

光敏生物素标记 cDNA 探针在肾综合征出血热 实验诊断中的初步应用

赵洪礼* 汪美先 姜绍谔
刘俊彬 安家泽 吕海 刘军连

(第四军医大学微生物学教研室 西安 710032)

提 要

本文用光敏生物素标记的 R3 cDNA 探针杂交检测了 HFRS 患者外周血淋巴细胞、血清和尿沉淀细胞中 HFRS 病毒核酸。结果 42 份淋巴细胞标本中 30 份为阳性, 48 份血清标本中有 24 份出现阳性杂交信号, 81 份尿沉淀细胞标本中 53 份为阳性, 表明将此光敏生物素标记的 cDNA 探针用于 HFRS 实验诊断和致病机理的研究是可行的。

关键词: 光敏生物素 cDNA 探针 核酸杂交 肾综合征出血热

自 1978 年南朝鲜学者李镐汪首次从黑线姬鼠肺组织中检出朝鲜出血热相关抗原以来^[1], 各国学者相继建立了多种检测肾综合征出血 (HFRS) 病毒血清学方法, 如免疫荧光法、ELISA, 血凝及血凝抑制实验等^[2,5]。这些方法促进了对 HFRS 的免疫学, 临床和流行病学的广泛研究。本文在成功地把光敏生物素标记到 R3 cDNA 探针的基础上, 将此探针用于 HFRS 的早期诊断, 现将方法和结果报告如下。

材 料 与 方 法

一、主要试剂 光敏生物素为军事医学科学院研制, 四氮唑蓝 (NBT), 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸 (BCIP) 为 Sigma 产品。

二、R₃ 重组质粒 cDNA 的大量提取 R₃ 重组质粒由中国预防医学科学院病毒研究所杭长寿惠赠^[1,11], 提取方法基本同冷泉港分子克隆手册。

三、光敏生物素标记探针 参照文献^[7]进行, 主要步骤为, 分别取等量 cDNA 和光敏生物素混匀置于冰水中, 用 200W 汞灯照射 15 分钟 (上述操作在暗室进行), 然后用仲丁醇洗涤两次, 去除游离的光敏生物素。加 1/2 体积的 7.5mol/L 醋酸氨和 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 放置 1 小时以上, 15000r/m 离心 15 分钟, 沉淀标记的 cDNA 探针, 真空干燥, 加 20μl TE (pH9.5) 溶解, -20℃ 保存备用。此光敏生物素标记的 cDNA 探针可检出 10pg 的靶核酸序列^[7]。

四、临床标本的采集和处理 取临床诊断为 HFRS 患者静脉血 2ml, 肝素抗凝, 用 Ficoll-泛影葡

本文于 1991 年 12 月 18 日收到, 1991 年元月 21 日修回

*: 现在沈阳军区后勤部军事医学研究所 110031

肢淋巴细胞分离液离心, 取淋巴细胞层, 用 0.01mol/L pH7.4 PBS 洗涤 3 次, 将细胞悬浮于 TNE 液中, 加 1% 的盐酸胍裂解液, 反复冻融 3 次, 用酚氯仿抽提 3 次, 2 倍乙醇沉淀, 得到 HFRS 病毒粗制核酸。同时取少量淋巴细胞涂片, IFAT 检测病毒抗原, 另取 0.5ml 患者血清加 10% SDS 50 μ l, 室温作用 10 分钟酚氯仿处理同上。取患者新鲜尿液 10ml, 1500r/m 离心 10 分钟, 弃上清, 加入 400 μ l TNE 液溶解沉淀细胞, 再加 10% SDS 40 μ l, 室温作用 10 分钟, 酚氯仿处理同上。同法处理阴性对照组尿细胞, 血清和淋巴细胞标本。

五、斑点杂交法^[6] 用甲醛法将病毒核酸变性, 即在 7% 的甲醛, 6 \times SSC 中 65 $^{\circ}$ C 加热 15 分钟, 立即冰浴 10 分钟。然后用 96 孔抽滤加样器把病毒核酸抽滤加到硝酸纤维膜上, 空气干燥, 80 $^{\circ}$ C 烤 2 小时, 固定核酸。制备好的杂交膜在 42—45 $^{\circ}$ C 水浴中预杂交 2—4 小时 (预杂交液组成为, 5 \times SSC, 5 \times Denharts 液, 0.1% SDS 和 100 μ g/ml 变性鲑鱼精 DNA)。然后在预杂交液中加入变性的标记好的探针, 42—45 $^{\circ}$ C 杂交 6 小时以上。依次用含 0.1% SDS 的 2 \times SSC 室温, 0.2 \times SSC 65 $^{\circ}$ C 各洗两遍, 干燥。

六、生物素标记探针用亲和素碱性磷酸酶系统检测^[7] 将洗好的杂交膜放入一新鲜的塑料袋内, 用 3% 的 BSA 65 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时, 去除 BSA, 加亲和素-碱性磷酸酶标记物, 室温反应 15 分钟, 用缓冲液 I (0.1mol/L Tris-HCl pH7.5, 0.15mol/L NaCl) 室温洗膜两次, 每次 15 分钟, 缓冲液 III (0.1mol/L Tris-HCl pH9.0, 0.1mol/L NaCl, 50mmol/L MgCl₂) 室温洗膜 10 分钟。然后放入底物缓冲液中 (1ml 缓冲液 III 含 4.4 μ l NBT, 3.3 μ l BCIP) 显色 40 分钟以上。观察结果, 拍照。

七、间接免疫荧光法检测外周血淋巴细胞病毒抗原 参照文献^[2]进行。

结 果

一、检测外周血淋巴细胞中 HFRS 病毒核酸 共检测 42 份标本, 30 份为阳性 (71.4%)。其中 1—7 病日 13 份标本 7 份为阳性 (53.8%), 8—14 病日的 18 份标本 15 份为阳性 (83.3%), 15—21 病日 8 份标本 6 份为阳性 (75%), 杂交结果见图版 IV 1。42 份标本的病程分布见表 1。15 份非出血热患者的外周血淋巴细胞核酸提取物杂交结果阴性。

二、检测血清中 HFRS 病毒核酸 共检测 48 份血清标本, 24 份为阳性 (50.0%)。其中 1—7 病日的 8 份标本 6 份为阳性 (75%), 8—14 病日的 21 份标本中 14 份为阳性 (66.7%), 22 病日后的 8 份标本有 1 份为阳性 (12.5%)。30 份非出血热患者血清 (15 份为正常人血清, 15 份为发热待查血清) 标本的杂交结果均为阴性。图版 IV 2 为血清标本的杂交结果。48 份标本的病程分布见表 1。

三、检测尿沉淀细胞中 HFRS 病毒核酸 在 81 份尿液标本中, 有 53 份出现阳性杂交信号 (65.4%), 其中 1—7 病日的 26 份标本有 21 份 (80.8%) 为阳性, 8—14 病日的 25 份标本 17 份为阳性 (68.0%), 22 病日后有的标本仍能查出病毒核酸。图版 IV 3 为部分尿液标本的杂交结果。81 份尿液标本与病程的关系见表 1。同法检测了 55 份非出血热患者的尿沉淀细胞标本 (其中 15 份为正常尿液, 20 份为发热待查, 20 份为泌尿系统感染), 结果均为阴性。

四、外周血淋巴细胞, 血清和尿沉淀细胞检出病毒核酸的相互关系, 对 5 例患者的尿细胞, 血清和外周血淋巴细胞进行了同步动态观察, 结果见表 2。

表1 淋巴细胞,血清,尿沉淀细胞,标本的病程分布
Tab 1 Distribution of Serum, Urine Cell and PBL in the Course of Disease

标 本	1-7天	8-14天	14-21天	22天	总计	对照
Speimen	1-7days	8-14days	14-21days	22days	Total	Control
淋巴细胞 PBL	7/13	15/18	6/8	2/3	30/42	0/16
血 清 Serum	6/8	14/21	3/11	1/8	24/48	0/30
尿中细胞 Urine	21/28	17/25	12/17	5/13	53/81	0/56

还: 阳性标本/标本总数。

Notes: Positive Sample/Total Sampel

表2 同步检测淋巴细胞,血清和尿沉淀细胞病毒核酸及淋巴细胞病毒抗原
Tab 2 Detection of Viral RNA and Antigen at the Same Time

患 者	病 日	尿 液	血 清	淋 巴 细 胞	病 毒 抗 原
No. of Patients	Day of illness	Urine	Serum	PBL	Ag-V
I	4	+	-	-	+
	6	+	+	+	+
	9	+	+	+	+
	11	-	+	+	-
II	4	+	+	-	+
	9	-	-	+	+
	11	-	+	+	-
III	14	+	-	-	+
	17	-	-	+	-
	19	-	-	-	-
IV	3	+	-	0	0
	19	-	+	+	+
V	11	+	-	0	0
	22	-	-	+	-

注: +, 阳性, -, 阴性, 0, 未作, Ag-V, 病毒抗原

Notes: +, Positive, -, Negative, 0, No test, Ag-V, Viral Antigen

讨 论

核酸杂交以其具有特异性和敏感性而广泛用于临床实验诊断, 流行病学调查和基础理论研究。但 HFRS 核酸探针迄今未用临床诊断, 本文应用我国 R₂₂ 株病毒 M 片段 cDNA R₁ 克隆为探针, 用光敏生物素标记, 杂交检测 HFRS 患者血清, 尿中细胞和外周血淋巴细胞标本, 获得初步结果。

一、用核酸杂交检测 HFRS 患者临床标本的可行性 血清学方法早已证明, HFRS

患者外周血淋巴细胞和尿中脱落细胞含有 HFRS 抗原,血清中含有 HFRS 特异性抗体,血细胞和尿细胞中抗原阳性率主要集中在10天以前,即在发热期和少尿期^[9,11]。这些结果尽管在临床早期诊断中起着积极作用,但它只为 HFRS 病毒的存在提供间接证据,还不能提供直接证据。应用特异的核酸杂交方法检测病毒核酸是证明病毒存在的简单方法,具有替代病毒分离的潜能。本文用光敏生物素标记的 R₁cDNA 为探针,杂交检测了 HFRS 患者的48份血清标本,42份淋巴细胞标本和81份尿细胞标本,分别检出24份(50.9%),32份(71.4%)和53份(65.4%)而阴性对照均为阴性。尿细胞,血清和淋巴细胞三者检出率没有显著性差异($P>0.05$),这表明可用检测尿液的方法代替血清和淋巴细胞的检测,而且检测尿液标本还具有取材方便及患者无损伤等优点。这些结果不仅为 HFRS 病毒的存在提供了直接证据,而且证明用核酸杂交的方法检测 HFRS 患者血尿标本中病毒核酸是可行的。

二、病程与 HFRS 病毒核酸阳性率的关系 从表1中可以看出,HFRS 病毒核酸检出率主要集中在病程的早期(1—14天),但各标本的分布情况不一,血清和尿液主要集中在1—7天,而淋巴细胞主要集中在8—14天。这一结果与病毒抗原分布有所不同,病毒抗原阳性率主要集中在10天前,这种差异的原因可能是由于发病早期,机体还没有产生特异性抗体,病毒大量复制,释放到血液中,造成病毒血症和病毒血症,而病毒感染细胞内的病毒含量较少,表现为血清和尿液标本检出率高而淋巴细胞检出率较低。随着特异性抗体的产生和增多,细胞外病毒被逐渐清除,血清中病毒含量下降,而淋巴细胞中的病毒可暂时逃避抗体的攻击生存下来,结果血清和尿细胞检出率下降,淋巴细胞检出率较高,维持时间较长。从表2的动态观察似乎也存在这种趋势。

参 考 文 献

- [1] Lee H.W. et al., 1978 *J Infect Dis*, 137: 298.
- [2] 李法尊等, 1987, 流行病学杂志, 4: 208.
- [3] 傅建林等, 1984, 公共卫生与疾病控制杂志, 3: 36.
- [4] 廖化新等, 1985, 中华传染病杂志, 3: 110.
- [5] Tsai T.F. et al, 1984, *J Infect Dis*, 159: 895.
- [6] Maniatis T. et al, 1982, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Laboratory Press, New York.
- [7] 赵洪礼, 1990, 等, 第四军医大学学报, 11(3): 398.
- [8] 张红毅等, 1989, 中华微生物学和免疫学杂志 9(6): 396.
- [9] 陈伯权等, 1986, 中华微生物和免疫学杂志 8: 29.
- [10] 朱志勇等, 1985, 中国公共卫生 4: 26.
- [11] 杭长寿等, 1988, 病毒学报 4: 208.

Experimental Diagnosis of HFRS with Photobiotin-Labelled cDNA Probe

Zhao Hong-li* Wang Mei-xian Jiang Shao-zhun
Liu Jun-bin An Jia-zhe Lu His Liu Jun-lian

(Department of Microbiology, The Fourth Military Medical University, Xi-an 710032)

Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) viral RNA in specimens of urine cells, serum and peripheral blood lymphocytes (PBL) from patients was detected by dot-blot hybridization with photobiotin-labelled R_3 cDNA probe. Positive results were obtained with 52 of 81 urine, 24 of 48 serum and 30 of 42 PBL specimens. Hybridization signal was not found in the specimens from those without HFRS of 55 urine, 30 sera and 15 PBL. The positive rate of the three kinds specimens were not significantly different ($P > 0.05$). Thus detection of viral RNA in urine cells with photobiotin-labelled probes can be used as a substitution of serum and PBL. It may also be used for diagnosis of HFRS as well as for epidemiological investigation.

Key words, Photobiotin cDNA Probe Hybridization HFRS

* Military Medical Institute of Shen Yang Military Area.