

斑点杂交生物素法检测流行性出血热病毒RNA

杨占秋 李治洪 杨平 刘薇茜 赵文先*

(湖北医学院病毒研究所, 武汉430071)

李德新 杭长寿

(中国预防医学科学院病毒研究所, 北京100052)

提 要

为寻找一种用于检测流行性出血热病毒的分子杂交方法, 以生物素-7-dATP 标记流行性出血热病毒(EHFV) R₂₂株 M 片段的 cDNA R₃ 克隆作探针, 与人源性的 EHFV H-114、H-435 株 RNA 基因组进行斑点杂交, 得到阳性结果, 可检出 5pg 的 cDNA 或 RNA。此探针与疱疹病毒 DNA 不出现杂交信号。以上结果说明这种标记探针具有 EHFV 特异性, 可以扩大应用范围, 结果还表明动物源性和人源性 EHFV 均具有共同的保守核苷酸序列。

关键词: 生物素 出血热病毒 RNA 基因组 杂交技术 检测

阐明流行性出血热(EHF)的发病机制, 制备有效的抗 EHF 疫苗以及 EHF 病毒的分子结构分析和 EHF 的基因诊断都要从分子水平对 EHF 病毒(EHFV)进行研究。而核酸分子杂交技术则是主要的研究手段, 经典的方法是用放射性同位素对 DNA 或 RNA 进行标记而制备核酸探针用于研究, 但是同位素半衰期短, 且对人体有害, 需要严格的操作技术和条件而使其应用、保存受到一定的限制。因此, 在建立 EHF 的分子杂交方法过程中, 我们根据 Leavy^[1]等的报道, 采用非放射性的生物素(biotin)标记系统对 EHFV 的 cDNA 进行标记, 获得成功, 现报道如下。

材 料 与 方 法

一、试剂 biotin-7-dATP、dUTP、dGTP、dCTP、λDNA、DNA 聚合酶、5-溴-4-氯-3-噁唑磷酸(BCIP)、四氮唑蓝(NBT)、生物素化 DNA、链亲和素碱性磷酸酶(SP-AP)、鲑鱼精子 DNA 均为 BRL 公司产品。RNA 酶、蛋白酶 K、EcoRI 购自北京华美生物工程公司。

二、质粒 DNA EHFV R₂₂ 株 cDNA R₃ 克隆由中国预防医学科学院病毒学研究所供提, 其限制性内切酶图谱见文献^[2]。

三、病毒 EHFV H-114、H-435 株系我们以前从 EHF 患者血浆和尿液中分离^[1], 经乳鼠脑内增殖后, 感染滴度为 10⁶ TCID₅₀/0.1ml。HSV 和 CMV 为本室保存病毒株, 均存放于 -75℃ 备用。

四、病毒 RNA 提取 将 EHFV 接种 Vero-E6 细胞单层, 37℃ 吸附 4 小时后, 加入 Eagle's 培养

本文于 1991 年 1 月 3 日收到, 1991 年 3 月 1 日修回。

* 课题负责人

液置37℃培养, 第10天收获感染细胞(同时取少量细胞涂片, IFA检查为阳性时收获), -75℃冻融3次, 超声波破碎3分钟, 4℃3000r/m离心去沉淀, 再在35000r/m离心沉淀1小时, 去上清, 用等体积饱和酚/氯仿常规提取RNA, 无水乙醇沉淀, 抽干溶于少量TE缓冲液中, -75℃存放备用。

五、质粒DNA提取 克隆质粒转入大肠杆菌MC1061, 扩增, 按文献^[4]提取DNA。以EcoRI水解后, 酚/氯仿提取, 无水乙醇沉淀后, 用于标记。

六、探针标记 用生物素-7-dATP缺口翻译标记核酸。取20μl样品cDNA, 5μl 0.2mmol/L pH7.8 dNTPs(溶于500mmol/L Tris-HCl、50mmol/L MgCl₂、100mmol/L 2-巯基乙醇、100μg/ml BSA), 2.5μl生物素-7-dATP, 5μl DNA聚合酶I和DNA聚合酶I/DNA酶I及双蒸水17.5μl, 15℃孵育90分钟, 加5μl 300mmol/L pH8.0 NaEDTA和1.25μl 15% SDS, 用冷无水乙醇沉淀, 即为标记探针, 浓度为100mg/ml, -20℃存放备用。

七、预杂交和杂交 将乙醇变性处理的待检标本(包括R₂cDNA、PUC18质粒、EHFV RNA、Vero-E₉细胞RNA、HSV和CMV DNA)25μl点于预处理好的硝酸纤维素膜上, 80℃干烤固定2小时后, 将膜放入20mmol/L Tris-HCl煮沸, 自然冷却后, 将膜转至聚乙烯杂交袋中, 加入预杂交溶液(含5%甲酰胺, 5×SSC、5×Denhardt's、25mmol/L磷酸钠及0.5mg/ml鲑鱼精子DNA), 100μl/cm², 42℃4小时后, 弃去预杂交溶液, 加入热变性探针和鲑鱼精子DNA, 同时加入杂交溶液(即预杂交溶液+5%硫酸葡聚糖), 42℃过夜, 用2×、0.2×、0.1×SSC/0.1% SDS各洗两次。

八、显色 经杂交后洗涤的硝酸纤维素膜用TNM(100mmol/L pH7.5 Tris-HCl、100mmol/L NaCl、50mmol/L MgCl₂)洗一次, 放入含3% BSA(100mmol/L pH7.5 Tris-HCl、150mmol/L NaCl配制)的杂交袋中, 65℃1小时, 取出后80℃干燥滤膜15分钟, 加入1.0μg/ml SA-AP室温10分钟(0.07ml/cm²), 用稀释的TN(100mmol/L pH7.5 Tris-HCl、150mmol/L NaCl)洗膜3次, 再用TNM洗一次, 加入NBT溶液(33μl NBT加到7.5ml TNM中), 混合后, 加入BCIP液, 放暗处30分钟观察结果。

九、IFA、ELISA法 按本室常规法^[5]。

结 果

一、探针的特异性

斑点杂交结果显示生物素-7-dATP标记的EHFV R₂株M片段R₁克隆片段探针可与R₂克隆cDNA和EHFV H-114、H-435株RNA发生阳性杂交反应, 呈现棕黑色斑块, 而此标记探针与PUC18质粒、正常Vero-E₉细胞RNA和HSV、CMV DNA不发生杂交反应, 无颜色出现, 见图1。

二、斑点杂交与IFA和ELISA法的比较

EHFV H-114、H-435株感染的Vero-E₉细胞, 经IFA检查, 出现强阳性荧光在其感染后第10天, 此时100%的感染细胞均显示特异性的荧光。而ELISA法测定病毒释放的高峰期(ELISA法检测感染细胞上清液中可溶性抗原OD值的最高值)也在病毒感染细胞后的第9~13天, 病毒抗原OD值为1.27~1.64。第7、10、13天收获的病毒, 杂交信号最强也在病毒感染细胞后第10天, 所提取的RNA在1:16稀释时, 仍能出现阳性杂交反应, 即病毒RNA含量为100pg。而就敏感性而言, 相当于标准DNA5pg所出现的

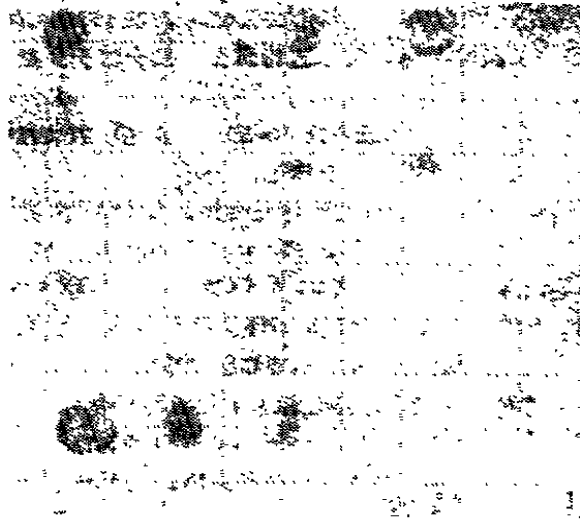


图1. EHFV R₂₂株R₃克隆与EHFVH-114、H-435株的杂交结果

(1,2为R₃克隆DNA, 3,4,5,7,8,9为EHFV H-114、H-435株感染细胞后第7,10,13天, 6为正常E₆细胞,10为PUC18质粒, 11为克隆DNA 1:16, 12为HSV DNA, 13为EHFV H-114 1:4, 14为CMV DNA,15为EHFV H-435 1:16,底排1,2,3,4,5为标准DNA, 含量依次为20,15,10,5,2pg)

Fig1. Dot hybridization of biotin-labeled probe of R₃ clone with EHFV H-114 and H-435 strains

(1,2,clone DNA; 3,4,5,7,8,9, EHFV H-114 and H-435 strains after infected 7,10,13 day; 6,E₆ cell RNA; 10,PUC 18 DNA; 11, clone DNA 1:16; 12,HSV DNA; 13,EHFV H-114 1:4; 14,CMV DNA; 15,EHFV H-435 1:16; Beneath 1,2,3,4,5,showed standard DNA containing 20,15,10,5,2pg.)

杂交信号,或者说斑点杂交可检出5 pg病毒RNA。

讨 论

目前,用于EHFV研究的基因探针多为放射性同位素标记探针,这种探针特异性强,敏感性高,但是保存期短,使其应用、特别是临床应用受到了一定的限制。为了对EHFV患者进行基因诊断,并克服放射性标记探针的某些缺点,我们应用生物素标记系统,对EHFV的基因片段进行标记获得成功,生物素-7-dATP标记的EHFV R₂₂株M片段的基因探针与R₂₂株的cDNA和待测的EHFV RNA发生阳性杂交反应。这说明生物素标记探针可用于EHFV的研究,这种探针还具有放射性标记探针所不及的优点,如操作简便、安全、不需严格的条件,探针可长期保存、应用广泛等。

本研究结果还指出来自于动物源性的EHFV R₂₂株M片段R₃克隆探针可与人源性的EHFV H-114、H-435株的基因组发生杂交反应,这进一步说明动物源性和人源性的EHFV有共同的保守核苷酸序列,R₂₂株的R₃克隆探针可作为EHFV的通用探针广泛用于EHFV的研究,如EHFV的基因诊断,不同毒株间的毒力比较等。

斑点杂交与 IFA 和 ELISA 法对 EHFV 的比较检测表明, 斑点杂交检测病毒 RNA 具有与 IFA 和 ELISA 法检测感染细胞内外病毒抗原同样的特异性, 病毒感染细胞后第 10 天杂交信号最强, RNA 含量约为 100pg, 而 IFA 和 ELISA 法检测病毒抗原也提示病毒增殖高峰期是在其感染细胞后第 9~13 天。陈等应用 ^{32}P 标记探针检测 11 株 EHFV, 有 3 株 IFA 和 ELISA 均显示弱阳性, 而斑点杂交显示强阳性, 其余 8 株病毒两种检测方法结果一致, 他认为斑点杂交法较 IFA 法敏感^[6]。我们的检测发现病毒 RNA 在 1:16 稀释时, 仍出现阳性杂交信号, 相当于 5 pg 标准 DNA 的杂交信号, 证实该法是敏感的。有关本法对 EHF 患者临床标本中病毒基因组的检测应用正在进行, 将另文报道。

参 考 文 献

- [1] Leavy JJ, et al. 1983, *Proc Nantl Acad Sci*, 80: 4045.
- [2] 杭长寿等, 1988, *病毒学报*, 4: 208.
- [3] 杨占秋等, 1989, *中华医学杂志*, 69: 621.
- [4] Sambrook J, et al., 1989, *Molecular Cloning*, 2ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 121-124.
- [5] 杨占秋等, 1989, *湖北医学院学报*, 10: 392.
- [6] 陈思毅等, 1989, *中华微生物学与免疫学杂志*, 9: 7.

Detection of Epidemic Hemorrhagic Fever Virus (Hantavirus) RNA Genome with Biotin-Labeled Probe by Dot Hybridization

Yang Zhan-qiu Li Zhi-hong Yang Ping
Liu Wei-qian Zhan Wen-xian

(Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan, 430071)

Dot hybridization assay was developed to detect epidemic hemorrhagic fever virus (EHFV) RNA genome using probe which biotin-7-dATP labeled R-3 cDNA clone of M fragment of EHFV R-22 strain. This probe was used to detect RNA genome of the human original EHFV H-114 and H-435 strains in cell cultures. The positive hybridization signal was obtained from cells infected EHFV H-114 and H-435 strains, 5 pg cDNA or RNA could be obtained. This probe do not react with DNA of cells infected herpes simplex virus and cytomegalovirus. It was shown that this probe was specific to EHFV, and also contain common nucleotide sequence in both human and animal original EHFV.

Key words: Biotin Hantavirus RNA genome Dot hybridization