维普资讯 http://www.cqvip.com

第13卷第3期 中 国 病 毒 学 Vol.13 No.3
1998年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1998

用反转录-聚合酶链反应检测B组轮状病毒*

韩新岳** 张福莲 王正党 黄嘉驷

(新疆农业大学动物医学系,乌鲁木齐 830052)

关键词 B组轮状病毒,双链RNA(dsRNA),反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

轮状病毒(Rotavirus)是属于呼肠病毒科(Reoviridae)的双链RNA(dsRNA)病毒。至今已将轮状病毒分为七个组(A~G)。已经发现的B组轮状病毒分别来自人、大鼠、牛、猪、羊。近十年来,通过轮状病毒的研究,轮状病毒B组已被公认为引起人及不同动物腹泻的流行病学的重要因素[1]。又由于B组轮状病毒和引起人腹泻的A组与C组轮状病毒的亲缘关系很近,对B组轮状病毒的研究受到日益重视。

传统病毒学检查中,免疫分析法是实验室诊断的主要方法。目前商业化生产的免疫检测试剂多是针对A组轮状病毒(GARV),虽然已经发展了B组轮状病毒(GBRV)的免疫检测及免疫电镜技术,但由于B组轮状病毒不同与A组和C组轮状病毒,无法通过体外细胞培养进行增殖,故无法大规模制备GBRV的抗血清,因而免疫诊断存在困难[1,2]。尚有一些其它技术用于检测GBRV,但仍存在局限性,如常用的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测通常要求10 ng以上的病毒RNA;核酸杂交虽行之有效,灵敏度较高,但这种方法需要特异的克隆探针[3]。因此,建立一种快速、灵敏和准确的实验室诊断方法就极为必要。

材料和方法

A组轮状病毒SA-11由中国预防医学科学院病毒学研究所洪涛院士提供,NCDV株由江苏农科院提供。其余各株均为本室近十年来采集并鉴定后低温保存的样品(-70℃)。

反转录酶AMV、Taq DNA聚合酶为Promega产品,dNTPs购自华美公司。

寡核苷酸引物:采用亚磷酰胺法在军事医学科学院合成。引物P1:IDIR基因3正链的899~919碱基。在它的5'端有一个接头区(带有EcoR I酶切位点)。5'CGGAATTCATGGAGGCCGGCCACAGAC 3'(划线部分是病毒核酸特异序列)。引物P2:IDIR基因3负链1175-1155碱基,在它的5'端有一个接头序列(带有BamH I酶切位点)。5'CGGGATCCTAGAAGTATCTATCTGTGCA 3'(划线部分是病毒核酸特异序列)。

DNA扩增仪是上海复生PCR-100A产品。

从MA-104细胞提取SA-11(A组轮状病毒)基因组RNA参考Shen介绍的方法[4]。从粪样中提取轮状病毒基因组RNA参照王正党等的方法[5]。用紫外吸收法分别测定260 nm和280 nm的光吸收值,以测定核

收稿日期:1997-11-03,修回日期:1997-12-26

* 本课题是新疆科委重点科研项目

** 现在地址:中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室,北京 100080

维普资讯 http://www.cqvip.com

酸样品的相对纯度和含量。

轮状病毒双链RNA的反转录-聚合酶链反应(RT－PCR)参照Eiden和Gouvea的方法[1,6]。1～5 μL提取纯化后的轮状病毒双链RNA反转录后，按下列程序进行PCR扩增：94 ℃，50 s；55 ℃，60 s；72 ℃，60 S．30个循环后，72 ℃延伸10 min。取上述PCR反应后的混合物1～5 μL，作为二次PCR的模板。加入PCR反应混合物(终体积50 μL)。扩增条件与上述PCR反应条件完全一致．PCR反应产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳或7.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)进行检测。

结果与讨论

轮状病毒基因组由11个分片段dsRNA组成，但各组轮状病毒dsRNA基因组不同，同组内不同株的dsRNA基因组也不同(见图1)。按Saif电泳图型分组[7]，A组轮状病毒基因组电泳后呈典型的4:2:3:2带型分区；B组轮状病毒基因组呈4:2:2:3带型；而C组轮状病毒基因组呈4:3:2:2带型特征。血清学组抗原检测的结果表明Saif的这种分型方法有一定参考意义，但最终分型需通过免疫学检测得以验证[8]。

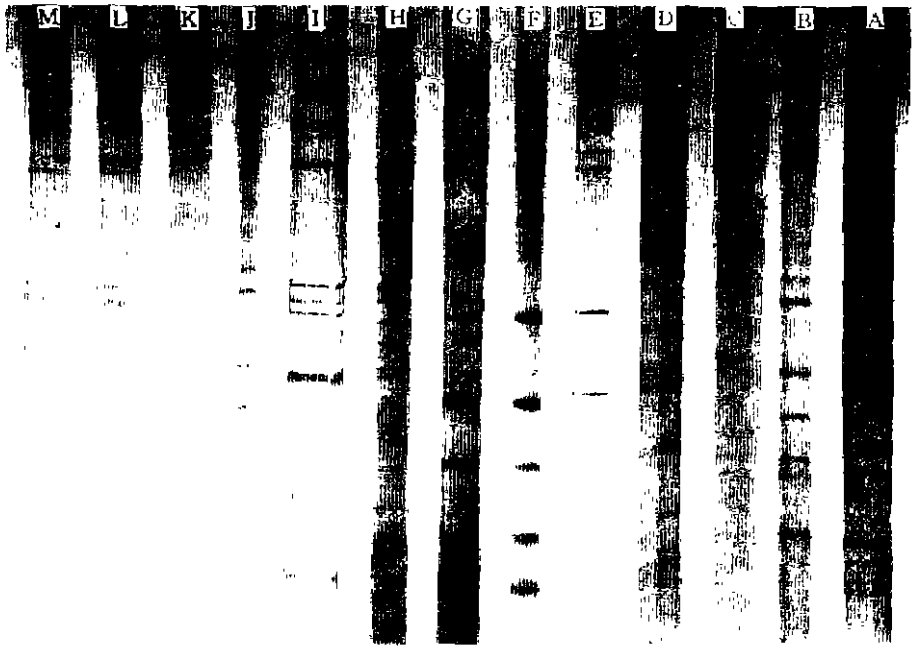


图1 几种轮状病毒核酸的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

左边罗马数字显示dsRNA大小分组。从A到M分别是：A：羊羔A组(Alken株)；

B，J：仔猪B组(PB1株)；C：仔猪B组(PB2株)；D，K：羊羔B组(KB－63株)；

E：KB－63株实验感染的犊牛；F：E回归山羊；G：D回归山羊；H：仔猪C组(PC1株)；I：仔猪C组(PC2株)

L：K与M的混合电泳；M：仔猪C(PC3株)

Fig. 1 Schematic of RNA electropherotypes of various rotavirus in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Migration is from top to bottom. Roman numbers on the left designate dsRNA size classes. Lanes: A: lamb GARV (Alken); B, J: porcine GBRV(PB1); C: porcine GBRV(PB2); D: kid GBRV(KB－63); E: KB－63 infected calf; F: E infected kid; G: D infected kid; H: porcine GCRV(PC1); I: porcine GCRV(PC2); K, lamb GBRV (KB－63); L: K + M; M: porcine GCRV(PC3)

维普资讯 http://www.cqvip.com

山羊 GBRV KB-63 株基因组经 PAGE 后，采用日本薄层色谱扫描仪 CS－900 在 550 nm 波长下对其进行光密度扫描测定（见图 2）。峰值所显示的数字对应于相应的基因片段，可以看出轮状病毒基因组在电泳图谱中分段排列的规律。

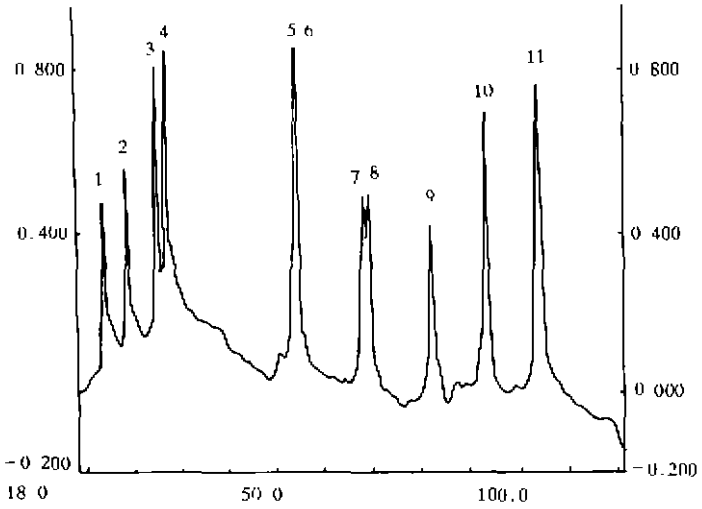


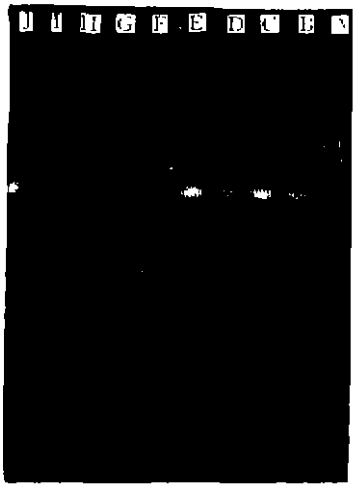
图 2　山羊 KB－63 株基因组的光密度测定
峰值所显示的数字对应于相应的基因片段

Fig 2　Densitometric tracings of the genome profiles of GBRV KB-63 strain peak numbers correspond to gene segment numbers

10 μL 的 PCR 扩增产物于 1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳，60V 电泳 1 h 后，溴化乙锭染色 15 min，紫外下观察结果（见图 3）。2 μL 的 PCR 扩增产物 7.5%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳，30 mA 电泳 1 h，银染显色（见图 4）。箭头所示位置为 290 bp 的扩增产物。从感染了 KB－63 株的山羊、绵羊和牛的腹泻粪样中提取的核酸，经 RT-PCR，电泳检测后，均获得特异的扩增产物，片段大小（290 bp）与预期相符。同时检测各株 A 组、C 组和猪 B 组轮状病毒所感染的粪样和健康牛的粪样，未获得特异的扩增产物。

早先核酸杂交的结果证实 GBRV IDIR 3 片段基因克隆可以检测出几个不同来源株的 GBRV RNA[3]，IDIR 3 片段基因的核酸序列与报道的 GARV 基因不互补，其末端序列与 GARV 各株中保守的末端序列也不同[9]，说明了 GBRV 基因 3 序列的相对保守性。而我们在感染了 GBRV 的绵羊、山羊和牛腹泻粪样中用 RT－PCR 的方法得到长度为 290 bp 的特异扩增片段。王正党等[5]经实验证实，引起绵羊和山羊腹泻的同一株轮状病毒（KB－63 株），且该病毒能引起剥夺初乳的犊牛腹泻，其病毒形态，核酸电泳图型、ELISA 组抗原检测均与原接种毒株 KB－63 一致。迄今为止，我们在新疆地区所检测出的绵羊、山羊 B 组轮状病毒都有相同的电泳图型，而检测的仔猪 B 组和 C 组电泳图型则多有不同[8]。我们的核酸杂交结果也说明了感染绵羊、山羊的 B 组轮状病毒在这一区段的保守性（待发表），更进一步的基因序列方面的工作尚待进行。

采用 IDIR 株 3 基因的引物对 A 组轮状病毒（GARV）、猪 B 组轮状病毒（GBRV）和 C 组轮



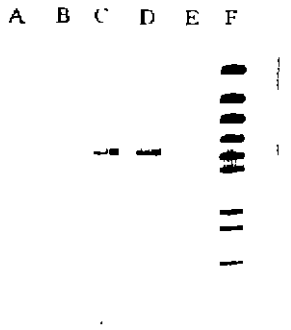


图3 PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

10μL扩增样品电泳后用溴乙锭染色。箭头所示的是290 bp的RT－PCR产物。A:DNA分子量(PGEM7Zf(＋)/HaeⅢ);B:山羊B组(KB－63株);C:KB－63实验感染牛;D:绵羊B组(KB－63株);E:B组KB－63株的二次PCR扩增;F:猴A组(SA－11株);G:山羊A组(Alken株);H:猪B组(PB2株);I:猪C组(PC1);J:未感染犊牛粪样

Fig 3 Electrophoretic analysis of the PCR－amplified products on 1.5% agarose gel

10μL samples of the RT－PCR mixture were analysed. The arrowhead indicates the position of the 290 bp PCR product. Lanes: A: marker; B: kid GBRV(KB－63 strain); C: KB－63－infected calf; D: lamb GBRV; E: second-PCR amplification of GBRV KB－63 strain; F: simian GARV (SA－11 strain); G: kid GARV (Alken strain); H: porcine GBRV (PB2 strain); I: porcine GCRV(PC1 strain); J: uninfected calf specimen (calf hour, 18 hr)

图4 PCR产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

取2μL扩增后的样品,电泳后银染显色。箭头所示是290 bp PCR扩增产物所在位置。A:山羊A组(Alken株);B:猪B组(PB2株);C:山羊B组(KB－63株);D:KB－63株实验感染犊牛后的腹泻粪样;E:猪C组(PC1株);F:DNA分子量标准(PGEM7Zf(＋)/HaeⅢ)。从上至下分子量分别为:657,458,434,328,289,267,174,142,102,80 bp。G.未感染牛粪样。

只有C和D能够产生290bp的特异扩增片段。

Fig 4 Polyacrylamide gel of PCR products with IDIR gene 3－specific primers

2μl samples of the RT－PCR mixture were visualized by means of PAGE and silver staining. The arrowhead indicates the position of the 290 D: KB－63－infected calf specimen; E: porcine GCRV(PC1 strain); F: DNA marker [PGEM 7Zf(＋), Hae Ⅲ]. From top to bottom: 657, 458, 434, 328, 289, 267, 174, 142, 102, 80 bp. G: uninfected calf. Only C and D produce a characteristic segment length.

状病毒(GCRV)感染的腹泻粪样进行检测不能得到目的基因片段的扩增产物。Eiden等在1991年的最初报道中采用对应于GBRV IDIR株3片段基因的引物进行RT-PCR,只能检测出大鼠和牛的B组轮状病毒。同时采用对应于GBRV ADRV株11片段基因的一对引物进行扩增,检测出成人和大鼠的B组轮状病毒[1]。所不同的是,我们采用IDIR株3片段基因的特异引物,用RT-PCR从山羊、绵羊和牛的腹泻粪样中成功地检测到B组轮状病毒。目前已应用RT－PCR对A组轮状病毒进行了分型[10],但由于B组轮状病毒不同于A组和C组轮状病毒,无法通过细胞培养进行增殖[1,2];电镜结果也已证实,B组轮状病毒在粪样中结构不稳定,

维普资讯 http://www.cqvip.com

降解、破碎比A组要严重得多[5]，大大增加了GBRV分子生物学研究的困难。综合这些结果，我们认为：就B组轮状病毒而言，为了选择一对通用引物和数对型特异性引物，对各种GBRV株的核酸序列进行分析是必要的。

理想状态下，PCR相当灵敏，但粪样中存在的反转录酶抑制物会影响检测的灵敏度[1]。此外，引物中的二级结构对扩增也有影响。采用二次PCR技术后，能够弥补第一次扩增实验中的某些不足，从而使PCR技术更趋完善。尤其是在样品较少情况下，可通过二次PCR获得大批量的cDNA，便于研究工作的进行，充分体现出PCR快速、灵敏的特点。

参 考 文 献

1 Eiden J J, Wilde J, Ftroozmand F *et al*. Detection of animal and human group B rotaviruses in fecal specimens by polymerase chain reaction J Clin Microbiol, 1991, 29(3): 539－543

2 Vonderfecht S L, Schemmer J K. Purification of the IDIR strain of group B rotavirus and identification of viral structural proteins. Virology, 1993, 194: 277－283

3 Eiden J J, Firoozmand F, Sato S *et al*. Detection of group B rotaviruses in fecal specimens by dot hybridization with a cloned cDNA probe. J Clin Microbiol, 1989, 27·422－426

4 Sben S, Berke B, Desselberger U. Rearrangment of the up 6 gene of A group rotavirus in combination with a point mutation affecting trimmer stability. J Virol, 1994, 3: 1682－1688

5 王正党，王林卿，单文鲁等.从绵羊羔和山羊羔腹泻粪样中检出B组轮状病毒.病毒学报，1989，5：129－132

6 Gouvea V, Glass R I, Woods P *et al* Polymerase chain reaction amplification and typing of rotaviruses nucleic acid from stool specimens. J Clin Microbiol, 1990, 28(2): 276－282

7 Saif L J. Nongroup A Rotavirus. In: Viral diarrheas of man and animal Boca Raton Florida: CRC Press, 1990. 73－95

8 王正党，单文鲁，黄嘉猷等.新疆幼畜和人非典型轮状病毒的调查和鉴定.病毒学报，1995，11(4)：336－341

9 Sato S, Yolken R H, Eiden J J. The complete nucleic acid sequence of gene segment 3 of the IDIR strain of group B rotavirus Nucleic Acid Research, 1989, 17(23): 10113

10 Gentsch J R, Glass R I *et al*. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 1992, 30(6): 1365－1373

Detection of Group B Rotavirus by RT-PCR

Han Xinbing[1,2]　Zhang Fuping[1]　Wang Zhengdang[1]　Huang Jiasi[1]

[1](*Faculty of Animal Medicine, Xinggiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052*)

[2](*State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080)

Abstract　A diagnostic assay was presented to detect group B rotavirus (GBRV) in fecal specimens with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). GBRV double-strand RNAs (dsRNA) isolated from stool samples were reverse transcribed and amplified by PCR using two oligonucleotide primers which were derived from genomic segment 3 of the IDIR (intestinal disease of infants rat) strain of GBRV. This RT-PCR assay permitted the sensitive and specific

维普资讯 http://www.cqvip.com

detection of a variety of GBRV in fecal specimens. Wild GBRV strains of lamb, kid were detected with these primer pairs by RT-PCR. Moreover, RT-PCR also permitted the detection of genomic RNA of lamb GBRV KB-63 strain which has been adapted to serial passage in cattle. The specific PCR products of 290 bp suggested that GBRV from lamb, kid and calf had identical sequences in genomic RNA; whereas the samples from fecal specimens containing group A rotaviruses (GARV), swine group B rotavirus (GBRV) and group C rotavirus (GCRV) or fecal specimens from uninfected controls gave negative reaction.

Key words Group B rotavirus, Double-strand RNA (dsRNA), Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)