

- id of patients with arthritis[J]. Rheumatol Int, 2011, 31(4):543-547.
- [12] Li G, Liu D, Guo S, et al. Anti-invasive effects of Celastrolus Orbiculatus extract on interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha combination-stimulated fibroblast-like synoviocytes[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14:62.
- [13] Xue M, Mckelvey K, Shen K, et al. Endogenous MMP-9 and not MMP-2 promotes rheumatoid synovial fibroblast survival, inflammation and cartilage degradation [J]. Rheumatology(Oxford), 2014, 53(12):2270-2279.
- [14] Sun S, Bay-Jensen AC, Karsdal MA, et al. The active form of MMP-3 is a marker of synovial inflammation and cartilage turnover in inflammatory joint diseases [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2014, 15:93.
- [15] Mcinnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. N Engl J Med, 2011, 365(23):2205-2219.
- [16] Moon SJ, Park MK, Oh HJ, et al. Engagement of toll-like receptor 3 induces vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in human rheumatoid synovial fibroblasts [J]. Korean J Intern Med, 2010, 25(4):429-435.
- [17] Madge LA, Kluger MS, Orange JS, et al. Lymphotoxin-alpha 1 beta 2 and LIGHT induce classical and noncanonical NF-kappa B-dependent proinflammatory gene expression in vascular endothelial cells[J]. J Immunol, 2008, 180(5):3467-3477.
- [18] Wang F, Yang JL, Yu KK, et al. Activation of the NF-kB pathway as a mechanism of alcohol enhanced progression and metastasis of human hepatocellular carcinoma [J]. Mol Cancer, 2015, 14:10.
- [19] Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease; molecular mechanisms and clinical implications [J]. Clin Sci(Lond), 2009, 117(3):95-109.
- [20] Park JW, Kwon OK, Kim JH, et al. Rhododendron album Blume inhibits iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW264. 7 cells through the downregulation of NF-kB signaling[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(4):987-994.
- [21] Chou LW, Wang J, Chang PL, et al. Hyaluronan modulates accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinase-3 in the synovium of rat adjuvant-induced arthritis model[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(3):R90.
- [22] Zhou HY, Shin EM, Guo LY, et al. Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonokiol is a function of the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264. 7 macrophages via NF-kappaB, JNK and p38 MAPK inactivation[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 586(1/3):340-349.
- [23] Yoon HY, Lee EG, Lee H, et al. Kaempferol inhibits IL-1β-induced proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and the production of COX-2, PGE2 and MMPs[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(4):971-977.
- (收稿日期:2016-02-26 修回日期:2016-05-09)
- 综 述 •

脊髓灰质炎病毒实时荧光定量 RT-PCR 方法的应用与发展

唐海淑, 杜相品, 甫尔哈提·吾守尔, 范新春, 关 静 综述, 崔 惠 审校
(新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心免疫规划科, 乌鲁木齐 830011)

关键词: 脊髓灰质炎病毒; 实时荧光定量 RT-PCR; 应用发展

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 18. 038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)18-2603-03

1996 年美国 Applied Biosystems 公司推出了实时荧光定量 PCR 技术, 该技术是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法^[1-2]。该技术实现了 PCR 从定性到定量的飞跃, 可动态实时检测核酸产物的形成, 无需后处理过程, 避免了扩增产物的污染, 而且具有直观、重复性好、特异性强、敏感性高、定量准确、自动化程度高、速度快、全封闭和易操作等优点, 因而目前已得到广泛应用^[3-4]。

2011 年 8 月新疆维吾尔自治区局部地区发生输入性脊髓灰质炎野病毒(WPV)的疫情后, 为了缩短检测时限, 中国决定从 2013 年起在脊髓灰质炎(下称脊灰)实验室网络启用世界卫生组织推荐的脊灰病毒(PV)分离新的检测流程。新检测流程要求省级脊灰实验室经过培训考核合格后, 使用美国疾病预防控制中心研制的实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(rRT-PCR)试剂和方法, 对分离出的 PV 进行型内鉴定(ITD)。

1 实时荧光定量 RT-PCR 方法

1.1 工作原理 根据原理的不同, 实时荧光定量 RT-PCR 检

测方法主要分为利用与靶序列特异杂交的探针来指示扩增产物增加的探针类和利用荧光染料或者特殊设计的引物来指示扩增的增加非探针类 2 种^[5]。荧光染料技术是在 PCR 反应体系中加入荧光探针, 利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板 DNA 进行分析的 1 种方法^[6]。荧光染料法是利用荧光染料染色 DNA 双链结构, 在 DNA 双链结构的小沟中, 当荧光染料处于游离状态时, 检测不到荧光信号, 当它与 dsDNA 结合后荧光强度明显增强, 即被荧光探测系统检测到, 荧光信号强度的增加是与初始模板量相关的, 由此可以进行定量 DNA 分析^[7]。荧光染料目前主要有 Pico Green 和 SYBR Green^[8]。PV 实时荧光定量 RT-PCR 采用的是 TaqMan 荧光探针法。

1.2 定量原理 实时荧光定量 RT-PCR 方法检测到的荧光信号强度与 PCR 反应产物的量呈正相关, 即每扩增 1 条 DNA 链, 就有 1 个荧光分子形成, 实现了荧光信号的累积与 PCR 产物的形成完全同步, 这样就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化, 从而得到 1 条荧光扩增曲线图^[9]。一般而言, 荧光扩

增曲线可分为 3 个阶段:荧光本底信号阶段、荧光信号指数扩增阶段和平台期。PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,缺省设置是 3~15 个循环,在指数增长阶段,每个循环 PCR 产物量大约增加 1 倍,随着反应的进行,反应体系组成成分的消耗,反应进入平台期^[10]。荧光信号扩增期 PCR 产物量的对数之间存在线性关系,可以在指数期的某一点上来检测 PCR 产物的量,并由此推断模板最初值与起始模板量的含量^[11]。在实际检测过程中,PCR 扩增时利用 Taq DNA 聚合酶的 5′~3′外切酶活性将探针水解成单核苷酸,游离的荧光报告基团导致荧光信号的增加,通过对荧光信号强度的实时动态监测对扩增产物进行定量分析,设定一定的荧光信号域值^[12-13]。如果检测到荧光信号超过域值,就被认为是真正的信号,它可用于定义样本的域值循环数 *Ct* (*C* 代表循环 cycle, *t* 代表域值 threshold)。每个模板的 *Ct* 值与该模板的起始拷贝数的对数呈线性关系,起始拷贝数越大, *Ct* 值越小^[14]。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线,只要获得未知样品的 *Ct* 值,即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数^[15]。

2012 年 3 月,新疆脊灰实验室与部分中国脊灰网络实验室的成员接受了由世界卫生组织和中国疾病预防控制中心病毒所国家脊灰实验室共同主办的 rRT-PCR 型内鉴定方法的培训,9 月顺利完成考核,取得了型内鉴定实验室的资质,随后,

PV 实时荧光定量 RT-PCR 方法便在中国脊灰网络实验室中普遍应用并逐步发展。基于美国 ABI 公司的 7500 型荧光定量 RT-PCR 仪完成的 PV 的荧光定量 RT-PCR 检测方法包括型内鉴定 (ITD) rRT-PCR 和疫苗衍生株 (VDPV) 筛查 rRT-PCR。通过 ITD rRT-PCR 反应可鉴别 PV 的 I、II、III 血清型,VDPV rRT-PCR 反应可鉴别其疫苗类似株 (SL)、疫苗衍生株 (VDPV) 和野毒株 (WPV)。

2 实时荧光定量 RT-PCR 方法的应用和发展

实时荧光定量 RT-PCR 方法在脊灰实验室网络中应用后经历了 3 次发展,从扩增条件的优化到扩增试剂的发展,都体现了该方法经过不断的优化和发展提高了 PV 型内鉴定的准确性、敏感性和快速性,同时也减少了 PV 的漏检。方法 2 相比方法 1,增加了逆转录阶段的循环,虽然该方法扩增时间延长了,但却增加了敏感性, *Ct* 值明显减小,且扩增曲线容易判断;方法 1 和方法 2 的 ITD rRT-PCR 和 VDPV rRT-PCR 反应条件各不相同。鉴于 II 型 WPV 已在全球范围内消灭,因而方法 3 的试剂中去除了 II 型 WPV 的引物和探针,同时增加了 I 型 WPV 和 III 型 WPV 的全球流行分支的鉴别引物和探针,使得 PV 的鉴别更加符合具体情况,同时, rRT-PCR 反应和 VD-PV rRT-PCR 反应在相同的条件下进行,进一步简化了操作步骤。几种方法的比较见表 1。

表 1 PV 实时荧光定量 RT-PCR 方法的发展

组别		方法 1	方法 2	方法 3
检测脊灰病毒数(<i>n</i>)	I	34	61	30
	II	50	79	59
	III	39	44	70
VDPV 假阳性数(<i>n</i>)	I	19	33	0
	II	22	30	25
	III	16	19	2
假阳性[%(<i>n</i> / <i>n</i>)]	I	55.9(19/34)	54.1(33/61)	0(0/30)
	II	44.0(22/50)	62.1(49/79)	42.4(25/59)
	III	41.1(16/39)	43.2(19/44)	2.8(2/70)
反应管数(<i>n</i>)	ITD	6	6	5
	VDPV	3	3	3
引物和探针数(<i>n</i>)	ITD	8	8	9
	VDPV	3	3	3
扩增条件	ITD	42 ℃ 45 min 逆转录, 95 ℃ 3 min 变性,以 95 ℃ 24 s,44 ℃ 30 s,65 ℃ 24 s 扩增 40 个循环,在 44 ℃ 采集荧光	42 ℃ 45 min 逆转录,95 ℃ 3 min 变性,以 95 ℃ 24 s,44 ℃ 30 s,60 ℃ 24 s 扩增 15 个循环,以 95 ℃ 24 s,47 ℃ 30 s,65 ℃ 24 s 扩增 40 个循环,在 47 ℃ 采集荧光	42 ℃ 45 min 逆转录,95 ℃ 3 min 变性,以 95 ℃ 24 s,47 ℃ 30 s,65 ℃ 24 s 扩增 40 个循环,在 47 ℃ 采集荧光
	VDPV	42 ℃ 45 min 逆转录, 95 ℃ 3 min 变性,以 95 ℃ 24 s,50 ℃ 30 s,65 ℃ 24 s 扩增 40 个循环,在 50 ℃ 采集荧光	42 ℃ 45 min 逆转录,95 ℃ 3 min 变性,以 95 ℃ 24 s,44 ℃ 30 s,60 ℃ 24 s 扩增 5 个循环,以 95 ℃ 24 s,50 ℃ 30 s,65 ℃ 24 s 扩增 40 个循环,在 50 ℃ 采集荧光	42 ℃ 45 min 逆转录,95 ℃ 3 min 变性,以 95 ℃ 24 s,47 ℃ 30 s,65 ℃ 24 s 扩增 40 个循环,在 47 ℃ 采集荧光
扩增所用时间(min)	ITD	160	202	160
	VDPV	147	168	160
荧光报告基团		FAM,Cy5,ROX	FAM,Cy5,ROX	VIC,FAM,Cy5,ROX
荧光淬灭基团		BHQ-1,BHQ-2,BHQ-3	BHQ-1,BHQ-2,BHQ-3	TAMRA ,BHQ-1,BHQ-2,BHQ-3

3 小 结

中国脊灰实验室网络在应用实时荧光定量 RT-PCR 方法之前,对 PV 的血清型鉴定采用血清中和定型试验。通过中和试验,可鉴定出 PV 的血清型,并可将混合血清型的病毒中和成单一血清型,但此法要求在敏感细胞中进行,操作繁琐,耗时长,且无法判断 PV 的基因型^[16-18]。PV 不断发展的 3 种实时荧光定量 RT-PCR 检测方法不需要提取核酸,只需直接将病毒分离物作为扩增反应的模板,逆转录、扩增反应和分析在完全闭管的条件下进行,有效防止了 PCR 产物的污染;分析过程由 PCR 仪完成,无需再进行电泳和紫外灯观察,减少了操作步骤,提高了效率,同时也提高了检测结果的可靠性^[19-21]。病毒分离培养方法是 PV 等肠道病毒分离鉴定的金标准,此法繁琐复杂且耗时长,所以不能用于临床标本的快速检测^[22]。实时荧光定量 RT-PCR 跟传统病毒分离培养方法比较,具有快速、灵敏、特异的特点,但目前实时荧光定量 RT-PCR 方法仍无法取代病毒分离,只能作为病毒分离的辅助和补充手段。实时荧光定量 RT-PCR 反应为了不漏检任何 1 株 VDPV,在增加检测敏感性的同时,就导致了一定的假阳性率,尤其是 II 型 VDPV。方法 2 与方法 1 相比,反应试剂相同,只是增加了扩增条件的逆转录循环,这导致了检测的敏感性有所增加,但假阳性率也增高了,II 型 VDPV 假阳性率增高得尤为明显;方法 3 对反应试剂和扩增条件都进行了改良,I 型和 III 型 VDPV 检测的精确性大大提高了,检测的 30 株 I 型 PV,已经没有 VDPV 的假阳性率,70 株 III 型 PV 其 VDPV 的假阳性率已经降低到 2.8%,II 型 PV 的 VDPV 假阳性率也明显降低,但仍然高达 42.4%,这可能与 II 型 PV 的突变热点较多,引物设计很难完全覆盖所有的突变位点有关^[23-24]。

目前实时荧光 PCR 定量分析技术,已成为公认的最具应用前景的靶模板拷贝数的定量分析技术,在基因表达、基因工程、药物疗效、病原体检测和转基因成分检测等领域中得到广泛应用^[25]。但 PV 的 rRT-PCR 方法需要继续发展改良,以降低 II 型 VDPV 的假阳性率,以便更加全面地适用于中国脊灰实验室网络。

参考文献

- [1] 钟江华,张光萍,柳小英.实时荧光定量 PCR 技术的研究进展与应用[J].氨基酸和生物资源,2011,33(2):68-72.
- [2] 李喆,张影,徐颖华,等. SYBR Green 实时荧光定量聚合酶链反应宽范围检测人 GAPDH 基因体系的建立[J].国际检验医学杂志,2015,36(22):3229-3231.
- [3] 赵锦伟.流行性感病毒检测方法的研究进展[J].职业与健康,2014,30(11):1553-1555.
- [4] 李娇,沈志强,祖立闯.猪瘟疫病毒荧光定量 PCR 检测方法研究进展[J].动物医学进展,2012,33(5):89-93.
- [5] 廉红霞,高腾云,傅彤,等.实时荧光定量 PCR 方法研究进展[J].江西农业学报,2010,22(10):128-129.
- [6] 王娟,方存磊.实时荧光 PCR 检测军团菌研究进展[J].国际检验医学杂志,2010,31(9):964-966.
- [7] 徐楠楠,胡桂学.实时荧光定量 PCR 技术的研究进展及应用[J].黑龙江畜牧兽医,2011,11(21):24-27.

- [8] 徐敏,向华.流感病毒核酸检测方法研究进展[J].动物医学进展,2011,32(1):89-92.
- [9] 吴婷,陈金梅,李莹.实时荧光定量 PCR 技术研究进展及应用[J].大家健康,2014,8(2):12-13.
- [10] 王惠,钱冲,郭峰,等.实时定量 PCR 检测技术研究进展[J].种子,2013,32(6):43-47.
- [11] 陈风华,孙建华,马盈盈,等.实时荧光定量 PCR 技术在病原体快检中的研究进展与应用[J/CD].中华临床医师杂志(电子版),2013,7(23):11004-11006.
- [12] 陈棋炯,孙永祥,丁水军,等.应用实时荧光定量 PCR 技术快速检测甲型 H1N1 流感病毒[J].中国卫生检验杂志,2010,20(6):1394-1396.
- [13] 颜善活,孙雷,符可鹏,等. TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测肺炎链球菌[J].国际检验医学杂志,2014,35(2):140-141.
- [14] 陈旭,齐凤坤,康立功,等.实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J].东北农业大学学报,2010,41(8):148-155.
- [15] 陈淑云,采云.不同实时荧光定量聚合酶链反应技术研究进展[J].国际检验医学杂志,2012,33(5):558-560.
- [16] 张晋,马可,白亮,等. Vero 细胞和脊髓灰质炎病毒在无血清条件下的培养探究[J].微生物学免疫学进展,2013,41(5):18-22.
- [17] 杨宗照,王剑峰,谢正,等.猪瘟疫病毒强弱毒株通用性 RT-PCR 检测方法研究进展[J].中国动物检疫,2012,9(11):71-76.
- [18] 周贺娟,王云龙,任瑞敏.流感病毒检测方法研究进展[J].动物医学进展,2011,32(10):90-93.
- [19] 代海丽,高铁磊,朱琳,等.柯萨奇病毒 B3 的 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J].中国卫生检验杂志,2012,22(1):8-10.
- [20] 李娟.梅毒螺旋体 PCR 检测技术研究进展[J].中国卫生检验杂志,2010,20(7):1834-1835.
- [21] 闫超.实时荧光定量 PCR 法检测儿童常见病原菌的研究进展[J].国际检验医学杂志,2013,34(9):1114-1116.
- [22] 荆成宝,刘婕,赵斌.实时荧光定量 PCR 技术检测患儿手足口病病原体[J].国际检验医学杂志,2013,34(18):2458-2459.
- [23] 蒋华芳,严冬梅,祝双利,等.中国大陆 2010 年非野毒 II 型脊髓灰质炎病毒基因特征分析[J].病毒学报,2012,28(2):130-135.
- [24] 张岩,季圣翔,张晓丽,等.2010 年山东省环境污水中脊髓灰质炎病毒的监测及其基因特征分析[J].病毒学报,2011,27(4):337-341.
- [25] 邓平建,杨冬燕.探讨降低实时荧光 PCR 定量分析系统误差的对策[J].中国卫生检验杂志,2011,21(2):287-289.

(收稿日期:2016-02-29 修回日期:2016-05-11)