

· 实验室研究 ·

一步法流行性乙型脑炎病毒 TaqMan 荧光定量反转录聚合酶链反应方法的建立及应用

谢荣辉 徐芳 朱函坪 程胤凯 傅桂明 姚芊芊 翁景清 卢亦愚 杨章女 朱智勇

【摘要】 目的 建立一种特异、灵敏、快速检测流行性乙型脑炎(乙脑)病毒的荧光定量 RT-PCR 方法。方法 根据 GenBank 登录的乙脑病毒毒株序列,应用生物软件在乙脑病毒基因的保守区设计与筛选引物和探针,对荧光定量 RT-PCR 反应体系与条件进行优化,验证方法的特异性、敏感性和重复性。并通过对蚊虫样本的检测,以评价该方法的实际应用价值。结果 优化结果表明荧光定量 RT-PCR 的最佳反应体系为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 探针浓度,0.2 $\mu\text{mol/L}$ 引物浓度,5 mmol/L Mg^{2+} 浓度。结果表明该方法对乙脑病毒的检测有高度的特异性、通用性,对 1~4 型登革热病毒、狂犬病毒、汉坦病毒(SEO 型与 HTN 型)均无交叉反应,检测的灵敏度达 0.1 TCID₅₀,重复性分析表明同一样品 C_t 值的重复检测 4 次,其标准差均在合理范围内,分别为 0.033、0.079、0.149 和 0.411。对 110 批蚊虫标本进行荧光定量 RT-PCR 检测和病毒分离检测,结果荧光定量 RT-PCR 检测出 7 份阳性,而病毒分离则只检测出 3 份阳性,表明建立的荧光定量 RT-PCR 方法更敏感,可直接从蚊虫样本中检测乙脑病毒核酸,从病毒核酸提取至完成检测仅需 3 h 左右,且操作简便、敏感性高。结论 研究建立的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 的方法具有特异、敏感、快速的特点,适用于乙脑病原学的快速检测。

【关键词】 流行性乙型脑炎病毒; 荧光定量反转录-聚合酶链反应; 检测

Development and evaluation of TaqMan-based one-step reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of Japanese encephalitis virus XIE Rong-hui, XU Fang, ZHU Han-ping, CHENG Yin-kai, FU Gui-ming, YAO Ping-ping, WENG Jing-qing, LU Yi-yu, YANG Zhang-nw, ZHU Zhi-yong. Key Lab of Vaccine Against Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

【Abstract】 **Objective** To establish a TaqMan based real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of Japanese encephalitis virus. **Methods** The gene sequences of Japanese encephalitis virus downloaded from the GenBank was aligned, using the biologic software. Specific primers and probes were designed in the conserved region of the C gene for Japanese encephalitis virus. The real-time RT-PCR reactive condition was optimized and the sensitivity, specificity and the stability of the assay were evaluated. Mosquitoes collected from Zhejiang province were detected by this assay. **Results** Mg^{2+} , primer and probe were optimized at 5 mmol/L, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ respectively. The specificity of the assay was high and there were no cross reactions with dengue virus, rabies virus, seoul virus or hantan virus. The detection limits of the assay was 0.1 TCID₅₀. Results from preliminary application showed that TaqMan RT-PCR for Japanese encephalitis virus was sensitive, easier and faster to perform the process of traditional virus isolation and identification. It took only three hours to extract viral RNA and perform the real-time RT-PCR. **Conclusion** This TaqMan-based one-step RT-PCR assay was a quick, sensitive and specific tool for molecular diagnosis of Japanese encephalitis virus.

【Key words】 Japanese encephalitis virus; Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction; Detection

流行性乙型脑炎(乙脑)病毒又称日本脑炎病毒,是引起乙脑的病原体,具有较强的传染性和致病性。近年澳洲及东南亚各国陆续发现乙脑的报

道^[1]。在我国除新疆、西藏和青海省外其他各省均有乙脑的发病和流行^[2]。乙脑病例的实验室诊断依靠血清学抗体检测,蚊虫媒介检测主要利用病毒分离鉴定的方法。利用 RT-PCR 方法检测乙脑病毒,虽然灵敏并能在疾病早期对病毒进行检测,但由于分析步骤繁琐且容易造成污染,使用受到限制^[3]。荧光定量 PCR 技术是最近发展起来检测新技术,利

用 PCR 对模板 DNA 的高效扩增, 探针技术的高特异性和光谱技术的敏感性以及定量的特点, 比普通 PCR 更加简便、快捷、灵敏、特异并且减少了污染环节。本研究利用荧光定量 PCR 技术建立乙脑病毒快速检测方法, 初步应用于蚊虫媒介的检测。

材料与方法

1. 试剂: MEM 培养液(1%谷氨酰胺, 1%青霉素和链霉素)购自 Gibco 公司。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。病毒 RNA 提取的试剂盒购自 Qiagen 公司。One step RT-PCR Kit (D044A) 购自大连 TaKaRa 公司。

2. 引物与探针设计和合成: 从参考国际基因库 (GenBank) 共检索到 20 多株全基因序列, 地理位置分布包括中国、印度、澳大利亚、韩国以及日本, 覆盖主要流行区域和基因型别。利用生物信息学分析软件 DNAMAN 对下载毒株全基因组进行保守性分析; 根据文献提供的 TaqMan PCR 引物探针的设计原则^[4-6], 利用 Primer Express 2.0 辅助进行引物探针设计, 然后进行 Blast 分析验证其种内的广谱性和特异性筛选到以下的引物和探针: JEV-FF: 5' -GGC TCT TAT CAC GTT CTT CAA GTT T-3'; JEV-FR: 5' -TGC TTT CCA TCG GCC YAA AA-3'; JEV-Probe: 5' -AGC ATT AGC CCC GAC CAA GGC G-3'。引物、探针由大连宝生物工程有限公司合成并标记, 探针 5'、3' 端分别标记 FAM 荧光报告基团和 TAMRA 荧光淬灭基团。

3. 病毒核酸的提取: 用 QIAGEN 公司的 Rneasy Mini Kit 对相关样本进行核酸提取, 按试剂盒操作说明书进行。

4. 荧光定量 RT-PCR 反应体系与反应条件的优化: Mg^{2+} 的浓度高低对 Taq 酶的活性与扩增的特异性密切相关, 在同一反应体系条件下改变 Mg 浓度, 分别以 1 mmol/L、2 mmol/L、3 mmol/L、4 mmol/L、5 mmol/L、6 mmol/L 6 个 Mg^{2+} 浓度进行优化, 筛选最佳浓度。用矩阵法优化筛选引物和探针的最佳反应浓度。使用 LightCycle 荧光检测系统进行检测, 反应条件: 42℃, 15 min 反转录, 94℃ 变性 2 min, 以 94℃ 10 s, 60℃ 40 s, 扩增 45 个循环, 在 60℃ 进行单点荧光检测。采用 MJ Research Option™ 2 荧光定量 PCR 仪上的温度梯度功能选定最佳退火检测温度 (T_m), 在 T_m 值 (50 ~ 67℃) 下进行检测, 选择最佳 T_m 温度。优化条件选定原则: 相同模板量下, 循环阈值 (C_t 值) 最小, 荧光信号比活度 (R_n) 最大,

若两者不一致优先考虑 C_t 值。

5. 荧光定量 RT-PCR 反应的灵敏度、特异性和重复性评价: 将 10^5 TCID₅₀/ml (50% 组织培养物感染剂量/ml) 的 SA14-14-2 株病毒做 10 倍梯度稀释, 取 10^5 ~ 10^{-2} TCID₅₀/ml 滴度的病毒各 200 μ l, 提取病毒核酸进行荧光定量 RT-PCR 检测, 以结果阳性的最高稀释度的病毒滴度作为评价敏感性的指标。分别对 1 ~ 4 型登革热病毒、狂犬病毒、SEO 型和 HTN 型汉坦病毒等常见虫媒病毒进行荧光定量 RT-PCR 扩增, 以评价该检测方法的特异性。选择 4 个模板含量不同的标本 a、b、c、d 分别进行 4 次检测。对得到的实验结果 C_t 值进行统计学分析, 计算各检测样品 C_t 值的平均值和变异系数以评价其稳定性或可重复性。

6. 标本采集: 在浙江省仙居、龙泉和慈溪县人房及猪舍采集蚊虫标本, 剔除雄蚊分类后, 蚊虫标本分装入冻存管; 登记编号后保存于 -80℃ 冰箱中。

7. 病毒分离: 从 -80℃ 取出冻存管, 将蚊虫 (约 100 只/批) 倒入研磨器中, 加入 1 ml 含 400 U 双抗的 MEM 液反复研磨至组织碎片基本消失为止。将研磨液吸入离心管, 平衡后于 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min, 取 0.2 ml 上清液接种 BHK-21 细胞, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中吸附 1 h 后弃去接种液体, 加入细胞维持液, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中继续培养; 逐日观察细胞病变, 在 BHK-21 细胞中盲传 3 代, 无病变者弃去。

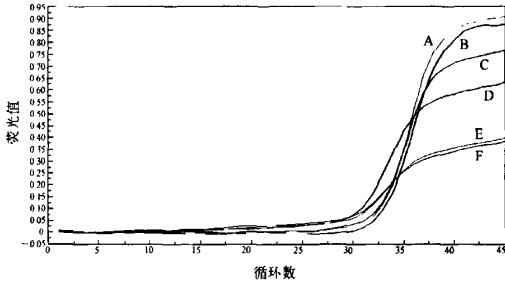
8. 蚊虫标本的检测分析: 对乙脑流行季节的 110 份蚊虫标本, 接种 BHK-21 细胞进行病毒分离实验和 TaqMan RT-PCR 检测分析。

结 果

1. 反应系统优化: 在 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 反应体系中, 调整不同的 Mg^{2+} 浓度, 以同一浓度阳性核酸为模板进行检测, 以临界 C_t 值大小为标准进行筛选, 结果表明 5 mmol/L 为该反应体系的最适 Mg^{2+} 浓度 (图 1)。本研究以提高反应的扩增效率与敏感度为标准, 采用矩阵法对引物与探针反应深度进行优化; 结果表明, 当引物用量为 0.2 μ mol/L 与 0.1 μ mol/L (表 1), 可获得最低 C_t 值和最高荧光强度增加值最高。利用荧光定量 PCR 仪上的梯度功能对 T_m 值 50 ~ 67℃ 之间进行选择, 结果表明, T_m 值为 57.3℃ 时在相同条件获得较低的 C_t 值。

2. 荧光定量 RT-PCR 检测方法的特异性: 对 1 ~ 4 型登革热病毒、狂犬病毒、SEO 型 HTN 型汉坦病毒

及乙脑病毒检测结果表明,只有乙脑病毒出现阳性扩增曲线,其他病毒及阴性对照检测结果均为阴性(图2)。表明该方法与其他常见病毒间无交叉反应,具有良好的特异性。



注: A: 1 mmol/L; B: 2 mmol/L; C: 3 mmol/L; D: 5 mmol/L; E: 4 mmol/L; F: 6 mmol/L

图1 乙脑病毒 TaqMan PCR 方法 Mg²⁺ 优化图

表1 引物和探针反应浓度的筛选结果(Ct 值)

引物浓度 (μmol/L)	探针浓度(μmol/L)					
	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
0.2	24.53	24.87	24.99	25.10	25.31	26.01
0.4	24.84	25.11	25.29	25.47	25.98	26.37
0.6	24.85	25.09	25.26	25.48	25.87	26.48
0.8	25.13	25.28	25.66	25.71	25.80	25.97
1.0	25.53	25.70	25.87	25.98	26.03	26.04

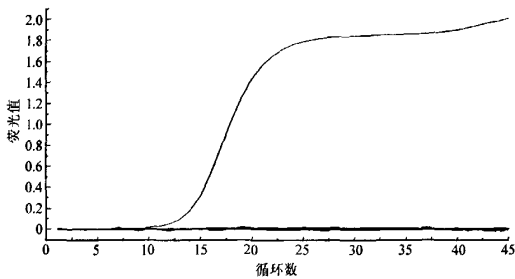
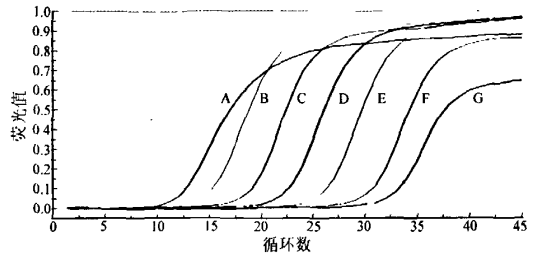


图2 乙脑病毒 TaqMan PCR 方法特异性实验扩增图

3. 荧光定量 RT-PCR 检测方法的敏感性: 乙脑病毒 SA14-14-2 株胞进行病毒效价滴定后(10⁵ TCID₅₀/ml), 稀释成 100 000、10 000、1000、100、10、1、0.1、0.01 TCID₅₀ 提取病毒 RNA, 用 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 进行检测, 敏感性达到 0.1 TCID₅₀ (图3)。

4. 荧光定量 RT-PCR 检测方法的稳定性: 分析实验结果, 对 4 个不同浓度样品重复检测 4 次得到的 Ct 值进行汇总, 并且通过计算 Ct 值的平均值以及标准差, 进一步可以得到各检测项目的变异系数。4 个检测样品均能够判定为阳性, 并且 Ct 值变异系数在合理范围内可以得出结论, 构建的乙脑病毒 TaqMan RT-PCR 检测方法具有良好的稳定性(表 2), 为乙脑病毒的检测奠定了基础。



注: A: 10⁵ TCID₅₀; B: 10⁴ TCID₅₀; C: 10³ TCID₅₀; D: 10² TCID₅₀; E: 10 TCID₅₀; F: 10⁰ TCID₅₀; G: 10⁻¹ TCID₅₀

图3 乙脑病毒 TaqMan PCR 方法灵敏性实验扩增图

表2 乙脑病毒 TaqMan RT-PCR 检测系统稳定性分析实验结果

样本名称	样本 Ct 值					
	1	2	3	4	平均值	标准差
a	22.66	22.65	22.72	22.70	22.683	0.033
b	25.92	25.95	25.99	26.10	25.990	0.079
c	28.80	29.16	29.01	28.95	28.980	0.149
d	31.71	31.57	32.34	32.35	31.992	0.411

5. 蚊虫标本的检测: 将 110 份蚊虫标本的研磨液分别接种 BHK-21 细胞进行病毒分离, 结果显示, 在仙居、龙泉和慈溪县采集的 110 份蚊虫标本中, 经分离并鉴定得到 3 株乙脑病毒; TaqMan RT-PCR 检测以 Ct 值 < 35 并且扩增曲线呈“S”形为阳性的判定原则: 110 份蚊虫标本的 TaqMan RT-PCR 检测结果 7 份可以判定为乙脑病毒阳性, 分别是 XJP613、XJ69、L5、XJ15、XJ31、L11 和 CX10, 检测 Ct 值 < 35 (表 3); 结合扩增曲线可以判定为乙脑病毒阳性; 而病毒分离结果对应仅在 XJP613、XJ69 和 L5 中分离到。

表3 7批乙脑病毒阳性蚊虫标本检测结果

标本	荧光定量检测		病毒分离及鉴定结果
	Ct 值	检测结果	
XJP613	31.33	+	+
XJ69	28.79	+	+
XJ15	24.62	+	-
XJ31	29.21	+	-
L5	25.18	+	+
L11	26.35	+	-
CX10	32.63	+	-

讨 论

蚊虫是乙脑病毒传播的重要媒介之一, 其带病毒情况直接影响着乙脑的流行, 因此加强蚊虫乙脑病毒带病毒率的研究有助于预防和控制该病的流行和暴发; 目前对于蚊虫标本中携带乙脑病毒检测常采用病毒分离培养法和普通 RT-PCR 法。但病毒分离培养技术复杂、费时, 不适合用于快速诊断; 而普

通 PCR 法易造成产物污染且只能定性检测,无法对病毒进行定量检测。近年来新发展起来的荧光定量 PCR 检测技术,具有灵敏度高、特异性强、准确快速且可以实时定量的特点,适合于快速诊断,而且闭管式操作减少了污染与假阳性结果的出现;已在病原体定性定量检测中得到广泛的应用。

本研究从 NCBI 上下载几十株不同年代、不同地区的乙脑病毒毒株,对其序列进行同源性对比与分析,选取保守性较高的核蛋白基因作为扩增区域,设计出荧光定量 PCR 引物和 TaqMan 探针。并将所设计引物与探针同乙脑、人类基因组、蚊虫相关基因以及森林脑炎病毒、西尼罗病毒和西方马脑炎病毒等相关病毒基因序列做同源性比较。结果表明,我们所设计的引物与探针仅与乙脑病毒具有良好的同源性,而与其他病毒的基因的同源性很低,显示了很好的特异性,不具有交叉性,能够区分鉴定。实验检测了 7 种病毒,包括登革热 1~4 型病毒、狂犬病毒、SEO 和 HTN 型汉坦病毒检测均为阴性,进一步验证了引物和探针的特异性。为了保证方法的灵敏度和扩增效率,获得检测最低 C_t 和最高荧光强度值 (R_n),本研究对所建立的荧光定量 RT-PCR 方法进行了几方面的条件优化: Mg^{2+} 浓度、引物、探针浓度和 T_m 温度。其中 T_m 温度对荧光强度 (R_n) 产生显著的影响,优化 T_m 温度后荧光强度可产生 2 倍以上的增加。

本研究通过对 110 份蚊虫标本同时进行 TaqMan RT-PCR 检测与病毒分离和分子生物学鉴定,对比两种方法检测的一致性、灵敏性、实用性等指标,通过检测比较发现,病毒分离方法最终经过分子生物学鉴定得到 3 株乙脑病毒,而 TaqMan RT-PCR 检测方法共检出 7 份标本阳性(包括病毒分离阳性的 3 份标本)。TaqMan RT-PCR 检测阳性标本, C_t 值在 24~35 个循环之间。在病毒分离与

Taq-Man RT-PCR 检测均阳性的蚊虫标本的 C_t 值分别是 31.33、28.79、25.18,而 TaqMan RT-PCR 检测阳性,病毒分离阴性的标本的 C_t 值则分别为 24.62、29.21、26.35 和 32.63,最晚在 32.63。从上述 C_t 值的数据分析可以看出,在某些蚊虫标本中乙脑病毒的含量可能很高,却未分离到病毒。提示病毒分离方法存在多因素影响实验结果,如病毒分离实验操作的熟练程度、规范程度以及接种细胞的灵敏程度等。而荧光定量 RT-PCR 方法则有效地解决病毒分离上述缺点。总之,特异性检测乙脑病毒核蛋白基因片段的 TaqMan RT-PCR 检测体系的建立,将为乙脑的诊断和研究提供一种新技术,也为我国乙脑流行病学调查提供了一种更为快捷和特异的方法。

参 考 文 献

- [1] Endy TP, Nisalak A. Japanese encephalitis virus: ecology and epidemiology. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002, 267: 11-48.
- [2] Tsai TF. New initiatives for the control of Japanese encephalitis by vaccination: minutes of a WHO/CV1 meeting, Bangkok, Thailand, 13-15 October 1998. *Vaccine*, 2000, 26(5): 1-25.
- [3] 孙静, 陶三菊, 陈伯权, 等. 利用 RT-PCR 方法检测乙型脑炎病人标本中的乙脑病毒. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2000, 14(2): 184-187.
- [4] Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, et al. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza virus 1, 2, 3 and 4. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(4): 1564-1569.
- [5] Stone B, Burrows J, Schepetiuk S, et al. Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real time PCR. *J Virol Meth*, 2004, 117(2): 103-112.
- [6] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR assays. *J Mol Endocrinol*, 2000, 25(2): 169-193.

(收稿日期: 2008-08-31)

(本文编辑: 尹廉)

· 有错即改 ·

本刊 2009 年第 1 期目录中作者姓名的更正

本刊 2009 年第 1 期目录中“临床流行病学”栏目第 2 篇文章“幽门螺杆菌感染与大肠癌关系的 Meta 分析”的第一作者“张研”应改为“张妍”。谨此更正。特对作者深表歉意。

本刊编辑部