

## · 临床论著 ·

# TaqMan荧光定量PCR检测HIV-1 DNA方法的建立及初步应用

韩根鹏<sup>1</sup> 熊勇<sup>1</sup> 高雨<sup>2</sup> 杨小霞<sup>1</sup>

**【摘要】目的** 建立基于TaqMan探针的HIV DNA荧光定量PCR检测方法,并检验其可靠性和稳定性。**方法** 选择HIV-1的保守区域LTR-gag设计引物和探针,构建质粒标准品,建立检测方法,对12份HIV-1阳性标本和5份HIV-1阴性标本进行检测。将检测结果与罗氏HIV DNA定性检测试剂盒作比较。**结果** 荧光定量PCR体系的检测下限为50 拷贝/μl,标准曲线的相关系数为0.99,斜率为-1.65,截距为39.80;12份HIV-1阳性标本,检出率为100%;5份HIV-1阴性标本,检测结果均为阴性。该方法与罗氏HIV DNA定性检测试剂盒检测结果完全一致。采用不同方法提取的DNA再行HIV DNA检测,其差异无统计学意义( $t=0.033$ ,  $P=0.974$ )。**结论** 成功建立了一种HIV DNA的检测方法,具有快速、特异性强以及稳定性好等优点。

**【关键词】** 实时荧光定量PCR; TaqMan探针; 人类免疫缺陷病毒

**TaqMan real-time PCR assay for the quantification of HIV-1 DNA** Han Genpeng<sup>1</sup>, Xiong Yong<sup>1</sup>, Gao Yu<sup>2</sup>, Yang Xiaoxia<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Department of Infectious Diseases, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China  
Corresponding author: Xiong Yong, Email: yongxiong64@163.com

**【Abstract】Objective** To establish a real-time PCR assay for HIV DNA quantification. **Methods** The primers were designed according to the sequence of LTR-gag gene. A recombinant plasmid containing LTR-gag gene was constructed as a standard control. HIV DNA quantification were detected by real-time PCR assay. Reproducibility and specificity of this assay were also evaluated. HIV DNA from 12 cases with HIV-1 infection was also detected. The results were compared with Roche HIV DNA qualitative detection kit. **Results** The detection limit of the fluorescent quantitative PCR was 50 copies/μl. The correlation coefficient of the standard curves was 0.99, the slope was -1.65, and the intercept was 39.80. HIV-1 DNA from 12 cases with HIV-1 infection was successfully quantified using this assay. All the results were consistent with the results of the Roche HIV DNA qualitative detection kit, with no significant differences in the results of HIV DNA by different extraction methods ( $t=0.033$ ,  $P=0.974$ ). **Conclusion** HIV DNA detection method that is rapid, specific and repeatable was established successfully.

**【Key words】** Real-time PCR; TaqMan probe; Human immunodeficiency virus-1

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染是严重危害人类健康的全球问题,自1981年在美国被识别并发展为全球大流行至今,已累计导致几千万人死亡。高效抗逆转录病毒疗法(highly active antiretroviral therapy, HAART)虽然可使HIV感染者血浆中的HIV-1 RNA水平低于实验室检

测下限<sup>[1]</sup>,但HIV DNA仍然存在于部分感染者的细胞中,这些细胞被称为病毒储存库。储存库的存在是HIV-1感染者能否彻底治愈的重大挑战<sup>[2]</sup>,HIV DNA可以反映病毒储存库的含量。故HIV-1 DNA水平可作为除CD4<sup>+</sup> T细胞计数和HIV-1 RNA外,特别是在HIV-1 RNA已经到达检测下限时的另一标志物,判断经抗病毒治疗患者的疾病进展<sup>[3-4]</sup>。血液中HIV-1 DNA含量的测定是目前最常用的测量方法,Real-time PCR是用于检测HIV-DNA的最常见方法,较多文献均已报道过关于HIV-1 DNA的检测方法<sup>[5-13]</sup>。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2017.02.006

基金项目: 国家科技重大专项(No. 2014ZX10001003006)

作者单位: 430071 武汉市,武汉大学中南医院感染科<sup>1</sup>; 430072 武汉市,武汉大学生命科学学院<sup>2</sup>

通信作者: 熊勇, Email: yongxiong64@163.com

虽然关于HIV-1 DNA检测的研究日渐增多,但其中一些方法为半定量<sup>[11]</sup>;其余方法要么缺乏足够的灵敏度<sup>[14-15]</sup>,要么无法正确量化所有的HIV-1 (M) 主要基因亚型(探针和引物针对的HIV-1区域只能包含< 70%的HIV-1亚型)<sup>[14, 16]</sup>。而本研究设计的方案基本包含了HIV-1 (M) 的所有亚型,与其他方法相比,大大提高了检测的准确度。现将实验设计和分析报道如下。

## 资料与方法

### 一、一般资料

1. 研究对象:均来自武汉大学中南医院感染科2015年12月~2016年7月就诊的住院和门诊患者,共12例HIV-1感染者(女性5例,男性7例),年龄27~62岁,平均年龄为37.6岁;其中5例患者合并乙型肝炎,5例合并丙型肝炎;另外选取5例本校学生为健康对照。HIV-1感染诊疗标准参照中华医学会感染病分会AIDS学组2011年版的AIDS诊疗指南,所有病例均经Western blot印迹分析确诊为HIV-1感染。所有受试者均于采血前签署知情同意书,且本研究已获武汉大学中南医院医学伦理委员会批准。

2. 主要试剂和仪器:ABI 7900实时荧光定量PCR仪(美国应用生物公司)、水平电泳仪和紫外分析仪购自北京君意东方电泳设备有限公司;RNase Inhibitor (TransGen)、dNTP Mixture (TINGEN)、50× ROX Reference Dye、All-in-one™ qPCR Mix购自VAZVME公司、Ex Taq™、DL2000 DNA Marker购自TAKARA公司、淋巴细胞分离液(天津灏洋)、TIANamp Genomic DNA Kit、TIANprep Mini Plasmid Kit购自TIANGEN公司,COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Qualitative Test, V2.0;引物及探针委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

### 二、实验方法

1. 引物、探针的设计与合成:由于HIV的遗传变异程度高,要确保所有HIV-1 (M) 主要基因亚型都能被检测到,这就对实验设计提出了很高的要求。首先,本研究从美国Los Alamos国家实验室HIV数据库(<http://www.hiv.lanl.gov>)下载了HIV-1的主要流行毒株序列,经分析后选取了基因LTR-gag的保守区设计PCR引物和探针

[包含了美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)数据库中约91%的HIV-1序列数据,见表1]。为保证所有HIV-1 (M) 主要亚型都能被检测到,研究又补充设计了反向引物2,当样本无法检测HIV DNA时则补充添加反向引物2再进行实验。Real-time PCR的引物和探针构成如下。上游引物:5'-TACTGACGCTCTCGCACC-3';下游引物1:5'-CTCGACGCAGGACTCG-3',下游引物2:5'-TCTCGACGCAAGGACTCG-3';标记探针FAM:5'-CTCTCTCCTTCTAGCCTC-3',引物设计针对HIV-1的LTR-gag的684→810碱基序列。

2. 样品处理(HIV DNA的提取):12例HIV-1感染者的病毒载量测定由武汉大学中南医院艾滋病临床指导培训中心实验室完成,病毒载量结果详见表2。

(1) 标本采集及外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)的分离:12例HIV感染者均抽取10 ml EDTA抗凝静脉血,标本采集按照《全国艾滋病检测技术规范》,在采血后4 h内以淋巴细胞分离液分离获到PBMC,再使用QIAGEN公司的TIANamp Genomic DNA Kit进行DNA提取,具体操作见说明书。用于核酸检测的血样在4 d内进行的可存放于4℃,3个月以内检测的应置于-20℃以下,3个月以上的检测应置于-70℃以下。

(2) 选择罗氏公司的COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Qualitative Test V2.0试剂盒作为对照方法进行HIV DNA定性测定,具体操作参见产品说明书。

3. 模板制备:为获取标准模板,查阅GenBank中的HIV核酸序列,选取LTR-gag区285 bp (629→913)的基因片段,并交由金斯瑞生物科技

表1 NCBI 数据库数据分析

错配	NCBI数据库中所占比例(%)		
	HIV-FOR引物	HIV探针	HIV-REV引物
None	4 881 (90.82)	1 924 (99.70)	1 810 (97.52)
3G→A	249 (4.63)	—	—
4A→G	245 (4.55)	—	—
9A→G	—	5 (0.30)	—
引物2	—	—	16 (0.86)
13G→A	—	—	5 (0.28)
14C→T	—	—	25 (1.34)

注:“—”:无相关数据

表2 两种方法 DNA 定量结果

样本编号	方法1		方法2		血浆HIV-1 RNA (拷贝/ml)
	Ct值 ( $\bar{x} \pm s$ )	拷贝数	Ct值 ( $\bar{x} \pm s$ )	拷贝数	
1	25.96 $\pm$ 0.16	4 387	26.12 $\pm$ 0.07	3 996	6 890
2	26.68 $\pm$ 0.11	2 833	26.82 $\pm$ 0.11	2 613	13 458
3	24.07 $\pm$ 0.16	13 817	24.28 $\pm$ 0.13	12 151	189 537
4	24.97 $\pm$ 0.18	7 993	24.95 $\pm$ 0.30	8 113	89 231
5	24.34 $\pm$ 0.06	11 717	24.31 $\pm$ 0.22	11 926	165 782
6	22.99 $\pm$ 0.03	26 558	22.96 $\pm$ 0.03	27 115	203 563
7	28.02 $\pm$ 0.11	1 263	28.08 $\pm$ 0.32	1 214	7 057
8	24.02 $\pm$ 0.06	14 208	24.02 $\pm$ 0.27	14 211	179 437
9	24.27 $\pm$ 0.01	12 235	24.26 $\pm$ 0.24	12 345	153 784
10	31.29 $\pm$ 0.05	174	31.19 $\pm$ 0.17	185	452
11	31.47 $\pm$ 0.15	156	31.55 $\pm$ 0.26	148	280
12	24.41 $\pm$ 0.11	1 1260	24.40 $\pm$ 0.08	11 317	156 783

有限公司进行片段合成,再将基因片段与pUC57载体进行连接,构建质粒标准品。将重组质粒进行扩增,提取质粒并测定质粒浓度,计算质粒拷贝数,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。一定体积的质粒溶液中质粒拷贝数计算公式如下: 质粒拷贝数 = (质粒浓度  $\times$  质粒体积/质粒相对分子质量)  $\times 6.02 \times 10^{23}$ 。使用无菌水对标准质粒进行10倍系列倍比稀释,稀释范围为  $1 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{l}$   $\sim 1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{l}$ ,用于建立标准参考曲线。

4. 荧光定量PCR方法的建立: 采用TaqMan探针法,以10倍稀释的质粒标准品为模板在ABI 7900实时荧光定量PCR仪上进行扩增反应。PCR体系为: AceQqPCR Probe Master Mix 10  $\mu\text{l}$ , 上下游引物各 0.4  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), ROX Reference Dye1 0.4  $\mu\text{l}$ , TaqMan Probe (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.2  $\mu\text{l}$ , 灭菌蒸馏水补足至20  $\mu\text{l}$ 。反应条件: 预变性  $95^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 循环反应  $95^{\circ}\text{C}$ 、30 s,  $60^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 40个循环, 荧光通道选择FAM。以质粒标准品拷贝数的对数为横坐标, Ct值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程。

#### 5. 灵敏度、特异度以及稳定性检测

(1) 灵敏度检测: 以标准质粒为检测模板, 通过换算确定其拷贝数后, 根据需要在每个反应体系中加入10、20、40、50、60、80、100、500拷贝/ $\mu\text{l}$ 的质粒模板来确定实验的灵敏度, 以所有重复管检测均呈阳性的最低梯度为检测的灵敏度, 确定检测下限。

(2) 特异性检测: 先选取健康对照、乙型肝炎患者、丙型肝炎患者血样进行交叉实验来检验实

验方法的特异性; 再将制作标准曲线时的real-time PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 观察产物的特异性。

(3) 稳定性试验: 为评价实验的稳定性, 选取7个梯度 ( $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{l}$ ) 的标准品, 每个梯度设2个复孔, 进行检测。将得到的实验结果计算变异系数 (coefficient of variation, CV) 进行分析。

6. Real-time PCR的初步应用: 对12例HIV-1感染者和5例健康对照的标本进行定量检测, 每个样本均设置3个复孔。采用罗氏HIV DNA定性检测试剂盒和自建的方法进行比较。本实验采取了两种不同方法制备DNA: 即用血细胞直接提取DNA或将血液分离得到PBMC后再提取DNA。经阅读大量文献后发现在很多研究中有以全血进行检测, 亦有分离得到PBMC后再进行检测, 为探究二者有无区别, 行对比试验, 将12例患者的血样分别用两种方法提取DNA, 再进行检测。

## 结 果

### 一、TaqMan荧光定量PCR检测

荧光定量PCR反应显示, PCR循环数与质粒标准品的拷贝数间存在线性关系, 当标准品浓度在  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{l}$ 时, 扩增曲线呈梯度分布。得到标准曲线  $Y = -1.65 \ln(X) + 39.80$ , 测定值基本在一条直线上, 与相应的Ct值具有良好的相关性 (相关系数  $R^2 = 0.99$ ), 见图1。



## 二、灵敏度、特异性及稳定性的检测

1. 灵敏度检测：当体系中加入50拷贝/ $\mu\text{l}$ 的质粒模板时，荧光信号结果不稳定，故确定该方法的检测下限为50拷贝/ $\mu\text{l}$ 。

2. 特异性检测：用HBV感染者、HCV感染者及健康人标本进行交叉实验的结果显示均为阴性，而HIV感染者标本则均为阳性，提示该法具有良好的特异性；将PCR反应产物进行琼脂糖凝胶电泳后，所得到的特异性片段（图2）与目的基因片段大小相吻合，提示实验特异性良好。

3. 稳定性分析：对实验结果进行分析发现在 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝/ $\mu\text{l}$ 的范围内，质粒标准品的重

复性表现良好，Ct值变异系数（CV）均 $< 2\%$ （表2），具有较好的重复性，提示所建立的real-time PCR扩增结果稳定，重复性好。

## 三、临床标本检测

研究结果显示，12例HIV感染者均呈现特异性荧光反应，检出率为100%；5例健康对照检测结果均为阴性。定量结果显示，最低HIV DNA含量为148拷贝/ $\mu\text{l}$ ，最高HIV DNA含量为27 115拷贝/ $\mu\text{l}$ ，均在线性范围内。罗氏HIV DNA定性检测结果与real-time PCR结果也完全一致，符合率为100%。采用两种不同方法提取DNA进行的HIV DNA测量结果见表3。

## 讨 论

HIV病毒储藏库的存在是HIV感染难以治愈的重要原因之一。在HIV感染早期，外周血细胞和其他组织中就已形成潜伏的病毒库，并且衰减速度很慢<sup>[17]</sup>。虽然HAART能将HIV感染者血清中的病毒水平降至低于检测下限，但是具有复制能力的病毒可能会持续存在而未被彻底清除，且不断有新感染的细胞补充到病毒储存库中，故在有效的抗病毒治疗后仍能检测到HIV-1 DNA。目前，已有越来越多的研究<sup>[18-19]</sup>将HIV-1 DNA、血浆RNA和CD4细胞计数一同作为监测疾病进展的指标。因此，监测HIV-1 DNA含量对于HIV感染者的疗效以及疾病进展有着重要意义。本研究所建立的实验能对HIV DNA含量进行有效测定。实验过程包括3个基本阶段，即患者血样的获取、DNA提取和HIV-1 DNA含量测定。从患者抽血开始到实验结束，HIV-1 DNA含量测定可在1 d内完成，操作简便，大大提高了检测效率，为患者HIV-1 DNA定量提供了一种快速、简便、可靠的方法。

Real-time PCR检测成功的关键在于引物的设计。文献已报道的检测方法选择的HIV靶基因包括LTR<sup>[5-6]</sup>、gag<sup>[7-8]</sup>、pol<sup>[7-9]</sup>和env<sup>[7]</sup>等，本研究通过对

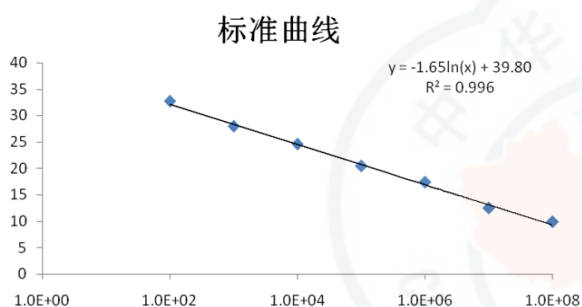


图1 质粒标准品浓度梯度标准曲线

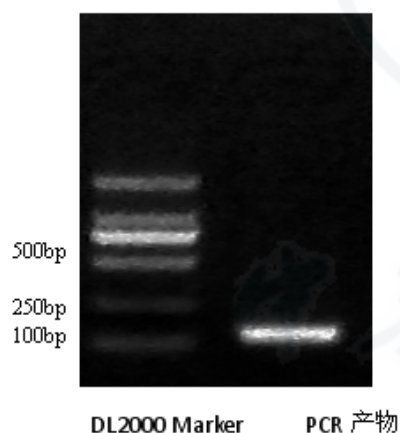


图2 扩增片段的凝胶电泳结果

表3 PCR 稳定性分析（拷贝/ml）

指标	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$
Ct值	9.86	12.46	17.35	20.46	24.56	27.91	32.71
	9.75	12.32	17.68	20.08	24.31	27.02	32.29
	9.63	12.23	17.34	20.73	24.87	27.23	32.12
Ct平均值	9.75	12.34	17.46	20.42	24.58	27.39	32.37
标准差	0.11	0.11	0.19	0.33	0.28	0.46	0.30
变异系数（%）	1.18	0.91	1.09	1.59	1.14	1.69	0.93

HIV各参考株基因组序列的全面比对,发现HIV-1病毒变异性较大,难以找到绝对保守的区域。最终,结合TaqMan探针短、设计灵活的优点,本研究选取了HIV-1相对保守的LTR-gag区域作为对HIV-1 DNA定量的目的基因,并对PCR的体系和程序进行了优化。

实验的线性检测范围在 $50 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝/ $\mu\text{l}$ ,且采用该方法对HIV感染者、乙型肝炎患者、丙型肝炎患者、健康对照进行的交叉分析结果显示了良好的特异性;琼脂糖凝胶电泳的结果也显示real-time PCR的产物特异性高,可以满足一定的实验要求。在重复性实验中,变异系数(CV)均 $< 2\%$ ,误差小,提示该检测方法具有良好的稳定性。而本研究用两种方法提取DNA再进行HIV DNA含量测定后,采用t检验分析结果发现二者数据差异无统计学意义( $t = 0.033$ 、 $P = 0.974$ ),提示全血HIV DNA与血液经分离得到PBMCs后的HIV DNA含量差异无统计学意义。故当在实验条件有限或者实验要求不高的情况下可以用全血HIV DNA来替代分离得到PBMC之后的HIV DNA,同时全血DNA的检测较为简单,适用于临床应用和大规模人群的检测。

本研究建立的TaqMan荧光定量PCR检测方法虽然应用数据较少,但显示出良好的扩增效果和实用性。方法的建立可以为深入探索HIV感染的免疫机制和致病机制,为药物的导向治疗、靶点设计提供理论依据,为日后进一步寻找彻底清除HIV的新治疗方案提供了一定的理论基础。

### 参 考 文 献

- [1] Richman DD, Margolis DM, Delaney M, et al. The challenge of finding a cure for HIV infection[J]. Science, 2009, 323(5919): 1304-1307.
- [2] Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4<sup>+</sup> T cells[J]. Nat Med, 2003, 9(6): 727-728.
- [3] Goujard C, Bonarek M, Meyer L, et al. CD4 Cell Count and HIV DNA Level Are Independent Predictors of Disease Progression after Primary HIV Type 1 Infection in Untreated Patients[J]. Clin Infect Dis, 2006, 42(5): 709-715.
- [4] Tsiara CG, Nikolopoulos GK, Bagos PG, et al. Impact of HIV type 1 DNA levels on spontaneous disease progression: a meta-analysis[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2012, 28(4): 366-373.
- [5] Véronique AF, Marie-Laure C, Stéphane B, et al. LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01)[J]. J Med Virol, 2009, 81(2): 217-223.
- [6] Luo W, Yang H, Rathbun K, et al. Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in dried blood spots by a duplex real-time PCR assay[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4): 1851-1857.
- [7] Zhang Q, Wang L, Jiang Y, et al. Early infant human immunodeficiency virus type 1 detection suitable for resource-limited settings with multiple circulating subtypes by use of nested three-monoplex DNA PCR and dried blood spots[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(2): 721-726.
- [8] 石向东, 赵广录, 王晓辉, 等. HIV基因芯片在艾滋病母婴传播早期诊断中的应用[J]. 现代预防医学, 2005, 32(6): 639-641.
- [9] Désiré N, Dehée A, Schneider V, et al. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(4): 1303-1310.
- [10] Morsica G, Tasca S, Biswas P, et al. Natural killer-cell cytotoxicity in HIV-positive and HIV-negative patients with and without severe course of hepatitis B virus infection[J]. Scand J Immunol, 2005, 62(3): 318-324.
- [11] Soulié C, Marcelin AG, Ghosn J, et al. HIV-1 X4/R5 co-receptor in viral reservoir during suppressive HAART[J]. AIDS, 2007, 21(21): 2243-2245.
- [12] Chun TW, Engel D, Berrey MM, et al. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4<sup>+</sup> T cells during primary HIV-1 infection[J]. P Natl Acad Sci USA, 1998, 95(15): 8869-8873.
- [13] Hasson H, Mantelli B, Biswas P, et al. Favorable outcome of ex-vivo purging of monocytes after the reintroduction of treatment after interruption in patients infected with multi-drug resistant HIV-1[J]. J Med Virol, 2007, 79(11): 1640-1649.
- [14] Gueudin M, Damond F, Braun J, et al. Differences in proviral DNA load between HIV-1 and HIV-2-infected patients[J]. AIDS, 2008, 22(2): 211-215.
- [15] Goujard C, Bonarek M, Meyer L, et al. CD4 Cell Count and HIV DNA Level Are Independent Predictors of Disease Progression after Primary HIV Type 1 Infection in Untreated Patients[J]. Clin Infect Dis, 2006, 42(5): 709-715.
- [16] Désiré N, Dehée A, Schneider V, et al. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(4): 1303-1310.
- [17] Pierson T, McArthur J, Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18(1): 665-708.
- [18] Eriksson S, Graf EH, Dahl V, et al. Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(2): 767-778.
- [19] 焦艳梅, 吴昊. HIV-1病毒储存库的特征及检测方法[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2009, 36(1): 68-70.

(收稿日期: 2016-09-22)

(本文编辑: 孙荣华)

韩根鹏, 熊勇, 高雨, 等. TaqMan荧光定量PCR检测HIV-1 DNA方法的建立及初步应用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2017, 11(2): 129-133.