

## RT-PCR 方法扩增白蛉热病毒 M 片段的研究

刘东瀛<sup>1,2</sup>, 肖红<sup>1,2</sup>, 郭广松<sup>3</sup>, 文利<sup>1,2</sup>, 叶梦贻<sup>4</sup>, 杨占秋<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 武汉大学医学院病原生物学系, 湖北武汉, 430071; 2. 武汉大学医学院病毒学研究所, 湖北武汉, 430071; 3. 武汉大学中南医院病理科, 湖北武汉, 430071; 4. Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas 77555-0609, USA)

## RT-PCR Methods for Amplifying M Segment of Phleboviruses

LIU Dong-ying<sup>1, 2</sup>, XIAO Hong<sup>2</sup>, GUO Guang-song<sup>3</sup>, WEN Li<sup>2</sup>, YE Meng-yi<sup>4</sup>, YANG Zhan-qi<sup>1, 2\*\*</sup>

(1. Department of Etiology, Wuhan University Medical School, Wuhan 430071, China; 2. Institute of Virology, Wuhan University Medical School, Wuhan 430071, China; 3. Department of Pathology, Wuhan University Zhongnan Hospital, Wuhan 430071, China; 4. Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas 77555-0609, USA)

**Abstract:** To amplify M fragment from unknown Phleboviruses, members of 7 serocomplexes and 8 no complex assigned Phleboviruses, total 42, were chosen and tested. The M segment amino acid sequences of 4 Phleboviruses in GenBank were aligned. Conserved regions were selected to design primers. Oligonucleotides were synthesized according to the cDNA sequences at the conservative regions. Then the oligonucleotides of the same region were mixed together as "cocktail" primers for RT-PCR. The amplification products were examined by agarose gel electrophoresis, purified and sequenced directly. The amplification ratio with primer pair Ph-M-2FM and Ph-M-3RM was 81.0% (34/42), the size of the products were around 600bp. The amplification ratio with Ph-M-2FM and Ph-M-4R2M was 52.3% (22/42), the size of the products were around 1 400bp. BLAST search showed that the sequences of amplicons were homologous with known sequences of Phleboviruses. In this study, partial M fragment of sequence unknown Phleboviruses were amplified and sequenced. The methods described here will be useful for genetic determination, phylogenetic analyses of Phleboviruses, and diagnosis of Phlebovirus infections.

**Key words:** *Phlebovirus*; M segment; RT-PCR

**摘要:** 为建立扩增未知序列白蛉热病毒 M 片段的 RT-PCR 方法, 本研究选取 7 个血清组成员和 8 个未分组血清型, 共 42 株白蛉热病毒为 RT-PCR 检测对象。通过排列 GenBank 中已知的 4 型白蛉热病毒 M 片段氨基酸序列, 选择保守区设计引物。根据保守区各已知病毒的 cDNA 特异序列合成寡核苷酸, 将相同区的寡核苷酸等量混合成为“鸡尾酒”引物, 用于 RT-PCR。扩增产物经电泳检测, 纯化后直接测序。引物对 Ph-M-2FM 和 Ph-M-3RM 扩增产物长度约为 600bp, 从 42 株病毒中扩增出 34 株, 阳性率为 81.0%。另一引物对 Ph-M-2FM 和 Ph-M-4R2M 扩增产物长度约为 1400bp, 扩增出 22 株病毒, 阳性率为 52.3%。测出序列经 BLAST 检索, 与 GenBank 中已知白蛉热病毒同源。本研究首次成功地应用 RT-PCR 扩增不同血清型未知序列白蛉热病毒的部分 M 片段, 并测出扩增产物序列, 为白蛉热病毒属成员的基因鉴定和种系发生关系分析提供了实验手段, 并将有助于白蛉热病毒感染的基因诊断。

**关键词:** 白蛉热病毒; M 片段; RT-PCR

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 05-0437-04

白蛉热病毒属 (*Phlebovirus*) 为布尼亚病毒科 (*Bunyaviridae*) 成员。白蛉热病毒分布于南欧, 非

洲, 中亚和美洲。现已知其中 8 个血清型能导致人类不同程度的临床疾病, 包括短期自限性发热, 视

收稿日期: 2003-04-25, 修回日期: 2003-07-07

作者简介: 刘东瀛 (1974-), 女, 湖北省籍, 博士, 研究方向为白蛉热病毒。电话: 027-87316831。

\*\* 通讯作者: 杨占秋 (1952-), 男, 湖北省籍, 教授, 博士生导师, 研究方向为临床病毒学。Corresponding author. Tel: 027-87331136

网膜炎, 脑炎, 脑膜脑炎, 和致死性出血热等<sup>[1~3]</sup>。白蛉热病毒属现由 68 个不同的血清型病毒组成, 可分为两大抗原群: 沙蝇热群(55 株病毒), 和 Uukuniemi 群(13 株病毒)<sup>[4]</sup>。目前已获得基因序列的白蛉热病毒仅有 5 型: 立夫特谷热病毒 (*Rift Valley fever virus*, RVFV), 潘塔托若病毒 (*Punta Toro virus*, PTV), 西西里沙蝇热病毒 (*Sandfly fever Sicilian virus*, SFSV), 托斯卡那病毒 (*Toscana virus*, TOSV) 和尤库尼亚米病毒 (*Uukuniemi virus*, UUKV)<sup>[5~7]</sup>。由于缺乏基因序列信息, 白蛉热病毒属成员目前仅根据血清学试验进行分类和鉴定<sup>[8~10]</sup>。RT-PCR 方法已被应用于 TOSV 和 RVFV 的检测和诊断<sup>[11, 12]</sup>, 但目前尚无扩增未知序列白蛉热病毒的 RT-PCR 方法报道。本研究应用 RT-PCR 方法扩增未知序列白蛉热病毒部分 M 片段, 为白蛉热病毒属的基因鉴定和种系发生分析提供了实验手段, 并为白蛉热病毒感染的基因诊断打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒

总共 42 株白蛉热病毒被选为 RT-PCR 检测对象, 均为沙蝇热群成员, 其中包括 7 个血清组成员: Sicilian 血清组(7 株病毒), Naples 血清组(10 株病毒), Punta Toro 血清组(9 株病毒), Rift Valley fever 类似病毒(4 株病毒), Frijoles 血清组(2 株病毒), Chilibre 血清组(1 株病毒), Candiru 血清组(1 株病毒), 和 8 个未分组血清型。病毒取自美国得克萨斯大学医学分校世界虫媒病毒参考中心。那不勒斯沙蝇热沙宾株病毒 (*Sandfly fever Naples Sabin virus*) 在 BHK 细胞中增殖, 其它 41 株病毒均在 Vero E6 细胞中增殖。当细胞呈现明显细胞病变时收获病毒。

### 1.2 RNA 抽提

使用 Trizol 试剂(Invitrogen)从感染的单层细胞中提取总 RNA。无 RNAase 水溶解 RNA, -80℃ 保存。

### 1.3 DNase I 处理与 cDNA 合成

在逆转录之前, 使用扩增级无 RNase 的 DNase I (Invitrogen)处理 RNA 抽提液以去除 DNA 污染。终止 DNase I 反应后的混合物直接用于逆转录, 加 dNTPs(Sigma) 0.01 μmole 和随机六聚引物(Promega) 0.1 μg, 65℃ 加热 5min, 快速置于冰上。再加 4 μL 5 × 缓冲液(250mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 375mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 0.2 μmole DTT, 40U RNASEOUT™ 重组 RNase 抑制剂(Invitrogen), 和 50U

SUPERSCRIPT™II RNase H 逆转录酶(Invitrogen)。总反应体积为 20 μL。反应温度为 25℃ 10min, 42℃ 60min, 最后 70℃ 15min 终止反应。

### 1.4 引物设计

从 GenBank 中查到已知沙蝇热群白蛉热病毒 M 片段序列: PTV(GenBank 登记号 M11156)、RVFV (M11157)、TOSV (X89628)和 SFSV (U30500)。应用 ClustalW 程序排列已知 M 片段氨基酸序列, 3 个保守区域(分别命名为 2, 3 和 4 区)被选为引物区。查出各保守区对应的 cDNA 核苷酸序列, 按照各已知的特异序列合成寡核苷酸; 再将相同区的寡核苷酸等量混合成为“鸡尾酒”引物, 用于 RT-PCR。引物的序列和位置列于表 1。正向引物 Ph-M-2FM 由 Ph-M-2F-PT、Ph-M-2F-RVF、Ph-M-2F-SFS 和 Ph-M-2F-TOS 混合而成, 各自对应于 2 区 PT、RVF、SFS 和 TOS 序列。反向引物 Ph-M-3RM 对应于 3 区, 初始由 Ph-M-3R-PT、Ph-M-3R-RVF、Ph-M-3R-SFS 和 Ph-M-3R-TOS 组成。随着工作进展而获得更多序列后, 又设计两个寡核苷酸, 即 Ph-M-3R-ELB 和 Ph-M-3R-27, 加入其中。反向引物 Ph-M-4R2M 对应于 4 区, 由 Ph-M-4R2-PT、Ph-M-4R2-RVF、Ph-M-4R2-SFS 和 Ph-M-4R2-TOS 组成。引物对 Ph-M-2FM 和 Ph-M-3RM, Ph-M-2FM 和 Ph-M-4R2M 分别用于扩增所有待测病毒。引物序列和位置见表 1。

### 1.5 RT-PCR 和扩增产物测序

PCR 反应体积为 50 μL, 包括 2 μL cDNA, 正反向引物各 40 pmol, 4 种 dNTP (Sigma) 各 400 μmol/L, 2.5 单位 Taq DNA polymerase (Sigma), 10mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 覆盖 50 μL 矿物油。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5min; 前 5 个循环是: 94℃ 1min, 40℃ 1min, 72℃ 90s; 然后 35 个循环是: 94℃ 1min, 50℃ 1min, 72℃ 90s; 最后一个循环后, 72℃ 7min 延伸产物。反应产物用含溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。切下扩增产物带, QIAquick 凝胶纯化试剂盒(Qiagen)纯化, PE Biosystem's 373 XL 自动 DNA 测序仪双向测序。测出序列用 BLAST 检索与 GenBank 中序列的同源性, 验证反应的特异性。

## 2 结果与讨论

白蛉热病毒属沙蝇热群成员中, 仅 4 型病毒的 M 片段基因序列为已知。为了应用 RT-PCR 方法扩增出未知序列的病毒, 尝试了以下方法:

1) 排列已知的 4 型白蛉热病毒 M 片段核苷酸序列, 根据相对保守序列设计引物, 未能扩增出大

表 1 用于白蛉热病毒 M 片段 RT-PCR 的“鸡尾酒”引物及其组分的序列和位置

Table 1 The sequences and positions of “cocktail” primers and their components used for RT-PCR of M segment of Phleboviruses

Primer Name	Sequence (5'-3')	Polarity	Position
<b>Ph-M-2FM</b>	<b>GGVMTSMTHAATTAYCAGTGYCA</b>	+	
Ph-M-2F-PT	GGCATCCTAAATTATCAGTGCCA	+	PTV M 2102-2124
Ph-M-2F-RVF	GGCCTGATAAATTACCAGTGCA	+	RVFV M 1737-1759
Ph-M-2F-SFS	GGGATCATCAATTACCAGTGCA	+	SFSV M 2170-2192
Ph-M-2F-TOS	GGACTGCTTAATTACCAGTGCCA	+	TOSV M 2166-2188
<b>Ph-M-3RM</b>	<b>CAYCTYCKNGARCTNARRCA</b>	-	
Ph-M-3R-PT	CACCTCCTAGAGCTAAGACA	-	PTV M 2703-2684
Ph-M-3R-RVF	CATCTCCTTGAGCTCAAACA	-	RVFV M 2350-2331
Ph-M-3R-SFS	CATCTTCTCGAACTTAGACA	-	SFSV M 2780-2761
Ph-M-3R-TOS	CACCTTCGCGAACTTAGACA	-	TOSV M 2785-2766
Ph-M-3R-ELB	CATCTTCTTGAGCTTAAGCA	-	
Ph-M-3R-27	CACCTTCTGGAAGTGAAGCA	-	
<b>Ph-M-4R2M</b>	<b>KMATYRCADGARTARCARCC</b>	-	
Ph-M-4R2-PT	TAATCACAGGAGTAGCAACC	-	PTV M 3485-3504
Ph-M-4R2-RVF	GCATTGCAAGAATAGCAACC	-	RVFV M 3132-3151
Ph-M-4R2-SFS	TCATTGCAAGAATAGCAGCC	-	SFSV M 3562-3581
Ph-M-4R2-TOS	TCATCACATGAATAACAGCC	-	TOSV M 3564-3583

TOSV- Toscana virus; SFSV- Sandfly fever Sicilian virus; PTV- Punta Toro virus; RVFV- Rift Valley fever virus.

R = G or A; Y = C or T; K = G or T; W = A or T; S = C or G; M = A or C; D = A, G or T; H = A, C or T; V = A, C or G; N = A, C G or T.

部分病毒。推测因为白蛉热病毒属成员变异较大, 在核苷酸保守区, 未知病毒序列并不一定与已知序列相符, 故此种引物设计方法未成功。

2) 排列已知的 4 型白蛉热病毒 M 片段氨基酸序列, 选择完全保守区设计引物。根据进化变异规律推测, 未知白蛉热病毒氨基酸序列在保守区发生变异的可能性较小, 而其对应的核苷酸序列则可能是相应简并密码子的随机组合。若将每种可能的核苷酸序列均合成引物, 一并用于 PCR 反应, 则引物成分过于复杂, 易产生二聚体和非特异性结合, 而不能得到特异性产物。试验也未成功。

3) 按照氨基酸保守区各已知病毒序列设计特异性引物对, 分别用于 RT-PCR, 仅有小部分病毒被扩增, 且每株病毒均需试验多个引物对, 较为麻烦。按本文所述方法, 将相同保守区的 4 个引物混合形成“鸡尾酒”引物, 一并用于 PCR, 则正反向引物能以多种方式组配, 扩增效率提高。应用随机 6 聚体引物合成 cDNA, 排除了因引物不配而造成 cDNA 合成失败的可能。降低 PCR 反应退火温度, 使反应严谨度降低, 利用引物错配而提高扩增率。此方法成功扩增了大多数被测白蛉热病毒, 扩增阳性率见表 2。

表 2 应用不同引物对 RT-PCR 扩增白蛉热病毒部分 M 片段阳性率

Table 2 Positive ratio of RT-PCR with different primer pairs for partial M segment of Phleboviruses

Virus serocomplex	Amplification ratio	
	Ph-M-2FM/Ph-M-3RM	Ph-M-2FM/Ph-M-4R2M
	600 bp	1400 bp
Sicilian serocomplex	100% (7/7)	71.4% (5/7)
Naples serocomplex	90.0% (9/10)	70% (7/10)
Punta Toro serocomplex	88.9% (8/9)	66.7% (6/9)
Rift Valley fever serocomplex	50.0% (2/4)	75.0% (3/4)
Frijoles serocomplex	100% (2/2)	0 (0/2)
Others	60.0% (6/10)	10% (1/10)
TOTAL	81.0% (34/42)	52.3% (22/42)

42 株白蛉热病毒中, 应用引物对 Ph-M-2FM 和 Ph-M-3RM 扩增出 34 株病毒, 总阳性率为 81.0%, 产物长度约为 600bp; 引物对 Ph-M-2FM 和 Ph-M-4R2M 扩增出 22 株病毒, 总阳性率为 52.3%, 产物长度约为 1400bp。两对引物均能扩增的有 19 株病毒, 占 45.2%; 仅被引物对 Ph-M-2FM 和 Ph-M-3RM 扩增的有 15 株, 占 35.7%; 仅被引物对

Ph-M-2FM 和 Ph-M-4R2M 扩增的有 3 株, 占 7.1%; 两对引物均未能扩增的有 5 株, 占 11.9%。两对引物扩增率不同, 原因可能是引物对 Ph-M-2FM 和 Ph-M-4R2M 的扩增产物长度超过 1000bp, RT-PCR 的效率有所降低。各血清组扩增率不同, 可能是各血清组成员与已知病毒序列的同源程度有差异, 因此引物结合率不同所致。

测出的部分序列已提交 GenBank, 登记号 AY129732-AY129752。测出序列经过 BLAST 检索, 均与已知的白蛉热病毒序列同源, 从而证实扩增产物为白蛉热病毒序列, 而不是非特异性产物。例如, *Corfou (PA AR 814)* 病毒测出部分 M 片段序列与 *Sicilian (Sabin)* 病毒的同源性为 58.0%; *Tehran (I-47)* 病毒测出序列与 *Toscana (ISS PHL3)* 病毒的同源性为 59.4%; *Buenaventura (Co Ar 3319)* 病毒测出序列与 *Punta Toro (Balliet)* 病毒的同源性为 58.2%。

少数未知序列病毒仍未扩增成功, 推测其序列与已知病毒有较大差异。可进一步换用其它保守区设计引物, 或根据氨基酸简并密码子设计更多引物用于扩增。本研究首次成功地应用 RT-PCR 方法扩增不同血清型未知序列白蛉热病毒 M 片段, 并测出扩增产物序列, 为白蛉热病毒属成员的基因鉴定, 种系发生关系分析和基因诊断打下了基础。

**致谢:** 感谢 Dr. Robert B Tesh 和肖书渊教授对本工作的支持。

## 参考文献

- [1] Bartelloni PJ, Tesh R B. Clinical and serologic responses of volunteers infected with phlebotomus fever virus (Sicilian type) [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1976, 25: 456-462.
- [2] Laughlin L W, Meegan J M, Strausbaugh L J, et al. Epidemic Rift Valley fever in Egypt: observations of the spectrum of human illness [J]. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1979, 73: 630-633.
- [3] Braito A, Ciufolini M G, Pippi L, et al. Phlebotomus-transmitted toscana virus infections of the central nervous system: a seven-year experience in Tuscany [J]. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 1998, 30: 505-508.
- [4] Elliott R M, Bouloy M, Calisher C H, et al. Genus Phlebovirus. Virus Taxonomy classification and nomenclature of viruses, seventh report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. San Diego: Academic Press, 2000. 614-616.
- [5] Collett M S, Purchio A F, Keegan K, et al. Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Rift Valley fever virus [J]. *Virology*, 1985, 144: 228-245.
- [6] Ihara T, Smith J, Dalrymple J M, et al. Complete sequences of the glycoproteins and M RNA of Punta Toro phlebovirus compared to those of Rift Valley fever virus [J]. *Virology*, 1985, 144: 246-259.
- [7] Ronnholm R, Pettersson R F. Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Uukuniemi virus encoding the membrane glycoproteins G1 and G2 [J]. *Virology*, 1987, 160: 191-202.
- [8] Tesh R B, Peters C J, Meegan J M. Studies on the antigenic relationship among phleboviruses [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1982, 31: 149-155.
- [9] Tesh R B, Boshell J, Young D G, et al. Characterization of five new phleboviruses recently isolated from sand flies in tropical America [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1989, 40: 529-533.
- [10] Travassos da Rosa A P, Tesh R B, Pinheiro F P, et al. Characterization of eight new phlebotomus fever serogroup arboviruses (Bunyaviridae: Phlebovirus) from the Amazon region of Brazil [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1983, 32: 1164-1171.
- [11] Valassina M, Valentini M, Valensin P E, et al. Fast duplex one-step RT-PCR for rapid differential diagnosis of entero- or toscana virus meningitis [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2002, 43: 201-205.
- [12] Sall A A, Macondo E A, Sene O K, et al. Use of reverse transcriptase PCR in early diagnosis of Rift Valley fever [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9: 713-715.