

毛细管电泳与微流控芯片电泳快速检测 粪便中腺病毒的方法建立*

阮佳, 任冬霞, 杨丹旎, 龙品品, 赵洪玥, 王乙棋, 李永新[△]

四川大学华西公共卫生学院 卫生检验与检疫系(成都 610041)

【摘要】 目的 建立粪便中腺病毒的 PCR-毛细管电泳-激光诱导荧光和 PCR-微流控芯片电泳-激光诱导荧光快速检测方法。方法 采用试剂盒法提取粪便中腺病毒 DNA, 选择腺病毒六邻体基因保守区域进行 PCR 扩增反应。PCR 产物分别用高灵敏度的 SYBR Gold 和 SYBR Orange 核酸荧光染料进行标记, 在优化的毛细管电泳和微流控芯片电泳条件下分离, 采用激光诱导荧光检测特异性 PCR 扩增产物。结果 腺病毒扩增产物在优化的毛细管电泳和微流控芯片电泳条件下可分别于 9 min 和 6 min 内完成检测。将 PCR 扩增产物测序, 并与 NCBI 基因库中核酸序列比对, 结果表明所选用的扩增序列特异性良好。商品化 DNA Marker 毛细管电泳和微流控芯片电泳对目标 DNA 片段 bp 值求得的日内精密度分别为 1.14%~1.34% 和 1.18%~1.48%, 日间精密度分别为 1.27%~2.76% 和 2.85%~4.06%。毛细管电泳-激光诱导荧光法和微流控芯片电泳-激光诱导荧光法检测腺病毒的灵敏度分别为 2.33×10^2 copies/mL 和 2.33×10^3 copies/mL。两种方法用于实际粪便样品测定, 准确度高。结论 本研究建立的 PCR-毛细管电泳-激光诱导荧光和 PCR-微流控芯片电泳-激光诱导荧光检测方法能够快速、灵敏、准确地检测出粪便中的腺病毒。

【关键词】 腺病毒 聚合酶链反应 毛细管电泳 微流控芯片电泳 激光诱导荧光检测

Rapid Detection of Adenovirus in Fecal Samples by Capillary Electrophoresis-laser Induced Fluorescence and Microchip Capillary Electrophoresis-laser Induced Fluorescence RUAN Jia, REN Dong-xia, YANG Dan-ni, LONG Pin-pin, ZHAO Hong-yue, WANG Yi-qi, LI Yong-xin[△]. Department of Laboratory Technology and Science of Public Health, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: lyxlee2008@hotmail.com

【Abstract】 Objective To establish a rapid and sensitive method based on polymerase chain reaction (PCR) combined with capillary electrophoresis-laser induced fluorescence (CE-LIF) and microchip capillary electrophoresis-laser induced fluorescence (MCE-LIF) for detecting adenoviruses in fecal samples. **Methods** The DNA of adenovirus in fecal samples were extracted by the commercial kits and the conserved region of hexon gene was selected as the target gene and amplified by PCR reaction. After labeling highly sensitive nucleic acid fluorescent dye SYBR Gold and SYBR Orange respectively, PCR amplification products were separated by CE and MCE under the optimized condition and detected by LIF detector. **Results** PCR amplification products could be detected within 9 min by CE-LIF and 6 min by MCE-LIF under the optimized separation condition. The sequenced PCR product showed good specificity in comparison with the prototype sequences from NCBI. The intraday and inter-day relative standard deviation (RSD) of the size (bp) of the target DNA was in the range of 1.14%-1.34% and 1.27%-2.76%, respectively, for CE-LIF, and 1.18%-1.48% and 2.85%-4.06%, respectively, for MCE-LIF. The detection limits was 2.33×10^2 copies/mL for CE-LIF and 2.33×10^3 copies/mL for MCE-LIF. The two proposed methods were applied to detect fecal samples, both showing high accuracy. **Conclusion** The two proposed methods of PCR-CE-LIF and PCR-MCE-LIF can detect adenovirus in fecal samples rapidly, sensitively and specifically.

【Key words】 Adenovirus Polymerase chain reaction Capillary electrophoresis Microchip capillary electrophoresis Laser induced fluorescence

腺病毒(adenovirus, AdV)由 Rowe 等于 1953 年从健康人腺样组织的细胞培养中首次发现。腺病毒属腺病毒科、哺乳动物腺病毒属,是一种无包膜的

双链 DNA 病毒。腺病毒对酸碱度及温度的耐受范围较宽,且对脂溶剂和酶类均有一定抵抗作用。该病毒能通过人与人接触传播,也可经粪-口途径及呼吸道传播,能够引起呼吸道、尿道和眼等部位感染,也是引起婴幼儿病毒性腹泻的重要病原体^[1-3]。建立粪便中腺病毒的特异、快速、准确的检测方法,对

* 国家自然科学基金(青年基金)项目(No. 81102162)资助

[△] 通讯作者, E-mail: lyxlee2008@hotmail.com

疾病诊断、控制疫情和追溯传染源等具有重要的卫生学意义。

目前腺病毒常用的检测方法包括组织培养、免疫学检测和生物学检测。组织培养法检测周期长,不适合临床和公共卫生事件大规模、快速、准确检测的需求^[4]。免疫学检测法主要受限于各型腺病毒特异抗体的鉴别和制备,且商业化试剂盒质量参差不齐,导致不同厂家试剂的检测结果有所不同。实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)法准确、高效,并且能对样品中腺病毒进行定量检测,但该方法所需的实时荧光定量 PCR 仪和荧光探针价格昂贵,用于日常检测成本太高^[5]。

本研究首次将特异、高效、灵敏的 PCR 与高效毛细管电泳和微流控芯片电泳法结合,检测腺病毒特异性 PCR 产物,不仅成本低,样品和试剂用量少,而且更加快速,灵敏度也与实时荧光定量 PCR 相当。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

MyCyclerPCR 扩增仪(BIO-RAD); TGL-16B 离心机[Biofuge Primo 1.0R(Heraeus),上海安亭科学仪器厂]。

毛细管电泳-激光诱导荧光检测装置为本实验室自行组装^[6],主要包括:473 nm 固体激光器光源(北京榜首科技有限公司);高压电源(5~30 kV,北京彩陆科学仪器公司)。石英毛细管柱(河北永年光导纤维厂),总长度为 50 cm,有效长度为 42 cm,内径为 75 μm 。毛细管柱内表面的聚丙烯酰胺涂层由本实验室完成,毛细管内壁首先经过酸洗和碱洗,再向管内注入充分溶解的 0.4%酸性 γ -甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷(γ -MTMS)溶液,放置 24 h,最后向毛细管内注入 25 g/L 聚丙烯酰胺溶液,放置 24 h^[7]。

微流控芯片电泳-激光诱导荧光检测装置主要包括:532 nm 固体激光器光源(北京榜首科技有限公司)和 GY63 型高压电源(东北大学理学院分析科学研究中心)。聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)微流控芯片(中国科学院大连化物所微流控芯片实验室):分离通道总长为 50 mm,有效长度为 45 mm,两通道交叉处的体积为 177 pL。

核酸荧光染料 SYBR Gold 和 SYBR Orange (Life Technologies Corporation); 甲基纤维素(MC)和羟丙基甲基纤维素(HPMC-50)(美国

Sigma 公司);用 4.5 mmol/L TBE 缓冲液分别制备 1%MC 和 2.5%HPMC-50 储备液(W/V),临用时稀释至实验所需浓度;实验中所用 DNA 分子量标准品为 DL500 DNA Marker(TaKaRa,大连),包含 50、100、150、200、300、400 和 500 bp 7 个 DNA 片段;Gene Ruler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas,晶美生物工程有限公司),包含 25、50、75、100、150、200、300、400、500 和 700 bp 10 个 DNA 片段。病毒核酸提取试剂盒购于台湾旭基公司的 Geneaid Viral Nucleic Acid Extraction Kit II; dNTPs、 MgCl_2 和 *Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa,大连)。腺病毒的引物 Hexon-F/R 由上海生工技术有限公司合成(Hexon-F 的序列为 5'-gccggagtggtcttacatgcacatc-3'; Hexon-R 的序列为 5'-cagcagcccgcgatgtcaaagt-3',扩增目标片段长度为 300 bp)。所用试剂除标注外,均为分析纯,实验用水为超纯水。

1.2 病毒来源

腺病毒来自四川省成都市某妇幼保健院检验科所确定的阳性腺病毒粪便标本。

1.3 实验方法

1.3.1 病毒核酸提取及 PCR 扩增 参照核酸提取试剂盒说明书提取粪便中病毒核酸,共收获腺病毒 DNA 液 20 μL 。

腺病毒 PCR 反应体系为 50 μL :6 μL 10 $\times$ PCR buffer(Mg^{2+} Free),3 μL 25 mmol/L MgCl_2 ,6 μL dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L),引物 Hexon-F/R 各为 0.5 $\mu\text{mol/L}$,DNA 模板为 3.0 μL ,*Taq* DNA 聚合酶 2.5 U;热循环反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 PCR 扩增产物的毛细管电泳和微流控芯片电泳-激光诱导荧光检测 PCR 扩增产物中分别加入终浓度为稀释 20 000 倍的 SYBR Gold 核酸染料或终浓度为稀释 10 000 倍的 SYBR Orange 核酸染料,室温下孵育 5 min,分别进行毛细管电泳-激光诱导荧光检测或微流控芯片-激光诱导荧光检测。

毛细管电泳-激光诱导荧光检测腺病毒 PCR 扩增产物,电泳条件为:电泳筛分介质 MC 浓度为 0.5%,分离电压为 15 kV,缓冲液 TBE 浓度为 30 mmol/L^[8]。在 473 nm 激发光激发下,检测 DNA-SYBR Gold 结合物产生的荧光。

微芯片通道先分别用超纯水和 45 mmol/L TBE 缓冲液冲洗,再以负压向通道中充入 2.0%

HPMC-50,分别向缓冲液池、样品废液池和缓冲废液池中加入 45 mmol/L TBE 缓冲液,样品池中加入 SYBR Orange 标记的 DNA 样品液或 PCR 产物,尽量使各池液面保持一致。将芯片置于已调好光路的检测系统中,在 20 ℃、100 V/cm 电压下电泳分离,在 532 nm 激发光激发下,检测 DNA-SYBR Orange 结合物产生的荧光。电泳完毕后,用蒸馏水冲洗通道。

DNA Marker 和病毒 PCR 产物在相同条件下进行毛细管电泳或微流控芯片分离检测,根据 DNA Marker 和 PCR 扩增产物的迁移时间确定待检样品中是否有腺病毒检出。

1.3.3 灵敏度实验 为考察毛细管电泳-激光诱导荧光和微流控芯片电泳-激光诱导荧光检测法对腺病毒的检出限,本研究将腺病毒 PCR 扩增特异性片段回收、纯化,与质粒 pUC57(上海生工)连接,导入感受态大肠杆菌(上海生工),经过筛选、鉴定和测序(上海生工),用 TIANpure Midi Plasmid Kit[天根生化科技(北京)有限公司]试剂盒收获阳性克隆质粒。所提取的质粒用 Life Technologies Invitrogen Qubit 2.0 Fluorometer 测定浓度,而后倍比稀释为 10 个梯度,以各个稀释度的质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物分别进行毛细管电泳-激光诱导荧光和微流控芯片电泳-激光诱导荧光检测。

1.3.4 精密度实验 在优化的毛细管和微流控芯片电泳条件下,同一日内分别连续 5 次进样测定 DL500 DNA Marker 和 Low Range DNA Ladder,计算各 DNA 片段日内相对标准偏差(RSD);在最优的电泳条件下,连续 5 d 测定 DL500 DNA Marker 和 Low Range DNA Ladder,计算日间

RSD。

2 结果与讨论

2.1 响应曲面法优化毛细管电泳条件

毛细管电泳分离 DNA 的影响因素较多,响应曲面法能同时考虑多个因素的交互作用,简便、直观且快速。本研究以 DL500 DNA Marker 为 DNA 相对质量标准,采用响应曲面法对毛细管电泳分离的主要影响因素进行优化。选择筛分介质 MC 的浓度、电泳电压和电泳缓冲液 TBE 的浓度为优化对象,在单因素实验的基础上,用 Design-Expert 8.06 软件按中心复合设计法确定实验方案,将 17 次实验的结果拟合成 MCEF 函数并通过 Design-Expert 8.06 软件进行分析和优化,得到具有统计学意义的实验模型,并确定优化条件为:电泳筛分介质 MC 浓度为 0.5%,分离电压为 15 kV,缓冲液 TBE 浓度为 30 mmol/L^[8]。

在优化的毛细管电泳条件下,DL500 DNA Marker 和腺病毒 Hexon-F/R 的 PCR 扩增产物电泳图谱见图 1。

2.2 微流控芯片电泳条件优化

为获得最佳 DNA 分离条件,本研究用高分子聚合物 HPMC-50 溶液作筛分介质,以 Low Range DNA Ladder 为标准,对影响微流控芯片电泳分离的主要因素(筛分介质浓度和电泳电压)进行条件优化实验。研究表明,DNA 片段分离度随着 HPMC-50 浓度增加而增大,随着电场强度增加而减小,但分析时间随着 HPMC-50 浓度增加而延长,随着电场强度增加而缩短。实验中,综合考虑分离度和分离时间,最终选择 2.0% HPMC-50 作为筛分介质,

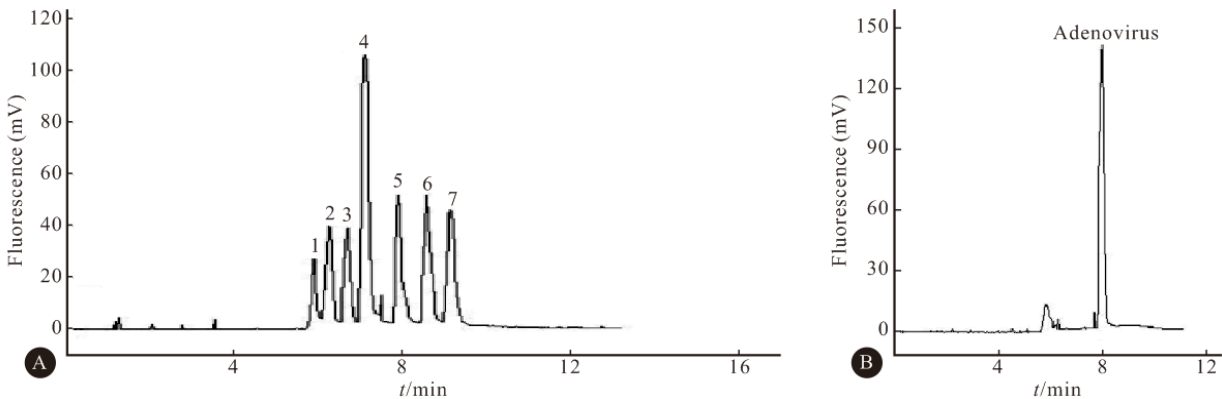


图 1 DL500 DNA Marker(A)和腺病毒 PCR 产物(B)的毛细管电泳图谱

Fig 1 Electrophoregram of DL500 DNA Marker (A) and adenoviruses PCR amplified products (B) by capillary electrophoresis

1: 50 bp; 2: 100 bp; 3: 150 bp; 4: 200 bp; 5: 300 bp; 6: 400 bp; 7: 500 bp

100 V/cm 作为电泳分离场强。

在优化的微流控芯片电泳条件下,Low Range DNA Ladder 和腺病毒 Hexon-F/R 的 PCR 扩增产物的电泳图谱见图 2。

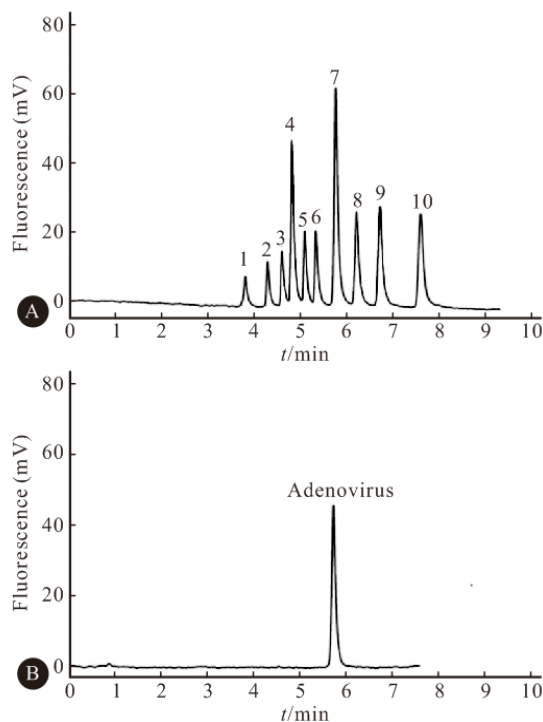


图 2 Low Range DNA Ladder (A)和腺病毒 PCR 产物(B)的电泳图
Fig 2 Electrophoregram of Low Range DNA Ladder (A) and adenoviruses PCR amplified products (B) by microchip capillary electrophoresis

1: 25 bp; 2: 50 bp; 3: 75 bp; 4: 100 bp; 5: 150 bp; 6: 200 bp; 7: 300 bp; 8: 400 bp; 9: 500 bp; 10: 700 bp

2.3 目的 DNA 片段的确定

毛细管电泳与微流控芯片电泳是基于迁移时间随 DNA 相对分子质量增加而延长的分离模式。DNA 片段碱基对的 $\ln$ 值与迁移时间($t_{\min}$)的倒数呈线性关系,根据 DNA 片段的迁移时间可以推算出其长度。对于毛细管电泳,50~500 bp 范围内,DNA 片段迁移时间($t_{\min}$)的倒数与 DNA 片段长度(bp) $\ln$ 值的线性方程为 $y = -0.0316x + 0.3070$, $R^2 = 0.9968$;对于微流控芯片电泳,25~700 bp 范围内,DNA 片段迁移时间($t_{\min}$)的倒数与 DNA 片段长度(bp)的 $\ln$ 值的线性方程为 $y = -0.0357x + 0.3808$, $r^2 = 0.9952$,其中 x 是 DNA 片段长度的 $\ln$ 值, y 是 $t_{\min}$ 的倒数。根据这两个方程求得腺病毒扩增产物的长度分别为 298 bp 和 301 bp,与片段真实大小只相差 1~2 bp^[9]。因此,本研究所建立的毛细管电泳和微流控芯片电泳体系能够比较精确地确定 DNA 片段的碱基对数,能够准确对 PCR 扩增

片段进行定性分析。

2.4 PCR 扩增结果序列分析

六邻体基因存在于不同型和亚型的腺病毒中,具有高度保守性。本研究以其为目的基因,参照文献选择 PCR 扩增引物序列^[10]。将 PCR 产物测序,测序结果与 NCBI 病毒核酸序列进行比对。结果表明,扩增出的片段与基因库中腺病毒 AF161576.1、EU600378.1、KJ425154.1、HQ268789.1、AM406715.1 和 EU600379.1 等序列的一致性分别为 99%、99%、100%、100%、100% 和 100%。说明本研究选用的引物特异性好,扩增结果可靠。

2.5 灵敏度实验结果

经测定,所提质粒的浓度为 7.7 ng/mL。根据公式:每毫升拷贝数=质量浓度×阿佛加德罗常数/(1 个碱基对的平均分子质量×总长度)(其中,质量浓度、碱基对的平均分子质量、总长度的单位分别是 g/mL、D/碱基数、碱基数),换算成以拷贝数表示的腺病毒质粒浓度为 2.33×10^9 copies/mL。进行倍比稀释,以各个稀释度的质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物分别用毛细管电泳和微流控芯片电泳-激光诱导荧光检测。结果表明,毛细管电泳-激光诱导荧光检测的灵敏度为 2.33×10^2 copies/mL,微流控芯片电泳-激光诱导荧光检测的灵敏度为 2.33×10^3 copies/mL。

2.6 精密度实验结果

在优化的毛细管和微流控芯片电泳条件下,根据各 DNA 片段迁移时间计算的 bp 值,求得目标 DNA 片段 bp 值的日内 RSD 分别为 1.14%~1.34% 和 1.18%~1.48%,日间 RSD 分别为 1.27%~2.76% 和 2.85%~4.06%。在同一毛细管电泳条件下,各 DNA 片段迁移的重复性好。具有良好精密度的毛细管或微流控芯片电泳技术与高特异性的 PCR 扩增反应结合,能够准确地检测出 PCR 扩增出的目的 DNA 片段,对目标微生物进行准确测定。

2.7 样品测定

采用试剂盒法提取粪便中的腺病毒 DNA,PCR 扩增特异目的基因片段,产物用高灵敏度核酸染料标记后,分别用毛细管电泳-激光诱导荧光和微流控芯片电泳-激光诱导荧光法检测。结果表明,毛细管电泳-激光诱导荧光检测法灵敏度高,能够有效避免假阴性,但所需时间更长;而微流控芯片电泳-激光诱导荧光检测法,在几分钟之内即可得到结果,但其灵敏度较毛细管电泳低。这是由于 (下转第 627 页)

近医疗机构大于 15 min 的农村居民就诊次数的 1.13 倍。由于卫生服务物理可及性是影响卫生服务利用的重要因素,距离卫生服务机构近的居民就诊较方便,因此,到最近医疗机构时间小于 15 min 的农村居民就诊次数相对较多。未婚农村居民两周就诊次数是已婚农村居民的 3.01 倍,这可能是因为已婚的农村居民大多家庭负担更重,因忙于生活,一旦生病为不耽误工作和照顾家庭,他们会尽量少就诊甚至不就诊;小学/初中文化程度、高中/中专文化程度农村居民两周就诊次数分别是未上过学的农村居民的 1.49 倍和 1.58 倍,这可能与农村居民健康保健知识和就诊意识有关,文化程度相对高的农村居民理解能力相对较好,在平时生活中获取的健康保健知识较丰富,一旦患病会主动寻求就医,并会在疾病未治愈期间多次就诊。

参 考 文 献

1 王济川,谢海义,姜宝法等. 多层统计分析模型:方法与应用. 第 1 版. 北京:高等教育出版社,2010:168.

2 Muhlenkamp AF, Broerman NA. Health beliefs, health value, and positive health behaviors. *West J Nurs Res*,1988;10(5): 637-646.

(上接第 618 页)

微流控芯片进样量极少,只有皮升级,若能解决进样量问题,使灵敏度进一步提高,其应用前景将更为广阔。

综上,本研究建立了粪便中腺病毒的 PCR 结合毛细管电泳-激光诱导荧光和微流控芯片电泳-激光诱导荧光快速检测方法。粪便中腺病毒 DNA 用试剂盒法提取,选择六邻体基因区域特异性片段进行 PCR 扩增,产物经高灵敏度核酸荧光染料标记后,分别在优化的毛细管电泳-激光诱导荧光和微流控芯片电泳-激光诱导荧光条件下分离、检测。粪便样品测定结果表明,两种方法均能准确、快速、灵敏地检测出粪便中的腺病毒。毛细管电泳灵敏度更高,可以有效避免假阴性;微流控芯片电泳速度更快,仪器更小,更容易发展成为便携式快速检测仪器,可用于突发公共卫生事件现场调查。

参 考 文 献

1 张志华,王华洪,兰 喆. 巢式 PCR 在腺病毒 F 亚属引起的致腹泻肠道感染检测中的应用. *实用预防医学*,2009;16(6): 1936-1939.

3 原 静. Hurdle 计数模型及其医学应用. 太原:山西医科大学,2010.

4 曾 平,赵晋芳,刘桂芬. 居民就诊次数的 Hurdle 模型分析. *中国卫生统计*,2010;27(6):603-605.

5 田娇妮,刘桂芬,张军锋等. 多水平零膨胀计数模型在骨关节疼痛影响因素中的应用研究. *中国卫生统计*,2012;29(1):44-46.

6 Wang K,Yau K,Lee A. A zero-inflated Poisson mixed model to analyze diagnosis related groups with majority of same-day hospital stays. *Computer Methods Programs Biomed*,2002;68(3):195-203.

7 Hall DB. Zero-inflated Poisson and binomial regression with random effects; a case study. *Biometrics*,2000;56(4):1030-1039.

8 Ridout M, Demétrio C, Hinde J. Models for count data with many zeros. In: *Invited Paper Presented at the Nineteenth International Biometric Conference*. Cape Town, South Africa, 1998:179-192.

9 Rose CE,Martin SW,Wannemuehler KA,*et al*. On the use of zero-inflated and hurdle models for modeling vaccine adverse event count data. *J Biopharm Stat*,2006;16(4):463-481.

10 田娇妮. 多水平计数模型在复杂抽样调查中的应用研究. 太原:山西医科大学,2011.

(2014-11-21 收稿,2015-03-28 修回)

编辑 汤 洁

2 金 玉,叶新华,方肇寅. 婴幼儿肠道腺病毒研究进展. *中华流行病学杂志*,2007;28(5):510-513.

3 Jatinder PSS,Warish A,Simon T. Sensitive detection of human adenovirus from small volume of primary wastewater samples by quantitative PCR. *J Virol Methods*,2013;187(2):395-400.

4 尚定昆,申宝玲,郑晓群等. 细胞培养结合实时荧光 RT-PCR 法快速检测 7 型腺病毒感染. *中华医院感染学杂志*,2008;18(4):594-598.

5 潘庆军,朱学芝. 腺病毒及其检测技术研究进展. *检验医学与临床*,2013;10(24):3362-3365.

6 黎源倩,杨经国,周 颖. 毛细管电泳-激光诱导荧光光谱分析装置研究. *四川大学学报(医学版)*,2004;35(1):103-106.

7 Li YQ,Jennifer W,David S, *et al*. Capillary electrophoresis as a method to study DNA reassociation. *Biotechnol Prog*,2001;17(2):348-354.

8 阮 佳,许 欣,孙成均等. 响应曲面优化-毛细管电泳-激光诱导荧光快速检测粪便中诺如病毒. *分析试验室*,2013;32(9):6-11.

9 李永新,黎源倩,何 玲等. 食品中沙门菌和单增李斯特菌的多重 PCR-芯片电泳快速检测. *分析试验室*,2012;31(9):1-4.

10 黄燕燕,郑晓群,彭 颖等. 浙江温州地区腹泻患儿腺病毒的检测及分型. *中国卫生检验杂志*,2009;19(1):24-25.

(2014-10-23 收稿,2015-01-13 修回)

编辑 余 琳