

RT-PCR 检测蓝舌病毒技术的建立*

张芑玮,董长垣**,涂攀,郭淑芳,陈晓,严银芳

(武汉大学医学院医学病毒研究所,湖北武汉 430071)

Development of RT-PCR Assay for the Detection of Bluetongue Virus*

ZHANG Peng-wei, DONG Chang-yuan**, TU Pan, GUO Shu-fang, CHENG Xiao, YAN Yin-fang

(Institute of Virology, Medical School of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: Using primers complementary to the conserved sequence previously published of BTV genomic dsRNA segment 7, a part of the 5' end of segment 7 was synthesized and amplified by RT-PCR method. We adapted this method to test on 12 blood samples suspected to be with BTV and the blood sample of a health sheep as a negative control. The results suggested that eleven of the twelve samples were positive, one was negative. In order to compare the sensitivity and reliability of RT-PCR technique, Vero cells were used to isolate BTV from these suspected samples and the results will be a control. The study proved that RT-PCR is a rapid, sensitive and precise method for detection and identification of bluetongue virus in clinical samples, animal quarantine and scientific research.

Key words: Bluetongue Virus; RT-PCR of DsRNA; Detection of virus nucleic acid

关键词: 蓝病毒; dsRNA 的 RT-PCR; 病毒核酸检测

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2001)04-0393-04

蓝舌病毒(Bluetongue Virus, BTV)是呼肠孤病毒科(*Reoviridae*)环状病毒属(*Orbivirus*)的代表种,含 10 个节段的双链 RNA(dsRNA)作基因组。其中, L₂ 节段编码 BTV 型特异性抗原 VP2, L₃ 节段和 S₇ 节段编码群特异性抗原多肽 VP3 和 VP7。其中, VP7 是 BTV 粒子的主要结构多肽之一,其编码基因序列保守。VP7 具有高度的抗原性,能刺激被感机体产生强的群特异性免疫反应^[1]。

蓝舌病毒的易感宿主是牛、羊及野生反刍动物,死亡率高达 60%~70%以上,并且至今仍无有效的防治措施,对畜牧业危害极大,被《动物检疫》列为一类传染病^[2]。国内用于检测该病毒病的传统方法是

利用 BTV 可溶性抗原检测牲畜血清抗体,该方法一方面诊断符合率不高,另一方面难以达到早期诊断目的。因此,建立快速、灵敏、早期、准确的检测技术对切断传染源和控制疾病流行具有极为重要的意义。

本研究拟在我们对 BTV 分子生物学和血清诊断学研究的基础上,进一步发展 BTV 分子诊断技术。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 国际标准株 BTV-10 为本实验室保存的毒种; BTV-HbC 株系我们自湖北省某种畜场分离

收稿日期: 2001-04-17, 修回日期: 2001-06-11

* 基金项目: 国家自然科学基金(39270031); 湖北省九五“攻关”项目课题(130275)

作者简介: 张芑玮(1974-), 女, 湖北籍, 硕士, 主要从事医学分子病毒学研究。

** 通讯作者: 董长垣(1949-), 男, 湖北籍, 教授, 主要从事分子病毒学和分子生物学研究。Correspondence author.

到的中国蓝舌病毒湖北株。

1.1.2 病羊血样 12 例蓝舌病可疑样品取自湖北省某种畜场可疑病羊的肝素抗凝全血;同法收集健康绵羊全血一份,作对照。

1.1.3 Vero 细胞为本室保存的常用细胞

1.1.4 试剂 M-MLV 逆转录酶、Taq 酶、RNasin 等分子生物学试剂均购自 Promega 公司。

1.1.5 引物的设计与合成 根据蓝舌病毒标准株 BTV-10 S₁ 基因的已知序列^[3],应用 oligo 4.0 引物设计软件设计一对特异性引物,由上海博亚公司合成。引物序列如下:P₁:5'AGC CAT ATG TTG AGT ATA 3'(上游 267bp~285bp);P₂:5'TAG AGA TGG ACA CTA TCG C 3'(下游 13bp~31bp)

1.2 方法

1.2.1 BTV-10 株和 BTV-HbC 株的增殖 将 BTV-10 株和 BTV-HbC 株分别接种于单层 Vero 细胞上,37℃ 吸附 1h,弃去病毒液,加含 2% 小牛血清的 MEM 维持液,置 37℃ 培养。待细胞病变达到 90% 时,收获病毒。

1.2.2 BTV-10 株和 BTV-HbC 株基因组的 dsRNA 的提取按文献方法进行^[4]。

1.2.3 病毒的分离 12 份待检样品各取 5mL 分别置于 12 个无菌试管,每试管加 5mL PBS (pH7.2),1 500r/min 离心 10min,沉淀再用 PBS 洗涤两次。用 2mL 生理盐水悬浮细胞,反复冻融三次。5 000r/min 离心 10min,取上清接种于单层 Vero 细胞。盲传三代,观察细胞病变效应(CPE)。

1.2.4 待检样品中病毒 RNA 的提取 12 份待检样

品各取 3mL,分别置于 12 个无菌试管,每试管加 5mL PBS (pH7.2),1 500r/min 离心 10min。沉淀用于病毒 dsRNA 的提取^[4]

1.2.5 逆转录 取病毒 RNA 提取液 2μL 用于逆转录^[4]。

1.2.6 聚合酶链式反应 取逆转录反应混合物 5μL 用于聚合酶链式反应^[4]。

2 结果

2.1 应用该 RT-PCR 技术扩增并检测出了国际标准株 BTV-10 和中国湖北株 BTV-HbC,大小为 273bp,电泳结果如图 1。

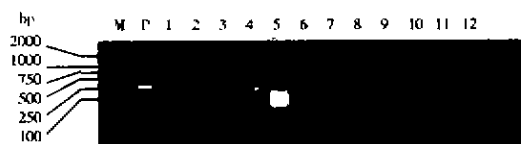


图 1 RT-PCR 检测样品电泳图

M, Marker; P, 阳性对照 (BTV-10 株); 1-12, 可疑蓝舌病绵羊血液样品; N, 阴性对照 (健康绵羊血)。

Fig. 1 RT-PCR Product electrophoresis of detecting samples Lane M, Marker DL2000; P, Positive Control (BTV-10); 2-12, Blood samples suspected to be with BTV; N, Negative Control (Samples of health sheep)

2.2 应用此 RT-PCR 系统,我们共检测了 12 例待检血液样品。其中 11 例扩增出一条与标准株 BTV-10 结果相同大小的核酸序列,而第 7 例标本血和健康绵羊血未见扩增出相应的核酸序列。有关 RT-PCR 扩增产物电泳结果见图 1 和表 1。

表 1 RT-PCR 检测 BTV-10 株及不同临床样品中 BTV dsRNA 的结果

Table 1 The results for detecting BTV dsRNA of BTV-10 and samples through RT-PCR

样品 (Samples)	BTV-10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	阴性血 (negative control)
结果 (Results)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-

注明:“+”表示扩增片段阳性,与 Maker 一致,“-”表示阴性。“+” means positive results,“-” means negative results.

2.3 用 Vero 细胞分离病毒结果如图 2 和表 2。图 2-A,示阴性对照和阴性标本经病毒分离后的细胞形态。可见细胞生长良好,形态多样,轮廓清晰,结构完整,且可见到细胞分裂相。图 2-B,示 Vero 细胞分离阳性标本病毒产生 CPE 的光学显微镜照片。照

片中可见到细胞收缩变圆,细胞膜分界模糊,出现细胞融合,细胞内颗粒增多,部分细胞大片脱落和破碎。病毒分离结果表明,12 例标本中有 11 例(11/12)出现 CPE,1 例正常,此亦第 7 号样品。

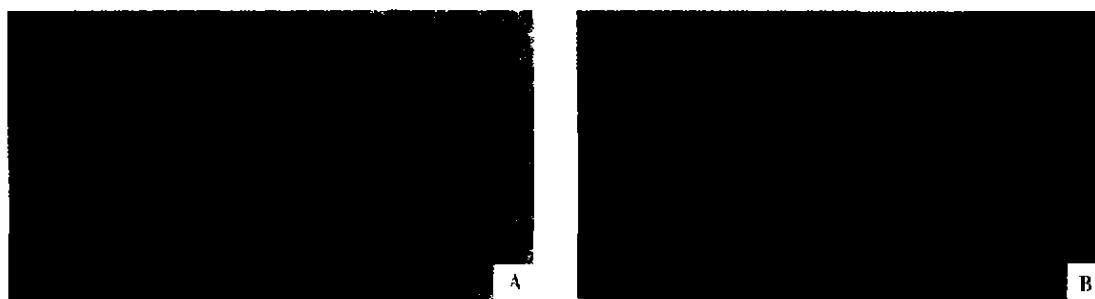


图2 Vero 细胞单层接种绵羊血后细胞形态($\times 400$)

A, 接种了健康绵羊血的 Vero 细胞, 细胞形态正常, 结果阴性; B, 接种了可疑蓝舌病绵羊血的 Vero 细胞, 细胞形态可见到典型的 CPE 现象, 结果阳性。

Fig.2 Vero cells inoculated with blood samples ($\times 400$)

A, vero cells inoculated with health sheep blood are normal, the results are negative; B, the CPE emerged from the vero cells inoculated with suspectable sheep blood, the results are positive.

表2 Vero 细胞分离 BTV 观察 CPE 的结果

Table 2 BTV isolation of samples using vero cells

样品 (Samples)	BTV-10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	阴性血 (negative control)
结果 (Results)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-

注明:“+”表示产生典型的 CPE,“-”表示不产生 CPE;“+”means CPE,“-”means no CPE.

3 讨论

蓝舌病毒感染牛、羊及野生反刍动物,引起病毒血症,并导致弥漫性血管内凝血(DIC),是该病毒致动物死亡的原因。患病动物血浆内病毒滴度很低,病毒主要存在于单核细胞、巨噬细胞、嗜中性细胞和内皮细胞^[2,9]。红血细胞上亦结合有大量病毒粒子。因此,我们采用低速离心收集病畜全血的有形成份,用于本研究,一方面增加了阳性检出率,另一方面缩小了待检样品体积,有利于操作。

BTV 的基因组是分节断的 dsRNA 分子。这种分子欲进行逆转录合成 cDNA 困难很大,关键是寻找适当的 dsRNA 解链条件。因此,我们探索了应用甲酰胺、7M 尿素、羟甲基汞和温度变性等方法。结果证明,温度变性只要操作适当,亦可解决好这一难题,同时也有利于后续 PCR 操作的进行。经反复比较,发现 95℃ 8min 处理 BTV S₇ 片段 dsRNA 便能有效地使该 dsRNA 片段变性,并适于后续 RT-PCR 反应。

S₇ 基因是一个保守基因,它编码 BTV 粒子的主要结构多肽 VP7。VP7 具有很强的抗原性,携带有 BTV 群特异性抗原决定簇,能刺激机体产生群特异性免疫反应^[5,10]。因此,我们选用蓝舌病毒编码群

特异性抗原基因 S₇ 片段,设计引物,建立该病毒 dsRNA RT-PCR 技术,这无疑是早期准确诊断动物感染 BTV 的有力依据。

国外已报道用这种方法可直接检测被感动物组织中 BTV 的 M₆ 片段^[11]。由于我国对建立这种诊断方法检测 BTV 尚处在探索阶段,所以我们在对 BTV RNA 保守区段了解的基础上,探讨了 RT-PCR 方法直接检测血液中的 BTV 的可能性,结果证明能有效、准确检测我省境内患病动物血液中的 BTV 双链核酸。

本实验共检测了两个实验室纯株(BTV-10 和 BTV-HbC)和 12 例临床样品,共 14 个受检对象。结果,有效地扩增了 13 个受检对象。我们用配对的方法就这 12 个临床样品进行了病毒分离,观察是否出现典型的 BTV CPE,其结果与我们的 RT-PCR 检测结果完全一致。有力地佐证了该 RT-PCR 系统检测 BTV 的极大可行性和可信性。从而展示了将该方法发展成检测药盒,提供市场,以解决畜牧业生产、海关检疫和实验室研究的潜在价值。

参考文献

- [1] 董长垣. 现代分子病毒学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1996. 184-185.
- [2] 于大海, 崔砚林. 中国进出境动物检疫规范[M]. 北京: 中国农

- 业出版社,1997.304-310.
- [3] Timothy F, Kowalik, Li J K K. Bluetongue Virus Evolution. Sequence Analyses of the Genomic S₁ Segment and Major Core Protein VP7[J]. *Virology*, 1991, 181: 749-755.
- [4] J. 萨姆布鲁克等. 分子克隆实验指南[M], 第二版, 北京: 科学出版社, 1992. 343-451.
- [5] Ahmad A. Bluetongue: laboratory diagnosis[J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1994, 17(3-4): 221-42.
- [6] Anderson J. Use of monoclonal antibodies in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus[J]. *J Immunol Methods*, 1984, 74: 139-149.
- [7] Chinsangaram J, Hammam S, Osburn BI, et al. Detection of bluetongue virus using a cDNA probe derived from genome segment 4 of bluetongue virus serotype[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4(4): 400-405.
- [8] Kowalik T F, Li J K K. Sequence Analyses and structural Prediction of Double Stranded RNA Segment S₁ and VP7 from United State Prototype Bluetongue Virus Serotypes 13 and 10[J]. *Virology*, 1989, 172: 189-195.
- [9] McColl K A, Gould A R. Detection and characterization of bluetongue virus using the polymerase chain reaction[J]. *Virus Research*, 1991, 21: 19-34.
- [10] Dang C A, de Mattos C A, et al. Identifying bluetongue virus ribonucleic acid sequences by the polymerase chain reaction[J]. *J Virol Methods*, 1990, 28: 281-292.
- [11] Bandyopadhyay SK, Kalaria RS, et al. Detection of bluetongue virus genome segment 6 sequences by RT-PCR[J]. *Res Vet Sci*, 66(3): 247-252.

会议报道

第34届国际无脊椎动物病理学会(SIP)会议简介

第34届国际无脊椎动物病理学会议于2001年8月25日-30日在荷兰 Noordwijkerhout 召开, 来自美国、加拿大、英国、德国、法国、丹麦、荷兰、日本、中国等30个国家的代表400余人参加了本次会议。大会共交流论文328篇。其中大会报告三个; 1. 果蝇免疫系统的信号传导 2. 由杆状病毒介导的新的调节细胞凋亡的机制 3. 昆虫及昆虫病原线虫间的宿主-寄生物相互作用关系; 专题讲座18个(含78个报告); 分组报告121个(病毒学42个、真菌28个、线虫14个、细菌23个、原生动物6个、交叉讨论8个); 墙报126个(病毒学45个、真菌32个、线虫14个、细菌30个、原生动物5个)。

共有11位中国学者参加了本次会议, 其中2位学者来自台湾省, 9位分别来自中国科学院武汉病毒研究所、华中农业大学、中山大学昆虫所、武汉大学等单位。我国大陆学者向大会提交论文18篇; 其中病毒类研究论文13篇, Bt类研究论文3篇。病毒类论文的数量较2000年有较大幅度增长(2000年5篇), Bt类研究论文较2000年有所下降, 论文总数较2000年增长(2000年10篇)。

中国科学院武汉病毒研究所胡志红所长应邀作了题为“重组病毒杀虫剂”的专题报告。中国科学院武汉病毒研究所胡志红所长、陈新文研究员和武汉大学齐义鹏教授三人分别作为分组讨论的执行主席, 这表明我国学者在相关领域的学术成就得到国际学术界的认可。

从整个会议的情况看, 目前相关学科的发展趋势是: 1. 以分子生物学为主导, 生态学仍起着重要作用; 2. 进化研究突出; 3. 学科交叉; 例如真菌与微孢子虫等。我国在病毒、细菌研究及应用方面的实力较强, 但是在真菌、线虫、原生动物等方面涉足少。

(中国科学院武汉病毒研究所 梁莉, 胡志红)