

114-117

## 多聚酶链反应检测狂犬病毒的研究

金玉怀 金士香<sup>✓</sup> 王永祥 王玉坤 顾葆良

(河北医学院微生物学教研室, 石家庄 050017)

R373.9

### 提 要

应用一对狂犬病毒特异性引物, 经逆转录和循环的扩增, 从狂犬病毒感染的细胞及加热灭活的这种样本中, 都扩增出了与预期相符的带, 表明结合热灭活技术可用作狂犬病毒的安全, 敏感, 特异, 快速检测手段。

**关键词:** 多聚酶链反应; 狂犬病毒; 热灭活, 检测。

狂犬病毒属弹状病毒科, 含有一单负股 RNA 基因组。它所引起的狂犬病病死率高, 一旦发病几乎 100% 死亡, 是一种严重的传染性疾病。因此, 急需建立一种安全、快速、敏感、特异的狂犬病毒实验检测技术。以此为目的, 我们应用一对狂犬病毒特异性寡聚核苷酸引物, 对 PCR 结合热灭活技术, 用于狂犬病毒的实验检测进行了探索。现将我们在这方面的报道如下。

### 材 料 和 方 法

1. **细胞和病毒:** BHK-21 细胞来自北京军区军事医科所微生物室, 常规传代培养。狂犬病毒 Flury 株购于保定生化制药厂, BHK-21 细胞上传代培养, 作为实验样本。单纯疱疹病毒 II 型, (HSV-2)、水泡性口炎病毒 (VSV)、均来自于中国预防医学科学院病毒所, 按常规传代培养<sup>[1]</sup>, 用作病毒对照。

2. **寡聚核苷酸引物** 实验采用一对针对狂犬病毒 N 基因的引物<sup>[2]</sup>。引物 1 与基因组第 121-140 碱基互补, 序列为 5'GAAGCCTGAGATTATCGTGG3'。引物 2 与第 428-450 碱基的互补链互补, 序列为 5'CCATGCCTCCTGTCAGAGAGCCC3' 由中科院微生物所新技术公司协助合成。

3. **加热预灭活:** 将感染狂犬病毒 Flury 株的 BHK-21 细胞培养以 60℃、75℃、100℃、121℃ 作用不同时间进行灭活处理后, 接种 BHK-21 细胞或进行 PCR, 观察灭活结果及其对 PCR 检测的影响。

4. **核酸提取** 参照 Olive<sup>[3]</sup> 的方法, 用酚-氯仿法提取核酸: 取样本液 0.5ml、加入 50μl SDS, 等量的 Tris-盐酸缓冲液饱和酚 (pH7.6), 充分混悬后, 10000r/m 离心 10min, 取水相再用酚抽提一次; 将水相用等量氯仿抽提两次后, 离心, 吸取上清水相, 加入 2mol/L 乙酸钠 50μl、2.5 倍体积的无水乙醇, 放 -50℃ 2 个小时或过夜后, 离心沉淀, 将沉淀物用 75%、95% 乙醇洗涤两遍后, 真空抽干, 加入 40μl 三蒸水溶解, 马上应用或放 -20℃ 保存备用。

本文于 1992 年 6 月 23 日收到, 8 月 4 日修回。

5. **逆转录** 取上述提取的核酸 10 $\mu$ l 作模板, 加入 8 $\mu$ l 5 $\times$  缓冲液 (250mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 375mmol/L KCl, 5mmol/L DTT, 67mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 10 $\mu$ l 的 4 种核苷酸混合液 (各 1.25mmol/L), 40U 的 RNasin, 5U 的禽骨髓母细胞瘤病毒逆转录酶 (购于华美公司), 40pmol/L 的引物 1 以三蒸水补至总量为 40 $\mu$ l, 38 $^{\circ}$ C 逆转录 2 小时后即为 cDNA。

6. **多聚酶链反应** 10 $\mu$ l 的 cDNA 加 10 $\times$  PCR 缓冲液 10 $\mu$ l (Tris-HCl 100mmol/L, pH8.3, 500mmol/L KCl, 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 10 $\mu$ l 的 4 种核苷酸混合液 (各 1.25mmol/L) 2.5U 的 Taq 酶, 引物 1 和引物 2 各 40pmol/L, 蒸馏水补总量为 100 $\mu$ l 按 94 $^{\circ}$ C 变性, 52 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸各 50 秒进行 PCR, 共进行 40 个循环。

7. **电泳** 15 $\mu$ l 的 PCR 扩增产物, 加等量溴酚蓝-甘油样本液, 于 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 30v、6 小时后, 溴化乙啶染色 15 分钟, 紫外灯下观察结果, 以入噬菌体 DNA (Hind III 酶切) 为参比 Marker。

## 结果与讨论

1. 狂犬病毒直接扩增结果: 从狂犬病毒 Flury 株感染的 BHK-21 细胞提取的核酸, 经逆转录 PCR 扩增, 琼脂糖电泳后, 可见一明显 DNA 带, 与参比 Marker 对比, 扩增片段长度/大小 (329bp) 与预期相符, 同时检测的 BHK-21 细胞, HSV 和 VSV 对照均呈阴性反应 (图 1)。

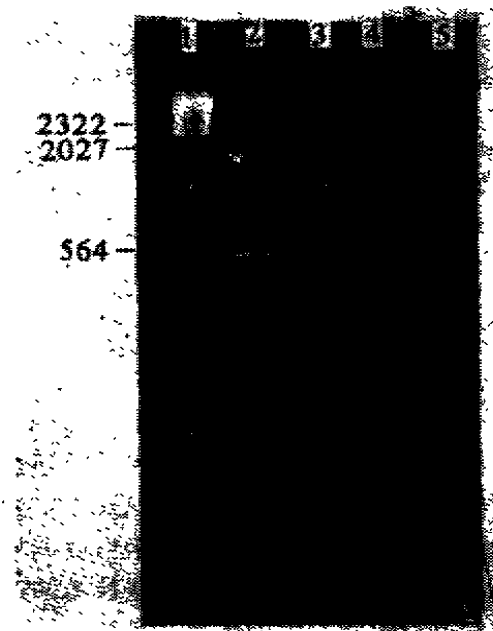


图 1. 狂犬病毒 PCR 扩增结果

1. Marker
2. 狂犬病毒
3. HSV-2
4. VSV
5. BHK-21 细胞

Fig 1. Electrophoresis of DNA fragment amplified by PCR from rabies virus Flury strain in BHK-21 cell culture. Lane 1, marker. Lane 2, rabies virus. Lane 3, HSV-2. Lane 4, VSV. Lane 5, uninfected BHK-21 cell.

2. 加热灭活样本的扩增结果: 将病毒样本首先经 60 $^{\circ}$ C 30min、75 $^{\circ}$ C 30min、100 $^{\circ}$ C 2min、5min、10min、20min、30min 水浴或 121 $^{\circ}$ C 高压蒸汽 20min 处理后, 再进行核酸提取, 逆转录和 PCR 扩增, 同时将处理后的样本接种 BHK-21 细胞, 观察灭活情况。电泳结果可见: 经 60 $^{\circ}$ C 30min、75 $^{\circ}$ C 30min、100 $^{\circ}$ C 2min 和 100 $^{\circ}$ C 5min 水浴加热

处理的样本，扩增出了同样的 DNA 带，其它各组无 DNA 带可见（图 2）。各处理后样本，经接种 BHK-21 细胞培养后再进行检测，均未发现有狂犬病毒生长。

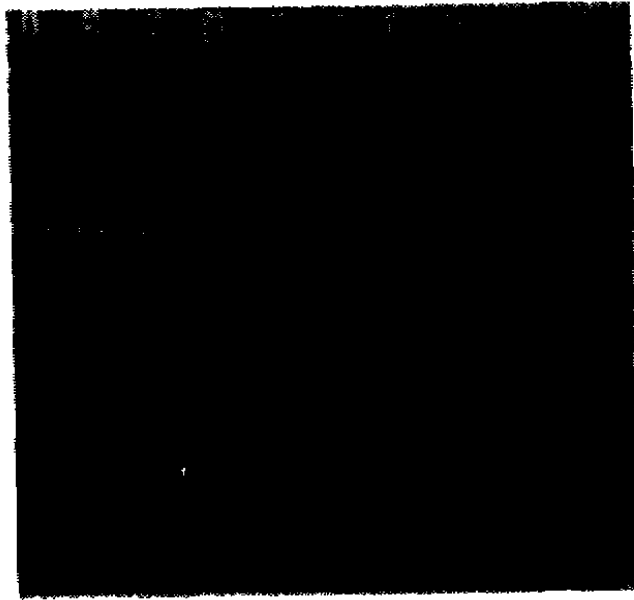


图 2. 加热灭活的狂犬病毒样本 PCR 扩增结果:

1. 未经加热处理的狂犬病毒

2—9 加热 60℃ 30 分钟, 75℃ 30 分钟, 100℃ 2 分钟, 5 分钟, 10 分钟, 20 分钟, 30 分钟, 121℃ 20 分钟灭活狂犬病毒扩增结果。

10. Marker (λ DNA Hind III 酶切)

Fig 2. Electrophoresis of DNA fragments amplified by PCR from rabies virus and heat-inactivated rabies virus. Lane 1, rabies virus. Lane 2—9 rabies virus inactivated by heating at 60℃ for 30 min, 75℃ for 30 min 100℃ for 2, 5, 10, 20, 30 min and 121℃ for 20 min. Lane 10, marker (λ DNA Hind III 酶切)

狂犬病是一种严重的传染病，近年来在我国发病率上升，所致死亡人数在我国 25 种法定上报的急性传染病中已跃居第一，二位<sup>[1]</sup>。而在狂犬病的诊断上，尽管已建立了内基氏小体检测等多种方法，但由于存在着费时，敏感性低需要一定设备和试剂供应困难等不足之处，尤其是该病毒为烈性病毒，实验安全问题难以解决，限制了这些技术的推广应用，使得本病的实验诊断工作，不能满足临床和流行病学研究的需要。多聚酶链反应，是一种在体外对特异性基因序列进行高效扩增的方法，1985 年 Saiki<sup>[5]</sup> 等建立本法后，迅速推广应用到多种病毒的检测上。与以往的病毒检测技术相比，该技术具有敏感性高，特异性好，快速，简便等优点。参照 Ermine 的方法<sup>[2]</sup>，我们合成了一对狂犬病毒特异性引物，进行了狂犬病毒的多聚酶链反应检测的方法研究，结果发现：（1）从狂犬病毒感染的 BHK-21 细胞及适当加热灭活的这种样本中，都扩增出了与预期相符的

DNA 片段。表明该技术可用于狂犬病毒的检测, 且经过适当加热处理灭活病毒, 不影响病毒核酸的检出, 这为解决这种高度危险的病毒的检测安全问题, 提供了可能; (2) 扩增产物泳道内, 无非特异性扩增带可见, 同时扩增的 BHK-21 细胞对照, 同属的 VSV 和 DNA 型的 HSV 病毒对照, 都无 DNA 带可见, 初步表明用此对引物进行扩增有较好的特异性; (3) 用该法做检测, 2 天即可得出结果。这些结果都提示, 该法有可能成为狂犬病毒的安全、敏感、特异、快速的检测技术, 它的推广应用将促进狂犬病防治和研究工作的展开。

### 参 考 文 献

- (1) 中国医学科学院流行病学研究所编, 1978, 常见病毒病实验技术, 第一版, 科学出版社,
- (2) Ermine A. et al., 1990, *Molecular Cellular probes*, 4, 189-191.
- (3) Olive D. M. et al., 1990, *Journal of General Virology*, 71: 2141-2147.
- (4) 褚菊仁, 1989, 中国人兽共患病杂志 5(6) 37-39.
- (5) Saiki R. K. et al., 1985, *Science* 230: 1350-1354.

## Studies on PCR for Safety-detection of Rabies Virus in Samples

Jin Yuhuai Jin Shixiang Wang Yongxiang Wang Yukun Gu Baoliang

(Department of Microbiology, Hebei Medical College, Shijiazhuang, 050017)

Polymerase Chain Reaction (PCR) combined with Heat-inactivation is adopted to detect of rabies virus. Using a pair of primers specific for rabies virus, reverse transcription and PCR were performed. The amplified products were visualized after electrophoresis on 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and exposed to ultraviolet light. It is shown that: (1) A DNA fragment corresponding in size to the distance between the two primers (329 bp) could be amplified from the nucleic acid extracted from the rabies virus sample (BHK-21 cell infected with Rabies virus Flury strain) but not from controls (BHK-21 cell, HSV, VSV); (2) The same DNA band could be amplified from the rabies virus samples inactivated by heating (60°C 30 min, 75°C 30 min, 100°C 2 min, 100°C 5 min). According to this result, it is suggested that PCR combined with heat-inactivation techniques could be used as a safe, rapid, specific and sensitive method for detection of rabies virus.

Key words, PCR Rabies virus Heat-inactivation Detection