

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.21.008

随机扩增多态性技术联合荧光定量高敏检测三种疱疹病毒方法的建立*

刘 雪¹ 邢益平^{1Δ} 严玉娟² 韩亚萍¹ 严友德¹ 张 帆³

(1 南京医科大学第一附属医院感染科 江苏 南京 210029; 2 苏州市第五人民医院感染科 江苏 苏州 215000;

3 南京市脑科医院检验科 江苏 南京 210029)

摘要 目的:建立一种随机扩增多态性技术(RAPD)联合荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)高敏定量检测单纯疱疹病毒(HSV)、人类巨细胞病毒(HCMV)、水痘带状疱疹病毒(VZV)的新方法。**方法:**根据文献筛选出数十条随机引物,分别对三种疱疹病毒进行随机扩增,产物经2%琼脂糖凝胶电泳,选取稳定清晰条带进行分离、纯化及克隆测序,应用blast-nr比对genebank现有病毒序列,选取高于99%匹配度的基因序列作为目的片段,并在其内部用primer3.0设计特异性引物。经过引物筛选及条件优化后建立RAPD联合qPCR检测新方法,分别检测三种疱疹病毒。**结果:**经过筛选,确定了HSV、HCMV、VZV扩增灵敏性及特异性最好一组引物,建立的RAPD-qPCR可分别检测出1:10⁶ HSV、1:10⁵ HCMV和1:10⁵ VZVDNA,而单一qPCR仅能检测1:10³ HSV、1:10² HCMV和1:10³ VZVDNA。RAPD-qPCR相比于单一qPCR灵敏性提高100-1000倍,RAPD-qPCR扩增大于1:10⁵病毒DNA得到的CT值均小于22.96±0.81,与10² copies/μL的标准线相距远,易于区分阴性和阳性。此外,用乙型肝炎病毒及疱疹病毒互为对照未见非特异扩增,特异性好。**结论:**随机扩增多态性技术联合荧光定量是一种检测三种病毒高度灵敏及特异的检测方法。

关键词:单纯疱疹病毒;人类巨细胞病毒;水痘带状疱疹病毒;随机扩增多态性技术;SYBR Green 1 荧光定量

中图分类号:R446.6;R373.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)21-4032-06

Random Amplified Polymorphic DNA Combined with Real-time PCR for Detecting Herpes Virus*

LIU Xue¹, XING Yi-ping^{1Δ}, YAN Yu-juan², HAN Ya-ping¹, YAN You-de¹, ZHANG Fan³

(1 Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing, Jiangsu, 210029, China;

2 Department of Infectious Diseases, the Fifth People, Hospital of Suzhou, Suzhou, Jiangsu, 215000, China;

3 Clinical laboratory, Nanjing Brain Hospital, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To develop a more sensitive method for quantitative detection of herpes simplex virus, human cytomegalovirus, varicella-zoster virus by random amplified polymorphic DNA combined with fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RAPD-qPCR). **Methods:** According to the literature, dozens of random primers for RAPD were selected and randomly amplified three herpes viruses. The stable and clear bands were selected to isolate, purify and sequence from 2% agarose gel electrophoretic plate. Then more than 99% matched gene sequences were chosen as the target fragment compared with the genebank existing virus sequences using blast-nr and the internal, specific primers were designed with primer 3.0. Finally, the new method of RAPD combined with qPCR after primer selection and reaction condition optimization was established and used to detect three herpes viruses. **Results:** After screening, a set of the best random primer and specific primer for each virus was chosen, and the RAPD-qPCR could detect 1: 10⁶ HSV, 1: 10⁵ HCMV and 1: 10⁵ VZVDNA respectively, while the single qPCR could detect only 1: 10³ HSV, 1: 10² HCMV and 1: 10³ VZVDNA. The sensitivity of RAPD-qPCR is higher 100-1000 times than qPCR. CT value was less than 22.96±0.81 when detecting more than 1:10⁵ diluted virus DNA by RAPD-qPCR, so that the results was easy to distinguish. **Conclusions:** RAPD-qPCR was a more sensitive and specific method to detect three herpesviruses than single qPCR.

Key words: Herpes simplex virus; Human cytomegalovirus; Varicella zoster virus; Random amplified polymorphic DNA; SYBR Green 1 fluorescence quantification

Chinese Library Classification(CLC): R446.6; R373.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)21-4032-06

前言

病毒是中枢神经系统感染的主要病原体之一^[1-3],流行病学资料显示全世界病毒性神经系统感染的每年发病率为

* 基金项目:江苏省卫生厅面上项目(H201403)

作者简介:刘雪(1990-),女,硕士研究生,主要研究方法:神经系统感染性疾病,电话:15950558797, E-mail: 1245916134@qq.com

Δ 通讯作者:邢益平,教授, E-mail: xingyiping2010@vip.com

(收稿日期:2017-03-09 接受日期:2017-03-29)

3.5-7.4/10 万人^[4],其临床表现主要为脑膜炎、脑炎、脊髓炎等,病原学诊断不及时可能导致死亡及后遗症的发生。Jorgensen-LK 研究报道疱疹病毒性脑炎从入院 30 天至 1 年内累积死亡率可达 8.3%-18.6%^[9]。疱疹病毒及肠道病毒是成人无菌性脑膜炎及脑炎的主要病因^[6-8],许多学者认为脑脊液或脑组织中检测特定核酸可以取代病毒分离培养成为病毒性神经系统感染的诊断标准^[9-11]。本研究采用随机引物在较低的退火温度下与目的基因多位点结合来对微量核酸进行放大,再联合荧光定量 PCR 技术进一步提高检查方法的灵敏性,运用该方法检测单纯疱疹病毒(HSV)、人类巨细胞病毒(HCMV)和水痘带状疱疹病毒(VZV),获得了较好的灵敏性及特异性。

1 材料与方法

1.1 病毒

已鉴定的单纯疱疹病毒(HSV)、人类巨细胞病毒(HCMV)AD169 株阳性标本由山东省医学科学院基础医学研究所提供,水痘带状疱疹病毒(VZV)OKA 株购自长春百克生物科技股份有限公司,乙型肝炎病毒(HBV)标本来自江苏省人民医院感染科。

1.2 试剂

DNA 抽提试剂盒(德国 QIAGEN 公司);PCR 产物纯化试剂盒(美国 axygen 公司);2× Taq PCR Master Mix(北京天根生化科技有限公司);gelRed 核酸染料(美国 Biotium 公司);100bp DNA Ladder(南京诺唯赞生物科技有限公司);琼脂糖粉(上海励瑞生物科技有限公司);SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(大连 TaKaRa 有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 抽提和定量 采用 DNA 抽提试剂盒(QIAamp DNA Mini and Blood Mini)根据说明书进行病毒 DNA 的提取,使用 ND-1000 分光光度计测病毒浓度后置于 -20℃ 备用。(HSV 浓度为 3.7 ng/μL;HCMV 浓度为 5.4 ng/μL;VZV 浓度为 7.4 ng/μL;HBV 浓度为 4.1 ng/μL)

1.3.2 RAPD 及随机引物筛选 根据文献对三种疱疹病毒分别设计 10、17、16 条随交由上海海捷瑞生物科技有限公司合成。分别对三种疱疹病毒进行随机多态性扩增。RAPD 反应总体积 25 μL:10 μM 随机引物 2 μL,HSV/VZV/HCMV DNA 5 μL,2× Taq PCR Master Mix 12.5 μL,去离子水 5.5 μL。反应条件为:94℃ 3 min,45 个循环 94℃ 1 min、36℃ 1 min、72℃ 1 min,72℃ 终末延伸 7 min。扩增产物用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,在凝胶图像分析系统上分析扩增条带。选取条带清晰且稳定的条带割胶纯化并送上海生工生物工程有限公司进行 TA 克隆测序,应用 blast-nr 比对 Genebank 现有病毒序列,选取所有高于 99% 匹配度的基因序列。

1.3.3 特异性内引物的筛选 利用 Primer3 设计相应的特异性内引物,将 10 倍倍比稀释的三种病毒 DNA 使用筛选出的随机引物进行 RAPD,产物稀释 10 倍后取 5 μL 作为模板用特异性内引物进行扩增,从而各自选出一对扩增灵敏性最高的特异性内引物。PCR 反应体系为:上、下游引物(10 μM)各 1 μL,模板 5 μL,2× TaqPCR Master Mix 12.5 μL,用 ddH₂O 补至 25 μL。反应条件:94℃ 3 min,35 个循环 94℃ 30 s、62℃ 30 s、72℃ 1 min,终末延伸 7 min。

1.3.4 质粒标准品的制备及绘制标准曲线 在选取的各特异性内引物扩出的 DNA 序列外部合成含有该产物的质粒标准品,交由上海生工生物科技有限公司合成。使用分光光度计检测质粒浓度。根据公式:质粒拷贝数(copies/ml)=(6.02× 10²³)× 质粒浓度(g/mL)/(碱基数× 660),计算得质粒标准品拷贝数,用 ddH₂O 进行 10 倍倍比稀释成 7 个浓度梯度,直到 10¹ copies/μL,并保存在 -20℃ 待用。将浓度梯度稀释的质粒标准品进行 SYBR Green I real time PCR,每个实验重复 3 次,并绘制标准曲线。

1.3.5 RAPD-Qpcr 将抽提的 HSV、HCMV、VZV DNA 进行 10 倍梯度稀释成一系列浓度,分别采用各自选取的随机引物进行 RAPD 扩增,扩增体系及条件如 2 所述,将扩增产物 100 倍稀释后取 2 μL 作为模板进行 qPCR 检测,反应总体积 10 μL:SYBR® Premix Ex Taq™ II 5 μL,特异性内引物各 0.2 μL,ROX 0.2 μL,模板 2 μL,加 ddH₂O 补至 10 μL。反应条件:预变性 95℃ 30 s,每个循环变性 95℃ 5 s,退火 & 延伸 62℃ 30 s,在 62℃ 延伸阶段收集荧光信号,共 40 个循环。每个实验重复 3 次。

1.3.6 qPCR 直接将各病毒抽提 DNA 10 倍倍比稀释后进行 qPCR,分析 RAPD-qPC 及 qPCR 扩增曲线,对两者的检测灵敏性进行比较。

1.3.7 特异性实验 对于 HSV 病毒,我们采用 HCMV、VZV、HBV 作为对照;HCMV 采用 HSV、VZV、HBV 对照;VZV 使用 HSV、HCMV、HBV 进行对照来分析此实验方法的特异性。

2 结果

2.1 随机引物及特异性引物筛选

根据扩增图谱选取稳定、清晰片段进行 TA 克隆测序后,发现 5 条与 HSV 高度同源的基因片段,大小分别为 878 bp、899 bp、793 bp、672 bp、307 bp(如红色箭头所示);6 条与 HCMV 高同源性基因片段,大小分别为 728 bp、531 bp、401 bp、869 bp、489 bp、765 bp;6 条与 VZV 同源性高的基因片段,大小分别为 366 bp、500 bp、616 bp、332 bp、636 bp、767 bp(图 1-3)。RAPD 产物再用特异性内引物进行扩增后结果显示随机引物 US11、H1、ORF42 联合各自特异性内引物对 HSV、HCMV 和 VZV 扩增灵敏性及特异性最好。所对应的特异性引物序列及其分别扩增产物片段大小和特征(见表 1)。

2.2 质粒合成及线性标准曲线的绘制

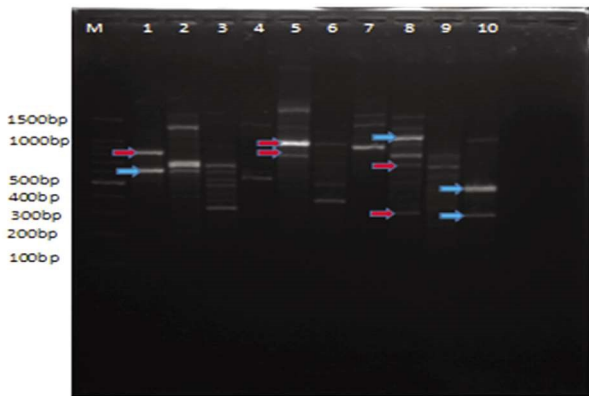
合成 HSV、HCMV 和 VZV 质粒后,使用分光光度计检测质粒浓度分别为 83 ng/μL、112 ng/μL 和 306 ng/μL,计算得质粒标准品拷贝数约为 2.7× 10¹⁰ copies/μL、3.5× 10¹⁰ copies/μL 和 9× 10¹⁰ copies/μL。将标准品稀释至(10¹-10⁷ copies/μL)作为模板,采用已优化的条件进行 SYBR Green I real time PCR 检测,并绘制标准曲线,实验结果显示可以获得较为理想的标准曲线(图 4-图 6),溶解曲线 TM 值非常均一,Ct 值与拷贝数的对数值间线性关系良好(R² 均大于 0.97),扩增效率理想。

2.3 qPCR 和 RAPD-qPCR 检测三种病毒的灵敏性比较

将三种病毒倍比稀释样品,分别进行 qPCR 和 RAPD-qPCR,得到相应扩增曲线(图 7),比较两者对于不同稀释度 DNA 的扩增结果(表 2),结果显示可分别检测出 1:10⁶

HSV、 $1:10^5$ HCMV 和 $1:10^5$ VZVDNA, 而单一 qPCR 仅能检测 $1:10^3$ HSV、 $1:10^2$ HCMV 和 $1:10^3$ VZVDNA。RAPD-qPCR 相比

于传统 qPCR 灵敏性提高 100-1000 倍。

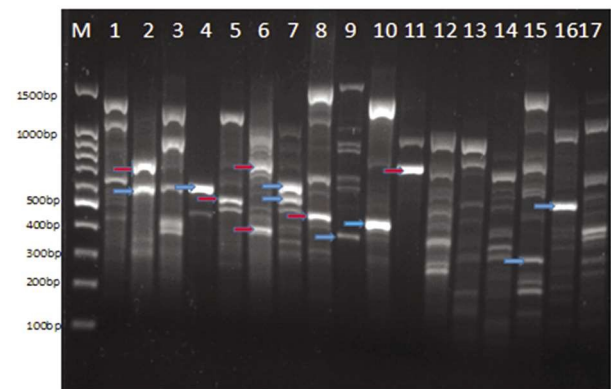


图(1) HSV10 种随机引物 RAPD 扩增图谱

Fig.1 RAPD profiles of HSV using 10 random primers

注:泳道 M 为 100bp DNA ladder; 1.引物 Gpd1; 2.引物 Gpd2; 3. 引物 Apoly1; 4. 引物 Apoly2; 5.引物 Us11; 6.引物 Us12; 7.引物 H1; 8. 引物 H2; 9. 引物 H3; 10.引物 H4。箭头表示割胶测序的条带,红色箭头则是测序与 HSV DNA 匹配度好的条带。

Note: M:100bp DNA Ladder; 1.primer Gpd1; 2.primer Gpd2; 3.primer Apoly1; 4.primer Apoly2; 5.primer Us11; 6.primer Us12; 7.primer H1; 8.primer H2; 9.primer H3; 10.primer H4. The bands which arrow indicate is tapping purified and sequenced, the bands which red arrow indicate match with HSV.

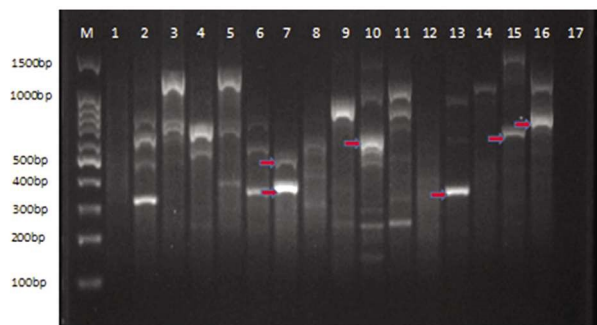


图(2) HCMV 17 种随机引物 RAPD 扩增图谱

Fig.2 RAPD profiles of HCMV using 17 random primers

注:泳道 M:100bp DNA ladder; 1.引物 Apo2; 2. 引物 GP581; 3. 引物 GP582; 4. 引物 GP583; 5.引物 GP584; 6. HindIII-X1; 7.引物 IEA1; 8.引物 IEA2; 9. 引物 MIE1; 10.引物 US91; 11. 引物 H1; 12.引物 H2; 13. 引物 70; 14.引物 80; 15.引物 90; 16.引物 RP2; 17.引物 RP5。箭头表示割胶测序的条带,红色箭头则是测序后与 HCMV 匹配度好的条带。

Note: M:100bp DNA Ladder; 1.primer Apo2; 2.primer GP581; 3.primer GP582; 4.primer GP583; 5.primer GP584; 6.primer HindIII-X1; 7.primer IEA1; 8.primer IEA2; 9.primer MIE1; 10.primer US91; 11.primer H1; 12.primer H2; 13. Primer70; 14. Primer80; 15. Primer90; 16.primer RP2; 17. primer RP5. The bands which arrow indicate is tapping purified and sequenced, the bands which red arrow indicate match with HCMV.



图(3) VZV16 种随机引物 RAPD 扩增图谱

Fig.3 RAPD profiles of VZV using 16 random primers

注:泳道 M:100bp DNA ladder; 1.引物 V1; 2. 引物 V2; 3.引物 V3; 4.引物 V4; 5.引物 Gene291; 6.引物 Gene292; 7.引物 ORF41; 8.引物 ORF42; 9.引物 70; 10.引物 80; 11.引物 Primer90; 12.引物 RP1; 13.引物 RP2; 14. 引物 RP3; 15.引物 RP4; 16.引物 RP5。箭头表示割胶测序的条带,红色箭头则是测序与 VZV 匹配度好的条带。

Note: M:100bp DNA Ladder; 1.primer V1; 2.primer V2; 3.primer V3; 4.primer V4; 5.primer Gene291; 6.primer Gene292; 7.primer ORF41; 8.primer ORF42; 9.primer 70; 10.primer 80; 11.primer 90; 12.primer RP1; 13.primer RP2; 14. Primer RP3; 15. Primer RP4; 16. Primer RP5. The bands which arrow indicate is tapping purified and sequenced, the bands which red arrow indicate match with VZV.

2.4 RAPD-qPCR 检测三种病毒的特异性分析

本实验中用乙型肝炎病毒及疱疹病毒互为对照未见非特异扩增,特异性好。

3 讨论

HSV、HCMV 和 VZV 是疱疹病毒属的双链 DNA 病毒,是病毒性神经系统感染的最常见病原体。病毒性神经系统感染常见诊断的方法有病毒的分离及特异性抗体检测,前者耗时较长,后者特异性差,并且两者灵敏性有限,不能满足临床需要,有研究显示仅有 5.7% 的脑脊液(CSF)病毒培养呈阳性^[12],抗体检测阳性约为 68.2%,且不能分辨既往感染和现症感染^[13]。近年来,脑脊液 CSF 检测病毒核酸被认为是其诊断的金标准^[9],新兴技术如多重 PCR、LAMP 技术(环介导的等温扩增)、二代测序、微阵列分析等广泛运用于病毒的检测,这些方法各有其优点,如多重 PCR 及二代测序、微阵列分析可实现对多种病原体检测,但是他们的检测灵敏性有限,并且有文献比较单一实时 PCR 与微阵列分析后发现单一荧光定量技术相对于微阵列分析更加敏感^[14]。因此,单一实时 PCR 在灵敏性上仍有其优势。Junlian Liu 等^[15]建立的 HSV 荧光定量检测系统的检测限度为 5×10^2 copies/mL,临床大部分标本可以实现有效检测,但是据文献报道 HSV、VZV 神经系统感染患者脑脊液中的病毒 DNA 含量低于 500 拷贝的情况并不少见^[16,17]。因此,有必要建立一套更加高敏、快速、特异的检测方法。

随机扩增多态性技术以 PCR 为基础,使用 8-12 bp 左右的随机引物,在较低的退火温度下进行扩增,使引物与目的片段更易结合复制,结合位点更多,从而达到随机放大的效果。已有学者将其运用分析细菌耐药及变异的产生及流行病学调查等^[18],本课题组曾用此方法检测结核分枝杆菌 DNA 并取得良好效果^[19,20]。本研究中,我们首先参照文献设计了相应的随机引物,筛选出 HSV、HCMV、VZV 各自一组扩增灵敏性及特异性最好

表 1 三种疱疹病毒随机引物及对应的特异性引物

Table 1 Random primers and corresponding specific primers of HSV, HCMV, VZV

Virus	Primer of RAPD	5'-3'	specific primers	5'-3'	Product size
HSV	US11	ACGAAACACAGGGGACGC	US11b-F	AATTCGATGGCCCAACTCC	133bp
			US11b-R	AGCCTGATTAAATACGCCCC	
HCMV	H1	ATCTACGGGGACACGGAC	H1a-F	TCCGGGCAGACATCTTATGA	186bp
			H1a-R	CACGGACAGGAACAGGTTTG	
VZV	ORF41	GCCCATGAATCACCTC	O1a-F	ACATAGAGGCACGGGAATGT	154bp
			O1a-R	CCC CGTCTAAGGTTTGAAT	

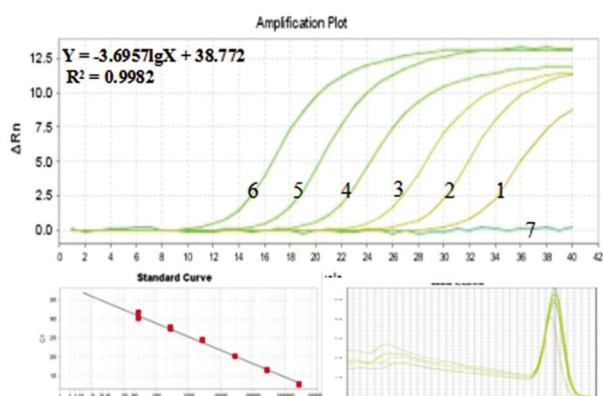


图 4 HSV 质粒标准品扩增曲线

Fig.4 Amplification plots of standards for herpes simplex virus

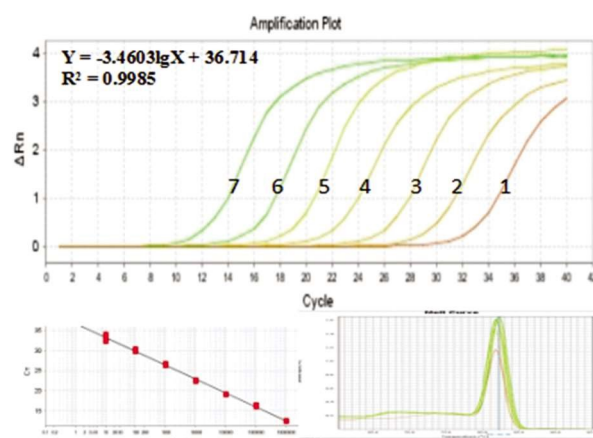
注: 1-6 为 HSV 质粒标准品梯度稀释(2.7×10^2 copies/ μ L- 2.7×10^7 copies/ μ L)扩增曲线。Note: Amplification curves obtained with serial dilutions (2.7×10^2 copies/ μ L- 2.7×10^7 copies/ μ L) of HSV.

图 5 HCMV 质粒标准品扩增曲线

Fig.5 Amplification plots of standards for human cytomegalovirus

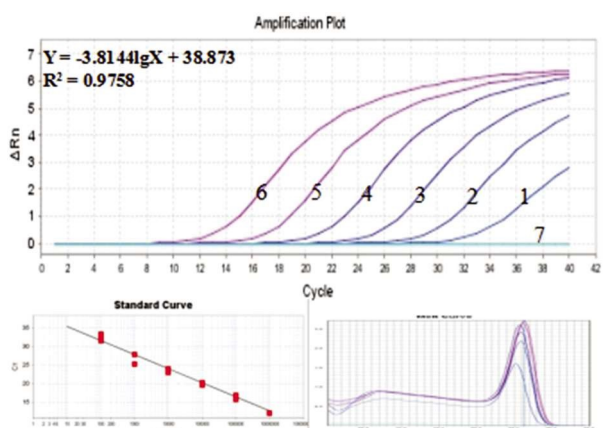
注: 1-7 为 HCMV 质粒标准品梯度稀释(3.5×10^1 copies/ μ L- 3.5×10^7 copies/ μ L)扩增曲线。Note: Amplification curves obtained with serial dilutions (3.5×10^1 copies/ μ L- 3.5×10^7 copies/ μ L) of HCMV.

图 6 VZV 质粒标准品扩增曲线

Fig.6 Amplification plots of standards for Varicella zoster virus

注: 1-6 为 VZV 质粒标准品梯度稀释(9×10^2 copies/ μ L- 9×10^7 copies/ μ L)扩增曲线。Note: Amplification curves obtained with serial dilutions (9×10^2 copies/ μ L- 9×10^7 copies/ μ L) of VZV.

的随机引物及特异性内引物,并且建立了 RAPD 联合 qPCR 检测三种病毒的方法。结果显示:可分别检测出 $1:10^6$ HSV、 $1:10^5$ HCMV 和 $1:10^5$ VZVDNA,而单一 qPCR 仅能检测 $1:10^3$ HSV、 $1:10^2$ HCMV 和 $1:10^3$ VZVDNA。RAPD-qPCR 相比于单一 qPCR 灵敏性提高 100-1000 倍。并且在实验结果的判断方面, RAPD-qPCR 扩增大于 $1:10^5$ 病毒 DNA 得到的 CT 值均小于

22.96 ± 0.81 与 10^2 copies/ μ L 的标准线相距远,易于区分阴性和阳性标本。为了保证检测的特异性,我们应用乙型肝炎病毒及三种病毒互为对照均未发现非特异性扩增,说明检测方法特异性较好。为了对目的基因进行准确定量,我们制作了标准质粒并绘制了标准曲线,结果显示标准曲线溶解曲线单一,扩增效率理想,相关性好,并且目前尚无文献报道此方法应用于病毒检测。既往 Gaeta、Tang JW 等建立的实时荧光 PCR 检测技术灵敏度理论上在 100-250 copies/mL 左右^[21,22]。但在脑炎患者亚临床感染时期,脑脊液中病毒含量可能更少,为了实现这部分患者的有效检测,我们利用 RAPD 技术筛选出了引物与靶基因结合的最佳位点,并将其作为预放大的一种手段来提高检测的灵敏性及稳定性。

综上所述,本研究表明 RAPD 联合 qPCR 是一种比单一 qPCR 更为敏感且特异的病毒检测方法。目前国内市售相关病毒 DNA 检测试剂盒大多属于单一 qPCR 方法,但是目前我们尚未与其进行对比分析,后续我们将同时应用此方法和市售试剂盒检测临床病毒性脑炎患者脑脊液标本,进一步验证其灵敏性和特异性。

参考文献(References)

- [1] Benjamin LA, Kelly M, Cohen D, et al. Detection of herpes viruses in the cerebrospinal fluid of adults with suspected viral meningitis in Malawi [J]. Infection, 2013, 41(1): 27-31

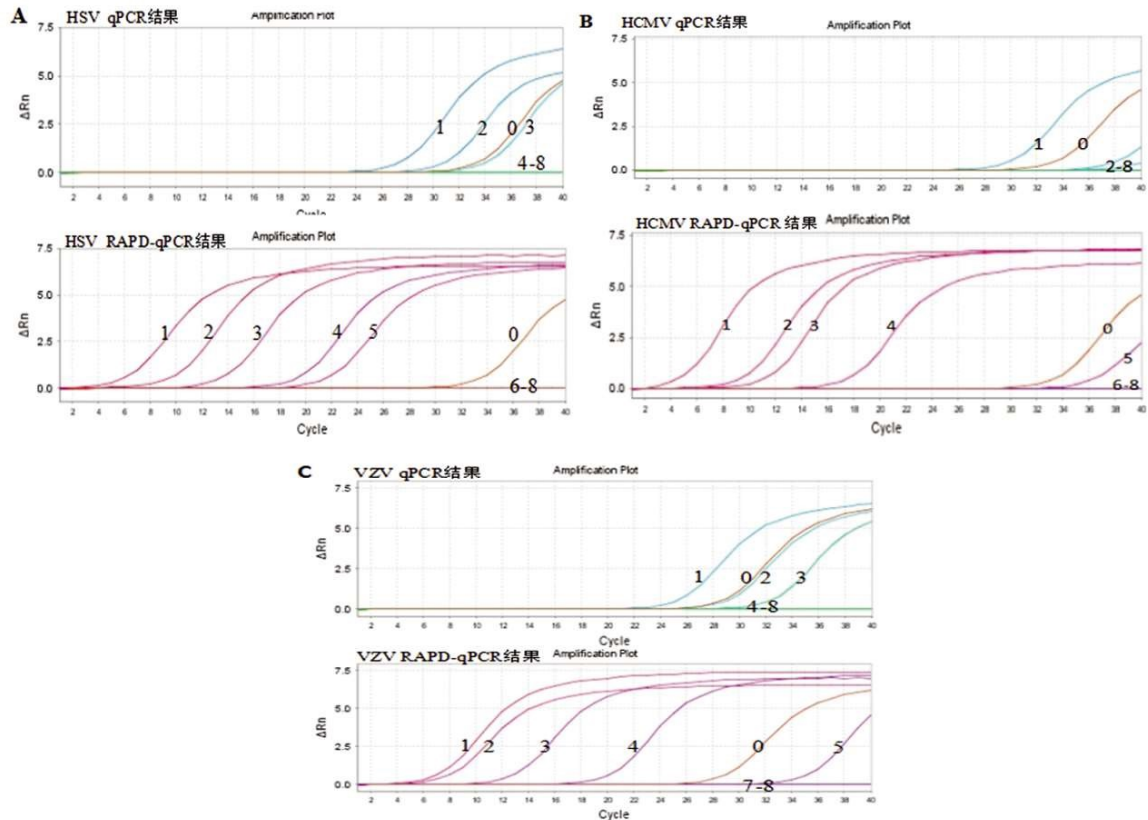


图 7 RAPD-qPCR 与 qPCR 检测三种疱疹病毒灵敏度比较

Fig.7 Comparison of the sensitivity between RAPD-qPCR with qPCR for detecting three herpes virus

注:A 图代表 HSV qPCR 与 RAPD-qPCR 的扩增曲线(其中 0.质粒标准品 2.7×10^2 copies/ μ L ; 1-7 为 HSV DNA $1:10^2$ - $1:10^8$; 8: ddH₂O); B 图代表 HCMV qPCR 与 RAPD-qPCR 的扩增曲线(其中 0.质粒标准品 3.5×10^2 copies/ μ L ; 1-7 为 HCMV DNA $1:10^2$ - $1:10^8$; 8: ddH₂O) C 图代表 VZV qPCR 与 RAPD-qPCR 的扩增曲线(其中 0.质粒标准品 9×10^2 copies/ μ L ; 1-7 为 VZV DNA $1:10^2$ - $1:10^8$; 8: ddH₂O)

Note: AHSV qPCR and RAPD-qPCR amplification curve (0.HSV plasmid 2.7×10^2 copies/ μ L ; 1-7 is HSV DNA $1:10^2$ - $1:10^8$; 8: ddH₂O); B represent HCMV qPCR and RAPD-qPCR amplification curve (0.HCMV plasmid 3.5×10^2 copies/ μ L ; 1-7 is HCMV DNA $1:10^2$ - $1:10^8$; 8: ddH₂O) C represent VZV qPCR and RAPD-qPCR amplification curve (0. VZV plasmid 9×10^2 copies/ μ L ; 1-7 is VZV DNA $1:10^2$ - $1:10^8$; 8: ddH₂O)

- [2] 王欣,王丽辉,岳玲,等. 2014-2015 年石家庄地区儿童病毒性脑炎临床流行病学及临床表现[J].脑与神经疾病杂志, 2016, 24(8): 480-484
Wang Xin, Wang Li-hui, Yue Ling, et al. Clinical and epidemiological characteristics of children's viral encephalitis in Shijiazhuang during 2014 to 2015 [J]. Journal of Brain and Nervous Diseases, 2016, 24(8): 480-484
- [3] Halperin JJ. Diagnosis and management of acute encephalitis [J]. Handb Clin Neurol, 2017, 140: 337-347
- [4] Granerod J, Tam CC, Crowcroft NS, et al. Challenge of the unknown A systematic review of acute encephalitis in non-outbreak situations [J]. Neurology, 2010, 75: 924-932
- [5] Jorgensen LK, Dalggaard LS, Ostergaard LJ, et al. Incidence and mortality of herpes simplex encephalitis in Denmark: A nationwide registry-based cohort study [J]. J Infect, 2017, 74(1): 42-49
- [6] Kimberley B, Rene M, Gerrit K, et al. Detection of human enterovirus and human parechovirus (HPeV) genotypes from clinical stool samples: polymerase chain reaction and direct molecular typing, culture characteristics, and serotyping [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010, 68(2): 166-173
- [7] Saraya AW, Supaporn W, Sininat P, et al. Normocellular CSF in herpes simplex encephalitis[J]. BMC Res Notes, 2016, 9: 95
- [8] Saylor D, Thakur K, Venkatesan A. Acute encephalitis in the immunocompromised individual [J]. Curr Opin Infect Dis, 2015, 28 (4): 330-336
- [9] Nasrin A, Marzieh J, Sadaf A, et al. Diagnosing of herpes simplex virus infections in suspected patients using real-time PCR [J]. Jundishapur J Microbiol, 2015, 8(2): e16727
- [10] 陈伟,刘晓静,崔寰,等. 病毒性脑炎患儿脑脊液病毒核酸检测及临床分析[J].中华疾病控制杂志, 2009, 13(3): 279-283
Chen Wei, Liu Xiao-jing, Cui Huan, et al. Virus nucleic acid testing and clinical analysis of cerebrospinal fluid in children with viral encephalitis [J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2009, 13(3): 279-283
- [11] Parida MM. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance[J]. J Biosci, 2008, 33(4): 617-628
- [12] Christopher RP, Cathy AP. Assessment of the utility of viral culture of cerebrospinal fluid [J]. Clinical infectious Disease, 2006, 43(12): 1578-1579
- [13] Patwardhan V, Bhalla P, Rawat D, et al. A Comparative Analysis of

表 2 不同稀释度病毒 DNA 进行 qPCR 和 RAPD-qPCR Ct 值的比较
($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of PCR and RAPD-qPCR Ct values for different dilutions of viral DNA($\bar{x} \pm s$)

HSV DNADilution	qPCR	RAPD-qPCR
1:10 ²	26.76± 0.17	5.50± 0.46
1:10 ³	30.10± 0.13	8.61± 0.07
1:10 ⁴	32.52± 0.09	11.97± 1.15
1:10 ⁵	--	18.52± 0.00
1:10 ⁶	--	20.86± 0.00
1:10 ⁷	--	--
HCMV DNADilution	qPCR	RAPD-qPCR
1:10 ²	29.70± 0.30	4.23± 0.09
1:10 ³	37.49± 1.68	8.72± 0.14
1:10 ⁴	--	10.75± 0.01
1:10 ⁵	--	17.11± 0.90
1:10 ⁶	--	--
VZV DNADilution	q-PCR	RAPD-qPCR
1:10 ²	27.94± 0.91	9.49± 0.06
1:10 ³	31.76± 0.31	10.35± 0.12
1:10 ⁴	35.43± 1.40	15.33± 0.07
1:10 ⁵	--	22.96± 0.81
1:10 ⁶	--	36.7± 0.92
1:10 ⁷	--	--

Polymerase Chain Reaction and Direct Fluorescent Antibody Test for Diagnosis of Genital Herpes[J]. J Lab Physicians, 2017, 9(1): 53-56

- [14] Raymond F, Carbonneau J, Boucher N, et al. Comparison of automated microarray detection with real-time PCR assays for detection of respiratory viruses in specimens obtained from children [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3): 743-750

- [15] Junlian Liu, Yong Yi, Wei Chen, et al. Development and evaluation of the quantitative real-time PCR assay in detection and typing of herpes simplex virus in swab specimens from patients with genital herpes [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(10): 18758-18764
- [16] Mazyar ZA, AlborziA, Borhani H, et al. Diagnosis and quantitative detection of HSV DNA in samples from patients with suspected herpes simplex encephalitis [J]. Med Virol, 2010, 82: 1911-1916
- [17] Julien Poissy, Karen Champenois, Anny Dewilde, et al. Impact of Herpes simplex virus load and red blood cells in cerebrospinal fluid upon herpes simplex meningo-encephalitis outcome [J]. BMC Infectious Diseases, 2012, 12: 256
- [18] Christianson, SaraWolfe, Joyce Soualhine,et al. Comparison of repetitive-sequence-based polymerase chain reaction with random amplified polymorphic DNA analysis for rapid genotyping of nontuberculosis mycobacteria [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(8): 953-964
- [19] 严玉娟, 邢益平, 施旭东, 等. 随机扩增多态性技术联合荧光定量 PCR 检测结核分枝杆菌方法的建立 [J]. 江苏医药, 2016, 42(11): 1209-1213
- Yan Yu-juan, Xing Yi-ping, Shi Xu-dong, et al. Establishment of random amplified polymorphic DNA combined with qPCR for detecting mycobacterium tuberculosis [J]. Jiangsu Medical Journal, 2016, 42(11): 1209-1213
- [20] 黄威, 邢益平, 严有德, 等. 一种随机引物联合多特异性 DNA 片段检测结核分枝杆菌的新方法 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14: 5609-5616
- Huang Wei, Xing Yi-ping, Yan You-de, et al. Detection of Mycobacterium Tuberculosis by Random Combined Specific PCR [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(29)
- [21] Aurelia G, Simona V, Latte MC, et al. Diagnosis of neurological herpesvirus infections:real time PCR in cerebral spinal fluid analysis [J]. New Microbiol, 2009, 32(4): 333-340
- [22] Tang JW, Lin M, Chiu L, et al. Viral loads of herpes simplex virus in clinical samples--a 5-year retrospective analysis[J]. Med. Virol, 2010, 82: 1911-1916

(上接第 4050 页)

- [15] Hughes A J, Herr A E. Microfluidic Western blotting [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(52): 21450
- [16] Pan W, Chen W, Jiang X. Microfluidic Western blot [J]. Anal Chem, 2010, 82(10): 3974
- [17] Jin S, Kennedy R T. New developments in Western blot technology [J]. Chin Chem Lett, 2015, 4: 006
- [18] Plotzki E, Keller M, Ivanusic D, Denner J. A new Western blot assay

for the detection of porcine cytomegalovirus (PCMV)[J]. Journal of Immunological Methods, 2016, 437: 37-42

- [19] Eaton S L, Hurtado M L, Oldknow K J, et al. A Guide to Modern Quantitative Fluorescent Western Blotting with Troubleshooting Strategies[J]. J Vis Exp, 2014, (93)
- [20] Kurien B T, Scofield R H. Protein blotting: a review [J]. J Immunol Methods, 2003, 274(1-2): 1