

应用 DNA-RNA 斑点杂交法检测登革病毒核酸

陈火胜 郭辉玉

(中山医科大学微生物学与免疫学教研室, 广州)

罗进贤 胡晋新

(中山大学生物工程研究中心, 广州)

提 要

新近制备了大量纯化的 pEH920 DNA, 该质粒 DNA 插入了登革病毒 2 型核酸片段的互补 DNA。以 $(\alpha-^{32}\text{P})$ dCTP 按缺口转译法标记 pEH 920 DNA 作为探针, 以感染病毒的蚊细胞 C₆/36 培养上清作标本, 应用 DNA-RNA 斑点杂交法检测了登革病毒核酸。结果显示同位素标记探针 (pEH 920) 与登革病毒 2 型标本反应最强, 具有一定的型特异性。但与其它血清型登革病毒也呈一定交叉反应。初步探讨了探针的敏感性, 至少可检出 TCID₅₀ 625 的登革病毒 2 型核酸。

关键词: 登革病毒 缺口转译 斑点杂交

登革病毒感染的病原学诊断, 主要依赖于病毒分离和血清学鉴定。但病毒分离率较低, 且耗费时间, 而血清学鉴定往往受到标本中存在的交叉反应性抗黄病毒抗体的干扰。尽管已有报道从临床标本中可直接检测登革病毒抗原^[1], 但检出率较低, 除交叉反应的干扰外, 还要克服抗原性损失的问题, 需要一套保存标本的冷藏系统。

作为病毒病原学诊断的一种方法, 核酸杂交试验已成功地应用于多种病毒的核酸检测^[2]。近两年, 国外又报道运用核酸杂交试验可检测登革病毒 2 型 RNA, 包括用同位素 ³²P 标记的 cDNA 探针或合成的寡核苷酸探针检测感染蚊细胞上清中的病毒 RNA, 以及用生物素光标记的 cDNA 探针检测从感染蚊细胞内抽提或纯化的病毒 RNA^[3-6]。我们在不久前曾报道^[7], 从国外引进插入登革病毒 2 型核酸片段 cDNA 的重组质粒—pEH920, 并通过转化试验、克隆增殖及 DNA 分离提纯制备了大量 pEH 920 DNA。本文报道应用 pEH 920 DNA 检测登革病毒核酸的初步结果, 并讨论登革病毒核酸杂交试验的现状 & 核酸探针的应用潜能。

材料与amp;方法

1. 病毒与细胞: 本实验所用原型黄病毒毒株有 DEN-1 (Hawaii)、DEN-2 (New Guinea C)、DEN-3 (H87)、DEN-4 (H241)、JBE (A3)。另外有 3 株从 1986 年广州流行时病人血液分

本文于 1988 年 9 月 20 日收到。

高的登革病毒,经单克隆抗体间接免疫荧光法鉴定为登革2型,按病人住院号分别记为585、649、15446。病毒毒株都用白纹伊蚊细胞 $C_6/36$ 培养,病毒的传代、TCID₅₀ 滴定按本室常规。

2. **探针 DNA:** pEH 920 DNA 作为探针。该质粒插入了登革病毒2型 (New Guinea C 株) 核酸部分片段的互补 DNA, 插入 cDNA 长约 2.0kb, 插入片段在基因组的位置见图 1。该片段对应的核苷酸序列见参考文献 [9]。在做探针应用前,对引进质粒 pEH 920 DNA 进行了酶切分析,并绘制了该质粒的限制性酶切图谱,见图 2。

3. **标本处理:** 取 200 μ l 感染病毒的 $C_6/36$ 培养上清液,加 600 μ l 变性处理液 (分析纯甲醛和 20 \times SSC 等量混匀即成), 60 $^{\circ}$ C 水浴孵育 15 分钟。做敏感性试验时,用 PBS 稀释含病毒的上清液后,以同法处理。同样处理未标记的 pEH 920 DNA 作阳性对照标本,未感染病毒的 $C_6/36$ 培养上清作阴性对照标本。标本经变性处理后,用多头微量过滤收集器 (Schleicher & Schüll D-3354 Dassel W, Germany) 加样到硝酸纤维素滤膜 (S&S BA 85), 每孔加样 200 μ l, 红外灯及 80 $^{\circ}$ C 烘炉干燥,真空干燥器内存放。

4. **缺口翻译标记探针:** pEH 920 DNA 1 μ g, 经 Bam HI 酶解成线状 DNA, 95% 乙醇沉淀回收后,用 (α -³²P)dCTP (Amersham) 约 100 μ Ci 进行缺口翻译标记, dNTPs、DNA 聚合酶 I、DNase I 为 BRL 和 Boehringer Mannheim 公司产品。标记完成后,用 Sephadex G-25 离心柱 (DNA prepacked pre-span column, Boehringer Mannheim) 分离标记 DNA 和游离核苷酸,用 Packard 2000 CA 液闪分析仪检测标记效率。结果获得比放活性约 2×10^7 CPM/ μ g DNA。

5. **杂交条件:** 将 NC 滤膜用预杂交液 70 $^{\circ}$ C 水浴处理 2 小时,预杂交液含 90mmol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH7.4), 0.9mol/L NaCl, 1 \times Denhardt 及 100 μ g/ml 变性鲑鱼精子 DNA。将标记探针加热 100 $^{\circ}$ C 变性处理 5 分钟,加入 10ml 预杂交液中,补充右旋糖苷硫酸酯 10g, 装入有 NC 的塑料袋中,尽量除去气泡,封口。65 $^{\circ}$ C 水浴中杂交约 16 小时。次日用 2 \times SSPE, 1.0% SDS 于室温下洗涤 NC 2 次,每次 15 分钟;再以 0.2 \times SSPE, 0.1% SDS 洗 4 次,每次 15 分钟。然后,红外灯下烘干,包上薄膜,在暗室中放入感光夹内,两面上 X 光片, -70 $^{\circ}$ C 感光 24 小时,最后显影,定影观察。

结果与讨论

1. **探针的特异性:** pEH 920 探针与登革病毒 2 型标本反应最强,与正常蚊细胞 $C_6/36$ 上清及乙脑病毒 (JBE A₃) 标本未显示可见杂交反应。同时, pEH 920 探针与 DEN1、DEN3、DEN4 标本也呈不同程度的弱杂交反应 (图 3)。结果表明, pEH 920 探针为登革病毒特异性,且具有一定程度的 DEN-2 型特异性。但没有严格的型特异性。

2. **探针的敏感性:** 为确定 pEH 920 探针的敏感性,将 DEN-2 (New Guinea C) 标本先经 TCID₅₀ 滴定,再制成不同稀释度标本,同时,将未标记的 pEH 920 DNA 制成不同含量的标本。结果显示,当标本稀释到 TCID₅₀ 625 时,仍有可见杂交反应 (图 3 中 B₀)。

3. **探针与中国分离株杂交:** pEH 920 探针与从广州分离的 3 株 DEN-2 都呈杂交反应。结果提示,该探针可用于登革病毒 2 型中国分离株的核酸检测。

应用核酸杂交方法检测登革病毒 RNA,国外是近两年才开展的,国内则尚未见报



图1. 插入cDNA片段在登革病毒基因组中的位置
Fig 1. Alignment of Inserted Dengue cDNA with the Genome

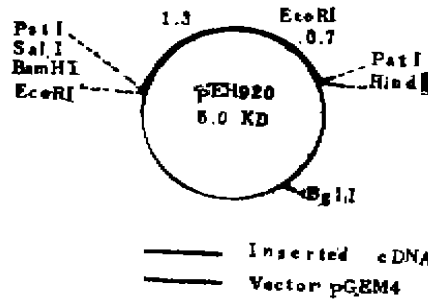


图2 pEH 920 的限制性酶切图谱
Fig 2. Restriction Digestion Map of pEH 920

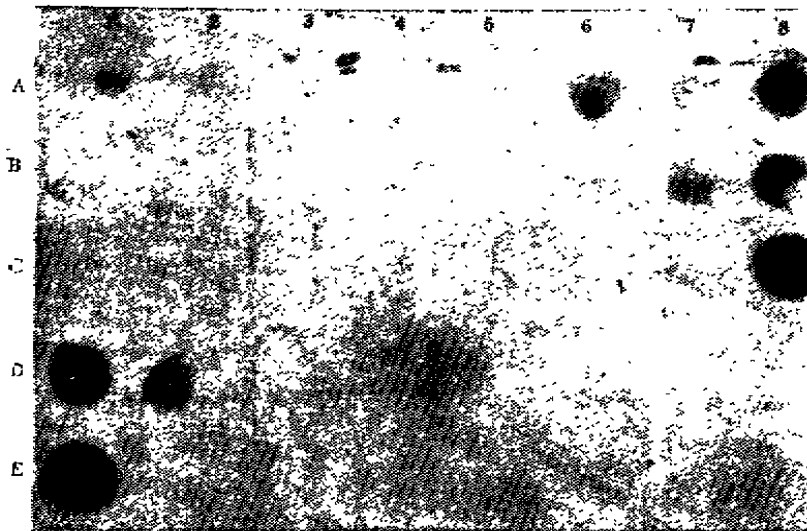


图3 cDNA-RNA 斑点杂交检测登革病毒核酸
Fig 3 Detection of Dengue Virus RNA by Dot-spot Hybridization
Note: A1-DEN1, A2-DEN3, A3-DEN4, A4-JBE A6, 7, 8-DEN2 (Chinese isolates)
B6, 7, 8 and C6, 7, 8-DEN2 (prototypes, different dilutions)
D1, 2 and E1-pEH 920 DNA (different dilutions)
B8-DEN2 (TCID₅₀=625)

道。核酸杂交试验作为病毒病原检测的一个突出优点就是标本中的核酸一经结合到滤膜后就相对稳定,有利于运送和检测。已报道的登革病毒核酸杂交试验中,都是以实验室感染病毒的蚊细胞 *C6/36* 培养物(上清或感染细胞)作为检测标本。最近,Olson 等^[7]报道实验室感染白纹伊蚊作检测标本,目前尚没有直接检测临床标本或流行现场蚊群标本的报道。但通过实验室摸索一套最适杂交条件,进一步提高探针的敏感性和特异性,核酸探针有可能应用于登革病毒感染的临床快速诊断和现场流行病学调查。

现有几种核酸探针可检测登革病毒,但其特性不同。Henchal 等^[4]报道的 cDNA 探针(pVV17)敏感性很高,可检出 11 个 p.f.u. 或 1pg 登革病毒 2 型 RNA,其特异性亦较高,在严格的杂交条件下,pVV17 呈现 DEN—2 血清型特异性;在不甚严格的杂交条件下,pVV17 探针呈登革病毒种特异性。我们所应用的 pEH 920 探针,就是由 pVV17 改建而成,其插入的 DEN—2 型核酸的 cDNA 片段相同,但载体为 pGEM4 质粒,该质粒包含 SP6 和 T₇ RNA 聚合酶的结合位点。因此,pEH 920 探针不仅可作为 cDNA 探针用,还可转录成单链 RNA 探针^[8]。从我们的实验结果看,pEH 920 探针的敏感性和特异性都不甚理想,这可能与实验条件有关,有待进一步探讨最合适的条件。

Khan 等^[6]报道了生物素光标记的登革病毒 2 型 cDNA 探针,其敏感性比同位素标记的 pVV17 低 100 倍左右。Olson 等报道^[7],核酸杂交试验与捕捉(Capture)ELISA 法相比,在检测蚊群体内登革病毒 2 型时,抗原检测较核酸检测更敏感。从探针种类看,检测 DEN—2 型 RNA,目前除了 cDNA、RNA 探针外,Kerschner 等^[6]还报道了寡核苷酸探针,其敏感性更低,检出登革病毒 2 型为 10^5 p.f.u.。但由不同的合成寡核苷酸序列所做的探针,具有不同的特异性,包括血清型、地域型特异性,已应用于登革病毒感染分子流行病学研究及登革病毒的地域性(Topotype)划分。

目前,正在研制非同位素标记的 cDNA 探针和寡核苷酸探针应用于临床标本检测和登革病毒血清型及地域型鉴定。

参 考 文 献

- (1) Monath TP et al., 1986, *J Gen Virol* 67: 639
- (2) Kulski JK et al., 1985, *Archives Virol* 83: 3
- (3) Henchal EA et al., 1987, *J Virol Methods* 15: 167
- (4) Henchal EA et al., 1986, *Arbovir Res Austr--Proc 4th Symposium* pp112
- (5) Khan AM et al., 1987, *J Virol Methods* 15: 121
- (6) Kerschner JH et al., 1986, *J Gen Virol* 67: 2645
- (7) Olson K et al., 1988, *J Clin Microbiol* 26: 579
- (8) 陈火胜等, 1988, *中华微生物学与免疫学杂志* 8: 160
- (9) Yaegashi T et al., 1986, *Gene* 46: 257

Detection of Dengue Virus RNA by DNA-RNA Dot-spot Hybridization

Chen Huo-sheng Guo Hui-yu

(*Department of Microbiology and Immunology, Sun Yat-sen
University of Medical Sciences, Guangzhou*)

Lo Jing-xen Hu Jin-xin

(*Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou*)

Recently we have prepared large amount of purified pEH 920 DNA which is inserted by complementary DNA of dengue virus 2 RNA. Using the [α - 32 P] dCTP labelled pEH 920 DNA as the probe, dengue virus RNA in the supernatants of infected C6/36 mosquito cells have been detected by DNA-RNA dot-spot hybridization. The results show that the probe strongly reacted with dengue 2 virus RNA though it also cross-hybridized with dengue 1, 3 and 4 virus RNA. The preliminary experiments show that the probe can at least detect 625 TCID₅₀ of dengue 2 virus RNA. The Chinese isolates of dengue 2 virus can also be detected by the probe.

Key words, Dengue virus Nick translation Dot-spot hybridization