

罗氏 HIV-1 定量检测引物 SK145 和 SKCC1B 的评估及优化

樊路娟^{1,2}, 张春霞¹, 徐庆刚¹, 张驰宇^{1,2}

(1. 江苏大学生命科学研究院, 江苏 镇江 212013; 2. 中国科学院上海巴斯德研究所, 上海 200025)

[摘要] 目的: 评估罗氏 HIV-1 检测系统中引物 SK145 和 SKCC1B 对不同亚型 HIV-1 病毒定量检测的广谱性及准确性, 并在此基础上对该引物进行优化。方法: 下载并分析 5 个主要 HIV-1 流行亚型(B、C、A、01_AE、D) 在引物 SK145 和 SKCC1B 扩增区段的对应序列, 从各亚型筛选出所占比例最高的 5 条序列构建定量标准品。用梯度稀释的 HIV-1 各亚型标准品来评估引物 SK145 和 SKCC1B 的扩增效率。为改善引物 SK145 和 SKCC1B 对 HIV-1 不同亚型扩增的准确性和广谱性, 我们重新设计了一对简并引物并分析其对不同亚型病毒的扩增效果。结果: 引物 SK145、SKCC1B 对于 B 亚型病毒的扩增效果最好, 而对非 B 亚型病毒的扩增效果并不理想, 简并引物能显著改善对各亚型 HIV-1 病毒扩增的效果。结论: 罗氏引物 SK145 和 SKCC1B 不适用于非 B 亚型 HIV-1 病毒载量的定量检测, 而优化设计的简并引物能改善对各亚型 HIV-1 病毒的扩增效率, 因而可用于中国等 HIV-1 多亚型共流行国家的 HIV-1 病毒载量检测。

[关键词] 人类免疫缺陷病毒 1 型; 实时荧光定量 PCR; SK145; SKCC1B

[中图分类号] R512.91

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-7783(2014)01-0026-05

DOI: 10.13312/j.issn.1671-7783.y130207

Assessment and optimization of Roche SK145 and SKCC1B primers for quantification of human immunodeficiency virus type 1

FAN Lu-juan^{1,2}, ZHANG Chun-xia¹, XU Qing-gang¹, ZHANG Chi-yu^{1,2}

(1. Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu 212013; 2. Institute Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China)

[Abstract] Objective: To assess and optimise applicability and accuracy of primers SK145 and SKCC1B for different HIV-1 subtypes in viral load quantification assay. **Methods:** We downloaded and analyzed genomic sequences of five main HIV-1 subtypes (B, C, A, 01_AE, D) with the primers SK145 and SKCC1B target. The top five dominant sequences were selected from each subtype sequences for the construction of quantification standards. We evaluated amplification efficiency of primers SK145 and SKCC1B for serially diluted standards of each HIV-1 subtype. To improve the amplified spectrum primers SK145 and SKCC1B for different HIV-1 subtypes, re-designed this primer pair into degenerate primers according to the top dominant sequences of different HIV-1 subtypes. **Results:** The amplification efficiency of primers SK145 and SKCC1B was best on quantification HIV-1 subtype B, but not ideal for the non-B subtypes, indicating that primers SK145 and SKCC1B were not able to quantify accurately the viral load of non-B HIV-1 subtypes. When the degenerate primers were used, we obtained relatively consistent amplification efficiency for various HIV-1 subtypes. **Conclusion:** Roche SK145 and SKCC1B primers were unsuitable for viral RNA quantification of HIV-1 non-B subtypes. Compared to Roche SK145 and SKCC1B primers, the optimized degenerate primers can efficiently amplify various HIV-1 subtypes, suggesting that they can be used for HIV-1 viral load assay in China and other countries where various HIV-1 subtypes are co-circulating.

[Key words] human immunodeficiency virus type 1; real-time PCR; SK145; SKCC1B

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81071391)

[作者简介] 樊路娟(1988—),女,硕士研究生;张驰宇(通讯作者),研究员,博士,E-mail: zhangcy1999@ips.ac.cn

人类免疫缺陷病毒 1 型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 是导致全球艾滋病 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 流行的主要病原体。HIV-1 的遗传异质性是影响病毒载量定量可靠性的一个重要因素,而所有的核酸扩增或信号扩增技术都依赖于 HIV-1 序列特异性的引物和 (或) 探针,引物(探针)结合区的核苷酸不匹配会干扰杂交从而影响定量结果的可靠性。

罗氏分子系统 (Roche Molecular Systems) 的 HIV-1 病毒载量检测技术中,AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test version 1.5 和 COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test version 1.5 都获得美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 认证,是临床监控正在进行抗病毒治疗 HIV-1 患者病毒载量的金标准^[1-2]。这两种检测方法使用相同的引物 SK145、SKCC1B,得到 155 bp 的扩增产物。

本实验目的在于评估引物 SK145、SKCC1B 对高度变异型病毒 HIV-1 定量检测的广谱性及准确性,并且在此基础上设计了一对广谱性更高、特异性更强的简并引物 de-F、de-R。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和载体 JM109 感受态细胞、pGH 载体 (上海捷瑞生物工程有限公司)。

1.1.2 主要试剂盒及试剂 柱式质粒 DNAout (北京天恩泽基因科技有限公司); *Sca* I 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; DNA 片段纯化试剂盒 (TaKaRa 公司); 快捷型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (离心柱型) II 型 (北京百泰克生物技术有限公司); 实时 PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.1.3 主要仪器 One Drop™ OD-4000 分光光度计 (南京五义科技有限公司)、Mx3000P/3005P 实时荧光定量 PCR 仪 (美国安捷伦公司)。

1.2 方法

1.2.1 序列筛选与合成 根据 HIV 数据库 (<http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/geo/geo.comp>) 中全球 HIV-1 序列分布情况,选取所占比例最高的 5 个亚型: B (58.2%), C (15.1%), A (7.5%), 01_AE (4.7%), D (3.7%)。这 5 个亚型的病毒占感染样本总比例的 89.2%, 可用来全面准确地评估引物 SK145、SKCC1B 对不同亚型 HIV-1 病毒的扩增效率。由于引物 SK145 (1359→1388)、

SKCC1B (1513→1486) 的扩增产物位于 HIV-1 基因组 1359 → 1513 区段,因此本实验从 HIV 数据库中下载这 5 个亚型病毒在 HIV 基因组 1359 → 1513 区段的所有序列,用 MEGA5 处理并经 DAMBE 比对后从各亚型分别筛选出占比例最高的 5 条序列,并统计数据。用 MEGA5 处理上述 25 条序列并删除上下游引物间区域 (1389→1485) 只保留上下游引物对应区序列,用 DAMBE 继续比对后得到 15 条独特序列。找到这 15 条序列所对应原始序列并在 1359→1513 区段前后各延伸 5 bp 得到长 165 bp (1354→1518) 的 15 条序列: A1, A3, A5, B1, B2, B4, C2, C4, D1, D3, D4, 01_AE1, 01_AE2, 01_AE4, 01_AE5。由上海捷瑞生物工程有限公司合成这 15 条序列并克隆到 pGH 载体。

1.2.2 简并引物设计和合成 处理并统计上述各亚型毒株在引物 SK145、SKCC1B 扩增区段 (1359→1513) 所占比例最高的 5 条序列 (5 个亚型 × 5 条), 分别只保留上游和下游引物对应区序列, 比对所得的 25 条上游 (1359→1388) 和下游 (1513→1486) 引物区对应序列, 并统计各一致序列条数, 根据上下游引物区序列比对结果并充分考虑 GC 含量、3'末端序列等因素后设计出上下游简并引物: de-F (AGTGGGGGACAYCARGCAGC)、de-R (TACTAGTAGTTCCTGCTATRTCCTTCC) 并由上海生工公司合成。

1.2.3 制备重组质粒 将克隆到 pGH 载体的重组质粒转化到 JM109 感受态细胞,挑单菌落扩大培养后用菌液 PCR 筛选阳性克隆,按照柱式质粒 DNAout 试剂盒的操作说明提取质粒。

1.2.4 *Sca* I 酶切质粒 pGH 载体上有一个 *Sca* I 酶切位点,可使环状质粒变为线性质粒。酶切体系: *Sca* I 2.5 μL, 10 × H 缓冲液 5 μL, 质粒 DNA ≤ 2.5 μg, 加灭菌水补足 50 μL 总体积, 37 °C 酶切 4 h 后, 取 4 μL 酶切反应液电泳观察其条带, 判断酶切是否完全。

1.2.5 纯化线性质粒 将所得线性质粒的酶切反应液按快捷型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (离心柱型) II 型操作说明进行纯化。

1.2.6 制备 15 个亚型线性质粒储存液 用超微量紫外分光光度计测纯化后线性质粒的纯度和浓度, 纯度要求 $D(260\text{ nm}) / D(280\text{ nm})$ 的值介于 1.8 ~ 2.0, 质粒拷贝数 (拷贝/mL) = $D(260\text{ nm}) \times 50\text{ }\mu\text{g/mL} \times 10^{-6} \times 6.02 \times 10^{23} / [650(\text{doltton/bp}) \times \text{碱基对数目}]$, 计算得到质粒浓度。用 pH 8.0 的 1 × TE 将各亚型线性质粒浓度调整到 10^9 拷贝/mL, 每管 100 μL 分装多管, -20 °C 储存备用。

1.2.7 评估引物 SK145、SKCC1B 对 15 个亚型线性质粒的扩增效率 用 pH 8.0 的 $1 \times \text{TE}$ 对 15 个亚型线性质粒的储存液(每次定量时各取出一管冰上融化)进行 10 倍梯度连续稀释,选取 1×10^8 拷贝/mL、 1×10^7 拷贝/mL 这两个梯度的稀释液为模板,SK145、SKCC1B 为上下游引物,B1 亚型线性质粒 $10^9 \sim 10^5$ copies/mL 的稀释液为标准品,进行 SYBR Green 荧光定量,各亚型各浓度梯度重复定量 3 次。冰上配置 PCR 体系(20 μL): SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 10.0 μL , SK145(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , SKCC1B(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , ROX 参比染料 0.4 μL , 质粒模板 2.0 μL , 灭菌蒸馏水 6.0 μL 。PCR 反应程序: 预变性 95 $^\circ\text{C}$ 30 s; 两步法扩增 95 $^\circ\text{C}$ 5 s 60 $^\circ\text{C}$ 34 s, 循环 40 次; 熔解曲线 95 $^\circ\text{C}$ 15 s, 60 $^\circ\text{C}$ 1 min, 每 30 s 升温 0.5 $^\circ\text{C}$, 循环 71 次后达 95 $^\circ\text{C}$ 95 $^\circ\text{C}$ 15 s。反应结束后系统自动生成标准曲线和熔解曲线,并给出各亚型线性质粒的拷贝数(即实验值)。计算荧光定量实验值/理论值的百分比,并汇总分析。

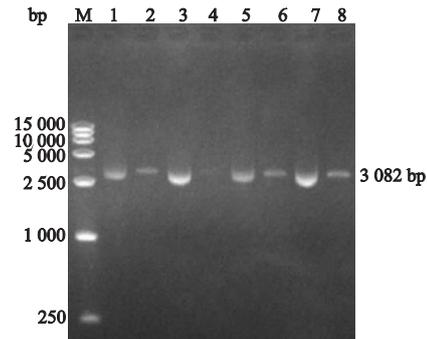
1.2.8 评估简并引物 de-F、de-R 对 15 个亚型线性质粒的扩增效率 以 de-F、de-R 为上下游引物,采用 SYBR Green 荧光定量(方法同 1.2.7)对 15 个亚型线性质粒的扩增效率进行评估。

2 结果

2.1 线性质粒的电泳结果

将各亚型的重组质粒单酶切并纯化后得线性质粒,电泳后得到 3 082 bp 的条带(图 1)和预期产物

结果一致。



M: DL 15000 DNA 标准参照物; 1、3、5、7: 环状重组质粒; 2、4、6、8: 线性重组质粒

图 1 线性质粒和环状质粒

2.2 B1 亚型线性质粒标准品的扩增曲线、标准曲线和熔解曲线结果

将梯度稀释的 B1 亚型线性质粒标准品($10^9 \sim 10^5$ 拷贝/mL)用荧光定量 PCR 重复测定 3 次,每次每个稀释度重复 3 管,荧光定量 PCR 结束后系统会自动生成扩增曲线、标准曲线和熔解曲线,见图 2。如图所示各梯度扩增曲线间隔分布均匀,且标准曲线的相关系数 $R^2 = 0.997$,说明线性质粒在此稀释范围内有良好的线性关系。回归方程: $Y = -3.490 \times \text{Log}(X) + 39.25$,扩增效率为 93.4%,说明反应体系及反应条件适宜且扩增效率较高。熔解曲线结果为单峰,产物 T_m 值(熔解温度)一致(均为 85 $^\circ\text{C}$),说明引物特异性强,无非特异性扩增。

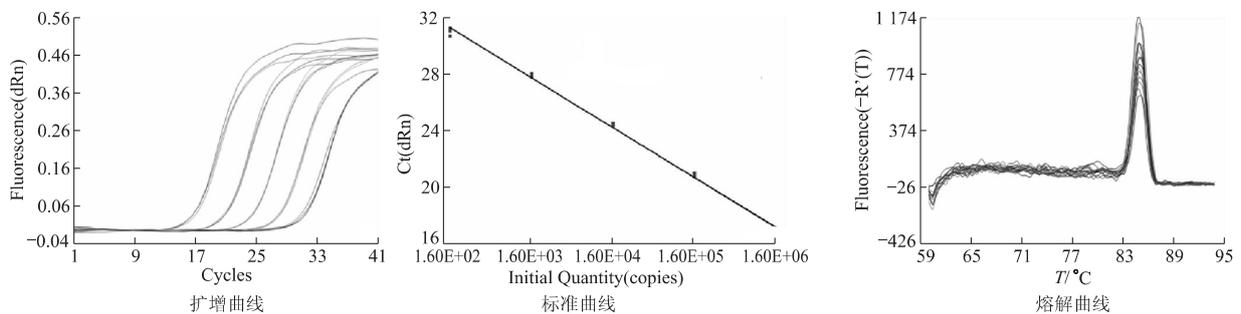


图 2 扩增曲线、标准曲线和熔解曲线

2.3 简并引物设计

各亚型毒株分别在引物 SK145(1359→1388)、SKCC1B(1359→1513)对应区域所占比例最高的 5 条序列(5 个亚型 \times 5 条),汇总结果如图 3 所示。分别比对这 25 条上游和下游引物对应区序列,并统

计各一致序列条数,结果见图 3。

在充分考虑上述 5 种流行亚型序列特征的基础上设计简并引物,其序列如下: de-F: AGTGGGGG-GACAYCARGCAGC, de-R: TACTAGTAGTTCCTGC-TATRTCACTTCC。

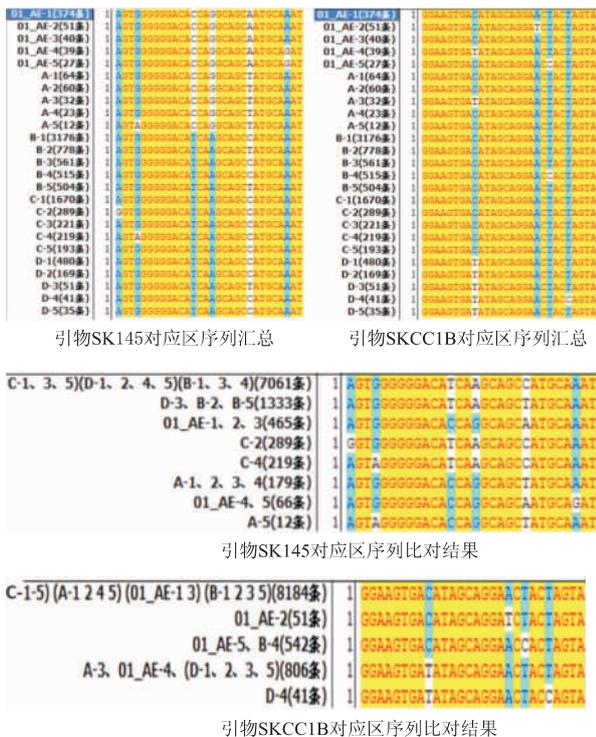


图 3 引物 SK145、SKCC1B 对应区序列比对及简并引物设计

2.4 各引物对 15 个亚型基因片段定量的可靠性比较

分别以 SK145、SKCC1B 和简并引物 de-F、de-R 为上下游引物,对 15 个亚型基因片段的标准品 (1×10^8 拷贝/mL、 1×10^7 拷贝/mL) 进行 SYBR Green 实时定量,计算所得实验值/理论值,各亚型各浓度分别重复定量 3 次,将实验值/理论值的数据汇总并计算平均值与标准差(图 5),结果显示引物 SK145、SKCC1B 对于 B 亚型的扩增最为有效,而对其他亚型的扩增效果则不太理想(对 A、C、D、01_AE 亚型病毒的扩增效率分别为 25.3%、44.39%、42.43%、35.9%),这可能造成在对非 B 亚型 HIV-1 病毒定量时低估其病毒载量。使用简并引物 de-F、de-R 后,除少部分 D 亚型和 01_AE 亚型的线性质粒外,其余大部分亚型的线性质粒扩增效果都有显著改善(对 A、C、D、01_AE 这 4 个亚型病毒的扩增效率分别提高到 31.58%、58.41%、47.82%、43.12%),说明所设计的简并引物对各亚型 HIV-1 病毒的扩增效果比引物 SK145、SKCC1B 更好,用于病毒载量测定也会使定量结果更加准确可靠。

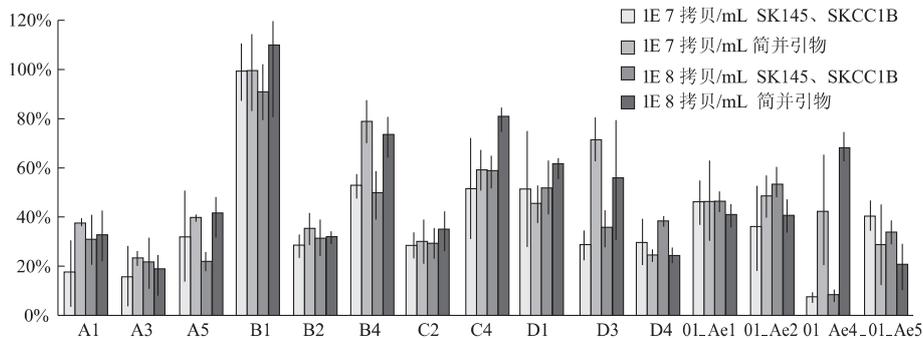


图 5 两对引物对 15 个亚型基因片段扩增效果的比较

3 讨论

血浆病毒载量对于疾病恶化的预测以及治疗药物和疫苗潜能的评估至关重要,并且血浆中 HIV RNA 的定量已经成为 HIV-1 感染者预后以及监控抗病毒治疗效果的主要工具^[3-4],也是治疗方案的一大重要组成部分^[5]。HIV-1 亚型间的遗传变异以及同一 HIV 亚型内的极端变异显著影响了临床样本中病毒 RNA 的检测和定量能力,而 HIV-1 血浆病毒血症无论是假阴性还是过低定量甚至是过高定量都可能对患者的治疗产生严重影响。目前现有的 HIV-1 病毒载量检测技术能够对 HIV-1 病毒载量进行较好的定量,罗氏分子系统的 AMPLICOR[®] HIV-1

MONITOR Test version 1.5 和 COBAS[®] AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test version 1.5 更成为定量的金标准。

比较对这两种诊断方法进行评估的国内外研究结果,发现他们大多采用对一定数量临床样品进行定量,然后比较这两种方法所得定量结果与其他商业化检测方法定量结果之间的一致性和相关性的策略。该评估策略不够系统和全面,其缺陷主要有两个方面,首先所用临床样品不能涵盖大多数流行亚型,且样品量不够丰富;其次,虽与其他检测方法进行了比较,但是并没有与样品中真正所含病毒载量进行比较,因而无法判断其定量结果的准确可靠性。

为解决上述问题,本实验精心设计实验方案并

全面搜集数据,对 AMPLICOR[®] HIV-1 MONITOR Test version 1.5 和 COBAS[®] AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test version 1.5 中所使用的引物 SK145、SKCC1B 进行了全面而系统的评估,结果发现该对引物对 B 亚型病毒的扩增最为有效,而对其他亚型病毒的扩增效果并不理想,尤其是对 A 亚型病毒的定量结果显著偏低。为改善引物的扩增效果,我们在原引物的基础上设计了一对简并引物 de-F、de-R。使用简并引物后,除少部分 D 亚型和 01_AE 亚型的质粒标准品外,其余大部分亚型的扩增效果都有显著改善。

由于罗氏 HIV-1 检测系统中的引物 SK145 和 SKCC1B 只对 B 亚型毒株有良好的扩增效果,因而适用于北美洲(B 亚型流行比例为 98.0%)、中美洲(B 亚型流行比例为 99.6%)等 B 亚型毒株盛行区域的 HIV-1 病毒载量检测,但是对于中国(B 亚型 31.3%、07_BC 占 28.3%、01_AE 占 23.5%)等 HIV-1 多亚型共流行国家的 HIV-1 病毒载量检测则不够适用。我们优化设计的简并引物对各亚型毒株的扩增效率都有显著改善,可用于中国等 HIV-1 多亚型共流行国家的 HIV-1 病毒载量的检测。然而由于 HIV-1 病毒的高度变异性,我们所设计的简并引物并不能改善所有亚型的扩增效率,还需要继续寻找更加保守的区段、采用更为缜密的方法来设计更

为理想的引物与探针,以进一步改善 HIV-1 定量检测方法的准确度和广谱性。

[参考文献]

- [1] Cobb BR, Vaks JE, Do T, et al. Evolution in the sensitivity of quantitative HIV-1 viral load tests [J]. *J Clin Virol*, 2011, 52 (Suppl 1): S77 - S82.
- [2] Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, et al. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41 (10): 4531 - 4536.
- [3] Triques K, Coste J, Perret JL, et al. Efficiencies of four versions of the AMPLICOR HIV-1 MONITOR test for quantification of different subtypes of human immunodeficiency virus type 1 [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37 (1): 110 - 116.
- [4] Luft LM, Gill MJ, Church DL. HIV-1 viral diversity and its implications for viral load testing: review of current platforms [J]. *Int J Infect Dis*, 2011, 15 (10): e661 - e670.
- [5] Skidmore SJ, Zuckerman M, Parry JV. Accuracy of plasma HIV RNA quantification: a multicentre study of variability [J]. *J Med Virol*, 2000, 61 (4): 417 - 422.

[收稿日期] 2013-09-16 [编辑] 何承志

(上接第 25 页)

- [6] Kaufman BA, Durisic N, Mativetsky JM, et al. The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18 (9): 3225 - 3236.
- [7] 孙青菊,朱克学,王学敏. 线粒体与衰老相关研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2005, 25 (9): 1135 - 1136.
- [8] Doria E, Buonocore D, Focarelli A, et al. Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 830257.
- [9] 孙飞,周强军,孙吉,等. 线粒体呼吸链膜蛋白复合体的结构 [J]. *生命科学*, 2008, 20 (4): 566 - 578.
- [10] Peterson CM, Johannsen DL, Ravussin E. Skeletal muscle mitochondria and aging: a review [J]. *J Aging Res*, 2012, 2012: 194821.
- [11] Johannsen DL, Conley KE, Bajpeyi S, et al. Ectopic lipid accumulation and reduced glucose tolerance in elderly adults are accompanied by altered skeletal muscle mitochondrial activity [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97 (1): 242 - 250.
- [12] Lee SM, Dho SH, Ju SK, et al. Cytosolic malate dehydrogenase regulates senescence in human fibroblasts [J]. *Biogerontology*, 2012, 13 (5): 525 - 536.
- [13] Schulz N, Himmelbauer H, Rath M, et al. Role of medium- and short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in the regulation of body weight and thermogenesis [J]. *Endocrinology*, 2011, 152 (12): 4641 - 4651.

[收稿日期] 2013-11-27 [编辑] 刘星星