

The Molecular Biological Techniques for Human Adenovirus Detection

Ye Li^{1,2}, Tuo Dong^{1,2}, Vladimir I. Zlobin³, Oleg Reva⁴, Zhangyi Qu^{1,2*}

¹Department of Microbiology, School of Public Health, Harbin Medical University, Harbin Heilongjiang

²Department of Natural-Foci Diseases, Institute of Environment-Associated Diseases, Sino-Russia Joint Medical Research Centre, Harbin Heilongjiang

³Research Institute for Biomedical Technologies, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

⁴Department of Biochemistry, Bioinformatics and Computational Biology Unit, University of Pretoria, Pretoria, South Africa

Email: *HMU635@126.com

Received: May 12th, 2017; accepted: May 30th, 2017; published: Jun. 2nd, 2017

Abstract

Adenovirus is one of the major viruses causing human respiratory diseases. The effective and rapid method in adenovirus detection is helpful to strengthen the surveillance of adenovirus infection, to investigate the epidemic trends timely, and to control the virus infection. The current molecular biological methods for adenovirus detection both used in laboratory and clinical are reviewed in this paper. The principle, characteristics and application of these techniques are commented.

Keywords

Adenovirus, PCR, Molecular Biological Detection

人腺病毒分子生物学常用检测技术

李 焯^{1,2}, 董 妥^{1,2}, Vladimir I. Zlobin³, Oleg Reva⁴, 曲章义^{1,2*}

¹哈尔滨医科大学, 公共卫生学院, 卫生微生物学教研室, 黑龙江 哈尔滨

²中俄医学研究中心, 环境相关疾病研究所, 自然疫源性疾病研究室, 黑龙江 哈尔滨

³俄罗斯伊尔库茨克国立医科大学, 生物医学技术研究所, 伊尔库茨克, 俄罗斯

⁴南非比勒陀利亚大学, 生物信息学与计算生物学部, 生物化学系, 比勒陀利亚, 南非

Email: *HMU635@126.com

收稿日期: 2017年5月12日; 录用日期: 2017年5月30日; 发布日期: 2017年6月2日

*通讯作者。

文章引用: 李焯, 董妥, Vladimir I. Zlobin, Oleg Reva, 曲章义. 人腺病毒分子生物学常用检测技术[J]. 微生物前沿, 2017, 6(2): 11-16. <https://doi.org/10.12677/amb.2017.62002>

摘要

腺病毒是引起人类呼吸道疾病的主要病毒之一，了解目前最有效、快捷的腺病毒检测方法有助于加强腺病毒感染的监测，及时发现疫情并掌握病毒流行趋势，为迅速采取有效措施提供保障。本文对目前实验室、临床常用的人腺病毒分子生物学检测方法的原理、特点和应用等进行了综述。

关键词

腺病毒，PCR技术，分子生物学检测

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

腺病毒是无包膜的 DNA 病毒，直径为 70~100 nm，二十面体对称结构，有 252 个壳粒。其中有 240 个非顶角壳粒，称为六邻体(Hexon)，六邻体作为腺病毒主要的中和抗原蛋白，可刺激机体产生抗体，抑制病毒体构象的改变，从而中和病毒体[1]。除六邻体外，二十面体的顶角壳粒为 12 个五邻体(penton)，每个五邻体由基底和伸出表面的一根末端有顶球的纤突(fiber)组成。人腺病毒(human adenovirus, HAdV)是 Rowe, W.P.在 1953 年从小儿扁桃腺中分离得到的，属于腺病毒科、哺乳动物腺病毒属，是一种感染人体的常见病原体。研究资料显示，至今为止已发现 72 个腺病毒型别，国际病毒分类学委员会(ICTV)将人腺病毒划分为 A~G 共 7 个种，其中 A 和 F 种主要引起消化道感染，C、E 和部分 B 种是呼吸道疾病的主要病因，其他 B 种引起尿路感染，D 种是角膜炎、结膜炎的主要病因[2]，F 和 G 种为肠道 ADV，此外腺病毒还会引起移植免疫缺陷疾病、脑炎及肥胖症等多种疾病。

目前，分子生物学检测技术以其高灵敏、高特异、快速的特点日渐成熟，以核酸扩增为主的多种分子诊断技术，大大缩短了检测的时间，在许多临床及实验室已逐步替代传统技术，成为病毒检测的新一代方法。同时随着基因芯片，下一代测序等技术的发展，使快速、灵敏、特异、高通量检测成为了可能。下面对人腺病毒分子生物学常用检测技术做一综述，旨在了解目前人腺病毒最有效、快捷的检测方法，为一线检测工作者提供参考。

2. 传统 PCR 技术

2.1. 普通 PCR(General PCR)

普通 PCR 技术是以目的基因为模板进行 DNA 的体外合成，特异性依赖于靶序列两端互补的寡核苷酸引物，经过多次循环，可在短时间内获得大量目的基因。检测腺病毒适用的临床标本类型包括咽拭子、鼻咽灌洗液、粪便及血液标本等，主要扩增区域为 hexon 的保守区基因，也有将 fiber 或 va (VA RNA)基因作为扩增靶序列以达到进一步分型的目的[3] [4]。如以腺病毒 hexon 蛋白核酸为例，进行普通 PCR 扩增，经变性、退火、延伸的数次循环后，使扩增产物在琼脂糖凝胶中电泳，在紫外灯下观察是否有相应大小的条带，最终测序结果经 BLAST 序列分析确定其型别[5]。随着通用引物 PCR 的研究，现已成功设

设计出腺病毒通用的、特异的且扩增产物具有腺病毒型别特异性的引物，用该引物建立的 PCR 方法检测呼吸道标本中的腺病毒 DNA 具有灵敏和特异的特点，适用于临床常规诊断腺病毒感染[6] [7]。

普通 PCR 技术简单经济，为现代分子生物学检测技术打下了基石，多数实验室均可应用，便于推广。但随着技术的发展，由于其检测时间较长、易污染且无法准确定量等原因，正逐渐被其他衍生方法所替代。

2.2. 实时荧光定量 PCR (Quantitative and Real-Time PCR)

实时荧光定量 PCR 是一种在 DNA 扩增反应中，以荧光化学物质实时监测和连续分析荧光信号，并通过绘制标准曲线来分析聚合酶链式反应循环后不同时期扩增产物的量。Morozumi, M.等人[8]应用该方法快速鉴定了儿科呼吸道腺病毒感染患者，证明该方法不但有非常高的灵敏度，而且避免了使用不必要的抗生素，还可以预防与 HAdV 相关的疾病爆发。目前，美国食品和药物管理委员会(FDA)已经批准了基于实时 PCR 技术的 Luminex xTAG REV Fast 检测方法，同时 Light Cycler [9]和 TaqMan [9] [10] [11]等方法都已被用于鉴定 HAdV。

该方法操作方便、省时省力，重复性好，灵敏度和特异度高，适用于人腺病毒的日常监测和暴发疫情的应急诊断。但由于运用了封闭的检测，因此也就不能监测扩增产物的大小，同时因为荧光素种类以及检测光源的局限性且实验成本比较高，限制了其广泛的应用。

2.3. 环介导等温扩增法(Loop-Mediated Iso-Thermal Amplification, LAMP)

LAMP 技术是近年来使用较多的一种核酸扩增技术，其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物，包括两条内引物和两条外引物，在一种特殊的链置换 DNA 聚合酶的作用下，60℃~65℃恒温扩增，以双链 DNA 中的一条链为模板合成新链，并将另外一条链替换掉，15~60min 左右即可，效率可达 $10^9\sim 10^{10}$ 个数量级。Li F 等人[12]根据腺病毒六邻体基因序列设计特异性 LAMP 引物，使用实时浊度仪对所建立的 LAMP 方法进行特异性与灵敏度评估后，对 3、7、14 型腺病毒分离株共 11 株进行了检测，随后采用直接免疫荧光法(OFA)鉴定腺病毒阳性和阴性的呼吸道标本，结果证明 LAMP 是一种快速可靠检测儿童急性呼吸道腺病毒感染的方法。

这种方法所需设备简单，扩增效率高，耗时短，具有特异性强、灵敏度高，不需要特殊的仪器和试剂，结果可视化等优点，此外对操作人员的熟练度和专业水平要求不高，使该方法特别适合基层或者实验条件较差的实验室进行病原微生物的快速检测。但 LAMP 技术也需要进一步改进与完善，如引物设计复杂且易被污染，以及反应试剂的保存运输等方面。

3. PCR 衍生技术

3.1. PCR 结合酶联免疫吸附试验技术(Pcr-Enzyme Linked Immunosorbent Assay, PCR-ELISA)

PCR-ELISA 技术是将免疫学反应和 PCR 技术相结合而创建的一种检测技术。它把抗原抗体反应的高特异性和聚合酶链反应的指数扩增能力有机结合起来。Metzger-Boddien C 等人[13]利用 PCR-ELISA 技术成功从 64 个急性胃肠炎患者的粪便标本中，检测出 26 个样本中有腺病毒，并证明了相对于传统 ELISA 和病毒分离培养方法，PCR-ELISA 是一种从粪便样品中检测肠道腺病毒的快速、灵敏、可靠的技术。

该方法对仪器要求较低，只要有扩增仪和酶标仪就可以进行，需要的样本量很小，节省时间，且易于自动化操作。相对于其他传统方法，无论是灵敏度、特异度、准确度上都是很大的提高，为病毒的早期检测提供了一个可行的平台。缺点是操作过程中易引起环境和交叉污染，易出现假阳性，每一环节都

影响它的敏感性和特异性, 因此探索最佳反应条件, 简化步骤, 实现标准化, 商品化生产, 使之易于在常规实验室推广至关重要。

3.2. 多重 PCR 结合反向斑点杂交技术(Multi-Plex Pcr-Based Reverse line blot Hybridization, mPCR-RLB)

多重 PCR 结合反向斑点杂交技术是在基因水平建立的一种快速的常见呼吸道病毒的检测方法。通过对腺病毒 DNA 的同源性比较, 可在其基因序列的保守区(如六邻体蛋白基因)设计出特异性引物, 引物的 5'末端用生物素标记; 探针的 5'末端用氨基标记, 将探针固定在尼龙膜(或硝酸纤维素膜)上, 将带有生物素标记的引物与探针特异性结合, 利用非放射性的酶显色反应显示杂交结果。北京儿童医院[14]利用 mPCR/RLB 技术检测包括人腺病毒(Adv)、呼吸道合胞病毒(RSV)、人流感病毒(A、B 型)、人副流感病毒(1、2、3 型) 7 种病毒株, 均得到相应的目标扩增产物, 扩增条带清晰, 并且彼此之间没有交叉反应, 与目标片段一致。

该方法通过反向斑点杂交可显著提高反应效率、缩短反应时间, 有效解决扩增片段大小的局限, 减少干扰, 大大提高了特异性和敏感性, 同时该技术所需成本低, 一次检测标本数可达多份, 适合对混合感染病原体进行高通量检测[15] [16]。不足之处主要是非扩增引物或引物二聚体产物与探针结合导致的假阳性信号、探针结合点突变可能导致信号弱或不存在等问题, 在实验中应特别注意。

3.3. 靶序列富集多重扩增技术(Target Enriched-Multiplex PCR, Tem-PCR)

Tem-PCR 技术是能在一个反应体系中同时对多种靶基因高度敏感和特异的扩增, 首先富集模板, 通过使用非常少量的特异性引物进行靶序列富集, 以减少引物二聚体形成和非特异性背景, 来增加测定特异性。在模板富集后, 使用一对具有高亲和力的高浓度超级引物来提高灵敏度, 进行高效指数扩增, 同时使产物带有生物素标记, 最后以液相芯片技术进行高通量的多重检测。Johnson D 等人[17]应用 Tem-PCR 原理的 ResPlex II 版本 1.0 面板检测含有腺病毒, 流感病毒, 副流感病毒(1~3 型), 呼吸道合胞病毒, 鼻病毒等多种标本, 结果表明 ResPlex II 结果与传统检测方法的总体一致性为 97.7%, 证明了 ResPlex II 板 1.0 面板是检测常见呼吸道病毒的快速和准确的方法, 而且还可以检测出传统病毒培养方法不能检测到的病毒。

Tem-PCR 技术克服了传统多重 PCR 检测腺病毒等呼吸道疾病的缺点, 如靶点不兼容、特异性和敏感性差、扩增不均衡等。可在一反应管内对多个目标基因进行高效特异的扩增, 是目前快速、可靠的多重 PCR 技术。但仍有不足之处, 如检测时打开 PCR 反应管可能会造成实验室污染和假阳性可能, 病毒各型保守区核苷酸序列存在不同程度变异等, 因此还有待于进一步优化。

4. 其他技术

4.1. 依赖连接反应的多重探针扩增技术(Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, MLPA)

依赖连接反应的多重探针扩增技术是针对待测核酸靶序列进行精确的定性和定量分析, 现已广泛应用于基因诊断。其特色在于扩增仅针对完成连接的探针而非样本靶序列, 只有当特异性探针与靶序列完全互补时, 2 条探针才能被连接酶连接形成单链扩增, 而每 1 对探针的扩增产物长度都是唯一的, 借助毛细电泳可对扩增产物进行分离和鉴别, 确保了其极高的特异度。目前欧洲已通过一种基于 MLPA 的检测方法 Respi Finder assay, 可同时检测包括腺病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒等在内的 15 种呼吸道病毒, 具有理想的灵敏度和特异度[18] [19]。

与其他分子诊断技术比较, MLPA 灵敏度及特异度方面均有很大的优势, 且操作简单, 重复性好, 无需特殊设备。缺点是在检测时间方面, 只能保证在 24 h 内给出结果, 无法作为快速诊断手段。

4.2. 基因芯片技术(Gene Chip)

基因芯片是近年来生物高新技术领域发展起来的一项技术, 原理是将大量探针分子固定于支持物上后与标记的样品分子进行杂交, 通过采集各采集点杂交信号强度, 辅以计算机软件进行图像信息分析处理。崔鹤馨等人[20]建立了一种可同时特异性检测样品中低滴度的腺病毒、鼻病毒以及呼吸道合胞病毒的基因芯片, 有望为临床提供确诊依据。

基因芯片技术因高通量化、微量化及快速简便的特点广泛应用于病毒病快速有效的筛查和诊断, 具有传统的病毒检测技术无法比拟的优势。缺点是其成本较高, 芯片制作技术复杂, 目前不宜在基层推广使用。

4.3. 下一代测序技术(Next Generation Sequencing Technology)

下一代测序技术有助于人们更全面、更深入地分析基因组、转录组及蛋白质之间交互作用组的各项数据。一代测序技术是将短寡聚核苷酸充当引物来合成与模板互补的新的 DNA 链。用双脱氧核苷酸(ddNTP)作为链终止试剂, 通过聚合酶的引物延伸产生一系列长度不等的多核苷酸片段再进行分离的方法。下一代测序技术在其基础上, 用不同颜色的荧光标记四种不同的 ddNTP, 当 DNA 聚合酶合成互补链时, 每添加一种 ddNTP 就会释放出不同的荧光, 根据捕捉的荧光信号并经过特定的计算机软件处理, 从而获得待测 DNA 的序列信息。石伟先, 申红卫等人[21]应用此技术对北京地区社区获得性肺炎病例中呼吸道病毒的流行情况进行分析, 成功筛查腺病毒、流感病毒、鼻病毒、副流感病毒等 14 种呼吸道病毒。

该技术为高通量检测技术, 具有较高的灵敏度、特异度, 检测结果能全面地反映临床患者的病毒感染情况, 在多种病原体的检测和流行病学的暴发调查中有广泛的应用前景。不足之处是单个样品的检测成本较高, 实验操作较繁琐, 且在几个相同碱基连续出现的情况下, 计算机易出现误读等情况, 检测时要格外小心。

近年来, 腺病毒感染暴发时有发生, 所致急性呼吸道感染传染性强、疫情发展快, 部分病例病情严重。由于呼吸道病毒种类繁多、感染症状相似、容易突变, 且影像学表现缺乏特异性等特点, 使病原学证据在临床诊断和流行病监控中十分重要。但由于传统病毒检测技术存在明显缺陷, 如病毒分离技术虽然为病毒感染诊断的金标准, 但是检测时间需要几天甚至几周, 且病毒分离成功与否与临床标本的质量和标本来源密切相关, 分离结果也需要有经验的实验人员判定, 使得该方法很难用于临床治疗的指导; 经典的免疫学检测方法如免疫荧光, ELISA 技术等, 因需要的实验设备简单, 在临床及基层疾控部门应用较广, 但有抗原检测灵敏度低与抗体检测滞后性等问题, 且易受人为因素干扰, 所以不利于急性传染病爆发时对患者的及时治疗与传染范围的及时控制。因此如何实现特异性强、灵敏度高、操作简便, 经济合理, 实时快速, 安全无污染的腺病毒检测方法, 是值得思考和深入研究的问题。

基金项目

国家自然科学基金资助项目(31370074; 81172725; 30771909), 黑龙江省医学科学院转化专项(201621), 哈尔滨医科大学中俄医学中心成果转化专项。

参考文献 (References)

- [1] 王鹏, 曲章义, 张鸿彦, 等. 人腺病毒六邻体蛋白保守区抗原性分析[J]. 国际免疫学杂志, 2007, 30(3): 135-138.
- [2] Hiroi, S., Izumi, M., Takahashi, K., *et al.* (2012) Isolation and Characterization of a Novel Recombinant Human Ade-

- novirus Species D. *International Journal of Medical Microbiology*, **61**, 1097-1102.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.042176-0>
- [3] 王瑞琨, 商蕾, 王迎晨, 金玉霞, 齐桂云, 黄冬娟, 曲章义. 呼吸道感染人腺病毒的分离培养和型别鉴定[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2013(5): 385-387.
- [4] 杨金峰, 商蕾, 董妥, 齐桂云, 王迎晨, 高虹, 刘振卫, 于惠崧, 郭微媛, 曲章义. 人7型腺病毒的分离与鉴定[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2014(5): 353-357.
- [5] 宁莉莉, 孙颖, 齐桂云, 黄冬娟, 韩珊珊, 王迎晨, 曲章义. 呼吸道感染人腺病毒的分离及鉴定[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2012(4): 329-331.
- [6] 袁晓辉, 曲章义, 王迎晨, 陈晶. 通用引物 PCR 研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2008(6): 522-524.
- [7] 陈晶, 曲章义, 魏凤香, 等. 人呼吸道腺病毒通用特异检测试剂的研究及应用[J]. 中华地方病学杂志, 2008, 27(6): 686-690.
- [8] Morozumi, M., Shimizu, H., Matsushima, Y., *et al.* (2014) Evaluation of New Immunochromatographic Assay Kit for Adenovirus Detection in Throat Swab: Comparison with Culture and Real-Time PCR Results. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, **20**, 303-306.
<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.01.005>
- [9] Jones, M.S., Hudson, N.R., Gibbins, C. and Fischer, S.L. (2011) Evaluation of Type-Specific Realtime PCR Assays Using the Light Cycler and J.B.A.I.D.S. for Detection of Adenoviruses in Species HAdV-C. *PLOS ONE*, **6**, Article ID: e26862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026862>
- [10] Feeney, S.A., Armstrong, V.J., Mitchell, S.J., Crawford, L., McCaughey, C. and Coyle, P.V. (2011) Development and Clinical Validation of Multiplex TaqMan Assays for Rapid Diagnosis of Viral Gastroenteritis. *Journal of Medical Virology*, **83**, Article ID: e16506. <https://doi.org/10.1002/jmv.22162>
- [11] Liu, P., Herzegh, O., Fernandez, M., Hooper, S., Shu, W., Sobolik, J., *et al.* (2013) Assessment of Human Adenovirus Removal by qPCR in an Advanced Water Reclamation Plant in Georgia, USA. *Journal of Applied Microbiology*, **15**, Article ID: e3108.
- [12] Li, F., Zhao, L.Q., Deng, J., *et al.* (2013) Detecting Human Adenoviruses in Respiratory Samples Collected from Children with Acute Respiratory Infections by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Chinese Journal of Pediatrics*, **51**, 52-57.
- [13] Metzger-Boddien, C. (2005) Development and Evaluation of a Sensitive PCR-ELISA for Detection of Adenoviruses in Feces. *Intervirology*, **48**, 297-300. <https://doi.org/10.1159/000085098>
- [14] 邵芳, 王亚娟. 多重聚合酶链反应和反向线性点杂交技术在常见呼吸道病毒检测中的应用[J]. 山东医药, 2010, 50(52): 22-24.
- [15] Wang, Y.J., Kong, F.R., Yang, Y.H., *et al.* (2008) A Multiplex PCR-Based Reverse Line Blot Hybridization (mPCR/RLB) Assay for Detection of Bacterial Respiratory Pathogens in Children with Pneumonia. *Pediatric Pulmonology*, **43**, 150-159.
- [16] O'Sullivan, M.V.N., Zhou, F., Vitali, S., *et al.* (2011) Multiplex PCR and Reverse Line Blot Hybridization Assay (mPCR/RLB). *Journal of Visualized Experiments*, **54**, e2781-e2781. <https://doi.org/10.3791/2781>
- [17] Johnson, D., Wolk, D., Ray, J., *et al.* (2008) Evaluation of a Target-Enriched Multiplex-PCR for Detection of Common Respiratory Viruses. Infectious Diseases Society of America, Arlington.
- [18] Reijans, M., Dingemans, G., Klaassen, C.H., Meis, J.F., Keijden-er, J., Mulders, B., Eadie, K., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Horrevorts, A.M. and Simons, G. (2008) RespiFinder: A New Multi-Parameter Test to Differentially. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**, 1232-1240. <https://doi.org/10.1128/JCM.02294-07>
- [19] Lucia, B., Stephan, A.W., Benedikt, S., *et al.* (2014) Evaluation of a Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay for the Detection of Respiratory Pathogens in Oncological Patients. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, **60**, 141-146.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.02.010>
- [20] 崔鹤馨, 田明尧, 姜庆利, 袁森, 田宇飞, 李沂, 刘昊, 靖杰, 阎富龙, 金宁一, 朱光泽. 3种常见呼吸道病毒检测基因芯片的制备[J]. 中国病原生物学杂志, 2013(2): 115-119.
- [21] 石伟先, 申红卫, 李爱华, 王全意, 黄芳. 应用再测序芯片技术调查北京地区社区获得性肺炎中呼吸道病毒流行情况[J]. 中国卫生检验杂志, 2015(14): 2319-2321.

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：amb@hanspub.org