

• 技术方法 •

聚合酶链反应直接检测粪便中脊髓灰质炎病毒 RNA 的研究

刘明团¹ 杨宏徽¹ 王树声¹ 孔 健²

摘要 用聚合酶链反应(PCR)技术检测19份急性弛缓性麻痹患者(AFP)的粪便中脊髓灰质炎(脊灰)病毒,其中11份阳性,与中和试验鉴定及单克隆抗体鉴定结果符合率为90.90%~100%。该法不仅简便、敏感、特异分型,而且可作型内鉴别,为环境样品中脊灰病毒污染提供了检测手段。

关键词 脊髓灰质炎病毒 聚合酶链反应 (PCR)

Detection of Poliovirus in Fecal Specimens by Polymerase Chain Reaction Liu Ming-tuan, Yang Hong-hui, Wang Shu-sheng, et al. Guangxi Sanitary and Anti Epidemic Centre, Nanning 530021

Poliovirus-RNA was detected in 11 clinical fecal specimens with AFP out of 19 samples. These comparative results between NT and Mcab identifications showed a coincidence rate of 90.90%-100%. Our experiment suggested that PCR a simple, sensitive, identification type and could be used for intratypic differentiation of poliovirus strains. It can also be applied for the detection of poliovirus contamination in the environment.

Key words Poliovirus Polymerase chain reaction (PCR)

脊髓灰质炎(简称脊灰)是一种严重急性瘫痪性的病毒性疾病。该病在广西仍有散发的麻痹病例,仅1994年1~6月份急性弛缓性麻痹症病例(简称AFP)报告85例,从粪便中分离出19株肠道病毒,其中11株为脊灰病毒。为了达到消灭脊灰的目的,需要用特异性强,敏感性高,简单、快速的试验方法,对麻痹病例粪便和环境污水中的病毒做出快速的检测和分型,及时采取防治措施,控制和消灭脊灰。1994年2月我们开展了用PCR直接扩增粪便标本中脊灰病毒,经凝胶电泳检测取得满意结果,现将结果报告如下。

材料与方 法

一、标准脊髓灰质炎病毒株: Sabin 疫苗株3个型均由卫生部北京生物研究所提供。

二、引物: 由卫生部北京生物制品研究所孔健同志设计提供,引物 polio 01及 polio 02选自5端的非编码区,其序列为:

polio 01(515-532)5'-GACTTGCGCGTTACGACA-3'

polio 02(424-440)5' AGAGCCTATTGAGCTAC-3'

该引物对3个型的疫苗株和野毒株均有扩增作用,产生109bp的特异性核酸片段,而非脊灰肠道病毒无扩增作用。

型特异性引物均选自VP₁区,各型的引物序列和扩增产物如下:

Sabin11(2769-2788)5' AAGCTGAGTTATCCACGGTT-3'

Sabin12(2521-2540)5' AGCATGATTGACAACACAGT-3'

该引物对仅扩增 Sabin 1型病毒,产生268bp的特异性核酸片段;

Sabin21(2697-2715)5'TCGCGTTCGTCTCGGATG-3'

Sabin22(2570-2589)5'-CCAATTGCCTGCCTGGACAC-3'

该引物对仅扩增 Sabin 2型,产生146bp的特异性核酸片段;

Sabin31(3371-3390)5'-CTCAGATAAGGGGTCCAAGT-3'

1 广西壮族自治区卫生防疫站 南宁 530021

2 北京生物制品研究所

Sabin32(3155-3174)5'-CAGCTGCCAATGACCAGTT-3'

该引物对仅扩增 Sabin 3型,产生233bp的特异性核酸片段。

三、病毒粪便标本: AFP 粪便标本收集于1994年广西各地、市、县卫生防疫站送检的便样。粪便经 Hank's 液稀释成20%悬液,按1/10的量加入氯仿处理10min,于4℃离心机离心(10 000r/min)10min,取上清液分为二管,一管用于细胞培养分离病毒,另一管用于 PCR 直接检测。

四、病毒分离结果的细胞中和试验鉴定和单克隆抗体法鉴定:

1. 细胞中和法鉴定: 将阳性标本用维持液稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} ,分别与三型组合脊髓灰质炎标准免疫血清(20个中和单位)等量混合于聚苯乙烯微孔板上进行鉴定。试验中和如有一型免疫血清与病毒混合后产生细胞病变,则表示病毒被该血清所中和,新分离的病毒即属该型。

2. 脊灰单克隆抗体反相间接血凝法: 将病毒倍比稀释分别加入等量25 μ l I、II、III型脊灰单克隆抗体致敏的诊断血球,振匀后30~60分钟观察结果,与相应型别诊断血球凝集者,判为该型病毒。

五、粪便中 RNA 的提取: 每份标本各取0.5ml 经氯仿处理过的粪便悬液放入1.5ml 离心管中,充分混匀后置60℃水浴5min,12 000r/min 离心15min,取水相,加入等体积的氯仿-异戊醇试剂(24:1),混匀后12 000r/min 离心5min,取水相0.4ml,加入2mol/L NaAC 10 μ l 冷乙醇750 μ l,置-70℃60min 后离心,于无菌罩吹风干燥,加双蒸水10 μ l 溶解,置-20℃备用。

六、逆转录合成 DNA: 取2 μ l 病毒 RNA 溶液4 μ l 5 \times RT 缓冲液, RNasin 40 μ (华美公司), 5mmol/l dNTP3 μ l 引物 polio 01, Sabin11, Sabin21, Sabin 31各加3 μ l(10pmol/ μ l), 加双蒸水至20 μ l, 混匀后覆盖液体石蜡50 μ l, 置42℃水浴30min。

七、PCR 法扩增: 在上述逆转录反应液

中加 polio 02, Sabin 12, Sabin22, Sabin32 引物各2 μ l; 10 \times PCR 缓冲液10 μ l; 6 μ l 的25mmol/L MgCl₂, 2 μ Taq 酶(华美公司), 然后双蒸水补至100 μ l, 混匀后在94℃水浴变性3min, 开始扩增, 循环参数为94℃45秒, 57℃60秒, 72℃60秒, 共循环25周, 最后一周时72℃反应时为7min。

八、扩增产物的检测: 10 μ l 反应产物在1%琼脂糖(低熔点琼脂糖)中电泳, 并以溴化乙锭染色法在 UV-I 型紫外分析仪下观察扩增结果。

结 果

一、19份粪便标本检测结果: 附表所示: 表明 PCR 检测与病毒分离阳性、中和试验鉴定及脊灰单克隆抗体反相间接血凝法鉴定结果符合率为90.90%~100%。该法较病毒分离、细胞中和试验鉴定型别原需要28天缩短到3天。

二、脊灰病毒分型、型内分析和其它肠道病毒区别: 用4对引物 polio 01, polio 02; Sabin 11, Sabin 12; Sabin 21, Sabin22; Sabin 31, Sabin32分别反转录并扩增 Sabin I、II、III型病毒和19份粪便标本中病毒 RNA 经电泳后分别出268bp、233bp、146bp 大小的型特异性条带和109bp 脊灰病毒的电泳带, 其它8株能致 R. D 细胞病变的肠道病毒(经组合型脊灰多克隆抗血清中和鉴定属非脊灰病毒)均为阴性(见附表)。

三、PCR 检测的灵敏度: 选择第一代和第二代培养致细胞病变的各5份粪便标本, 按上述方法提取病毒核酸, 用 polio 01和 polio 02引物 PCR 扩增产物电泳结果表明, 第一代培养产生细胞病变的5份标本均可看到清晰的109bp 粗电泳条带, 另外5份盲传第二代培养致细胞病变的标本提取物经 PCR 扩增产物电泳出现细小条带, 有些条带模糊不清。这种情况用第一次扩增产物按 PCR 合成系统加入反应试剂重复扩增的产物电泳可呈明显的109bp 大小的条带。实验结果表明 PCR 法

附表 从粪便中检测脊髓灰质炎病毒结果

标本号	病 毒 分 离				
	CPE 1	代数 2	中和鉴定 (型 别)	单克隆抗体 鉴定 (型别)	PCR 分型和 型内鉴别
1 (94-2)	+		I	I	I (V)
2 (94-3)	+	+	E	-	-
3 (94-10)		+	I	I	I (V)
4 (94-13)	+		E	-	-
5 (94-17)	+		E	-	-
6 (94-18)		+	I	I	I (V)
7 (94-22)	+		I	I	I (V)
8 (94-27)	+		III	III	III (V)
9 (94-42)		+	I	I	I (V)
10 (94-52)		+	I	I	I (V)
11 (94-62)		+	I	I	I (V)
12 (94-63)	+		I	I	I (V)
13 (94-64)	+		III	III	III (V)
14 (94-76)		+	E	-	-
15 (94-92)		+	E	-	-
16 (94-103)	+		E	-	-
17 (94-127)	+		E	-	-
18 (94-130)	+		I	-	I (V)
19 (94-142)	+		E	-	-

E: 其它肠道病毒; CPE: 细胞病变; +: 阳性标本; V: 疫苗相关株

检出阳性率与标本的收集时间, 质量好坏有直接关系。

现疫点, 有目的采取强化免疫措施, 控制脊髓灰质炎野毒株的流行, 将有重要意义。

讨 论

通过本研究结果与病毒分离之组织培养法细胞病变指标, 中和试验和单克隆抗体鉴定结果相比, 简便、灵敏。在盲传第二代第4天后出现细胞病变的粪便标本用 PCR 法扩增的产物电泳带显示109bp 大小的核酸片段和不同大小的型特异核酸片段。检测19份粪便标本中有11株脊灰病毒, 血清型分别为 I 型2株, II 型7株, III 型2株, 非脊灰病毒8株, 型内鉴别分析新分离的11株脊灰病毒均为疫苗病毒相关株。因此, 该法的应用对脊髓灰质炎的监测和环境污水中病毒的检测提供了有力的手段, 及时诊断病原体, 型内鉴别, 发

参 考 文 献

- 1 Toyode H, Girard M, Aymard L, et al. Complete nucleotid sequences of all three poliovirus serotype genomes. J Mol Biol, 1984, 174:561.
- 2 马静雅, 张礼壁, 刘文军, 等. 聚合酶链反应用于脊髓灰质炎病毒诊断和定型的实验研究. 病毒学报, 1991, 7 (2):164.
- 3 孔健, 刘保奎, 迮文远, 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.
- 4 刘明团, 周影屏, 斑华国, 等. RT-PCR 快速鉴别脊髓灰质炎病毒野毒株和疫苗株的应用. 广西医学, 1993, 15(6):574.

(收稿: 1995-09-18 修回: 1995-10-07)