

1837(5)
R373.32

PCR 和生物素探针对 HFRSV 的检测和分型的探讨

唐家琪 李越希 李先富 潘秀珍 郭恒彬 张云

(南京军区军事医学研究所, 南京 210002)

A 摘要 分析比较肾综合征出血热病毒(HFRSV)76/118株和R₂₂株的核苷酸序列,根据引物设计原则及检测分型的目的,设计并合成了3对引物。1对引物取于两毒株间的高同源区段,作为共同引物和外引物,另两对引物取于两毒株间的低同源区段,分别作为野鼠型引物、家鼠型引物和内引物。建立了DNA聚合酶链反应(PCR)和Nest PCR方法,并用Nest PCR合成了两种型特异的生物素探针。PCR检测76/118、A₀、陈、R₂、R₂₂5个毒株,用外引物时均扩增出1条约300bp的条带;用内引物的野鼠型引物时,除R₂₂株之外,其余4株均扩增出1条约70bp的条带。斑点杂交试验证实了PCR检测分型的准确性。Nest PCR和生物素探针斑点杂交试验可以测出1—10pg的目的cDNA。

关键词 肾综合征出血热, DNA聚合酶链反应, 生物素探针斑点杂交, 肾综合征出血热病毒分型

目前,将流行于全球不同区域的HFRSV分为姬鼠型、大鼠型、岸野鼠型、田鼠型、巴尔干姬鼠型、小鼠型6个血清型^[1]。我国的HFRSV称为流行性出血热病毒(EHFV),分为野鼠型、家鼠型两个血清型。其野鼠型代表毒株有A₀株等,与朝鲜出血热代表毒株76/118株等同属姬鼠型;其家鼠型代表毒株有R₂₂株等,与日本SR-11株同属大鼠型。HFRSV的正确分型,对流行病学调查、疫苗研制、临床治疗均有重要意义。由于二者抗原关系密切,交叉反应严重,用免疫学方法分型很困难^[2,3,4]。许多学者对单克隆抗体分型寄予希望,应用单克隆抗体的RIP和Western-blot可以证实两型HFRSV G₁和NP蛋白分子量存在差异^[5]。由于抗原漂移及毒株间基因重组造成的表型差异,有些分型结果可能含糊不清。HFRSV为负链RNA病毒,由L、M、S3个基因片段组成^[6],76/118、SR-11、R₂₂等毒株的M、S片段序列已研究清楚^[7,8]。本文在详细分析、比较上述3株HFRSV基因编码特点和核苷酸序列的基础上,设计、合成了共同引物、型特异引物,用RNA逆转录及DNA聚合酶链反应(PCR)对HFRSV进行检测及分型。

材料和方法

1 引物的设计与合成 用计算机基因组程序处理分析76/118、R₂₂、SR-11 3个代表株的核苷酸序列。根据引物设计原则和检测分型的目的,一对共同引物(外引物)选于M片段,其左侧引物同源于76/118株cDNA3239—3256段,为5'-GTA AAT GGG ATT TCT GAG-3',其右侧引物互补于76/118株cDNA3536—3522段,为5'-TGT TAG ATA TTA GAG-3',扩增段全长为298bp。型特异引物(内引物)选于M片段扩增序列当中,其左侧引物同源于3451—3466段,右侧引物互补于3521—3508段,扩增片段全长为71bp。其中野鼠型引物根据76/118株序列设计,左侧引物为5'-GCT AAA TIC TGT GAC T-3',右侧引物为5'-TAT ACT GGA ATA TA-3';家鼠型引物根据R₂₂株序列设计,左侧引物为5'-AAT CCT ACC CAT TAA T-3',右侧引物为5'-CCA GGT-TAA GTT

• 本文于1993年3月15日收到,6月28日修回

GT-3'。上述引物用 Bio-system 381A 合成仪合成。

2 毒株和菌株 HFRSV 的 A₈ 株、R₂₂ 株系中国预防医学科学院病毒所杭长寿研究员惠赠。上述毒株均在 Vero-E₆ 细胞中增殖。其中的 A₈ 株、R₂₂ 株经克隆化纯化后分别传 25 代和 10 代。含 76/118 株 M 片段 cDNA 的质粒 PBR322 (转化在 HB₁₀₁ 细菌内) 系军事医学科学院八所夏东翔博士惠赠, 含 R₂₂ 株 M 片段 cDNA 的质粒 PUC19 (转化在 JM103 细菌内) 系杭长寿研究员惠赠。

3 质粒的扩增和提取 取菌种斜面保存物少许接种 LB 液体培养基, 37℃ 振荡培养过夜。将活化菌按 1% 接种量转种于三角烧瓶中培养, 每瓶含 LB 培养基 200ml (含氨苄青霉素 100μg/ml), 37℃ 继续振荡培养 14h。收集培养液, 离心取湿菌, 用酚变性法抽提质粒, 再超速离心分离出超螺旋质粒, -20℃ 保存。

4 目的 cDNA 片段的酶切和回收 根据计算机检索, 在 M 片段 cDNA 上选择合适的酶切位点。用 PstI 酶将插在质粒 PBR322 上的 76/118 株 M 片段 cDNA 切下, 回收后再用 EcoRV 酶切, 回收约 1.0kb 的 cDNA 片段。用 BamHI 和 EcoRI 双酶切, 将插在质粒 PUC19 上的 R₂₂ 株 M 片段末端约 600bp 的 cDNA 切下, 用低熔点琼脂糖分别回收上述两个目的片段 cDNA, 溶于 TE (pH8.0) 液中, -20℃ 保存, 作为探讨 PCR 条件和制备生物素探针的模板。

5 HFRSV RNA 的提取 取组织培养标本加等体积 40% 的 PEG6000, 4℃ 作用 1h, 10000r/min 离心 20min, 弃上清。沉淀用异硫氰酸胍/酚/氯仿 (AGPC) 处理, 即每份标本溶于 DS 溶液 (4.0mmol/L 异硫氰酸胍 0.5% Sarkosyl, 25mmol/L 柠檬酸钠 pH7.4, 0.1mol/L 2-巯基乙醇) 50μl 中再依次加入 2mol/L NaAC (pH4.0) 100μl, 酚 (水平平衡) 50μl, 氯仿/异戊醇 (49:1) 100μl。倒置轻摇混匀, 振荡 10s, 冰浴 15min, 4℃ 10000r/min 离心 15min, 沉淀用 75% 冷乙醇洗涤, 真空抽干, 最后用 DEPC (FlukaChemie, AG) 处理过的 H₂O 40μl 溶解 RNA, 20℃ 保存供逆转录用, 操作用器械和试剂均需用 DEPC 处理的 H₂O 荡洗。

6 逆转录反应和 PCR 扩增 所用试剂、微量离心管、热循环扩增仪为 PE 公司产品。首先向 0.5ml 微量离心管内依次加入 25mmol/L MgCl₂ 4μl, 10×Buffer 2μl, 灭菌去离子水 1μl, 10mmol/L dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2μl, RNase Inhibitor 1μl (1u), AMV 逆转录酶 1μl (2.5u), 0.15μmol/L 左侧引物 1μl, 模板 2μl, 总量为 20μl。混匀后将离心管放热循环仪内 39℃ 逆转录 25min, 再作 99℃ 5min, 5℃ 5min 处理。向原离心管加上述 MgCl₂ 4μl, Buffer 8μl, H₂O 63.5μl, 左、右侧引物各 2μl, TaqDNA 聚合酶 0.5μl (2.5u), 总量为 100μl。混匀后加灭菌石蜡油 40μl 放热循环仪内进行扩增。通过比较不同变性条件、复性条件、延伸条件的扩增结果, 确立本系统的扩增参数。

7 扩增结果的检测 取扩增产物 6μl, 与溴酚兰电泳上样液 2μl 混匀后作聚丙烯酰胺凝胶电泳。胶浓度为 12%, 电泳缓冲液为 1×TBE。100V, 电泳 2h 后取下胶块, 用 EB 染色 10min, 在紫外灯下观察扩增条带的有无, 并根据扩增条带与标准参比 DNA 的位置关系估算其 bp 数。

8 生物素探针的制备 以酶切回收的 76/118 株和 R₂₂ 株 M 片段部分 cDNA 为模板, 以 Bio-11-dUTP (Sigma) 取代 dTTP, 按上述 PCR 方法和本系统确定的参数进行扩增, 分别制备家鼠型和野鼠型生物素探针。

9 斑点杂交试验

9.1 取扩增产物 3μl 于微量离心管, 加 1N NaOH 160μl, 0.5mol/L EDTA 20μl, 加水补至 400μl, 混匀使 DNA 变性。

9.2 硝基纤维素膜 (Schleicher and Schuell) 用 2×SSC 液浸湿, 用点样皿在负压抽滤条件下将扩增产物点于膜上, 80℃ 烘烤 2h。

9.3 将膜装于杂交袋中, 按 100μl/cm² 量加入预杂交液 (50% 甲酰胺, 5×SSC, 5×Denhardt's 液, 0.5mg/ml 新鲜切变的鲑鱼精子 DNA, 50mmol/L 磷酸钠缓冲液 pH5.0, 5mmol/L EDTA), 封口, 42℃ 预杂交 2h。

9.4 倾去预杂交液, 加入杂交液 (40ng/ml 新鲜变性的生物素标记 DNA 探针, 45% 甲酰胺, 5×SSC, 1×Denhardt's 液, 20mmol/L 磷酸盐 pH6.5, 0.2mg/ml 新鲜切变的鲑鱼精子 DNA), 分别于 38℃、40℃、42℃ 杂交 24h。

9.5 倾去杂交液, 用洗液 (0.1×SSC, 0.1% SDS) 室温振荡洗涤 15min×3, 65℃ 洗涤 20min×3, 每次用洗液不少于 250ml。

9.6 将膜装入另一杂交袋,加3%BSA 4.0ml, 42℃封闭1h。

9.7 倒出封闭液,按生物素试剂盒(军事医学科学院二所)使用说明先后加入亲合素-硷性磷酸酶,洗涤、显色、终止反应。

结 果

1 PCR 最佳条件的探讨

以回收的76/118株M片段部分cDNA为模板,进行PCR,共循环40次。变性条件为94℃ 1min,延伸条件为70℃ 1min,比较不同复性条件的扩增结果可见:复性温度高于38℃时,电泳未能见条带;复性温度为38℃时,电泳可见一条约300bp的条带(用外引物)或约70bp的条带(用内引物);复性温度低于38℃时,电泳可见两条以上的条带。

在变性条件为94℃ 1min,复性条件为38℃ 1min的条件下,比较64℃、68℃、70℃、72℃延伸1min的扩增结果可见:70℃延伸时电泳条带最浓、最整齐。

复性条件为38℃ 1min,延伸条件为70℃ 1min,变性温度低于94℃时,电泳未能见到条带。

因此,本系统的扩增参数确定为94℃ 1min, 38℃ 1min, 70℃ 1min,共循环40次,最后一个循环70℃延伸5min。

2 RNA 逆转录条件的探讨

HFRSV感染的组织培养物经PEG浓缩后分别用AGPC法及NP-40/PK法提取RNA并以其为逆转录模板,用上述确定的扩增参数作PCR。电泳结果显示AGPC法产生的电泳条带清晰度,重复性优于NP-40/PK法。

以AGPC法提取的RNA为逆转录模板,用同一批号AMV逆转录酶分别作37℃ 60min和39℃ 25min逆转录,然后进行PCR,电泳结果表明39℃ 25min法区带较浓。

因此,确定本系统标本处理用AGPC法,逆转录条件为39℃ 25min。

3 杂交条件的探讨

将PCR产物点于膜上,用两型特异生物素探针在甲酰胺浓度为45%的杂交液中,分别于38℃、40℃、42℃杂交24h。结果显示:36℃杂交的非特异性显色深,40℃和42℃杂交的特异性显色浅,38℃杂交的特异性显色最好。故本系统的杂交条件确定为杂交液含45%甲酰胺,38℃杂交24h。

4 敏感性

测定酶切回收的76/118株M片段部分cDNA的含量,然后10倍系列稀释,分别作为模板,用确定的参数进行Nest PCR。电泳结果表明,当模板含量 ≥ 10 pg时,均可见到扩增产生的条带。

用上述模板点膜,与生物素标记探针进行杂交。模板含量 ≥ 1 pg的斑点均可见到杂交信号。

5 PCR 对 HFRSV 代表株的检测和分型

分别用AGPC法从76/118株、A₉株、陈株、R₂株、R₂₂株感染物中提取RNA,以提取的RNA为模板进行逆转录,然后用外引物进行PCR。再从每株PCR产物中取2份5 μ l作模板,分别与两种内引物进行第二次PCR。比较每个毒株3份PCR产物的电泳结果可见:用外引物进

行 PCR 时, HFRSV 的 5 个代表株均可扩增出 1 条约 300bp 的条带; 用野鼠型内引物进行 Nest PCR 时, 除 R₂₂ 株外, 其余 4 株均扩增出 1 条约 70bp 的条带; 用家鼠型内外物进行 Nest PCR 时, 仅有 R₂₂ 株产生 1 条约 70bp 的条带(图 1)。

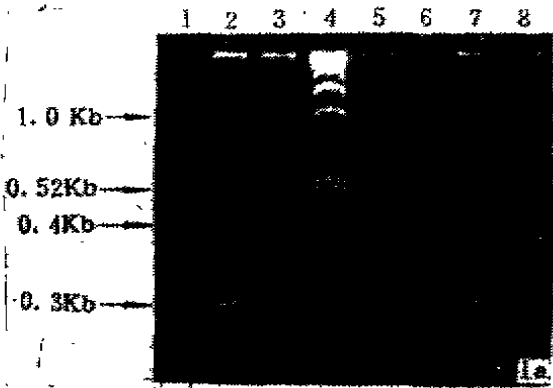


图 1a 用外引物进行 PCR 时, 所测的 5 个毒株均产生一条约 300bp 的条带,

1. E. coli HB101, 2. 76/118 株, 3. A₉ 株, 4. GIBCO BIL DNA 标准, 5. 陈株, 6. R₂ 株, 7. R₂₂ 株, 8. vero 细胞培养液

Fig. 1a Electrophoresis analysis on PCR products amplified with the outer primer set. 2, 3, 5, 6, 7 show a 300bp DNA lane.

1. E. coli HB101, 2. 76/118 strain, 3. A₉ strain, 4. GIBCO BIL DNA markers, 5. chen strain, 6. control of vero cell culture media.

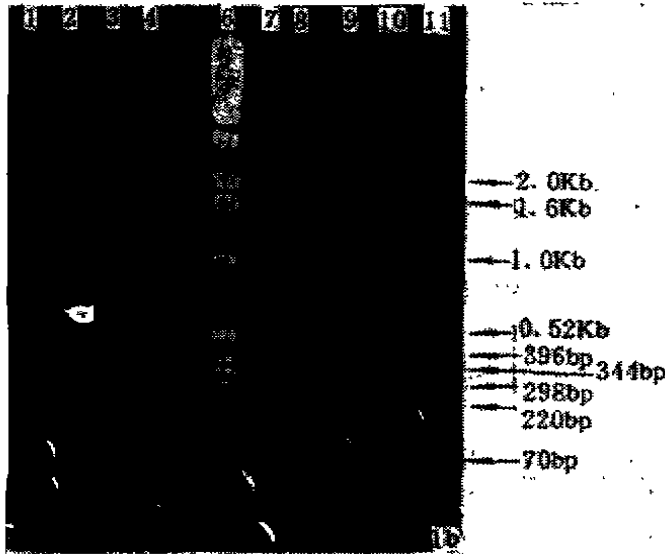


图 1b 用内引物进行 PCR 的结果, 1~5 用家鼠型内引物扩增时仅 5(R₂₂) 显示一条约 70bp 的条带; 用野鼠型内引物扩增时, 7(76/118), 8(A₉), 9(陈), 10(R₂) 均显示一条约 70bp 的条带, 而 11(R₂₂) 未显示条带。6 为 GIBCO BIL DNA 标准

Fig. 1b Electrophoresis analysis on PCR products amplified with the inner primer set of home-rat type EHFV (1~5), and of field-rat type EHFV (7~11). With home-rat type primer set, only 5 (R₂₂ strain) shows a 70bp DNA lane; with field-rat type primer set 7(76/118 strain), 8(A₉ strain), 9(Chen strain), 10 (R₂ strain) all have a 70bp DNA lane.

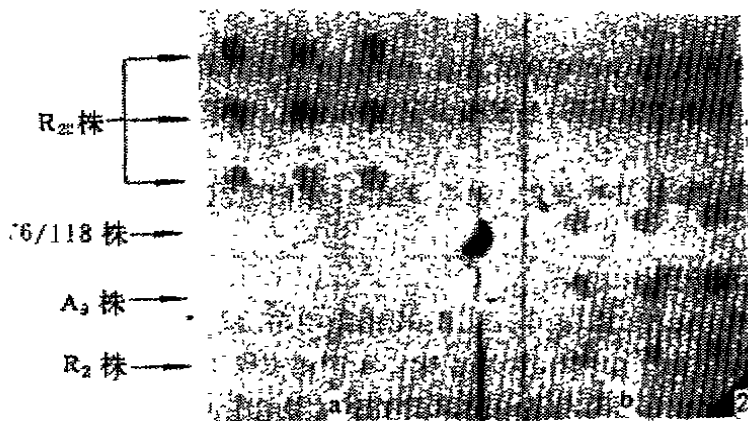


图 2 生物素探针斑点杂交结果
a. 家鼠型探针 b. 野鼠型探针

Fig. 2 Dot hybridization of four strains of EHFV with biotinylated DNA probes

a. home-rat type probe
b. field-rat type probe

用 5 个毒株第 2 次 PCR 产物点膜两张,分别与两型特异的生物素探针杂交,76/118 株、A₉ 株、陈株、R₂₂ 株与野鼠型探针杂交阳性,R₂₂ 株与家鼠型探针杂交阳性(图 2)。

上述结果表明,76/118 株、A₉ 株、陈株、R₂ 株可能为一种型别的毒株,R₂₂ 株可能为另一种型别的毒株。

讨 论

基因分型的关键是型特异引物的设计。型特异引物应满足以下条件:1. 同型毒株间,相应区段的同源性应 >75%,3' 端与同型各株相应位点均应同源,以确保对同型毒株均可通过扩增而检测;2. 异型毒株间相应区段的同源性应 <30%,3' 端与异型各株相应位点均不同源,以确保对异型毒株不能扩增;3. 长度为 20bp 左右,3' 与 5' 端不互补,G+C 比例约占 50%。通过计算机检索,76/118 株、R₂₂ 株、SR-11 株的 S 片段和 M 片段编码区不存在符合上述条件的区段。M 片段非编码区 3' 末端为汉坦病毒属各型共同的保守序列,可反映该属的共性;5' 末端为各型相对保守序列,可反映型特异特征,本研究在此段选择到型特异引物的序列。其左、右侧引物野鼠型与家鼠型同源性分别为 5/16(31%)和 3/14(22%),家鼠型间(R₂₂ 株与 SR-11 株)同源性分别为 12/16(75%)和 13/14(93%)。

影响 PCR 结果的因素很多。就扩增参数而言,最重要是确定适当的复性温度。经验表明,复性温度偏低,会发生非目的 DNA 的扩增;复性温度高,会影响模板和引物的结合。本系统最初在 40—55℃ 范围选择复性温度,一直没能扩增出目的 DNA;只有将复性温度设定为 38℃ 时,才扩增出一条清晰的条带。这个温度比一般文献报道低得多,主要因为引物设计得较短,A+T 比例较高所致。

用两对型特异引物对 5 株 HFRSV 分型,其中 76/118 株、A₉ 株、陈株、R₂ 株为一种型别,R₂₂ 株为另一种型别。李德新等曾根据 G₂、NP 蛋白分子量差异将 R₂ 株与 R₂₂ 分为同型^[5]。这两个毒株虽然均自家鼠中分离,但 R₂ 株抗原性更接近于野鼠型。本研究分型的毒株数还太少,用这两对引物是否可将我国流行的 HFRSV 完全分型,尚需对更多毒株进行研究。

由于 HFRSV RNA 的 M 片段 3' 端属于高度保守区,根据该段序列设计的共同引物可以检测汉坦病毒属的所有毒株^[9]。这样就可以通过外引物 PCR 对 HFRSV 进行检测,再用内引物作 Nest PCR,对被检毒株进行分型。PCR 的敏感性很高,Nest PCR 进一步提高了 PCR 的敏感性。这将为检测微小媒介昆虫感染、携带 HFRSV 提供手段,有关研究正在进行。

致谢 中国预防医学科学院病毒所抗长寿研究员、李德新大夫为本研究提供基因序列资料及毒种,致以衷心感谢。

参 考 文 献

- 1 P W Lee, Amyx H L, Gajdosck D C, et al. New haemorrhagic fever with renal syndrome-related virus in indigenous wild rodents in United States. *Lanect*, 1982, ii, 1405~1413
- 2 唐家琪,陈竞芳,李先富,等. HFRSV 单克隆抗体的制备及应用. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1987, 7(4), 237~239
- 3 唐家琪,陈竞芳,李先富,等. RPHI 检测 HFRSV 总抗体. *病毒学杂志*, 1988, (1)37~40
- 4 K Yamaniishi, J R Dantas, M Takahashi, et al. Antigenic differences between two viruses, isolated in Japan and Korea, that cause Hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Virol*, 1984, 52(5), 231~237

- 5 李德新,宋干,杭长寿,等.流行性出血热结构蛋白的研究.病毒学报,1990,6(2):99~105
- 6 Schmaljohn C S, Dalrymple J M. Analysis of Hantaan virus RNA; evidence for a new genus of bunyaviridae. *Virology*, 1983, 131(3), 482~491
- 7 Schmaljohn C S, Schmaljohn A L, Dalrymple J M. Hantaan virus M RNA; coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology*, 1987, 157(1): 31~39
- 8 杭长寿,陈思毅,金奇,等.流行性出血热家鼠型病毒 R₂₂株基因组 M 片段 3' 端核苷酸序列分析.病毒学报, 1988, 4(4) 358~360
- 9 M Vaheri, A Tazi, T F Regnery, et al. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. *Science*, 1985, 227(4), 1041~1044

Detecting and Typing of HFRSV with PCR and Biotinylated Probes

Tang Jiaqi Li Yuexi Li Xianfu, et al

(Nanjing Military Medical Research Institute, Nanjing Command, Nanjing 210002)

By analysis and comparison of nucleotides sequences of HFRSV 76/118 and R₂₂ strains, three pairs of primers were designed and synthesised. One pair of primer lying in the high homologous region between 76/118 strain and R₂₂ strain was used as common and outer primers; the other two pairs of primers were in the low homologous region, as the type-specific and inner primers.

Using above primers and RT-PCR technique, we measured five strains of HFRSV, 76/118, A9, Chen, R₂, and R₂₂. When using the outer primers, all of the five strains produced one DNA lane of 300bp; using the field-rat type inner primers all strains but R₂₂ strain produced one DNA lane of 70bp and using the home-rat type inner primers, only R₂₂ strain produced one DNA lane of 70bp.

Part of M fragment cDNA of 76/118 and R₂₂ strains was used respectively as template, two type-specific biotinylated probed were synthesised by nest PCR technique, the probes were used to hybridization with the RT-PCR products of the five strains, the results showed, RT-PCR technique may be used to the detecting and typing of HFRSV, and had great accuracy, the sensitivity of dot hybridization with biotinylated probe was 1-10pg of cDNA.

Key words HFRS, PCR, Dot blot hybridization, HFRSV-typing