

检测痕量单纯疱疹病毒Ⅱ型荧光定量 PCR 方法的建立

陶 薇 傅 婷 何卓晶 洪 艳 胡如西 贾 岚

摘 要 **目的** 建立一种高敏感度的检测痕量单纯疱疹病毒Ⅱ型(HSV-2)DNA 的实时荧光定量 PCR 方法,为针对 HSV-2 潜伏感染的治疗性疫苗和抗病毒药物疗效提供一个评价方法。**方法** 依据 HSV-2 糖蛋白 D(gD)基因序列,使用序列比对软件,选取其保守区序列设计引物及 TaqMan 探针并进行筛选;以 gD 基因重组质粒 pcDNA3-HSV-2 gD 作为标准模板,对该检测方法的反应条件进行优化,提高其检测特异性、敏感度和重现性。**结果** 该检测方法特异性好,检测的最低拷贝数可达到 2 个拷贝,线性范围为 $2 \times 10^0 \sim 2 \times 10^8$ 拷贝/反应,是普通 PCR 敏感度的 10^3 倍。该检测方法组间和组内变异系数均低于 5%,说明该检测方法具有良好稳定性。**结论** 本研究建立的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法用于检测痕量 HSV-2 DNA 具有特异、敏感、定量和重现性好的优点。

关键词 单纯疱疹病毒Ⅱ型 荧光定量 PCR TaqMan 探针

中图分类号 R373 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.02.014

Development of TaqMan Real-time Fluorescence Quantitative PCR Assay for Detection of Herpes Simplex Virus Type 2. Tao Wei, Fu Ting, He Zhuojing, et al. Zhejiang Academic of Medical Sciences, Zhejiang 310013, China

Abstract Objective A sensitive TaqMan fluorescence quantitative PCR assay for detecting herpes simplex virus type 2 (HSV-2) was developed for evaluating the treatment effect of antiviral medicines and therapeutic vaccines aiming at latent HSV-2 infection. **Methods** Based on the nucleotide sequences of HSV-2, the primers and probes were designed from the glycoprotein D gene of HSV-2. The standard curve was generated by purified pcDNA3-HSV-2 gD of the recombinant plasmid of gD gene. With the pcDNA3-HSV-2 gD as a template, the important influential factors including primers, probe, annealing temperature and primer concentrations were optimized for the highest sensitivity. **Results** This TaqMan fluorescence quantitative PCR assay showed good specificity for detecting HSV-2. The method can detect 2 copies/reaction which was 1000-fold more sensitive than conventional PCR, and the linearity range was $2 \times 10^0 - 2 \times 10^8$ copies/reaction. The intra- and inter-assay coefficients of variation were both less than 5%. **Conclusion** The TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR assay was a specific, sensitive and stable method which could be used for the quantitative detection of HSV-2.

Key words Herpes simplex virus type 2 (HSV-2); Real-time fluorescent quantitative PCR; TaqMan probe

单纯疱疹病毒Ⅱ型(HSV-2)是一种线性双链 DNA 病毒,属于人疱疹病毒科,是一种常见的性传播疾病的致病因子,在人群中感染率较高,主要通过性传播或母婴传播。截止到 2012 年,全世界 15~49 岁人群感染人数达 4.17 亿,每年新增感染者估计可达 4000~8000 例^[1]。HSV-2 主要引起生殖器疱疹,且反复发作,清除病毒十分困难,根源在于 HSV-2 具有嗜神经潜伏性,病毒可在人的骶尾神经节内建立终生潜伏^[2]。HSV-2 潜伏性感染可因各种非特异性

刺激活化而导致相关临床症状的复发,如典型的生殖器疱疹性损伤,或无症状排毒,从而重新具有传染性。妊娠早期急性感染 HSV-2 可致流产、死胎和先天畸形。血清型抗 HSV-2 IgG 阳性的孕妇传染新生儿风险增高^[3]。新生儿疱疹常常会导致长期的神经病学后遗症或死亡^[4]。感染 HSV-2 还会增大感染人类免疫缺陷病毒(HIV)的风险^[5]。此外,还有关于感染 HSV-2 与某些癌症的发病相关的文献报道^[6]。

本研究建立了一种检测痕量 HSV-2 DNA 的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法,通过筛选 PCR 引物和探针,优化反应条件,以提高该方法的特异性、敏感度和重现性。该方法可用于研究 HSV-2 感染、潜伏和复发 3 个阶段的病毒复制情况;了解病毒潜伏的位置;评价抗病毒药物的疗效、预防性疫苗的保护效力和治疗性疫苗的治疗效果等重要问题。

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY12H19009);浙江省科技厅基金资助项目(2011C23002,2011F20015);浙江省公益技术研究社会发展项目(2014C33276)

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院

通讯作者:洪艳,研究员,硕士生导师,电子信箱:hongy1008@163.

com

材料与方法

1. 材料: (1) HSV-2 病毒: 冻存病毒 (本研究室保存) 反复冻融 3 次。离心后取上清加入到单层 Vero 细胞 (本研究室保存) 上, 37℃ 孵育 1h。加入 4% FBS DMEM 完全培养基替换攻毒液体, 35℃ 培养 24 ~ 48h。贴壁细胞用细胞刮板刮下, 每瓶加入 1ml DMEM 不完全培养液重悬后, -80℃ 冻存。(2) 人乳头瘤病毒 (HPV) 由浙江省医学科学院病毒所提供, 作为荧光定量 PCR 方法特异性分析的对照组。(3) 主要试剂和仪器: PCR Mix (Genesolution 公司) 购自上海硕盟公司; Premixs Ex Taq™、Easy dilution 购自 TaKaRa 公司; 质粒小量提取试剂盒购自康为世纪公司。荧光定量 PCR 仪 Rotor Gene 3000 购自德国 Qiagen 公司。(4) 引物与探针: 将 GeneBank 中 HSV-2 全序列进行序列比对, 选取保守区域序列作为设计引物和探针的候选区段。选取 HSV-2 gD 基因 (序列号: Z86099.2), 利用 Primer express 软件设计 PCR 引物和 TaqMan 探针 (表 1)。引物和 TaqMan 探针由上海闪晶生物技术公司合成。

表 1 引物和探针

引物/探针	序列 (5'→3')	序列位置 (bp)
上游引物	ACACCGAGTGGCCCTACAA	141434 ~ 141452
下游引物	TGCATCAGGAATCCCAGGTTA	141531 ~ 141551
探针	Fam - AGTCGTTGGGGGTCTGC- CCCA - tamara	141455 ~ 141475

2. 方法: (1) 标准模板的制备: 含有目的片段的标准模板 pcDNA3 - HSV-2/gD, 由本研究室构建^[7]。采用碱裂解法提取并纯化模板, 测定 A260/A280 比值与浓度后, 换算成拷贝数。(2) 反应体系建立和优化: 根据 Premixs Ex Taq Takara 荧光定量 PCR 试剂盒说明书推荐, 选择不同引物浓度 (0.2、0.4 和 0.8 μmol/L)、TaqMan 探针浓度 (0.2、0.4 和 0.8 μmol/L) 以及退火温度 (58℃、60℃ 和 62℃) 分别进行实验。采用检测敏感度高、背景信号低、扩增荧光信号曲线呈典型 S 型的反应条件作为最适反应条件。(3) 标准曲线的建立: 采用 Easy dilution (TaKaRa 公司) 将纯化的质粒标准模板以 10 倍梯度倍比稀释至 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10 、 1×10^0 拷贝/微升, 在 Rotor - Gene3000 荧光定量 PCR 仪上检测, 得到动力学曲线, 并计算获得相应的标准曲线。(4) 稳定性分析: 分别从批间重复性和批内重复性评价该定量检测方法的

稳定性。选取 3 个浓度 (1×10^4 、 1×10^5 和 1×10^6 拷贝/微升) 标准模板进行荧光定量 PCR 检测。每个浓度分别进行 3 次重复实验, 每次实验各浓度设 3 个重复, 根据 CT 值计算变异系数 (CV)。(5) 特异性分析: 利用本实验建立的方法, 对细胞培养 HSV-2 和具有相似感染途径的 HPV 病毒 DNA 进行检测, 分析该检测方法的特异性。含有 HSV-2 的 Vero 细胞培养液反复冻融 3 次, 经过超声波破碎并离心后, 取上清作为检测样本。(6) 敏感度实验: 利用本实验建立的方法检测 HSV-2 gD 重组质粒标准模板, 并与常规普通 PCR 方法进行比较。

结 果

1. 荧光定量 PCR 标准模板的制备: 标准模板浓度为 $0.443 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, A260/A280 为 1.8, 表明该重组质粒的纯度很高。

2. 荧光定量 PCR 最适反应条件的确定: 以 25 μl 为反应总体积, 通过对不同浓度的引物、Taqman 探针及退火温度的筛选和优化, 确定最佳反应体系为: 荧光探针 1 μl 10 μmol/L (终浓度 0.4 μmol/L)、上下游引物各 0.5 μl 10 μmol/L (终浓度 0.2 μmol/L)、TaKaRa 荧光定量 PCR 预混液 12.5 μl、灭菌双蒸水 8.5 μl、模板 2 μl。反应程序采用两步法: 95℃ 预变性 1min; 95℃ 5s, 60℃ 25s, 共 45 个循环。

3. 荧光定量 PCR 标准曲线的建立: 梯度稀释的质粒标准模板在扩增后呈现典型的 S 型扩增曲线 (图 3A)。对荧光信号分析显示, 在 $2 \times 10^0 \sim 2 \times 10^8$ 拷贝范围内, 9 个点具有良好的线性关系, 斜率为 -3.311, 相关系数 $R^2 = 0.9992$, 反应效率为 1, 定量敏感度为 2 个拷贝。以标准模板拷贝数的对数为横轴 (X), 检测的循环数 CT 值为纵轴 (Y) 建立标准曲线 (图 1), 用于 HSV-2 病毒 DNA 的绝对定量, 标准曲线 $CT = -3.311 \times \log(\text{conc}) + 36.756$ 。

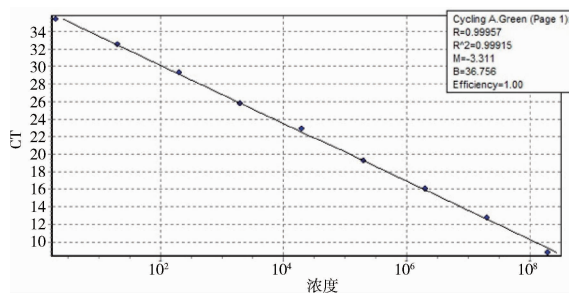


图 1 定量标准曲线

4. 重复性分析: 对 pcDNA3 - HSV-2 gD 标准模板 (10^4 、 10^5 、 10^6 拷贝/微升) 进行了组内和组间荧光

定量 PCR 重复性测定,每个浓度分别进行 3 次重复实验,每个浓度设 3 个重复,结果显示组内和组间变异系数均小于 5% (表 2)。

表 2 荧光定量 PCR 方法的重复性

差异	标准模板浓度 (拷贝/微升)	CT 值平均数 ($\bar{x} \pm s$)	变异系数 (CV%)
组内实验	1×10^4	24.85 ± 0.050	0.20
	1×10^5	21.51 ± 0.078	0.36
	1×10^6	18.20 ± 0.078	0.43
组间实验	1×10^4	25.15 ± 0.92	3.66
	1×10^5	21.70 ± 0.72	3.32
	1×10^6	18.31 ± 0.88	4.81

5. 特异性分析:采用该方法检测 Vero 细胞培养 HSV-2、HPV 病毒和阴性对照后,只有 HSV-2 检测呈阳性反应,表明本实验建立检测 HSV-2 荧光定量 PCR 方法具有良好的特异性(图 2)。

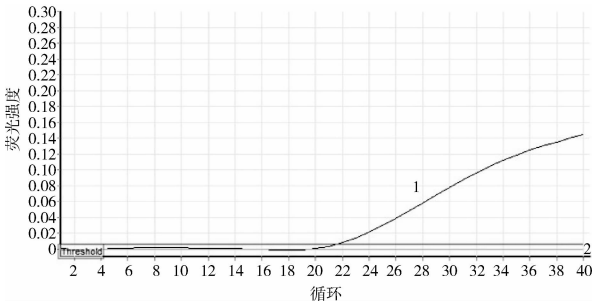


图 2 特异性结果

1. HSV-2; 2. HPV 和阴性对照

6. 敏感度分析:将 pcDNA3-HSV-2 gD 标准模板 10 倍系列稀释后,分别进行普通 PCR 和荧光定量 PCR 检测,结果荧光定量 PCR 最低检测为 2 拷贝/反应(图 3A),普通 PCR 的最低检测限为 2×10^3 拷贝/反应(图 3B)。本研究建立的方法的检测敏感度为普通 PCR 的 10^3 倍。

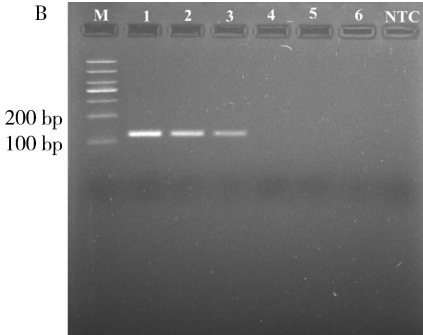
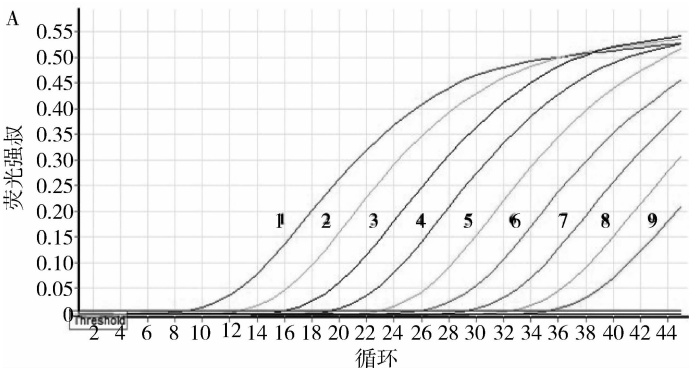


图 3 荧光定量 PCR 及普通 PCR 敏感度比较

A. 荧光定量 PCR, 1~9 分别为 $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^0$ 拷贝/反应; B. 普通 PCR, 1~6 分别为 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^0$ 拷贝/反应; NTC. 阴性对照; M. DNA ladder

讨 论

HSV-2 主要传染源是生殖器疱疹患者和无症状病毒携带者。近年来随着我国经济的发展,特别是沿海地区,其发生率呈现逐年上升的趋势。随着研究的逐渐深入,研究者认为 HSV-2 感染可能会带来超过以往的严重后果。研究者发现 HSV-2 可以增加感染 HIV 的概率。HSV-2 可以通过破损生殖器上皮为 HIV-1 募集活化的靶细胞和破坏黏膜朗格汉斯细胞功能^[5,8]。HIV 患者感染 HSV-2 可以增加其生殖道 HIV 的释放和加速 HIV 疾病的进程^[9,10]。相反,感染 HIV 也可以增加 HSV-2 的释放频率和数量。此外,研究者认为 HSV-2 还参与神经疾病的发生,如癫痫、多发性硬化症、阿尔茨海默病、自闭症及帕金森病^[11-15]。这些感染 HSV-2 所导致的严重后果,越来越受到人们的重视,也迫切的需要切实有效

的治疗方法和预防手段。在经过多年的研究,对于 HSV-2 的发病机制的研究取得重大进展。HSV-2 潜伏感染和反复发作是病毒感染无法根治的根源。

目前 HSV-2 的嗜神经潜伏性是有有效治疗和彻底清除该病毒的最大障碍,因此针对 HSV-2 神经节潜伏感染的治疗性药物和治疗性疫苗将是研究的重点。目前已发表的用于检测 HSV-2 的定量 PCR 方法虽然较多,多用于临床疱疹感染诊断和流行病学调查,检测敏感度不高,而利用更敏感方法(如定量 PCR 方法)检测潜伏感染时药物治疗或疫苗导致的潜伏病毒量变化的研究报道更少^[15]。笔者在实验过程中共设计和合成了 3 对引物和探针,其他两对检测敏感度较差,说明引物和探针的选择在提高荧光定量 PCR 检测敏感度方面尤为重要。从敏感度结果可知,该荧光定量 PCR 方法可以检出的质粒浓度低至 2

拷贝/反应,说明荧光定量 PCR 较之其他检测方法,如免疫组化和普通 PCR,在敏感度方面具有很强的优势。此外,针对 HSV-2 嗜神经潜伏的特点,检测样本需要从实验动物组织特别是从神经节中提取,因此优化组织提取 DNA 或总 RNA 方法也是实验成败的关键。

本研究建立的实时荧光定量 PCR 检测方法可用于定量检测个位数痕量 HSV-2 病毒 DNA,具有高敏感度。这一方法将为后续针对神经节潜伏的痕量病毒的抗病毒药物或治疗性疫苗的疗效评价提供科学依据。

参考文献

- 1 Looker KJ, Magaret AS, Turner KM, *et al.* Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1):e114989
- 2 Cunningham AL, Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, *et al.* The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control [J]. *J Infect Dis*, 2006, 194(Suppl 1):S11-S18
- 3 Brown ZA, Sklke S, Zeh J, *et al.* The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy [J]. *N Engl J Med*, 1997, 337(8):509-515
- 4 Kimberlin DW, Lin CY, Jacobs RF, *et al.* Natural history of neonatal herpes simplex virus infections in the acyclovir era [J]. *Pediatrics*, 2001, 108(2):223-229
- 5 Thurman AR, Doncel GF. Herpes simplex virus and HIV: Genital infection synergy and novel approaches to dual prevention [J]. *Int J STD Aids*, 2012, 23(9):613-619
- 6 Thomas F, Elguero E, Brodeur J, *et al.* Herpes simplex virus type 2 and cancer: a medical geography approach [J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2011, 1239-1242

- 7 傅婷,陈勇,洪艳,等.壳聚糖季铵盐(HTCC)载 HSV-2 型 DNA 疫苗 pgD 诱导小鼠免疫应答的初步研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(2):205-207
- 8 De Jong M, de Witte L, Taylor ME, *et al.* Herpes simplex virus type 2 enhances HIV-1 susceptibility by affecting langerhans cell function [J]. *J Immunol*, 2010, 185(3):1633-1641
- 9 Todd J, Riedner G, Maboko L, *et al.* Effect of genital herpes on cervicovaginal HIV shedding in women co-infected with HIV AND HSV-2 in Tanzania[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e59037
- 10 Lingappa JR, Baeten JM, Wald A, *et al.* Daily acyclovir for HIV-1 disease progression in people dually infected with HIV-1 and herpes simplex virus type 2: a randomised placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2010, 375(9717):824-833
- 11 Kim SH, Lee SG, Kim SH, *et al.* Relapsed herpes simplex virus encephalitis after epilepsy surgery[J]. *J Epilepsy Res*, 2013, 3(1):28-31
- 12 Koros C, Ioannidis A, Acquaviva T, *et al.* HSV1 and 2 detection in the CSF of multiple sclerosis patients by real-time PCR[J]. *In Vivo*, 2014, 28(6):1201-1205
- 13 Dumitrascu OM, Mott KR, Ghiasi H. A comparative study of experimental mouse models of central nervous system demyelination [J]. *Gene Ther*, 2014, 21(6):599-608
- 14 Mancuso R, Baglio F, Agostini S, *et al.* Relationship between herpes simplex virus-1-specific antibody titers and cortical brain damage in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment[J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6(285):1-8
- 15 Paul S, Khanapur S, Boersma W, *et al.* Cerebral adenosine A₂ receptors are upregulated in rodent encephalitis [J]. *Neuroimage*, 2014, 15(92):83-89

(收稿日期:2015-03-11)

(修回日期:2015-04-01)

粪菌移植在小鼠实验性结肠炎中的疗效研究

姬盼盼 周中银 李 槐 操寄望 罗和生

摘 要 **目的** 观察粪菌移植(fecal microbiota transplantation, FMT)对葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的小鼠结肠炎的影响,探讨 FMT 对结肠炎的治疗作用和可能机制。**方法** 将小鼠分为 4 组:正常对照组、DSS 组、美沙拉嗪(又叫 5-氨基水杨酸, 5-aminosalicylic acid, 5-ASA)组、FMT 组。除正常对照组外,其余 3 组小鼠连续饮用 3% DSS 水 7 天,建立急性溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)模型,同时 DSS 组、5-ASA 组及 FMT 组于实验第 1、3、5、7 天分别给予 0.5% 羧甲基纤维素钠(Carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na)、5-ASA 及粪菌液灌肠。每天观察各组疾病活动指数(disease activity index, DAI),于实验第 8 天处死小鼠,测量结肠长度,检测结肠组织中中性粒细胞髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活力,肿瘤坏死因子- α

基金项目:湖北省科技厅基金资助项目(2013BKB013)

作者单位:430060 武汉大学人民医院消化内科

通讯作者:周中银,主任医师,电子信箱:zhouhu0425@163.com