

逆转录-聚合酶链反应快速检测柯萨奇 B 病毒

王同展 徐爱强 王常银 王爱莲*

(山东省卫生防疫站 济南 250014)

孔 健

(卫生部北京生物制品研究所 北京 100024)

摘要 在柯萨奇 B₃病毒 RNA 5'端非编码区选择并合成引物,用 RT-PCR对我省苍山县 23 份无菌性脑炎患者的粪便标本进行检测,并与常规病毒分离、培养、鉴定进行了平行比较。两种检测结果基本一致。

关键词 柯萨奇 B₃病毒, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

分类号 Q939.93

柯萨奇病毒属于肠道病毒,根据实验动物产生病变的性质分为 A、B 两组,其中 B 组病毒可引起病毒性心肌炎、肺炎、脑膜炎等疾病,严重危害人类的身心健康,为预防、医疗工作者所重视。柯萨奇 B 病毒有分离困难、操作繁杂、需时间长等缺点,难以适应临床需要。聚合酶链反应(PCR)作为现代分子生物学的一项推广、应用重大技术,为该病毒的检测开辟了新途径。1993 年 Severini^[1]等报道了利用巢式 PCR 检测组织标本中的柯萨奇 B 病毒,获得了令人满意的结果。我们在柯萨奇 B₃病毒 RNA 5'端非编码区选择并改进了 Severini 报道的引物,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)进行了无菌性脑膜炎患者粪便标本柯萨奇 B 病毒检测的方法研究。现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 脊灰病毒标准株由中国药品生物制品检定所提供;艾柯病毒、柯萨奇病毒标准株由卫生部北京生物制品研究所提供。

1.1.2 临床标本 采集我省苍山县 1994 年 3~9 月流行性无菌性脑炎患者发病 7 日内的粪便标本 23 份。

1.1.3 引物依据 Cox B₃病毒核苷酸序列^[2],选择、改进了 Severini 报道的引物,合成了一对专

门用于检测 Cox B 病毒的引物:

C1 (447~463) 5'-ATTTCAGGGGCCGAGG A-3'

C2 (180~196) 5'-CCCCGGACTGAGTATC A-3'

扩增产物长度为 283bp。

1.2 方法

1.2.1 病毒的常规分离、鉴定,按 WHO 推荐的方法进行。粪便标本经氯仿处理后,离心取上清液接种 RD、Hep-2 细胞。35℃ 培养观察 7d,盲传 2 代观察 7d,细胞病变(CPE)呈 + + + ~ # 时收获,冻融 3 次, - 30℃ 保存备用。二代培养标本仍阴性,视为病毒分离阴性。将分离的病毒与肠道病毒组合抗血清(由中国医学科学院昆明生物研究所提供)中和并进行血清学鉴定。

1.2.2 病毒捕获:将大便上清液接种 RD、Hep-2 细胞,吸附 1h 后,用细胞维持液(MEM)洗涤三次,加 MEM 1ml, 36℃ 培养 24h 后,冻融 3 次, - 30℃ 保存备用。

1.2.3 病毒 RAN 提取:采用异硫氰酸胍-酚-氯仿法。抽提物干燥后,加双蒸水 10μl 溶解, 4℃ 保存备用。RD、Hep-2 细胞抽提物作阴性对照。

1.2.4 逆转录合成 cDNA:取 RNA 液 2μl, 5 ×

* 参加本工作的还有山东省卫生防疫站的刘桂芳,宋立志,周晓琳,王海岩,李漫时
1996-12-18 收稿

RT 缓冲液 4 μ l, RNasin 40 μ l, AMV 逆转录酶 8 μ l, 5mmol/L dNTP 3 μ l, 引物 C₁ 1 μ l, 加双蒸水补至 20 μ l, 混匀后覆盖液体石蜡 50 μ l, 42℃ 水浴 60min.

1.2.5 多聚酶链反应 (PCR), 在上述逆转录反应液中加入 C₂ 引物 1 μ l, 10 \times PCR 缓冲液 10 μ l, Taq 酶 2 μ l, 25mmol/L MgCl₂ 6 μ l, 然后加双蒸水补至 100 μ l. 混匀后 95℃ 变性 5min, 开始扩增, 参数为: 变性 94℃ 60s, 退火 52℃ 60s, 延伸 72℃ 90s, 共 30 个循环, 最后一周时为 72℃ 7min.

1.2.6 扩增产物分析, 取扩增产物 10 μ l, 在 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察. 以 pBR322 / HaeIII 作为分子量标准.

2 结果

2.1 引物的特异性、敏感性

引物对柯萨奇 B 病毒 6 个血清型 RT-PCR 扩增, 均有明显分离带, 扩增产物为 283bp. 对脊髓灰质炎病毒 I、II、III, 艾柯病毒 2, 6, 7, 9, 11, 16, 20 进行 RT-PCR, 扩增均无分离带. 标本 RT-PCR 扩增部分结果见图 1.

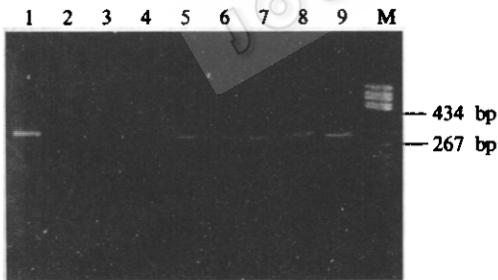


图1 C₁, C₂引物扩增结果

M Marker, 1.阳性对照, 2.阴性对照, 3, 4阴性标本, 5, 6, 7, 8, 9阳性标本

2.2 标本检测:

对 23 份采集自苍山县的粪便标本的悬液, 进行了病毒捕获后 RT-PCR, 并与柯萨奇病毒常规分离、培养鉴定进行了比较. 常规法需时 3

周~2 个月, 病毒捕获后 RT-PCR 只需 72~96h. 结果见表 1.

表1 各方法检测情况表

	标本	阳性	血清学分型				
			CoxB ₃	CoxB ₅	Echo ₂	Echo ₉	未定
常规分离鉴定	23	9	5	1	1	1	1
病毒捕获PCR	23	7	5	1	0	0	1
直接PCR	23	1	1	0	0	0	0

3 讨论

肠道病毒 RNA 5'端非编码区是高度保守的基因区, 病毒 RNA 在复制过程中极少发生变异, 在该区选择、设计的引物, 保持了与同种待检物核苷酸序列的高度一致性和非柯萨奇 B 其他肠道病毒核苷酸序列的极大差异性. 保证了引物的特异性和相应待检物的全部检出. 粪便中生物抑制因子和众多化学离子的存在, 均能影响 RT-PCR 直接从粪便标本中检出柯萨奇病毒, 可通过细胞捕获病毒后 RT-PCR, 既能除去各类抑制因子, 又保留了感染因子, 克服了常规方法的不足, 提高了诊断的特异性、敏感性、及时性. 柯萨奇病毒的常规分离、鉴定是在细胞培养得到病毒后, 通过血清学鉴定得出, 柯萨奇病毒特异性抗体敏感性差异的病毒颗粒^[3]的存在, 它们在组织培养传代后, 所产生的变异株影响了血清学效价, 同样给血清学分型带来困难.

总之, 粪便标本进行病毒捕获后 RT-PCR 检测, 快速、准确, 为预防、临床提供可靠的诊断依据.

参考文献

- [1] Serveni G M, Mestroni L, Falaschi A *et al.* J Clin Microb, 1993, 31(5): 1345~1349.
- [2] Lindberg A M, Stalhandske P O, Petterson U. Virology, 1987, 156: 50~63.
- [3] 余贺主编. 医学微生物学. 北京: 人民卫生出版社, 1983, 678~684.