

轮状病毒 NASBA 检测研究

寇晓霞^{1,2,3} 吴清平^{1*} 范宏英¹

(¹广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(²中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

(³中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 轮状病毒是世界范围内流行性胃肠炎暴发的重要病因。以患者粪便为样抽提轮状病毒 RNA,在轮状病毒 VP7 高保守基因区段上设计引物,运用核酸序列依赖的扩增(NASBA)法进行检测,变性琼脂糖凝胶电泳和 Northern 杂交验证。NASBA 预期的特异性产物为 392bp,并在仅以目标核酸为模板或在浓度高达 1 μ g/ μ L 的非特异性核酸存在的混合模板中,均有清晰的目标带产生,表现出了很高的特异性。其灵敏度和 RT-PCR 相同甚至更高,可检测到 50pg 的核酸,并且当反应时间为 3h 时检测灵敏度最高。NASBA 法扩增效率高、灵敏度高、快速易操作,尤其适用在基层单位推广应用。

关键词 NASBA 轮状病毒 检测 胃肠炎 RT-PCR

中图分类号:Q939.4 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)02-0328-03

近年来病毒性胃肠炎在全世界非常流行,其中在过去的 10 年中,轮状病毒、诺瓦克病毒和甲型肝炎病毒是引起十大非细菌性胃肠炎疾病的主要原因^[1,2]。通常轮状病毒的检测方法有电镜观察、细胞培养、核酸杂交、酶联免疫及聚合酶联反应,但是这些方法的灵敏度都相对很低且操作繁琐,需时较长,或者需要特殊的仪器^[3],不适合于基层检测单位的应用。依赖核酸序列的扩增法(Nucleic acid sequence based amplification, NASBA)^[4]作为一种新型研究方法,尤其适用于 RNA 的研究,已成功应用于 HCV、HIV 等病毒的研究中。本研究运用此法进行轮状病毒检测,是轮状病毒 RT-PCR 检测法之外的一个很好的选择和补充,并可用于其它胃肠炎病毒、临床病原体的检测、基因异常的筛选、肿瘤的诊断与监控、疾病易发性检测等,具有广阔的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒样本和菌株 从广州市儿童医院及南方医院新生儿科收集非细菌性腹泻病人的腹泻样本,用 pH7.4 的 PBS 稀释成 10% 的悬液,4 $^{\circ}$ C、10000r/min 离心,弃去残渣,用 0.22 μ m 的无菌滤膜过滤除菌后,经兰州生物制品所生产的轮状病毒 ELISA 试剂盒检测, -20 $^{\circ}$ C 保存。大肠杆菌 *Escherichia coli* (ATCC-25922) 在营养肉汤培养基中培养。

1.1.2 主要试剂 反转录聚合酶 AMV、RNasin 购于 Promega 公司;T7 RNA 聚合酶、dNTP、NTP 购于上海 Sangon 公司;RNase-H、RNA Marker 购于大连 TaKaRa 公司;杂交液购自深圳依诺金公司;正电荷尼龙膜、地高辛碱性磷酸酶 Anti-

Digoxigenin-AP、发光底物 CDP-Star 购于 Roche 公司,TRIzol 试剂盒购于 GBICOL 公司。

1.2 核酸制备

用 TRIzol 试剂盒抽提病毒和 *E. coli* 的总 RNA,详细操作过程见说明书。在分光光度计上测定所提取的 RNA 浓度和纯度。*E. coli* 的总 RNA 用来评价 NASBA 反应的特异性。

1.3 引物和探针

以轮状病毒 VP7 基因的高保守区段为靶序列设计各血清型通用的引物,正义引物 P1:5'-GGCTTTAAAGAGAGAA TTTCCGTCTGG-3',反义引物 P2:5'-AAATTCTAATACGA CTCACTATAGGGAGAGATC CTGTTGCCATCC-3',杂交探针 5'-GTATGGTATTG AATATACCAC-3',所对应的碱基位置分别为 1-28、376-392、51-71,其中反义引物的 5'端下划线部分为 T7 启动子序列。引物及地高辛标记探针均由北京赛百胜公司合成。

1.4 NASBA 反应^[5,6]

反应体系为 25 μ L。在 1.5mL 的 Eppendorf 管中依次加入轮状病毒 RNA 模板 2 μ L,40mmol/L Tris-HCl (pH8.5) 50mmol/L KCl,12mmol/L MgCl₂,1mmol/L dNTP,2mmol/L NTP,引物各 5 μ mol,在 68 $^{\circ}$ C 水浴中 5min,破坏病毒的二级结构,42 $^{\circ}$ C 下 5min 使引物与模板退火,迅速加入 40U T7 RNase,8U AMV,0.2U RNaseH,20U RNasin,小心混匀,置于 42 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 2h。将反应管置于 -20 $^{\circ}$ C 下终止反应。

1.5 变性琼脂糖凝胶电泳和杂交验证

配制 1.2% 的变性凝胶。取 10 μ L 稀释 10 倍后的 NASBA

基金项目:广东省重大科技攻关项目(2002B3100103)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-20-87688132 E-mail: wuqp@gdas.ac.cn

作者简介:寇晓霞(1979-),女,甘肃西峰人,博士研究生,主要从事分析微生物学研究。E-mail: kou_er@163.com

收稿日期:2005-05-23 接受日期:2005-06-10 修回日期:2005-10-24

产物和 5 μ L RNA Marker, 用 20 \times MOPS: 甲醛: 甲酰胺以 1:2:10 的比例配置上样缓冲液, 与样品以 2:1 的比例混合, 在 65 $^{\circ}$ C 水浴中 20min, 冰浴 5min, 加入溴酚蓝 5 μ L 和 0.5 μ L EB。先在 120V 下预电泳 5min 后, 加入经处理的样品和 RNA Marker, 在 75V 电压下电泳 1h, 在紫外凝胶成像系统中观察结果。然后转膜进行 Northern 杂交和斑点杂交^[5]。杂交所用探针浓度为 50nmol/L, 抗体浓度为 1:10000。

2 结果

2.1 NASBA 反应的特异性

如图 1-A 所示, 同时进行以轮状病毒 RNA 和 *E. coli* RNA 为混合模板、以轮状病毒 RNA 为单一模板和以 *E. coli* RNA 为单一模板进行 NASBA 扩增, 通过变性凝胶电泳可以看到, 混合模板和仅以轮状病毒 RNA 为模板的扩增产物在与 Marker 对应的位置出现了预期特异、大小为 392bp 的条带, 无任何杂带产生。但以 *E. coli* RNA 为单一模板进行 NASBA 扩增没有条带出现。NASBA 的特异性通过 Northern 杂交得到了进一步的证实, 前两者的扩增产物出现了很强的杂交信号, 而非目标核酸 *E. coli* RNA 为模板的扩增产物没有任何杂交信号出现 (图 1-B) 并且在总共 30 份样品的检测过程中证明, 即使在非目标核酸浓度高达 1 μ g/ μ L 的情况下, NASBA 反应的特异性也丝毫没有受到影响。

2.2 NASBA 反应的灵敏度

用紫外分光光度计测定抽提的病毒 RNA 浓度, 将病毒 RNA 做 10 倍梯度稀释, 各取 2 μ L 为模板进行 NASBA 扩增, 将 NASBA 扩增产物进行 Northern 斑点杂交, 将可检测到杂交信号的最高核酸稀释浓度作为 NASBA 检测法的最高检测灵敏度, 则可检测信号的最高稀释度为 10⁻⁷, 即可检测到的 RNA 为 50pg 左右 (图 2)。

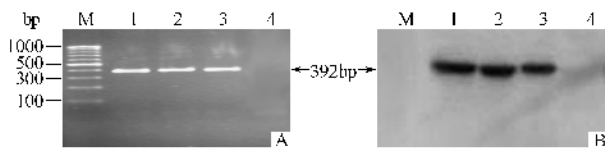


图 1 NASBA 反应的特异性 (A) 和 Northern 杂交验证 (B)

Fig.1 The speciality of NASBA reactor (A) and Northern blot (B). M. RNA marker; 1~2. RNA of rotavirus and *E. coli* as template; 3. Rotavirus RNA as template; 4. *E. coli* RNA as template.

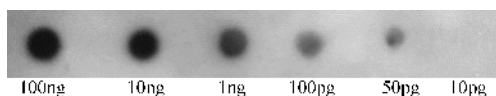


图 2 Northern 点杂交验证 NASBA 灵敏度

Fig.2 The sensitivity was testified by Northern hybridization.

2.3 NASBA 反应所需时间对产物积累的作用

NASBA 的标准反应时间是 1.5h, 用相同的模板和反应体系, 在试验中分别设立 1.5h、2h、2.5h、3h、3.5h 5 个不同的反应时间来验证 NASBA 反应产物积累的量 and 检测灵敏度是

否和反应时间有关系, 试验表明, 当反应时间更长时, 变性凝胶电泳的条带更亮, 杂交信号为 3h 时产生的检测信号更强, 但可检测的灵敏度水平没有再提高。图 2 显示的是在反应时间为 3h 时的灵敏度。

2.4 NASBA 和 RT-PCR 检测灵敏度的比较

在 NASBA 反应的同时, 以相同的引物 (反义引物不含 T7 启动子序列) 和相同稀释梯度的轮状病毒核酸为模板, 用 RT-PCR 方法对轮状病毒进行检测。NASBA 检测的最高灵敏度为 50pg, RT-PCR 检测的最高灵敏度为 100pg, 半套式 RT-PCR 的检测最高灵敏度为 10pg。

3 讨论

一直以来, RT-PCR 是检测肠道病毒最为灵敏特异的分子生物学方法, 但本研究运用 NASBA 法检测轮状病毒相比于 RT-PCR 表现出非常大的优越性, 非常适于检测和定量特异 RNA。在试验中也表明当非目标核酸 *E. coli* RNA 存在时, 并且在大量增加非目标核酸浓度的情况下, 都丝毫没有影响到 NASBA 的特异性。而在 NASBA 检测中, 除了 NASBA 的反义引物加有 T7 启动子序列之外, 本试验用的引物和 RT-PCR 的引物相同。另外, 一种检测方法的灵敏度水平是用来评价该方法的重要指标, 本试验表明, NASBA 的灵敏度略高于或和 RT-PCR 灵敏度水平相同^[10]。NASBA 能检测到的最高核酸水平为 50pg, RT-PCR 能检测到的最高核酸水平为 100pg。如果进行套式 RT-PCR, 则可进一步提高检测灵敏度, 可检测到的最高核酸水平为 10pg。但是进行半套式 RT-PCR 所需的时间远远大于 NASBA 反应所需的时间。试验中也表明当反应时间为 3h 时 NASBA 的灵敏度最高, 而半套式 RT-PCR 所需的时间为 6h 左右。因此, 从数量级水平上来说, NASBA 和 RT-PCR 的检测灵敏度基本相同。另外, RT-PCR 包括两个反应过程, 每一个 PCR 循环都要求不同的反应温度。必须在有热循环仪的条件下才能进行; NASBA 的操作简单, 在水浴条件下即可完成, 无须特殊仪器, 无须温度循环, 全部试验过程只在一个温度下进行。NASBA 法已经成功应用于李斯特菌 (*Lister monocytogenes*)^[8]、星状病毒^[9]、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒^[10] 等的检测和研究中。作为一种新型研究方法, 尤其适用于 RNA 的研究, 对于临床检测和流行病学研究来说, NASBA 法是更好的选择。可以同时处理大批量样品, 尤其对于基层缺乏配备齐全的专业分子实验室的检测部门非常适用。

参 考 文 献

- [1] Koopmans M, Bonsdorff CH, Jan V, et al. Foodborne virus. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, 26: 187-205.
- [2] 王 勇, 刘秀梅. 食源性病毒研究进展. 国外医学卫生学分册, 1999, 26: 225-229.
- [3] 吴清平, 寇晓霞, 张菊梅. 食源性病毒及其检测方法. 微生物学通报, 2004, 31: 101-105.
- [4] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 1991, 350: 91-97.

- [5] Jean J ,Blais B ,Darveau A ,*et al.* . Detection of Hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* , 2001 **67** :5593 – 5600.
- [6] 颜进 ,刘剑雄 ,彭红梅 . NASBA(核酸序列依赖的扩增)及其在医学上的应用 . 国外医学临床生物化学与检验学分册 , 1997 **18** :66 – 69.
- [7] Tai JH ,Ewert MS ,Belliot G ,*et al.* . Development of a rapid method using nucleic acid sequence-based amplification for the detection of astrovirus. *J Virol Metho* , 2003 **110** :119 – 127.
- [8] Blais BW ,Turner G ,Sooknanan R ,*et al.* . A nucleic acid sequence-based amplification system for detection of *Listeria monocytogenes hlyA* sequences. *Appl Environ Microbiol* ,1997 **63** :310 – 313.
- [9] 骆利敏 ,黄建生 ,李明 .应用 NASBA 定量检测 HCV RNA 的研究应用 . *J Tropi Medi* ,2002 **2** :64 – 66.
- [10] 寇晓霞 ,吴清平 ,张菊梅 ,等 .单管半套式 RT-PCR 法检测贝类中轮状病毒的研究 . *微生物学报* ,2004 **45** :401 – 404.

Study on Rotavirus detection by nucleic acid sequence based amplification

KOU Xiao-xia^{1,2,3} ,WU Qing-ping^{1*} ,FAN Hong-ying¹

(¹ Guangdong Institute of Microbiology ,Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application , Guangzhou 510070 ,China)

(² Wuhan Institute of Virology ,Chinese Academy of Sciences , Wuhan 430071 ,China)

(³ Graduate School of the Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 ,China)

Abstract : Rotavirus is one of the major cause of the viral gastroenteritis throughout the world. A nucleic acid sequence-based amplification(NASBA) technique for the detection of rotavirus in faecal specimens was developed and compared to the RT-PCR technique. Primers were designed according to the high conserved region of VP7 gene. Amplicons were detected by denaturing agarose gel ,and then demonstrated by Northern hybridization with digoxigenin-labeled oligonucleotide probe. The anticipative specific amplification product is 392bp ,and no nonspecific products appear even the concentration of nontarget nucleic acid as high as 1 μ g/ μ L. A detection limit of 50pg target RNA/mL is obtained when the optimal amplification time of 3h used. The NASBA assay will be a favourable alternative to RT-PCR for the investigation of rotavirus outbreaks as a routine diagnostic test in the near future because it is shown to be highly sensitive , specific and do not require specialized equipment.

Keywords : NASBA ; Rotavirus ; Detection ; Gastroenteritis ; RT-PCR

Foundation item : Guangdong Provincial Great Science and Technology Item(2002B3100103)

* Corresponding author . Tel/Fax :86-20-87688132 ; E-mail :wucqp@gdas.ac.cn

Received : 23 May 2005/Accepted : 10 June 2005/Revised 24 October 2005