

## SARS 冠状病毒的分离培养与鉴定

江丽芳<sup>1</sup>, 赵卫<sup>2</sup>, 晏辉钧<sup>1</sup>, 方丹云<sup>1</sup>, 周经姣<sup>1</sup>, 龙北国<sup>2</sup>, 吴义芳<sup>1</sup>,  
周俊梅<sup>1</sup>, 梁瑜<sup>1</sup>, 张文炳<sup>2</sup>, 吴强<sup>1</sup>, 郭辉玉<sup>1</sup>

广东省防治非典型肺炎科技攻关病原学研究专题组

(1. 中山大学中山医学院微生物学教研室, 广东广州, 510080; 2. 第一军医大学热卫系微生物学教研室, 广东广州, 510515)

## Isolation and Identification of SARS-Coronavirus

JIANG Li-fang<sup>1</sup>, ZHAO Wei<sup>2</sup>, YAN Hui-jun<sup>1</sup>, FANG Dan-yun<sup>1</sup>, ZHOU Jing-jiao<sup>1</sup>, LONG bei-guo<sup>2</sup>, WU yi-fang<sup>1</sup>,  
ZHOU Jun-mei<sup>1</sup>, LIANG Yu<sup>1</sup>, ZHANG Wen-bing<sup>2</sup>, WU Qiang<sup>1</sup>, GUO Hui-yu<sup>1</sup>

(1. Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** To isolate and identify the etiologic agent of severe acute respiratory syndrome(SARS), the throat swabs and gargle of patients with SARS were collected. We inoculated the specimens onto a number of cell lines including Vero, Vero E6, MDCK, HeLa, Hep-2, HP and HEL cells. The isolates were identified by thin-section electron-microscopy, indirect-immunofluorescence, neutralization test, RT-PCR and nucleotide sequence analysis. Using cell culture techniques, a coronavirus was isolated from patient with SARS. Four cell lines, Vero, Vero E6, HP and MDCK cells, showed cytopathic effect. The infected cells showed strong cytoplasmic and membranous staining with a convalescent-phase serum from the patients with SARS in an indirect-immunofluorescence staining. The cytopathic effect of the viruses could be neutralized by convalescent serum. Under electron-microscopy, a large number of coronavirus-like particles were observed in the infected cells. With specific primers, the specific cDNA fragments were amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) from infected cells and the nucleotide sequence analysis showed that homology of the amplified fragments to the SARS-coronavirus (SARS-CoV) previously reported was 100%. A SARS-CoV was isolated from patients with SARS. This virus was closely associated with SARS.

**Key Words:** Severe acute respiratory syndrome(SARS); SARS-CoV; Isolation and identification; Nucleotide sequence analysis.

**摘要:** 采集急性期病人的咽拭子或漱口液, 用 Vero、Vero E6、MDCK、HeLa、Hep-2 等传代细胞, 人胚肺二倍体细胞(HEL)和人胚肺(HP)细胞分离培养严重急性呼吸系统综合症(SARS)的病原体。结果用 Vero、Vero E6、MDCK 和 HP 细胞从标本中分离到一株病毒。间接免疫荧光试验发现, 恢复期病人血清可与所分离的病毒起反应, 在胞膜和胞浆中出现翠绿色荧光; 中和试验结果表明, 恢复期病人血清能中和病毒对细胞的致细胞病变作用; 电镜下可观察到冠状病毒样颗粒; RT-PCR 法可扩增到冠状病毒特异性基因片段, 且其核苷酸序列与国内发表的 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)相应的基因序列相符, 同源性达到 100%。从传染性非典型肺炎病人的漱口液中分离到 SARS 冠状病毒, 这种病毒与传染性非典型肺炎密切相关。

**关键词:** 传染性非典型肺炎; SARS 冠状病毒(SARS-CoV); 分离培养与鉴定; 序列分析

中国分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2003)06-0544-05

收稿日期: 2003-09-27, 修回日期: 2003-10-10

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30340013); 广东省科技攻关项目

作者简介: 江丽芳(1953-),女,广东省籍,教授,从事微生物教学和研究工作。Tel: 020-87332160.

传染性非典型肺炎又称严重急性呼吸系统综合征 (Severe acute respiratory syndrome, SARS), 是一种新出现的传染病<sup>[1]</sup>。2003 年 1 月 2 日在广东省河源市首先被发现, 回顾性的流行病学调查表明, 2002 年 11 月 16 日发生在广东省佛山市的一宗非典型肺炎为首发病例。此病传染性强, 可短时间内在医院和社区迅速传播, 到 2003 年 2 月 16 日已蔓延至广东省的广州、中山、深圳、江门和顺德等市, 2003 年 3 月中旬, 疾病扩散到毗邻广东省的国家和地区, 并跨越亚洲迅速向全世界传播, 到 2003 年 4 月 30 日加拿大、新加坡、德国、澳大利亚等 29 个国家和地区发现病例, 至 2003 年 7 月 31 日止, 全球累计感染人数达 8094 人, 死亡 774 人<sup>[2,3]</sup>。传染性非典型肺炎以起病急, 发热、咳嗽、肺部阴影、外周血白细胞不升高或者降低为主要临床特征<sup>[4]</sup>。

为了查明该病的病因, 我们在疾病流行的早期即 2003 年 2 月初就广泛收集病人标本, 开展病原体的分离培养, 并于 2003 年 4 月下旬从病人的漱口液中分离鉴定了一株 SARS 冠状病毒, 该毒株命名为 SARS-CoV GD322。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

咽拭子和漱口液标本 51 份, 采自广州地区临床诊断为传染性非典型肺炎的住院病人。病人血清采自广州地区传染性非典型肺炎恢复期病人, 经间接免疫荧光染色和 ELISA 检测抗体反应呈强阳性者。

Vero、Vero E6、MDCK、Hela、Hep-2 等传代细胞, 人胚肺二倍体细胞 (HEL) 由本实验室保存。原代人胚肺细胞 (HP) 由本实验室制备。

RPMI 1640 和小牛血清为 Gibco 公司产品。QIAamp Viral RNA Mini Kit 和核酸回收试剂盒 QIAquick Gel Extraction Kit 购于 QIAGEN 公司; 逆转录酶 SuperScript II, Taq DNA 聚合酶购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 标本的采集和处理

咽拭子标本的采集: 用灭菌棉拭子从患者双侧咽扁桃体或咽后壁涂取咽分泌物, 在 4~5 mL 含抗生素的标本收集液的螺口试管中搅拌后挤出棉拭子上的液体。漱口液的采集: 用 10 mL 标本收集液漱口后, 置螺口试管中。标本采集后应立即冷冻保存并迅速送到实验室。咽拭子和漱口液标本加入 1000 μ/mL 青霉素、1000 μ/mL 链霉素, 2000 r/min 离心 30 min, 取上清作病毒的分离培养。

### 1.3 细胞培养分离病毒

Vero、Vero E6、MDCK、Hela、Hep-2、HEL 和 HP 细胞均用 20% 小牛血清 RPMI 1640 营养液培养。将用抗生素处理好的咽拭子或漱口液标本接种于已长成单层的 24 孔细胞培养板中, 每孔 0.5 mL, 35°C 吸附 90 min, 然后加含 2% 小牛血清的 RPMI 1640 维持液 1.5 mL, 置 35°C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。12 h 后吸出培养液弃去, 加入 2 mL 维持液, 在相同的条件下继续培养。每天光镜下观察细胞病变情况, 连续观察 7 d, 若不出现病变则进行盲传, 若连续盲传 3 代后无病变则弃去。

### 1.4 超薄切片电子显微镜检查

取 2 mL 培养细胞加入等量固定液 (2.5% 戊二醛加 2% 多聚甲醛), 固定 15 min, 以固定和灭活病毒。1000 r/min 离心 5 min, 使细胞沉淀。弃上清, 加固定液 2 mL, 固定 30 min。2000~3000 r/min 离心 10 min, 取沉淀的细胞, 1% 锇酸固定, 梯度乙醇脱水, 包埋, 常规超薄切片, 经醋酸铀和柠檬酸铅电子双染色后在电镜下观察。

### 1.5 间接免疫荧光染色

当病毒感染细胞出现明显病变时, 收获细胞, 调整细胞浓度, 滴加于抗原片上。室温干燥, 冷丙酮固定 20 min 后置 -20°C 保存备用。

用 10% 小牛血清封闭抗原片, 置湿盒中 37°C 30 min。滴加 1:10 稀释的经 56°C 30 min 灭活的传染性非典型肺炎的恢复期病人血清于抗原片上, 置湿盒中, 37°C 1 h。用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。最后加 FITC 羊抗人 IgG 荧光抗体 (含 0.05% 伊文思蓝), 置湿盒中, 37°C 1 h。洗涤后用 50% 甘油盐水封片, 荧光显微镜下观察结果。胞浆或胞膜上出现翠绿色荧光者为阳性, 暗红色者为阴性。

### 1.6 中和试验——固定病毒稀释血清法

收获细胞培养的病毒液, 在敏感细胞上滴定病毒 TCID<sub>50</sub>。恢复期患者血清经 56°C 30 min 灭活, 用 Hank 氏液作连续倍比稀释后与等量 100 TCID<sub>50</sub> 的病毒液混合, 室温结合 2 h, 接种于 Vero E6 细胞板中, 每孔 0.5 mL, 每个稀释度接种两孔, 35°C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每天观察细胞病变, 共观察 1~2 周, 判断中和抗体效价。设病毒对照和正常血清对照。

### 1.7 RT-PCR 法检测病毒核酸

使用 QIAGEN 公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat. No. 52904), 参照试剂盒使用说明, 从 160 μL 病毒培养上清中提取 RNA, 溶于 30 μL 水中备用。

使用 Biometra 公司的 UNOII Thermocycler, 进

行 RT-PCR。引物为: BNIoutS: 5'-atg aat tac caa gtc aat ggt tac -3', BNIoutAS: 5'-cat aac cag tcg gta cag cta c -3'。该引物为 WHO 推荐的 7 对引物之一, 扩增长度 190bp, 位于 SARS 冠状病毒基因组 18138-18327nt。

逆转录过程为: 取 RNA 10 $\mu$ L, 加入反向引物 BNIoutAS, 80 $^{\circ}$ C 作用 5min 后, 依次加入 RNaseOUT RNA 酶抑制剂 (GibcoBRL) 0.5 $\mu$ L, 5 $\times$  第一链缓冲液 4 $\mu$ L, 10 $\mu$ mol/L dNTPs (Pharmacia) 2 $\mu$ L 及 AMV 反转录酶 (Promega) 2 $\mu$ L, 加水至总体积 20  $\mu$ L, 42 $^{\circ}$ C 保温 60min 进行反转录。反应完毕, 95 $^{\circ}$ C 5min 灭活 cDNA 作为 PCR 模板。

取 cDNA 3 $\mu$ L, 10 $\times$  PCR 缓冲液 3 $\mu$ L, 正向、反向引物各 1 $\mu$ L, TaKaRa Taq<sup>TM</sup> 聚合酶 1U, 10 $\mu$ M dNTPs (Pharmacia) 1 $\mu$ L, 补水至总体积 30  $\mu$ L 进行 PCR 扩增。反应参数为: 95 $^{\circ}$ C, 3min; 95 $^{\circ}$ C 10s/60 $^{\circ}$ C, 10s (drop 1 $^{\circ}$ C) /72 $^{\circ}$ C, 20s, 共 10 次循环; 95 $^{\circ}$ C 10s/56 $^{\circ}$ C, 10s/72 $^{\circ}$ C, 20s, 共 40 次循环; 最后一次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

### 1.8 PCR 产物的克隆测序

用 TaKaRa 的 PCR Fragment Recovery Kit 回收特异的扩增片段, 直接与 pGEM-T 载体 (Promega) 连接, 转化感受态菌 DH5  $\alpha$ , 涂布含氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养后, 挑取白色菌落经 PCR 及酶切鉴定后测序。

### 序列分析

对所测得序列用 Blast 同源性分析。收集 GenBank 中 SARS 冠状病毒的核苷酸序列, 利用 DNASTAR 软件包中 MEGALIGN 程序对测得序列与收集序列进行同源比较。

## 2 结果

### 2.1 病毒的细胞培养

病人标本接种 Vero、Vero E6、HP 和 MDCK 细胞后, 3~7d 左右出现细胞病变, 病变特征是细胞变圆, 颗粒增多, 但细胞破碎不明显。其中在 Vero、Vero E6 和 HP 细胞中出现时间较早; 约 3d 左右出现病变, 在 MDCK 细胞中出现病变较晚, 约 5d 左右才出现病变。病毒在上述细胞内传到第 7 代, TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>-6</sup>~10<sup>-7</sup>。病人标本接种 Hela、Hep-2 和 HEL 细胞未发现明显的细胞病变。

### 2.2 电镜观察

将病变细胞常规超薄切片电镜下观察, 发现胞浆内有大量的病毒颗粒, 呈球形, 大小在 80~90nm

之间, 有包膜, 包膜外周有排列均匀的突起。在内质网池内可见大量的病毒颗粒 (图 1)。根据电镜下病毒的形态特征可初步判断这种病毒为冠状病毒。



图 1 超薄切片电镜检查结果显示 Vero E6 细胞内的 SARS 冠状病毒

Fig. 1 A thin-section electron-microscopical view of SARS-CoV in Vero E6 cells.

A, The scale bar represents 100nm, Bar=100nm; B, The scale bar represents 80nm, Bar=80nm.

### 2.3 免疫学鉴定

间接免疫荧光染色结果显示病变细胞可与 17 份临床诊断为传染性非典型肺炎恢复期病人血清起反应, 在胞浆和胞膜上出现黄绿色荧光, 且呈强阳性反应 (图 2)。提示所分离的病毒与本次传染性非典型肺炎密切相关。

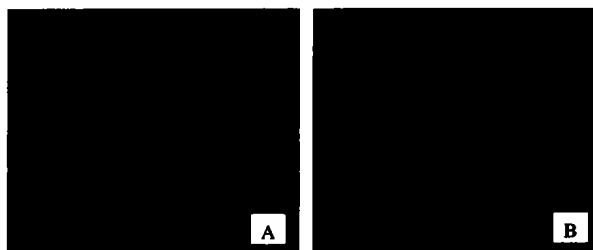


图 2 间接免疫荧光染色结果

Fig. 2 Result of indirect-immunofluorescence staining

A, Indirect-immunofluorescence staining of normal serum; B, Indirect-immunofluorescence staining of convalescent serum.

用 10 份传染性非典型肺炎恢复期病人血清与所分离病毒的中和试验结果表明, 病毒的感染性可被恢复期病人血清所阻断, 中和抗体滴度在 1:64~1:128 之间, 进一步提示病毒与疾病的关系。

### 2.4 核酸分析

2.4.1 RT-PCR: 经过 RT-PCR 后, 我们从病毒培养上清液中扩增出预计大小的 190bp 的 DNA 片段。(图 3)

2.4.2 序列分析和同源性比较: 将所扩增的特异大小的 DNA 片段克隆到 pGEM-T 载体后, 每例取 3 个



图 3 RT-PCR 结果

Fig. 3 Result of RT-PCR

Lane 1, Negative control; 2, Supernatant of culture medium; 3, PCR product amplified from sample of throat swabs; M:DNA Marker.

克隆进行序列分析。所得测序结果与 GeneBank 中的 TOR2 (NC-004718)、BJ01 (AY278488)、BJ02 (AY278487)、BJ03 (AY278490)、BJ04 (AY 27 9354)、URBANI (AY278741)、CUHKU-W1 (AY 278554)、Frankfurt1 (AY291315)、HKU-39838 (AY 278491)、ZJ01 (AY297028)、TW1 (AY 291 451)、SIN2500 (AY283794)、SIN2677 (AY 283795)、SIN2748 (AY283797)、SIN2774 (AY 283798)、CUHK-SU10 (AY282752) 等 SARS 冠状病毒株中相应序列完全相同。与 GZ01 (AY 278489)、SIN2679 (AY283796) 的序列各有一个核苷酸的差异, GD322 24 位核苷酸为 C, 而 GZ01 为 T。GD322 130 位核苷酸为 C, 而 SIN2679 为 A。

### 3 讨论

非典型肺炎是指由肺炎链球菌以外的病原体所致的肺炎, 可由多种病原体引起。但这次传染性非典型肺炎发生后我们课题组和广东省的其他课题组在 2 月份就排除了由细菌、支原体、衣原体、腺病毒、汉坦病毒、流感病毒、真菌等常见病原体感染的可能, 并把查找病原的重点放在病毒的分离培养上。为了提高病毒的检出率, 我们采用了 Vero、Vero E6、MDCK、Hela、Hep-2、HEL 和 HP 等多种细胞培养系统从急性期病人的咽拭子和咽漱液中分离病毒。结果从一份咽漱液中分离出病毒, 这种病毒在 35℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下, 可在人胚肺细胞、Vero E6 和 Vero 细胞上生长并使细胞出现明显病变, 说明这些细胞是该病毒的允许性细胞。而 Hela、Hep-2 和 HEL 则不能支持病毒的增殖, 是非允许性细胞。

为了确定这株病毒与传染性非典型肺炎的关系, 我们用 H5N1、HSV1 和 H3N2 等多种已知病毒的单克隆抗体和 17 份恢复期病人血清与病毒进行间接免疫荧光试验和中和试验, 结果表明, 只有恢复期病人血清能与病毒起反应, 中和抗体效价可达

1:128 以上。上述结果证明, 我们分离到的病毒与此次疾病的流行有关, 而且可能是一种新病毒。

随后, 我们在病毒培养上清液中扩增出 SARS 冠状病毒基因片段, 序列测定结果表明, 该片段与 16 株从国内外不同地区分离的 SARS 冠状病毒相应基因片段的同源性为 100%, 与 GZ01 株 (广州株) 及 SIN2679 株 (新加坡株) 仅有一个核苷酸的差异, 证实所扩增的片段确实为 SARS 冠状病毒所特有。另一方面, 也说明所扩增部分的序列保守性较高, 适于用作 SARS 冠状病毒的特异性检测。

然而, 本研究的病毒分离率较低, 在 51 份临床诊断为 SARS 的标本中仅分离出一株 SRAS 冠状病毒, 其原因可能与下述因素有关, 一是临床诊断的准确性, 由于流行早期 SARS 敏感、特异的诊断方法尚不完善, 因此可能有一些非疑似病例混杂其中; 其二是取材的部位、取材时间及标本送检和保存等因素的影响, 由于所用的标本来自广州市的不同医院, 因此难于保证送检标本的质量。

传染性非典型肺炎是一种新出现的传染病, 自流行发生以来国内外在病因学研究方面做了大量的工作。2003 年 3 月 15 日, Thomas 等首先宣布用 Vero E6 细胞在病人的标本中分离到新型冠状病毒<sup>[5]</sup>, 2003 年 4 月 16 日, WHO 宣布这种新型的冠状病毒是传染性非典型肺炎的病原体<sup>[6]</sup>。本研究从传染性非典型肺炎病人标本中分离出了 SARS 冠状病毒, 其形态学、免疫学和分子生物学的鉴定结果表明, 这株病毒与国内外报道的传染性非典型肺炎的病原体相符, 是一种新型的冠状病毒。

### 参考文献

- [1] Acute respiratory syndrome in China-update 3: disease outbreak reported. Geneva: World Health Organization, February 2003.
- [2] Rota P A, Oberste M S, Monroe S S, *et al*. Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory[J/OL]. Sciencexpress/www.sciencexpress.org/1 May 2003/page 1/10. 1126/ science. 1085952.
- [3] WHO. Cumulation number of reported cases(SARS)[J/OL]. <http://www.who.int/csr/sarco un try/2003-05-30>.
- [4] Poutanen S M, M. P. H., Donald E. Low, M.D, *et al*. Identification of severe zaute respiratory syndrome in Canada[J]. N Engl E Med. Low1-Low10
- [5] Ksiazek T G, D. V. M., Ph D, Dean Erdman, *et al*. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome[J]. N Engl J Med 2003; 348 1953-66.
- [6] WHO. Update 31-Coronavirus never before seen in humans is the cause of SARS[J/OL]. <http://www.who.int/csr/sarsarchive/2003-04-16/en/>.