

23-28

第13卷第1期
1998年3月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 13 No. 1
Mar. 1998

肾综合征出血热病毒基因检测及分型的研究*

雷万里** 唐家琪 陆承平** 潘秀珍 李先富

(南京军区军事医学研究所, 南京 210002)

** (南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

R 512.8
R 373.32

摘要 根据流行于我国的两型 HFRSV 代表株汉滩型 76-118 株及汉城型 R22 株 M 节段的核酸序列, 设计两型共同引物, 建立了逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法, 检测 39 株从不同地区、不同宿主分离的 HFRSV 感染鼠脑及细胞培养物; 同时还建立了捕捉 ELISA 法(cELISA), 检测了 39 株中的 36 株, 每份样本设复孔, 以 $P/N \geq 2.10$ 且 $P-N \geq 0.10$ 者判为阳性。RT-PCR 及 cELISA 两法的检出率分别为 97.6% 与 82.4%, 二者符合率 84.6%。此外, 对 RT-PCR 产物进行酶切分型, 38 份扩增产物中的 15 份可被 AluI 切开。根据所获酶切图谱的差异, 可分为汉滩型及汉城型两型, 显示了酶切分型的潜在价值。

关键词 肾综合征出血热病毒, 逆转录-聚合酶链反应, 捕捉 ELISA 法, 检测, 分型

肾综合征出血热病毒(HFRSV)是布尼病毒科汉坦病毒属成员, 该属目前可分为 9 型^[1], 其中 4 型可引致肾综合征出血热(HFRS)或汉坦病毒肺综合征(HPS), 一般认为我国只有汉滩型(HTNV)及汉城型(SEOV)两型流行。快速检测 HFRSV 对 HFRS 的防治具有重要意义。间接免疫荧光(IFA)、空斑减少中和试验、酶联免疫吸附试验(ELISA)等血清学方法已广泛应用, 但它们的敏感性还待提高。Palaipan 等^[2]根据 M、S 节段设计了型特异性引物, 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)对分离自五大洲的毒株进行检测和分型, Xiao^[3]用 RT-PCR 结合限制性酶切对 HFRSV 进行检测和分型, 上述两报道取得了较一致的结果。RT-PCR 具有极高的敏感性, 但其特异性的关键在于引物设计, 本研究^[4]及目前国内外大多采用 HTNV、SEOV、PUUV 及 PHV 四型共同引物进行 HFRSV 检测, 由于汉坦病毒核酸序列变异率较高, 有些毒株的检出可能受影响。为进一步提高 RT-PCR 对我国流行 HFRSV 毒株的检出率, 我们设计了新的引物, 以期建立更具有流行病学调查和病原学研究价值的 RT-PCR 系统。为了验证 RT-PCR 的准确性及其反应条件进行优化, 还建立了捕捉 ELISA 和 IFA 检测方法。此外, 根据扩增片段中是否存在 AluI 酶切位点, 对样本中的 HFRSV 进行核酸分型探讨。

材料与方 法

1 样本

39 个毒株的分离和传代背景见表 1。其中 76-118 株、R22 株、陈株及 A9 株为中国预防医学科学院杭长寿研究员赠送, 本所 Vero-E6 细胞传代或鼠脑传代保存, 其余 35 个毒株的鼠脑培养样本由安徽省医学科学研

收稿日期: 1996-08-28, 修回日期: 1997-08-11

* 本研究为国家自然科学基金资助课题

参加本工作的还有本所张云、郭恒彬、王长军

究所倪大石研究员赠送。另外5份阴性对照为未感染HFRSV的正常Balb/c小鼠鼠脑。

2 引物设计及合成

根据HTNV76-118株及SEOV R22株M节段互补DNA(cDNA)序列,选取同源性较高的两段作为检测引物,上游引物与两型病毒cDNA 1199~1218序列相同,为5'-GCATCAGTGAAGCCTTTTC-3';下游引物与两型病毒cDNA 1497~1478的序列互补,为5'-GCAGATGTGCCCAACCATG-3'。这对引物可扩增出299 bp的DNA片段。经军事医学科学院王槐春设计的PCRDESN软件检验,中国科学院上海植物生理研究所合成。

3 RNA的提取

参见Piotr等^[5]的异硫氰酸胍一步法。从液氮中取出76-118株感染的Vero-E6细胞,2% MEM培养基36℃培养8 d,收集细胞悬液,10 000 r/min 4℃离心5 min,沉淀用于RNA提取。将鼠脑无菌研磨后6 000 r/min离心5 min,沉淀用于RNA提取,上清用捕捉ELISA试验进行检测。提取RNA时向沉淀中加入100 μL变性液(4 mol/L异硫氰酸胍,0.5%十二烷基肌氨酸钠,25 mmol/L柠檬酸钠,0.1%2-巯基乙醇),充分裂解后,加NaAc(2 mol/L, pH4.0)10 μL、酚100 μL、氯仿异戊醇混合液(49:1)20 μL,混匀,置冰上15 min,12 000 r/min 4℃离心10 min,加等体积冷异丙醇沉淀上清中RNA,用变性液100 μL重溶沉淀,冷异丙醇100 μL再次沉淀RNA,75%乙醇液洗涤沉淀,室温干燥10 min后用灭菌的DEPC液40 μL溶解沉淀,-20℃存放。

4 RT-PCR

以HTNV 76-118株感染Vero-E6细胞提取的总RNA为模板,建立并优化RT-PCR条件。操作程序如下:5'逆转录Buffer(Promega)4 μL, RNasin(华美,40 U/μL)0.5 μL, dNTPs(Promega,5 mmol/L each)4 μL,上游引物1 μL, AMVRTase(Promega,5 U/μL)0.5 μL, RNA模板1 μL,灭菌的DEPC水8.4 μL,混匀后42℃逆转录2 h,95℃5 min灭活RTase。向上述逆转录产物中加Taq酶(华美,3 U/μL)1 μL,10·PCR Buffer(华美)5 μL,上、下游引物各1 μL,补加双蒸水至总体积50 μL,覆盖石蜡油50 μL,用Tc-1 Thermal Cycler(PE公司产品)进行扩增。经过反复实验比较,将PCR的退火温度设定在57℃,变性温度与延伸温度分别为94℃与72℃,各步骤时间为1 min。RT-PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测^[6]。

5 捕捉ELISA(cELISA)

取抗μ链单抗(购自上海生物制品研究所),1:800稀释后包被酶联板(Nunc),每孔加入100 μL,4℃过夜,PBST洗涤3·3 min。将经IFA检测1gM确诊为HFRS患者的早期血清(江苏省卫生防疫站提供)及健康人血清(购自南京市红十字中心血站)各3份分别混匀,用PBST 1:100稀释,实验孔(P孔)中加入患者混合阳性血清稀释液100 μL;对照孔(N孔)中加入健康人血清稀释液100 μL,置37℃1 h,PBST洗涤3·3 min。检测标本1:40稀释于PBST中,每孔加入100 μL,37℃作用1 h,PBST洗涤3·3 min。辣根过氧化物酶酶标抗HFRSV抗体^[7]1:500稀释于含5%牛血清白蛋白(BSA)的PBST中,每孔加入100 μL,37℃作用1 h,PBST洗涤3·3 min。向各孔加入显色液100 μL,37℃暗盒放置15 min,加入2 mol/L H₂SO₄ 50 μL终止显色,用酶联免疫检测仪(华东电子管厂生产)测定OD₄₅₀值,以P/N≥2.10且P-N≥0.10者判为阳性。

6 酶切分型

取RT-PCR产物20 μL,加入抽提液(酚·氯仿:异戊醇=25:24:1)20 μL抽提,4℃10 000 r/min离心5 min,取上清加入NaAc溶液(3 mol/L, pH5.2)2 μL及冷无水乙醇40 μL,-20℃1 h,15 000 r/min离心10 min,75%乙醇液洗涤,沉淀干燥后加入10·AluI酶切Buffer(Promega)2 μL,AluI(Promega,10 U/μL)0.5 μL,双蒸水17.5 μL,37℃酶切2 h,产物检测方法同步骤4。

7 IFA检测HFRSV抗原

将各株HFRSV感染Vero-E6细胞单层,培养7 d后消化细胞,将细胞悬液滴于载玻片上,丙酮固定后用常规IFA法检测HFRSV抗原的有无。

8 RT-PCR反应条件的进一步优化

对比RT-PCR及cELISA的检测,将两法所检结果不一的3份样本重新用RT-PCR检测,最后优化反应参数如下:退火条件为先在45℃进行5个循环,然后将退火温度升至57℃再进行35个循环;变性及延伸温

度分别为 94℃ 与 72℃, 各步骤时间均为 45 s。最后一个循环于 72℃ 延伸 5 min。

结 果

1 RT-PCR 检测结果

根据引物序列计算 T_m 值, 将 PCR 退火温度设定为 57℃。用上述条件检测有毒或无毒标本 44 份, 其中 36 份扩增出 299 bp 的目的 DNA 条带, 其余 8 份未见扩增产物(见图 1。3 份毒株标本 22、38、39, 5 份阴性对照标本 24、27、31、35、36)。

优化 PCR 条件后, 将 22、38、39 三份 RT-PCR 检测阴性、cELISA 检测阳性的样本重新抽提 RNA 进行 PCR 扩增, 当降低退火温度至 45℃ 时, 38 号样本得到了扩增产物; 22 号样本虽未得到 299 bp 的目的条带, 但得到了一条 577 bp 左右的条带(见图 2), 经分子杂交证明该 577 bp 条带为 HFRSV 特异性核酸。

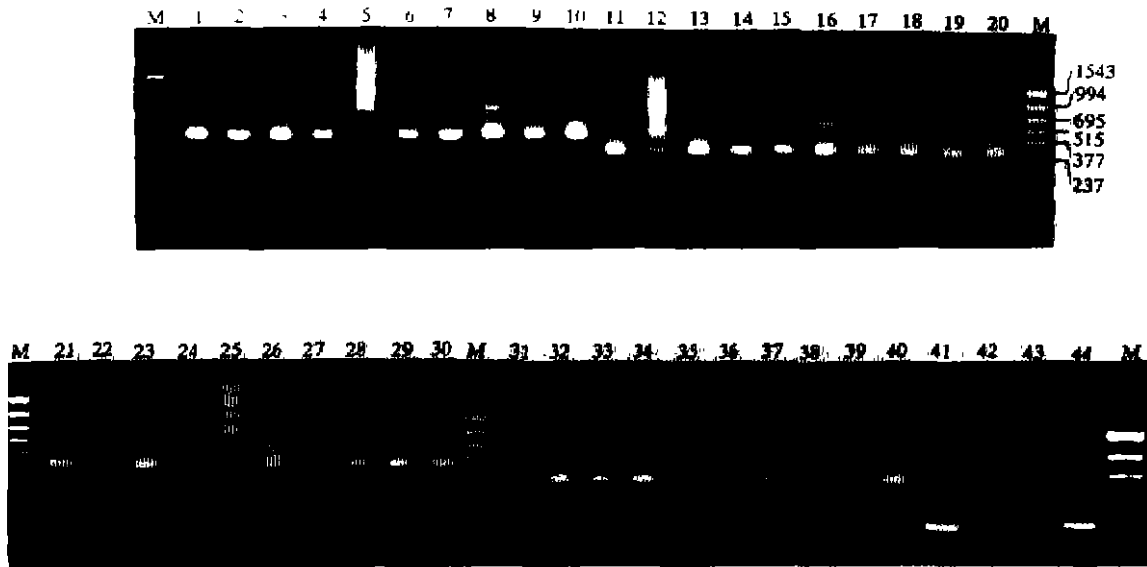


图 1 RT-PCR 产物的 2% 琼脂糖凝胶电泳分析

EB 染色, M 为 Marker, 各泳道标记号为样本号

Fig 1 RT-PCR products analysed by 2% agarose gel electrophoresis
Stained by EB; M: Marker; Number over every lane is sample order.

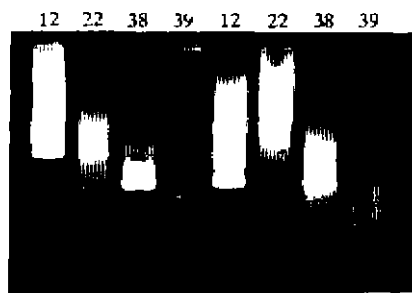


图 2 退火温度对 RT-PCR 扩增的影响

左四泳道退火温度为 45℃; 右四泳道: 退火温度为 50℃; 各泳道上的数字为样本号。

Fig 2 The effects of annealing temperature on RT-PCR
Left 4 lanes: annealing temperature set at 45℃; Right 4 lanes:
annealing temperature set at 50℃; The number over every lane
is sample order.

表1 RT-PCR及eELISA检测结果比较

Table 1 Comparison of detection of RT-PCR and eELISA

样本 Sample	培养基 及代数 Medium & generations	分离地及宿主 Districts and hosts	P孔 Positive well	N孔 Negative well	eELISA 结果 Results of eELISA	RT-PCR 结果 Results of RT-PCR
1 鲁胎	EM1	山东(Shandong), 胎乳 Fetus	1/42	0/21	-	-
4, A537	SM9	福建(Fujian), 黑线姬鼠 <i>A. agroticus</i>	1/27	0/23	+	-
5 B5	M9	浙江(Zhejiang), 人血 Human blood	1/18	0/22	+	-
6 S45	LM1	上海(Shanghai), 人血 Human blood	0/18	0/20	-	+
7, A3	M6	浙江(Zhejiang), 黑线姬鼠 <i>A. agroticus</i>	1/37	0/13	+	+
8 HR54	SM8	河南(Henan), 褐家鼠 <i>R. norvegicus</i>	0/56	0/22	+	+
9 H14	M5	陕西(Shanxi), 人血 Human blood	0/38	0/15	+	+
10 鲁姚	EM1	山东(Shandong), 人血 Human blood	1/42	0/13	+	+
11 R2	SM8	安徽(Anhui), 褐家鼠 <i>R. norvegicus</i>	1/28	0/14	+	+
12 H3	EM2	湖北(Hubei), 人血 Human blood	1/38	0/17	+	+
13 鲁沂	EM1	山东(Shandong), 人血 Human blood	1/43	0/23	+	+
14 H5	EM6	黑龙江(Heilongjiang) 人血 Human blood	1/08	0/18	+	-
15 A96	M92	安徽(Anhui), 黑线姬鼠 <i>A. agroticus</i>	1/33	0/12	+	-
16 C4	M6	安徽(Anhui), 家猫 Cat	1/36	0/20	+	+
17 R27	M5	河南(Henan), 褐家鼠 <i>R. norvegicus</i>	0/32	0/19	-	+
18 R	SR4	安徽(Anhui), 大白鼠 White rat	0/17	0/25	-	+
19 A216	EM1	四川(Sichuan), 黑线姬鼠 <i>A. agroticus</i>	0/49	0/19	+	+
20, 1 R1	SM24	甘肃(Gansu), 人血 Human blood	0/66	0/13	+	+
21 Hubei	EM4	湖北(Hubei), 人血 Human blood	0/14	0/16	+	+
22 A101R	SM7	湖北(Hubei), 黑线姬鼠 <i>A. agroticus</i>	0/48	0/08	+	(+)
23 199	SM4	江西(Jiangxi), 罗赛鼠 <i>R. lossa</i>	1/27	0/22	+	+
25 B178	SM2	福建(Fujian), 褐家鼠 <i>R. norvegicus</i>	1/44	0/23	+	+
26 A16	SM15	陕西(Shanxi), 黑线姬鼠 <i>A. agroticus</i>	0/96	0/18	-	-
28, R36	EM1	云南(Yunnan), 褐家鼠 <i>R. norvegicus</i>	1/28	0/20	+	-
29 R30	EM3	云南(Yunnan), 褐家鼠 <i>R. norvegicus</i>	1/42	0/25	+	+
30 C10	SM7	安徽(Anhui), 家猫 Cat	1/20	0/18	+	+
32 B11	SM6	安徽(Anhui), 人血 Human blood	0/89	0/19	+	+
33 S45	EM1	上海(Shanghai), 人血 Human blood	0/19	0/21	-	+
34 A59	EM2	云南(Yunnan) 高山姬鼠 <i>A. monticola</i>	1/37	0/24	+	+
37 Rr	SR1	安徽(Anhui), 大白鼠 White rat	0/24	0/24	-	+
38, Ho	EM1	山东(Shandong), 人尿 Human urine	0/68	0/22	+	-(+)
39 B9	M1	安徽(Anhui), 人血 Human blood	0/67	0/20	-	-
40, B78	EM5	山东(Shandong), 人血 Human blood	0/56	0/21	+	-
41, F142	EM4	云南(Yunnan), 褐线鼠 <i>E. flavus</i>	1/23	0/22	+	+
42 J10	SM17	辽宁(Liaoning), 褐家鼠 <i>R. norvegicus</i>	1/26	0/20	+	+
P	Sample-2		1/15	0/29	+	+
N	24		0/14	0/17		
	27		0/41	0/37		
31			0/54	0/26		
35			0/17	0/17	-	
36			0/21	0/20	-	
E, 7b 118	Vero-E6 cell virus				+	
43, 陈林	Mouse brain virus				+	
44 A9	Mouse brain virus					+

Notes: 1. EM, Vero-E6 适应后接种乳鼠脑; R, 大鼠; SR, 乳大鼠; M, 小鼠; SM, 乳小鼠

EM, Vero-E6 adaptive virus intracranially inoculated suckling mouse; R, *Rattus norvegicus*; SR, Suckling *Rattus norvegicus*; M, *Mus musculus*; SM, Suckling *Mus musculus*; P, Positive control; N, Negative control

2. 22 和 38 这两份样本在退火温度 57℃ 时为阴性, 而将退火温度降至 50℃ 时及 45℃ 时, 可检出 HERSV-RNA, 故用-(+)表示

2. 22 and 38 samples were negative when annealing temperature was set at 57℃ but positive at 50℃ or 45℃, indicating as -(+)

2 cELISA 法的检测结果

表1为cELISA检测所得 OD_{450} 值。以 $P/N \geq 2.10$,且 $P-N \geq 0.10$ 为阴、阳性判定标准,36份标本中有30份可判为阳性。

3 IFA 检测结果

IFA检测39个毒株,用荧光标记的兔抗HFRSV染色后,经荧光显微镜镜检,均可观察到特异性荧光团块。

4 RT-PCR 及 cELISA 检测结果的比较

对比两种方法检测39份标本的结果,发现有6份标本经RT-PCR检测为阳性,cELISA检测为阴性;5份阴性对照标本(24、27、31、35、36)经两方法检测均为阴性;27份标本经两法检测均为阳性;有一份标本(39)经cELISA检测为阳性,而RT-PCR检测为阴性。RT-PCR及cELISA的检出率分别为97.6%及82.4%,二者符合率为84.6%。

5 分型

在扩增片段上,HTNV型有两个AluI酶切位点,SEOV型有3个AluI酶切位点。用AluI酶切本研究的RT-PCR产物,有15份可被切开。其中8份样本的酶切图为三条带,表明为HTNV型;7份样本酶切图谱为两条大带和两条小带,表明为SEOV型。其余23份RT-PCR产物未能被AluI酶切,或酶切图谱难以分型。

讨 论

HFRS是我国广泛流行的传染病,目前认为其病原HFRSV在我国只有HTNV及SEOV两型,它们在毒力及流行特点等方面均有所不同。提供快速、灵敏的检测及分型方法,对预防、诊断、治疗及判断预后均有重要意义。

本试验根据HTNV及SEOV两型HFRSV M节段的核酸序列,自行设计引物,建立RT-PCR法并对条件进行了优化,检测39株分离毒株的鼠脑或细胞感染物。同时与建立的cELISA法检测结果进行了比较,显示两方法均有较好的特异性,且RT-PCR比cELISA的检测率更高。

PCR技术的关键在于引物选择及循环参数的优化。本试验通过cELISA和IFA证明,进一步优化RT-PCR反应条件后,提高了该法的检出率。12、22号样本虽未得到299 bp的目的条带,但得到约577 bp的条带,经生物素探针杂交试验证明,该条带为HFRSV特异性核酸。其他阴性对照均无此带。12号、22号样本中的病毒核酸与其他样本中的病毒核酸有较大的差异,对这两个毒株的进一步研究正在进行之中。

经RT-PCR验证,本实验所设计的引物具有通用性,检出率高达97.7%,可望用于我国HFRS的流行病学调查。cELISA灵敏度虽比RT-PCR低15.2%,但与RT-PCR检测符合率达84.6%,且操作较简便,亦具有推广应用的价值。

HFRSV的HTNV及SEOV两型在致病力、流行特点等方面存在较大差异,建立该病毒的分型方法颇为重要。分析HTNV型代表株76-118株和SEOV型代表株R22株的核苷酸序列,发现本研究所扩增的299 bp片段中,HTNV型存在两个AluI酶切位点,SEOV型存在三个AluI酶切位点,因此将扩增产物用AluI酶切后,其电泳图谱应有明显差异。本研究对这种方

法分型进行探讨,采用 AluI 单酶切可将 39.5% 的分离毒株分为两型,显示了酶切分型的可行性。若与其他识别碱基序列较短的限制酶酶切相结合,可望进一步提高酶切分型的百分比和准确性。

参 考 文 献

- 1 Eugene V R, Pierre E R, Thomas G K *et al.*. Genetic and serologic analysis of black creek canal virus and its association with human disease and *Sigmodon hispidus* infection. *Virology*, 1995, 210: 482~489
- 2 Pilapap P, Ho WL, Yong K *et al.*. Typing of hantaviruses from five continents by polymerase chain reaction. *Virus Research*, 1992, 26: 1~14
- 3 Xiao SY, Chu YK, Fredrick KK *et al.*. Comparison of hantavirus isolates using a genus-reactive primer pair polymerase chain reaction. *J Gen Virol*, 1992, 73: 567~573
- 4 唐家琪,李越希,李先富等. PCR 和生物素探针针对 HFRSV 的检测和分型的探讨. *中国病毒学*, 1994, 9(1): 25~30
- 5 Protr C, Nicoletta S. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162: 156~159
- 6 金冬雁,黎孟枫,侯云德等译.《分子克隆》实验指南 第二版 北京:科学出版社,1995.
- 7 唐家琪,陈克芳,李先富等.肾综合征出血热病毒单克隆抗体的制备及其特性研究. *中华免疫学杂志*, 1988, 4(5): 260~262

Detection and Genotyping of Hantaviruses Using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Lei Wanli* Tang Jiaqi Lu Chengping* Pan Xiuzhen Li Xianfu

(*East-China Medical Institute of Biological Techniques, Nanjing 210002*)

(**College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095*)

Abstract Common primers were designed, based on M segmental sequences of two HFRSV serotypes—HTNV and SEOV, and RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction) method was applied in detecting 39 strains of isolated hosts from different areas. Thirty six of the 39 samples were tested by cELISA (capture-ELISA) in duplicated wells, while $P/N \geq 2.10$ and $P - N \geq 0.10$ the result was considered to the positive. The detection rates of RT-PCR and cELISA were 97.6% and 82.4% respectively, 84.6% in correspondence. Fifteen of 38 RT-PCR products could be digested by restriction endonuclease AluI. According to the restriction map the HFRSV detected was classified into two types—HTNV and SEOV.

Key words HFRSV, RT-PCR, cELISA, Detection, Type