对。

**1.3.5 微球的包被:** 将合成的各型特异性探针与上海透景生命科技技术有限公司提供的编码微球进行偶联,偶联步骤按公司技术文件说明进行。

**1.3.6 杂交:** 反应体系:杂交反应液 16.0 μl,0.07 mol/L TE 缓冲液 3.0 μl,混合微球 3.0 μl,检测样本 3.0 μl,共 25.0 μl。95℃5 min,49℃30 min,加入链霉素亲和素藻红蛋白(SA-PE)75.0 μl 作用 15 min。

**1.3.7 荧光信号检测:** 杂交结束后,转移至 Luminex 200 多功能流式点阵仪进行荧光信号的检测。

**1.4 统计学方法** 用上述构建好的检测体系,检测 430 份临床样本,与福建省疾病预防控制中心的 RT-PCR 检测结果进行比对,用 SPSS17.0 进行  $\chi^2$  检验,比较 2 种检测方法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 筛选得到的引物及探针** 见表 1、表 2、表 3。

**2.2 电泳结果** 09H1N1、H1N1、H3N2 及其他各型质粒经 PCR 扩增,扩增产物在 2.5%的琼脂糖凝胶上进行电泳,均能清晰得到目的条带,且无非特异性条带。09H1、H1、H3 及其他 HA 质粒电泳结果 175 bp;N1、N2 及其他 NA 质粒电泳结果 219 bp;IFA 224 bp、IFB 230 bp、IFC 215 bp。

### 2.3 特异性、灵敏性及稳定性

**2.3.1 特异性:** 扩增的各型基因产物先进行杂交反应,再置 Luminex200 多功能流式点阵仪进行荧光信号检测,读取荧光信号值。信号值  $\geq 200$  的判断为阳性,150~200 的判断弱阳性, $\leq 150$  判断为阴性。各型基因检测结果值均大于 600,信号强,未与其他型别出现非特异反应,即当检测标本为 H1 时,其他型别如 H2、H3 等不会出现  $\geq 200$  的信号值。见表 4、表 5。

**2.3.2 灵敏性:** 取  $10^4$  拷贝/μl、 $10^3$  拷贝/μl、 $10^2$  拷贝/μl、 $10^1$  拷贝/μl、 $10^0$  拷贝/μl 标本进行最低浓度检测。取  $\geq 200$  信号值为阳性或两次  $150 \leq$  信号值  $\leq 200$  为阳性。最低检测浓度,  $10^1$  拷贝/μl: H1、IFC;  $10^2$  拷贝/μl: 09H1、H2、H3、H4、H6、H8、H9、H12、H13、N1、N2、N5、N6、N9、IFA、IFB;  $10^3$  拷贝/

表 1 流感病毒血凝素基因分型引物、探针序列及微球编号

Tab.1 The primer, probe sequence and microsphere number of hemagglutinin (HA) gene of influenza virus for genotyping

基因	通用简并引物	探针 (5'→3')	微球编号	产物长度 (bp)
09H1		NH2C6-AAAAAAAAAACCGTCTATTCAATCTAGA	29	
H1		NH2C6-AAAAAAAAAACATCCATTCAATCCAGA	16	
H2	HA-F1;	NH2C6-AAAAAAAAAATCAGATTGAGTCAAGG	19	
H3	Biotin-GGRGAATGCCCCAAATAYGT	NH2C6-AAAAAAAAAACAGAGAAACAACTAGA	20	
H4	HA-F2;	NH2C6-AAAAAAAAAAGTAAAAGGCATCAAGA	22	
H5	Biotin-GGRARATGCCCCAGRTATGT	NH2C6-AAAAAAAAAACCTCTAAGAGAAAGA	25	
H6	HA-F3;	NH2C6-AAAAAAAAAAGTTCCACAGATTGAGA	13	
H7	Biotin-GGRGAATGCCCCAARTAYAT	NH2C6-AAAAAAAAAACAGAGAACCCTCAAGA	31	
H8		NH2C6-AAAAAAAAACCTTCTATTGAACCCAAA	55	175
H9	HA-R1;	NH2C6-AAAAAAAAAATGCTAAGTCAAGCAGA	33	
H10	Biotin-CTGAGTCCGAACATTGAGTT	NH2C6-AAAAAAAAAAGTTGTCCAAGGAAG	35	
H11	GCTATGVTGRTAWCCATACCA	NH2C6-AAAAAAAAAAGCGATAGCGACAAGA	37	
H12	HA-R2;	NH2C6-AAAAAAAAAAGGCCAAGACCGA	52	
H13	Biotin-CTGAGTCCGAACATTGAGTT	NH2C6-AAAAAAAAACTGCCATATCAAACAGA	39	
H14	YTGATGYCTGAADCCRTACCA	NH2C6-AAAAAAAAACTGACAAGCAAACAAAG	42	
H15		NH2C6-AAAAAAAAAGAAGACACATACCAGG	45	
H16		NH2C6-AAAAAAAAACCCATCCATTAATGAAAGA	47	

表 2 流感病毒神经氨酸基因分型引物、探针序列及微球编号

Tab.2 The primer, probe sequence and microsphere number of neuraminidase (NA) gene of influenza virus for genotyping

基因	通用简并引物	探针 (5'→3')	微球编号	产物长度 (bp)
N1		NH2C6-AAAAAAAAAATAATCAATAGAGTTGGATG	24	
N2	NA-F;	NH2C6-AAAAAAAAAATCGTTCATATTAGCACA	18	
N3	Biotin-CCCGRACHCARGARTCNKMRGT	NH2C6-AAAAAAAAAATATGAGAACGTTCCCTAA	24	
N4	NA-R;	NH2C6-AAAAAAAAAATAATGAGTGTGAAAGATGTA	27	
N5	Biotin-CCCCNNKCCARTTRTCYCTRCA	NH2C6-AAAAAAAAAGTAGATGAAAAGGAAATTTTC	14	219
N6		NH2C6-AAAAAAAAAATACAGAAAATTGAAAGAACTG	41	
N7		NH2C6-AAAAAAAAAAGAGGAATCCCTTAAA	49	
N8		NH2C6-AAAAAAAAAATAGTTGGCAAACCTGAAA	52	
N9		NH2C6-AAAAAAAAATTGAAATGGGAGTCTCT	53	

表 3 A、B、C 型流感病毒引物及探针序列、微球编号

Tab.3 The primer, probe sequence and microsphere number of Influenza virus A, B and C type

病毒	通用简并引物	探针 (5'→3')	微球编号	产物长度 (bp)
FluA	IFA-F: Biotin-TAACCGAGTTCGAAACGTA	NH2C6-AAAAAAAAAAGTAAAGACAAGACCA	48	224
	IFA-R: Biotin-GCGTCTACGCTGCAGTCC			
FluB	IFB-F: Biotin-CGGATCCTCAACTACTC	NH2C6-AAAAAAAAAACCGATTATCACCAGA	38	230
	IFB-R: Biotin-CAGCTATTATGGAGCTGTT			
FluC	IFC-F: Biotin-CTCTTTGGGATTAGGGATA	NH2C6-AAAAAAAAAAGACCACAATTATGCC	51	215
	IFC-R: Biotin-CTGAGTTGTCGGTTTCGT			

μl: H5、H7、H10、H11、H14、H15、H16、N3、N4、N7、N8。

2.3.3 稳定性: 随机挑选  $10^3$  拷贝/μl 的 HA、NA 及 IFA, IFB, IFC 的质粒进行 PCR 扩增, 扩增产物进行 3 次荧光信号检测, 信号值分别为 H2: 890、900、893; H4: 690、700、718; H5: 789、780、810; H6: 899、905、908; H7: 801、808、810; N3: 950、958、948; N4: 1100、1110、1090; N5: 1201、1190、1220;

N6: 1207、1198、1222; IFA: 1180、1208、1204; IFB: 1210、1220、1236; IFC: 2107、2120、2092。结果相近, 显示稳定性好。

2.4 与福建省疾病预防控制中心 RT-PCR 检测结果比较 2015/07/01-2016/12/31, 430 份鼻咽拭子或咽拭子标本, 流式荧光法检测 23 份阳性 (5.35%), 4 例 H1N1 (0.93%), 6 例 H3N2 (1.4%), 13 例 IFB (3.02%)。福建省疾病预防控制中心 RT-

表 4 流感病毒血凝素特异性

Tab.4 The specificity of influenza virus hemagglutinin (HA)

样品	09H1	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16
阴性	20	19	18	16	13	17	19	13	21	17	27	20	16	20	23	20	19
09H1	756	20	15	11	14	11	18	14	17	14	21	22	16	16	17	16	15
H1	19	643	10	15	12	16	18	15	17	13	12	20	17	12	19	18	10
H2	11	14	675	16	20	24	20	19	19	13	18	11	19	17	19	20	14
H3	10	21	13	879	17	10	12	17	19	10	12	12	14	17	11	13	11
H4	14	17	14	18	720	17	14	15	16	14	11	13	15	15	19	20	13
H5	13	17	13	20	18	815	17	21	15	15	13	16	17	12	20	15	13
H6	11	11	12	11	15	17	913	18	18	16	10	18	18	13	15	13	18
H7	16	15	18	16	18	11	11	817	14	12	14	12	15	19	15	18	17
H8	18	30	20	20	15	11	49	64	818	15	22	21	42	13	21	20	19
H9	25	26	22	13	17	23	44	19	15	774	34	19	32	16	27	21	32
H10	12	16	16	21	23	16	13	31	12	20	637	12	20	16	18	20	16
H11	12	34	19	17	20	31	28	29	21	18	34	879	38	16	44	24	71
H12	16	21	16	16	14	18	12	12	20	13	19	11	876	18	19	21	21
H13	15	15	12	12	20	16	21	15	14	12	15	19	19	865	18	20	25
H14	14	16	16	18	16	16	24	12	22	13	15	16	21	19	685	17	35
H15	19	22	14	17	14	18	13	12	21	13	15	19	21	18	16	876	23
H16	16	17	18	12	19	12	18	20	19	16	21	22	19	19	11	13	875

表.5 流感病毒神经氨酸 A、B、C type 型流感病毒特异性

Tab.5 The specificity of virus(NA) neuraminidase (NA), A, B and C

样品	FluA	FluB	FluC	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9
阴性	20	24	16	14	16	19	15	20	19	17	17	19
FluA	1 215	15	13	11	11	14	18	14	13	10	14	18
FluB	36	1 223	22	24	24	32	30	32	29	34	22	28
FluC	43	15	2 233	18	18	22	17	42	47	32	20	14
N1	15	17	17	1 210	15	22	14	16	14	14	14	11
N2	10	19	17	15	1 321	12	27	23	14	11	11	17
N3	14	12	17	17	12	986	12	32	18	14	20	18
N4	11	11	14	10	14	13	1 134	10	32	12	18	14
N5	13	12	6	10	11	14	11	1 231	13	33	21	12
N6	13	18	16	11	17	16	14	10	1 245	23	16	18
N7	18	20	18	12	11	11	17	18	17	1 867	25	11
N8	17	16	17	16	13	12	23	19	12	14	1 657	22
N9	19	17	22	18	14	15	18	15	14	14	11	1 358

表 6 流式荧光法与 RT-PCR 方法比较

Tab.6 Comparison of Flow Fluorescence and RT-PCR

流式荧光法	RT-PCR 方法		合计
	+	-	
+	23	0	23
-	3	404	407
合计	26	404	430

PCR 方法<sup>[6]</sup>, 检测 26 份阳性 (6.05%), 5 例 H1N1 (1.16%), 6 例 H3N2 (1.86%), 13 例 FluB (3.02%)。SPSS17.0 进行配对卡方检验 (Fisher 精确概率检验),  $P=0.25$ , 两种检测方法无差异。

### 3 讨论

流行性感病毒至今已发现甲型流感的 HA 有 18 种亚型, NA 有 11 个亚型, H17N10、H18N11 目前仅在蝙蝠中分离得到<sup>[7]</sup>。由于 HA 和 NA 的抗原性容易发生变异, 所以造成了流感病毒的不断流行, 因此, 追踪流感病毒的变异, 预防流感的爆发流行, 对流感病毒亚型的进行检测显得尤为重要。目前, 流感病毒的检测主要有病毒培养分离、血清学诊断、病毒抗原检测、病毒核酸检测<sup>[7]</sup>。其中病毒培养分离、血清学检测是常规的方法, 病毒在细胞内培养要

求条件高、技术复杂,一般医疗场所难以开展,且检测时间也较长<sup>[8]</sup>。血清学检测主要为患者感染病原体后产生抗体,检测患者产生的抗体以判断相应的病原体感染,一般患者需要 1~4 周才能产生抗体,故免疫学其多为回顾性研究。在病毒的核酸检测和分型中,出现了很多快速特异的方法,流式荧光技术则是具有众多优点的一种核酸检测方法<sup>[9-10]</sup>。

美国 Luminex 公司研发建立的流式荧光技术平台,可满足快速、高通量,多指标检测等要求。其原理为将直径为 5.6  $\mu\text{m}$  微球用 2 种不同的染料染成染料浓度比例不同的编码微球,每种染料各有 10 个浓度,就可得到 100 种染料颜色不同的编码微球,每种微球都具有唯一染料编码,理论上说,可一次同时检测 100 种不同的指标。编码微球上带有成千上万的羧基结合位点,可与设计合成的 5' 端带有氨基的探针结合。通过 5' 端带有生物素 Biotin 标记的引物扩增标本,如扩增出可与特异性探针碱基互补的目的序列,则 PCR 产物可与编码微球表面的探针杂交,再经过链霉素亲和素藻红蛋白与生物素 Biotin 亲和结合,液态芯片系统中的红、绿激光就可检测到相应的荧光信号。这种基于编码微球的液态芯片技术能够对单孔内多达 100 种不同的指标同时进行检测,灵敏度高(可达 0.01 pg);重复性好(CV < 5%);检测动态范围宽(可达 0.2~32 000 pg/ml);可在 3~6 h 内实现快速检测,实现了快速、多指标、同步、定量分析等功能。

本研究利用 Luminex 平台建立流式荧光检测系统,检测已有标本及构建流感各型质粒,显示高度的灵敏性、特异性及稳定性。按建立好的检测系统检测 430 份临床标本与疾病预防控制中心用 RT-PCR 检测的结果相近。但该方法还需更多的阳性流感病毒标本进行临床验证,有待后续的进一步研究。综上,该检测方法的建立有望实现对多种流感病毒分型达到快速、多指标、同步、半定量检测,将为突发公共卫生事件及流感流行应急检测系统做好方法学准备,有望成为流感病毒检测及分型的一种新手段。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 陈东杰:论文撰写;王大璇,李小钦,黄丽萍,黄珊珊,黄艺娜:实验操作;李鸿茹,陈愉生:研究设计、指导、论文修改、经费支持

#### 参考文献

- [1] 赵娜,刘金霞,孙殿兴.反转录环介导等温扩增技术检测甲型 H1N1 流感病毒的建立[J].中华实验和临床病毒学杂志,2016,30(1):67-70. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2016.01.018.
- [2] 李希妍,赵翔,谭敏菊,等.Sanger 法测定季节性 H3N2 亚型流感病毒全基因组序列[J].中华实验和临床病毒学杂志,2016,30(5):469-472. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2016.05.013.
- [3] 薄洪,高荣保,李晓丹,等.H10N8 禽流感病毒 Real time RT-PCR 检测方法的建立[J].中华实验和临床病毒学杂志,2015,29(1):74-76. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2015.01.025.
- [4] Gall A, Hoffmann B, Harder T, et al. Universal primer set for amplification and sequencing of HA0 cleavage sites of all influenza A viruses [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(8):2561-2567. DOI: 10.1128/JCM.00466-08.
- [5] Alvarez AC, Brunck ME, Boyd V, et al. A broad spectrum, one-step reverse-transcription PCR amplification of the neuraminidase gene from multiple subtypes of influenza A virus [J]. Virol J, 2008, 5:77. DOI: 10.1186/1743-422X-5-77.
- [6] Pichon M, Gaymard A, Jossset L, et al. Characterization of oseltamivir-resistant influenza virus populations in immunosuppressed patients using digital-droplet PCR: Comparison with qPCR and next generation sequencing analysis [J]. Antiviral Res, 2017, 145:160-167. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.07.021.
- [7] Granados A, Peci A, McGeer A, et al. Influenza and rhinovirus viral load and disease severity in upper respiratory tract infections [J]. J Clin Virol, 2017, 86:14-19. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.11.008.
- [8] Grund S, Michel S, Barthuber C, et al. Serum and mucosal antibodies fail as prognostic markers during critical influenza A infection [J]. J Clin Virol, 2016, 74:32-36. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.11.019.
- [9] Sakurai A, Takayama K, Nomura N, et al. Fluorescent immunochromatography for rapid and sensitive typing of seasonal influenza viruses [J]. PLoS One, 2015, 10(2):e0116715. DOI: 10.1371/journal.pone.0116715.
- [10] Vemula SV, Zhao J, Liu J, et al. Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans [J]. Viruses, 2016, 8(4):96. DOI: 10.3390/v8040096.

(收稿日期:2018-12-13)

(本文编辑:陈培莉)