

# 柯萨奇 B 组 3 型病毒 SYBR Green I RT-PCR 检测方法的建立

张 伟 李咏洁 杨凤梅 李艳艳 靳玮华 徐鸿界 李明学 刘 权 赵 远 和占龙

**摘 要** **目的** 建立一种灵敏、特异的柯萨奇 B 组 3 型(CV-B3)病原 SYBR Green I RT-PCR 实时荧光定量检测方法,用于快速、准确地检测 CV-B3。**方法** 设计柯萨奇 B 组病毒通用引物以及 VP1 基因的 T7 启动子特异性引物,以体外转录获得的 RNA 为标准品,绘制标准曲线,建立 CV-B3 的荧光定量 PCR 检测方法;对检测方法的敏感度、特异性、重复性进行评价。**结果** 该检测方法在  $10 \sim 10^9$  拷贝/微升范围内具有良好的扩增效率和线性关系,最低检测限为 10 拷贝/微升,标准曲线  $r^2 = 0.999$ ,扩增效率为 95.7%;且对柯萨奇病毒 A 组 6 型(CV-A6)、柯萨奇病毒 A 组 10 型(CV-A10)、肠道病毒 71 型(EV-71)均无交叉反应,重复性实验变异系数(CV%) $< 2\%$ 。**结论** 本实验建立的检测方法敏感度较高,同时具备良好的特异性及重复性,可用于 CV-B3 病原的临床及实验室样本的定性定量检测。

**关键词** 柯萨奇病毒 B 组 3 型 SYBR Green I RT-PCR

中图分类号 R373

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.01.014

**Establishment of SYBR Green I RT-PCR Detection Assay for Coxsackievirus B3.** ZHANG Wei, LI Yongjie, YANG Fengmei, et al. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College/Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases, Yunnan 650118, China

**Abstract** **Objective** To Establish a sensitive and specific SYBR Green I real-time quantitative PCR (RT-qPCR) for rapid and accurate detection of coxsackievirus B3 (CV-B3). **Methods** Universal primers for Coxsackie B virus and specific primers for the VP1 gene with T7 promoter of this Serotype strain was designed. 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-B3. The sensitivity, specificity and repeatability of this detection method was evaluated. **Results** The method showed a good amplification efficiency and linear relationship in the range of  $10 - 10^9$  copies/ $\mu$ l. The lowest detection limit was 10copies/ $\mu$ l, the  $r^2$  coefficient of the standard curve was 0.999, and the amplification efficiency was 95.7%. There was no cross reaction was found with coxsackievirus A6(CV-A6), coxsackievirus A10(CV-A10) and enterovirus 71 (EV-71) in the method and the coefficient of variation (CV%) value of repeatability experiment was less than 2%. **Conclusion** The detection method established in this experiment has strong sensitivity, specificity, and reproducibility, and can be used for the qualitative and quantitative detection of the clinical and laboratory samples.

**Key words** Coxsackievirus B3; SYBR green I; RT-PCR

柯萨奇 B 组病毒是一种能引起婴幼儿手足口病的病原,在 2008 年后该类病原被列入中国疾病预防控制中心信息系统的疾病监测范围<sup>[1]</sup>。柯萨奇病毒 B3 属小 RNA 病毒科,肠道病毒属 B 组,临床上大量肠道病毒感染并发症如病毒性心肌炎的报告与柯萨奇 B3 密切相关,而根据病毒性心肌炎的诊疗指南指出:目前该疾病的诊断主要依靠临床症状、心电图、血清心

肌酶等影像学及血液生化指标判定,这对急性、亚急性及重症病毒性心肌炎患者而言存在诊疗的滞后性<sup>[2]</sup>。对于该病毒的感染并无特殊治疗方法,主要采取对症治疗,因此基于以上背景,本研究拟建立起敏感、特异、低成本的 CV-B3 分子检测方法,以期对临床上该病原的检测提供参考。

## 材料与方法

1. 材料:CV-B3、CV-A10、CV-A6 及 EV-71 病原由中国医学科学院医学生物学研究所遗传室马绍辉教授和呼吸道病毒研究室刘龙丁教授惠赠。其中 CV-B3 经 Vero 细胞增殖培养后,所收获的病毒液经纯化测定细胞培养半数感染量即感染性效价

基金项目:中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-12M-2-001);云南省重大科技专项(2017ZF020);昆明市科技创新和服务能力提升计划重点项目(2016-2R-07674)

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院医学生物学研究所

通信作者:和占龙,教授,硕士生导师,电子信箱:hzl612@126.com

(cell culture infective dose 50% ,CCID<sub>50</sub>) 为  $1 \times 10^{6.75}$  CCID<sub>50</sub>/ml,分装保存于笔者所在科室;病毒培养及保存溶液均为细胞维持液(表1),配制所需成分均由中国医学科学院医学生物学研究所中心供应室提供;Vero 细胞来源于欧洲动物细胞收藏中心(European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC)第141代,保存于中国医学科学院医学生物学研究所;感受态细胞(JM109)、T 载体(pMD19-T)、反转录 PCR 试剂盒(Prime Script™ One Step RT-PCR Kit)、T7 体外转录试剂盒(in vitro Transcription T7 Kit)、一步法荧光定量 PCR 试剂盒(One Step TB Green® Prime-Script® PLUS RT-PCR Kit)及 DNA 末端加 A 试剂盒(DNA A-Tailing Kit)购自大连宝日医生物工程有限公司,无内毒素小提中量质粒提取试剂盒购自天根生物有限公司;C1000 型 PCR 仪、C1000 Touch™ Thermal Cycler 实时荧光定量 PCR 仪及凝胶成像仪购自

美国伯乐生物科技公司。

表 1 细胞生长液、病毒培养及细胞维持液(病毒保存液)配制

| 项目                             | 细胞生长液   | 细胞维持液   |
|--------------------------------|---------|---------|
| MEM 培养基(ml)                    | 410     | 440     |
| 1% 双抗(ml)                      | 5       | 5       |
| 3% 谷氨酰胺(ml)                    | 15      | 15      |
| 新生牛血清(ml)                      | 50      | 20      |
| 6.6% NaHCO <sub>3</sub> 溶液(ml) | 20      | 20      |
| pH 值                           | 7.0~7.4 | 7.4~7.6 |

2. 引物设计与合成:使用柯萨奇 B 组病毒通用引物对病毒进行扩增后测序,通过 MEGA7 软件对测序结果与 GeneBank 中 CV-B3 毒株序列进行比对,选取该毒株的 VP1 序列并利用 Oligo7 软件设计该段序列的 T7 启动子引物(VP1-T7)及荧光定量 PCR 引物,引物序列详见表2,引物由昆明擎科生物公司合成。

表 2 引物序列

| 引物名称   | 引物序列(5'→3')                                                                 | 产物大小(bp) |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------|----------|
| 通用     | 上游引物:GGYTAYATNCANTGYTGGTAYCARAC<br>下游引物:GGTGCTCACTAGGAGGTCYCTRTRTARTCYTCCCR | 1132     |
| VP1-T7 | 上游引物:TAATACGACTCACTATAGGGGGTTGCCGATACCATAGG<br>下游引物:CATTGCTGTAATACTCTGTCTG  | 816      |
| 荧光定量   | 上游引物:GCTCACCTTCGTTATTACTAG<br>下游引物:AATGCTCAAGAATGAATGG                      | 211      |

3. 标准品的构建:使用 Trizol 法提取病毒总 RNA,经通用引物和特异性引物 VP1-T7 进行 RT-PCR 后,获得该病原的带有 T7 启动子的 VP1 基因,使用 DNA A-Tailing 试剂盒、pMD19-T 克隆载体对获取的 VP1 基因 3'末端添加 A 尾并连接至 T 载体上,构建 VP1 基因的重组质粒;将连接产物转入 JM109 感受态细胞中,经蓝白斑筛选后挑取含有阳性克隆的白色菌落,放入含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃ 200r/min 培养 12h 后,测序验证并提取阳性克隆质粒。对重组质粒进行单酶切线性化后使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳对酶切产物进行纯化并回收获得大小为 3508bp 的线性化重组质粒;使用 in vitro Transcription T7 Kit 试剂盒进行体外转录获得 RNA,同时对转录的 RNA 使用水饱和酚/氯仿(1:1)、乙酸钠(NaAC)进行 RNA 精制,获得的标准品用微量分光光度计进行浓度与纯度测定并计算标准品的拷贝数。

4. 荧光定量(RT-qPCR)检测方法的建立:①优

化反应体系:对反应体系的引物浓度以及反应条件进行优化,最终以无二聚体、荧光信号强、背景噪音小为判断标准,确定最佳的反应体系;②标准曲线的建立:对获得的标准品进行 10 倍梯度稀释,取  $10 \sim 10^9$  拷贝/微升标准品稀释液 9 个梯度,设立阴性对照并使用上述优化后的反应体系和条件进行 SYBR Green I RT-PCR 反应,绘制出标准曲线;③特异性检测:使用上述优化后的反应体系分别对 EV-71、CV-A6、CV-A10 的病毒核酸进行检测,验证检测体系的特异性;④敏感度检测:将 CV-B3 的标准品按 10 倍梯度稀释( $10 \sim 10^9$  拷贝/微升),使用建立的 SYBR Green I RT-PCR 方法进行检测,评价其对病毒核酸检测的敏感度;⑤重复性检测:将 CV-B3 病毒接种于 Vero 细胞后,分别于感染后的 0、4、8、12、20、28、36、48、60、72h 收集样本并提取 RNA,进行 SYBR Green I RT-PCR,每个样本做 3 次重复,观察组内重复性。

5. 统计学方法:采用 Graphpad Prism 8.0 统计学软件计算出组内的 Ct 平均值( $\bar{x}$ )、标准差(s)以及变

异系数 (coefficientvariation, CV%)。

结 果

1. CV - B3 病毒 VP1 基因序列的扩增及重组质粒的构建:通用引物扩增 CV - B3 核酸后获得 1132bp 的基因片段(图 1A)与 CV - B3 原始毒株序列比对,其序列一致性为 94%;特异性引物 VP1 - T7 扩增

CV - B3VP1基因获得 816bp 的基因片段(图 1B);重组质粒经 ECOR - I 限制性核酸内切酶进行单酶切后获得 3508bp 的线性化重组质粒(图 1C),同时对重组质粒测序结果与通用引物产物序列比对,其一致性为 99%。以上结果提示成功克隆了该病原的 VP1 基因,构建了该病原的重组质粒。

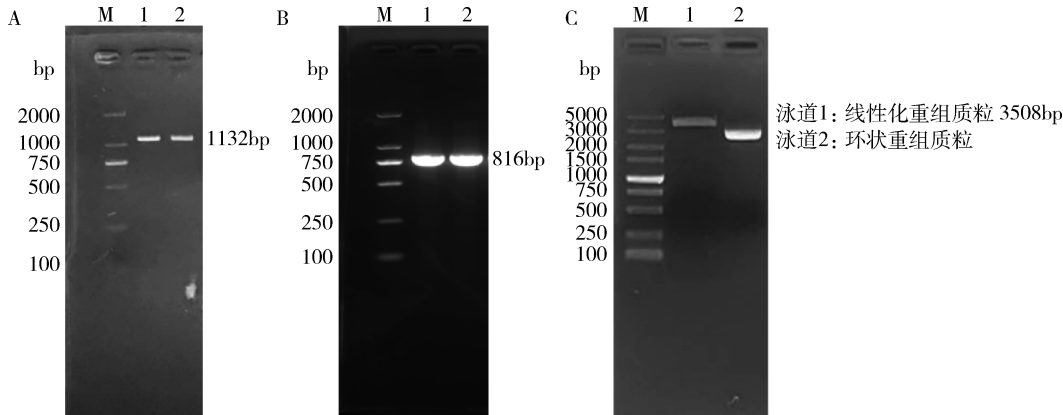


图 1 通用引物扩增产物、VP1 特异性引物扩增产物、重组质粒电泳结果

A. 通用引物扩增产物电泳结果(1、2 为产物,M 为 2000DNA marker); B. CV - B3 的 VP1 片段(1、2 为产物,M 为 2000DNA marker); C. 酶切线性化的质粒和环状质粒(1、2 为产物,M 为 5000DNA marker)

2. 最优荧光定量 PCR 反应体系的确立:对引物浓度以及反应条件摸索,最终确定了引物最佳浓度为 10 $\mu$ mol/L,最佳退火温度为 60 $^{\circ}$ C。最终确定了 SYBR Green I RT - PCR 反应体系(表 3),反应条件为:42 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 10s,95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 30s,共 39 个循环,65 $^{\circ}$ C 5s,95 $^{\circ}$ C 5s 进行溶解曲线反应。

表 3 SYBR Green I RT - PCR 反应体系

| 试剂                                             | 使用量 ( $\mu$ l) |
|------------------------------------------------|----------------|
| 2 $\times$ One Step TB Green RT - PCR buffer 4 | 12.5           |
| Ex Taq HS Mix                                  | 1.5            |
| PrimeScript PLUS RTase Mix                     | 0.5            |
| 荧光定量上游引物                                       | 1              |
| 荧光定量下游引物                                       | 1              |
| RNA                                            | 2              |
| 无核酸酶水                                          | 6.5            |
| 总体积                                            | 25             |

3. 标准曲线的建立:将单酶切线性化的重组质粒经体外转录后用超微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度,按照 10 倍梯度将标准品稀释为 10 ~ 10 $^9$  拷贝/微升的标准品模板,利用上述优化好的 PCR 反应体系进行荧光定量 PCR 反应,并得到标准曲线、扩增曲线、溶解曲线和特异性检测扩增曲线,详见图 2。得到的 CV - B3 荧光定量 PCR 标准曲线方程为  $y =$

$-3.3843x + 37.529, r^2 = 0.999$  扩增效率为 95.7%。

4. 特异性评价:使用建立起的检测方法对 CV - B3、CV - A6、CV - A10、EV - 71 的病毒 RNA 进行扩增(图 2D)。该方法只能特异性地检测 CV - B3 的核酸,而对 CV - A6、CV - A10、EV - 71 的核酸均未检测到荧光信号,提示该方法对检测本株 CV - B3 具有较好的特异性。

5. 敏感度评价:使用该方法检测标准品,结果显示:在 10 ~ 10 $^9$  拷贝/微升范围内,可出现较好的扩增曲线,因此建立的 SYBR Green I RT - PCR 方法的最低检测限为 10 拷贝/微升。

6. 重复性评价:取接种 CV - B3 后 0、4、8、12、20、28、36、48、60 和 72h 的 Vero 细胞样本,提取 RNA 后使用上述检测方法对不同时间点的样本进行独立 3 次重复实验,实验结果如表 4 所示。结果表明各组重复性实验变异系数均 < 2%,提示该检测方法具有良好的重复性。

讨 论

根据欧洲及国内相关地区 2008 ~ 2017 年的流行病学调查报告指出:国内外肠道病毒流行病学病原谱正在逐步发生改变,这在一定程度上增加了肠道病毒感染患者的诊治难度<sup>[3,4]</sup>。而 CV - B3 对心血管系统极高的趋向性和破坏性提示该病原的预防及诊

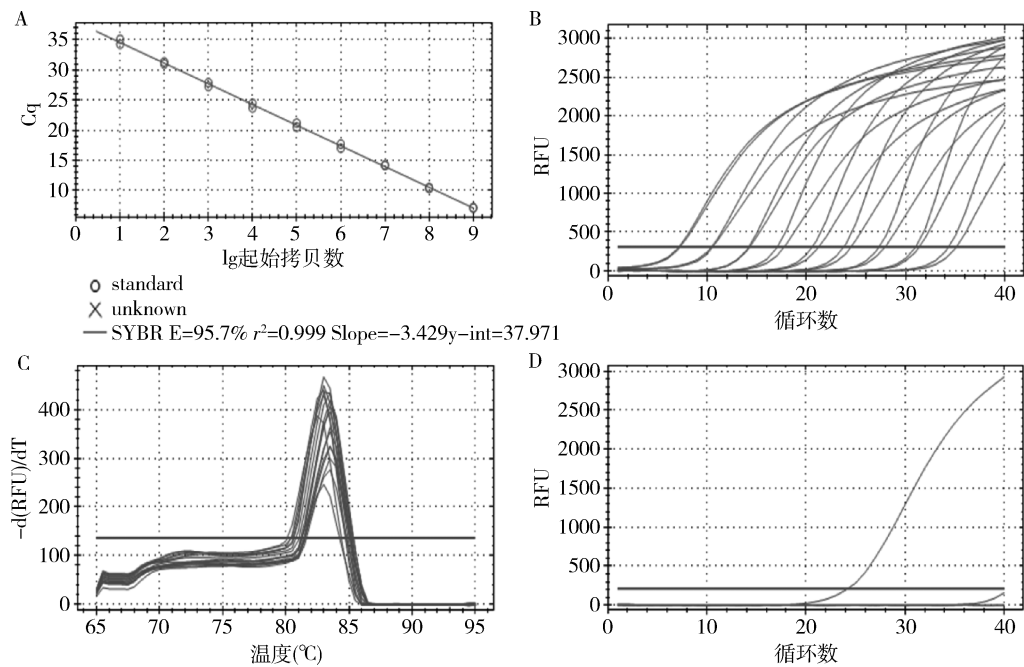


图2 SYBR Green I RT-PCR 反应体系标准曲线的建立及评价  
A. 标准曲线; B. 扩增曲线; C. 溶解曲线; D. 特异性检测

表4 SYBR Green I RT-PCR 检测体系重复性评价

| 时间 (h) | 样品 1 (Ct 值) | 样品 2 (Ct 值) | 样品 3 (Ct 值) | 平均值       | 标准差       | CV ( % )  |
|--------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| 0      | 19.55796488 | 19.60241714 | 19.4172706  | 19.525884 | 0.0966524 | 0.4949963 |
| 4      | 19.13346427 | 19.32918816 | 19.10958425 | 19.190746 | 0.1204879 | 0.6278437 |
| 8      | 16.72333473 | 17.00721244 | 16.34028275 | 16.690277 | 0.3346915 | 2.0053086 |
| 12     | 14.64287907 | 14.58414208 | 14.79605563 | 14.674359 | 0.1094078 | 0.7455715 |
| 20     | 12.54261034 | 12.61131885 | 12.48818475 | 12.547371 | 0.0617050 | 0.4917760 |
| 28     | 14.29757938 | 14.11765760 | 14.13930165 | 14.184846 | 0.0982278 | 0.6924838 |
| 36     | 13.65139098 | 13.91240495 | 13.79622679 | 13.786674 | 0.1307689 | 0.9485168 |
| 48     | 10.90758436 | 10.96556138 | 10.87416083 | 10.915769 | 0.0462467 | 0.4236685 |
| 60     | 10.20565827 | 10.48398996 | 10.38767691 | 10.359108 | 0.1413480 | 1.3644802 |
| 72     | 12.45912373 | 12.87102422 | 12.70577196 | 12.678640 | 0.2072863 | 1.6349254 |

治应当引起足够的重视。因此建立起一种快速、敏感、特异、成本低廉且能完成分型的检测方法对于临床诊断及传染病防治工作具有重大意义。

临床上对于肠道病毒感染的检测,使用较多的主要有病毒的分离培养、血清特异性中和抗体检测、ELISA 检测、核酸检测等<sup>[5]</sup>。其中中和抗体检测以及 ELISA 操作较为繁杂、诊断结果存在假阴性,而病毒分离培养对于操作人员需要极高的生物安全防护意识,同时需要具备二级生物安全实验室的实验条件,对于临床患者的诊断而言存在极大的滞后,因此目前的主流检测方法主要是病毒核酸检测。而核酸检测主要分为常规的核酸检测及荧光定量核酸检测,常规核酸检测需要在 PCR 结束后进行琼脂糖凝胶电泳鉴

定,其操作繁琐易污染,同时只能进行定性检测。而荧光定量核酸检测则不需要电泳鉴定,同时对于病毒载量极低的临床样本仍然能够检出<sup>[6]</sup>。新型生物技术的开发与利用,使得肠道病毒的检测不再局限于核酸检测,目前报道较多的有反转录环介导等温扩增 (reverse transcription loop mediated isothermal amplification, RT-LAMP) 技术、基因芯片技术、新一代测序技术 (NGS) 等<sup>[7,8]</sup>。尽管这些检测方法样本通量大、效率高,但其对实验设备要求较复杂,需要设计各种昂贵的分子探针等<sup>[9]</sup>。而 SYBR Green I RT-PCR 检测方法并不需要合成探针,且并无特殊设备要求。SYBR Green I 方法检测成本低廉,染料与 DNA 结合后,目的片段的扩增可通过荧光强度进行判断,而扩

增片段的统一性、特异性以及是否存在引物二聚体可通过溶解曲线的温度分布来判断<sup>[10,11]</sup>。同时染料法荧光定量检测也存在一定的不足之处,如该方法会产生错误的单链二级结构等。但是肠道病毒血清型众多,设计探针成本较高,同时易感人群基数庞大等,这在一定程度上给病原检测带来较大难度,因此综合检测效率、敏感度、特异性及成本考虑,SYBR Green I 不失为一种较好的检测方法<sup>[12]</sup>。

另外有研究报道建立起了 CV-B3 的 TaqMan 探针实时荧光定量 RT-PCR 检测方法<sup>[13,14]</sup>。虽然 TaqMan 探针法荧光定量较于染料法荧光定量敏感度更高,但是探针的设计及合成成本较于染料更为昂贵且易污染,同时在以上研究报道中,研究者均未将建立的标准品转录成 RNA,这就使得在样品检测过程中必须将样本 RNA 反转录成 cDNA 进行,这在一定程度上增加了检测误差<sup>[15,16]</sup>。而由于标准品载体骨架序列存在,也存在载体骨架序列影响样本检测准确性的可能。

基于此,本研究建立起了一种快速、敏感、特异、低成本的 CV-B3 SYBR Green I RT-PCR 检测方法。首先本实验在建立标准品时,在该病原 VP1 克隆的基础上对其 5'端添加了 T7 启动子,确保其在体外能够成功转录成 RNA,在一定程度上避免了载体骨架序列对检测体系的干扰的可能性,提高了检测准确性。同时基于 T7 启动子,将构建好的重组质粒进行了线性化处理,通过体外转录获得了病毒 VP1 基因 RNA 标准品,使得在检测体系中可以将标准品与检测样本同时进行反应,降低了多步操作带来的误差。与此同时根据实验结果对比,本实验建立的检测方法相较于前人研究具有更高的样品检测上限和检测准确性。

综上所述,本实验建立的 CV-B3 SYBR Green I RT-PCR 检测方法具有良好的敏感度、特异性、重复性,可以为 CV-B3 临床患者的快速诊断及临床样本的快速筛查提供参考。

#### 参考文献

- 1 国家卫生健康委员会. 手足口病诊疗指南(2018 年版)[J]. 传染病信息, 2018, 31(3): 193-198
- 2 中华医学会儿科学分会心血管学组, 中华医学会儿科学分会心

血管学组心肌炎协作组, 中华儿科杂志编辑委员会. 儿童心肌炎诊断建议(2018 年版)[J]. 中华儿科杂志, 2019, 57(2): 87-89

- 3 Cabrerizo M, Díaz-Cerio M, Muñoz-Almagro C, *et al.* Molecular epidemiology of enterovirus and parechovirus infections according to patient age over a 4-year period in Spain[J]. J Med Virol, 2017, 89(3): 435-442
- 4 李艳艳, 李宗瑾, 宋秋坤. 平顶山市 2009~2019 年手足口病流行特征分析[J/OL]. 微生物学免疫学进展, 2021, 3: 1-6
- 5 欧晓燕, 许彬. 手足口病实验室检测方法的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(6): 428-432
- 6 张龙, 袁青, 郑雅萍. 不同分子生物学方法在手足口病标本检测中的应用[J]. 智慧健康, 2017, 3(12): 102-103
- 7 Feng X, Guan W, Guo Y, *et al.* A novel recombinant lineage's contribution to the outbreak of coxsackievirus A6-associated hand, foot and mouth disease in Shanghai, China, 2012-2013[J]. Sci Rep, 2015, 5(1): 1-12
- 8 姜棋予, 冯帆, 柴燕涛. 利用长距离 PCR 扩增国内肠道病毒流行株基因组方法的建立和评价[J]. 生物技术通讯, 2019, 30(3): 326-331
- 9 Marinowicz DR, Zanirati G, Rodrigues FV, *et al.* A new SYBR Green real-time PCR to detect SARS-CoV-2[J]. Scientific reports, 2021, 11(1): 2224
- 10 吕莉琨, 杨东靖, 李力. 手足口病柯萨奇病毒 A2、A4 和 A5 型 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(1): 15-19
- 11 白彩霞, 张达, 赵靓. 鹅星状病毒 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(3): 634-638
- 12 Wan Z, Zhang Y, He Z, *et al.* A melting curve-based multiplex RT-qPCR assay for simultaneous detection of four human coronaviruses[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11): 1880
- 13 代海丽, 高铁磊, 朱琳. 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
- 14 李智涛, 王云龙, 董晓敏. 荧光定量 RT-PCR 检测血清标本中的肠道病毒 RNA[J]. 现代预防医学, 2010, 37(6): 1128-1131, 1137
- 15 牛犇, 洪斌, 穆丽丽. 荧光定量 PCR 在预测微生物学中的应用[J]. 食品工业科技, 2019, 40(5): 275-282
- 16 刘红波, 丛山日, 许丹茜. 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

(收稿日期: 2021-07-07)

(修回日期: 2021-07-09)