



呼吸道合胞病毒（RSV）特性鉴定实 验室规程手册

2026年10月

欧洲疾病预防控制中心运营支持

呼吸道合胞病毒（RSV）特性鉴定实验室规程手册

000000



本报告由欧洲疾病预防控制中心委托，作为工作包3“诊断和病毒特征化支持”的一部分，属于框架合同ECDC/2022/001下的具体合同23（“支持欧盟/欧洲经济区、西巴尔干和土耳其的微生物学相关活动与能力建设，重点聚焦COVID-19和流感。实验室支持、培训和标准化——NP/2021/DPR/25121” - RS/2025/DPR/250629）。该报告由Eeva Broberg协调，并由AURORAE联盟制作。

国家呼吸道病毒参考中心（法国北部）和巴黎巴斯德研究所M3P单位的合著者：Olivier Leymarie、Yannis Rahou、Chloe Douheret和Marie-Anne Rameix-Welti

致谢

我们感谢整个AURORAE联盟以及Cyril Barbezange（欧洲疾病预防控制中心）的支持。我们还要感谢世界卫生组织提供了流感RT-qPCR原引物列表。最后，我们感谢FMC生物聚合物公司慷慨捐赠的AVICEL。

免责声明 本手册不包含对任何特定商业产品的评估、推荐或认可；然而，所使用的方案中试剂的可能制造商已列出。如果保证具有同等质量，也可以使用其他制造商的试剂。如有必要，必须对方案进行验证。

建议引文：欧洲疾病预防控制中心. 呼吸道合胞病毒（RSV）特征鉴定的实验室规程手册. 斯德哥尔摩：ECDC；2026.

斯德哥尔摩，2026年10月

PDF ISBN 978-92-9498-935-2 doi: 10
. 2900/9028840 目录编号 TQ-01-26-08
0-EN-N

© 欧洲疾病预防控制中心，2026年

经许可转载，但须注明出处。

内容

缩写	iv
1 引言	1
1.1 疾病概述	1
1.1 病毒学	1
1.1.1 预防措施	2
2 方法	2
3 实验室方案	3
3.1 生物安全	4
3.2 常用实验室设备和耗材	4
3.3 呼吸道合胞病毒（RSV）的分子检测与测序	4
3.3.1 RSV RT-qPCR	4
3.3.2 RSV测序	7
3.3.3 细胞培养	14
3.3.4 病毒库的制备	17
3.3.5 RSV蚀斑测定	19
参考文献	23

数字

图1. 呼吸道合胞病毒基因组的组织示意图.....	1
图2. 可能样本结果的可视化展示.....	16

表格

表1. 用于检测RSV、甲型流感病毒和乙型流感病毒M基因的RT-qPCR反应混合物.....	5
表2. 用于检测RSV、甲型流感病毒和乙型流感病毒M基因的引物和RT-qPCR探针....	6

缩写

AURORAE	欧洲美国典型培养物收藏中心
ATCC	实验室支持
BSL	流感
cDNA	冠状病毒
CPE	生物安全级别
dNTP	补充DNA
dpi	细胞病变效应
DMEM	脱氧核糖核苷三磷酸
DMSO	感染后天数
dNTP	杜氏改良
EDTA	Eagle
EVAg	培养基
FBS	二甲基亚砷
Flu	脱氧核糖核苷三磷酸
g	乙二胺四乙酸
MEM	欧洲病毒档案
MOI	胎牛血清
NGS	流感病毒
PBS	G力
PCR	最小必需培养基
Pen/Strep	感染倍数
PFU	下一代测序
qRT-PCR	磷酸盐缓冲液
RNA	聚合酶链式反应
RSV	青霉素-链霉素
RT	凝集单位
RT-PCR	实时定量逆转录
TCID50	聚合酶链式反应
	核糖核酸
	呼吸道合胞病毒
	室温
	逆转录-聚合酶链式反应
	组织培养感染剂量

1 简介

针对呼吸道合胞病毒（RSV）的新疫苗和单克隆抗体，对于预防高风险感染人群（如婴儿和65岁及以上老年人）的严重疾病，标志着一种重大转变。持续进行表型和基因组监测对于检测融合前F蛋白表位的突变、监测单克隆抗体敏感性潜在的降低以及追踪RSV-A和RSV-B基因型替代的动态至关重要。即使是相对稳定的病毒，广泛的免疫压力也可能加速某些进化轨迹。因此，综合监测（临床、病毒学和抗原性）对于维持预防策略与流行病毒之间的最佳匹配至关重要。

本手册由欧洲疾病预防控制中心发布，旨在为欧盟/欧洲经济区（EU/EEA）的实验室专业人员提供关于呼吸道合胞病毒（RSV）常用实验室检测方案的全面概述。手册汇集了协调一致的方法，旨在支持各参与实验室对RSV生物学特性、分子进化和抗原特性的研究。本手册旨在支持在欧盟/欧洲经济区范围内应用一致的实验室检测方案。这有助于协调和比较不同实验室产生的数据和结果，从而加强RSV综合监测，并及时发现抗原特性和对单克隆抗体的敏感性变化。

本手册中介绍的实验室方法包括：

- 细胞培养流程；
- 从阳性临床标本中分离和扩增病毒，以制备标准化病毒库；
- 使用呼吸道合胞病毒（RSV）蚀斑滴定法进行感染性病毒定量；

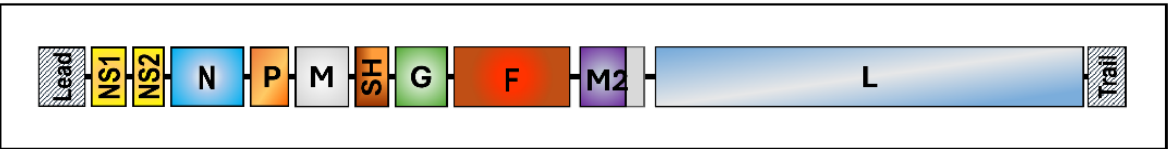
呼吸道合胞病毒（RSV）是一种普遍存在且高度传染性的呼吸道病原体，可引起季节性流行，尤其在温带地区。大多数RSV感染表现为类似普通感冒的上呼吸道症状。感染风险更高的人群——包括婴儿、65岁及以上的老年人以及患有慢性疾病（例如慢性阻塞性肺病、心力衰竭或免疫缺陷）的患者——更容易发展为疾病的严重形式[1]。在这些严重病例中，RSV的致病性可能源于病毒在呼吸道上皮直接复制造成的损伤，以及免疫反应的加剧。

全球范围内，每年有超过300万五岁以下儿童因RSV感染住院，并有12万例死亡[2, 3]。早产儿和婴儿感染后，可能引发急性细支气管炎或肺炎，其特征为气道阻塞、过多粘液产生和呼吸窘迫；此类感染可能需要住院或重症监护，甚至可能导致死亡。

1.1.1 病毒学

呼吸道合胞病毒（RSV）属于副黏病毒科。它是一种包膜病毒，具有负链单链RNA基因组（图1）。病毒基因组与核蛋白（N）紧密结合形成螺旋状核衣壳，该核衣壳与由磷酸蛋白（P）、大聚合酶蛋白（L）和M2-1蛋白组成的病毒复制复合物相关联。病毒包膜的内表面由基质蛋白（M）覆盖，并包含两种主要的跨膜糖蛋白：附着蛋白（G）和融合蛋白（F），以及第三种跨膜蛋白：小疏水蛋白（SH）。

图1. 呼吸道合胞病毒基因组的组织示意图



基因以彩色矩形表示，编码蛋白的名称已标明。比例尺仅供参考。复制起始区域的启动子被标记为“Lead”，终止区域被标记为“Trail”。

据认为，G蛋白通过与趋化因子CX3C受体1（CX3CR1）或硫酸软骨素蛋白聚糖的相互作用，负责呼吸道上皮细胞的初始粘附[4]。证据表明，F蛋白必须与其他细胞受体（如IGF1R和核糖核酸酶）相互作用，才能使病毒有效地结合到细胞表面[4]。病毒粘附后，F蛋白发生显著的构象变化，从融合前状态转变为融合后状态。这一过程暴露了F蛋白的融合肽，该肽插入质膜，从而引发病毒膜与细胞膜之间的融合以及病毒核衣壳进入细胞质。RSV感染随后诱导形成包涵体，也称为病毒工厂。这些是无膜细胞器，由病毒蛋白凝聚而成，其中发生病毒复制和转录[5]。新合成的病毒核糖核蛋白随后被转运到质膜，此前F、G和SH蛋白已被处理，出芽过程在此发生，产生能够启动新一轮感染周期的病毒颗粒。

人类呼吸道合胞病毒（RSV）分为两个主要抗原亚组，RSV-A和RSV-B。这两种亚组每年都在人类群体中共同流行，其主导程度因季节和地理区域而异[6, 7, 8]。在这些亚组中，不同的谱系会出现并持续共存很长时间，逐渐取代彼此。这一过程可能反映了受流行季节中人群免疫力和选择压力影响的进化动态。G蛋白表现出高度序列异质性，这可以改变病毒的抗原特性，并导致既往暴露后仍发生再感染[9]。相比之下，F蛋白高度保守，尽管偶尔发生的替换可能会影响其前融合构象的稳定性或影响其对中和抗体的敏感性。

1.1.2 预防

近年来，通过针对其前融合构象中的F蛋白的疫苗接种和被动免疫策略，在RSV预防方面取得了重大进展[10]。

预防婴儿重症RSV感染依赖于被动免疫，可通过母体疫苗接种或单次长效单克隆抗体注射实现。在孕期使用非佐剂双价疫苗（Abrysvo）进行母体免疫，已在多个欧盟/欧洲经济区（EU/EA）国家获得批准，通过胎盘抗体转移在婴儿出生后的最初几个月内为其提供被动保护。两种靶向融合蛋白 prefusion 形式的长效单克隆抗体（Nirsevimab 和 Clesrovimab）通过单次肌肉注射可提供整季保护。这相较于早期的单克隆抗体Palivizumab有显著改进，后者需要在RSV流行季每月给药，且主要限于感染风险高的婴儿。

已有三种RSV疫苗在欧盟/欧洲经济区获得许可，供成人使用。

- 一种佐剂单价疫苗，可诱导针对两种RSV亚型的交叉中和抗体（Arexvy）；
- 一种非佐剂二价疫苗（Abrysvo）；
- 以及• 一种基于mRNA的疫苗（mRESVIA）。

两种方法

本指南中介绍的方案是在法国北部国家呼吸道病毒参考中心（National Reference Centre for Respiratory Viruses）和巴斯德研究所（Institut Pasteur）的 Pneumoviruses 复制分子机制研究小组（M3P Unit）内部研发的。此处复制的版本对应于其实验室目前常规或研究使用的标准操作规程。

巴斯德研究所的RSV RT-qPCR方案已根据ISO 15189获得认证。

RSV测序方案最初由巴斯德研究所的埃蒂安·西蒙-洛里埃博士开发。最初的RSV扩增子面板可在网上获取（https://github.com/SimonLoriereLab/RSV_amplicons_panels），其改编自Quick等人，2017年[11]。该方案由法国北部呼吸道病毒国家参考中心及巴斯德研究所进行更新。

本手册中提供的检测板是使用2025年和2026年在欧洲流行的RSV阳性样本进行优化的。处理过去或未来年份的样本——或来自欧洲以外地区的样本——可能需要进一步调整。更新的检测板版本将在线提供（<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/tous-cnr/virus-infections-respiratoires-dont-grippe-sars-cov-2>）。

其他基于扩增子（amplicon）的协议是可用的，例如Talts等人[12]中描述的那一个。

呼吸道合胞病毒（RSV）扩增和滴定方案已根据 Boullier 等人 [13] 的方法进行修改。

3 实验室规程

3.1 生物安全

呼吸道合胞病毒（RSV）被归类为第2类风险物质，如欧盟指令2019/1833（修订EC指令2000/54号附件一、三、五和六）所述。因此，根据国家法规和监管机构的要求，必须在其下进行生物安全水平2（BSL-2）条件的培养。未感染的人II型上皮细胞（HEp-2）细胞的细胞培养同样需要BSL-2条件，如欧盟指令2000/54/EC [14]所述。

3.2 一般实验室设备和耗材

• 吸管、移液器吸头； • 1.5或2 mL微量离心管； • 15或50 mL离心管； • 烧瓶和细胞培养板； • 低温管； • 96孔RT-qPCR板（MicroAmp、EnduraPlate、Optical 96-Well Clear Reaction Plates、Applied BioSystems、A36924或同等产品）； • 96孔PCR板（Thermo Scientific，货号AB0900SS或同等产品）； • 无核酸酶水； • 无水乙醇； • PBS 1X（Gibco，149190-094）； • 胰蛋白酶-EDTA（0.05%或0.25%）（Gibco，25300062或25200056）； • MEM（1x）+ GlutaMAX™（Gibco，41090-028）； • 胎牛血清（FBS）； • 100 U/mL青霉素/100 µg/mL链霉素（Pen/Strep）（Gibco，15140148）； • 碳酸氢钠7.5%（Gibco，25080-060）； • 漂白剂； • 台式离心机； • PCR热循环仪，如VeritiPro热循环仪，96孔，Applied Biosystems或同等产品； • 实时PCR热循环仪，如QuantStudio 5（Thermo Fischer）或LightCycler 480 Instrument-II（Roche）； • 水浴锅； • 冷冻容器（Corning CoolCell Freezing Container或同等产品）； • 5%-CO₂细胞培养箱； • 细胞培养用显微镜； • 液氮气相储存罐。

所需的具体设备或试剂均列于相关规程的开头。

3.3 呼吸道合胞病毒（RSV）的分子检测与测序

3.3.1 RSV 实时荧光定量PCR

实时荧光定量PCR（RT-qPCR）可在从临床样本（鼻咽拭子、唾液或支气管肺泡灌洗液）、感染细胞培养物或病毒悬液中提取的病毒RNA上进行，用于诊断或定量目的。从临床样本、感染细胞培养物或无细胞病毒悬液中提取的RNA必须与病毒RNA提取试剂盒提供的裂解缓冲液按制造商定义的比例混合。例如，MACHEREY-NAGEL公司的RAV1裂解缓冲液、罗氏的MagNA pure外裂解缓冲液和QIAGEN的AVL缓冲液。为完全失活病毒颗粒，混合物必须在70°C下孵育五分钟。

材料和试剂

所需材料和试剂为：

• 总核酸提取试剂盒（NucleoSpin 8 病毒核心试剂盒，Macherey-Nagel，参考号 740451.4）； • 实时RT-PCR试剂（Invitrogen SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR试剂盒，参考号 11732088RFA）； • 引物和探针（见表2和表4）。

方法

本RNA提取采用Macherey-Nagel公司的NucleoSpin 8病毒核心试剂盒手动进行。也可使用其他制造商的经验证的方法和商业试剂盒，包括贵设施目前用于流感病毒或SARS-CoV-2检测的RNA提取方法。这些方法可以是手动操作或自动化操作。

使用 Maxispan 8 病毒核心试剂盒 (Macherey-Nagel) 进行 RNA 提取：

- 在生物安全柜中，将100 µL患者样本（例如，从前鼻或鼻咽部采集的液体拭子）或病毒培养物与400 µL RAV1裂解缓冲液混合。注意，在室温下用裂解缓冲液孵育10分钟可灭活99.99%的病毒。通过将混合物在70° C下孵育五分钟完成灭活，然后在生物安全水平1 (BSL-1) 实验室进行剩余步骤。
- 加入400 µL乙醇并混合。
- 将所有混合物加载到柱子上。
- 以6 000 g离心两分钟。
- 丢弃洗脱液。
- 用RAV3洗涤缓冲液洗涤柱子三次：
 - 用500 µL RAV3洗涤缓冲液洗涤，离心两分钟 (6 000 g)，丢弃洗脱液。
 - 用700 µL RAV3洗涤缓冲液洗涤，离心两分钟 (6 000 g)，丢弃洗脱液。
 - 用700 µL RAV3洗涤缓冲液洗涤，离心15分钟 (6 000 g)，丢弃洗脱液。

100µL的RE洗脱缓冲液（预热至70° C）中洗脱液，室温孵育一分钟，6 000 g离心两到三分钟。

水解探针法检测病毒及分型

可以采用两种水解探针检测方法，一种用于病毒检测，另一种用于分型。

呼吸道合胞病毒 (RSV) 病毒检测——该多重RT-qPCR技术通过靶向每种病毒特有的M基因（panRSV-FluA-FluB三重检）来检测RSV、甲型流感病毒和乙型流感病毒。反应混合物见表1，引物和RT-qPCR探针见表2。

呼吸道合胞病毒亚型分型——该RSV-A/B差异RT-qPCR技术通过靶向RSV-A和RSV-B的N基因来区分RSV亚组。反应混合物见表3，引物和RT-qPCR探针见表4。

为进行实验，按表1或表3所述制备RT-qPCR反应混合物。我们建议预先配制含有引物、探针和水的混合物。这些混合物可分装后于-20° C储存数月。

表1. 用于检测呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒和乙型流感病毒M基因的RT-qPCR反应混合物

panRSV、甲型流感病毒、乙型流感病毒三重RT-qPCR反应混合物				
试剂		股票集中度	最终浓度	每孔体积 (µL)
2X反应缓冲液		–	1X	10
MgSO ₄		50毫摩尔/升	0.6 毫摩尔/升	0.24
H ₂ O		–	–	3.64
入门第一课 Fw	VRSM-27Fw	100 µM	0.5 µM	0.1
入门第一课 Rv	VRSM-104Rv	100 µM	0.5 µM	0.1
入门指南2 Fw	GRAM-7Fw	100 µM	0.5 µM	0.1
入门指南2 Rv	GRAM-161Rv	100 µM	0.5 µM	0.1
入门指南3 Fw	GRBM-4Fw	100 µM	0.5 µM	0.1
入门指南3 Rv	GRBM-105Rv	100 µM	0.5 µM	0.1
探测器1	VRSM-53探头 (+) FAM	100 µM	0.2 µM	0.04
探测器2	GRAM-52探测器 (+)-十六进制	100 µM	0.2 µM	0.04
探测器3号	GRBM-34c探针 (+) Cy5	100 µM	0.2 µM	0.04
酶	上标III RT/铂金Taq混合物 (2U/µL)	2个UI/微升	0.8个界面/反应	0.4
样本	纯化的RNA被洗脱出 100 µL	–	–	5
总计				20

表2. 用于检测呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒和乙型流感病毒M基因的引物和RT-qPCR探针

Virus – gene	Name	序列
RSV – M	VRSN-27Fw	GGCAAATATGGAACATACGTGAA
	VRSN-104Rv	TCTTTTCTAGGACATTGTAYTGAACAG
甲型流感 – M	VRSN-53探针 (+) FAM	FAM – AGCTTCACGAAGGCTCCACATACAG – BHQ1
	GRAM-7Fw	CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA
	GRAM-161Rv	GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA
	GRAM-52探测器 (+) – 十六进制	EX - TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG - BHQ1
流感B – M	GRBM-4Fw	TCGCTGTTTGGAGACACAATTG
	GRBM-105Rv	CAAGGCAGAGTCTAGGTCAAATTCT
	GRBM-34c探针 (+) Cy5	Cy5 - AGAAGGCAAAGCAGAACTAGC - BHQ3

RSV M引物源自Wang等人[15]，RSV M探针由法国北部呼吸道病毒国家参考中心（巴斯德研究所）内部设计。甲型流感M引物和探针源自Terrier等人[16]以及世界卫生组织关于流感病毒分子检测的信息[17]。乙型流感M引物源自Jørgensen等人[18]，乙型流感探针由法国北部呼吸道病毒国家参考中心（巴斯德研究所）内部设计。

表3. 呼吸道合胞病毒A/B型差异RT-qPCR反应混合物

RSV-A/B差异型RT-qPCR混合试剂				
试剂	股票集中度	最终浓度	体积 (μL)	
2X反应缓冲液	–	1X	10	
MgSO ₄	50毫摩尔/升	0.6 毫摩尔/升	0.24	
H ₂ O	–	–	4.08	
入门级 1 前言	VRSN-1141Fw	100 μM	0.5 μM	0.1
入门级1 Rv	VRSN-1262Rv	100 μM	0.5 μM	0.1
探测器1	VRSN-1262Probe(+) FAM	100 μM	0.2 μM	0.04
探测器2	VRSN-1262Probe(+) 阿托647N	100 μM	0.2 μM	0.04
酶	上标III RT/铂金Taq 混合 (2UI/μL)	2个UI/微升	0.8个界面/反应	0.4
样本	纯化RNA 洗脱于100 μL	–	–	5
总计				20

表4. 用于RSV-A和RSV-B N基因差异检测的引物和RT-qPCR探针

病毒基因名称	序列
RSV – N	VRSN-1141Fw
	VRSN-1262Rv
	VRSN-1262Probe(+) FAM
	VRSN-1262Probe(+) Atto647N

源自 Wang 等人 [11] 的引物和探针

实时荧光定量PCR程序

实时荧光定量PCR在热循环仪上按照表5中所述的热循环程序进行。

表5. RT-qPCR热循环程序

Step	温度	持续时间	周期数
逆转录	50°C	15分钟	1
变性	95°C	两分钟	1
延伸 ^a	95°C	15秒	50
	60°C	40秒	
冷却	40°C	30秒	1

^a 在此步骤结束时测量荧光信号。

要分析数据，请根据您的特定热循环仪手动设置阈值线。一旦为您的仪器确定阈值，请始终使用相同的阈值。在扩增曲线（即曲线穿越预定义阈值的循环数）上定位Ct值。

3.3.2 RSV基因测序

RSV-A的参考序列为A/England/397/2017毒株，其登录号分别为GenBank中的PP109421和GISAID中的EPI_ISL_412866。

RSV-B的参考序列为B/Australia/VIC-RCH056/2019毒株，该毒株可在GenBank和GISAID数据库中分别通过登录号OP975389和EPI_ISL_1653999获取。

材料和试剂 所需材料和试剂为：

- dNTPs 10mM (Thermo Scientific, 货号R0192)；
- RNA酶抑制剂 (Promega, 货号N2511)；

方法

RSV测序是否成功取决于病毒载量。根据我们的经验，在RSV-A/B差异RT-qPCR检测中，Ct值低于28的样本能够成功测序。此阈值可能因地区而异，并需根据当地测序策略进行调整。

cDNA合成

进行cDNA合成：

- 将表6中给出的试剂混合。
- 用水为整个程序添加一个阴性对照样品。
- 使用表7中的热循环程序进行逆转录。

表6. cDNA合成试剂

试剂	1X
Lunascript超混5X (NEB, 参考号E3010)	2 µL
RNA ^a	8 µL
总计	10 µL

按照上述方法从100 µL呼吸道样本中提取RNA，并用100 µL进行洗脱。

表7. cDNA合成热循环程序

温度	Time
25°C	两分钟
55°C	10分钟
95°C	一分钟
4°C	∞

PCR扩增 对于PCR扩增，应独立生成扩增子副本。事先按表10和表11所述混合引物。

将表8中给出的试剂混合，并使用表9中的热循环程序进行PCR多重反应。

评估琼脂糖凝胶上的DNA扩增：将每个反应的5 µL样品加载到1%琼脂糖凝胶上进行电泳。PCR产物应产生一个可见的~400 bp条带，而阴性对照（无cDNA）应无杂带。

将多重PCR产物1和2混合（最终体积50µL）。

表8. PCR扩增试剂

构图	反应	最终 集中 25 µL
5倍 Q5 反应缓冲液 (NEB)	5 µL	1X
10毫摩尔脱氧核糖核苷三磷酸	0.5 µL	200 µM
50倍扩增池1或扩增池2	0.5 µL	–
cDNA	2.5 µL	–
Q5 polymerase (2000 U/mL) (NEB)	0.25 µL	0.02 U/µL
H2O 无核糖核酸酶 无脱氧核糖核酸酶	最终数量 25 µL	–

表 9. PCR 扩增的热循环程序

T°	Time	周期数
98°C	30 s	1
98°C	15 s	35
65°C	5分钟	
10°C	∞	1

珠子上的扩增子纯化

在珠子上对扩增子进行纯化：

- 将 AMPure XP 磁珠在室温下平衡 30 分钟。
- 振荡磁珠 10 秒。
- 向 50µL 样品中加入 72 µL (1.8 倍) 磁珠。

也可以使用其他技术来纯化扩增子。

扩增子测序

对于扩增子测序，准备两种50倍浓缩的预混液：引物池1和引物池2。分装并与-20° C冷冻保存，直至使用。制备PCR混合物时，分装样品最多冻融5次。

表10. RSV-A 瓦片扩增子测序引物——2026年3月20日版

基础教材	序列	Pool	最终浓度 (nM)	专注 预混 (毫摩尔/升) (50 X)
RSVA_1_LEFT	CTTGCGTAAACCAAAAAATGGGG	1	30	1.50
RSVA_1_RIGHT	TGGTCATTGTTGAATCACTTAGTTTTTG	1	30	1.50
RSVA_3_LEFT	TAGAGACATCATAACACATAAATTTATATACTTG	1	15	0.75
RSVA_3_RIGHT	CAACTTGACTTTTGCTAAGAGCCAT	1	15	0.75
RSVA_5_LEFT	AGGTATGTTATATGCTATGTCTAGATTAGGA	1	75	3.76
RSVA_5_RIGHT	TGGTAATAAACCTTTATAGCGTTTCA	1	75	3.76

基础教材	序列	Pool	最终浓度 (nM)	专注 预混 (毫摩尔/升) (50 X)
RSVA_7_LEFT	AAGTGATGTTACGGTGGGGG	1	15	0.75
RSVA_7_RIGHT	ACTCAAAGCTCTACATCATTATCTTTTGG	1	15	0.75
RSVA_9_LEFT	AAACCCAATAAATGAGACAGATGATACT	1	15	0.75
RSVA_9_RIGHT	TCC TGA GTCT TGG CCAT AGCT TTC	1	15	0.75
RSVA_11_LEFT	GCTACCAAAGTGTACATCAAAACACA	1	8	0.38
RSVA_11_LEFT_bis	GCTACCAAAGTGTATATCAAAACACA	1	8	0.38
RSVA_11_RIGHT	TCTTAATGAGGGTCCCTTGGGT	1	15	0.75
RSVA_13_LEFT	ACA CTCA ACCCA ACA CAC ATG ACA	1	113	5.64
RSVA_13_LEFT_bis	ACA CTCA ACC CCA CAC ATG ACA	1	38	1.88
RSVA_13_RIGHT	TTGTATGAATCTACTCATTGATGTAGAGG	1	113	5.64
RSVA_13_RIGHT_bis	TTGTGTGAATCTGCTCATTGATGTAGAGG	1	38	1.88
RSVA_15_LEFT	ACACGCTAGATAAAATCAACCAATGG	1	15	0.75
RSVA_15_RIGHT	CATTTGCCCCAGCGTTRTTYTT	1	15	0.75
RSVA_17_LEFT	CCACAAAGTCACACTAACAACTGC	1	15	0.75
RSVA_17_RIGHT	TGGTGGTGGTTTTCTTTCCAGG	1	15	0.75
RSVA_19_LEFT	AAACCCTCCACTCAACCACCTC	1	15	0.75
RSVA_19_RIGHT	TCTGTACCATTACACTTATTTTCCTTGAT	1	15	0.75
RSVA_21_LEFT	GGCATTGCCGTATCCAAGGT	1	15	0.75
RSVA_21_RIGHT	TGCTGTCTAACTATTTGAACATTGCT	1	15	0.75
RSVA_23_LEFT	GTGACAATGCAGGATCAGTATC	1	15	0.75
RSVA_23_RIGHT	CAGAGGGGAACACTAATGGATC	1	15	0.75
RSVA_25_LEFT	TATACTGCAAGGCCAGAAGCAC	1	15	0.75
RSVA_25_RIGHT	CATGGGGTGGCCATTCAAAATAA	1	15	0.75
RSVA_27_LEFT	ACTGAACTCAACAGCGATGACA	1	75	3.76
RSVA_27_RIGHT	CATTGAATGGTTGATCCGGTGG	1	75	3.76
RSVAb_29_LEFT	CTCAGAATGTAACGCTTTAGGAAG	1	150	7.52
RSVAb_29_RIGHT	G T A G T A A T G A C T G A G T T G T C T T C A T C	1	150	7.52
RSVAb_31_LEFT	GCAACATCCTCCATCATGGTTAATAC	1	75	3.76
RSVAb_31_RIGHT	G T A G A A C C C C T C A T G T G G A A T A G	1	75	3.76
RSVA_33_LEFT	TGCAGGTGACAATAACCTCAACA	1	30	1.50
RSVA_33_LEFT_bis	TGCAGGTGACAACAACCTCAACA	1	30	1.50
RSVA_33_RIGHT	AAATTTTAGGAGGTGATATAGCCTTATCA	1	30	1.50
RSVA_33_RIGHT_bis	AAATTTTAGGAGGTGATATAGCCTTGTC	1	30	1.50
RSVA_35_LEFT	AGGCAAAGAAAGAGAACTCAGTGT	1	15	0.75
RSVA_35_RIGHT	GGGGGTGCATGCCTATATGT	1	15	0.75
RSVA_37_LEFT	TCACTATTAGATCTAATATCTCTCAAAGGGA	1	150	7.52
RSVA_37_RIGHT	ACTGCATAATAGACTTTCACCTCTATATTC	1	150	7.52
RSVA_39_LEFT	TCGAAGTTTCTATAGAAGAACTCCTGA	1	15	0.75
RSVA_39_RIGHT	T C A T A A A C A A C T C T A G C C G C T G A	1	15	0.75
RSVA_41_LEFT	GAGATAAAAGAGAAATATTGAGTATGGAAAACC	1	75	3.76
RSVA_41_RIGHT	TGGCCTTCTCATATGTTAACCCA	1	75	3.76
RSVA_43_LEFT	TGGCCTTAGCTTAATGTCTGTAGT	1	15	0.75
RSVA_43_RIGHT	ACATATGATCAGTTATATATCCCTCTCCC 的中文翻译是: ACATATGATCAGTTATATATCCCTCTCCC	1	15	0.75
RSVA_45_LEFT	AGCTTCAAACATATGGTTTCTTAAACG	1	150	7.52

基础教材	序列	Pool	最终浓度 (nM)	专注 预混 (毫摩尔/升) (50 X)
RSVA_45_RIGHT	CCTATACAATAGTCACTCAGTGTC	1	150	7.52
RSVA_47_LEFT	CCTTAGTGCACAATAGCACATCAC	1	15	0.75
RSVA_47_RIGHT	CAGGCAATTCAGCATCACAGAC	1	15	0.75
RSVA_49_LEFT	GGTCCTGCAAATGTGTTCCCA	1	75	3.76
RSVA_49_RIGHT	AGCTGTTTAAACAATTCACCTTAGATGAGG	1	75	3.76
RSVA_2_LEFT	TGGCCTAATAGATGACAATTGTGAAA	2	30	1.50
RSVA_2_RIGHT	TGACCAGAAATGTAAATGTGGCCT	2	30	1.50
RSVA_4_LEFT	CAAACAATCCGAAATAACAACCTTATGCA	2	15	0.75
RSVA_4_LEFT_bis	CCAAGGTTTCCAAAAATTTACGTTTATGCA	2	15	0.75
RSVA_4_RIGHT	TCCACTCCATTTGCCCTAACATGA	2	15	0.75
RSVA_4_RIGHT_bis	TCCACTCCATTTGCTTTGACATGA	2	15	0.75
RSVA_6_LEFT	AGCAGCAGGAGATAGATCAGGT	2	15	0.75
RSVA_6_RIGHT	GGTTGTTCAATATATGGTAGAATCCTGC	2	15	0.75
RSVA_8_LEFT	AAATGGTGTGATTAACCTACAGTGATTAGA	2	11	0.56
RSVA_8_RIGHT	GGCGTAGGGTCTTCTTTGAACT	2	11	0.56
RSVA_10_LEFT	AGGATTGATGAGAAATTAAGTGAATACTAGG	2	15	0.75
RSVA_10_RIGHT	TCAGCAGATAGATGTTTGTTGGA	2	15	0.75
RSVA_12_LEFT	TCCATGCCAGCAGATCTACTCA	2	15	0.75
RSVA_12_RIGHT	TCAAGTGTGTTGAGATCTTTATTCTGA	2	15	0.75
RSVA_14_LEFT	CAGCAGGTGGAAGCACACAGCT	2	15	0.75
RSVA_14_RIGHT	TGTTATCATGTGTATTAGTGTAAGTAAGGC	2	15	0.75
RSVA_16_LEFT	TCTCACCATGCAAGCCATYATC	2	15	0.75
RSVA_16_RIGHT	TGGGTGAGGTATGTTGGGGTT	2	15	0.75
RSVA_18_LEFT	ACC_AACAATGATTTTCACTTTGAAGT	2	15	0.75
RSVA_18_RIGHT	GTGTTGGATGAAGATRGAGRTTGTGAT	2	15	0.75
RSVA_20_LEFT	GCAAAGGCTATCTTAGTGCTCTAAG	2	15	0.75
RSVA_20_RIGHT	AGCCTTGTTTGTGGATAGTAGAGC	2	15	0.75
RSVAb_22_LEFT	GTGTAACACACCTGTAAGCAC	2	75	3.76
RSVAb_22_RIGHT	CAGAGATTTACCTCACTTGGTAATG	2	75	3.76
RSVA_24_LEFT	GGGTGGATACTGTGTCTGTAGG	2	15	0.75
RSVA_24_RIGHT	GGTGCTATTTTTATTAGTTACTAAATGCA	2	15	0.75
RSVA_26_LEFT	GGGGCAAATATGTCGAAGGA	2	15	0.75
RSVA_26_RIGHT	GCTTTCAATATATGATATGACAGTATTGTACAC	2	15	0.75
RSVA_28_LEFT	CAAGTAATTGTAGAGTCACTATGTATAACCA 的中文翻译是: CAAGTAATTGTAGAGTCACTATGTATAACCA	2	15	0.75
RSVA_28_LEFT_bis	CAAGTAATTGTAGAGTCACTATGTATAATCA 的中文翻译是: CAAGTAATTGTAGAGTCACTATGTATAATCA	2	15	0.75
RSVA_28_RIGHT	AGTTGGTATAATCATTTTTGAGATAAGGACC	2	30	1.50
RSVAb_30_LEFT	CTTATGACATACAAGAGTATGACCTC	2	15	0.75
RSVAb_30_RIGHT	CTCACTAGATCGATATTGTGTTAATATGC	2	15	0.75
RSVA_32_LEFT	TGTGGATTCAATAATGTTATCTTGACACA	2	15	0.75
RSVA_32_RIGHT	AGCATCCATGGCTTGCTTTCA	2	15	0.75
RSVA_34_LEFT	TCAGGACTACGTTTCTATCGAGAGT	2	15	0.75
RSVA_34_RIGHT	TGTTTTCTGCTATCATTTTCTCTGCT	2	15	0.75
RSVA_36_LEFT	TGGATGAAGTGCATGGTGTACA	2	30	1.50
RSVA_36_RIGHT	TGTGGCCTATTCTGCATACTC	2	30	1.50

基础教材	序列	Pool	最终浓度 (nM)	专注 预混（毫摩尔/升） (50 X)
RSVA_38_LEFT	GGACCGTGGATAAACACTATACTTGA	2	56	2.82
RSVA_38_LEFT_bis	GGACCGTGGATAAACACCATACTTGA	2	19	0.94
RSVA_38_RIGHT	CTTGAAGTTTGTCTTTAAATCATGGTTTG	2	75	3.76
RSVA_40_LEFT	GTGCACAACACTATACCACCAC	2	15	0.75
RSVA_40_RIGHT	TGTCCATTGTATACATGATACTGGGT	2	15	0.75
RSVA_42_LEFT	AGCAAAATTGGATTGGGTGTATGC	2	15	0.75
RSVA_42_RIGHT	ACATCACCTGTGAATATGGGAGG	2	15	0.75
RSVA_44_LEFT	ACTAATTTAGCTGGACATTGGATTCTT	2	30	1.50
RSVA_44_RIGHT	TGTTAACAACCCAAGGGCAAAC	2	30	1.50
RSVA_46_LEFT	ACAACAAATTATATCATCCYACACCAG	2	150	7.52
RSVA_46_RIGHT	TATGATGCCAAGGAAGCATGC	2	150	7.52
RSVA_48_LEFT	GACCATTCCTGCTACAGATGCA	2	30	1.50
RSVA_48_RIGHT	GGCATGATGAAATTTTGGTTCTTGA	2	30	1.50
RSVA_50_LEFT	CGATAAAGAGTCTATTGATGCAAATTAAGAG	2	75	3.76
RSVA_50_RIGHT	TGGATTTAACTTATTCTCCTAGATCAAAA	2	75	3.76

表 11. RSV B 碱基扩展子测序引物 - 版本 2025年5月26日

基础教材	序列	Pool	最终浓度 (nM)	专注 预混（50倍） (mM)
RSVB_1_LEFT	CAGAAATGGGGTGCAATTCAGT	1	15	0.75
RSVB_1_RIGHT	T C A T G A A T G G A G A T C A A G C C C A A	1	15	0.75
RSVB_3_LEFT	ACCATGAGCACTACAAAMGACAA	1	30	1.50
RSVB_3_RIGHT	GTTGGAAGTTACGGGTGAGGT	1	30	1.50
RSVB_5_LEFT	TGACACTCCCAATTATGATGTGCA	1	30	1.50
RSVB_5_RIGHT	TTACAAGGCAGCTATACACAGT	1	30	1.50
RSVB_7_LEFT	AGCACAATCATCCACAAGAGGG	1	224	11.22
RSVB_7_RIGHT	GAGTTGCTCTGCATATGCTTTGG	1	224	11.22
RSVB_9_LEFT	TCCAAAGATCCTAAGAAGAAAGATAGCA	1	11	0.56
RSVB_9_RIGHT	TATTCCGTCACGAGCCGAAGTR	1	11	0.56
RSVB_11_LEFT	TTGGAAGACAACGATAGCGACAA	1	15	0.75
RSVB_11_RIGHT	GCTTTACTAGTATGTTGATGCTTGCA	1	15	0.75
RSVB_13_LEFT	TGCAGTTTAACATGCTTAAAGTAAAAAG	1	30	1.50
RSVB_13_RIGHT	GTGGTTTGATTGAAAACGTGTAGC	1	30	1.50
RSVB_15_LEFT	CCTAGAGTGCGAATAGGTAAATAAAACAAG	1	150	7.48
RSVB_15_RIGHT	tgtagtgccatgactctgtgag	1	150	7.48
RSVB_17_LEFT	GAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCT	1	75	3.74
RSVB_17_RIGHT	GTGCTTGGCTTGTTGTTCTGTG	1	75	3.74
RSVB_19_LEFT	AGAAACCACCATTAACCCAACAAAAA	1	15	0.75
RSVB_19_RIGHT	GCAAGAGTTAGGAAGATTGCACTTG	1	15	0.75
RSVB_21_LEFT	CAGAGTTACTTGAGTGCTTTAAGAAC	1	150	7.48
RSVB_21_RIGHT	CTTTGTTTCGTAAGCTGCAAAGCA	1	150	7.48
RSVB_23_LEFT	AGCACTTACATGTTAACAACAGTGAG	1	30	1.50

基础教材	序列	Pool	最终浓度 (nM)	专注 预混 (50倍) (mM)
RSVB_23_RIGHT	CCAAGGCTGACTTCACTTGGT	1	30	1.50
RSVB_25_LEFT	GCTGTGATTATGTGTCAAACAAAGGA	1	30	1.50
RSVB_25_RIGHT	TGCAATATTATTGATTCCACTTAGTTGGTC	1	30	1.50
RSVB_27_LEFT	TACATCAACATCACADCACAGGC	1	150	7.48
RSVB_27_RIGHT	CTCTCTAGCACTCCAACTATACCAAG	1	150	7.48
RSVB_29_LEFT	CTTAAACGATTACCAGCAGACGTR	1	15	0.75
RSVB_29_RIGHT	GGTTGGATGATATAGAATCGTTATGATCAAG	1	15	0.75
RSVB_31_LEFT	ACGGCCCTTATCTTAAAAATGATTATACC	1	15	0.75
RSVB_31_RIGHT	ACCAGTGATTAACCATGATGGAGG	1	15	0.75
RSVB_33_LEFT	AGATAATCAAACTTTGAGTGGTTTTAGT	1	15	0.75
RSVB_33_RIGHT	ACTCTTGATAGTAGATCCTTTTGAGCC	1	15	0.75
RSVB_35_LEFT	ACTTGAGTGAGCTATATTTCTCTTCAGA	1	15	0.75
RSVB_35_RIGHT	ACTAGTCCATATTAGATCTTTGGAGGAG的中文翻译是: ACTAGTCCATATTAGATCTTTGGAGGAG	1	15	0.75
RSVB_37_LEFT	AGAAAGAGAGCTCAGTGTGGGT	1	15	0.75
RSVB_37_RIGHT	T C C T T T A T A A A G G A G G T G C A T G T C T	1	15	0.75
RSVB_39_LEFT	CACAGCTCTGATAAATGGTGATAATCAG	1	15	0.75
RSVB_39_RIGHT	TTGCAGAGCAATTTGATTGTATAACCA	1	15	0.75
RSVB_41_LEFT	GAGAACTCCAGACTTCCTTACAGAR	1	75	3.74
RSVB_41_RIGHT	GCGCACTTTTAGAAAATATTTGTTTGGA	1	75	3.74
RSVB_43_LEFT	TGTAAGAGAAAGATCTTGGTCATTATCCA	1	15	0.75
RSVB_43_RIGHT	ACTGTTAACCGGTGTAATAATTKACAC	1	15	0.75
RSVB_45_LEFT	CTTAGCTTGATGTCAGTWTGGAAC	1	15	0.75
RSVB_45_RIGHT	TGATCAGTTATATACCCYCTCCCC	1	15	0.75
RSVB_47_LEFT	GCTACTGGAATCTATGTCTAAAGTTTTCC	1	37	1.87
RSVB_47_RIGHT	GGGGTTGGGTGATAGTTTGTTRTAATT	1	37	1.87
RSVB_49_LEFT	G T G A T A G A C A G G A T T A T A G A T C A T T C A G G T	1	15	0.75
RSVB_49_RIGHT	GTTGCATCTGTAGCAGGAATGGT	1	15	0.75
RSVB_51_LEFT	ACAGCCAATTGGAGTAAATYATAATTGA	1	15	0.75
RSVB_51_RIGHT	TCTCCATTAACACTACTCTTCAATTTGAC	1	15	0.75
RSVB_53_LEFT	AACAAGCTTATAAACCACAAGCATATGA	1	150	7.48
RSVB_53_RIGHT	TGTCTCGTTGTGTTGTAATGCAC	1	150	7.48
RSVB_2_LEFT	AGTGAAATCTAACTTTACAACATGCCA	2	72	3.61
RSVB_2_RIGHT	GGTGAGAGATGTTATTATTGAATCCATCG	2	72	3.61
RSVB_4_LEFT	TGGCGGGTTTCTAGAATGTATTGG	2	29	1.44
RSVB_4_RIGHT	TGATTTGCATCTTCAGTGATTAATAGCA	2	29	1.44
RSVB_6_LEFT	AAGCTTGACATCAGAAATACAAGTCAA	2	14	0.72
RSVB_6_RIGHT	CTTGTCTGTAACCATAGGCATTCA	2	14	0.72
RSVB_8_LEFT	AGCAGGTCTAGGCATAATGGGA	2	14	0.72
RSVB_8_RIGHT	TGTTGGTGCCAGATGTTATCGG	2	14	0.72
RSVB_10_LEFT	TGACCAACAAATGATAACATTACAGCA	2	14	0.72
RSVB_10_RIGHT	GGTGTCTGTTTTGTTGATGYTGT	2	14	0.72
RSVB_12_LEFT	CAGCAGCTGTCCAGTACAATGT	2	14	0.72
RSVB_12_RIGHT	TTCACATAGAGCAATGATCTCATGAGT	2	14	0.72

基础教材	序列	Pool	最终浓度 (nM)	专注 预混 (50倍) (mM)
RSVB_14_LEFT	GGAGCATTCAAGTATATCAAGCCAC	2	29	1.44
RSVB_14_RIGHT	GCTTGTGAATTCTATTGTRATGGATGT	2	29	1.44
RSVB_16_LEFT	ACAGATGTATCAAAATCGACACATAGTG	2	14	0.72
RSVB_16_RIGHT	GCAGAGATGATGAATATTATGGCTGC	2	14	0.72
RSVB_18_LEFT	ACCCTTGGTTTTGTCGTTTTGTCAC	2	14	0.72
RSVB_18_RIGHT	ACAGTGGATTGTGGGGTGCT	2	14	0.72
RSVB_20_LEFT	GTGATCCCTCAAGCAAGAACKA	2	72	3.61
RSVB_20_RIGHT	TGATTGTATAGTTCATATACTGTGGTGCT	2	72	3.61
RSVB_22_LEFT	AGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAG	2	144	7.22
RSVB_22_RIGHT	GCCTTACTATCTGAACATTGCTTGAC	2	144	7.22
RSVB_24_LEFT	T C C T T T C T T T C C A A G C T G A C A C	2	14	0.72
RSVB_24_RIGHT	GAAGGAAACACTAGAGGGTCATAGT	2	14	0.72
RSVB_26_LEFT	CAAAGTTTAGCTTTTATTCGTAGATCYGA	2	14	0.72
RSVB_26_RIGHT	G T G T T G A T T G C G A T A T T G A G G C T T	2	14	0.72
RSVB_28_LEFT	TGTTAAACAAGATACTCAAGTCAATGGAC	2	14	0.72
RSVB_28_RIGHT	TGGTTGACTCTTTGGGTTGCT	2	14	0.72
RSVB_30_LEFT	GCCACTCAACAATTTCTCCAACA	2	14	0.72
RSVB_30_RIGHT	AGTAATGACTGGAAATAAGTTGGTCTTC	2	14	0.72
RSVB_32_LEFT	G T G A T G A A A A C T C A G T A C T T A C A A C C A	2	29	1.44
RSVB_32_RIGHT	GCTGATGCTTTCCATGTCAAAAATTG	2	29	1.44
RSVB_34_LEFT	CTATCACAATTATTCCTTACGGAGATTGT	2	14	0.72
RSVB_34_RIGHT	T C A T T G C A G T T A A T C T T A C A G C A T C C	2	14	0.72
RSVB_36_LEFT	TTGCGGTTCTATCGTGAGTTTCA	2	29	1.44
RSVB_36_RIGHT	CAGGGAAGAATTGTAAATATTTTCGGC	2	22	1.08
RSVB_36_RIGHT_bis	CAGGGAAGAATTGTAAATATTTTCAGC	2	7	0.36
RSVB_38_LEFT	ACGAACTGCATGGRGTACAATC	2	14	0.72
RSVB_38_RIGHT	TCCCTTAAGCTTATGGCCTATGC	2	14	0.72
RSVB_40_LEFT	AGGTAGCTTAACACAGGARTTAGAATAC	2	108	5.42
RSVB_40_RIGHT	GACACAAGTCAAGAATTTGTTCACTCT	2	108	5.42
RSVB_42_LEFT	ATCCACAGGCTTTAGGGTCTGA	2	14	0.72
RSVB_42_RIGHT	GGCTATAGTGCTAGTTGTATATTTAATRTCC	2	14	0.72
RSVB_44_LEFT	CCAATGCGTAAATGACCCGTTACTGAC	2	14	0.72
RSVB_44_RIGHT	GCTTCAACTTGATGATATCRACATCTCC	2	14	0.72
RSVB_46_alt_LEFT	TTAGCTGGACATTGGATTCTGA	2	72	3.61
RSVB_46_RIGHT	CACCCCAAGGGCATAACGGT	2	54	2.71
RSVB_46_RIGHT_bis	CACCCCAAGGGCATAACAGT	2	18	0.90
RSVB_48_LEFT	CTTTTCAGACAACACTCATCTGCT	2	72	3.61
RSVB_48_RIGHT	CTGATCTTGCATCCTGTGGAAC	2	72	3.61
RSVB_50_LEFT	CCCAGTTGTATAGCATTCATAGGTGA	2	29	1.44
RSVB_50_RIGHT	TTTGAAATCAATATCATCTTGAGCATGGT	2	29	1.44
RSVB_52_LEFT	GATGTTGTGCAAAATGCTAAATTGATTCT	2	14	0.72
RSVB_52_RIGHT	C-A-C-T-A-C-C-T-G-T-T-A-T-T-T-A-A-T-C-A-G-C-T-T-C-T-T-G-A	2	14	0.72

文库构建与测序

扩增子面板兼容牛津纳米孔技术和Illumina测序。使用Nextera试剂盒进行文库制备和NextSeq 2000测序系统（Illumina公司）即可进行Illumina DNA测序。

若使用与扩增子大小（~400nt）相比更短的联合配对读取长度，并结合DNA片段化或Tagmentation技术，需调整生物信息学流程以进行引物修剪。建议使用至少150nt的长读长。

3.3.3 细胞培养

HEp-2细胞是分离和扩增呼吸道合胞病毒（RSV）的参考细胞系。所有细胞培养均在...进行。使用无菌材料制成的生物安全柜，以防止细菌污染。

细胞应按以下方法常规进行支原体检测。

材料和试剂

所需材料和试剂如下。

内部自行进行支原体检测可选

- Minerva Biolabs的VenorGem OneStep试剂盒（货号：118025）。

HEp-2 细胞：

- CCL-1. 23

完全生长培养基

- MEM（1份）+ GlutaMAX（Gibco，货号：41090-028）：- 10% FBS； - 100 U/mL 青霉素 / 100 µg/mL 链霉素（Pen/Strep）（Gibco，货号：15140148）。

培养基的组成可能因实验室而异。理想情况下，一旦选择了细胞培养基，就不应再更改。

冷冻介质：

- 80% 胎牛血清； • 20% 二甲基亚砷（DMSO；Sigma-Aldrich，D2650）

FBS必须在使用前在56° C下热灭活30分钟。

方法

HEp-2细胞传代

HEp-2细胞建议每周进行两次1:5至1:10的亚培养。根据您实验室观察到的生长动力学调整接种密度，以确保在预定传代日时培养物达到约90%汇合度。

进行细胞传代：

- 在显微镜下观察细胞汇合度。
- 吸弃培养液，用1X PBS清洗一次。
- 加入0.05%胰蛋白酶-EDTA溶液，刚好覆盖细胞（例如，T-150培养瓶约需3至5 mL），在37° C孵育5-10分钟。

HEp-2细胞接种 为进行感染和滴定，细胞铺板过程按细胞传代所述方法进行。将细胞重悬于生长培养基后，根据表12计数并铺板于完全生长培养基中。细胞应于次日达到90%汇合度。

1 美国典型培养物保藏中心（ATCC）CCL-23。获取地址：<https://www.atcc.org/products/ccl-23>。

表12 HEp-2细胞接种和感染条件

Flask, 碟子或盘子	表面	Nb HEp-2涂层的当天之前	中等音量	接种体积 吸附
T-150	150平方厘米	15×10^6	30mL	5毫升
T-100	100平方厘米	10×10^6	20mL	3毫升
T-75	75平方厘米	7.5×10^6	15毫升	2.5毫升
100毫米碟片	78厘米	5×10^6	10毫升	2毫升
T-25	25平方厘米	2.5×10^6	5毫升	1毫升
35毫米碟形天线	8.8平方厘米	1×10^6	4毫升	400 µL
6-well	9.6平方厘米	1×10^6	2.0毫升	400 µL
12-well	3.5平方厘米	5×10^5	1毫升	400 µL
24-well	1.9平方厘米	2.5×10^5	0.5毫升	200 µL
48-well	1.1平方厘米	1×10^5	0.2毫升	100 µL
96-well	0.32平方厘米	0.5×10^5	0.1毫升	100 µL

支原体检测 可选用多种方法，例如荧光染色、ELISA、PCR、免疫染色或微生物学检测，用于在细胞培养物中检测支原体。下方详述的两种方法仅作参考；贵机构常规使用的任何经验证的替代方法也同样可接受。

商业测试中，由多家公司（例如 Eurofins Scientific）提供支原体检测服务。

准备样品：

- 收集 500 µL 细胞培养上清液。
- 在 90° C 下孵育 10 分钟。
- 以至少 10 000 g 离心 10 秒。
- 将 100 µL 上清液转移至新的反应容器中。

对样品进行条形码标记，并将它们送往进行DNA提取和基于PCR的检测的支原体检测公司。

聚合酶链式反应支原体检测

明华生物的VenorGem OneStep试剂盒（货号：11-8025）可用于内部支原体检测。

准备样品：

- 将100µL细胞培养上清液在95° C下灭活10分钟。
- 按照说明书配制VenorGem OneStep Mix。
- 将2µL灭活样本加入23µL VenorGem OneStep Mix中。
- 整个过程中需包含阳性和阴性对照。
- 使用表13中提供的 the rmocycling 程序在热循环仪上进行热扩增循环。

使用1%琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物。

当在阳性对照品相同的高度检测到清晰条带时，样品被认为是阳性（强污染）（预期大小：265 - 278 bp）。

当检测到两条带时，样品被视为阳性（弱污染）：一条与阳性对照条带高度相同，另一条与阴性对照条带高度相同（预期大小分别为265 - 278 bp和191 bp）。

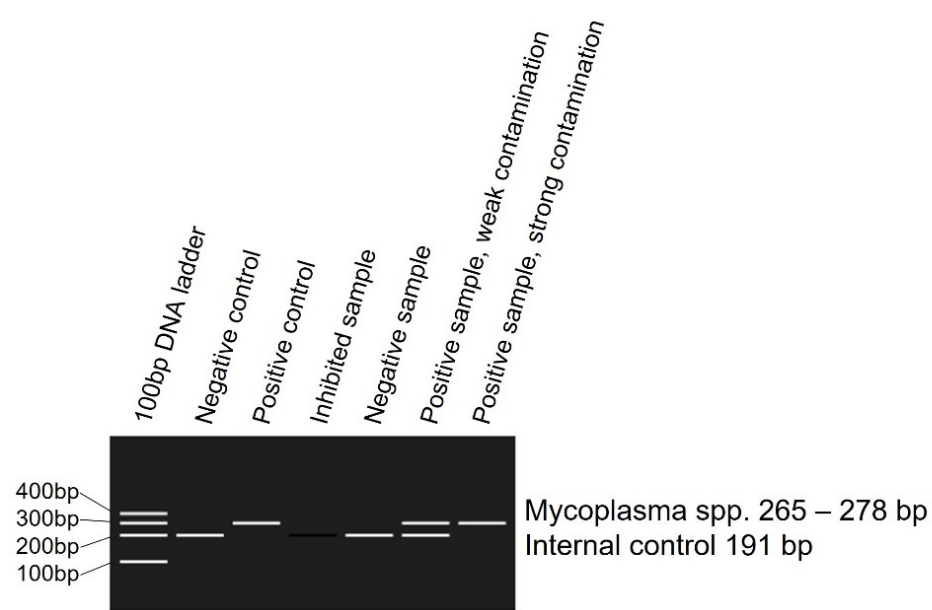
当检测到的条带与阴性对照在同一高度时，样品被视为阴性（预期大小：191 bp）。

图2给出了可能的样本结果的可视化。

表13. PCR支原体检测的热循环程序

温度	Time	周期数
94°C	两分钟	1
94°C	30秒	39
55°C	30秒	
72 °C	30秒	
10°C	∞	1

图2. 可能的样本结果的可视化



来源：制造商说明书（可在网上获取：<https://minerva-biolabs.com/en/mycoplasma-detection-kits/venorgem-onestep-2>）

细胞冷冻 vital真核细胞（或：重要真核细胞）的永久保存是在液氮中进行的。

按照细胞传代说明进行操作。细胞重悬于完全培养液后：

- 通过离心分离小珠细胞（400 g，五分钟，室温）。• 以下步骤在冰上操作：– 将 $2 \times 10^6 - 3 \times 10^6$ 细胞/冷冻管重悬于0.5 mL/冷冻管的FBS中。– 与等体积的冻存介质混合。– 每个冷冻管转移1 mL。• 将冷冻管放入冷冻容器（细胞冷却器）中，在-80° C保存至少四小时。• 将管子转移至液氮气相储存罐。• 解冻一管以检测批次。

细胞解冻

解冻细胞时需快速操作，以便尽快洗出冷冻介质中含有的DMSO。解冻后，在使用前需传代两次，以确保条件一致。

解冻细胞：

- 在离心管中配制10 mL完全培养培养基。• 将培养基置于37° C水浴中预热15分钟。
- 将细胞置于37° C水浴中解冻，直至仅剩少量冰晶。

3.3.4 病毒原液的制备

材料和试剂 所需材料和试剂为：

- 摇摆式摇床；
- Hep-2细胞；
- 病毒稀释液：– MEM (1x) + GlutaMAX™ (Gibco , 41090-028) ；
– 100 U/mL青霉素/100 µg/mL链霉素 (Pen/Strep) (Gibco , ref n° 15140148) ；
- 感染液：–
MEM (1x) + GlutaMAX™ (Gibco , 41090-028) ； – 2% FBS ； – 100 U/mL青霉素/100 µg/mL链霉素
(Pen/Strep) (Gibco , ref n° 15140148) ；
- 10倍RSV冷冻保存液：– 0.5M HEPES (SIGMA H337
5) ； – 1M硫酸镁；pH 7.5 ； – 灭菌分装后储存在-20°C或+4°C。

方法

从临床PCR阳性样本中分离病毒

呼吸道合胞病毒（RSV）从临床标本中分离，用于多种目的。

用于病毒分离和鉴定的临床标本可能包括鼻咽拭子、唾液或支气管肺泡灌洗液。新鲜样本应在室温下储存和运输，并在可能的情况下接种，以优化病毒回收。当采集和接种之间的间隔超过三天时，分离效果会下降。当从新鲜样本中分离出呼吸道合胞病毒（RSV）时，其分离效果可能在25%至40%之间（未发表数据）。

先前冷冻的样品必须在原始储存温度下运输，以保持稳定性并防止冻融损伤。

HEp-2细胞（接种量如表12所示）是分离和培养呼吸道合胞病毒（RSV）的首选。

细胞板的制备

为制备细胞板：

- 提前一天在12孔板中每孔接种 5×10^5 个HEp-2细胞。

细胞应在第二天达到90%汇合。

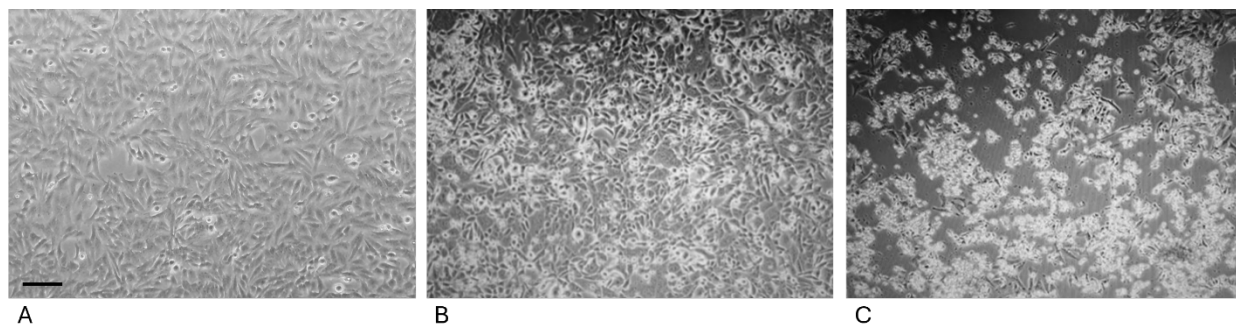
病毒分离

分离病毒：

- 将细胞培养液从铺有细胞的12孔板中移除。
- 向细胞中加入100 – 150 µL的临床标本。
- 将板置于37° C、5%-CO₂培养箱中，在跷跷板摇床上进行轻微摇晃，孵育两小时。

图3展示了在分离过程中观察到的细胞病变效应的一个实例。

图3. 分离过程中观察到的细胞病变效应示例



A: 未感染细胞; B: 轻微细胞病变效应; C: 严重细胞病变效应。标尺: 20 μ m。

收割

执行收割:

- 用细胞刮刀分离细胞。
- 将细胞和上清液转移至洁净的离心管中。
- 将离心管剧烈振荡至少30秒, 以使病毒颗粒从细胞膜上释放。
- 加入1/10体积的10倍浓缩RSV冷冻保存液。
- 剧烈振荡五秒。
- 在室温下快速将样品分装至冷冻管中。
- 使用-80 $^{\circ}$ C预冷的乙醇或将分装样品置于-80 $^{\circ}$ C乙醇-干冰浴中冷冻, 避免使用液氮。
- 置于-80 $^{\circ}$ C保存。

可选的病毒扩增步骤

如果细胞在六天后仍未表现出至少50%的CPE, 可以尝试立即通过感染12孔板中接种的新HEp-2细胞 (每孔加入200 μ L新鲜收获的病毒液, 参见“收获”部分) 来扩增分离的病毒。这种二次扩增的成功率较低 (约为10%)。

呼吸道合胞病毒 (RSV) 毒株的制备

病毒 stocks 是通过特定的感染倍数 (MOI) 制备的。因此, 在 plaque 定量测定部分所述的方法之前, 有必要对病毒培养物进行滴定。

制备烧瓶接种HEp-2细胞: 感染前一天, 按照表12将细胞接种到合适的烧瓶中。感染当天, 细胞应达到90%汇合。

库存生产

按照以下方法感染HEp-2细胞:

- 将病毒原液用病毒稀释培养基稀释, 使感染复数 (MOI) 达到0.005个蚀斑形成单位 (PFU) /细胞。如果这种低MOI效果不佳, 可将其提高到0.01至0.05的范围内。
- 将培养瓶中的细胞培养基弃去。
- 将病毒接种物 (参见表12确定适当体积) 加入细胞上进行吸附。
- 在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中, 使用摇摆式摇床进行轻柔震荡, 孵育两小时。
- 移除病毒接种物, 加入感染培养基 (体积见表12)。
- 在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中孵育两至六天, 直至80 - 90%的细胞出现细胞病变效应 (CPE)。
- 孵育时间可能因病毒而异。约在感染后3天 (3 dpi), 80 - 90%的细胞应死亡。否则, 需再培养一到三天后再进行收获。

收割

- 向烧瓶中加入10X RSV冷冻保存液的1/10。
- 用细胞刮刀分离细胞, 并将细胞与上清液一起转移至离心管中。
- 振荡两分钟。
- 通过离心澄清 (5分钟, 400 g)。
- 将上清液转移至干净的50 mL离心管中, 振荡并分装。
- 将分装好的样品快速冷冻至-80 $^{\circ}$ C (使用-80 $^{\circ}$ C的乙醇或乙醇-干冰浴, 避免使用液氮)。
- 存储于-80 $^{\circ}$ C。

对病毒 stocks 进行质量检查

最后，检查病毒库存质量：

- 依据下方“滴定”部分所述，进行两次滴定，独立进行（使用不同的样品量，至少在两天内，且至少使用两种不同的细胞传代）。预期病毒滴度应在 10^5 至 10^7 PFU/mL 之间。
- 进行下一代测序 (NGS) 并检查突变。

3.3.5 RSV plaque assays

可以进行多种蚀斑测定来检测培养物的病毒效价或进行蚀斑减少实验。

材料和试剂 所需材料和试剂为：

- HEp-2细胞；
- AVICEL RC591 (FMC生物聚合物)：该产品小批量不对外销售，但FMC生物聚合物非常有帮助，可获取500克样品。
- 病毒稀释液：– MEM (1x) + GlutaMAX (Gibco, 货号41090-028)；– 100 U/mL青霉素/100 µg/mL链霉素 (Pen/Strep) (Gibco, 参考号15140148)；

- 感染培养基：– MEM (1倍) + GlutaMAX (Gibco, 货号41090-028)；– 2% FBS；– 100 U/mL青霉素 / 100 µg/mL 链霉素 (Pen/Strep) (Gibco, 货号15140148)。

MEM 2X 溶液可按表 14 配制。该混合物应剧烈摇晃，可在 4° C 下储存。

紫罗兰溶液可按表15配制。该混合物不应接触光线，可在室温下储存。

表14. MEM 2X溶液

组件	卷帙
MEM 10x (Gibco, Ref 21430-020)	50毫升
L-Glutamine 0.2 M (Gibco, Ref 25030-024)	5毫升
每毫升100单位青霉素 / 每毫升100微克链霉素 (Pen/Strep) (Gibco, ref n° 15140148)	5毫升
细胞培养级水	190毫升

表15. 晶紫溶液

组件	卷帙
紫羅蘭草酸鈉 (RAL, 参考號 3614963)	100毫升
甲醛	100毫升
无水乙醇	200毫升
超纯水	高达1升

AVICEL RC591 (FMC生物聚合物) 2.4%溶液的配制方法如下：

- 使用磁力搅拌器将2.4克AVICEL分散于100毫升蒸馏水中，直至完全溶解（通常需要4至12小时）。
- 将该悬浮液在 121° C下灭菌20分钟。

使用前请置于室温或4° C保存。在此条件下，悬浮液稳定一年。

在无菌环境下打开溶液后，可在4°C下储存六个月。使用前必须充分混合悬浮液（通过手动摇晃或涡旋混合）以确保其均匀。

相同的覆盖液解决方案用于不同的板架培养（每板制备约33毫升）。在执行培养时，该溶液必须临时制备。

根据表16可以制备覆盖溶液。在制备覆盖溶液时，通过逐滴加入7.5%碳酸氢钠（Gibco，25080-060）来调节MEM 2X溶液的pH值，直至溶液变红。

表16. 叠加解决方案

组件	体积
感染媒介	3:4比例
阿维素溶液 2.4%	1:8 体积比
MEM 2X	1:8 体积比

方法

呼吸道合胞病毒（RSV）蚀斑滴定法

本方案描述了测定RSV（呼吸道合胞病毒）储备液滴度（以形成斑数单位/PFU/mL表示）的方法[17]。

提前准备12孔板，每孔接种5个HEp-2细胞，每天制备。细胞应在次日达到90%汇合。
5x10盘

滴定

进行滴定：

- 通过将100μL的前一步稀释液加入900μL病毒稀释培养基中并混合，制备一系列十倍梯度病毒稀释液（10⁻¹ 至 10⁻⁶，使用含100 U/mL青霉素/100μg/mL链霉素的MEM 1x培养基作为病毒稀释培养基）。
- 每次稀释时更换移液器吸头。
- 将12孔板中的细胞培养基弃去。
- 将每种病毒稀释液400 μL分装到各孔中。一次不要处理超过两个板，因为在生物安全柜中细胞很快会干燥。
- 将 plates 置于37°C、5%-CO₂培养箱中孵育两小时，进行病毒吸附。
- 准备覆盖液（每孔约2.5 mL）。
- 将覆盖液在37° C下预热。
- 吸附两小时后，向每孔加入2 - 2.5 mL的覆盖液。
- 轻轻摇晃 plates 混合。
- 将 plates 置于37°C、5%-CO₂培养箱中孵育六天。不要移动或摇晃 plates。孵育时间可缩短至五天或延长至七天。这可能会轻微改变蚀斑的大小。

揭示

进行揭示：

- 轻轻摇晃培养皿，使艾维素沉积物松动。
- 丢弃覆盖层。
- 用PBS溶液分别清洗每个孔两次。

参考文献

1. 石杰, 黄晓, 叶超, 陆岩, 刘岩, 魏岩, 等. 呼吸道合胞病毒（RSV）：从基础生物学到临床预防与控制的综合概述. Med Res Rev. 2026 May;46(3):672-712. 可在: <https://doi.org/10.1002/med.70025>

4. Attaianese F, Guiducci S, Trapani S, Barbati F, Lodi L, Indolfi G, 等. 重塑我们的认知：对人类呼吸道合胞病毒免疫反应的理解进展. Pathogens. 2023 Sep 1;12(9):1118. 获取地址: <https://doi.org/10.3390/pathogens12091118>

王丽, 皮德雷·帕, 阿瓦达努拉·V, 杜里贡·EL, 马哈巴什维利·A, 洛佩斯·MR等. 用于检测和亚型特异性鉴定人呼吸道合胞病毒的实时荧光定量PCR双通道检测法. 病毒学方法杂志. 2019年9月;271:113676. 获取地址: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113676>