

6种常见脑炎病毒多重PCR检测体系的建立和应用*

王晓因¹, 陆士奇², 段欠欠¹, 李建刚³, 张丽君³, 刘婉婉¹, 奚邦生¹, 孙万平¹

(1. 苏州大学药学院药理学系, 江苏苏州 215021; 2. 苏州大学附属第一医院急诊科, 江苏苏州 215006; 3. 苏州高新区卫生监督所, 江苏苏州 215010)

摘要:目的 建立单纯疱疹病毒1(HSV I), 2型(HSV II)、水痘带状疱疹病毒(VZV)、EB病毒(EBV)、肠道病毒71型(EV71)及巨细胞病毒(CMV)的多重聚合酶链式反应(mPCR)体系。方法 对HSV I, HSV II, VZV, EBV, EV71及CMV设计特异引物, 建立mPCR检测方法, 并进行敏感性验证。收集2014~2015年在苏州大学附属第一医院收治的15例临床疑似病毒性脑炎(VE)患者脑脊液(CSF)标本, 采用mPCR体系进行核酸检测。结果 6对引物特异性扩增六种病毒, 构建的mPCR体系敏感度超过 10^3 copies/ μ l; 该mPCR体系对15例临床脑脊液标本进行检测, 共6例阳性标本(6/15, 40%), 其中HSV I 5例, CMV 1例。结论 初步建立了一种能够同时筛查6种常见脑炎病毒的mPCR方法。

关键词:多重聚合酶链式反应; 病毒性脑炎; 核酸检测

中图分类号: Q503; R373 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)06-011-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.06.003

Development of A Multiplex PCR Method for Detecting Six Types of Viruses Causing Encephalitis

WANG Xiao-nan¹, LU Shi-qi², DUAN Qian-qian¹, JI Jian-gang³, ZHANG Li-jun³,
LIU Wan-wan¹, XI Bang-sheng¹, SUN Wan-ping¹ (1. College of Pharmaceutical Sciences,
Soochow University, Jiangsu Suzhou 215021, China; 2. Department of Emergency,
the First Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215006, China; 3. Health
Surveillance Institute of Suzhou Hi-Tech Development Zone, Jiangsu Suzhou 215010, China)

Abstract: **Objective** To develop a new mPCR method for rapid diagnosis of six types of encephalitis causing viruses of HSV-I, HSV-II, VZV, EBV, EV71 and CMV. **Methods** Six pairs of specific primers for CMV, EV71, HSV I, VZV, EBV and HSV II were designed. The mPCR detection method was established and the sensitivity was detected. In order to verify the clinical application value of their multiplex PCR system, fifteen cerebrospinal fluid specimens of clinically suspected VE from the First Affiliated Hospital of Soochow University from 2014 to 2015 were examined by the mPCR method. **Results** The 6 pairs of primers did not interfere with each other, and the sensitivity of the mPCR system was over 10^3 copies/ μ l. Among 15 cerebrospinal fluid specimens from patients with suspected viral encephalitis, six specimens (6/15, 40%) were tested positive by the mPCR. Among them, HSV I was 5 and CMV was 1. **Conclusion** The mPCR method for detecting six types of encephalitis-associated virus at same time was established with high specificity, sensitivity and stability.

Keywords: multiple polymerase chain reaction; viral encephalitis; nucleic acid detection

病毒性脑炎(viral encephalitis, VE)是指由一种或几种病毒感染脑实质或脑膜的一种中枢神经系统疾病, 该病缺乏临床特异性, 导致神经系统后遗症, 严重者甚至死亡^[1,2]。VE早期诊断能有效减轻脑组织损伤, 降低后遗症发生率及死亡率, 对疾病的治疗和预后至关重要^[3]。目前应用较广泛的PCR及荧光定量PCR技术每次一般检测一种病毒, 难以实现病毒性脑炎的快速诊断。本研究针对临床最常见的VE病毒, 包括单纯疱疹病毒1型(herpes simplex virus type 1, HSV I)、单纯疱疹

病毒2型(herpes simplex virus type 2, HSV II)、水痘带状疱疹病毒(varicella zoster virus, VZV)、EB病毒(epstein-barr virus, EBV)、肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)及巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV), 采用mPCR技术, 建立了一种同时筛查这6种常见VE病毒的多重聚合酶链式反应(multiple polymerase chain reaction, mPCR)检测体系。

1 材料和方法

1.1 实验样本 HSV I, HSV II, EBV, CMV标

* 基金项目: 苏州市重大疾病、传染病预防和控制关键技术(研究)项目(Gwzx201606), 苏州市民生项目(SS201660, SS201511)。

作者简介: 王晓因(1992—), 女, 硕士在读, 专业: 药理学, 主要研究方向: 分子诊断, E-mail: 1173588898@qq.com。

通讯作者: 孙万平, 男, 博士, 副教授, 主要研究方向: 分子诊断, E-mail: sunwanping@suda.edu.cn。

准菌株均购于广州邦德盛生物科技有限公司, EV71 和 VZV 质粒由苏州金伟智生物科技有限公司合成。收集 2014~2015 年间苏州大学第一附属医院 15 例疑似 VE 但未明确诊断患者的脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 标本, 期间脑脊液储存在 -80°C , 其中男性 9 例, 女性 6 例, 年龄 15~60 岁, 均出现不同程度的发热、嗜睡、呕吐、腹泻、精神萎靡、意识障碍等症状, 临床初步诊断为 VE。

1.2 试剂和仪器 DreamTaq Green PCR Master Mix ($2\times$), T4 DNA Ligase, GreenRuler 100bp DNA Ladder 均购自 Thermo 公司 (美国, 马萨诸塞州); 限制性内切酶均购自 NEB 有限公司 (北京); QIAamp DNA Mini Kit 购自 QIAGEN 公司; 病毒基因组 RNA 提取试剂盒、离心柱型通用型 DNA 产物回收试剂盒、离心柱型质粒小提试剂盒、溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 溶液、DH5 α 感受态细胞均购自天根生化科技有限公司 (北京); pMD19-T vector 购自 Promega 公司 (美国, 威斯康辛州), HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 购自诺唯赞生物科技有限公司 (南京)。

1.3 实验方法

1.3.1 引物设计: 通过国内外文献[4~9], 确定 HSV I, HSV II, EBV, CMV, EV71 和 VZV 保守基因, 遵循引物设计原则设计引物。EV71 和 VZV 引物来自文献[7, 8]。HSV I 上游引物: 5'-AC-CCTCAAGTTCTTCCTCAC-3', 下游引物: 5'-AGTCCAGGCAAATCTTCT-3'; HSV II 上游引物: 5'-ATGGCACGACCCACGGAAGA-3', 下游引物: 5'-CGGAGCGGACGTAGGCGAAT-3'; VZV 上游引物: 5'-TGAGCGTTGGACACGT-GATA-3', 下游引物: 5'-GCCTGTCTGAT-GTCTGCTCTAA-3'; EBV 上游引物: 5'-GCATCGTGGTCAAGGAGGTTC-3', 下游引物: 5'-CAGCACGCATGATGTCTACTGG-3'; EV71 上游引物: 5'-GCGCAAATGCGTAGAAAGGT-3', 下游引物 5'-GAGGTATCCATGCCCT-GACG-3'; CMV 上游引物: 5'-CCCTTCCCTAA-GACCACCAAT-3', 下游引物 5'-TAAGACAT-AGCAGCACAGCA-3'。

1.3.2 阳性质粒模板制备: 在病毒保守序列设计引物, 使扩增片段包含特异性引物。扩增序列和 pMD19-T 载体通过双酶切、连接、转化, 提取得到重组质粒并通过 PCR 和测序进行鉴定。

1.3.3 引物特异性检测: 采用单引物多模板的方法检测每条引物的特异性, 即每对引物与 HSV I, HSV II, EBV, CMV 这 4 种病毒基因组和 VZV,

EV71 这 2 种重组质粒混合形成的混合模板进行 PCR 反应。PCR 反应体系为 25 μl , 包括 12.5 μl 的 DreamTaq Green PCR Master Mix ($2\times$), 2 μl 引物 (每条引物终浓度为 0.8 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$), 1.5 μl 混合模板 (HSV I, HSV II, EBV, CMV 模板每种模板浓度 2.5 ng/ μl , EV71 与 VZV 重组质粒模板浓度为 10^4 copies/ μl), 去离子水补足体积 25 μl 。循环条件: 95°C 4 min, 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环, 72°C 7 min。2 g/dl 琼脂糖凝胶电泳。

1.3.4 敏感性检测: 将构建好包含特异性引物的重组质粒从大肠埃希菌中提取后以去离子水按 10 倍稀释梯度 10^8 copies/ μl ~10 copies/ μl , 每个稀释度取 1 μl 作为模板进行敏感性检测。

引物敏感性检测采用单引物单模板的方法。PCR 反应体系为 25 μl , 1 μl 质粒模板, 其余与引物特异性 PCR 反应体系相同。循环条件与上游引物特异性鉴定一致。

体系敏感性检测采用多引物单模板的方法。PCR 反应体系为 25 μl , 包括 12.5 μl 的 DreamTaq Green PCR Master Mix ($2\times$), 3 μl 的混合引物 (共 12 条引物, HSV I, CMV, EV71, VZV, EBV 每条引物终浓度 0.5 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$, HSV II 每条引物终浓度为 0.8 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$), 1 μl 的重组质粒模板, 去离子水补足到总体积 25 μl 。循环条件: 95°C 4 min, 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环, 72°C 7 min。2g/dl 琼脂糖凝胶电泳。

1.4 临床样本的多重检测 按照基因组 DNA 提取试剂盒 (QIAamp DNA Mini Kit) 说明书和病毒 RNA 提取试剂盒 (TIANamp Virus RNA Kit) 说明书提取 CSF 中 DNA 和 RNA, 病毒 RNA 按照逆转录试剂盒 [HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)] 说明书获得相应 cDNA, -20°C 保存。以 CSF-DNA 和 CSF-cDNA 为模板, 用 mPCR 进行检测, 反应体系与体系敏感性检测一致。

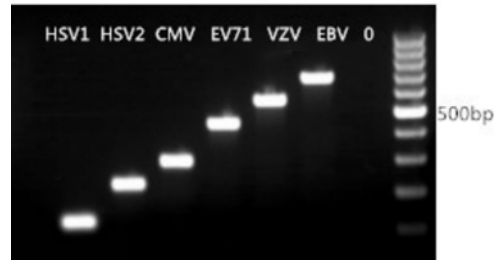
2 结果

2.1 病毒质粒模板的制备 通过 PCR 鉴定并经测序验证, 成功构建 HSV, HSV II, EBV, CMV, EV71, VZV 阳性质粒模板。

2.2 引物特异度检测 在脑脊液病原体核酸检测中, 从人脑脊液中提取基因组包含人基因组, 本研究设计和筛选的 6 对引物以人基因组为模板时均未扩增出任何条带 (图未给出)。从电泳图中显示每个泳道都出现目的条带, 并且清晰明亮, 未出现杂带, 说明 6 对引物的特异度好。

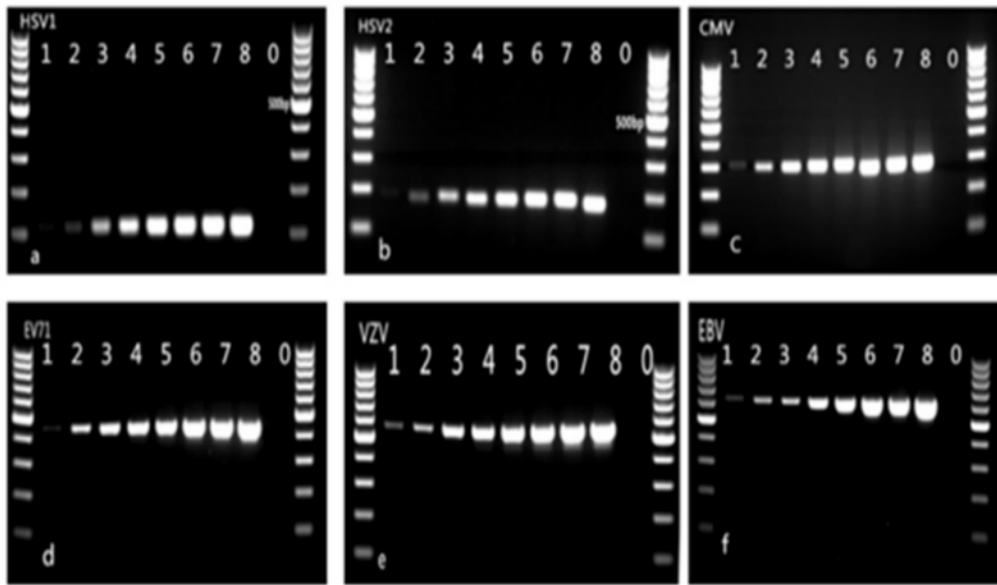
2.3 引物敏感度和体系敏感度检测 分别通过单引物单模板和多引物单模板检测引物敏感度和多

重体系敏感度,见图2和图3。在图2(a~f)分别表示 HSV I, HSV II, CMV, EV71, VZV, EBV 病毒特异性引物的敏感度。HSV II, CMV, EV71, VZV, EBV 的引物敏感度为 10^2 copies/ μ l, HSV I 的引物敏感度为 10^2 copies/ μ l。图3(a~d)6个泳道均能跑出清晰可辨目的单一条带。HSV I, CMV, EV71, VZV, EBV 体系检测敏感度达到 10^2 copies/ μ l, HSV II 体系检测敏感度达到 10^3 copies/ μ l,该多重体系敏感度好,可用于临床检测。



HSV I : 114bp, HSV II : 219bp, CMV : 293bp, EV71 : 442bp, VZV : 552bp, EBV : 618bp, 0:空白对照。

图1 6对引物的特异性鉴定



a~f 分别以 HSV I, HSV II, CMV, EV71, VZV, EBV 为模板,1~8 泳道表示浓度为 10^2 copies/ μ l~ 10^8 copies/ μ l。

图 a:2~8 泳道依次出现逐渐增亮的条带;图 b~图 f:1~8 泳道依次出现逐渐增亮的条带;0:空白对照。

图2 6对特异性引物敏感度检测

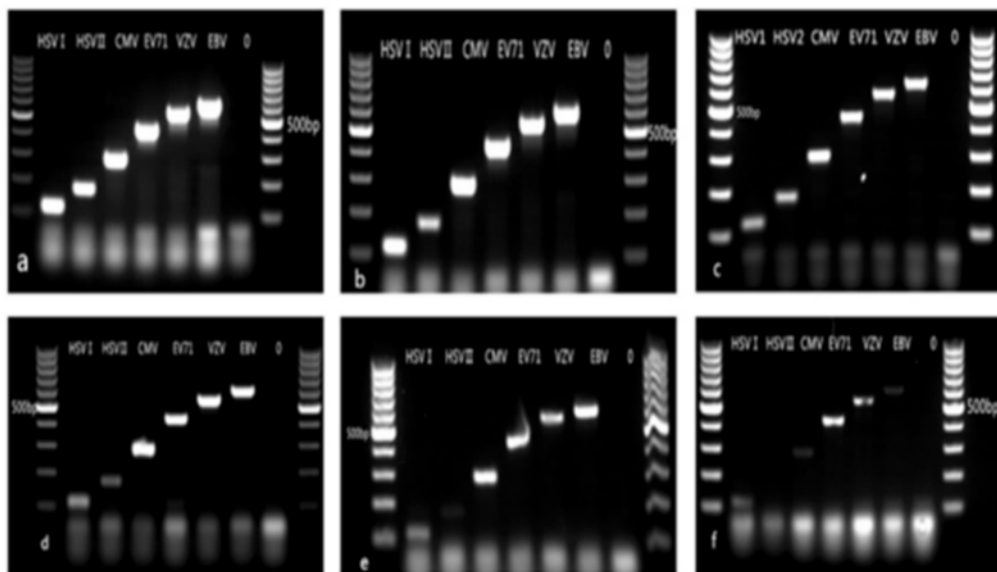
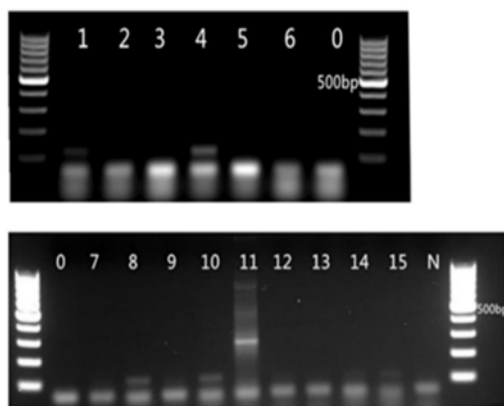


图 a~f 分别以 10^7 copies/ μ l~ 10^2 copies/ μ l 的 HSV I, HSV II, CMV, EV71, VZV, EBV 重组质粒为模板,0:空白对照;HSV I, CMV, EV71, VZV, EBV 检测敏感度达到 10^2 copies/ μ l, HSV II 检测敏感度达到 10^3 copies/ μ l。图中各产物条带大小分别为:HSV I : 114 bp, HSV II : 219 bp, CMV : 293 bp, EV71 : 442 bp, VZV : 552 bp, EBV : 618 bp。

图3 多重 PCR 体系敏感度的检测

2.4 临床样本的多重检测 以15例临床疑似病毒性患者的 CSF-DNA/CSF-cDNA 为模板进行 mPCR 检测,电泳图见图4(1号、4号、8号、10号、15号标本出现 HSVI 目的条带,11号出现明亮的 CMV 条带)。为了进一步验证结果的可靠性,我们对这6例标本进行单重 PCR,见图5。测序结果见图6~11。以15例临床疑似病毒性患者的 CSF-cDNA 为模板进行 mPCR 检测,电泳结果显示未检测到 EV71,图未显示。



0:空白对照;N:阴性对照。

图4 mPCR检测15例标本

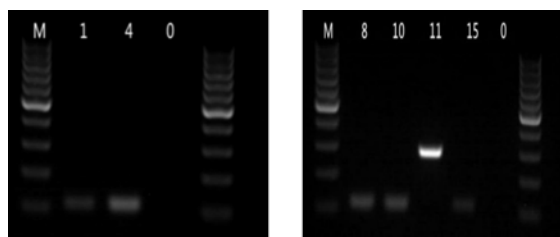


图5 单重PCR验证1,4,8,10,11,15号标本

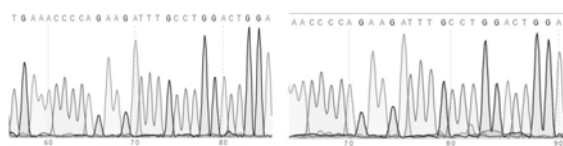


图6 1号标本测序图

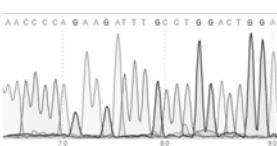


图7 4号标本测序图

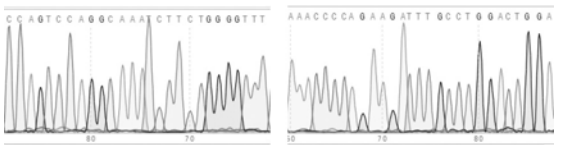


图8 8号标本测序图

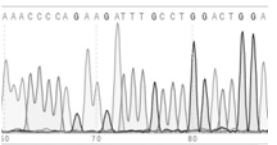


图9 10号标本测序图

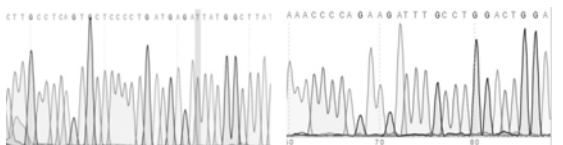


图10 11号标本测序图

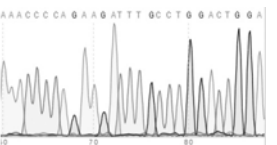


图11 15号标本测序图

3 讨论 VE 一年四季均可发生,其发病率约为(3.5~7.4)/10万,为比较常见的中枢神经系统感染疾病^[10],急性 VE 患者在延误治疗的情况下,71%患者会留下持久后遗症,严重者甚至出现死亡,死亡率达到7.4%^[11]。VE 的早期诊断和治疗

能有效减轻脑组织损伤、降低后遗症发生率及死亡率。目前我国临床上 VE 的传统实验室检测包括脑电图、影像学、病毒培养、酶联免疫吸附等方法,该类方法操作过程冗杂繁复、耗时长,难以在疾病早期做出诊断,并且存在特异度差、敏感度低、假阳性高的缺点^[12,13]。mPCR 在同一 PCR 反应管内可同时检出多种病原体,有效的节省时间和降低试剂成本,该方法对于 VE 诊断具有高效性和经济简便性。本课题针对 HSV I, HSV II, CMV, EV71, VZV 及 EBV 这6种常见 VE 病毒,初步建立了一种 mPCR 检测技术,可同时、快速检测6种常见病毒病原体。

本研究根据多重引物设计原则,各引物间 Tm 值保持一致,同时对设计和选用的6对引物之间的核酸同源性和互补性进行分析,避免和减少引物间二聚体的形成。各个病毒扩增的目的条带大小相差40个碱基以上,HSV I, HSV II, CMV, EV71, VZV 和 EBV 各自对应的条带分别为114bp, 219bp, 293bp, 442bp, 552bp 和 618bp,并且每个泳道扩增出特异性单一条带,未出现杂带,见图1。6对引物具有高敏感度,HSV II, CMV, EV71, VZV 和 EBV 的敏感度均达到10copies/ μ l, HSV I 的敏感度达到10²copies/ μ l,见图2。

由于多重体系各引物对扩增效率不一致,为使不同引物在同一体系内最终扩增产物量达到均衡并防止非特异性带的产生,通过调整6对引物之间的浓度,优化 mPCR 体系, HSV I, CMV, EV71, VZV 和 EBV 每条引物终浓度采用0.5 μ mol/ μ l, HSV II 每条引物终浓度为0.8 μ mol/ μ l。mPCR 体系检测敏感度达到10²copies/ μ l,该敏感度可用于临床检测。此外,本体系中虽出现了引物二聚体,但片段长度在100bp以下,不影响本实验结果的判断。

采用本研究建立的 mPCR 方法,对15例疑似 VE 但未有临床明确诊断的患者脑脊液标本进行检测,共6例阳性标本,占40%(6/15),分别为5例 HSV I, 1例 CMV(图4),这6例患者的平均年龄为28岁,其中<5岁4例,占66.7%,说明本组婴幼儿更容易患由病毒引起的脑炎。6例患儿的发病时间集中在7月~10月,这提示 VE 的发病高峰期可能在夏季。由于本研究收集标本量偏少,未检出其它类型 VE 病毒,这也是本实验之后要继续往前推进的方向。

综上所述,本研究设计和建立的针对6种常见脑炎病毒的 mPCR 检测方法,较全面地涵盖了 VE 病毒,该方法特异度、敏感度较好,且操作简单、快速,可在 VE 早期对病原体进行 (下转18页)

(上接 14 页)鉴别,为 VE 的早期诊断和治疗提供依据,具有一定的临床推广应用价值。但该检测方法仍需进行大批量临床标本,特别是婴幼儿患者的标本进行检测,来提高检测体系准确性,优化检测体系,使其能够更适用于临床病毒性脑炎的检测。

参考文献:

- [1] Bautista C. Central nervous system infections[J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2013, 25(3): 11-12.
- [2] 高 珺,王 琼,林广裕,等. 病毒性脑炎患儿脑脊液人类鼻病毒检测的价值[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(2): 11-15.
Gao J, Wang Q, Lin GY, et al. Value of human rhinovirus detected in cerebrospinal fluid of children with viral encephalitis[J]. J Mob Lab Med, 2015, 30(2): 11-15.
- [3] Parisi SG, Basso M, Del Vecchio C, et al. Viral infections of the central nervous system in elderly patients: a retrospective study[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2016, 44(C): 8-10.
- [4] 王云龙,李智涛,李玉林,等. 荧光定量 RT-PCR 检测临床标本中的肠道病毒 RNA[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(6): 1329-1331, 1346.
Wang YL, Li ZT, Li YL, et al. Enterovirus RNA detection in clinical samples by real-time RT-PCR[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2009, 19(6): 1329-1331, 1346.
- [5] Hinson VK, Tyor WR. Update on viral encephalitis[J]. Curr Opin Neurol, 2001, 14(3): 369-374.
- [6] 孙卫国,孙雯娜,侯江厚,等. 人巨细胞病毒 pp150-gp52 蛋白原核可溶性表达与 IgM 捕获 ELISA 方法建立和应用[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(5): 1-4.
Sun WG, Sun WN, Hou JH, et al. Soluble expression of HCMV pp 150-gp52 protein in prokaryotic system and establishment of IgM capture-ELISA[J]. J Mob Lab Med, 2015, 30(5): 1-4.
- [7] 杨吉星,居丽雯,施 强,等. 上海地区水痘带状疱疹病毒基因型研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(2): 223-224.

Yang JX, Ju LW, Shi Q, et al. Research of genotype of varicella-zoster virus in Shanghai[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 18(2): 223-224.

- [8] 曾昭森. 荧光 RT-PCR 同步检测肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型方法的建立及应用[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(16): 1327-1328.
Zeng ZS. Detection of a fluorescent RT-PCR method for detecting Enterovirus 71 and coxsackie A16[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2012, 11(16): 1327-1328.
- [9] 郭建巍,高毓蕊,田占月,等. EB 病毒和人巨细胞病毒核酸检测的实验研究[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(1): 105-107.
Guo JW, Gao YR, Tian ZY, et al. Experiment research for detecting DNA of epstein-barr virus and human cytomegalovirus[J]. J Mob Lab Med, 2014, 29(1): 105-107.
- [10] Ziyaeyan M, Alborzi A, Borhani Haghighi A, et al. Diagnosis and quantitative detection of HSV DNA in samples from patients with suspected herpes simplex encephalitis[J]. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2011, 15(3): 211-214.
- [11] Cho HK, Lee NY, Lee H, et al. Enterovirus 71-associated hand, foot and mouth diseases with neurologic symptoms, a university hospital experience in Korea, 2009[J]. Korean Journal of Pediatrics, 2010, 53(5): 639-643.
- [12] Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, et al. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis[J]. Clin Infect Dis, 2006, 43(12): 1565-1577.
- [13] 陈 勇,吴华平. 小儿病毒性脑炎的诊断与治疗[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(24): 1863-1865.
Chen Y, Wu HP. Diagnosis and treatment of viral encephalitis in children[J]. J Appl Clin Pediatr, 2012, 27(24): 1863-1865.

收稿日期: 2017-08-03

修回日期: 2017-09-25