

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测肠道腺病毒的实验研究

中国医学科学院医学生物学研究所 世界卫生组织肠道病毒参考和研究合作中心

陈元鼎 戴国珍* 李 军 丁雪凤 孙茂盛 王丽春 徐维明
苏 晔 牡丹萍 郭 仁

提要 本文报道运用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术同时检测肠道腺病毒(EAd)、轮状病毒(RV)和呼肠孤病毒(ReoV)及非肠道腺病毒(NEAd)的研究结果。并用PAGE检测技术与电镜技术(EM)进行了比较研究。结果表明, PAGE是检测肠道腺病毒的简便、快速、可靠的技术, 并可同时检出轮状病毒和呼肠孤病毒, 它与EM的符合率为94%, 适合于实验室和临床常规的流行病学研究。

关键词 PAGE 肠道腺病毒 轮状病毒 呼肠孤病毒

在每年上亿人的急性病毒性胃肠炎中, 除轮状病毒(RV)这一主要病因外, 肠道腺病毒便是其重要病原体, 也经常引起胃肠炎的爆发流行^[1]。由于轮状病毒研究领域有了比较完善的检测技术, 因此进展迅速。作为病毒性胃肠炎重要因子的EAd, 由于较难在常规培养细胞上生长, 阻碍了其检测技术的进步, 其流行病学意义还未被人们普遍重视, 研究现状远远落后于轮状病毒领域。呼肠孤病毒由于在胃肠炎病人中的检出率较低, 其流行病学意义尚不清楚。

EAd自被发现以来^[2], 其检测方法仍然主要依靠电镜(EM)技术, 这需要昂贵的设备和熟练的技术人员。其它诸如酶免疫技术、放射免疫技术和核酸杂交或酶工程技术是目前较先进的技术, 但这些技术需要制备高价免疫血清, 或需作放射性同位素标记, 或需特异性克隆的DNA探针以及使用生物工程酶等, 一般实验室因不具备这样的条件而不能被广泛采用。1984年Moosai等^[3]用PAGE技术对EAd进行了比较研究, 证明PAGE是检测EAd的可靠、适用的技术。本文用改进的PAGE同时检

测EAd、RV和ReoV, 结果如下。

材料和方法

一、病毒标本及其制备: 用于本实验的病毒标本有: 含RV和腺病毒(Adv)的冬季小儿腹泻便; 含ReoV的成人腹泻便细胞培养分离液; 含RV、EAd的成年树鼩便液; 组织培养标准猴RV SA11株和人腺病毒5型(Ad5)和7型(Ad7), 以及阴性对照便液。人和树鼩便样品用PBS(含10mM Ca^{++} , pH7.4)稀释为20%悬液, 组织培养标准病毒对照液不稀释, 经3000rpm离心30分钟, 取上清液留作下列各项检测。

二、ELISA检测: 上述20%悬液和组织培养上清液用检测甲组RV抗原的ELISA试剂盒(WHO RV腹泻研究中心Flewett博士提供)进行检测。操作按说明进行。

三、EM检测: 大便和组织培养上清液在室温下直接滴Formvar膜和碳膜包被的载网, 1分钟后用滤纸吸去剩余上清液。稍干后

*现在广州市卫生防疫站

用2%磷钨酸 (PTA, pH6.8) 染色1分钟, 吸去染液。待完全干燥后将载网上电镜观察结果。

四、PAGE检测:

1. 病毒核酸的制备: 选取EM检测含Adv、ReoV的样品和EM、ELISA检测RV都阳性的样品以及作对照的组织培养标准样品和阴性对照样品, 按前文^[4, 5]描述的方法提取RV ReoV的RNA和Adv的DNA。步骤简述如下: 取0.4 ml 20%悬液和组织培养上清液, 加入0.25 ml 0.1M醋酸钠 (含1% SDS) 和0.25 ml 酚-氯仿混合液 (酚混合液: 酚125g+17.5g甲苯酚+125mg 8-羟基喹啉, 加蒸馏水至50ml; 氯仿混合液: 氯仿: 异戊醇=24:1; 3份体积酚混合液与2份体积氯仿混合液混合)。混匀, 振摇2分钟, TGL-168型高速台式离心机4℃离心, 10 000rpm 5分钟, 取上清, 此即病毒核酸样品。

2. 电泳分离及染色: 方法同前文^[4~6]。浓缩胶含3%聚丙烯酰胺 (polyA), 分离胶含10% polyA。电泳在不含SDS的Laemmli不连续缓冲液中进行。电泳时电流恒定为40mA。待样品缓冲液中的溴酚蓝跑出, 凝胶底部后约1小时 (总共约3小时), 取下分离胶, 浸入10%乙醇液 (含0.5%醋酸) 中固定过夜, 或50%乙醇液中固定2小时。凝胶经硝酸银 (0.19%) 染色半小时, 氢氧化钠液 (3% NaOH+0.8% 甲醛) 显色至浅棕色凝胶背景上出现清晰的黑色核酸带时, 用5%醋酸终止显色。拍照。

结 果

用EM及ELISA法检测RV为阳性的标本, 经PAGE及银染色后可见典型的RV RNA电泳图型, 按分子量大小分为四组11条带^[4, 6] (附图柱B和H) (附图见封4)。

EM检查Adv阳性的人和树鼯大便标本及Ad5、Ad7标准病毒标本, 经PAGE后出现的电泳图型与RV RNA的完全不一样, 为一条高分子量核酸带。此带在凝胶上部, 如与RV

RNA带比较, 则位于其第一基因节段的上方 (附图柱A、C、D、J、K、L、M)。Moosai等^[3]认为这一条带即是腺病毒DNA, 它可作为诊断的依据。除此之外, 如附图柱A所示其第一条DNA带下方还出现3条分子量较小的核酸带 (带2、3、4)。这与Moosai^[3]在EAd上观察到的结果是一致的。Moosai等认为这三条带也是DNA, 它们可能是缺损Adv基因或Adv相关病毒基因, 它们经常出现于EAd标本中^[1, 3]。在适应细胞培养的人腺病毒即5型、7型腺病毒中, 只在凝胶上部见到一条带 (附图柱L、M)。

用EM检查既看到RV也看到Adv的标本, 经PAGE后, 核酸带也兼有RV-RNA及Adv-DNA两种特点, 即为两者的嵌合图型 (附图柱F、G、I)。

ReoV阳性样品经PAGE后, 其电泳图型不同于RV-RNA和Adv-DNA。病毒基因由10条带组成, 分为三组, 为3·3·4排列, 各基因节段的分子量都较RV相应基因节段的分子量大, 在判断上不会产生错误 (附图柱O)。

PAGE检测Adv、RV、ReoV结果与ELISA、EM检测的结果比较见附表)。除1例由

附表 ELISA、EM、PAGE检测腺病毒、轮状病毒和呼肠孤病毒结果

病 毒	检测方法			标本数
	ELISA	EM	PAGE	
轮状病毒	+	+	+	10
腺病毒	-	+	+	10
	-	-	+	1
轮状病毒+腺病毒	+	+	+	4
	-	+	+	2
	+	+	-	1
呼肠孤病毒	-	+	+	1
阴性标本	-	-	-	2
合 计				31

ELISA和EM证实含RV、Adv样品, 经PAGE检测为阴性和1例ELISA、EM检测Adv阴性而PAGE检测为阳性 (后经EM复查证实含

Adv)外,其它结果是一致的。另有2例经EM和PAGE检查发现是RV+Adv混合感染,而ELISA检查RV是阴性,可能系因标本中RV含量较低或是取样的缘故。此结果说明PAGE结果是非常敏感和可靠的,与ELISA和EM的符合率达94%(29/31)。

讨 论

众所周知, RV、ReoV基因为分节段的双链RNA,而Adv基因为不分节段的连续的线形双链DNA。病毒裂解后,核酸经PAGE呈现的电泳图型具有各自不同的特点。这是利用PAGE检测EAd、RV和ReoV的基础。我们利用此技术检测了31份经EM和ELISA检测含Adv, RV及ReoV标本和标准病毒对照标本,获得了比较满意的结果。腺病毒DNA电泳后在凝胶上部出现一条带, Moosai等证实这就是Adv-DNA,因为它能被DNA酶降解,溴乙锭染色阳性^[3]。这条主带可作为鉴定Adv-DNA的依据。在这条主带下面还可以见到另外三条带,它们经常出现在EAd标本中,可能也是DNA。

在同一张凝胶上, Adv-DNA, RV-RNA及ReoV-RNA的图型各有其特点: Adv的为单一核酸带, RV-RNA为11个片段,可分为4组,作4·2·2·3排列,而ReoV-RNA为10个片段,按3·3·4排列。彼此区别明显,易于判断。结果说明,本技术是直接从大便标本或细胞培养样品中检测Adv RV及ReoV的一种快速、简便、可靠、经济的方法。每次实验最好设已知的Adv、RV及ReoV对照。

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) as a Method for Detecting Enteric Adenovirus (EAd) Chen Yuan-ding, et

al., Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences

This paper presents a method which could provide a simple, rapid, economical, and reliable means of detecting or identifying adenoviruses (Adv), rotaviruses (RVs) and reoviruses (ReoVs) in stool suspensions or tissue cultures. The method is based on polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of the virus nucleic acids, but sample preparation does not need the use of radioactive label, specific DNA probe or antisera. Comparison of the results of PAGE of Adv, RV and ReoV with those of electron microscopy (EM) and/or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was made. The method is of comparable sensitivity to electron microscopy, and is not limited by amount of specimens obtained, and is thus suitable for application as a batch testing method.

Key words PAGE EAd RV ReoV

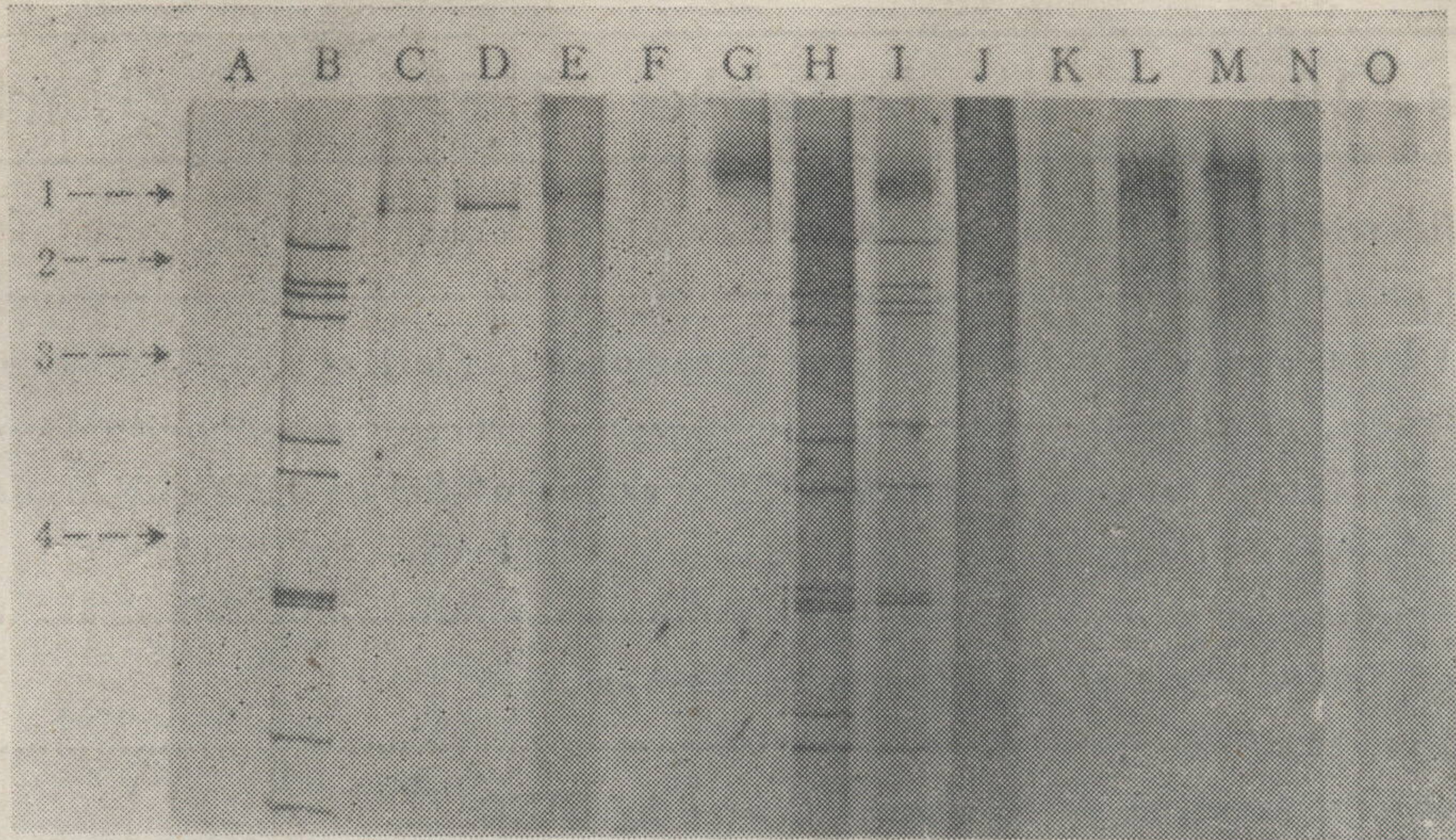
参 考 文 献

1. 陈元鼎. 肠道腺病毒研究进展. 腹泻病专辑1987; 109.
2. Flewett TH, et al. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. Lancet 1975; 1: 4.
3. Moosai RB, et al. Rapid detection of enteric adenovirus and rotavirus; a simple method using polyacrylamide gel electrophoresis. J Clin Pathol 1984; 37: 1404.
4. 戴国珍, 等. 介绍一种简单、快速直接从大便中提取婴幼儿及成人轮状病毒RNA的方法. 中华微生物学和免疫学杂志 1985; 5(1): 48.
5. 陈元鼎, 等. 树鼩大便中腺病毒的实验研究. 中国人兽共患病杂志 1987; 3(3): 2.
6. 戴国珍, 等. 1979~1981年昆明地区人轮状病毒分子流行病学研究-用PAGE分析病毒RNA基因组及其多形性. 中华微生物学和免疫学杂志 1984; 4(6): 355.

(本文中PAGE凝胶照片系我所石怀生技师拍摄, 特此致谢)

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测 肠道腺病毒的实验研究

(正文见366页)



附图 RV-RNA、ReoV-RNA、EAd-DNA和Adv-DNA电泳图比较
A、C、D、E、树鼩大便中EAd-DNA；B.树鼩大便中RV-RNA；
F、G、树鼩大便中RV-RNA和EAd-DNA；H.小儿腹泻大便中RV-RNA；
I.标准RV (SA11) RNA和树鼩EAd-DNA混合电泳；J.K.小儿腹泻大便中
EAd-DNA；L.M.标准腺病毒Ad5 (L) 和Ad7 (M) DNA；
N.树鼩大便阴性对照；O.成人腹泻大便中分离到的ReoV-RNA。

中华流行病学杂志

ZHONGHUA LIUXING BINGXUE ZAZHI
Chinese Journal of Epidemiology
(双月刊)

1981年 8月 创刊

总编辑：何观清

编辑室主任：张宝安

中华流行病学杂志编辑委员会编辑 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
出版 北京昌平流字5号，邮政编码102206 北京市邮政局总发行 全国各地邮局
订购 国外总发行：中国国际图书贸易总公司（中国国际书店 北京2820信箱）
流研所印刷厂 北京星城印刷厂印刷 国内统一刊号：CN 11-2338

CHINESE JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY is published bi-monthly
by the Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy
of Preventive Medicine, P.O.Box 5 Changping Beijing, 102206.
Subscriptions: Domestic Local Post Offices, Foreign: China Inter-
national Book Trading Corporation, P.O.Box 2820, Beijing, THE PEOP-
LE'S REPUBLIC OF CHINA

1989年 第10卷 第6期

Vol.10 No.6

1989年12月10日出版

Publication date: December 10, 1989

本刊代号：2-73 (BM724)

国内定价：全年6.30元，每期1.05元