

• 论 著 •

单管多重 RT-PCR 检测肠道病毒核酸及其临床应用

龙 辉¹, 谢建红²

(1. 广东省清远市妇幼保健院 511500; 2. 广东省珠海市妇幼保健院 519000)

摘 要:目的 建立一种快速检测肠道病毒通用型(EV)、科萨奇病毒 A16(CA16)和肠道病毒 71(EV71)核酸的单管多重反转录聚合酶链反应(RT-PCR),并探讨其临床应用价值。方法 建立单管多重 RT-PCR 检测 EV、CA16 和 EV71 的反应体系,并优化退火温度、各引物比例和循环参数等反应条件;采用自建 RT-PCR 体系检测 136 例手足口病患儿的肠道病毒核酸。结果 单管多重 RT-PCR 检测体系的最佳反应条件:退火温度为 54 ℃;EV、CA16 和 EV71 引物比例为 2:1:1;循环参数为 35。采用自建单管多重 RT-PCR 从 136 例标本中检出 EV 阳性 46 例(33.82%),CA16 阳性 14 例(10.29%),EV71 阳性 14 例(10.29%),其中 CA16、EV71 同时阳性 2 例。结论 成功建立检测 EV、CA16 和 EV71 核酸的单管多重 RT-PCR,并应用于手足口病患儿的病原学检测。

关键词:反转录聚合酶链反应; 手足口病; 肠道病毒; 核酸

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.11.019

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)11-1497-04

Development and application of single-tube multiplex RT-PCR for detecting enterovirus RNA

LONG Hui¹, XIE Jianhong²

(1. Maternal and Child Health Hospital of Qingyuan, Qingyuan, Guangdong 511500, China;

2. Maternal and Child Health Hospital of Zhuhai, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

Abstract:Objective To establish a rapid single-tube multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for rapid detection of enterovirus RNA including universal enterovirus (EV), coxsachievirus A-16 (CA16) and enterovirus 71 (EV71) and to evaluate the clinical value of this method. **Methods** The reaction conditions of single-tube multiplex RT-PCR were optimized systematically including annealing temperature, the proportion of three groups of primers and the cycle parameter. After the optimal conditions were determined, single-tube multiplex RT-PCR was used to test enterovirus RNA extracted from stool samples of 136 children diagnosed as hand-foot and mouth disease (HFMD). **Results** The optimal reaction conditions were as follow: annealing temperature was 54 ℃, the proportion of EV, CA16 and EV71 primers corresponded to 2:1:1 and the cycle parameter was 35. Out of 136 samples analyzed by single-tube multiplex RT-PCR, 46 samples were identified as positive for EV (33.82%), 14 samples were identified as positive for CA16 (10.29%) and 14 samples were identified as positive for EV71 (10.29%), among which two samples were identified as positive for both CA16 and EV 71. **Conclusion** The single-tube multiplex RT-PCR assay for detecting enterovirus RNA is successfully established and can be applied to provide etiological evidence for HFMD.

Key words: reverse transcription polymerase chain reaction; hand-foot and mouth disease; enterovirus; nucleotide

手足口病(HFMD)是由肠道病毒(EV)引起的常见传染病,致病病原以柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)和肠道病毒 71 型(EV71)多见^[1]。以婴幼儿发病为主,近年来呈现暴发流行的趋势,严重影响婴幼儿的生活及学习,成为影响社会稳定的公共卫生问题。尤其是 2008 年 3 月在安徽阜阳暴发的手足口疫情,出现了部分死亡病例,从而引起了全社会的广泛关注^[2]。如何对 HFMD 的病原进行快速检测,对 HFMD 的早期诊断、治疗和预后观察显得尤为重要。本研究旨在建立一种简便、快速检测 EV 核酸的单管多重反转录聚合酶链反应(RT-PCR),为 HFMD 的早期诊断及治疗提供病原学依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 6 月至 2015 年 3 月清远市妇幼保健院儿科收治的 136 例疑诊 HFMD 患儿的粪便标本,所有标本置-40 ℃保存待检。其中男 74 例,女 62 例,年龄 6 个月至 11 岁,平均 3 岁零 2 个月。HFMD 参照原卫生部颁布的《HFMD 诊疗指南(2010 年版)》诊断标准^[3]。

1.2 试剂与仪器 柱式病毒 RNA 提取试剂购自北京天恩泽

基因科技有限公司,one-step RT-PCR 试剂盒为 Takara 宝生物(大连)公司产品,采用珠海黑马 9600 型 PCR 仪进行检测。

1.3 方法

1.3.1 RNA 提取 先用生理盐水将大便标本进行重悬,取 0.2 mL 重悬液至 1.5 mL 洁净离心管中,严格按照病毒 RNA 提取试剂盒说明书提取病毒 RNA。提取后的 RNA 可直接用于 RT-PCR 或-80 ℃保存。

1.3.2 EV 通用型(以下简称 EV)、CA16 和 EV71 单重 RT-PCR 退火温度选择 分别对 EV、CA16 和 EV71 单重 RT-PCR 采用梯度 PCR 进行退火温度摸索,温度选择 47~63 ℃。采用 Primer 5.0 软件设计各引物序列,交由 Takara 宝生物(大连)公司合成,引物序列见表 1。以实时荧光 RT-PCR 检测 EV、CA16 和 EV71 三者均为阳性的 RNA 作为 RT-PCR 反应的模板。RT-PCR 反应条件为:50 ℃反转录反应 30 min,94 ℃预变性 2 min 后,94 ℃ 30 s,梯度 PCR 退火温度 47~63 ℃ 30 s,72 ℃延伸 45 s,35 个循环后,72 ℃再延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物于 2%的琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶成像仪对

结果进行分析。

1.3.3 EV、CA16 和 EV71 单管多重 RT-PCR 退火温度确定 在确定各单重 RT-PCR 退火温度后,选择 EV、CA16 和 EV71 三者均能扩增出产物的温度范围作为单管多重 RT-PCR 退火温度摸索条件,从而选择最佳退火温度。

表 1 EV、CA16 和 EV71 RT-PCR 引物序列

名称	引物序列	产物长度(bp)
EV	5'-ATG AAA GTT GCG GAG TGT-3'	263
	5'-GCA GAG TTA CCC ATT ACG A-3'	
CA16	5'-TCT GGG ACT TCG GAT TAC-3'	315
	5'-AGC GGT TTA CTT GGT TGT-3'	
EV71	5'-GTG TTA GGG ACC GCT TAG-3'	425
	5'-GAA ACC TTG TCT GCC ATT-3'	

1.3.4 单管多重 RT-PCR 按正交设计方法摸索 EV、CA16 和 EV71 各引物比例 分别以 EV、CA16 和 EV71 引物(浓度为 10 μmol/L)体积 0.5、1.0、1.5 和 2.0 μL 作为引物比例摸索条件来选择单管多重 RT-PCR 最佳引物比例。

1.3.5 单管多重 RT-PCR 循环参数 以 25、30、35 和 40 循环数进行单管多重 RT-PCR 来选择最佳循环参数。

1.3.6 单管多重 RT-PCR 检测 HFMD 患儿 EV 核酸 对单管多重 RT-PCR 各反应参数进行优化后,建立最佳反应体系用于临床标本检测。将 136 例诊断为 HFMD 患儿的大便标本提取 RNA 后,采用单管多重 RT-PCR 同时检测 EV、CVA16 和 EV71,从而分析 HFMD 患儿 EV 感染情况。结果判断标准见表 2。

表 2 单管多重 RT-PCR 检测结果解释

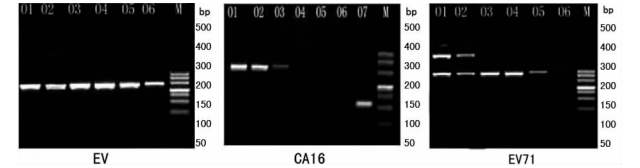
待测标本 RT-PCR 结果	结果判断
EV(−)、EV71(−)、CA16(−)	非 EV
EV(+),EV71(−)、CA16(−)	非 EV71、CA16 的其他 EV
EV(+),EV71(+),CA16(−)	EV71
EV(+),EV71(−)、CA16(+)	CA16
EV(+),EV71(+),CA16(+)	EV71 和 CA16 混合感染

注:(+)表示阳性,(−)表示阴性。

2 结 果

2.1 EV、CA16 和 EV71 各单重 RT-PCR 退火温度 EV 在温度为 47~62 ℃ 时均能扩增出产物,表明其退火温度范围较宽。CA16 在 48~54 ℃ 能扩增出产物,而在 57~63 ℃ 未见扩增产物,由此说明 CA16 的退火温度为 48~54 ℃。虽然 EV71

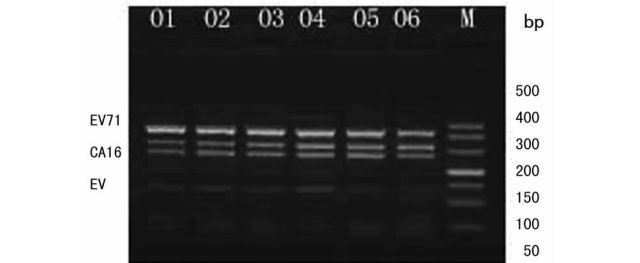
在 47~62 ℃ 均能扩增出产物,但在 47~49 ℃ 出现非特异性条带,说明该退火温度范围过低,因此 EV71 适宜的退火温度为 50~62 ℃。综合三者单重 RT-PCR 的退火温度,选择 49~55 ℃ 作为三者单管多重 RT-PCR 退火温度摸索的范围。EV、CA16 和 EV71 单重梯度 RT-PCR 结果见图 1。



注:EV 和 EV71 的 01~06 温度范围为 47~62 ℃。CA16 的 01~06 温度范围为 48~63 ℃,07 为内对照,M 为 DNAMaker DL500。

图 1 EV、CVA16 和 EV71 单重 RT-PCR 各退火温度范围

2.2 EV、CA16 和 EV71 单管多重 RT-PCR 退火温度 三者在 49~55 ℃ 均能扩增出产物(图 2),根据三者产物条带灰度的强弱选择 54 ℃ 作为 EV、CA16 和 EV71 单管多重 RT-PCR 最适退火温度。



注:01 为 49.4 ℃,02 为 50.4 ℃,03 为 51.6 ℃,04 为 52.9 ℃,05 为 54.2 ℃,06 为 55.0 ℃, M 为 DL500。

图 2 单管多重 RT-PCR 退火温度

2.3 单管多重 RT-PCR EV、CA16 和 EV71 各引物剂量 见表 3。通过对各引物比例条件的摸索,根据不同引物比例产物灰度的强弱(图 3),选择 EV : CA16 : EV71=2 : 1 : 1 为单管多重 RT-PCR 为最佳引物比例条件。

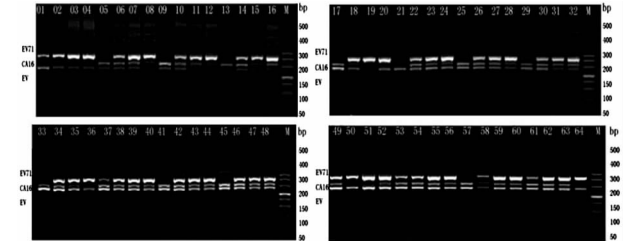


图 3 单管多重 RT-PCR EV、CA16 和 EV71 各引物比例电泳图

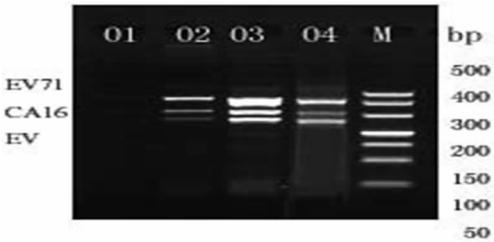
表 3 单管多重 RT-PCR 检测 EV 核酸引物剂量(μL)

编号	EV	CA16	EV71	编号	EV	CA16	EV71	编号	EV	CA16	EV71	编号	EV	CA16	EV71
1	0.5	0.5	0.5	17	1.0	0.5	0.5	33	1.5	0.5	0.5	49	2.0	0.5	0.5
2	0.5	0.5	1.0	18	1.0	0.5	1.0	34	1.5	0.5	1.0	50	2.0	0.5	1.0
3	0.5	0.5	1.5	19	1.0	0.5	1.5	35	1.5	0.5	1.5	51	2.0	0.5	1.5
4	0.5	0.5	2.0	20	1.0	0.5	2.0	36	1.5	0.5	2.0	52	2.0	0.5	2.0
5	0.5	1.0	0.5	21	1.0	1.0	0.5	37	1.5	1.0	0.5	53	2.0	1.0	0.5
6	0.5	1.0	1.0	22	1.0	1.0	1.0	38	1.5	1.0	1.0	54	2.0	1.0	1.0

续表 3 单管多重 RT-PCR 检测 EV 核酸引物剂量(μL)

编号	EV	CA16	EV71	编号	EV	CA16	EV71	编号	EV	CA16	EV71	编号	EV	CA16	EV71
7	0.5	1.0	1.5	23	1.0	1.0	1.5	39	1.5	1.0	1.5	55	2.0	1.0	1.5
8	0.5	1.0	2.0	24	1.0	1.0	2.0	40	1.5	1.0	2.0	56	2.0	1.0	2.0
9	0.5	1.5	0.5	25	1.0	1.5	0.5	41	1.5	1.5	0.5	57	2.0	1.5	0.5
10	0.5	1.5	1.0	26	1.0	1.5	1.0	42	1.5	1.5	1.0	58	2.0	1.5	1.0
11	0.5	1.5	1.5	27	1.0	1.5	1.5	43	1.5	1.5	1.5	59	2.0	1.5	1.5
12	0.5	1.5	2.0	28	1.0	1.5	2.0	44	1.5	1.5	2.0	60	2.0	1.5	2.0
13	0.5	2.0	0.5	29	1.0	2.0	0.5	45	1.5	2.0	0.5	61	2.0	2.0	0.5
14	0.5	2.0	1.0	30	1.0	2.0	1.0	46	1.5	2.0	1.0	62	2.0	2.0	1.0
15	0.5	2.0	1.5	31	1.0	2.0	1.5	47	1.5	2.0	1.5	63	2.0	2.0	1.5
16	0.5	2.0	2.0	32	1.0	2.0	2.0	48	1.5	2.0	2.0	64	2.0	2.0	2.0

2.4 单管多重 RT-PCR 循环参数 见图 4。25 循环时无扩增产物,30 循环时产物条带较暗,说明产物量较少,40 循环时已至 PCR 扩增的平台期,因此选择 35 循环作为单管多重 RT-PCR 的循环参数。



注:01 为 25 循环参数,02 为 30 循环参数,03 为 35 循环参数,04 为 40 循环参数。

图 4 单管多重 RT-PCR 不同循环参数

2.5 单管多重 RT-PCR 检测 HFMD 患儿 EV 核酸 见图 5。在 136 例大便标本中检出 EV 阳性 46 例(33. 82%),CA16 阳性 14 例(10. 29%),EV71 阳性 14 例(10. 29%),其中 CA16、EV 同时阳性 2 例。

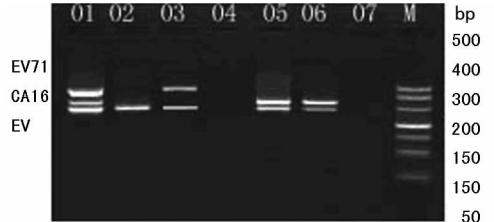


图 5 单管多重 RT-PCR 检测 HFMD 患儿 EV 核酸

3 讨 论

HFMD 是由多种人 EV 引起的一种婴幼儿常见的传染病,大多数患者症状轻微,以发热和手、足、口腔等部位的皮疹或疱疹为主要症状,其中以 EV71 和 CA16 感染较常见^[4]。特别是 EV71 可出现无菌性脑膜炎、脑炎、脑脊髓炎等中枢神经系统病变,严重者可致死亡^[5-6]。HFMD 是一种可预防、可治愈的疾病,主要应于早期诊断、早期隔离、早期治疗。因而对 HFMD 病原学进行快速检测,为 HFMD 提供早期诊断依据显得尤为重要。目前 HFMD 诊断以临床表现为主要手段,传统的实验室诊断方法有病毒分离、中和试验和 ELISA 等^[7]。病毒分离时间长,操作繁琐。血清中和试验和 ELISA 用于疾病早期诊断灵敏度不高。通过检测 EV 核酸则能更快速、更特异

地对 HFMD 进行诊断^[8]。常用于 EV 核酸检测的方法有 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 等,虽然实时荧光 RT-PCR 检测时间短,操作简便,但由于其要使用荧光探针,且不能用单管多重的方法同时检测 EV、CA16 和 EV71,因而检测成本较高,增加了患者的经济负担^[9]。为了提高检测 EV 核酸的灵敏度,有研究者采用互补锁定引物技术 RT-PCR 和反转录环介导等温扩增法等方法来提高检测的灵敏度,但是这些方法技术难度大,应用成本更高^[10-11]。为了建立一种更简便快速、经济的方法,本研究将 EV、CA16 和 EV71 3 种引物加入同一管中,对各反应条件进行优化,采用单管多重 RT-PCR 同时对 EV、CA16 和 EV71 进行检测。

分别对单管多重 RT-PCR 的退火温度、各引物的比例及循环参数等条件进行优化,其退火温度为 54 ℃,EV、CA16 和 EV71 的引物比例为 2 : 1 : 1,循环参数为 35,成功建立用于 EV 核酸检测的单管多重 RT-PCR。并对 136 例 HFMD 患儿临床标本进行检测,EV 阳性率为 33. 82%,CA16 阳性率为 10. 29%,EV71 阳性率为 10. 29%,由此表明在 HFMD 患儿中 CA16 和 EV71 均有感染,为 HFMD 的诊断、治疗及预后观察提供了指导作用。为使单管多重 RT-PCR 能更好地应用于临床,需要对单管多重 RT-PCR 进行方法学评价,包括特异性、灵敏度及与其他方法进行比较,这是本研究下一步将要解决的问题。

HFMD 已在世界范围内流行,常成暴发趋势,可致严重的并发症甚至死亡,在我国已列为丙类传染病,因而实验室检查对 HFMD 的早期诊断有重要意义。本研究所建立的单管多重 RT-PCR 更能简便快速、经济有效地在各基层单位应用于 HFMD 的病原体检测^[12]。

参考文献

[1] 王学东,孙爱霞,孟卫东,等. 人肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型的现况研究[J]. 医学检验与临床,2015, 26(1):54-57.

[2] 万俊峰,朱理业,刘红,等. 阜阳市手足口病(EV71 感染)疫情流行病学分析[J]. 安徽医学,2008,6(4):268-269.

[3] 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2010 版)[J]. 中国实用乡村医生杂志,2012,19(19):9-11.

[4] 孙宝昌,朱传新,陈俐丽,等. 健康人群 EV71、CA16 及其他肠道病毒携带率调查[J]. 浙江预防医学,2015,27(6): 585-587.

(下转第 1502 页)

发现, MG 患者外周血 Th17 特异性转录因子 ROR γ t 的表达呈显著性增高, 由此提示 Th17 与 MG 的发生和发展密切相关。

KLF 家族是真核生物中一大类基础转录因子, 在真核细胞的基因转录调控过程中起重要作用^[9]。KLF4 是其家族中目前研究最多的一员, 包含 3 个结构域: 高度保守的 C-端 DNA 结合结构域、高度可变的 N-端转录调节结构域及核定位序列^[10]。KLF4 能结合靶基因富含 Gc 的启动子序列, 促进或抑制下游基因表达, KLF4 对 Th17 的分化具有正调节作用^[5]。本研究发现, 在 MG 患者 PBMC 中 KLF4 mRNA 的表达也显著增高, 而且与 ROR γ t mRNA 的表达呈正相关($r=0.705$, $P<0.05$)。本研究结果提示, MG 患者 PBMC 中 KLF4 mRNA 可以通过促进 ROR γ t 活性而上调 Th17 表达, 促进 Th17 细胞分化。

miRNA 是一类内源性的具有调控功能的非编码小分子 RNA, 每个 miRNA 可以有多个靶基因, 而几个 miRNAs 也可以调节同一个基因。它通过与靶基因的 3'UTR 结合继而抑制靶基因的表达^[11]。人类的外周血中 KLF4 是 miR-206 的靶分子之一^[6]。本研究发现, MG 患者 PBMC 中 miR-206 表达下降, 相反 KLF4 mRNA 表达水平却呈升高状态, 二者呈明显负相关($r=-0.675$, $P<0.05$), 并且 miR-206 与 ROR γ t mRNA 表达也表现出显著负相关($r=-0.806$, $P<0.05$), 这可能是由于 miR-206 的低表达从而上调了 KLF4 mRNA 的表达, 进而促进 ROR γ t mRNA 的高表达, 从而使 MG 患者 PBMC 中 Th17 比例增高。

本研究结果表明, MG 患者 PBMC 中 miR-206 的表达下降可在一定程度使 KLF4 mRNA 表达上调, 进一步促使 ROR γ t mRNA 表达增强, 最终提高了 Th17 水平, 促进疾病的发生和发展, 相关的分子机制还需进一步研究。

参考文献

[1] Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis; emerging clinical and biological heterogeneity[J]. Lancet Neurol, 2009, 8(5): 475-490.

[2] 王中魁, 魏东宁, 王卫, 等. Th17 细胞与重症肌无力发病及临床严重度相关性研究[J]. 中国神经免疫学和神经病

学杂志, 2013, 20(3): 167-171.

[3] Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages[J]. Ann Rev Immunol, 2007, 25(5): 821-852.

[4] Lebson L, Gocke A, Rosenzweig J, et al. Cutting edge; the transcription factor Kruppel-like factor 4 regulates the differentiation of Th17 cells independently of ROR γ t [J]. J Immunol, 2010, 185(12): 7161-7164.

[5] An J, Golech S, Klaewongkram J, et al. Kruppel-like factor 4 (KLF4) directly regulates proliferation in thymocyte development and IL-17 expression during Th17 differentiation [J]. FASEB J, 2011, 25(10): 3634-3645.

[6] Parasramka MA, Dashwood WM, Wang R, et al. A role for low-abundance miRNAs in colon cancer: the miR-206/Kruppel-like factor 4 (KLF4) axis [J]. Clin Epigenetics, 2012, 4(1): 16-26.

[7] Pal J, Rozsa C, Komoly S, et al. Clinical and biological heterogeneity of autoimmune myasthenia gravis[J]. J Neuroimmunol, 2011, 231(1/2): 43-54.

[8] 彭素芳, 王建军, 陈建国, 等. 胃癌患者外周血单个核细胞 ROR γ t 和 IL-17 mRNA 水平的检测及临床意义[J]. 免疫学杂志, 2009, 25(3): 318-321.

[9] Yang HW, Xia T, Chen ZL, et al. Cloning, chromosomal-localization and expression patterns of porcine Kruppel-like factors 4, -5, -7 and the early growth response factor 2[J]. Biotechnol Lett, 2007, 29(1): 157-163.

[10] Pearson R, Fleetwood J, Eaton S, et al. Kruppel-like transcription factors: a functional family[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(10): 1996-2001.

[11] Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(3): 219-230.

(收稿日期: 2016-01-13 修回日期: 2016-03-29)

(上接第 1499 页)

[5] Chen SC, Chang HL, Yan TR, et al. An eight-year study of epidemiologic features of enterovirus 71 infection in Taiwan[J]. Am J Trop Med Hyg, 2007, 77(1): 188-191.

[6] 郭靖. 重症肠道病毒 71 型感染手足口病研究进展[J]. 中国药业, 2015, 24(5): 4-6.

[7] Hong J, Kang B, Kim A, et al. Enhanced detection of enteroviruses in clinical samples by reverse transcription-PCR using complementary locked primer technology[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 615-616.

[8] 王晓. 手足口病常见病原体的核酸检测技术研究进展[J]. 华夏医学, 2014, 27(6): 162-165.

[9] 吕厚明, 房本兰, 姜亚楠. 手足口病不同核酸检测方法敏

感性比较[J]. 医药与保健, 2015, 23(2): 91-92.

[10] Arita M, Ling H, Yan DM, et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for a highly sensitive detection of enterovirus in the stool samples of acute flaccid paralysis cases[J]. BMC Infect Dis, 2009, 9(1): 1-10.

[11] 戴光跃. 肠道病毒核酸检测在儿童手足口病诊断应用价值[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(27): 172-173.

[12] 樊旭成, 张凯伦, 杨璐鹭. IQTM5 多重实时荧光定量 PCR 仪快速检测肠道病毒 RNA 及其临床意义[J]. 医学信息 (上旬刊), 2011, 24(12): 216-217.

(收稿日期: 2016-01-18 修回日期: 2016-02-25)