

· 基础研究 ·

流感病毒 RNA 在 RNA 抽提试剂裂解缓冲液中的稳定性

朱远峰[△], 刘洪波[△], 吴衍恒

中山市疾病预防控制中心, 广东 中山 528403

摘要: **目的** 评价 RNA 抽提试剂的裂解缓冲液(lysis buffer, LB)对流感病毒(influenza virus, Flu-V)RNA 的稳定作用。**方法** 将流感病毒临床分离株 A/Zhongshan/085/2009(H1N1)进行 10⁻² 稀释,加入 RNA 抽提试剂的 LB 后,分别置 4 和 -20 °C 保存 7、15、30 和 45 d,以未经 LB 处理的 Flu-V 稀释物作为对照。提取各样品核酸后,分别采用实时 RT-PCR(靶序列长 105 bp)和普通 RT-PCR(扩增子长 527 bp)进行检测。**结果** 经 LB 处理的样品,在 4 和 -20 °C 保存 45 d,均能检测到特异性扩增信号;在 4 °C 保存 30 d, -20 °C 保存 45 d,均可用于较长核酸片段的扩增分析。而未经 LB 处理的样品,在 -20 °C 也可稳定 45 d,用于该两种 RT-PCR 的检测,但在 4 °C 仅 7 d 时能检测到 527 bp 的靶序列,30 d 时,两种 RT-PCR 方法均未检测到靶序列。**结论** LB 可延缓流感病毒 RNA 的降解,具有用作流感病毒核酸检测样品稳定剂的潜能。

关键词: 流感病毒;核糖核酸;稳定性

中图分类号: R373.1+3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2014)10-1272-03

Stability of influenza virus RNA in lysis buffer of RNA extraction reagent

ZHU Yuan-feng, LIU Hong-bo, WU Yan-heng

Zhongshan Center for Disease Control and Prevention, Zhongshan 528403, Guangdong Province, China

Corresponding author: LIU Hong-bo, E-mail: flood.001@163.com

Abstract: **Objective** To evaluate the ability of lysis buffer (LB) of RNA extraction reagent in stabilizing influenza virus (Flu-V) RNA. **Methods** Clinical isolate A/Zhongshan/085/2009 (H1N1) of Flu-V was diluted to a dilution of 10⁻², then mixed well with LB of RNA extraction reagent, and stored at 4 and -20 °C for 7, 15, 30 and 45 d separately, using the diluted Flu-V untreated with LB as a control. RNA was extracted from each sample, and its quality was evaluated by both real-time RT-PCR targeting a 105 bp sequence and conventional RT-PCR targeting a 527 bp sequence. **Results** Specific amplification signal was detectable in the LB-treated samples after storage at 4 and -20 °C for 45 d. Both the samples stored at 4 °C for 30 d and those at -20 °C for 45 d were suitable for the amplification of long RNA fragments. The Flu-V suspension untreated with the LB after storage at -20 °C for 45 d was also stable for detection by the two RT-PCR assays. However, only the target sequence at a length of 527 bp was detected in the samples after storage at 4 °C for 7 d, while no target sequence was detected in those after storage for 30 d by two RT-PCR assays. **Conclusion** LB delays the degradation of Flu-V RNA, thus has a potential to be used as RNA stabilizer of influenza virus samples.

Key words: Influenza virus; RNA; Stability

核酸技术已广泛用于流感病毒的鉴定分析^[1],然而,待检标本的储存和运输条件不当可导致病毒 RNA 的降解^[2-3]。由于基层和偏远地区很难保证超低温或液氮等储存、运输条件,从而降低了核酸技术在流感监测和诊断中的效用。

商业化 RNA 稳定试剂如 RNAlater 能较好地

保护流感病毒 RNA 的完整性^[2,4]。但其应用存在诸多缺点:需要额外的程序和费用来处理样品;可能和下游的核酸抽提方法不兼容^[4];经处理的病毒的感染性仍然存在,增加了生物危害风险^[5]。因此,需要开发一种简单、安全、有效的核酸稳定方法。

RNA 提取试剂的裂解缓冲液(lysis buffer, LB)中,通常含有变性大分子的胍盐及其他抑制或灭活 RNA 酶的化学物质,可以在 RNA 提取过程中保护 RNA。在本实验中,我们观察了一种传统 RNA 提取

基金项目: 中山市卫生局医学科研立项课题(J2011107);国家科技重大专项(2012ZX10004213)资助。

通讯作者: 刘洪波, E-mail: flood.001@163.com

[△]: 共享第一作者

方法的 LB 在 4 和 -20 °C 条件下对流感病毒 (influenza virus, Flu-V) 核酸的稳定效果, 以评价核酸提取试剂的 LB 用作流感病毒 RNA 稳定剂的可能性。

1 材料与方 法

1.1 毒株 流感病毒临床分离株 A / Zhongshan / 085 / 2009 (H1N1), 滴度为 $10^{2.8}$ TCID₅₀ / ml, 由本中心病毒实验室保存。

1.2 主要试剂及仪器 培养用牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、青-链霉素溶液、羟乙基哌嗪乙硫磺酸 (hydroxyethylpiperazine ethane sulfonic acid, HEPES) 及杜氏改良培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 均为美国 Invitrogen 公司产品; RNA 抽提试剂 (改良异硫氰酸胍法) 为广州华银公司产品; Superscript III Platinum One-step qRT-PCR Kit 为美国 Invitrogen 公司产品; 7500 Fast 实时 PCR 系统为美国 ABI 公司产品; QIAGEN One Step RT-PCR kit 为德国 QIAGEN 公司产品。

1.3 病毒处理及保存 用病毒运输液 (含 0.2% BSA, 100 U / ml 青霉素, 100 μg / ml 链霉素, 25 mmol / L HEPES 的 DMEM 溶液) 将流感病毒临床分离株 A / Zhongshan / 085 / 2009 (H1N1) 进行 10^{-2} 稀释后, 100 μl / 管分装至 1.5 ml 微量离心管中, 每管加入 400 μl RNA 抽提试剂的 LB, 颠倒混匀 10 次, 室温放置 3 min 后, 分别置 4 和 -20 °C 保存 7、15、30 和 45 d, 以未经 LB 处理的样品作为对照。分别于各时间点取 2 个平行样置 -70 °C 保存。

1.4 病毒 RNA 提取 按照 RNA 抽提试剂说明书提取各样品中的流感病毒 RNA。

1.5 实时 RT-PCR 检测 利用 Superscript III Platinum One-step qRT-PCR Kit 和美国 CDC 开发的甲型流感病毒通用引物 / 探针和方法^[6], 用 7500 Fast 实时 PCR 系统对各样品进行荧光 PCR 分析 (靶序列长 105 bp)。循环阈值 (threshold cycle, CT) 指示 RNA

的相对量, 低于阈值线或高于临界值 (40) 定义为未检测到靶核酸序列。

1.6 普通 RT-PCR 检测 采用 QIAGEN One Step RT-PCR Kit, 用 H1N1 亚型通用引物 F1147 (5'-AAG AGC ACA CAT AAT GCC AT-3') 和 R1673 (5'-CCA TTR GAR CAC ATC CAG-3') 对各样品进行特异性扩增 (扩增子长 527 bp), 观察长片段病毒 RNA 序列的可获得性。该引物对、扩增反应体系及条件均由中国 CDC 推荐^[7]。取 8 μl 扩增产物, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.7 PCR 质量控制 为防止交叉污染, 核酸提取、PCR 反应液制备、PCR 扩增以及扩增后的产物分析等程序, 均在各自分隔的实验室区间内完成; 同时, 每次 PCR 扩增均设置一弱阳性对照和多个阴性对照, 监测 PCR 反应及污染; 每一核酸样本均平行双孔检测, 不一致和可疑结果需重复检测。

2 结 果

2.1 实时 RT-PCR 检测结果显示: 经 LB 处理的样品, 4 和 -20 °C 保存 45 d, 均能检测到特异性扩增信号; 以 -70 °C 保存样品的 CT 值为基值 (32.1), LB 处理的样品在 4 °C 保存 45 d 内, CT 值增加 0.7 ~ 2.5 个循环, 在 -20 °C 保存 30 d 内, CT 值增加 0.4 ~ 2.6 个循环。而未经 LB 处理的样品, 4 °C 保存 15 d, CT 值增加 2.6 个循环, 保存 30 d, 未能检测到靶序列; -20 °C 保存 45 d, 仍能检测到靶序列, CT 值增加 3.4 个循环。见表 1。

2.2 普通 RT-PCR 检测结果显示: 经 LB 处理的样品在 4 °C 至少可稳定 30 d, -20 °C 至少可稳定 45 d 用于较长核酸片段的扩增分析; 而未经 LB 处理的样品, 在 -20 °C 45 d 也可检测到 527 bp 的靶序列; 在 4 °C 7 d 时能检测到长的靶序列片段, 15 d 时, 2 个平行样的长片段扩增结果为一个弱阳性和一个阴性。见表 1。

表 1 流感病毒 RNA 在裂解缓冲液和病毒运输液中的稳定性

Tab 1. Stabilities of influenza virus RNA in LB and viral transport medium

分析方法	保存溶液	保存时间(d)							
		4 °C				-20 °C			
		7	15	30	45	7	15	30	45
实时 RT-PCR	LB	32.8 ^a	33.1	33.3	34.6	33.3	33.2	32.5	34.7
	病毒运输液	33.0	4.7	Neg	Neg	33.1	33.8	34.4	35.5
普通 RT-PCR	LB	+ / +	+ / +	± / +	± / -	+ / +	+ / +	+ / +	± / +
	病毒运输液	+ / +	± / -	- / -	- / -	+ / +	+ / +	± / +	+ / ±

注: a 表示实时 RT-PCR 检测 2 个平行样获得的 CT 均值; Neg 表示阴性; “/”左右分别为普通 RT-PCR 测定的 2 个平行样结果, “+”表示阳性, “±”表示弱阳性, “-”表示阴性。

3 讨论

我们在前期实验中,以广州华银公司的 RNA 提取试剂提取分离株 A/Zhongshan/085/2009(H1N1) 核酸,本实验采用的两种 PCR 方法的检出限均位于该分离株的 10^{-2} 和 10^{-3} 稀释度之间,因此,采用近临界的病毒滴度(10^{-2} 稀释度)进行病毒核酸稳定实验,以便能灵敏地反应病毒核酸质量的变化。另外,实时 RT-PCR 的靶序列通常小于 150 bp,可容忍 RNA 分子的部分降解^[8],而扩增子越长对 RNA 质量要求越高^[9],因此,本研究不仅采用了实时 RT-PCR,还采用了扩增长片段的普通 RT-PCR 来分析 RNA 的质量。病毒样品稳定性试验结果发现:在普通冰箱即能提供的温度条件下,LB 保存方法可延缓流感病毒 RNA 的降解;经 LB 处理后的流感病毒在 4 °C 时至少可稳定 30 d, -20 °C 时至少可稳定 45 d 用于包括较长核酸片段(527 bp)的扩增分析。由于我国流感网络实验室使用的流感病毒鉴定和分型引物的靶序列长度均 ≤ 527 bp^[7,10],而 30 d 也完全能满足样本的长距离运送和各种可能的时间耽搁,也使一些回顾性研究分析成为可能。因此,我们认为 LB 具有用作流感病毒核酸检测样品稳定剂的潜能。另外,通常认为流感病毒在 -20 °C 时比 4 °C 更容易丧失活力,因此要求流感病毒样品勿置 -20 °C 保存^[7]。然而本实验结果发现:经或不经 LB 处理的流感病毒样品的病毒核酸在 -20 °C 比 4 °C 更稳定。这可能与 RNA 酶在低温条件下活性更低有关。因此,在缺乏超低温储存条件的情况下,建议用于流感病毒核酸检测的样品应置于 -20 °C 保存。

尽管 PCR 基于的核酸测定已成为流感监测和诊断的首选方法,但由于流感病毒的抗原分析及疫苗生产等需要,流感病毒分离培养目前仍然不可替代^[1]。而流感病毒经 LB 处理后将失去活性^[11],因此,以 LB 溶液保存流感样病毒样本目前尚不能完全取代原有的样本储存和运输方法。另外,流感病毒临床样本(各种呼吸道样本、人和禽排泄物等)可能比病毒培养物含有更丰富的 RNA 酶,从而可加速 RNA 的降解。因此,将 LB 溶液用作其他流感病毒核酸检测样品稳定剂前,尚需进一步评价。

参考文献

[1] Wang R, Taubenberger JK. Methods for molecular surveillance

of influenza [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2010, 8 (5): 517-527.

- [2] Forster JL, Harkin VB, Graham DA, *et al*. The effect of sample type, temperature and RNAlater on the stability of avian influenza virus RNA [J]. *J Virol Methods*, 2008, 149 (1): 190-194.
- [3] Frisbie B, Tang YW, Griffin M, *et al*. Surveillance of childhood influenza virus infection: what is the best diagnostic method to use for archival samples[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42 (3): 1181-1184.
- [4] Evers DL, Slemons RD, Taubenberger JK. Effect of preservative on recoverable RT-PCR amplicon length from influenza A virus in bird feces [J]. *Avian Dis*, 2007, 51 (4): 965-968.
- [5] Uhlenhaut C, Kracht M. Viral infectivity is maintained by an RNA protection buffer [J]. *J Virol Methods*, 2005, 128 (1-2): 189-191.
- [6] WHO. CDC protocol of realtime RT-PCR for influenza A (H1N1) [EB/OL]. (2009-10-06) [2012-05-12]. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol_20090428.pdf.
- [7] National Institute for Viral Disease Control and Prevention. Primer set and protocol for detection of influenza virus using RT-PCR [P/OL]: China, 200910085476. 9. 2009-10-21. 中国疾病预防控制中心病毒预防控制所. 流感病毒 RT-PCR 检测引物及检测流感病毒的方法 [P/OL]: 中国, 200910085476. 9. 2009-10-21.
- [8] Schoor O, Weinschenk T, Hennenlotter J, *et al*. Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA [J]. *Biotechniques*, 2003, 35 (6): 1192-1196, 1198-1201.
- [9] Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance [J]. *Mol Aspects Med*, 2006, 27 (2-3): 126-139.
- [10] National Institute For Viral Disease Control and Prevention. National Influenza Center Standard Operating Procedure (Revised Edition). [EB/OL]. (2007-03-19) [2012-2-10]. <http://www.cnic.org.cn/chn/down/showdown.php?downid=46>. 中国疾病预防控制中心病毒预防控制所. 国家流感中心标准操作规程(修订版). [EB/OL]. (2007-03-19) [2012-2-10]. <http://www.cnic.org.cn/chn/down/showdown.php?downid=46>.
- [11] Liu HB, Wu YH, Zhu YF, *et al*. Evaluation of effect of two viral RNA extraction reagents on the capability of inactivating influenza A virus [J]. *China Trop Med*, 2011, 11 (7): 812-814. (in Chinese) 刘洪波, 吴衍恒, 朱远峰, 等. 病毒 RNA 提取试剂对甲型流感病毒的灭活效果 [J]. *中国热带医学*, 2011, 11(7): 812-814.