

RT-nested PCR 检测肾综合征出血热患者血清病毒核酸*

李秀玲¹ 张天明² 胡珍姣²

(湖北医科大学病毒研究所, 武汉 430071)

R512.810/4

A 摘要 采用异硫氰酸胍-酚-氯仿(AGPC)一步法提取病毒 RNA, 并依据肾综合征出血热病毒(HFRSV)核蛋白(NP)编码基因保守区核苷酸序列合成两对巢式引物, 建立了逆转录巢式聚合酶链反应(RT-nested PCR)检测 HFRSV RNA 方法。应用此法对 HFRSV 感染的 Vero E6 细胞培养液及 HFRS 患者血清中的病毒 RNA 进行检测。结果显示, 感染细胞培养液及 35 例 HFRS 患者血清均为阳性, 正常的 Vero E6 细胞及 20 例正常人血清均为阴性。将 HFRSV 感染细胞提取的 RNA 进行 10 倍系列稀释, 可检出 10^{-7} 稀释度的病毒 RNA (约 0.2 pg)。该法灵敏、特异、快速、简便, 为从分子水平探讨 HFRS 的发病机理、临床早期快速诊断提供了新的研究手段。

关键词 肾综合征出血热, 聚合酶链反应, 汉坦病毒

核酸

肾综合征出血热(HFRS)是由布尼亚病毒科汉坦病毒属中的几种病毒引起的临床上以发烧、出血及肾脏损害为基本特征的一类疾病的总称。其病原体——肾综合征出血热病毒(HFRSV)基因组为分节段的单股、负链 RNA, 由大(L)、中(M)、小(S)三个片段组成, 分别编码多聚酶(L蛋白)、包膜糖蛋白(G1 和 G2)以及核蛋白(NP)^[1]。本研究依据 HFRSV 核蛋白(NP)编码基因保守区核苷酸序列合成了一组巢式寡核苷酸引物, 对 35 例临床确诊为 HFRS 的患者血清中病毒核酸进行逆转录巢式聚合酶反应(RT-nested PCR)扩增, 以期建立一种快速、敏感、特异的 HFRSV RNA 检测方法。

材料和方法

1 主要材料

1.1 试剂来源: 异硫氰酸胍、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 片段长度标准物(λ DNA/Hind III Markers)均为华美生物工程公司产品; RNasin 和 AMV 逆转录酶系 Promega 公司产品; DNA 小分子量标准为上海复华公司产品; HFRSV R22 株 S 片段 cDNA 质粒由中国预防医学科学院病毒研究所杭长寿研究员惠赠, 本所分子生物室保存; 其余试剂均为分析纯。

1.2 引物设计与合成: 引物参照 Kim 等^[2]报道设计。序列为: SK1: 5'-ATTGATGAACCTACAGGAC-3'; SK2: 5'-AGCATGAAGGCAGAAGAG-3'; SK3: 5'-ACAAGCATGTTGGTGGAC-3'; SK4: 5'-TGTATCCCATTTGATTGTG-3'。由中国科学院微生物研究所基因工程中心合成。

2 实验对象

2.1 病毒及其培养: Vero E6 细胞及 HFRSV HTN76-118 株为本室所存。将病毒接种至单层 Vero E6 细胞,

收稿日期: 1996-06-13; 修回日期: 1996-08-23

* 卫生部北京生物制品研究所, 北京 100024

培养 14 d 后,ELISA 检测 HFRSV 抗原^[3]为阳性时收获。同时进行 CVB₁、CVB₂、CVB₄、RSV 培养。

2.2 HFRS 患者血清及正常人对照血清:35 例 HFRS 患者血清来源于湖北省武昌、荆州、咸宁等流行疫区。临床诊断均按 1986 年全国 HFRS 会议制定的标准,经 ELISA 检测血清中特异性 IgM^[4]阳性证实。正常人对照血清 20 份,为本校附二院提供,均为门诊体检健康者,ELISA 检测血清 HFRSV 特异性 IgM 阴性。

3 实验方法

3.1 HFRSVS 基因片段质粒 cDNA 的扩增与提取:从所获得的带质粒的菌种中取一环菌,接种到 5 ml LB 培养液中,37℃ 振荡培养过夜。将活化菌接种于含氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养液中,37℃ 振荡过夜。收集菌体于离心管中,离心取沉淀,用碱变性法提取质粒 cDNA。

3.2 病毒 RNA 的提取:取 HFRS 患者血清 500 μL 或病毒感染细胞培养液 200 μL,按异硫氰酸胍-酚-氯仿(AGPC)一步法^[5]提取。

3.3 cDNA 合成:20 μL 反应体系中含:5× 逆转录缓冲液 4 μL,4× dNTPs 各 400 μmol/L,AMV 逆转录酶 10 U,RNasin 40 U,引物 SK1 30 pmol/L,模板 RNA 10 μL。41℃,1 h。

3.4 nested PCR:第一次 PCR 反应体系中含:10× Taq DNA 聚合酶缓冲液 5 μL,4× dNTPs 各 200 μmol/L,SK1、SK4 各 30 pmol/L,模板 cDNA 10 μL(质粒 cDNA 2 μL),Taq DNA 聚合酶 2 U。95℃ 预变性 5 min 后,按 94℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 2 min 进行 30 次循环,末次循环后 72℃ 再延伸 5 min。第二次 PCR 反应体系中含:10× Taq DNA 聚合酶缓冲液 5 μL,4× dNTPs 各 200 μmol/L,SK2、SK3 各 30 pmol/L,第一次 PCR 产物 5 μL。扩增条件同上,进行 15 次循环。

3.5 扩增产物的鉴定:取 10 μL PCR 扩增产物与 2 μL 上样缓冲液混合后,经含溴化乙锭(EB)2% 的琼脂糖凝胶电泳(5V/cm)分析,以 DNA 片段长度标准物为参考,于紫外灯下观察结果并拍照。电泳后的凝胶经变性、中和后,Southern 印迹转移至硝酸纤维素(NC)薄膜。烘烤,预杂交后与特异性探针杂交(见另文报道)。探针为采用 Dig-11-dUTP DNA 标记的 HFRSV S 片段 cDNA。非放射性 Dig-11-dUTP DNA 标记及检测试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品。

结 果

1 特异性 PCR 产物的鉴定

HFRSV 感染细胞培养液中提取的 RNA 进行 RT-nested PCR、HFRSV 质粒 cDNA 进行 nested PCR,其产物均为单一核酸带。经与 DNA 小分子量标准比较,证实其大小约为 403 bp。与理论预期值一致。Southern 印迹杂交,证实 PCR 产物为 HFRSV 序列。而未感染 Vero E6 细胞培养液、四种 RNA 病毒(CVB₁、CVB₂、CVB₄ 及 RSV)感染细胞与 HFRSV 感染细胞培养液进行同样步骤的 RNA 提取、逆转录及 nested PCR 扩增,均未见特异性扩增产物。Southern 印迹杂交亦为阴性结果。

2 灵敏度试验

将 500 μL HFRSV 感染细胞培养液中提取的 RNA(约 2.0 μg),经 10 倍系列稀释后进行 RT-nested PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳,最低可检出 10⁻⁷ 稀释度的病毒 RNA(见图 1)。

3 患者血清 RT-nested PCR 产物的检测

35 例 HFRS 患者血清经 RT-nested PCR 检测,扩增结果均为阳性,而 20 例正常人血清均为阴性(见图 2)。

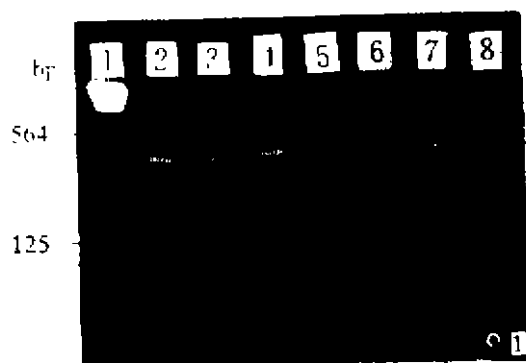


图 1 HFRSV RNA 不同稀释度

RT-nested PCR 检测结果

1: λ DNA/Hind III markers, 2-8 为 10^{-1} - 10^{-7} 稀释度

Fig. 1 Electrophoresis analysis of RT-nested PCR products of serially diluted HFRSV RNA

Lane 1: λ DNA/Hind III markers,

Lanes 2-8: 10^{-1} - 10^{-7} diluted HFRSV RNA

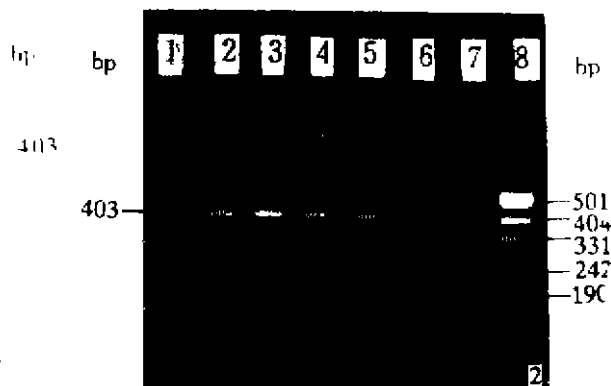


图 2 部分 HFRSV 患者血清标本 RT-nested PCR 检测结果

1-5: 部分 HFRSV 患者血清标本 6: 正常人血清标本 7: 阳性对照(S 片段质粒 cDNA) 8: DNA 小分子量标准

Fig. 2 Electrophoresis analysis of RT-nested PCR products of some patients' sera

Lanes 1-5: Patients' sera Lane 6: Normal serum

Lane 7: Positive control(HFRSV S segment plasmid cDNA),

Lane 8: Marker

讨 论

HFRSV 至少可分为四个血清型: 汉坦病毒(HTNV, 简称 I 型病毒), 汉城病毒(SEOV, 简称 II 型病毒), 普马拉病毒(PUUV, 简称 III 型病毒), 希望山病毒(PHV, 简称 IV 型病毒)^[6]。流行于我国的 HFRS 主要由 I 型病毒引起^[7]。目前检测 HFRSV 常用的方法为病毒分离、免疫学方法测抗原及对病毒基因特异性核酸杂交等, 但都存在费时、费力、危险性大或对少量抗原检测不够灵敏等不足。

PCR 是近年来发展并成熟起来的一种体外基因扩增技术, 能在数小时内使 DNA 呈指数级增长, 已成功地用于多种病毒的基因检测和分子流行病学调查等。本研究将逆转录与巢式 PCR 技术相结合, 依据 HFRSV 核蛋白(NP)编码区保守核苷酸序列设计了一组巢式引物 SK1/SK4、SK2/SK3, 建立了一种直接检测 HFRSV 患者血清病毒 RNA 的 RT-nested PCR 法。可见一条约 403 bp 的特异性扩增带, 大小与理论预期值一致。而正常 Vero E6 细胞及 CVB₁、CVB₂、CVB₄、RSV 等 RNA 病毒感染细胞培养液均为阴性。经 Southern 印迹杂交也证实上述结果。表明引物的特异性决定了产物的特异性。将从 HFRSV 感染细胞提取的 RNA 进行 10 倍系列稀释后进行 RT-nested PCR 检测, 最低可检出 0.2 pg 的病毒 RNA。巢式 PCR 具有以下优点: 经过两次扩增, 大大提高了敏感性; 同时由于模板和引物的改变, 降低了非特异性反应的连续放大, 进一步提高了反应的特异性。

HFRSV 对人体的感染呈泛嗜性, 国内外学者也相继证实, 应用 PCR 技术可直接从动物的

感染组织或临床标本中检出病毒核酸。PCR 技术为从基因水平检测 HFRSV RNA 提供了灵敏、特异、快速、准确方法。本实验采用 RT-nested PCR 检测了 35 例 HFRS 患者血清病毒 RNA, 结果均为阳性。20 例正常人血清检测结果均为阴性。结果经过 Southern 印迹杂交证实。采用 AGPC 一步法提取 HFRSV RNA, 方法简便, 分离 RNA 产率高、纯度高且 RNA 不易降解。由于该方法灵敏度高, 为防止交叉污染, 除严格执行操作规程外, 每次试验均同时用 HFRSV S 片段质粒 cDNA 作为阳性对照, 以正常人血清作为阴性对照。本实验从样本处理至完成整个检测过程约需 8~10 h。进一步较大样本的临床应用研究正在进行, 以期用于不同样本(如血清、尿沉渣、外周血单核细胞或血凝块等)的检测, 进而深入探讨该方法在 HFRS 的临床早期诊断、流行病学调查及发病机制研究中的应用价值。

致谢 本所丁晓华、鲁德银讲师给予本研究支持与帮助, 谨致谢忱!

参 考 文 献

- 1 Schmaljoin CS, Detrynole JM. Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of bunyaviridae. *Virology*, 1983, 131(3):482
- 2 Kim E, Kim I, Choi Y *et al.* Rapid differentiation between Hantaan and Seoul Viruses by polymerase chain reaction and restriction enzyme Analysis. *J Med Virol*, 1994, 43:245
- 3 张天明, 向近敏, Huggins JW 等. 用 ELISA 扩增系统检测流行性出血热病毒抗原. *湖北医学院学报*, 1991, 12(3):236
- 4 张天明, 杨占秋, 张美英 等. 应用抗体捕捉 ELISA 法检测流行性出血热患者血浆特异性 IgM 抗体. *中华医学杂志*, 1990, 70(1):15
- 5 Chomczynski P, Sacchit N. Single-step of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162:156
- 6 Puthavathana P, Lee HW, Kang CY *et al.* Typing of Hantavirus from five continents by polymerase chain reaction. *Virus Res*, 1992, 26:1
- 7 宋 干, 杭长寿, 廖化新等. 中国流行性出血热(野鼠型和家鼠型)病毒的抗原性比较. *中华微生物和免疫学杂志*, 1984, 4(4):236

Detection of Hantavirus by RT-nested PCR in Patients with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome

Li Xiuling Zhang Tianming Hu Zhenjiao

(*Virus Research Institute, Hubei Medical University, Wuhan 430071*)

Hantavirus (HV) has a tripartite, single-stranded, negative-sense RNA genome. Two pairs of oligonucleotides flanking S segment were chosen as primers for reverse transcription polymerase chain reaction(RT-nested PCR). The method of RT-nested PCR was used for detection of virus RNA in HV infected Vero E6 cells and clinical serum specimens from 35 hemorrhagic fever

with renal syndrome(HFRS) patients, with HV gene S segment plasmid cDNA as positive control, and virus RNA was extracted by Acid Guanidinium Thiocyanate - Phenol - Chloroform Single - Step Method. The results showed that all the patients' serum samples and HV infected Vero E6 cells were positive, on the other hand, all the twenty normal serum samples and Vero E6 cells were negative. It suggested that RT - nested PCR was sensitive, specific, rapid and simple, and can be applied for study on the pathogenesis of HFRS in molecular level and early clinical diagnosis.

Key words Hemorrhagic fever with renal syndrome, Polymerase chain reaction, Hantavirus

《现代分子病毒学》已经出版发行

董长垣主编的《现代分子病毒学》已于 1996 年 10 月由武汉大学出版社出版发行。全书 75.3 万字、大 16 开。

《现代分子病毒学》以人和动物病毒为模型,以介绍现代病毒学研究进展为宗旨,较系统地讨论了现代分子病毒学和病毒生物工程的辉煌成就。全书 35 章,分成三个部分。第一部分:动物病毒分子生物学导论。从病毒和亚病毒的概念入手,讨论了病毒学研究进展,提出了分子病毒学已成为现代病毒学的主要方向的学术观点。第二部分:人和动物病毒家族。结合本书学科特点,采取了按病毒分子结构进行分类的方法,对人和动物病毒各家族成员的分子结构和功能、复制和表达的研究进展,逐一进行了较详细的讨论。第三部分:现代分子病毒学的重要地位。讨论了病毒分子生物学和基因工程在病毒流行病学、致病性病毒的分子诊断、病毒生物工程疫苗、抗病毒因子、核酸和药物,以及病毒基因工程载体研究进展、应用和前景。

为了使读者方便起见,本书利用了必要的插图和表格,列出了一定数量的文献,以便有志者深究的读者可以从中查到很多有价值的出版物。

本书具有一定的学术性和实用性,可作为有关大专院校、研究机构、医院、防疫部门和生产开发部门中,从事病毒学、生物学、分子生物学、微生物学、遗传学、医学、农学和药学工作的教师、研究工作者、医生、兽医师、研究生、大专生等人员的手头参考书。

定价:38 元/册,另加邮寄费 5 元。

邮购和汇款地址:武汉市武昌东湖路 39 号,湖北医科大学病毒研究所。联系人:陈晓老师。邮政编码:430077。电话:027-7812138,027-7812140。开户银行:工行水办 开户名:湖北医科大学基础医学院科技开发部。行号:825598,帐号:8255982490590022095