

## EV71-CA16 肠道病毒荧光定量 RT-PCR 诊断试剂盒的研制\*

陈勉乔<sup>1</sup>, 于浩洋<sup>1</sup>, 卢秋梅<sup>2</sup>, 陈立嘉<sup>3</sup>, 刘晓青<sup>4</sup> (1. 深圳市晋百慧生物有限公司, 广东深圳 518055;  
2. 广州市药品检验所, 广州 510160; 3. 白云山何济公制药厂, 广州 510410;  
4. 汕尾逸挥基金医院, 广东汕尾 516000)

**摘要:**目的 研制一种能同时检测 EV71, CA16 肠道病毒的二联实时荧光定量 PCR 检测试剂盒, 主要用于 EV71, CA16 肠道病毒的快速检测和流行病学监测。方法 设计特异度的 EV71 型、CA16 型基因的引物和探针, 优化实时荧光定量 PCR 检测体系, 并研究产品的灵敏度、精密度、稳定性和检测线性范围; 同时对 2014 年 5 月份收集的 26 份样品进行检测。结果 试验得到了阳性重组质粒, 线性范围在  $5 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$  ~  $10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ , 该范围内检测结果良好; 优化后肠道病毒 CA16 上下游引物和探针浓度分别为 0.48, 0.24  $\mu\text{mol/L}$ , EV71 上下游引物和探针浓度分别为 0.40, 0.20  $\mu\text{mol/L}$ 。敏感度达到 500 copies/ $\mu\text{L}$ , 重复性变异系数  $\text{CV} \leq 5\%$ ; 该荧光定量 PCR 检测试剂盒稳定性强, 在  $-20^\circ\text{C}$  下可以保存一年, 对 EV71, CA16 肠道病毒具有良好的特异度。用该方法检测 20 份临床阳性样品和 6 份阴性样品, 阳性检出率为 100% (20/20), 阴性检出率为 100% (6/6)。结论 试验建立的 EV71, CA16 肠道病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法可用于 EV71, CA16 肠道病毒的临床诊断。

**关键词:** 荧光定量 RT-PCR; EV71, CA16 肠道病毒; 快速检测

中图分类号: Q503 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)06-027-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.06.008

## Development of EV71-CA16 Enterovirus Fluorescence Qualitative RT-PCR Diagnostic Kit

CHEN Mian-qiao<sup>1</sup>, YU Hao-yang<sup>1</sup>, LU Qiu-mei<sup>2</sup>, CHEN Li-jia<sup>3</sup>, LIU Xiao-qing<sup>4</sup>  
(1. Shenzhen GeneBioHealth Co. LTD, Guangdong Shenzhen 518055, China;  
2. Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China;  
3. Baiyun Mountain He Jigong Pharmaceutical Factory, Guangzhou 510410, China;  
4. Shanwei Yihui Foundation Hospital, Guangdong Shanwei 516000, China)

**Abstract:** **Objective** A novel real-time RT-PCR kit was developed to detect EV71 and CoxA16 enteroviruses simultaneously, which used for hand, foot and mouth disease in the clinical diagnosis and epidemiological surveillance. **Methods** Designed specific primers and probes of EV71 and CA16, optimized the detection system of real-time quantitative PCR and research the sensitivity, precision, stability of the products and the linear range of detection. Then tested 26 samples which were collected on May 2014. **Results** The results showed that this experiment obtained positive recombinant plasmid, the range of the linear relation was from  $5 \times 10^2$  to  $10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ , and the detection result within this range was fine. The optimal concentrations of CA16 upstream and downstream primers were 0.48  $\mu\text{mol/L}$  and the probes were 0.24  $\mu\text{mol/L}$ , and EV71 upstream and downstream primers were 0.40  $\mu\text{mol/L}$  and the probes were 0.20  $\mu\text{mol/L}$ . The detection sensitivity reached to 500 copies/ $\mu\text{L}$ , the CV of the repeatability test was no more than 5%, the fluorescence quantitative PCR Kit was stable and could be saved for one year at  $-20^\circ\text{C}$  environment, and this Kit had high specificity for EV71 and CA16 enteroviruses. 20 clinical positive samples and 6 negative samples were detected in this experiment, detection rate of positive samples was 100% (20/20) and negative samples was 100% (6/6) by fluorescent quantitative PCR detection method. **Conclusion** The experiment demonstrated that the detection method of the fluorescent quantitative PCR for EV71 and CA16 enteroviruses could be used for the diagnosis in clinical application.

**Keywords:** fluorescence qualitative RT-PCR; EV71, CA16 enterovirus; rapid diagnosis

手足口病(hand-foot-mouth disease, HFMD) 疱疹,个别患者还可引起心肌炎、肺水肿和无菌性  
是一种传染度颇高的传染病,由肠道病毒引起的传 脑膜炎等并发症<sup>[1]</sup>。引发手足口病的肠道病毒有  
染病,多发于婴幼儿,可引起手、足和口腔等部位的 20多种(型),柯萨奇病毒 A 组的 16, 4, 5, 9, 10 型,

\* 基金项目: 深圳市技术创新计划(CYZZ20140605154742155)。

作者简介: 陈勉乔(1983—), 男, 硕士研究生, 主要从事疾病快速诊断试剂盒的研发, Tel: 15914069189, E-mail: mianqiaochen@yeah.net。

通讯作者: 于浩洋(1971—), 男, 德籍博士, 高级工程师, 主要从事医学分子学研究, E-mail: guixuanyu@hotmail.com。

B组的2,5型以及肠道病毒71型(EV71)均为HFMD较常见的病原体,其中以柯萨奇病毒(coxsackievirus)A组的16型(Cox A16)和肠道病毒EV71型最为常见<sup>[2]</sup>。近年EV71和CA16的流行呈上升趋势,对儿童的健康造成危害,研发出一种高灵敏、准确、特异并快速的检测方法,对于病毒体内感染机制和散布趋势等方面显得尤为重要<sup>[3]</sup>。因此,快速而特异地确定病原体,对于HFMD的防控具有重要意义。

近年来,采用荧光定量RT-PCR技术对肠道病毒进行诊断国内外已有报道,该方法具有定量检测、快速、灵敏度高、特异度强以及自动化程度高等特点。但是由于RNA病毒基因组的高度变异率,针对肠道病毒基因组设计的引物及探针都具有一定的时效性,需要不断更新。实验对EV71,CA16肠道病毒二联实时荧光定量PCR诊断试剂盒的研制,为快速筛查HFMD病原体奠定基础<sup>[4]</sup>。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 EV71,CA16肠道病毒样品,深圳市疾病预防控制中心2014年5月份收集的样品;大肠埃希菌DH5a实验室保存,新成疫、口蹄疫灭活毒株等均购于哈尔滨维科生物技术开发公司。

1.2 试剂和仪器 pMD18T载体、TAQ酶、反转录酶、DNA Marker DL2000, DNA纯化回收试剂盒(离心柱型)、高纯质粒小量制备试剂盒(离心柱型)等均为宝生物工程(大连)有限公司产品;RNA提取试剂盒fermentas公司产品;引物由上海英维捷基贸易有限公司合成。紫外可见分光光度计(2000/2000C型)为北京普析通用仪器有限公司产品;ABI 7500 RT-PCR仪为Applied Biosystems公司产品。

## 1.3 方法

1.3.1 引物和探针设计:在NCBI核酸序列数据库中,搜索选择中国大陆近期流行EV71型,CA16型肠道病毒基因序列,采用DNASTAR软件进行clustalV方法比对,选择各型序列共同的保守区设计引物和探针,得到引物和探针序列,见表1。

表1 引物和探针序列及荧光标记

目的基因	引物和探针	序列	荧光标记
EV71 基因	Forward primer	5'-AAGTGATGCCACCCTAGTGATCAA-3'	VIC-BHQ1
	Probe	5'-ATACTGCACAACGTCACCCACCGG-3'	
	Reverse	5'-GGGTAGGCTTACCACTGAGATTCA-3'	
CA16 基因	Forward primer	5'-AAGGATGAACAACATACATGCAGTTC-3'	FAM-MGB
	Probe	5'-AGCAAACACCGTATTGAACC-3'	
	Reverse	5'-TTACCTGTTCTGGAGAGCCTCT-3'	

1.3.2 常规RT-PCR扩增:反应条件:45℃ 30 min,95℃ 3 min;95℃ 5 s,58℃ 45 s,45个循环。

反应结束后,取2 μl PCR产物于10 g/L琼脂糖凝胶进行电泳鉴定。

## 1.3.3 质粒标准阳性模板的制备

1.3.3.1 CA16和EV71目的基因的纯化回收:将1.3.2中常规PCR产物于10 g/L琼脂糖凝胶电泳后,紫外灯下切回目的片段,用多功能DNA纯化回收试剂盒回收目的DNA,置-20℃保存备用。

1.3.3.2 目的基因的克隆及鉴定:将回收的DNA片段基因克隆到pMD18-T载体上,然后将连接产物转化入感受态细胞DH5a中。挑取单个菌落扩大培养,进行菌液PCR鉴定,用高纯质粒小量制备试剂盒提取质粒进行PCR及琼脂糖凝胶鉴定,最后将阳性质粒送到上海英维捷基贸易有限公司测序鉴定。

1.3.3.3 CA16和EV71重组质粒浓度的测定利用紫外可见分光光度计测定阳性重组质粒的浓度,并计算其拷贝数。

1.3.3.4 标准模板的制备:用灭菌蒸馏水将阳性重组质粒CA16和EV71稀释至 $1.0 \times 10^8$  copies/μl左右,再依次做梯度稀释,分别以 $10^6$ , $10^5$ , $10^4$ , $10^3$ , $5 \times 10^2$ , $10^2$ , $10^1$  copies/μl拷贝数梯度作为标准模板,每μl含有等量CA16和EV71拷贝数。

## 1.3.4 实时荧光定量PCR检测方法的研制

1.3.4.1 实时荧光定量PCR方法反应条件的优化以标准阳性质粒为模板,表中合成的EV71,CA16基因引物和探针,选用不同的引物探针浓度、退火温度、退火时间等进行Real-time PCR反应,根据PCR反应结果,不断优化反应条件,以得到最佳的荧光定量PCR反应条件。

引物探针浓度优化:在其它条件相同情况下,设计不同浓度引物、探针,具体方案见表2,比较反应体系中不同引物、探针浓度对荧光PCR扩增效率的影响。

表2 引物探针浓度优化方案

方案(μmol/L)	方案1	方案2	方案3
CA16-F上游引物终浓度	0.4	0.48	0.48
CA16-R下游引物终浓度	0.4	0.48	0.48
CA16-B探针终浓度	0.2	0.24	0.24
EV71-F上游引物终浓度	0.4	0.4	0.48
EV71-R下游引物终浓度	0.4	0.4	0.48
EV71-B探针终浓度	0.2	0.2	0.24

PCR反应程序优化方案:在其它条件相同情况下,设计不同退火温度(56℃,58℃,60℃,62℃),比较反应体系中不同退火温度对荧光PCR扩增效率的影响。

退火时间优化:在其它条件相同情况下,设计

不同退火时间(30 s, 35 s, 40 s, 45 s), 比较反应体系中不同退火时间对荧光 PCR 扩增效率的影响。

1.3.4.2 敏感度试验: 以  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  copies/ $\mu$ l 的标准品作为模板, 进行荧光定量 PCR 扩增, 得出能检测出阳性结果的最低稀释度的拷贝数。

1.3.4.3 重复性试验: 选取  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $5 \times 10^2$  copies/ $\mu$ l 浓度梯度的阳性标准质粒, 每个稀释度一次进行 3 个重复, 统计每个稀释度的  $C_t$  值, 方差分析。

1.3.4.4 产品稳定性研究:  $-4^\circ\text{C}$  和  $-20^\circ\text{C}$  稳定性研究: 将产品置于  $4^\circ\text{C}$ , 每隔 24 h 取样, 共进行 7 天。处理样本种类有: 强阳性质控品和弱阳性质控品及阴性; 6 份临床样本 (2 份 EV71 阳性样本, 2 份 CA16 阳性样本, 2 份阴性样本)。检测结果与  $-20^\circ\text{C}$  稳定性第 0 个月的结果进行比较, 看变异系数 (CV),  $\text{CV} \leq 5\%$  时, 表示没有差异。将产品分置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中, 分别于第 0, 2, 4, 6, 8 和 12 个月取出, 检测 6 份临床样本 (2 份 EV71 阳性样本, 2 份 CA16 阳性样本, 2 份阴性样本) 及内置强阳性和弱阳性质控品。用荧光定量 PCR 仪检测各样本的 D 值, 其中临床样本重复检测三次, 试剂盒内质控品做单孔检测。将检测结果与第 0 个月的结果进行比较, 看变异系数 (CV),  $\text{CV} \leq 5\%$  时, 表示没有差异。

1.3.4.5 特异度试验: 用 RNA 提取试剂盒提取新成疫、口蹄疫灭活毒株两种病毒 RNA, 将其 RNA 作为特异度对照, 反应体系为 25  $\mu$ l, 进行荧光定量 PCR 检测。

1.3.4.6 临床样品: 以深圳市疾病预防控制中心已提取的 20 例得 HFMD 病人 RAN 为模板, 和 6 份正常人 RNA 作为阴性对照, 进行荧光定量 RT-PCR 检测。

1.4 统计学分析 采用 SPASS1.30 统计学软件处理  $C_t$  值变异系数,  $C_t$  值  $\text{CV} \leq 5\%$  为具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 目的基因的克隆与鉴定 PCR 产物经回收后, 与 pMD18 T 载体连接构成重组质粒, 用 1.2 中的引物对所构建的质粒进行常规 PCR 扩增, 得到两条约 100 bp (CA16 和 EV71) DNA 条带, 左右的 DNA 片段 (DNA Marker DL2 000), 与连接前的 PCR 产物大小一致。将经 PCR 鉴定的阳性重组菌送上海英维捷基贸易有限公司进行序列测定。测定结果与目的片段序列完全一致。

### 2.2 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

2.2.1 荧光定量 PCR 反应条件的优化: 优化后的

荧光定量 PCR 反应体系为 25  $\mu$ l, 其中  $20 \times$  buffer 2.5  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L CA16-F 上游引物 1.2  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L CA16-R 下游引物 1.2  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L CA16-B 探针 0.6  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L EV71-F 上游引物 1.0  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L EV71-R 下游引物 1.0  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L EV71-B 探针 0.5  $\mu$ l, 标准模板 (含有 CA16 和 EV71 质粒) 10  $\mu$ l, 25  $\mu$ mol/L Mg 离子 2  $\mu$ l, DNTP 1  $\mu$ l, 加去离子水至 25  $\mu$ l。

具体实验结果见表 3。从表 3 实验结果可以看出, 在温度较低的情况下, 扩增效率随温度的升高而增加, 到了  $62^\circ\text{C}$  以后开始降低, 最适退火温度为  $60^\circ\text{C}$ 。

表 3 PCR 退火温度优化实验结果

退火温度( $^\circ\text{C}$ )	检测结果( $C_t$ 值)			
	56 $^\circ\text{C}$	58 $^\circ\text{C}$	60 $^\circ\text{C}$	62 $^\circ\text{C}$
CA16 扩增 $C_t$ 值	24.81	23.25	22.58	23.15
EV71 扩增 $C_t$ 值	24.53	23.12	22.56	23.25

表 4 PCR 退火时间优化实验结果

退火时间(s)	检测结果( $C_t$ 值)			
	30s	35s	40s	45s
CA16 扩增 $C_t$ 值	24.36	23.41	21.35	21.38
EV71 扩增 $C_t$ 值	24.56	23.56	21.45	21.46

具体实验结果见表 4。从表 4 实验结果可以看出, 在退火时间较低的情况下, 扩增效率随温度的升高而增加, 到了 40s 扩增效率达到最高, 最适退火时间为  $60^\circ\text{C}$ 。

优化后荧光定量 PCR 反应条件:  $45^\circ\text{C}$  30 min  $95^\circ\text{C}$  3 min;  $95^\circ\text{C}$  5 s,  $60^\circ\text{C}$  40 s, 45 个循环, 在  $60^\circ\text{C}$  接收荧光。

2.2.2 按照以上最佳的优化条件: 选择  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  copies/ $\mu$ l 6 个梯度浓度的标准质粒作为灵敏度试验模板。

试验结果显示, 检测的灵敏度达到 500 copies/ $\mu$ l, 灵敏度较高, 见图 1。

2.2.3 试验选取  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  copies/ $\mu$ l 的标准模板以优化的反应条件分别连续扩增 3 次, 经方差分析, 组内与组间  $\text{CV} \leq 5\%$ , 重复性很好, 见图 2。

2.2.4 产品稳定性研究: 稳定性研究结果显示, 本产品  $4^\circ\text{C}$  存放 7 天, 检测效果不发生改变。 $-20^\circ\text{C}$  稳定性研究显示  $-20^\circ\text{C}$  存放 12 个月, 试剂性能亦未发生改变。

2.2.5 特异度试验结果: 以新成疫和口蹄灭活毒株为对照, 进行实时荧光定量 PCR 反应, 结果为阴性, 表明特异度良好。

2.2.6 临床检测结果: 以深圳市疾病预防控制中心

心已提取的 20 例得 HFMD 病人 RNA 为模板,并做 6 份阴性对照,进行荧光定量 RT-PCR 检测,荧光结果显示:CA16 和 EV71 病人检测结果为阳性,而 6 份阴性对照未能检测到。结果表明,检测阳性率达 100%。

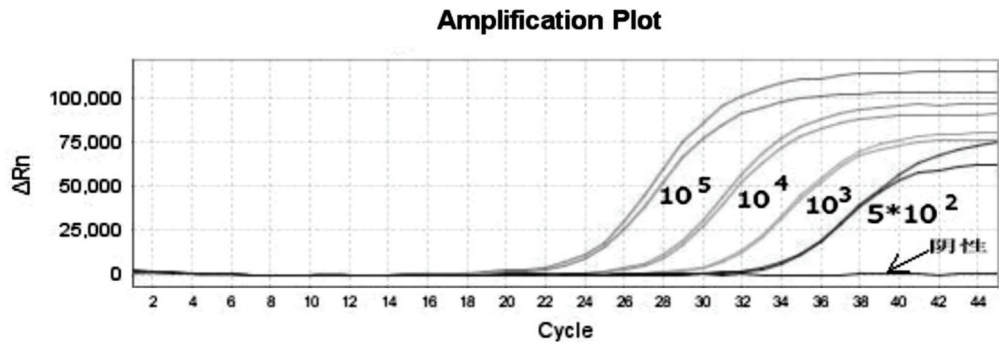


图 1 CA16-EV71 基因片段实时荧光定量 PCR 方法的灵敏度试验

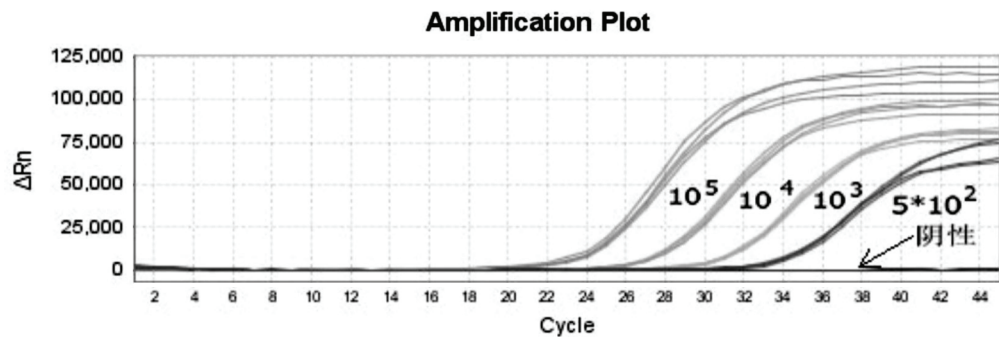


图 2 CA16-EV71 基因片段实时荧光定量 PCR 方法的重复性试验

表 5 临床检测结果

样品类型	阳性样品		阴性样品	合计	阳性率(%)
	CA16	EV71			
咽拭子	6	6	3	12	100
水疱液	4	4	3	12	100
合 计	10	10	6	24	100

3 讨论 实时荧光 PCR(Real-PCR)技术,引入了特异度扩增引物和荧光探针,使其检测的特异度得到很大程度的增强,从而避免了其它检测方法特异度不高且容易漏检的问题。实时荧光探针法检测速度快,敏感度高,特异度强,此法适用于咽拭子、水疱液、粪便、体液及组织中 EV71 RNA 的检测,为疾病的快速诊断提供了科学依据<sup>[6]</sup>。

从病毒核酸提取、RT-PCR 反应到结果分析,整个过程大约需要 4 h 左右,与普通的 PCR 检测相比,缩短了检测时间,提高了检测效率。采用二重荧光定量 PCR 技术,可以在同一个反应中对 EV71 和 CoxA16 肠道病毒进行检测,取代传统单一检测,提高检测的可靠性,缩短了检测时间并且降低成本,达到早期、快速、准确检测主要肠道病毒及分型的应用目的,可作为 HFMD 的常规检测方法,具有巨大的市场潜能。

参考文献:

[1] Hwang S, Kang B, Hong J, et al. Development of du-

plex real-time RT-PCR based on Taqman technology for detecting simultaneously the genome of pan-enterovirus and enterovirus 71[J]. Journal of Medical Virology, 2013, 85(7): 1274-1279.

[2] Yan XF, Gao S, Xia JF, et al. Epidemic characteristics of hand, foot, and mouth disease in Shanghai from 2009 to 2010; Enterovirus 71 subgenotype C4 as the primary causative agent and a high incidence of mixed infections with coxsackievirus A16[J]. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2012, 44(4): 297-305.

[3] Ryu WS, Kang B, Hong J, et al. Clinical and etiological characteristics of enterovirus 71-related diseases during a recent 2-year period in Korea[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(7): 2490-2494.

[4] Song LQ, Sun SP, Li B, et al. External quality assessment for enterovirus 71 and coxsackievirus A16 detection by reverse transcription-PCR using armored RNA as a virus surrogate[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(10): 3591-3595.

[5] Zhang YJ, Mao HY, Yan JY, et al. Development of novel AllGlo-probe-based one-step multiplex qRT-PCR assay for rapid identification of avian influenza virus H7N9[J]. Archives of Virology, 2014, 159(7): 1707-1713.

[6] 娄国平, 李显东, 张昭勇. 多种探针的 RT-PCR 检测 H5N1 病原体方法的建立及应用[J]. 现代检验医学

- 杂志, 2014, 29(5): 73-76.
- Luo GP, Li XD, Zhang ZY. Establishment and application of methods for detecting H5N1 pathogen with multiple probe RT-PCR[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5): 73-76.
- [7] Yang TC, Xu GZ, Dong HJ, et al. A case-control study of risk factors for severe hand-foot-mouth disease among children in Ningbo, China, 2010~2011[J]. European Journal of Pediatrics, 2012, 171(9): 1359-1364.
- [8] Yip CY, Lau SP, Zhou B, et al. Emergence of enterovirus 71 "double-recombinant" strains belonging to a novel genotype D originating from southern China: first evidence for combination of intratypic and intertypic recombination events in EV71[J]. Archives of Virology, 2010, 155(9): 1413-1424.
- [9] 陈勉乔, 卫明, 张宏斌, 等. 一种用于以荧光 RT-PCR 检测样品中禽流感病毒的引物对、探针和包含其的试剂盒: 中国, 201310216523. 5[P]. 深圳太太基因工程有限公司: 2013-06-03.
- Chen MQ, Wei M, Zhang HB, et al. A primers, probe used to detect samples of avian influenza virus with fluorescence RT-PCR, and a kit including them: China, 201310216523. 5[P]. Shenzhen Wife Genetic Engineering Co., LTD, 2013-06-03.
- [10] 王立军, 祝颢英, 徐蓓. 西安地区 2011 年儿童手足口病病原学分析[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3): 116-118.
- Wang LJ, Zhu XY, Xu P. Investigate on etiology of hand, foot and mouth disease 2011 in Xi'an[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(3): 116-118.

收稿日期: 2015-03-17

修回日期: 2015-06-11