维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)06－0688－04

博尔纳病病毒荧光定量套式 RT－PCR 检测方法的建立

徐 平，谢 鹏，邹德智，左 联

(重庆医科大学临床学院神经内科，重庆 400016)

【摘 要】目的：建立博尔纳病病毒(BDV)荧光定量套式 RT－PCR 检测方法，为快速、准确地定量检测 BDV 奠定基础。方法：根据 BDV P24 基因序列，设计并合成引物和荧光标记探针。将 PCR 扩增的 BDV P24 基因片段克隆入载体，重组质粒经筛选、鉴定后，作为阳性模板，用于标准曲线的制定和样品检测。结果：应用量组质粒制作的定量曲线循环阈值与模板具有良好的线性关系，相关系数为 0.998，建立了检测 BDV 的荧光定量套式 RT－PCR 方法。检测 58 例神经精神病患者及 50 例健康人外周血单核细胞(PBMC)中 BDV P24 基因片段，3 例精神分裂症及 1 例帕金森病患者呈阳性，其余均为阴性。结论：荧光定量套式 RT－PCR 方法能够避免 PCR 后处理导致的假阳性污染，并实现准确定量，对于研究 BDV 感染与人类神经精神疾病的关系有很好的应用价值。

【关键词】博尔纳病病毒；基因；病毒；聚合酶链反应

【中国图书分类法分类号】R737；R394.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－05－13

Detection of Borna disease virus by fluorescence quantitative nested RT－PCR

XU Ping, et al

(*Department of Neurology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To establish fluorescence quantitative nested RT－PCR method for detecting Borna disease virus (BDV). *Methods*: According to the specific sequence of BDV P24 genes, the primers and the fluorescence probe were designed and synthesized. The fragment generated by PCR was cloned into the pMD18－T vector. The positive recombinant plasmid would be used as standard quantitative template to make the standard curve for sample detection. *Results*: The standard curve indicated the linear relationship between Ct(cycle threshold) and template concentration ($r=0.998$). The fluorescence quantitative nested RT－PCR method for detection of BDV p24 fragment was established. And it was used to detect BDV p24 fragment in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 58 patients with neuropsychiatric disorders and 50 healthy blood donors. 4 patients with neuropsychiatric disorders were positive, and normal control negative. *Conclusion*: The fluorescence quantitative nested RT－PCR method for detection of Borna disease virus can eliminate PCR cross－contamination which causes false positive, and real－time detection ensures accurate quantity. It can be used to study the association between BDV infection and human neuropsychiatric disorders.

【Key words】 Borna disease virus; Genes; Viral; Polymerase chain reaction

有关博尔纳病病毒(Borna disease virus，BDV)感染与人类神经精神疾病的关系，既往报道的资料各实验室差异较大[1]。聚合酶链反应(PCR)技术用于检测博尔纳病病毒核酸，其灵敏度和特异性是以往其他检测技术所无法比拟的。但由于基因高效扩增后产物的电泳检测易引起 PCR 产物的交叉污染而可能导致假阳性，致使有学者认为用套式逆转录 PCR(nested RT－PCR)在神经精神疾病患者中检出 BDV，可能系某些实验室曾从事动物 BDV 的研究，由于分离的病毒模板或样本的交叉污染所致的假阳性结果[1]。而实时荧光定量 PCR(Fluorescence quantitative PCR)技术[2]，采用荧光技术并实行完全闭管式操作，能大大减少扩增产物污染的机会，提高检测的特异性，并可进行实时定量监测。将其用于检测 BDV，将会有很高的研究和使用价值。我们自行设计合成了检测 BDV 的引物和探针，运用 PE7700 型荧光定量 PCR 仪建立了检测 BDV 的荧光定量套式 RT－PCR 方法。

基金项目：国家自然科学基金资助课题(39870252)

作者介绍：徐 平(1963－)，男，副教授，博士研究生，主要研究方向：中枢神经系统感染性疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 标本来源

神经精神病患者血标本 58 份采自本院住院及门诊患者。健康自愿献血者系本院血库提供。

1.2 仪器

PE7700 荧光定量 PCR 仪(美国 Perkin Elmer 公司)。

1.3 引物和探针

BDV P24 内外引物和特异性荧光探针序列均为自行设计,引物由上海博亚生物技术有限公司合成:荧光探针 5′标记的是 6 - 羧基荧光素(FAM),3′标记的是四甲基罗达明(TAMRA),由中山大学达安基因诊断中心合成。第二轮 PCR 后所扩增的 BDV P24 基因片段为 86bp(见表 1)。

表 1 PCR 引物及荧光探针的碱基序列

种类		碱基序列(5′ - 3′)	bp
外引物	P1	TCAGACCCAGACCAGCGAA	1443 ~ 1461(19bp)
	P2	ATCTGGGGATAAATGCGCG	1816 ~ 1834(19bp)
内引物	P1	CCCTCCAAGTGGAAACCAT	1609 ~ 1617(19bp)
	P2	CAGTATCTTGATGTTCTCGCCA	1673 ~ 1694(22bp)
探针		TCAGCGGTGCGACCACTCCGATAGC	1637 ~ 1661(25bp)

1.4 方法

1.4.1 提取细胞 RNA 每例采外周血 10ml,用 Ficoll - conray 液分离外周血单核细胞(PBMC),用 Tripure RNA 提取试剂盒(Boehring - Mannheim 公司)提取细胞总 RNA,标本置 -20℃保存。

1.4.2 荧光定量套式 RT - PCR 荧光定量 PCR 原理:在常规 PCR 基础上,在反应体系中加入一种带有 2 个荧光标记的探针,该探针可与引物包含序列内的 DNA 模板发生特异性杂交,标记在 5′端者为荧光报告基团(R),荧光发射峰值在 518nm 处,3′端者为荧光淬灭基团(Q),荧光发射峰值在 582nm 处,两者可构成能量传递结构,即当探针保持完整时,Q 抑制或吸收 R 发出的荧光。探针自身的 3′端羟基已被去除或封闭(3′末端被磷酸化),不具有延伸的能力,探针在无特异性 PCR 发生时,荧光信号无变化。当发生特异性 PCR 时,复性期探针与模板 DNA 发生杂交,延伸期 Taq 酶随引物延伸沿 DNA 模板移动,当移动到探针结合的位置时,发挥其 5′→3′外切酶活性,将探针切断,Q 的抑制作用被解除,R 的荧光信号被释放出来(518nm 处的光密度增加而被荧光探测系统检测到)(见图 1)。模板每复制一次,就有一个探针被切断,伴随一个荧光信号的释放。释放的荧光基团数目和 PCR 产物量是一对一的关系,因此可对模板进行准确定量。当荧光信号增强到某一阈值即循环阈值(Cycle threshold,Ct)时,此时的循环次数即被记录下来。该参数与 PCR 体系中 DNA 起始量的对数值之间有严格的线性关系。利用阳性梯度标准品的 Ct 值制成标准曲线,再根据样品的 Ct 值即可准确定出起始 DNA 的量[2]。

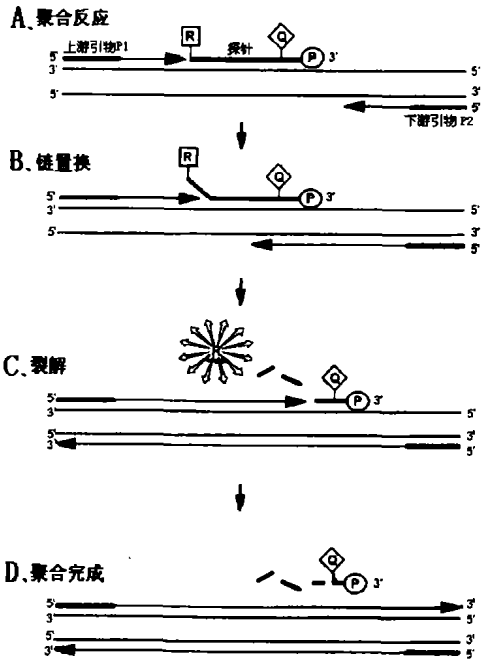


图 1 荧光定量 PCR 的反应模式(R:FAM;Q:TAMRA)

本研究在进行常规套式 RT - PCR 时,第二轮扩增的反应混合物中加入了荧光标记探针进行荧光定量 PCR。首先进行逆转录反应,在含样本 RNA 的反应管中加入逆转录体系 9μl,外引物一对各 0.5μl,逆转录酶 MMLV 20[u],总反应体积 11μl,37℃ 60 min,95℃ 3 min。然后取逆转录后反应液 10μl,加外引物一对各 1μl,10mmol/L dNTP 1μl,25mmol/L $MgCl_2$ 10μl,Taq 聚合酶 3[u],总反应体积 50μl,进行第一轮 PCR,反应条件:94℃ 2 min;94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,共 40 个循环;再 72℃ 7 min。第二轮 PCR 总反应体积 50μl,含第一轮扩增产物 5μl,10mmol/L dNTP 1μl,Taq 酶 3[u],25mmol/L $MgCl_2$ 10μl,内引物一对各 1μl,荧光标记探针 1μl。反应条件:93℃ 2 min;93℃ 45s,55℃ 1 min,10 个循环;93℃ 30s,55℃ 45s,30 个循环。每份标本同时检测 β - actin(237bp)作内参照。每次实验设阴性对照。

1.4.3 PCR 产物纯化 采用醋酸钠、乙醇沉淀法纯化 PCR 产物。

1.4.4 PCR 扩增产物的克隆及测序 阳性 PCR 产物与 pMD18 - T 载体(大连宝生物公司)连接,转化大肠杆菌,采用蓝白斑 LB 平板筛选,含氨苄青霉素 80u/ml LB 培养基培养,RESINcolumn™小批量质粒纯化系统(华美生物工程公司)提取质粒 DNA,用荧光定量 RT - PCR 鉴定阳性重组质粒。阳性重组质粒送上海生物工程有限公司进行序列测定。

1.4.5 阳性定量标准曲线的建立 将鉴定好的质粒测定 OD 值,计算出拷贝数,稀释成 10^5、10^4、10^3、10^2 拷贝/μl 浓度梯度,如上述第二轮 PCR 加入 50μl 反应体系。反应条件同上。反应结束后在计算机上得到标准曲线。

1.4.6 样品的检测 将所有标本在 PE7700 上进行扩增,观察、记录结果。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结 果

2.1 RNA 提取结果

提取的 RNA 分光光度计测定并计算 OD_{260} 和 OD_{280} 的光密度比值大于 1.8，随机取 2 例作琼脂糖凝胶电泳显示 28s、18s 和 5s 条带，说明 RNA 样品纯度较高，完整性较好，无降解(见图 2)。

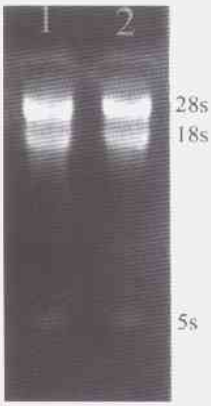


图 2 RNA 提取结果

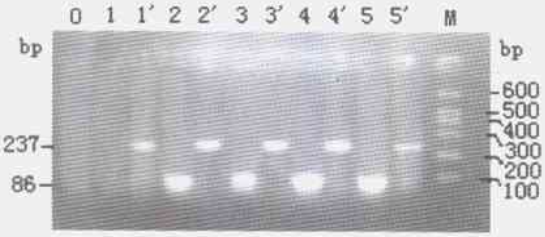


图 3 PCR 扩增 BDV P24 基因片段

0 为空白对照；1,2,3,4,5 为样本 P24 基因片段(1 为阴性；2,3,4,5 为阳性)；1′,2′,3′,4′,5′ 为样本 β-actin 内参照；M 为 DNA marker

2.2 荧光定量套式 RT-PCR 扩增结果

将神经精神疾病患者 58 份样本的 PBMC RNA，分别经荧光定量套式 RT-PCR 扩增，发现 4 例(精神分裂症 3 例，帕金森病 1 例)样本呈 BDV P24 基因片段阳性(S 型曲线)。每例标本的 β-actin 基因片段均阳性。阴性对照均显示阴性。PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图 3。

2.3 重组质粒的筛选

荧光定量套式 RT-PCR 扩增的阳性 PCR 产物与 T 载体连接所构建的重组质粒，经蓝白斑 LB 平板筛选，含氨苄青霉素 LB 培养基培养，提取质粒后用荧光定量 RT-PCR 鉴定重组质粒，可见挑选的 4 个克隆均呈阳性反应(S 型曲线)(见图 4)。说明目的基因重组质粒成功。阳性质粒重组子测序显示所含目的基因片段与马的 BDV P24 核苷酸序列(86bp)[3] 比较同源性为 96.51%，在 3 个位点出现一致性沉寂突变(nt1658T→C，nt1667A→G，nt1670C→T)，突变率为 3.49%，所编码的氨基酸无变化。

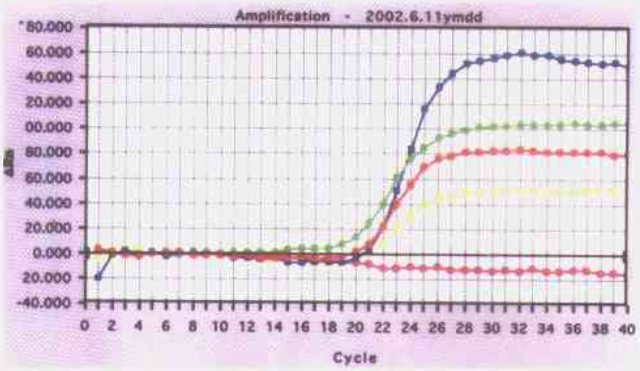


图 4 重组质粒荧光定量 PCR 鉴定结果

2.4 定量标准曲线的建立

将重组质粒定量后作为阳性模板，稀释成 10^5、10^4、10^3、10^2 拷贝/μl 浓度梯度，在 PE7700 型扩增检测仪上进行 PCR 扩增，PE7700 型扩增检测仪在 PCR 反应进行的同时，每 8s 检测 1 次 PCR 产物的量(即反应管中荧光值 Rn 的变化)，做到了实时检测。反应结束后，由电脑自动分析出定量结果，并给出 PCR 扩增的动力学曲线。图 5 是仪器测出的各反应管中荧光值 Rn 随循环数的增加而变化的曲线。可见阳性标本不论拷贝数多少均呈现典型的 S 型，此为特异 PCR 产物指数式扩增所特有的图形。可见，不同起始浓度的模板，在反应后平台期产物量相接近。图中的 Ct 值称为循环阈值，即当 Rn 值逐渐增强到以 99.7% 的可信度判断明显高于基线平均值(即荧光阈值，其确定为产物荧光信号尚未出现前本底荧光信号平均值加 3 个标准差，本组结果为 172.33)时的循环数(本组不同模板浓度即 10^5、10^4、10^3、10^2 拷贝/μl 的 Ct 值分别为 14.4，17.5，21.6，25.0)。因此，将检测定在产物大量生成初期，即刚进入指数增长期的起始点位置—Ct 值。以起始拷贝数的自然对数(1g concentration of starting templates，lgCo)为横坐标，以 Ct 值为纵坐标，拟合作图，可得到定量标准曲线(见图 6)，该曲线的斜率为 -3.559，相关系数为 0.998，说明起始模板浓度与 Ct 值之间有良好的线性关系。

2.5 样品的检测结果

所有 108 例外周血标本检测 PBMC BDV P24 基因片段，除 4 例神经精神疾病患者样本呈阳性外

维普资讯 http://www.cqvip.com

(拷贝数分别为 2.2×10^{9}, 1.6×10^{9}, 5.9×10^{5}, $6.0\times10^{5}/\mu l$),其余样本均为阴性。

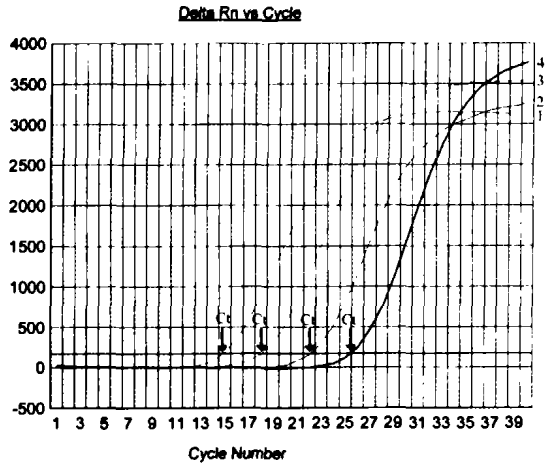


图 5 荧光定量 PCR 测定 BDV P24 的动力学曲线图

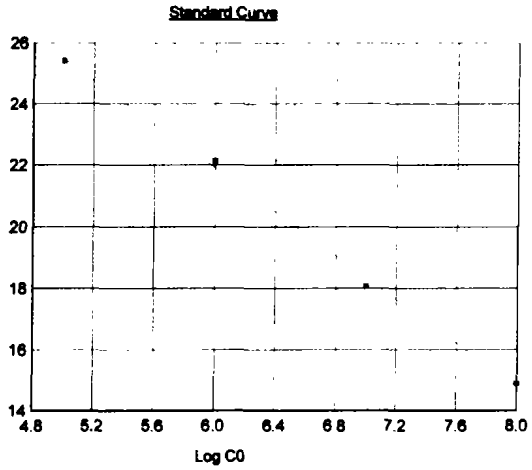


图 6 荧光定量 PCR 测定 BDV P24 标准曲线图

3 讨 论

与常规 PCR 相比,荧光定量 PCR 技术具有以下特点[2,4,5]:(1)当荧光信号达到检测点 Ct 值时,PCR 反应体系处于最佳饱和状态,最能反映起始的模板数,克服了常规 PCR 平台效应带来的误差。因此,可准确定量待检模板的拷贝数。(2)闭管检测,不需 PCR 产物后处理,有效避免了扩增产物交叉污染引起的假阳性。(3)引物和探针特异地同目的模板结合,相当于 PCR 技术与寡核苷酸探针杂交技术二者之结合,保障了检测的特异性。但并没有在 PCR 之后单独做杂交的操作,而是贯穿于整个 PCR 过程中同时完成的。(4)荧光检测的灵敏度显著高于肉眼观察电泳条带的灵敏度。(5)操作简单、方便、安全、快速,整个过程由电脑控制,不存在溴化乙锭和同位素对人体的危害性问题。

目前对于 BDV 感染与人类神经精神疾病的研究不同作者报道的结果差异较大。有作者认为检测方法的不同可能对检测结果影响极大[6],用于检测人类 BDV 感染的间接免疫荧光试验(IFA)方便、迅速、敏感,但特异性差;免疫印迹法(IB)特异性较 IFA 高但敏感性降低;特异性检测 BDV 抗体的酶联免疫吸附试验(ELISA)敏感性不高,且血清学试验阳性并不一定代表被检者正存在 BDV 感染,因为目前尚不清楚 BDV 抗体阳性是代表 BDV 感染存在或是 BDV 已被清除。免疫组化法的敏感性取决于被检组织和细胞中 BDV 蛋白的数量以及所使用的 BDV 抗体与人类 BDV 抗原的结合力,其特异性取决于 BDV 抗体与非 BDV 蛋白的交叉反应情况;原位杂交的特异性和敏感性均较高,但当 BDV RNA 浓度过低或细胞中的 BDV RNA 已降解时可出现假阴性,而探针与非 BDV 核酸发生非特异性结合可出现假阳性;病毒分离是诊断 BDV 感染的金标准,但具体用于临床检测较困难。因此,研究 BDV 与人类神经精神疾病的关系时,选择一种可靠的方法非常重要。

套式 RT-PCR 有很高的敏感性和特异性,可检出每份标本中 10~100 个 BDV 基因拷贝。但因血标本中病毒 RNA 的水平低,细胞受 BDV 感染率仅为 $1/(10^{5}\sim10^{6})$,若标本保存处理不当可出现假阴性。PCR 产物的交叉污染可造成假阳性,这可能也是检测 BDV 人类感染阳性率差异较大的原因[1]。研究显示荧光定量 PCR 与套式 PCR 有相同的敏感性[7]。由于在反应体系中加入了特异性寡核苷酸探针从而更增强了检测的特异性,避免了扩增产物后处理的可能污染所致的假阳性。本研究在无 BDV 模板的情况下,通过将套式 RT-PCR 与荧光定量 PCR 相结合对神经精神疾病患者中可能阳性标本的检测,得到了 BDV P24 基因片段的阳性 PCR 产物。阳性产物克隆和序列测定后与 Genebank 中相应序列比较,证实目的片段确系 BDV P24 基因片段。再将目的基因片段与质粒重组做成阳性模板,建立了检测 BDV RNA 的荧光定量套式 RT-PCR 方法。制作的定量曲线循环阈值与模板具有良好的线性关系,相关系数为 0.998,说明方法的灵敏度和特异性均很好。

对 RNA 用 RT-PCR 方法进行定量,尚应考虑逆转录效率。曹丽萍等[8]指出用 RNA 作定量模板,系列稀释后更易降解,导致结果不(下转第 696 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

[12] Delchier JC, Lamarque D, Levy M, et al. Helicobacter pylori and gastric lymphoma: high seroprevalence of CagA in diffuse large B - cell lymphoma but not in low - grade lymphoma of mucosa - associated lymphoid tissue type[J]. Am J Gastroenterol, 2001; 96: 2324 - 2328.

[13] Morgner A, Miehlke S, Fischbach W, et al. Complete remission of primary high - grade B - cell gastric lymphoma after cure of Helicobacter pylori infection[J]. J Clin Oncol, 2001; 19: 2041 - 2048.

[14] Zhang XQ, Lin SR. Progress in research on the relationship between Hp and stomach cancer[J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 2000; 8: 206 - 207.

[15] Hua JS. Effect of Hp: cell proliferation and apoptosis on stomach cancer[J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 1999; 9: 647 - 648.

[16] Gotto T, Nishizono A, Fujioka T, et al. Local secretory immunoglobulin A and postimmunization gastritis correlated with protection against Helicobacter pylori infection after oral vaccination of mice[J]. Infect Immun, 1999; 67(5): 2531 - 2539.

[17] Jiang Z, Huang AL, Tao XH, et al. A study of recombinant protective H. pylori antigen[J]. World J Gastroenterol, 2002; 8: 308 - 3011.

[18] Metzler B, Mayr M, Bietrich H, et al. Inhibition of arteriosclerosis by T - cell depletion in normocholesterolemic rabbits immunized with heat shock protein 65[J]. Arterioscler thromb vasc boil, 1999; 19: 1905 - 1911.

[19] Todoroki I, Joh T, Watanabe K, et al. Suppressive effects of DNA vacines encoding heat shock protein on Helicobacter pylori - induced gastritis in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000; 277: 159 - 163.

(上接第 691 页)稳定，且逆转录需大量昂贵的 RNA 酶抑制剂和逆转录酶，而用稳定的 cDNA 作模板，操作简便、省时，也易于储存、运输和标准化。本实验采用基因克隆方法构建 BDV P24 基因片段的 cDNA 定量模板，有纯度高、可大量生产及定量准确等优点。用于检测并了解 BDV 在我国的流行情况，开展对 BDV 的深入研究，无疑将具有重要的实用价值。本研究检测神经精神病人和健康人共 108 例，发现 4 例神经精神疾病患者样本呈 BDV 基因片段阳性。表明中国的神经精神疾病患者存在 BDV 感染。而 BDV 感染与神经精神疾病发病是否相关有待深入研究。

(本实验有部分在中山大学达安基因诊断中心完成，感谢程钢博士、胡斌博士、王毅博士、高劲松博士和刘晓东的协助和指导)

参 考 文 献

[1] Lipkin WI, Hornig M, Briese T. Borna disease virus and neuropsychiatric disease - a reappraisal[J]. Trends Microbiol, 2001; 9(7): 295 - 298.

[2] Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization[J]. PCR Methods Appl, 1995; 4(6): 357 - 362.

[3] Cubitt B, Oldstone C, de - la - Torre JC. Sequence and genome organization of Borna disease virus[J]. J Virol, 1994; 68(3): 1382 - 1396.

[4] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR[J]. Genome Res, 1996; 6(10): 986 - 994.

[5] Gibson UE, Held CA, Willims PM. A novel method for real time quantitative RT - PCR[J]. Genome Res, 1996; 6(10): 995 - 1001.

[6] Carbone KM. Borna disease virus and human disease[J]. Clin Microbiol Rev, 2001; 14(3): 513 - 527.

[7] Morris T, Robertson B, Gallagher M. Rapid reverse transcription - PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system[J]. J Clin Microbiol, 1996; 34(12): 2933 - 2936.

[8] 曹丽萍，王 斌，郁知非. 多耐药基因 QRT - PCR 检测中内标准 DNA 和 RNA 模板的构建[J]. 实验血液学杂志, 1997; 5(4): 393 - 398.