

研究报告

多重 RT-PCR 用于临床检测三种胃肠炎病毒的研究^{*}寇晓霞^{1 2 3} 吴清平^{1 * *} 王大鹏^{1 2 3} 郭伟鹏¹ 邓梅清¹

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071) (中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 轮状病毒、诺瓦克病毒和星状病毒是引起病毒性胃肠炎的主要病原因子。研究采用 JV12/JV13、P1/P2 和 Mon340/Mon348 三对引物,建立了同时检测这 3 种病毒的多重 RT-PCR 技术,并应用于 128 份临床粪便样本的检测,检出轮状病毒 62 份(48.44%),诺瓦克病毒 8 份(6.25%),星状病毒 11 份(8.59%)。在灵敏度试验中,轮状病毒的检测灵敏度为 5pg/mL,诺瓦克病毒和星状病毒的检测灵敏度均为 50pg/mL。该研究所建立 3 种常见胃肠炎病毒的多重 RT-PCR 方法具有特异性强、灵敏度高的特点,可用于临床病原诊断和溯源。

关键词 诺瓦克病毒 轮状病毒 星状病毒 多重 RT-PCR

中图分类号 Q939.4 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(2007)03-0401-05

Studies on Simultaneous Detection of Three Gastroenteritis Virus in Clinical Samples by Multiplex RT-PCR^{*}

KOU Xiao-Xia^{1 2 3} WU Qing-Ping^{1 * *} WANG Da-Peng¹ GUO Wei-Peng¹ DENG Mei-Qing¹

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430071)

(Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049)

Abstract Rotavirus, norwalk virus and astrovirus are the major causes of viral gastroenteritis. Primers JV12/JV13, P1/P2 and Mon340/Mon348 were used to develop a multiplex RT-PCR system to simultaneously detect norwalk virus, rotavirus and astrovirus in clinical fecal samples. In a total of 128 samples, 62 was rotavirus, 8 was norwalk virus and 11 was astrovirus. The detection limits was 5pg/mL for rotavirus, 50pg/mL for norwalk virus and astrovirus respectively. The multiplex RT-PCR system can be used to detect norwalk virus, rotavirus and astrovirus for routine monitoring and risk assessment in diseases outbreak with high specificity and sensitivity.

Key words Norwalk virus, Rotavirus, Astrovirus, Multiplex RT-PCR

胃肠炎是人类最常见的一种疾病,在全球范围内被认为是一个严重的公众健康问题,也是引起婴幼儿发病和死亡的一个主要原因。除了细菌和寄生虫病原外,大多数胃肠炎由病毒引起。这类病毒主要包括诺瓦克病毒(Norwalk virus, NVs)、轮状病毒(Rotavirus, RVs)和星状病毒(Astrovirus, Avs)等。目前,这 3 种病毒也是世界范围内最为流行的病毒性

胃肠炎疾病的主要病因^[1],它们所致的胃肠炎临床表现相似,主要为腹泻与呕吐。这类病毒的感染剂量非常低,10~100 个病毒粒子即可引发感染。在离体条件下存活力很强。

目前,胃肠炎病毒的诊断方法主要有电镜观察、细胞培养、核酸杂交、酶联免疫及聚合酶链反应。电镜观察一直是病毒诊断的金标准,具有直

^{*} 广东省重大科技攻关项目(No.2002B3100103)

^{**} 通讯作者 Tel/Fax 86-20-87688132 E-mail: dlikangzhang@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-10-18,修回日期:2006-12-12

接、可靠的优点,但由于一些病毒在电镜下缺乏显著的形态学特征,且敏感性低、价格昂贵、技术条件要求高,因此无法应用于大规模的流行病学调查;核酸杂交及酶联免疫检测法的灵敏度相对都很低;细胞培养法的操作繁琐,需时较长,一般需要一周才能观察到细胞病理反应,更重要的是许多人肠道病毒不能进行细胞培养,或者可以培养但不出现细胞病理效应。如 NVs 目前没有合适的细胞体系和动物模型进行培养。近年来将 PCR 方法应用于胃肠炎病毒的检测大大促进了检测方法的发展,但是常规的 PCR 都是单一地扩增,即每个反应只能扩增一个模板,在实际应用中很难在短时间内处理大量的样品。多重 PCR 技术(m-PCR)的建立和应用提高了 PCR 的能力,解决了这一难题。M-PCR 是指在一个反应体系中,加入多对特异性引物,如果存在与各引物对特异性互补的模板,即可同时在同一反应管中扩增出一条以上的目的 DNA 片段,实现了一次性检测多个模板的目的。

本文建立了在临床粪便样本中同时检测 3 种胃肠炎病毒的多重 PCR 检测技术,相比于传统方法,多重 PCR 检测法节省时间,效率高,更灵敏特异,可以应用于临床病例的诊断和流行病学调查等研究。

1 材料与方法

1.1 粪便样本

总共 128 份腹泻样本,自 2005 年 9 月至 2006 年 3 月,收集于临床上诊断为非细菌性胃肠炎的患者。病人有水样便至少 24h,伴有恶心、呕吐和发热等症状,临床上初步诊断为病毒性感染。粪样收集后在 24h 内运回实验室,用 pH7.4 的 PBS 稀释成 10% 的悬液,4℃、10000r/min 离心取上清,0.22μm 的无菌滤膜过滤除菌后,-20℃保存待用。

1.2 试剂

TRIzol 试剂盒购自 Gibco 公司;MLV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司;RNasin、dNTP 购自上海 Sangon 公司;引物由北京赛百盛公司合成。

1.3 样本初筛

采用酶联免疫法对轮状病毒(兰州生物制品所生产的轮状病毒 ELISA 试剂盒)、星状病毒(星状病毒 ELISA 试剂盒, IDEMATM Astrovirus, DAKO 公司)

检测粪便标本中的病毒抗原,依据试剂盒说明操作。128 份粪便样本中,轮状病毒阳性 58(45.31%)份、星状病毒阳性 11(8.59%)份。用电镜初步检测样本中的诺瓦克病毒,方法参照 O'Neill^[3],观察所得诺瓦克病毒阳性 7(5.47%)份。

1.4 RNA 抽提

用 Gibco 公司生产的 TRIzol 试剂盒抽提病毒 RNA,详细操作过程见说明书。在分光光度计上测定所提取的 RNA 浓度和纯度。

1.5 引物设计

以轮状病毒的高保守区段 VP7 基因设计各血清型通用的引物 P1/P2^[4];以诺瓦克病毒 RNA 多聚酶高保守区为靶序列,采用对 GⅠ 和 GⅡ 型通用的引物 JV12/JV13、P289/P290 和 Ni/E3 3 对引物同时进行样本筛选^[5,6];以星状病毒的 ORF1 为靶序列,采用引物 Mon340/Mon348^[7]。引物序列、位置及产物长度等见表 1。

1.6 RT-PCR 检测

1.6.1 单一 RT-PCR:建立轮状病毒、诺瓦克病毒和星状病毒各自的 RT-PCR 检测方法。RT 和 PCR 一步完成。反应体系为 2.5μL 10 × PCR buffer、300μmol/L dNTP、20U RNasin、引物各 0.3μmol/L、MLV 200U、TaqE 1.5U、MgCl₂ 3.5 mmol/L、RNA 模板 1μL,加水至 25μL,42℃ 30min 合成第一链 cDNA,94℃ 变性 5min 后,轮状病毒、诺瓦克病毒和星状病毒的扩增条件紧接着为 94℃ 40s,55℃ 50s(轮状病毒)、50℃ 50s(诺瓦克病毒)、52℃ 50s(星状病毒),72℃ 40s,循环 30 次;72℃ 延伸 10min。三者的反应体系相同。

1.6.2 多重 RT-PCR:建立同时检测轮状病毒、诺瓦克病毒和星状病毒的多重 PCR 反应体系。RT 和 PCR 一步完成。反应体系为 2.5μL 10 × PCR Buffer、20U RNasin、MLV 200U、dNTP 300μmol/L、轮状病毒引物 P1/P2 各 0.2μmol/L、诺瓦克病毒引物 JV12/V13 各 0.5μmol/L、星状病毒引物 Mon340/Mon348 各 0.4μmol/L、TaqE 2.5U、MgCl₂ 3.5 mmol/L、模板 3μL,加水至 25μL。采用降落 PCR 进行扩增,条件为:变性 94℃ 5min,94℃ 40s,55℃ 1min,72℃ 40s,退火温度每 5 个循环降低 1℃,15 个循环后退火温度降至 52℃ 时再进行 25 个循环共 40 个循环后,72℃ 延伸 10min。

表 1 诺瓦克、轮状和星状病毒的引物序列

| 病毒 | 基因 | 引物 | 极性 | 序列(5'-3') | 位置 | 产物大小(bp) |
|-----|-------|--------|----|------------------------------|-----------|----------|
| NVs | RdRp | JV12 | + | ATACCACTATGATGCAGATT | 4552-4572 | 327 |
| | | JV13 | - | TCATCATCACCATAGAAAGAG | 4858-4878 | |
| | RdRp | P289 | + | GACAATGTAATCATCACCATA | 4865-4886 | 319 |
| | | P290 | - | GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC | 4568-4590 | |
| | RdRp | Ni | + | GAATTCCATCGCCCACTGGCT | 4756-4776 | 113 |
| | | E3 | - | ATCTCATCATCACCATA | 4869-4853 | |
| RVs | VP7 | P1 | + | GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCGCTCTGG | 1-28 | 392 |
| | VP7 | P2 | - | GATCCTGTTGGCCATCC | 376-392 | |
| AVs | ORF1a | Mon340 | + | CGTCATTTGTTTGTGTCACTACT | 1182-1203 | 288 |
| | ORF1a | Mon348 | - | ACATGTGCTGCTGTTACTATG | 1450-1470 | |

1.7 单一 RT-PCR 和多重 RT-PCR 的灵敏度测定

将轮状病毒、诺瓦克病毒及星状病毒的 RNA 进行 10 倍梯度系列稀释 ,分别按上述反应体系和条件进行单一和多重 PCR 扩增 ,确定和比较单一 PCR 和多重 PCR 的灵敏度。

1.8 诺瓦克病毒引物的选择

针对诺瓦克病毒序列变异性较大 ,在单一和多重 PCR 扩增中分别以 Ni/E3 JV12/JV13 P289/P290 3 对不同的引物对分别进行扩增 ,以所检出的阳性样本数决定引物的适用性。

1.9 电泳和测序

1.2%琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物 ,以 Gold view 染料替代 0.5μg/mL EB ,凝胶成像分析系统 UVI 观察结果。PCR 产物序列测定由上海博亚公司完成。所得的产物序列输入 GenBank ,用 Blast 进行同源性比对。

2 结果

2.1 单一 RT-PCR 及多重 RT-PCR 产物分析

将轮状病毒、诺瓦克病毒的扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳上分离 ,紫外成像系统观察扩增结果 ,均得到了清晰特异的预期扩增条带 ,轮状病毒的预期条带为 392bp ,诺瓦克病毒的预期条带为 327bp ,星状病毒的预期条带为 288bp。阴性对照无任何条带出现。如图 1 所示。

2.2 灵敏度

检测灵敏度通过检测 RNA 的系列稀释度确立。实验中设立 10⁻¹ ~ 10⁻⁶ 共 6 个稀释度 ,经过换算 ,所对应的核酸量依次为 50ng、5ng、0.5ng、50pg、5pg、

0.5pg ,对六个稀释度同时进行 RT-PCR 检测 ,并进行点杂交验证其灵敏度。将可检测到杂交信号的最高核酸稀释浓度作为最高的检测灵敏度 ,所在的实验环境和方法完全相同 ,每个稀释度同时做 3 个重复。并在多次实验后 ,轮状、诺瓦克、星状病毒得到的可重现性稳定的最高检测限依次是 10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁵ ,即可检测到的 RNA 依次为 5pg、50pg、50pg。如图 2 所示。

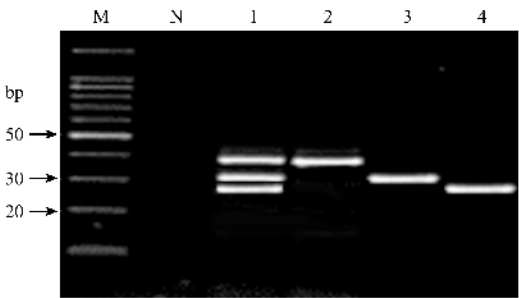


图 1 轮状病毒、诺瓦克病毒和星状病毒单一及多重 RT-PCR 特异性产物图

M 100bp DNA Marker , N 阴性对照 ,1 3 种病毒多重 RT-PCR 2 轮状病毒产物(392bp) 3 诺瓦克病毒(327bp) 4 星状病毒(288bp)

2.3 多重 PCR 的优化

多重 PCR 要求不同引物能在同一反应体系中进行特异性扩增 ,影响其扩增效果的因素较多 ,因此 ,本试验中对反应体系和条件分别进行了优化 ,以确保在最少的成本和时间下 ,扩增的效率最高。在多重 PCR 体系的优化过程中 ,首先对最佳引物浓度进行了大量摸索 ,实验设置了从 0.2μmol/L 至 1μmol/L ,每 0.1μmol/L 为一个浓度扩增 ,利用正交试验 ,最终确定最优化的引物浓度为轮状病毒为 0.2μmol/L ,诺瓦克为 0.5μmol/L ,星状病毒为

0.4 μ mol/L 对 Mg²⁺ 浓度分别采用了 1.5mmol/L 至 4.0mmol/L ,每 0.5mmol/L 为一个梯度 ,结果发现 3.5mmol/L 为最优 Mg²⁺ 浓度。对扩增条件的优化中 ,主要针对退火温度进行。由于 3 种病毒各自引

物的最佳反应温度有差异 ,因此在最初采用单一退火温度进行多重 PCR 时 ,得到的扩增结果从亮度及扩增结果的稳定性方面都不是很理想。最终在不断摸索条件的基础上 ,在 3 种病毒单一 RT-PCR 条件的基础上 ,采用降落 PCR ,退火温度从 55℃ 到 52℃ ,每 5 个循环降低 1℃ ,退火温度到 52℃ 时进行 25 个循环 ,操作过程结合热启动 PCR ,得到了均一、稳定的预期特异性扩增产物。

2.4 检出率

实验所用 128 份腹泻样本 ,针对每种病毒 ,分别采用了传统的 ELISA、电镜检测法及多重 RT-PCR 方法同时对所有的样本进行检测 ,3 种检测方法的检出率如表 2 所示。在诺瓦克病毒检测中 ,对 3 对引物的效率也进行了比对。

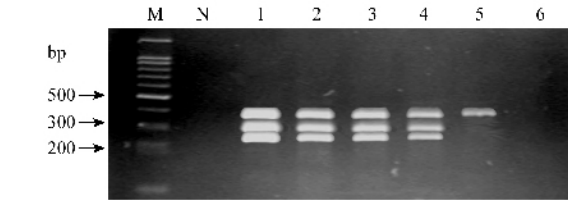


图 2 轮状病毒、诺瓦克病毒和星状多重 RT-PCR 灵敏度
M100 bp DNA Marker , N 阴性对照 ,1 ~ 6 轮状病毒、诺瓦克病毒和星状病毒的核酸总量为 50ng、5ng、0.5ng、50pg、5pg、0.5pg 依次扩增所得的产物 ,每条泳道 ,从上往下依次为轮状病毒、诺瓦克病毒和星状病毒

表 2 多重 RT-PCR 与 ELISA、电镜对临床样本的检出率比较

| | 样品 | 轮状病毒 | 诺瓦克病毒 | 星状病毒 |
|-----------|-----|--------------|--|-------------|
| 单一 RT-PCR | 128 | 62(48.44%) | 8(6.25% JV12/JV13)7(5.47% Ni/E3)6(4.69% P289/P290) | 11(12.5%) |
| 多重 RT-PCR | 128 | 62(48.44%) | 8(6.25% JV12/JV13)7(5.47% Ni/E3)6(4.69% P289/P290) | 11(12.5%) |
| ELISA | 128 | 58(45.31%) | / | 11(12.5%) |
| 电镜 | 128 | / | 7(5.47%) | / |

2.5 同源性比对

将序列输入 GenBank 中用 Blast 软件比对 ,轮状病毒的序列和已知序列 K02033、Y18786、D16326、D86266、AJ491165 和 AF438228 的同源性达 95% ~ 100% ,诺瓦克病毒序列和 L07418(1) ,M87661(1) ,X86557(2)和 U07611(2)的同源性达 93% ~ 99% ,星状病毒序列和 L23513 的同源性可达 96% ~ 100%。

3 讨论

轮状病毒、诺瓦克病毒和星状病毒是世界范围内重要的胃肠炎病毒因子。自从澳大利亚学者 Bishop 和他的同事 1973 年利用电镜法发现轮状病毒以来 ,至今已经 30 年了 ,人类轮状病毒已被确认为引起全世界婴幼儿急性胃肠炎最常见的原因 ,每年由轮状病毒引起的腹泻在世界范围内有 14 亿之多。星状病毒是引起急性病毒性胃肠炎仅次于轮状病毒的主要病原之一 ,可散发或暴发流行 ,有明显季节性。另外 ,据美国 CDC 统计 ,在美国 96% 的严重非细菌性胃肠炎由诺瓦克引起。1996 年 4 月至 1997 年 3 月 ,我国首都儿科研究所北京市感染与

免疫中心实验室对 1109 例来自首都儿科研究所附属儿童医院门诊及体检血清进行检测 ,发现诺瓦克病毒的阳性检出率高达 88.8% ,这说明诺瓦克病毒的感染非常普遍。近年来各个省份及地区有关诺瓦克病毒引起的腹泻时有报道。

由于这类病毒粒子在患者或无症状的携带者的粪便中被大量排放 ,常导致胃肠炎疾病的暴发流行。并且这些病毒既可通过粪口途径传播 ,也可通过食源性或水体途径传播。迄今为止 ,由于高特异性和灵敏性 ,RT-PCR 是检测食源性病毒最为高效的方法。有很多的研究表明传统的 PCR 灵敏度高于电镜和酶联免疫法 ,经改造的套式 PCR 的灵敏度更高。通过本实验的结果也充分证明了这一点。但是常规的 RT-PCR 都是一个反应扩增一个模板 ,这在处理大量样本时非常浪费时间和成本。多重 PCR 方法的建立解决了这一难题 ,并已在很多方面得以应用。本研究建立的灵敏、特异、快速地在粪便样本中同时检测轮状病毒、诺瓦克病毒和星状病毒的多重 RT-PCR 检测方法 ,既保留了常规 PCR 的特异性、敏感性 ,又减少了操作

本实验所用的轮状病毒引物 P1/P2 和星状病毒引物 Mon340/Mon348 已经在很多的文献中得到证实,并且在 GenBank 中查找了不同株的轮状病毒和星状病毒序列,根据 Oligo4.0 和 Primer5.0 软件程序对引物进行设计和理论分析,并利用 Blast 进行了同源性比对,表明了所选用的引物对不同的毒株高度特异。经 ELISA 试剂盒检测的轮状病毒和星状病毒的阳性样本,在多重 RT-PCR 体系中,仍然表现为阳性,并且 ELISA 未能检出的 4 个样本,在多重 RT-PCR 中得以检出。充分证明了所建立的反应方法的特异性和灵敏性。选用的诺瓦克病毒引物是目前欧盟 5 个国家的 5 个实验室经过证明的能同时扩增诺瓦克 G I、G II 两个型别的引物对,在单一 PCR 和多重 PCR 反应中,以相同的反应体系,分别以 Ni/E3、JV12/JV13、P289/P290 3 对不同的诺瓦克病毒引物对检测样本,在多次反复的灵敏度试验中表明 JV12/JV13 引物对的扩增效果比其它两对的扩增效果好、检出率高。用 Ni/E3 和 P289/P290 引物对检测的诺瓦克病毒阳性个数分别为 7 个和 6 个,而 JV12/JV13 引物对检测的阳性个数为 8 个,比电镜的检出

个数(7 个)更高,并且测序结果证实了其正确性。因此本研究的所有结果均是以 JV12/JV13 为引物得出。

本研究建立的诺瓦克病毒、轮状病毒和星状病毒多重 RT-PCR 检测技术,其灵敏度和检出率高于传统检测法,这为进行细致而深入的流行病学调查研究,大规模突发性疾病暴发时病因的溯源打下了良好的技术基础。

参考文献

- [1] 吴清平,寇晓霞,张菊梅.微生物学通报,2004,31(3):101~105.
- [2] O'Neill H J, McCaughey C, Coyle P V, *et al.* J Clin Meth, 2002, 25(3):335~343.
- [3] Flores J, Sears J, Schael P I, *et al.* J Virol, 1990, 64(4):4021~4024.
- [4] Koopmans M, De Bruin E, Vennema H. J Clin Virol, 2002, 25(2):233~236.
- [5] Vinje J and Koopmans M. J Infect Dis, 1996, 174(3):610~615.
- [6] Belliot G, Laveran H, Monroe S S. Arch Virol, 1997, 142(7):1323~1334.
- [7] 靖宇,钱渊,王洛平.病毒学报,1998,14(4):322~324.