

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00438

## 实时定量 PCR 检测 BK 病毒时尿样本的优化处理

林春兰<sup>1</sup>, 卢育洪<sup>2\*</sup>, 陈少华<sup>3</sup>, 李扬秋<sup>3</sup>, 朱康儿<sup>2</sup>, 张 涛<sup>2</sup>

1. 暨南大学医学院生物化学教研室, 广州 510632

2. 暨南大学附属第一医院血液科, 广州 510632

3. 暨南大学医学院血液研究所, 广州 510632

**[摘要]** **目的** 建立简便有效的样本处理方法, 提高实时荧光定量 PCR 法检测尿液中 BK 病毒载量的敏感性和准确性。**方法** 任意选择 24 例 BK 病毒阳性样本, 每一样本进行 4 种不同的处理: 原尿、原尿病毒 DNA 提纯、1:10 稀释尿液、1:100 稀释尿液, 实时荧光定量 PCR 法检测各组样本 BK 病毒载量, 所测数据用 SPSS 11.0 进行统计学分析。**结果** 4 种不同的处理方法对实时荧光定量 PCR 法检测尿液中 BK 病毒载量有明显的影响: 原尿阴性 3 例, 病毒载量在 4 组中的最低值占 66.7%; 1:100 稀释尿阴性 2 例, 病毒载量在 4 组中的最高值占 79.2%, 但中位值和 1:10 稀释组差异无统计学意义; DNA 纯化组与 1:10 稀释尿液病毒检出率相当, 均为 100%, 但 DNA 纯化组目标基因的流失量较明显。**结论** 在临床尿液中 BK 病毒载量检测时, 1:10 稀释尿在实时荧光定量 PCR 检测 BK 病毒时 DNA 损失小, 效率高, 且处理过程简便、成本低, 是一种较好的尿样本处理方法。

**[关键词]** BK 病毒; 尿; 实时荧光定量 PCR; 病毒载量**[中图分类号]** R 446.12**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2010)04-0438-04

### Optimization of urinary sample preparation process for real-time PCR detection of BK virus

LIN Chun-lan<sup>1</sup>, LU Yu-hong<sup>2\*</sup>, CHEN Shao-hua<sup>3</sup>, LI Yang-qiu<sup>3</sup>, ZHU Kang-er<sup>2</sup>, ZHANG Tao<sup>2</sup>

1. Department of Biochemistry, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

2. Hematological Station, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

3. Hematology Institute of Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

**[Abstract]** **Objective** To develop an effective preparation method to improve the sensitivity and accuracy of real-time PCR in detection of BK virus's (BKV's) load in urine samples. **Methods** A total of 24 samples documented as positive probes in primary detection were enrolled in this study. The candidate samples were prepared by 4 different approaches: unprocessed urine, BKV's DNA extracted from urine, 1:10 diluted urine, and 1:100 diluted urine; and then they were subjected to real-time PCR examination to obtain the viral load. The data obtained were analyzed by SPSS 11.0. **Results** The four different preparation processes for urinary specimens had significant impact on detection results of real-time PCR. Three samples were negative in the unprocessed urine group and 66.7% of its samples had the lowest viral loads compared with the other three groups. Two samples in the 1:100 diluted urine group were negative and 79.2% of its samples had the highest viral loads, but its median load was similar to that of the 1:10 group. Viral gene was detected in all samples in the DNA extraction group and 1:10 diluted urine group, but the loss of the target gene was more severe in the DNA extraction group. **Conclusion** The 1:10 diluted urine is better for real-time PCR detection of BKV's load, as it loses less viral gene and is more efficient, easy to perform and economical.

**[Key words]** BK virus; urine; real-time PCR; viral load

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(4):438-441]

实时定量 PCR 检测尿液中多瘤病毒成员之一 BK 病毒 (BKV) 的拷贝浓度, 是诊断和监控肾移植后 BKV 相关肾病和造血干细胞移植后 BKV 相关出血性膀胱炎的主要手段之一<sup>[1-4]</sup>。但 PCR 方法过于敏感, 易受多种因素的影响, 尤其是

样本中多种物质的影响。人类尿液成分复杂, 存在 PCR 天然抑制物, 因此, 对样本进行预处理, 降低尿液对 PCR 的抑制作用, 对于提高病毒的检出率十分重要。多数研究在检测尿中 BK 病毒时, 采用预先提取目标基因 BKV DNA 后进行 PCR

**[收稿日期]** 2009-11-27**[接受日期]** 2010-01-27**[基金项目]** 广东省自然科学基金自由项目(04010491)。Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province, China(04010491)。**[作者简介]** 林春兰, 硕士, 实验师。E-mail: linchunlan@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 020-38688631, E-mail: yhl2006jn@163.com

定量检测<sup>[2-6]</sup>。但该方法成本高,操作烦琐,费时费力,不利于大样本检测,而且在操作过程中可能造成病毒 DNA 部分丢失,影响检测的准确度。国内有学者建议用稀释尿液法减轻抑制物对 PCR 的抑制作用<sup>[7]</sup>,但没有大样本量的数据支持和具体分析。本研究对 24 例检测阳性的样本进行 DNA 提纯和尿液稀释等处理,比较不同处理方法对实时荧光定量 PCR 检测 BKV 的敏感性和准确性的影响,从而选出简便优化的样本处理方法,为临床检验提供有价值的实验参考依据。

## 1 材料和方法

1.1 样本的采集 收集广州暨南大学附属第一医院造血干细胞移植患者术后新鲜中段尿,经 0.02% 叠氮钠防腐处理后 4℃ 保存。先以 1:10 稀释尿液为样本经实时荧光定量 PCR 检测,任意选取 24 例阳性样本作为研究对象。同时收集 10 例健康成人晨尿进行相同处理作为正常对照。

1.2 样本的处理和分组 尿样本收集于 2 ml Eppendorf 管中,低速离心 5 min 去除悬浮的固体成分,即为原尿液。每一样本采用 4 种方法进行处理并采用自身配对分为相应的 4 组:(1)原尿液组:直接以原尿液为检测样本;(2)尿液病毒 DNA 提纯组:应用 PureLink™ Viral RNA/DNA Kits 试剂盒 (Invitrogen),按照操作说明书提取 200 μl 原尿液病毒 DNA,-20℃ 保存;(3)1:10 稀释原尿组:取 10 μl 原尿样本用双蒸水稀释;(4)1:100 稀释原尿组:取 10 μl 原尿样本用双蒸水稀释。

1.3 标准品及标准曲线的制备 根据文献<sup>[5]</sup>提供的方法,目标序列位于 BKV 壳蛋白 VP1 基因内(GenBank J02038,碱基序列 5'-3'为 4 3224 567),先以上游引物 5'-ACA GCA AAG CAG GCA AG-3'和下游引物 5'-GGT GCC AAC CTA TGG AAC AG-3'(引物由 Invitrogen 公司合成)通过普通 PCR 扩增目标片段,PCR 的反应体系 30 μl,包括 5 μl 检测样本(原尿液)、3 μl 10×PBS 液,333 nmol/L 引物、50 μmol/L dNTPs,2 U Taq DNA 聚合酶。反应条件:94℃ 预变性 3 min 后,94℃ 20 s、53℃ 20 s、72℃ 1 min 30 个循环。PCR 产物在含溴乙啶的琼脂糖凝胶上电泳进行鉴定,片段大小为 246 bp,将阳性样本的 PCR 产物纯化后与 pMD18-T 质粒用 DNA 连接试剂盒 (Invitrogen) 连接,构建重组质粒 pMD18-BK。将重组质粒 pMD18-BK 转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞内,筛选阳性克隆,扩增,提取重组质粒。测序结果显示与目的片段序列一致,作为标准品。将 pMD18-BK 标准品按 10 倍浓度梯度稀释为 10<sup>7</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10 拷贝/μl 后制作实时定量 PCR 标准曲线。

1.4 样本检测 用 Chromo4 荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD, USA)检测样本病毒的载量。引物及荧光探针均由 Invitrogen 公司合成,序列<sup>[5]</sup>如下:上游引物 5'-TCT ATT ACT AAA CAC AGC TTA CT-3'(碱基序列定位:4 3424 356 nt)、下游引物:5'-GGT GCC AAC CTA TGG AAC AG-3'(碱基序列定位:4 5484 567 nt)及荧光探针 5'-TGG AAA GTC TTT AGG GTC TTC TAC CTT-3'(碱基序列定位:4 3874 413 nt;5'端使用 FAM 标记,3'端使用 TAMRA 标

记)。扩增产物片段大小为 226 bp。

总反应体系为 25 μl,应用 Platium Quantitative PCR SuperMix-UDG 试剂盒(Invitrogen),包括 2×SuperMix 12.5 μl,终浓度为 0.4 mmol/L 的上、下游引物,终浓度为 4 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub>,终浓度为 0.1 mmol/L 的探针及 2 μl 样本。在 50℃ 2 min 热启动,94℃ 预变性 3 min 后,94℃ 30 s、60℃ 1 min 共 45 个循环进行扩增。

以未加入样本的检测体系为阴性对照,病毒质粒为阳性对照。每份样本设 2 个复孔,测得 2 个 Ct 值及相应的目的基因拷贝浓度,计算均值输入数据库进行统计学分析。

1.5 重复性检测 用标准品 10<sup>6</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup> 拷贝/μl 分别在一批次中做 6 个复孔,根据所测得 Ct 值计算组内变异系数(CV),另外分别于不同批次重复 6 次检测所得数据计算组间变异系数。

1.6 灵敏度检测 将 pMD18-BK 稀释成 10、5、1、0.5、0.1 拷贝/μl,同时检测 10 次,以阳性扩增曲线生成率≥60% 为检测下限,检测本方法的灵敏度。

1.7 特异性检测 以阴性尿液为对照,另将部分阳性扩增产物电泳分析、测序检测本方法的特异性。

1.8 统计学处理 经实时荧光定量 PCR 检测获得 4 组数据,为每份样本分别进行 4 种预处理后相应的病毒载量,故属自身配对比较实验。采用 SPSS 11.0 统计软件按非正态分布资料的非参数检验进行数据分析,中位数比较采用 Friedman 和 Kendall's W 秩和检验,两组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验,P<0.05 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 标准曲线的制备 采用 PCR 产物提纯目的基因转入 pMD18-T 质粒作为标准品,10 倍梯度稀释 7 等级经 chromo4 实时荧光 PCR 检测,扩增曲线见图 1A,标准曲线见图 1B,Ct 值和目的基因拷贝浓度的相关性良好( $r^2=0.994$ )。

2.2 重复性检测 10<sup>6</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup> 拷贝/μl 标准品组内变异系数为 1.61%~2.56%,组间变异系数为 2.26%~2.82%,均小于 5%,表明该方法重复性较好。

2.3 灵敏度 pMD18-BK 质粒浓度为 10、5、1、0.5、0.1 拷贝/μl 时,其阳性扩增曲线生成率分别为 100%、100%、60%、30%、0,以 60% 为检测下限,确定本方法灵敏度为 1 拷贝/μl。

2.4 特异性 不同预处理后 10 例正常对照样本检测结果均为阴性。阳性扩增产物片段大小一致,随机抽取 1 例测序,结果与目标基因序列一致,说明本方法特异性良好。

2.5 样本检测结果 对每份尿液样本进行不同的预处理后进行定量测定,获得 4 组数据(表 1)。结果显示,1:10 稀释样本和 DNA 纯化组病毒检出率一致,均为 100%,原尿液和 1:100 稀释的样本出现阴性结果,分别有 3 例和 2 例未检出病毒。10 例正常对照样本经不同预处理后检测均为阴性。

4 种不同样本处理方法对实时荧光定量 PCR 检测病毒拷贝浓度的影响显著,原尿组、DNA 纯化组、1:10 稀释组、1:100 稀释组的中位值分别为 8.263×10<sup>5</sup>、3.003×10<sup>6</sup>、7.838×10<sup>6</sup>、1.183×10<sup>7</sup> 拷贝/ml,1:100 稀释的样本不仅中

位值最高,而且在4组中出现同一样本病毒载量最高值最多,共19例,占79.2%,原尿组的中位值最低,且在4组中出现同一样本病毒载量最低值最多,共16例,占66.7%。各组中位值的比较显示:除DNA纯化组/原尿组和1:10稀释组/1:100稀释组无统计学差异( $P>0.05$ )外,其他各组之间两两比较均有统计学差异( $P<0.05$ )。

病毒拷贝浓度低的样本,在原尿液中被检出率低;在1:100稀释的样本中也可能漏检。在原尿液中第15编号的样本病毒浓度未被测出,但在1:10和1:100稀释样本中病毒浓度却很高,达到百万级,在DNA纯化组中也达到十万级水平。这些现象可能与尿液对PCR的抑制作用以及尿液被过度稀释有关。

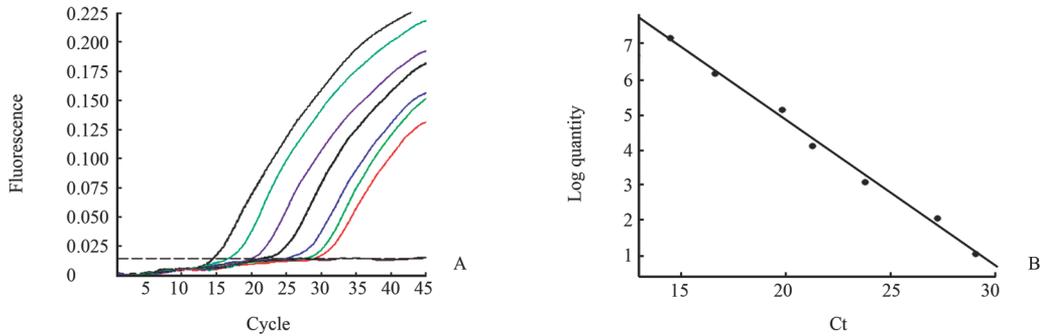


图1 实时定量PCR检测10倍梯度稀释的pMD18-BK质粒时的反应曲线(A)和标准曲线(B)

Fig 1 Quantification plots (A) and standard curve (B) of pMD18-BK plasmid in geometric serial dilution as detected by real-time PCR

表1 经不同方法预处理后检测所得样本中BK病毒载量

Tab 1 Viral load detected by real-time PCR in every sample with different preparation processes

Sample No.	Viral load (copy/ml)			
	Unprocessed urine	Extracted viral DNA	1:10 diluted urine	1:100 diluted urine
1	$5.772 \times 10^6$	$5.200 \times 10^6$	$1.249 \times 10^7$	$1.686 \times 10^7$
2	$1.115 \times 10^1$	$4.336 \times 10^1$	$2.768 \times 10^2$	-
3	$2.235 \times 10^6$	$1.128 \times 10^6$	$8.718 \times 10^6$	$1.051 \times 10^7$
4	$8.972 \times 10^5$	$1.039 \times 10^6$	$6.156 \times 10^6$	$7.311 \times 10^6$
5	$1.005 \times 10^5$	$4.372 \times 10^6$	$1.956 \times 10^6$	$9.223 \times 10^6$
6	$5.775 \times 10^4$	$1.011 \times 10^7$	$5.945 \times 10^6$	$6.139 \times 10^6$
7	-	$1.035 \times 10^2$	$4.370 \times 10^2$	$3.916 \times 10^3$
8	$4.003 \times 10^5$	$2.782 \times 10^6$	$7.614 \times 10^6$	$7.751 \times 10^6$
9	$4.836 \times 10^5$	$1.221 \times 10^6$	$6.735 \times 10^6$	$4.379 \times 10^6$
10	$3.312 \times 10^3$	$1.645 \times 10^6$	$2.541 \times 10^6$	$7.256 \times 10^6$
11	-	$1.441 \times 10^1$	$4.334 \times 10^2$	$5.004 \times 10^3$
12	$2.121 \times 10^6$	$6.364 \times 10^6$	$1.442 \times 10^7$	$1.315 \times 10^7$
13	$2.410 \times 10^6$	$3.014 \times 10^5$	$8.626 \times 10^6$	$7.195 \times 10^6$
14	$3.063 \times 10^6$	$3.614 \times 10^6$	$1.735 \times 10^7$	$1.756 \times 10^7$
15	-	$3.372 \times 10^6$	$5.284 \times 10^7$	$5.654 \times 10^7$
16	$4.551 \times 10^6$	$3.996 \times 10^6$	$9.876 \times 10^6$	$2.659 \times 10^7$
17	$3.251 \times 10^6$	$7.912 \times 10^5$	$6.320 \times 10^6$	$2.106 \times 10^7$
18	$8.644 \times 10^6$	$3.860 \times 10^6$	$1.457 \times 10^7$	$1.633 \times 10^8$
19	$2.440 \times 10^7$	$9.216 \times 10^6$	$3.001 \times 10^7$	$2.145 \times 10^8$
20	$1.030 \times 10^6$	$7.100 \times 10^6$	$8.062 \times 10^6$	$1.942 \times 10^7$
21	$7.555 \times 10^5$	$4.846 \times 10^5$	$6.080 \times 10^6$	$4.733 \times 10^7$
22	$3.431 \times 10^6$	$4.706 \times 10^6$	$1.661 \times 10^7$	$3.601 \times 10^7$
23	$6.199 \times 10^5$	$3.224 \times 10^6$	$8.729 \times 10^6$	$2.631 \times 10^7$
24	$3.169 \times 10^0$	$2.642 \times 10^3$	$1.152 \times 10^3$	-

### 3 讨论

实时荧光定量PCR是目前准确、定量检测临床样本中的病原体的主要技术,但样本中存在的PCR抑制物可能影响检测结果的准确性和精确性<sup>[8]</sup>,如粪便样本中的胆盐、多

聚糖,血液样本中的亚铁血红素、血红蛋白、IgG,尿液中尿酸、尿素等都具有抑制PCR的作用。应对PCR检测样本进行预处理,以减少PCR抑制物对检验结果的影响作用。

尿液的成分复杂、多变,不仅存在个体差异,而且饮食、身体状况等多种因素均可以影响其成分组成和含量的变化。

因此用实时荧光定量 PCR 检测尿中病原体时,对样本进行预先处理,减少尿液中的 PCR 抑制物的影响,对于提高检测结果的稳定和可比性尤为重要。本实验中直接检测原尿液样本,BK 病毒的检测效率明显受到影响,不仅零值最多,低值也在 4 组中占了 66.7%(16/24)。

多数文献在检测尿中 BK 病毒时,采用预先提取目标基因 DNA,后进行 PCR 定量检测。本实验的结果显示,3 例样本在原尿组中没有检测到病毒,而在其他 3 种方法的处理组中可以检测到;2 例在 1:100 稀释组中未检测到病毒的样本,在另外 3 组中阳性。可见在病毒阳性检测率上 DNA 纯化组和 1:10 稀释组具备优势。但在 DNA 纯化组中,样本中 BK 病毒载量明显低于 1:10 稀释组和 1:100 稀释组,可能是病毒 DNA 在纯化过程中有部分丢失所致。

适度的稀释尿样本有助于提高检测效率和减少 BK 病毒基因损失,如本实验中 1:10 稀释尿在实时荧光定量 PCR 检测 BK 病毒时 DNA 损失小,效率高;但过度稀释,如本实验中 1:100 稀释,虽然可能更大程度减轻尿液中 PCR 抑制物的作用,但因部分病毒拷贝浓度低的样本,稀释后病毒含量过低,有出现假阴性的可能。

通过分析比较,结果显示 1:10 稀释尿样本作为实时荧光定量 PCR 的模板检测 BK 病毒,不仅检测效率高,而且目标基因的损耗少,可作为相关疾病监控尿液中 BK 病毒的样本处理方法。而且处理方法操作简单,成本低,尤其适合大样本检测。

#### [参考文献]

[1] Si-Mohamed A, Goff J L, Désiré N, Maylin S, Glotz D, Bélec L. Detection and quantitation of BK virus DNA by real-time polymerase chain reaction in the LT-ag gene in adult renal trans-

plant recipients[J]. J Virol Methods, 2006, 131: 21-27.

- [2] Leung A Y, Suen C K, Lie A K, Liang R H, Yuen K Y, Kwong Y L. Quantification of polyoma BK viraemia in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation[J]. Blood, 2001, 98: 1971-1978.
- [3] 陆明,朱有华,王皓,韩澍,冀俊峰. 实时荧光定量 PCR 检测肾移植患者术后 BK 病毒感染[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27: 672-675.
- Lu M, Zhu Y H, Wang H, Han S, Ji J F. A real-time fluorescent quantitative PCR method for determination of BK virus in renal transplant recipients[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27: 672-675.
- [4] 黄彬,陈茶,姜悦. 自身淬灭探针荧光定量 PCR 检测 BK 多瘤病毒方法的建立与评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19: 1489-1492.
- [5] Biel S S, Held T K, Landt O, Niedrig M, Gelderblom H R, Siebert W, et al. Rapid quantification and differentiation of human polyomavirus DNA in undiluted urine of patients after bone marrow transplantation[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 3689-3695.
- [6] Pang X L, Martin K, Preiksaitis J K. The use of unprocessed urine samples for detecting and monitoring BK viruses in renal transplant recipients by a quantitative real-time PCR assay[J]. J Virol Methods, 2008, 149: 118-122.
- [7] 黄涛,黄超,孔宪涛. 尿液对 PCR 检测的影响[J]. 上海医学检验杂志, 1994, 9: 149.
- [8] Huggett J F, Novak T, Garson J A, Green C, Morris-Jones S D, Miller R F, et al. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon [J]. BMC Res Notes, 2008, 1: 70.

[本文编辑] 孙岩

#### • 书 讯 •

### 《实用肺功能临床解读手册》已出版

该书由赵立军、李强主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-961-6,16 开,定价:39.00 元。

内容简介:该书为肺功能检查详尽的实用手册,包括:与呼吸相关的基础知识,肺功能测定设备的相关内容,临床各科如何能从肺功能测定中获益,尤其是各种手术前进行肺功能测定的重要作用。医务人员学会解读肺功能检查报告并应用于临床诊治,是一个需要学习和训练的过程。本书按临床工作的思路及肺功能检查的顺序,层层递进,深入浅出,结合临床实例进行阐述,层次分明,言简意赅。书后还提供了大量的典型临床病例分析,可以起到强化训练、增强学习效果的目的。该书为临床各科医生尤其是内科医生的案头参考书,也可供内科研究生、进修生深入学习时使用。

该书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>