

• 技术方法 •

# PCR 系统制备地高辛标记的探针 检测脊髓灰质炎病毒核酸

刘明团 王树声 朱田风 韦一知

**摘要** 笔者应用聚合酶链反应(PCR)合成系统,以逆转录的 Sabin I、II、III 型病毒 cDNA 为模板,在反应液中加入标记的 Dig-dUTP,经扩增制备了地高辛配基标记的脊髓灰质炎病毒 cDNA 探针。该法比 PCR 扩增产物后,电泳,片段回收标记、提纯,常需 3 天。结果比较 PCR 技术直接制备地高辛标记 cDNA 探针方便,快速,标记率高,用于型别鉴定比中和试验快,敏感,特异性强等优点。

**关键词** PCR 地高辛标记 核酸斑点杂交

**Detection of Poliovirus by Digoxigenin-labeled cDNA Probe Prepared by PCR Technique** Liu Ming-tuan, Wang Shu-sheng, Zhu Tian-feng, et al. Guangxi Health and Anti-epidemic Center, Nanning 530021

**Abstract** A study including reverse transcribed cDNAs of Sabin I, II, III virus used as templates and digoxigenin-labeled dUTP added to the reaction solution was carried out. After amplification, digoxigenin-labeled poliovirus cDNA probe was prepared by this PCR technique. Results showed that the direct preparation of digoxigenin-labeled poliovirus cDNA probe by PCR is a convenient and rapid method with a high labeling rate. Compared with neutralization test, the probe has the advantages of more rapid, more sensitive and more specific for poliovirus typing.

**Key words** PCR Digoxigenin-labeling Dot hybridization

异羟基洋地黄毒甙(又称地高辛 Digoxigenin)标记是一种新的非放射标记物用于纯化基因探针的制备<sup>[1]</sup>。近几年来,国外报道应用 PCR 技术直接制备标记的核酸探针,方法简便,快速<sup>[2,3]</sup>。据此,我们在 4 种脱氧核苷酸底物中加入适量的异羟基洋地黄毒甙标记的脱氧尿嘧啶核苷三磷酸(Dig-11-dUTP)。应用 PCR 系统扩增标准脊髓灰质炎病毒(Sabin 株) cDNA 片段,同步制备地高辛配基标记的 Sabin-1、Sabin-2、Sabin-3 cDNA 探针,并对急性弛缓性麻痹(简称 AFP)粪便标本中细胞培养分离物进行脊髓灰质炎(简称脊灰)病毒 RNA 斑点杂交试验。同时与中

和抗体鉴定法进行了比较。现将结果报告如下。

## 材料与方 法

一、标准脊灰病毒株(Sabin 株):脊灰疫苗病毒 I、II、III 型,由卫生部北京生物制品研究所提供。

二、粪便标本来源和病毒分离:AFP 粪便标本收集于 1994~1995 年广西各地、市、县卫生防疫站送检的便样。粪使用 Hank's 稀释成 20% 悬液,4 000r/min,离心 20 分钟,取上清液用于 HEP-II 细胞(由国家脊灰实验室提供)培养分离病毒。

三、标准 Sabin 株的培养和病毒 RNA 的提取:按参考文献[4]进行。

四、PCR 引物及试剂:引物由卫生部北京生物制品研究所提供,其各型特异性引物序列如下:

Sabin-11(2769-2788)

5'-AAGCTGAGTTATCCACGGTT-3'

Sabin-12(2521-2540)

5'-AGCATGATTGACAACACAGT-3'

Sabin-21(2697-2715)

5'-TCGCGTTCGTCTCTGGATG-3'

Sabin-22(2570-2589)

5'-CCAATAGCCTGCCTGGACAC-3'

Sabin-31(3371-3390)

5'-CTCAGATAAGGGGTCCAAGT-3'

Sabin-32(3155-3174)

5'-CAGATGCCAATGACCAGATT-3'

五、地高辛标记试剂盒:非放射性 DNA 标记与检测试剂盒, Dig-11-dUTP 为 Boehringer Mannheim 公司产品,购于华美公司。

六、逆转录:2 $\mu$ l 病毒 RNA 溶液,4 $\mu$ l 15 $\times$  RT 缓冲液, RNasin 40u(华美公司), AMV 逆转录酶 8.5 $\mu$ l(华美公司), 5mmol/L dNTP 3 $\mu$ l, 引物 Sabin-11、Sabin-21、Sabin-31, 各加 30 $\mu$ l(10pmol/L), 加双蒸水至 20 $\mu$ l, 混匀后覆盖液体石蜡 50 $\mu$ l, 置 42 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟。

七、PCR 扩增 cDNA 同步地高辛配基标记:在上述逆转录反应液中加入 Sabin12、Sabin22、Sabin-32 引物各 2 $\mu$ l; 10 $\times$  PCR 缓冲液 10 $\mu$ l, 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 6 $\mu$ l, Taq 酶 2u, dNTP 底物(各 2mmol/L) 5 $\mu$ l, Dig-11-dUTP(25mmol/L) 2 $\mu$ l。然后补加无菌双蒸水 100 $\mu$ l, 混匀后开始 PCR 循环:最后一周时 72 $^{\circ}$ C 反应时间为 7 分钟。在扩增 Sabin1、2、3 型特异性 cDNA 片段同时标记上 Dig-11-dUTP 作探针, 如简称 Sabin 1、2、3-PCR-Dig 标记探针。同法扩增 Sabin 1、2、3 型病毒 cDNA, 但不加 Dig-11-dUTP 作对照。

八、斑点杂交:待检标本和对照组病毒核酸量加入甲醛使最终浓度为 6%, 置 56 $^{\circ}$ C 变性 15 分钟, 取混匀液 20 $\mu$ l 点到硝酸纤维膜(NC), 分别设 PCR 扩增的 Sabin1、2、3 型产

物 cDNA 和正常细胞上清液为阳性和阴性对照。已点样的 NC 膜, 待干, 置 80 $^{\circ}$ C 烘干 2 小时。核酸杂交法见参考文献<sup>[1]</sup>。

## 结 果

一、PCR 标记产物分析:各取 10 $\mu$ l PCR 扩增产物 Sabin1、2、3 型和 PCR 扩增标记的产物, 在 1.2% 低熔点琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu$ g/ml EB) 作水平电泳。在电泳时设 PBR322/Hae III 分子量标准对照。在透射式紫外线发生仪上观察, 对照 Sabin1、2、3 型 PCR 扩增产物荧光条带分别为 268bp、146bp 和 233bp, 而 PCR 标记产物平行出现相应位置条带。表明扩增产物与同步标记的产物大小差别不大。

二、PCR-Dig 标记探针的敏感性:将提纯的病毒 RNA 经紫外线分析仪检测 OD 值定量后, 作不同量稀释点膜, 与 PCR-Dig 探针作 cDNA-RNA 杂交, 可检出病毒 RNA 最小量为 0.1pg。

可见 PCR 地高辛配基标记探针敏感性高, 标记率高。

三、地高辛配基标记 cDNA 探针的特异性:PCR-Dig 标记的 Sabin1、2、3 型 cDNA 探针分别与 Sabin1、2、3 型病毒 RNA 和 PCR 扩增产物 cDNA 作交叉斑点杂交反应。结果表明, 地高辛标记型特异性 cDNA 探针与同源性 RNA 或 cDNA 产生斑点杂交, 而与异型病毒 RNA 或 cDNA 和正常 Hep-2 细胞上清液不显色, 无交叉反应, 显示地高辛配基标记型特异性 cDNA 探针(见表 1)。

四、PCR-Dig 标记 cDNA 探针和微量细胞中和试验(NT)鉴定分离物脊髓灰质炎病毒 RNA 的结果比较:用地高辛配基标记的 3 种型特异性 cDNA 探针, 即 PCR-Dig-Sabin1、2、3 型 cDNA 探针分别与 1994、1995 年从 AFP 粪便标本中 Hep-2 细胞培养分离物(经组合型脊髓灰质炎多克隆抗血清中和鉴定)提取 RNA 进行斑点杂交检测分型见表 2。

表 1 标记探针与 Sabin 株病毒 RNA 杂交特异性比较

PCR-Dig 标记探针	正常 Hep-2 细胞对照	感染 Hep-2 细胞病毒			PCR 扩增产物阳性对照		
		I	II	III	I	II	III
Sabin1-cDNA	—	P	—	—	P	—	—
Sabin2-cDNA	—	—	P	—	—	P	—
Sabin3-cDNA	—	—	—	P	—	—	P

P 为斑点杂交阳性, — 为斑点杂交阴性

表 2 探针检测分型和常规中和试验鉴定结果比较

年份	检测份数	中和试验定型					探针分型				
		E	I	II	III	—	E	I	II	III	
1994	23	9	5	2	6	1	7	7	2	7	
1995	31	27	2	1	1	0	26	2	1	2	

E—非脊髓灰质炎肠道病毒

### 讨 论

地高辛配基标记纯化的质粒 DNA 或 RNA 作探针, 已广泛应用病毒性疾病和细菌感染的诊断。该探针不仅特异性高, 敏感性强 (0.1pg), 而且长时间显色无背景现象, 适合于基层卫生单位推广应用价值。本研究根据国外文献<sup>[2,3]</sup>, 发展用 PCR 合成系统制备地高辛标记脊灰 Sabin1、2、3 型病毒 cDNA 探针获得满意结果。并用 cDNA-RNA 斑点杂交检测了 AFP 粪便标本细胞培养分离物脊灰病毒 RNA。中和试验鉴定 1994 年 1 株分离物为阴性, 2 株为非脊灰肠道病毒, 而探针检出 I 型脊灰病毒 2 株, 1 株 3 型脊灰病毒, 1995 年 1 株分离物为非脊灰肠道病毒, 探针检出脊灰 III 型病毒。作者分析原因, 其一, AFP 粪便培养分离物, 经传 2 代仍未产生足量病毒, 培养 7 天后出现轻微的细胞病变 (CPE), 而在中和试验又作 10 倍滴度稀释, 被鉴定病毒极少。在鉴定观察期间 (一般 7 天) 未能出现细胞病变, 判断结果阴性标本。与探针杂交的分离物中 RNA 经浓缩提取, 待检标本中病毒 RNA 量只需 0.1pg 就产生阳性斑点杂交现象而被检出。其二, 中和

鉴定法用刻度吸管做病毒量稀释不准, 病毒量大, 早出现细胞病变而产生突破现象。其三, 分离物中有脊灰病毒和其他肠道病毒混合感染, 鉴定时仅用一种 Hep-2 或 RD 细胞, 结果难于判断。该探针检测分型优于中和试验鉴定, 防止漏检等问题。尤其接近消灭脊灰末期, 实验室对 AFP 粪便标本的分离、检测更为慎重。建立地高辛配基标记 cDNA 探针将成为细胞培养分离、鉴定提供有效辅助工具。

### 参 考 文 献

- 1 刘明团, 梁富雄, 陈锦华, 等. 用地高辛配基标记的 cDNA 探针检测登革热病毒. 中国公共卫生学报, 1992, 11: 55.
- 2 Schowatar DB, Marotta WJ, Quarrel DF, et al. The generation of radiolabelled DNA and RNA probes with polymerase chain reaction. Anal Biochem, 1989, 177: 90.
- 3 Lion T, Stockey K, Thrasher G, et al. Nonradioactive labelling of probe with dioxigenin by polymerase chain reaction. Anal Biochem, 1990, 188: 335.
- 4 孔健, 刘保奎, 连文远, 等. RT-CPR 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: 399.

(收稿: 1997-01-06 修回: 1997-01-16)