

22-27

9113(4)

第10卷 第1期
1995年3月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 10 No. 1
Mar. 1995

PCR 制备地高辛素标记的探针检测轮状病毒核酸

卓礼梅 徐帆 陈火胜 严泳楷

(中山大学微生物学教研室, 广州 510089)

R392-33
R373.24

A

提要 用聚合酶链反应(PCR)技术,制备了轮状病毒第9基因部分片段的地高辛素标记的cDNA探针。DNA-RNA 斑点杂交表明该探针具有轮状病毒A组的特异性,可检出10pgHRV-RNA。实验中选择了粪便标本提取核酸后点膜和粪便上清直接点膜进行斑点杂交,两种方法的结果一致,同时将斑点杂交法与PAGE法的结果进行了比较。实验结果表明用PCR技术直接制备地高辛素标记的cDNA探针具有方便、快速、标记率高、特异性强的特点,具有一定的应用前景。

关键词 聚合酶链反应(PCR),地高辛素标记,斑点杂交,轮状病毒(HRV)

核酸杂交试验利用核酸碱基互补配对的特异性,通过标记特异核酸片段作为探针,用于检测标本中的目标核酸。该技术在病毒性疾病的实验室诊断和不同来源核酸间同源性的研究上已获得广泛应用。在轮状病毒感染的研究中,已有文献报道应用核酸杂交试验^[1,2]。其中多以第9或第8基因片段或克隆的cDNA作为探针,且探针多用同位素标记。Flores等人^[3]以轮状病毒RNA和克隆的cDNA作为模板,用PCR直接制备³²P标记的探针,该法简便、快速。据此,我们在PCR反应液中加入适量的DIG-11-dUTP,制备了地高辛素标记的HRV-cDNA探针,并对120份急性胃肠炎患儿粪便标本进行了轮状病毒RNA斑点杂交试验,同时与PAGE法进行了比较。

材料和方法

1 粪便标本的收集及处理

1991年10月至1992年1月,在广州市两家医院收集急性胃肠炎住院患儿(≤2岁)粪便标本120份。成人轮状病毒(ADRV)感染的粪便标本由第一军医大学流行病学教研室余守义教授惠赠。粪使用PBS稀释成10-20%的悬液,5000r/min离心10分钟,取上清置-20℃备用。

2 毒株与细胞株

HRV标准株Wa株(血清1型)、S₂株(血清2型)、Y₆株(血清3型)、Hochi株(血清4型)、牛轮状病毒NCDV株(血清6型);恒河猴胚肾细胞株(MA104细胞);腺病毒7型(Ad₇);登革病毒2型(DEV₂)均为本室保存。

3 HRV-RNA的提取与浓缩

按文献[4]方法进行。

4 HRV-RNA聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

按文献[4]方法进行。

本文于1993年9月28日收到,1993年12月13日修回

• 中山大学昆虫所生物工程室,广州510275

5 斑点杂交

5.1 PCR 引物及试剂

5.1.1 引物 引物设计扩增 A 组 HRV-VP7 基因第 51—392 位核苷酸(342bp)片段,由中国科学院上海细胞所代合成。上游引物序列:5'-GTATGGTATTGAATATACCAC-3';下游引物序列:5'-GATCCTCTTGGCCATCC-3'。

5.1.2 试剂 RNA 逆转录试剂盒(AMV Reverse Transcriptase)为美国 Promega 公司产品;PCR 试剂盒为上海复旦大学遗传所产品;<DIG>标记检测试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品。

5.2 探针的制备

5.2.1 逆转录 HRV-RNA(从 Wa 株纯化的病毒液所提取)先经 95℃ 加热 7 分钟,立即置冰浴中 3 分钟使之变性。以变性的 HRV-RNA 为模板,PCR 下游引物为逆转录引物,按逆转录试剂盒说明书进行逆转录合成 cDNA。

5.2.2 PCR 扩增标记 PCR 总反应体积 50 μ l。在 Eppendorf 管中依次加入 5 \times 缓冲液 10 μ l、dNTP 底物(各 2mmol/L)5 μ l、DIG-11-dUTP(25nmol/L) 2 μ l、上下游引物各 1 μ l(100ng/ μ l)、逆转录产物 5 μ l、灭菌双蒸水 25 μ l、FDNA 多聚酶 1.5U,混匀后覆盖石蜡油开始 PCR 循环(使用 FR-300 DNA 扩增仪,复日公司产品):93℃,45" \rightarrow 55℃,45" \rightarrow 72℃,90";30 个循环。同法扩增 Wa 株 cDNA,但不加 DIG-11-dUTP 作为对照。PCR 扩增完毕,取扩增产物电泳(1.5%琼脂糖凝胶)进行鉴定后,扩增标记的产物用饱和酚抽提,无水乙醇沉淀备用。

5.3 斑点杂交 基本按试剂盒说明书进行。

5.3.1 核酸样品点样 待检样品及对照组病毒核酸首先置沸水浴中 5 分钟,立即冰浴 3 分钟,使 dsRNA 或 DNA 变性。在真空抽滤条件下,依次将阳性对照、阴性对照及待检样品点样于预处理的硝酸纤维膜(NC 膜)上。点样完毕,将 NC 膜置室温下晾干,再放于 80℃ 烘干 2 小时。

5.3.2 粪便上清直接点样 粪便上清直接点在预处理的 NC 膜上,然后将 NC 膜转至变性液(0.1mol/L NaOH、1mol/L NaCl)浸过的定性滤纸上,放置 5 分钟,再置于浸有中和液(0.1 Tris-HCl pH7.2、1 mol/L NaCl)的定性滤纸上 5 分钟,最后转至 2 \times SSC 浸过的滤纸上两次,每次放置 10 分钟。室温干膜后,置 80℃ 烘干 2 小时。

5.3.3 预杂交、杂交及显色 按<DIG>标记与检测试剂盒说明书进行。

结 果

1 PCR 标记产物鉴定

PCR 扩增产物经 1.5%琼脂糖电泳后,对照扩增产物在 342bp 处有一扩增带,PCR 标记产物则在约 390bp 处有一扩增带,这是由于扩增片段中掺入了 DIG-11-dUTP,因此分子量较大,泳动较慢,亦表明<PCR-DIG>探针标记成功。见图 1。

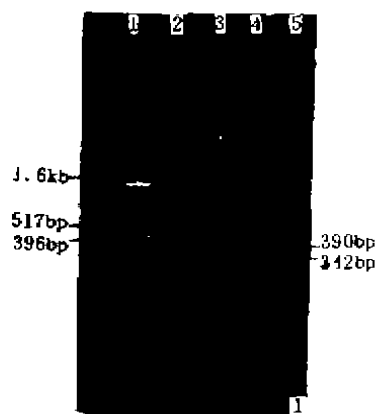


图 1 PCR 标记产物电泳

1. pBR322/Hinf I; 2、4. PCR 标记产物; 3、5. 对照扩增产物。

Fig. 1 Electrophoresis of labelled PCR product

1. pBR322/Hinf I fragment; 2, 4. Labelled PCR product;

3, 5. Amplified product as a control.

2 <PCR-DIG>探针的敏感性

HRV-RNA(Wa株)进行10倍稀释(用Pharmacia公司Ultrascpec紫外分析仪测OD值定量)后点膜,探针与其进行杂交,在RNA量为10pg时仍有杂交信号出现(见图2)。这表明<PCR-DIG>探针的敏感度达10pg水平。



图2 PCR-DIG探针的敏感性

(样品:Wa株HRV的RNA)

Fig. 2 Sensitivity of PCR-DIG probe.

(Samples: HRV-RNA of Wa strain)

3 <PCR-DIG>探针的特异性

<PCR-DIG>探针与A组HRV-RNA(Wa、S₂、Y₀、Hochi、NCDV株)呈阳性杂交反应;而与MA104细胞、ADRV-RNA、DEV₂-RNA、Ad₇-DNA及TE缓冲液杂交后不显色,无交叉反应,表明该探针具有A组HRV特异性。见图3。

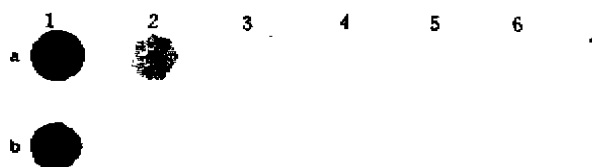


图3 PCR-DIG探针的特异性

a行:1-4. Wa、S₂、Y₀、Hochi株HRV的RNA;5. MA104细胞;6. TE对照;

b行:1. Wa株HRV-RNA的RT-PCR产物;2. NCDV株HRV的RNA;3. Ad₇-DNA;4. DV2-RNA。

Fig. 3 Specificity of PCR-DIG probe

Row a: 1-4. HRV-RNA of Wa, S₂, Y₀, Hochi strains; 5. MA104 cells; 6. TE control;

Row b: 1. RT-PCR product of HRV-RNA(Wa strain); 2. HRV-RNA(NCDV strain); 3. Ad₇-DNA; 4. DV2-RNA.

4 斑点杂交与PAGE法检测患儿粪便中HRV-RNA的结果比较

用斑点杂交和PAGE法检测了120份患儿粪便标本,HRV-RNA的检出率分别为57.5%、50%,经统计处理,两者差异有显著性意义。见图4和表1。

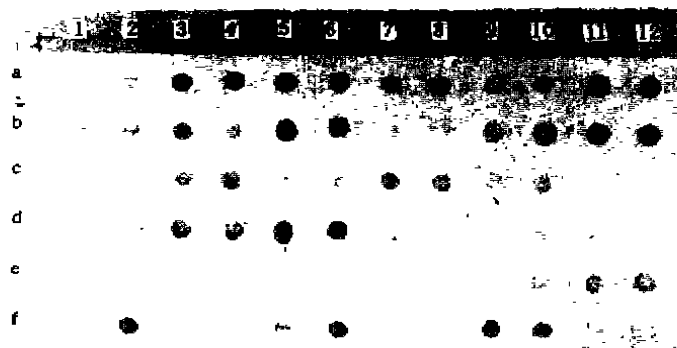


图 4 PCR-DIG 探针与急性胃肠炎患儿粪便中 HRV-RNA 的杂交结果

a—e 行以及 f 行的 1—6 孔:急性胃肠炎患儿粪便标本;f 行:7—8. ADRV-RNA 对照;9—10. HRV-RNA (Wa 株)对照;11—12. TE 对照。

Fig. 4 Detection of HRV-RNA in faeces of infants with gastroenteritis by hybridization to PCR-DIG probes

Raw a—e and 1—6 wells of raw f: The faeces obtained from infants with gastroenteritis;

Raw f: 7—8. ADRV-RNA control; 9—10. HRV-RNA control (Wa strain); 11—12. TE control

表 1 斑点杂交与 PAGE 法检测患儿粪便中 HRV-RNA 的结果比较

Table 1 Comparison of dot blot hybridization and PAGE in detecting HRV-RNA from the faeces of diseased infants

斑点杂交 Dot blot hybridization	PAGE		合计 Total	
	+	-	阳性数 No. of positive	%
+	54	15	69	57.5
-	6	45	51	42.5
合计 Total	60	60	120	
	阳性数 No. of positive	%		
	50	50		

$$X^2=4.76 \quad P<0.05$$

5 两种点样法杂交效果的比较

用提取的核酸点膜和粪便上清直接点膜法进行斑点杂交检测了 60 份患儿粪便标本检出结果如表 2 所示。

表 2 提取核酸点膜法和粪便上清直接点膜法结果比较

Table 2 Comparison of the results obtained by direct loading or loading after extraction of nucleic acid from fecal supernatant

核酸法 Nucleic acid method	上清法 Supernatant method		合计 Total	
	+	-	阳性数 No. of positive	%
+	29	4	33	55
-	7	20	29	45
合计 Total	36	24	60	
	阳性数 No. of positive	%		
	60	40		

$$X^2=1.55 \quad P>0.05$$

讨 论

核酸分子杂交技术具有快速、敏感及可大量检测临床标本等优点,近年来已广泛应用于病毒性感染的检测中。核酸探针的制备是杂交成功的关键,以往多采用同位素或生物素标记的探针,前者虽然特异性、敏感性较好,但存在放射性同位素防护、成本高及放射自显影设备的购置等限制,而且因同位素衰变而影响检测结果的可靠性;生物素探针则由于组织中生物素结合蛋白或内源性生物素的存在,在实验中往往出现较高的非特异性背景和假阳性结果,影响了检测的准确性^[5,6]。地高辛素标记探针是近几年来发展的一种非放射性标记方法,地高辛素是从植物洋地黄中提取的固醇类半抗原物质,由一个较长的侧臂共价结合到尿嘧啶环的5位上,构成地高辛素标记物(Dig-11-dUTP),在标记探针时即可掺入到DNA或RNA中。地高辛素标记技术由于用阻断剂封闭非特异性结合位点后,降低了本底,故背景清晰,而且因单股核酸配对,从而提高了反应的特异性,在很大程度上弥补了上述两种方法的不足,使临床诊断的准确性、敏感性和特异性都有所提高^[7]。

近年来国内外均有采用PCR法制备³²P标记、地高辛素标记探针的报道^[3,8]。国外有用PCR制备³²P标记的HRV-cDNA探针。但未见用PCR技术制备地高辛素标记的HRV-cDNA探针的报道。我们首次用PCR扩增HRV-VP₇基因(Wa株)第51—392位核苷酸片段制备地高辛素标记探针获得成功,并用cDNA-RNA斑点杂交检测了HRV-RNA,结果表明该探针具A组HRV特异性,具有一定的通用性,可检出10pg HRV-RNA,灵敏度与³²P标记的HRV-cDNA探针相似^[4]。

检测轮状病毒感染的常用方法有电镜、PAGE、ELISA、DIA(免疫斑点法)、核酸杂交法,近年来由于PCR技术的发展,亦有用PCR法检测HRV感染的报道^[9],但由于采用PCR法必须先进行逆转录,成本较高,且一旦有HRV感染,病人粪便中排病毒量较高(10¹¹个/g),此时用PCR法与一般的核酸杂交法已无明显区别。因此,作者认为对于HRV感染用核酸杂交法检测即可,在本文中我们利用PCR法制备地高辛素探针,该方法方便、快速、标记率高,是标记探针的好方法。

我们同时用斑点杂交法(自行标记的地高辛素探针)和PAGE法对120份患儿粪便标本中HRV-RNA进行了检测,发现两者检测结果差异有显著性意义,斑点杂交法灵敏度较PAGE法高,可达10pg水平,而PAGE法则为535pg水平^[4]。前者比后者高50倍左右。

在杂交方法上我们同时比较了提取核酸点样法和粪便上清点样法,发现两者结果无显著差异,与文献报道相似^[1]。从而表明可用简单的粪便上清直接点样法进行核酸杂交反应,简化了实验步骤,有利于大批临床标本的检测。

参 考 文 献

- 1 Flores J, Boeggeman E, Purcell R, *et al*. A dot hybridisation assay for detection of rotavirus. *The Lancet*, 1983; 8324:555—558
- 2 Tam J S L, Zheng B J, Lo S K, *et al*. Distinct populations of rotaviruses circulating among neonates and older infants. *J Clin Microbiol*, 1990; 28:1033
- 3 Flores J, Sears J, Schael I P, *et al*. Identification of human rotavirus serotype by hybridization to polymerase chain reaction-generated probes derived from a hypervariable region of the gene encoding outer capsid protein VP₇. *J Virol*, 1990; 64:4021—4024
- 4 王荇. 斑点核酸杂交检测广州地区人轮状病毒的初步研究. *广东卫生防疫*, 1991; 17(2):6—9

- 5 Kluytmans J A J W, Niesters H G M, Mouton R W, *et al*. Performance of a nonisotopic DNA probe for detection of chlamydia trachomatis in urogenital specimens. *J Clin Microbiol*, 1991; 29:2685—2689
- 6 Woods G L, Young A, Scott J C, *et al*. Evaluation of a nonisotopic probe for detection of chlamydia trachomatis in endocervical specimens. *J Clin Microbiol*, 1990; 28:370—372
- 7 DIG-DNA Labelling and Detection Nonradioactive Application Manual, pp9—10; 德国 BM 公司
- 8 庄坚, 郭辉玉, 陈火胜. PCR 法制备地高辛配基标记的探针检测登革病毒核酸. *中山医科大学学报*, 1993; 14(1):21—25
- 9 Wide J, Eiden J, Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J Clin Microbiol*, 1990; 28:1300

Detection of Nucleic Acid of HRV by a Dig-Labelled Probe Prepared with Polymerase Chain Reaction (PCR)

Zhuo Limei Xu Fan Chen Huosheng Yan Yongkai

(Department of Microbiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089)

A cDNA probe of the partial genome segment of HRV ninth gene was labelled with DIG by the technique of PCR. DNA-RNA dot blot hybridization results showed the properties of HRV A group specificity of this probe. The results were consistent by the method of loading the sample supernatant directly or loading after the extraction of fecal sample nucleic acid. We also compared the results of dot blot hybridization and PAGE. It was strongly indicated in this experiment that the Dig-labelled HRV cDNA probe prepared directly by PCR appeared to be convenient, fast, high labelling rate and highly specific.

Key words Polymerase chain reaction (PCR), DIG-labelling, Dot blot hybridization, Human rotavirus (HRV)