

• 论 著 •

柯萨奇病毒 A 组 6 型 TaqMan 一步法实时荧光定量 PCR 方法的建立*

刘红波^{1,2}, 丛山日^{1,2}, 许丹茵^{1,2}, 黄小琴^{1,2}, 孙浩^{1,2}, 杨昭庆^{1,2}, 马绍辉^{1,2,△}

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院医学生物学研究所, 云南昆明 650118; 2. 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 云南昆明 650118)

摘要:目的 建立一种灵敏、特异的一步法实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR), 用于快速、准确地检测柯萨奇病毒 A 组 6 型(CV-A6)。方法 利用 MEGA7.0 软件比对 GenBank 数据库中 15 条 CV-A6 VP1 序列, 选择高保守区域设计特异性引物和探针; 以体外转录获得的 RNA 为标准品, 绘制标准曲线, 建立检测 CV-A6 病毒的 RT-qPCR 方法; 对该方法的灵敏度、特异度、重复性进行评估; 并利用该方法对 CV-A6 病毒感染后的乳鼠组织进行病毒载量的检测。结果 该方法在 $10^2 \sim 10^{11}$ copy/ μ L 模板范围内出现良好的扩增曲线, 检测极限约为 10^2 copy/ μ L, 标准曲线中 R^2 系数为 0.999, 扩增效率为 109.6%; 且该方法对肠道病毒 71 型(EV-A71)、柯萨奇病毒 A 组 16 型(CV-A16)和柯萨奇病毒 A 组 10 型(CV-A10)均无交叉反应; 另外, 该方法在组间重复试验中, 变异系数(CV)值小于 2.0%。结论 本实验建立的方法具有较强的灵敏度、特异度和重复性, 可用于 CV-A6 病毒的日常检测、实验室诊断和定量分析。

关键词:柯萨奇病毒 A 组 6 型; TaqMan 探针; 荧光定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.11.008 中图法分类号:R737.23

文章编号:1673-4130(2020)11-1314-05 文献标识码:A

Establishment of a one-step TaqMan real-time quantitative PCR assay to detect Coxsackievirus A6*

LIU Hongbo^{1,2}, CONG Shanri^{1,2}, XU Danhan^{1,2}, HUANG Xiaoqin^{1,2},
SUN Hao^{1,2}, YANG Zhaoqing^{1,2}, MA Shaohui^{1,2,△}

(1. Institute of Medical Biology & Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan 650118, China; 2. Key Laboratory for Research and Development of Major Infectious Diseases Vaccine in Yunnan, Kunming, Yunnan 650118, China)

Abstract: Objective To establish a sensitive and specific one-step real-time quantitative PCR (RT-qPCR) for rapid and accurate detection of coxsackievirus A6 (CV-A6). **Methods** MEGA7.0 software was used to compare 15 CV-A6 VP1 sequences in GenBank database, and highly conserved regions were selected to design specific primers and probes. RNA obtained from in vitro transcription was used as the standard, standard curve was drawn, and a RT-qPCR method was established to detect CV-A6. The sensitivity, specificity and repeatability of this method were evaluated, and the viral load of suckling mouse tissue infected with CV-A6 was detected by this method. **Results** The established method showed a good amplification curve in the range of $10^2 - 10^{11}$ copies/ μ L template, the lowest detection limit was about 10^2 copies/ μ L. The R^2 coefficient in the standard curve was 0.999, and the amplification efficiency was 109.6%. There was no cross-reaction was found with enterovirus 71(EV-A71), coxsackievirus A16 (CV-A16) and coxsackievirus A10(CV-A10) in this method. In addition, the coefficient of variation(CV) value of this method was less than 2.0% in the intergroup repeated experiments. **Conclusion** The method established in this experiment has strong sensitivity, specificity and repeatability, and can be used for routine detection, laboratory diagnosis and quantitative analysis of CV-A6 virus.

Key words: coxsackievirus A6; TaqMan probes; quantitative real time PCR

自 1998 年以来,手足口病(HFMD)已成为全球重要的公共卫生问题^[1]。与 HFMD 相关的病原体较

* 基金项目:云南省科技计划项目(2017FA006)。

作者简介:刘红波,女,在读硕士研究生,主要从事肠道病毒方面的研究。△ 通信作者, E-mail:shaohuima70@126.com。

本文引用格式:刘红波,丛山日,许丹茵,等.柯萨奇病毒 A 组 6 型 TaqMan 一步法实时荧光定量 PCR 方法的建立[J].国际检验医学杂志, 2020,41(11):1314-1317.

为复杂,其中,以肠道病毒 71 型(EV-A71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(CV-A16)为主^[2]。然而,从 2008 年起,与柯萨奇病毒 A 组 6 型(CV-A6)相关的 HFMD 病例在多个国家及我国许多地区被报道。并且,CV-A6 病毒感染引起的 HFMD 具有非典型临床症状,主要表现为非典型疱疹、甲状腺肿、脱甲等,严重危害公众健康^[3-7]。因此,CV-A6 病毒得到了我国疾病预防控制部门和医疗卫生机构的充分重视,被纳入日常监测和临床检验中。传统检测病毒的方法有病毒分离、生化、血清学诊断等,这些方法虽然可靠,但检测周期长,操作复杂,不易快速得出结论。近年来发展起来的荧光定量聚合酶链反应(PCR),因其灵敏度、特异性、重复性好且操作简便快速,被广泛应用于病原体的定性定量检测^[8]。

1 材料与方 法

1.1 标本 CV-A6(KYN-A1205、YN-A13)、EV-A71、CV-A16 和 CV-A10 毒株由本实验室保存并提供,SPF 级别实验动物 BALB/c 孕鼠由本单位的小动物实验部提供,实验动物操作经中国医学科学院医学生物学研究所动物伦理委员会批准(批准编号:DWSP201804001)。

1.2 仪器与试剂 荧光定量 PCR 仪 CFX96 (BIO-RAD,美国)、病毒 RNA 提取试剂盒(Axygen Body Fluid viral DNA/RNA Miniprep Kit,美国)、病毒 RNA 扩增试剂盒(Primescript™ One Step RT PCR Kit Ver. 2)、琼脂糖凝胶回收 DNA 试剂盒(E. Z. N. A.™ Gel Extraction Kit,美国)、加尾试剂盒(DNA A-Tailing Kit)、T 载体(pMD™18-T Vector Cloning Kit)、质粒 DNA 小量提取试剂盒(thermo scientific™/GeneJET Plasmid Miniprep)、体外转录试剂盒(In vitro Transcription T7 Kit, for siRNA Synthesis)、核酸稀释液(EASY Dilution, for Real Time PCR)、一步法实时荧光定量 PCR 试剂盒(One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit, for Perfect Real Time)等。

1.3 引物和探针设计 从 GenBank 数据库中下载 15 条 CV-A6 VP1 基因序列,利用 MEGA7.0 软件比对后找出保守区域设计特异性引物(CV-A6-qP-F、CV-A6-qP-R)和 Taqman 探针(CV-A6-probe),利用 NCBI 数据库中 Primer-BLAST 检测引物和探针的特异性。引物和探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,其中,探针 5' 标记的荧光报告基因为 FAM,3' 标记的荧光淬灭基因为 BHQ。

1.4 阳性 RNA 标准品的建立 以本实验室分离并鉴定为 CV-A6 的毒株 KYN-A1205(基因登录号:MN184853)作为模板,设计扩增引物 CV-A6-VP1-F 和 CV-A6-VP1-R,其中上游引物包含 T7 启动子,且该对引物包含 CV-A6-qP-F、CV-A6-qP-R 引物及 CV-A6-probe。采用病毒 RNA 扩增试剂盒进行 RT-PCR 反应,阳性 PCR 产物经琼脂糖凝胶试剂盒回收后利用 DNA 加尾试剂盒对其 3' 末端加“A 尾”;与

pMD18-T Vector 连接并转化 DH5α 感受态细胞,菌落 PCR 确定阳性克隆;利用质粒提取试剂盒提取质粒,送往硕擎(昆明)生物技术有限公司并用 pMD18-T Vector 通用引物 M13F 和 M13R 测序确定目的片段插入的方向;Sal I 限制性内切酶将重组质粒线性化后切胶回收;体外转录试剂盒转录出目的 RNA,并用紫外分光光度计测定其水平;根据公式计算拷贝数:单位体积 RNA 拷贝数(copy/mL) = $6.02 \times 10^{23} \times (X \text{ g/mL}) / (\text{RNA 碱基数} \times 340)$,RNA 于 -20 °C 保存备用。其中,本实验所用到的引物和探针序列见表 1。

表 1 引物和探针序列

名称	序列(5'→3')	位置
CV-A6-qP-F	TAC CAC CGG GAR AAA CGT CCA CG	
CV-A6-qP-R	CGG TCA GYT GCA GTG TTA GT	
CV-A6-probe	FAM-ACG TGA GAG CTT GGG TAC MIA GAC CCC TTC-BHQ	3184—3213
CV-A6-VP1-F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GTC AGA TCT GCA GGT ATT AC	2020—2040
CV-A6-VP1-R	GAG GAC ACC AGA AGA TCT CG	3488—3469
M13F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	

注:下划线序列为 T7 启动子序列。

1.5 RT-qPCR 方法的建立 反应体系(20 μL): 2 × One Step RT-PCR Buffer III 缓冲液 10 μL, TaKaRa Ex Taq HS(5 U/μL)为 0.4 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix II 为 0.4 μL, CV-A6-Probe(10 μmol/L)为 0.8 μL, CV-A6-qP-F(10 μmol/L)为 0.4 μL, CV-A6-qP-R(10 μmol/L)为 0.4 μL, RNA 模板为 1 μL, RNase Free H₂O 为 6.6 μL, 其中引物和探针水平为试剂盒推荐的最佳浓度。按照说明书设置反应条件: 42 °C 5 min, 95 °C 10 s, 另 95 °C 5 s, 60 °C 30 s 共 40 个循环。

1.6 灵敏度试验 根据上述 RNA 拷贝数计算公式,用核酸稀释液 EASY Dilution(for Real Time PCR)将 RNA 标准品稀释至初始浓度 834 ng/μL(对应拷贝数为 10¹² copy/μL),连续 10 倍梯度稀释,从 10¹¹ ~ 10⁰ copy/μL,并设置无模板对照(NTC),按照上述反应体系及反应条件进行一步法 RT-qPCR,从而确定检测最低拷贝数的极限。为了评估该标准品的重复性和稳定性,每个稀释度设置 3 个复孔。选取上述 9 个稀释度(10³ ~ 10¹¹ copy/μL)对应拷贝数的对数和循环阈值 Ct 值,系统自动生成标准曲线。

1.7 特异度试验 对 EV-A71、CV-A16、CV-A6 和 CV-A10 核酸进行检测以评估该方法的特异度。

1.8 乳鼠组织病毒载量检测 毒株 YN-A13 感染 1 日龄 BALB/c 乳鼠后解剖取心、肝、脾、肺、肾、肠、脑组织并提取 RNA,按照上述反应体系及反应条件进行一步法 RT-qPCR,反应结束后根据 Ct 值和标准曲

线公式计算出各组织中的病毒载量。

2 结果

2.1 阳性 RNA 标准品的建立 经 RNA 拷贝数公式计算得出,当 RNA 标准品稀释至初始浓度为 834 ng/ μ L 时,其对应拷贝数为 10^{12} copy/ μ L(RNA 标准品长度为 1 477 nt)。

2.2 实验的灵敏度 经检测, RNA 标准品在 $10^2 \sim 10^{11}$ copy/ μ L 范围内出现良好的扩增曲线,见图 1A。当模板为 10^2 copy/ μ L 时, Ct 值为 35.8,从而认为该方法的检测极限约为 10^2 copy/ μ L。RNA 标准品在 $10^3 \sim 10^{11}$ copy/ μ L 的范围内具有良好的线性关系,见图 1B(R^2 系数为 0.999,扩增效率为 109.6%,方程式为 $Y = -3.112X + 43.149$)。

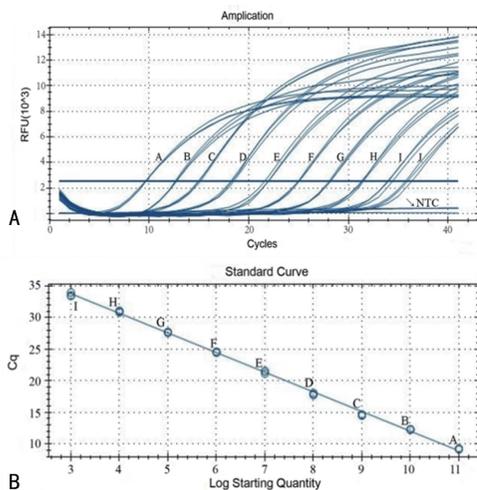


图 1 不同稀释度的扩增曲线

2.3 重复性试验 在本研究中,对 $10^2 \sim 10^{11}$ copy/ μ L 范围内的 9 个稀释度的样品各进行 3 次组内重复性试验,并对试验结果进行统计分析。利用软件 SPSS 19.0 计算出组内荧光定量中 Ct 值及 R^2 的值的变异系数(CV),见表 2。

表 2 RT-qPCR 组内重复性试验

RNA 标准品(copy/ μ L)	平均 Ct 值	标准差	CV(%)
10^{11}	9.4667	0.035 12	0.37
10^{10}	12.5167	0.055 08	0.44
10^9	14.8367	0.109 70	0.74
10^8	18.1567	0.138 68	0.76
10^7	21.6533	0.219 39	1.01
10^6	24.8133	0.049 33	0.20
10^5	27.9733	0.080 83	0.29
10^4	31.2233	0.105 04	0.34
10^3	33.9300	0.272 21	0.80
10^2	35.7967	0.318 96	0.89

2.4 特异度试验 利用该方法检测 EV-A71、CV-A16、CV-A6 和 CV-A10 病毒核酸时,仅有 CV-A6 出现阳性扩增曲线,其余病毒及 NTC 检测结果均为阴性,见图 2。

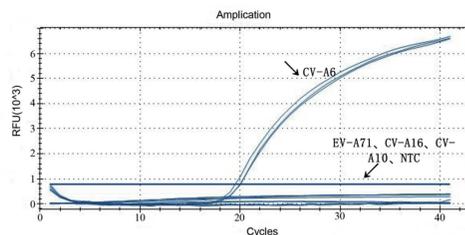
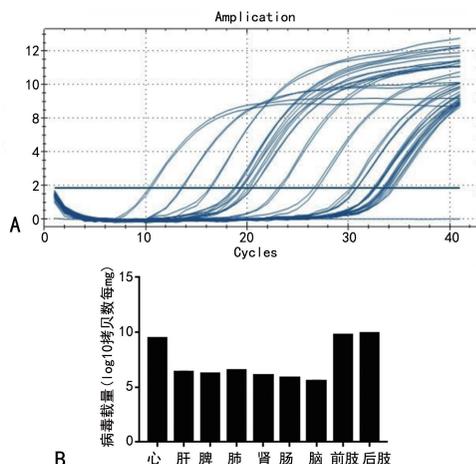


图 2 RT-qPCR 的特异度试验

2.5 乳鼠组织病毒载量检测结果 用该方法检测 YN-A13 毒株感染 1 日龄 BALB/c 乳鼠后各组织中 CV-A6 的载量。其中,各样本均出现良好的扩增曲线见图 3A。Ct 值在 18.98~34.46,根据各样本达到荧光阈值对应的 Ct 值和标准曲线的公式可精确计算出各组织中 CV-A6 病毒的载量,见图 3B。



注:A 为乳鼠各组织及标准品各稀释度扩增曲线;B 为乳鼠各组织病毒载量。

图 3 乳鼠组织病毒载量检测结果

3 讨论

CV-A6 为单股正链的小 RNA 病毒,作为近十年来引起 HFMD 的主要病原体之一,严重危害儿童的健康^[9]。CV-A6 感染可引起全身性水疱疹、侵蚀性皮肤病和紫癜损伤等非典型 HFMD 临床症状,部分 CV-A6 感染可导致无菌性脑膜炎和脑干脑炎等严重疾病^[10-11]。而且 CV-A6 感染容易与其他出疹性疾病,如水痘、麻疹等混淆,致使临床医生发生漏诊甚至误诊的情况。因此,建立一种快速准确检测 CV-A6 感染的方法,为 CV-A6 的流行病学调查和实验室诊断均提供了可靠的检测技术。

传统检测 CV-A6 的方法以病毒分离培养和血清学诊断为主^[12]。病毒分离作为病毒性疾病诊断的金标准,常采用细胞培养对临床样品进行病毒分离。虽然,该方法特异度强,但培养周期过长,分离率低,因而,常被用于回顾性诊断。血清学诊断技术也伴有周

期长和灵敏度低等缺点。另外,目前实验室常用的普通 RT-PCR 特异度虽强,但易污染且只能进行定性分析^[13]。

CV-A6 病毒与其他肠道病毒结构类似,其中 VP1 基因相对保守,常被用作病毒血清型鉴定以及进化分析的靶基因。本研究选择 CV-A6 的 VP1 基因比对后的保守区域设计引物和探针,构建一步法 RT-qPCR 检测方法,为进一步提高引物和探针与靶基因结合位点的保守性。另外, TaqMan 探针与模板特异度互补,极大提高了反应的特异度。利用该方法检测 EV-A71、CV-A16、CV-A6 和 CV-A10 病毒核酸时,仅有 CV-A6 核酸出现扩增曲线,进一步提示该方法具有较强的特异度。经检测,该方法在 $10^2 \sim 10^{11}$ copy/ μ L 模板范围内,均具有良好的扩增曲线,提示该方法在很大的线性范围内可对病毒核酸进行检测和定量分析。再者,通过对该方法的重复性进行分析发现,组内 CV 值在 0.20%~1.01%,小于 2.00%,说明其重复性良好^[14]。利用该方法检测感染 CV-A6 后 BALB/c 乳鼠组织的病毒载量,发现各样本均出现良好的扩增曲线,根据 Ct 值和标准曲线的公式可精确计算出各组织中初始病毒量。

另外,与李洋等^[15]建立的 CV-A6 TaqMan 探针 RT-qPCR 检测方法不同的是,本研究将构建好的重组质粒进一步线性化,并通过体外转录获得 RNA 为标准品。在检测反应体系中, RNA 标准品与待检测的样品同步进行,一步法完成逆转录及 qPCR 的过程,保证了每个样品的扩增效率一致,对病毒进行定量时也尽可能地降低了试验误差。并且,在 1 h 内可以同步完成 96 孔样品的扩增及检测, RT-qPCR 产物无需凝胶电泳检测和测序分析,极大地节约了时间和成本。当然,该检测方法也存在一些不足,例如无法检测扩增片段的大小以及各个实验室构建的标准品有所不同导致实验结果缺乏可比性,但相信随着科技的发展,这些问题终将被突破。

4 结 论

本研究成功构建了用于检测 CV-A6 并能对病毒精准定量的方法,为 CV-A6 的流行病学调查和预防带来了帮助。本检测方法特异度高,灵敏度高,重复性好,能够可靠地应用于 CV-A6 的检测。

参考文献

[1] BIAN L, WANG Y, YAO X, et al. Coxsackievirus A6: a new emerging pathogen causing hand, foot and mouth disease outbreaks worldwide[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015, 13(9):1061-1071.

[2] XU L, ZHENG Q, LI S, et al. Atomic structures of Cox-

sackievirus A6 and its complex with a neutralizing antibody[J]. Nat Commun, 2017, 8(1):505.

- [3] CEYLAN A N, TUREL O, GULTEPE B S, et al. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6: a preliminary report from istanbul[J]. Pol J Microbiol, 2019, 68(2):165-171.
- [4] DI B, ZHANG Y, XIE H, et al. Circulation of Coxsackievirus A6 in hand-foot-mouth disease in Guangzhou, 2010-2012[J]. Virol J, 2014, 11:157.
- [5] HAN J F, XU S, ZHANG Y, et al. Hand, foot, and mouth disease outbreak caused by coxsackievirus A6, China, 2013[J]. J Infect, 2014, 69(3):303-305.
- [6] KLEIN M, CHONG P. Is a multivalent hand, foot, and mouth disease vaccine feasible? [J]. Hum Vaccin Immunother, 2015, 11(11):2688-2704.
- [7] KOBAYASHI M, MAKINO T, HANAOKA N, et al. Clinical manifestations of coxsackievirus A6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan[J]. Jpn J Infect Dis, 2013, 66(3):260-261.
- [8] 王楷宸, 王素春, 朱琳, 等. 禽流感病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2019, 36(4):64-69.
- [9] WANG H, YU W, XU T, et al. Molecular characteristic analysis for the VP1 region of coxsackievirus A6 strains isolated in Jiujiang area, China, from 2012 to 2013[J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(14):e15077.
- [10] BLOMQUIST S, KLEMOLA P, KAIJALAINEN S, et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland[J]. J Clin Virol, 2010, 48(1):49-54.
- [11] RICHTER J, KOPTIDES D, TRYFONOS C, et al. Molecular typing of enteroviruses associated with viral meningitis in cyprus, 2000-2002[J]. J Med Microbiol, 2006, 55(Pt 8):1035-1041.
- [12] 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.
- [13] 胡晓星, 彭杰, 冯悦, 等. 以主要流行 EV71 VP1 基因高度保守区为靶点的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 生命科学研究, 2016, 20(3):189-195.
- [14] 蔡丽娟, 陈瑶, 杜红延, 等. 柯萨奇病毒 A 组 16 型 TaqMan 一步法荧光定量 RT-PCR 快速检测方法的建立[J]. 广东医学, 2012, 33(5):598-600.
- [15] 李洋, 张相萍, 翟明强, 等. 柯萨奇病毒 A6 TaqMan 探针实时荧光逆转录 PCR 检测方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(11):971-975.

(收稿日期:2019-08-28 修回日期:2020-01-08)