

## PCR 技术在 RNA 病毒诊断中的应用

苏 卫

(昆明动植物检疫局, 云南昆明 650034)

聚合酶链锁反应 (PCR) 是 1985 年 Saiki 等<sup>(1)</sup>人首先建立的一种体外扩增 DNA 的方法。应用该方法可使极微量的特定 DNA 片段在几小时内迅速扩增至百万倍。由于这一技术具有快速、简便、敏感及特异性强的优点, 因此在其首次报道后不久, PCR 技术就在核酸分子研究领域内得到广泛利用, 并显示出巨大的潜力。

随着 PCR 技术的推广和应用, 对 RNA 病毒诊断的报道也日益增多, 但目前仍需将 RNA 反转录为互补 DNA (cDNA), 才能应用 PCR 技术加以扩增。RNA 病毒可分为双链 RNA 和单链 RNA, 在反转录为 cDNA 的过程中稍有差异, 双链 RNA 经反转录后可直接形成双链 cDNA, 从而作为扩增的模板, 而单链 RNA 病毒则需要反转录成单链 cDNA 后, 进一步合成另一条 cDNA 链, 才能作为扩增的模板, 但扩增时使用的 Taq DNA 聚合酶在有引物存在的情况下可部分起着合成另一条 cDNA 的作用。单链 RNA 病毒包含单正链和单负链 RNA 两种病毒, 前者其核酸实际是 mRNA, 而后者不能直接起 mRNA 作用, 必须经转录后方能作为 mRNA 指导病毒蛋白质的合成。

### (一) 在单链 RNA 病毒诊断中的应用

Hyypia 等<sup>(2)</sup>应用 PCR 技术检测单正链的小 RNA 病毒获得成功, 在使用时首先选择基因非编码区中具有代表性的高稳定区的寡聚核苷酸链作为引物, 而且上游下游引物间距离设计为 305bp, 在反转录酶及 DNA 聚合酶 I 的作用下将病毒 mRNA 反转录为 cDNA, 再经 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 其产物用凝胶电泳观察结果扩增的 DNA 片段的大小与设计相符, 为了证实扩增产物是否正确, 作者还选择

设计两段处于扩增产物序列中间各为肠道病毒和鼻病毒亚种的 16 个核苷酸片段, 在 5' 末端分别标记上 <sup>32</sup>P 后作为探针, 对扩增产物进行杂交, 结果肠道病毒全部试验毒株扩增后除埃柯病毒 22 外均可用肠道病毒探针检测出, 而用鼻病毒寡聚核苷酸探针杂交则无反应, 相反, 鼻病毒探针能够识别所有的鼻病毒 PCR 扩增产物, 从而证实 PCR 扩增产物为病毒核酸靶序列, 并表明设计的引物适用于小 RNA 病毒的肠道病毒亚种和鼻病毒亚种。马静雅等<sup>(3)</sup>对小 RNA 病毒的另一成员脊髓灰质炎病毒进行了 PCR 诊断和定型, 通过设计的 4 对不同引物对 Sabin 毒株进行 PCR 扩增, 结果 3 对型特异引物分别对 Sabin 株 I、II 和 III 型特异结合, 其扩增产物分别为 97bp、71bp 和 44bp 与设计结果相符。另外, 在 3 个型别的毒株两两混合后, 于各混合组中同时加入 3 对型特异引物, 仍能清楚地鉴别出各组混合的型别, 同时马静雅等<sup>(3)</sup>还提出用 Capture-PCR 探讨, 从样品中直接用特异性脊髓灰质炎抗体包被于塑料板上, 捕捉病毒颗粒用作 PCR 检测的可能性, 通过试验其结果初步表明, 吸附的病毒颗粒洗脱收集后, 进行反转录及扩增, 敏感度达到 1 TCID<sub>50</sub>/ml。人艾滋病病毒 (HIV) 为单链 RNA 病毒, 在其感染早期血清出现 HIV 抗体之前, 采用 PCR 技术便可测知 HIV 基因, 另外也可在艾滋病患者存在非特异性相关症状时, 从病人外周血白细胞, 甚至其碎片中测得极微量的 HIV 基因, 因此 PCR 方法日益成为早期检测 HIV 的重要方法。Rogers 等<sup>(4)</sup>用 PCR 方法检测 7 例新生儿 HIV 基因阳性婴儿, 其中 5 例仅在 9 个多月龄时便发生艾滋病, 而 9 例未检出前病毒的婴儿, 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

滋病症状。杨立宏等<sup>[5]</sup>应用 PCR 直接检测 HIV 病毒基因，在 2pg 含有 HIV 基因的 pARV-2/7A DNA 中，经 PCR30 次循环后，HIV 基因扩增产量可达 3.45μg，另外用 10 个分子上述含 HIV 基因的 DNA，35 次循环后，即可电泳出清晰条带，扩增后若结合 Southern 杂交法进行检测，则能检出 1 个分子的 HIV。Kwor 等<sup>[6]</sup>应用 PCR 方法检测 HIV 病毒，同时与 Southern 杂交法进行比较，结果用 PCR 法从 19 个有逆转录酶 (RT) 活性的细胞 DNA 样品中检出 17 个样品含有 HIV 病毒核酸，而 Southern 杂交法从 18 个 RT 阳性细胞的 DNA 样品中只检出 11 个有病毒核酸。另外用 PCR 方法还从 41 个 RT 阴性细胞 DNA 样品中检出 9 个含有 HIV 核酸，从而纠正了细胞系的 RT 活性阴性，即表明 HIV 阴性的看法。汤一苇等<sup>[7]</sup>应用 PCR 技术鉴别肾综合症出血热病毒的血清型，此病毒为单股负链 RNA 病毒，结果表明 PCR 方法不仅能够快速、敏感地检测出病毒核酸的存在，同时在型特异引物的介导下能准确地区分血清 I 型和血清 II 型病毒。除上述病毒外，还对口蹄疫病毒、甲型肝炎病毒和丙型肝炎病毒等应用 PCR 技术检测成功。

**(二) 在双链 RNA 病毒中的检测应用**

Dangler 等<sup>[8]</sup>设计选择兰舌病毒 (BTV) 核酸第 6 片段 5' 末端 210bp 作为群特异基因进行 PCR 扩增，结果对 5 种型的美国标准兰舌病毒株 BTV-2、10、11、13 和 17 型均能产生 210bp 的扩增产物，将扩增产物标记<sup>32</sup>P 后作为探针反过来与兰舌病毒核酸杂交，证实了扩增产物的正确性，试验表明 PCR 检测兰舌病毒具有很高的敏感度，可检测出低于 2pg 的 BTV 核酸靶序列，即相当于 7500 个病毒颗粒的 RNA。Gould 等<sup>[9]</sup>则选择兰舌病毒核酸编码 VP<sub>7</sub> 蛋白的一段基因序列，合成群特异引物，对未感染羊血、感染 BTV<sub>13</sub> 的羊血、感染 BTV<sub>1</sub> 的羊血及感染未知病毒的羊血等样品进行 PCR 扩增，经琼脂糖电泳检查，直接用于 BTV 的诊断。Davis 等<sup>[10]</sup>应用 PCR 技术对双链 RNA 的禽传染性法氏囊病毒 (IBDV) 进行了检测研究，首先从大

片段核酸中选 3 段寡聚核苷酸作为引物，引物间距离分别为 264 和 110bp，结果显示形成距离为 110bp 的一对引物能够扩增 3 株 IBDV，而距离为 264bp 的引物则不能产生 PCR 产物，表明引物的设计至关重要，另外通过引物设计能够区分型的差异，甚至野毒和疫苗毒的差异。Xu 等<sup>[11]</sup>报道用 PCR 技术直接检测粪便中的轮状病毒，并与核酸杂交及聚丙烯酰胺凝胶电泳作比较，结果表明 PCR 的敏感性比核酸杂交高 5×10<sup>3</sup> 倍，比凝胶电泳高 1×10<sup>5</sup> 倍。

**(三) 技术改进及展望**

Cetus 公司新开发的 rTth DNA 聚合酶，使 RNA 和 PCR 扩增变为简单易行，这种酶将反转录和聚合作用融为一体，使 RNA 反转录为 cDNA 及进行 PCR 扩增不需要分步进行操作，直接由 rTth DNA 聚合酶将 RNA 反转录后扩增出大量的 DNA 片段，大大简化了操作程序，提高了效率。笔者认为对于 RNA 病毒，能否提取一种依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶在体外大量扩增原始 RNA 靶序列，如能这样便可解决反转录带来的敏感性下降问题。总之，PCR 技术已在 RNA 病毒的检测方面得到了广泛应用，并将发挥愈来愈重要的作用。

**参 考 文 献**

1. Saiki R K et al. : *Science*. **230**: 1350-1354, 1985.
2. Hyypiä T et al. : *J. Gen. Virol.* **70**: 3261-3268, 1989.
3. 马静雅等: *病毒学报*, **7** (2): 164-169, 1991.
4. Rogers M F et al. : *N. Engl. J. Med.* **320**: 1649-1654, 1989.
5. 杨立宏等: *中华微生物学和免疫学杂志*, **10** (5): 273-276, 1990.
6. Kwor S et al. : *J. Virol.* **61**: 1690-1694, 1987.
7. 汤一苇等: *病毒学报*, **6** (4): 368-372, 1990.
8. Dangler C A et al. : *J. Virol. Meth.* **28**: 281-292, 1990.
9. Gould A R et al. : *Austr. Vet. J.* **66** (12): 450-454, 1989.
10. Davis V S et al. : *Analytical Biochemistry*. **189**: 30-34, 1990.
11. Xu L et al. : *J. Virol. Meth.* **27** (1): 29-38, 1990.

(1992-4-13 收稿)