

用微量单管 RT-PCR快速检测及定型脊髓灰质炎病毒

Rapid Detecting and Identifying Poliovirus by Smaller Volume and One-Tube RT-PCR Assay

刘 巍 古绍文 王树声 梁善凡 班华国 陈 杰
Liu Wei Gu Shaowen Wang Shusheng Liang Shanfan Ban Huaguo Chen Jie

(广西卫生防疫站 南宁市桃源路 530021)

(Guangxi Hygienic and Anti-epidemic Station, Taoyun Road, Nanning, Guangxi, 530021)

孔 健

Kong Jian

(卫生部北京生物制品研究所 北京 100024)

(National Vaccine and Serum Institute, Beijing, 100024)

摘要 介绍一种逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 的简单快速检测和定型脊髓灰质炎病毒 (PV) 的方法, 无需提取 PV RNA, 共用一种缓冲系统, 将 RT和 PCR试剂混合在 20 μ L反应体系中, 整个操作可置于一不间断温度循环程度程序中完成。一步法 RT-PCR与常规 RT-PCR及中和抗体试验对 PV 的检测结果完全一致, 它的检测敏感度可达 5TCID₅₀/mL。该法需要的时间, 费用和污染的都大大减少, 而且特别适于临床常规诊断和鉴别 PV 的需要。

关键词 脊髓灰质炎病毒 逆转录聚合酶链反应 一步法 检测

Abstract We describe a simple method for the rapid detection and identification of poliovirus (PV) using one-step reverse transcription PCR (RT-PCR) method. Without RNA extraction, 20 μ L of mixed reagents for both RT and PCR were added into a tube, with sharing one buffer system. The whole procedure was performed with a single uninterrupted thermal cycling program. A good concordance was found among the PV neutralization test, the routine RT-PCR and one-step RT-PCR. The sensitivity of one-step RT-PCR method reached the virus infectious titer of 5TCID₅₀/mL. The needed time, cost and opportunity of contamination of this assay was reduced greatly. The one-step RT-PCR method is especially suitable for routine detection and identification of PV in clinical laboratories.

Key words poliovirus, RT-PCR, one-step, assay

脊髓灰质炎 (简称脊灰) 是一种急性病毒性传染病, 其危害严重性在于此病可因麻痹而导致持久性残疾。对急性弛缓性麻痹病例及周围接触者作出早期实验室诊断, 以确定病原是非脊灰的肠道病毒或何种型别 PV, 是控制和消灭脊灰的重要环节。目前常规应用的细胞培养分离病毒, 中和试验鉴别 PV 的方法, 因操作烦琐和费时 (需 3周~ 4周), 而不能满足早期

快速诊断的需要。以后发展的核酸斑点杂交^[1], 也因特异性和敏感性低, 而未能推广。逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 已成功地应用在脊灰病毒的诊断和分型^[2]。但由于常规 RT-PCR检测费工费时且成本高, 难于适应我国的日常监测需要, 为此, 在原来研究的基础上^[3], 我们通过简化步骤, 试剂国产化, 缩小反应体积, 建立了一种快速、简便、灵敏、特异和费用低廉的检测方法。现报告如下:

1 材料和方法

1.1 病毒样品

疫苗株 PV1/Sabin I、PV2/Sabin II、PV3/Sabin III, 标准野毒株 PV1/Mahoney PV2/MEF-1 PV3/Saukett均由中国医学科学院医学生物研究所提供; PV分离株选自1986年以来从麻痹病人分离到的22株PV, 经中和试验定型, 其中12株为PV1, 7株为PV2及3株为PV3 病毒经Vero单层细胞37°C培养, 出现CPE(++++)后, -20°C冻融3次, 12 000 r/min离心15 min去细胞碎片, 病毒上清备用

1.2 引物

由卫生部北京生物制品研究所提供, Polio 01和Polio 02用于区分脊灰病毒和其它肠道病毒, 其它3对引物分别为Sabin I、II、III型的引物。它们的序列分别为:

Polio 01 (-) (515- 532)

(5'- GACTTGCGCGTTACGACA- 3')

Polio 02 (+) (424- 440)

(5'- AGAGCCTATTGAGCTAC- 3')

Sabin 11 (-) (2769- 2788)

(5'- AAGCTGAGTTATCCACGGTT- 3')

Sabin 12 (+) (2521- 2540)

(5'- AGCATGTTGACAACACAGT- 3')

Sabin 21 (-) (2697- 2715)

(5'- TCGCGTTCGTCTCTGGATG- 3')

Sabin 22 (+) (2570- 2589)

(5'- CCAATAGCCTGCCTGGACAC- 3')

Sabin 31 (-) (3371- 3390)

(5'- CTCAGATAAGGGTCCAAGT- 3')

Sabin 32 (+) (3155- 3174)

(5'- CAGATGCCAATGACCAGATT- 3')

1.3 试剂

4× dNTP RNasin DNA分子量标准及Tag DNA聚合酶及10× PCR缓冲液购自华美公司, AMV逆转录酶及5× RT缓冲液由美国Promega提供, 异硫氰胍为德国Serva公司产品

1.4 基因扩增仪

DNA Thermal Cycle.

1.5 方法

1.5.1 常规法 参考文献 [2]

(1) 病毒RNA提取 取离心后的病毒液100 μL, 加5 μL二巯基乙醇, 400 μL DS裂解液^[4], 酚/氯仿/异戊醇500 μL, 置1.5 mL离心管内, 充

分混匀后60°C水浴5 min, 12 000 r/min, 离心15 min, 取上相, 加入等体积氯仿/异戊醇混匀后, 15 000 r/min, 离心5 min, 取上相加入2.5倍体积的无水乙醇, 置-70°C 0.5 h或-20°C 2 h, 12 000 r/min离心10 min, 吸去上清并真空干燥, 加双蒸水10 μL溶解, 置-20°C备用

(2) 合成病毒cDNA 2 μL病毒RNA, 4 μL 5× RT缓冲液, 40U RNasin, 8.5 U AMV逆转录酶, 5 mmol/L 4× dNTP 3 μL, 引物Polio 01或Sabin 11, Sabin 21, Sabin 31各3 μL (10 pmol/L), 加双蒸水至20 μL, 混匀后覆盖液体石蜡50 μL, 置42°C水浴30 min

(3) 病毒cDNA扩增 在上述逆转录反应液中加入Polio 02或Sabin 12, Sabin 22, Sabin 32各2 μL (10 pmol/L), 10× PCR缓冲液(含15 mmol/L Mg-Cl₂) 10 μL, Tag酶2 U, 加双蒸水补至100 μL, 混匀置扩增仪内反应, 扩增程序为94°C 3 min后, 以94°C 45 s, 56°C 45 s, 72°C 60 s循环35次, 最后72°C延伸5 min

1.5.2 一步法 10 μL病毒液95°C 5 min 12 000 r/min离心5 min 取5 μL上清加10× PCR缓冲液(含15 mmol/L MgCl₂) 2 μL, 1 mmol/L 4× dNTP 2 μL, 15 U RNasin, 2.0 U AMV逆转录酶, 1 U Tag酶, 每对引物(5 pmol/L)各1 μL, 加双蒸水至20 μL混匀后覆盖液体石蜡20 μL, 置扩增仪内反应, 42°C 30 min逆转录, 94°C 3 min热变性, 进入94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 30 s循环35次, 最后72°C延伸5 min

1.6 产物分析

取10 μL PCR产物与2 μL上样缓冲液混合, 作1.5%琼脂糖凝胶电泳, 电泳后EB染色。在电泳时设pBR322/HaeII分子量参照, 以确定产物片段大小

所有操作过程严格按照防交叉污染操作规程进行: PCR的前处理、PCR以及PCR产物的检测分别在3个不同的场所进行, EP管及吸头均为清洁无菌, 一次性使用, 加样器严格分开使用, 每次实验均设空白和正常对照, 以防假阳性出现

2 结果

2.1 一步法 RT-PCR的特异性

Polio 01和Polio 02引物用一步法扩增疫苗株PV1/Sabin I、PV2/Sabin II和PV3/Sabin III, 及标准野毒株PV1/Mahoney PV2/MEF-1和PV3/Saukett均出现一条大小为109 bp的清晰电泳带。用Sabin 11, Sabin 12, Sabin 21 Sabin 22和Sabin 31,

Sabin 32分别扩增对应的 PV 疫苗株和标准野毒株时,分别出现 268bp、146bp及 233bp大小的型异性条带,与预期结果完全一致。且引物与不同型别 PV 配对使用时,不会出现交叉反应,阴性对照均未见条带。一步法的结果与常规法相同(图 1)。

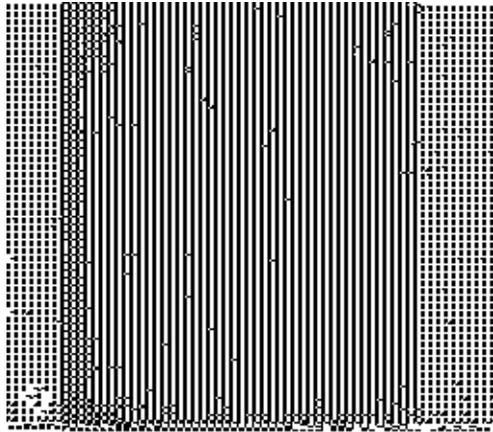


图 1 一步法 RT-PCR检测脊灰病毒 sabin 疫苗株的扩增产物比较

Fig. 1 Comparison of one-step RT-PCR amplification products of poliovirus sabin strain
M. DNA分子量参照 pBR322/HaeIII M. DNA mark pBR322/HaeIII; 1. SabI 型用引物 Sab 11, Sab 12 的扩增产物 Products of Sab I using primers Sab 11, Sab 12; 2. SabI 型用引物 Polio 01, Polio 02 的扩增产物 Products Sab I using primers Polio 01, Polio 02; 3. SabII 型用引物 Sab 21, Sab 22 的扩增产物 Products Sab II using primers Sab 21, Sab 22; 4. SabII 型用引物 Polio 01, Polio 02 的扩增产物 Products of Sab II using primers Polio 01, Polio 02; 5. Sab III型用引物 Sab 31, Sab 32 的扩增产物 Products of Sab III using primers Sab 31, Sab 32; 6. Sab III型用引物 Polio 01, Polio 02 的扩增产物 Products of Sab III using primers Polio 01, Polio 02; N. 正常 Vero 细胞对照 Normal Vero cells control.

2.2 一步法 RT-PCR的敏感性

将已知滴度的 PV 1/Sabin I 疫苗株病毒培养物,按 10倍系列稀释至 10^{-5} 时,用一步法 RT-PCR 检测,仍可出现特异性条带,经推算,此法可检出至少至 $5\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 的病毒 RNA,其灵敏度与常规法相同(图 2)。

2.3 病毒分离株的一步法 RT-PCR检测

22株 PV 分离株经 Polio 01和 Polio 02引物扩增,进一步证实均为 PV,再经型特异性引物检验,发现 12株 PV 1, 7株 PV 2, 3株 PV 3与中和试验及常规 RT-PCR结果完全相同。

3 讨论

本实验所用的 Polio 01、Polio 02引物是对 PV 高度保守的 5'端非编码区设计的,可用来区分脊灰病

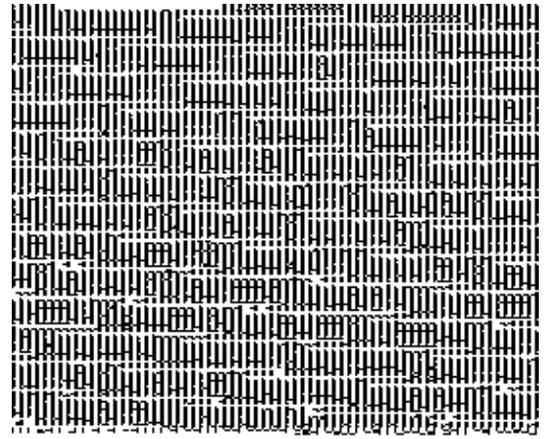


图 2 一步法 RT-PCR检测脊灰病毒 sabinI 株的敏感性

Fig. 2 Sensitivity of detection of poliovirus sabin strain by one-step RT-PCR
M. DNA分子量参照 pBR322/HaeIII M. DNA mark pBR322/HaeIII; 1. 10^4 TCID₅₀/mL; 2. 10^3 TCID₅₀/mL; 3. 10^2 TCID₅₀/mL; 4. 10^1 TCID₅₀/mL; 5. 5 TCID₅₀/mL; 6. 1 TCID₅₀/mL; 7. 0.5 TCID₅₀/mL; N. 正常 Vero 细胞对照 Normal vero cells control.

毒和非脊灰的肠道病毒。而 PV 1, PV 2, PV 3型的引物,是参照 Sabin I, II, III型疫苗病毒的表面蛋白编码区 VP1设计的,它们能准确地识别 PV 1, PV 2, PV 3型病毒。但需注意的是,由于脊灰病毒野毒株之间的差异可超过 20%^[5],当变异发生在型引物结合区时,则型引物无法与对应的 PV 核酸序列结合,出现 Polio 01、Polio 02检测阳性,而 Sabin 11、Sabin 12, Sabin 21、Sabin 22、Sabin 31和 Sabin 32检测都阴性的病例,在此情况下须用抗体中和试验配合定型。

分离 PV 用的阳性细胞培养物,其病毒含量常达 10^7 TCID₅₀/mL以上,一步法 RT-PCR能检出至少至 $5\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 的培养物,因此足以适应常规检测。另外,一步法仅用 $5\mu\text{L}$ PV 培养物就可有效地检出 PV RNA,而常规法则需 $100\mu\text{L}$ 。

基于 PV 在细胞培养物中的滴度高,且所含 RT 和 PCR 的抑制因子相对较少,我们采用 95°C 加热 5 min 一步裂解病毒,释放病毒 RNA,同时使蛋白质变性分离,省去了异硫氰酸胍裂解,酚/氯仿抽提,乙醇沉淀的复杂费时方法。进而用 $10\times$ PCR 缓冲液替代 $5\times$ RT 缓冲液,使 RT 和 PCR 反应物能同时混和于一管内进行反应。对一个新分离的 PV,我们只需对它加热离心,加入 RT-PCR 反应液,以后由基因扩增仪做程序化反应。这样我们在不影响检测效果

(下转第 52 页 Continue on page 52)

5 结语

式 (11) 所示的单元刚度方程与式 (4) 所示单元刚度方程都是由 6 个平衡方程组成的. 二者之间的根本区别在于单元自由度的含义上. 式 (4) 中, $[W]^e$ 是由单元 e 的两个结点 i, j 的横向位移 w , 转角 θ 及曲率 \dot{w} 所组成; 而式 (11) 中, 组成 $\{c\}^e$ 的 6 个参数没有任何几何或物理意义, 它们是广义的. 这 6 个广义参数 $\hat{c}_i (i = 1, 2, \dots, 6)$ 同样条插值节点参数 $\alpha (k = i - 2, i - 1, \dots, j + 2)$ 之间存在着式 (8a) 所示的一一对应关系. 这就决定了两类单元性能上的区别. 5 次 (二阶) Hermite 单元在公共结点上不但挠度、转角相等, 而且曲率也连续. 所以这种单元不能直接应用于曲率不连续的变厚度梁、板等结构中. 因而尽管这种单元的计算效率 (自由度与精度的综合比较) 要比低阶单元高, 但使用范围上的局限影响了它的应用, 是其致命的缺陷. 而广义参数高阶单元则不存在这个问题. 除此之外, 自由度在含义上的不明确性带来了另外一大优点: 结构的离散自由度大大减少. 尽管 5 次广义参数单元 (本文由于采用样条函数形成此类单元, 故

可以称之为样条元) 的两个端点同 5 次 Hermite 单元一样共有 6 个自由度, 但样条元的自由度都相应地与某个样条插值参数 α 通过式 (8a) 联系起来. 这就大大增加了相邻样条元之间的共用自由度. 某些即便不相邻的样条元也可能拥有同样的结点参数. 因而在同样的分划下, 特别是当离散单元个数较多时, 使用 Hermite 单元时的自由度要大大超过样条元的自由度. 同时, 从算例可以看出, 5 次广义参数元仍保持高阶单元所具有的高精度特性.

另外, 在截面突变处, 弯矩应取左右两相邻单元在此处弯矩值的平均.

参考文献

- 1 秦荣. 结构力学的样条函数方法, 南宁: 广西人民出版社, 1985.
- 2 李桂青. 抗震结构的计算理论和方法, 北京: 地震出版社, 1985.
- 3 石钟慈. 样条有限元. 计算数学, 1979, (1): 50-72.
- 4 龙驭球. 新型有限元引论, 北京: 清华大学出版社, 1992.
- 5 杨绿峰等. 薄板弯曲分析中的有限样条元法. 广西大学学报, 1995, (3): 228-232.

(责任编辑: 邓大玉 蒋汉明)

(上接第 47 页 Continue from page 47)

的前提下, 大大地简化了操作步骤, 使原来要 2 d-3 d 完成的工作, 在 4 h 内可办到, 且其中绝大部分时间为机器操作. 另外, 由于一步法 RT-PCR 的整个操作过程可在一只管内完成, 极大地减少了因移液和开盖而造成污染的可能性, 使假阳性率降低到最小程度. 我们曾试图将 Sabin 11, Sabin 12, Sabin 21, Sabin 22, Sabin 31 和 Sabin 32 引物预混于同一管, 以期对 PV1, PV2, PV3 同时检测, 但效果不佳, 出现某型 PV 因竞争干扰未被检出的问题.

该技术通过下面 3 个途径来降低实验费用: (1) 省略 RNA 提取步骤, 避免使用提纯试剂, 特别是 DS 裂解液中用量大价格贵的进口试剂异硫氰酸胍; (2) 除 AMV 逆转录酶目前尚无国产外, 其余均为国产试剂; (3) 将原先 RT20 μ L 和 PCR 100 μ L 合并缩减至 RT-PCR 20 μ L, 使得 AMV 逆转录酶的用量由 8.5 u 降至 2 u, Tag 酶由 2 u 降至 1 u, RNasin 由 40 u 降至 15 u, 引物和 4 \times dNTP 的用量分别减少了 1/6 和 1/7, 因此实验费用由原来的常规法约 50 元降低

到一步法的约 10 元.

在本方法的基础上, 我们还研制了 PCR 检测 PV RNA 的试剂盒, 使用起来更为方便.

参考文献

- 1 Da Silva E E et al. . Oligonuceotide probes for the specific detection of the wild poliovirus type 1 and 3 endemic to Brazil. Intervirology. 1991, 32: 149.
- 2 孔健等. RT-PCR 用于脊髓灰质炎病毒的检测及定型. 中华微生物学和免疫学杂志, 1993, 13 (6): 399.
- 3 古绍文等. 应用聚合酶链反应 (PCR) 作脊髓灰质炎病毒定型及型内分析的初步研究. 广西医学, 1994, 16 (2): 116.
- 4 Chomczynski P et al. . Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162: 156.
- 5 Toyoda H et al. . Complete nucleotide sequences of all three poliovirus serotype genomes: implication for genetic relationship, gene function and antigenic determinants. J Mol Biol, 1984, 174: 561.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)