

应用套入式聚合酶链反应(Nested-PCR) 检测蓝舌病病毒的研究*

马洪超 孙淑芳 陶茂辉 尹燕博 郭福生 龚振华 蔡丽娟 蒋正军
(农业部动物检疫所, 266032)

丁有胜 黄运生 陈书琨
(深圳动植物检疫局, 518010)

摘要 本实验建立了一种 Nested-PCR 方法。应用该方法检测 5 株标准株蓝舌病病毒(T4、T10、T11、T16、T20)和 5 株国内蓝舌病病毒分离株(CF4、AF6、Z1、JH1、G14), 检测结果均为阳性, 而检测相关环状病毒(EHD2、EHD6、Ibraki), 检测结果均为阴性。研究证明, 此方法可检测到 3.5fg 的 BTV-RNA, 灵敏度较高。该方法成功区分了蓝舌病病毒和相关环状病毒, 比血清学方法更加优越, 在临床检测方面具有广阔的应用前景。

关键词 蓝舌病病毒, Nested-PCR, 引物, 核酸探针

蓝舌病病毒(Bluetongue virus BTV), 属呼肠孤病毒科(Reoviridae)环状病毒属(Oribivirus), 共 24 个血清型^[1]。牛、羊及野生动物感染 BTV 后, 临床症状从亚临床到急性、发热性反应, 重者导致高死亡率, 对畜牧业危害极大^[2]。因此极早地检出病毒, 切断传染源意义巨大。目前, 国际贸易中常用的检测方法均为血清学方法, 如琼脂扩散实验(AGID)、竞争性酶联免疫吸附实验(ELISA)等^[2]。我国目前仍使用 AGID。此方法无法区分 BT 群和鹿流行性出血热(EHD)等相关环状病毒, 并且敏感性较差^[2]。应用群特异性单抗的竞争 ELISA 可解决这个问题, 但此方法依赖于病毒分离, 至少需 3~4 周的时间, 这不利于迅速控制疾病流行^[2]。

PCR 技术为 90 年代发展起来的新技术, 能在短时间内将病毒核酸扩增几百万倍^[4]。国际上许多国家已建立了应用 PCR 检测 BT 的新技术^[5-8, 9]可在接到临床样品几天之内对病毒进行定群、定型、定地域型^[10, 11]。动物感染后至少 30d 仍可测得病毒核酸, 有时可达 90d, 比分离到病毒的时间长。来自于 VP3、VP7、NS1 基因的引物可用来分群, 来自于 VP2 的引物可用于分型^[2], 我们则根据已发表的 NS1 基因序列^[6, 7], 应用微机软件设计并合成了两对引物, 进行套入式 PCR 扩增, 提高了反应的灵敏性和特异性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 引物: 根据编码 NS1 的基因 M6 片段部分序列应用序列分析软件设计, 自动合成仪合

* 此项研究为农业部“九五”重点攻关课题。
** 收稿日期 1998-08-24。

成。

引物 PA1 5' TTCTCTAGTTGGCAACCACCA 3'
PA2 5' GCAGCCAAACGGTCTCTCGA 3'
PB1 5' AGAATTTTGAGAGAGAGCAA 3'
PB2 5' TCTCGATCATACATCGCCTC 3'

1.1.2 毒种: 国际标准型蓝舌病病毒(T4、T10、T11、T16、T20) 国内分离蓝舌病病毒(CF4、AF6、Z1、H1、G14), 国际标准 EHD2、Jbraki 均由本所保存。EHD6 由云南热带亚热带动物病毒重点实验室赠送。

1.1.3 试剂: AMV 反转录酶、Taq 酶、Rnasin 等分子生物学试剂为 Promega 公司产品, 普通化学试剂为分析纯试剂, 地高辛试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 病毒增殖: 将 BT 病毒及 EHD、Jbraki 病毒接种于培养 48h 呈致密单层的 BHK21 细胞上, 待细胞脱落达 80% 以上时, 收集细胞, 用 pH7.2 的 PBS 洗若干次后, -70℃ 保存备用。

1.2.2 核酸的提取和纯化: 取收集的细胞悬液 2.5ml, 加入 1ml 硫氰酸胍裂解液(4mol/L 硫氰酸胍, 25mmol/L 柠檬酸钠 pH 7.5, 0.5% 十二烷基肌胺酸钠, 0.1mol/L 2-巯基乙醇), 0.1ml 2mol/L NaAc, 1ml 苯酚, 1ml 氯仿: 异戊醇(24:1)。充分混匀, 剧烈振荡; 冰浴 15min, 分装于 Eppendorf 管中, 10 000r/min 离心 10min, 吸取上层液相加入 2 倍体积无水乙醇, -20℃ 放置 1h, 13 000r/min 离心 10min, 吸取上层液相加入 500ul 70% 乙醇, 13 000r/min 离心 5min, 弃上清, 真空干燥, 重溶于 20ul TE(10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA) 中。

1.2.3 反转录及 PCR 扩增: 取上述提取的 RNA 2ul, 加入 2.5mM dNTP 2ul, 5×AMV 反转录酶缓冲液 4ul, pA 引物混合物 1ul, Rnasin 1ul, AMV 反转录酶 1ul, 加入灭菌双蒸水 9ul, 总共 20ul。混匀后, 42℃ 保温 1h, 产物为 cDNA。

取 cDNA 10ul 于 Eppendorf 管中, 加入 2.5mM dNTP 4ul, 10×Taq 缓冲液 5ul, pA 引物混合物 1ul, taq 酶 0.8ul(2.5u), 加入 33.2ul 灭菌双蒸水, 共 50ul 反应体积, 混匀后加入 50ul 液体石蜡。将加好液的管放入自动 PCR 仪上进行扩增, 预变性 94.5℃ 3min, 循环参数为: 变性 94.5℃ 60s, 退火 55℃ 60s, 延伸 72℃ 100s。循环数为 33, 循环结束后 72℃ 保温 4min。产物为第一次扩增产物。

取第一次扩增产物 0.5ul, 加入 2.5mM dNTP 4ul, 10×Taq 酶 缓冲液 5ul, pB 引物混合物 1ul, Taq 酶 0.8ul(2u), 加入灭菌双蒸水补足 50ul 体积。混匀后加入 50ul 液体石蜡, 按一次扩增条件进行扩增, 产物为第二次扩增产物。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物: 用 TBE 溶解琼脂糖并加入 5ul 10mg/ml 溴化乙锭制成 2% 的凝胶, 在凝胶孔中加入 10ul 的 PCR 产物和分子量标准, 100V 电压电泳 1h, 在紫外检测仪上观察结果。

1.2.5 核酸探针杂交实验: 用地高辛试剂盒标记纯化的第二次扩增产物作为探针, 将蓝舌病 7 个型的病毒 RNA, 以及 EHD2、EHD6、Jbraki RNA, 经变性后点在 NC 膜上, 经 80℃ 烘烤固定后, 按照地高辛试剂盒的使用方法进行杂交、显色。

2 结 果

2.1 应用 Nested-PCR 共检测了 5 个国际标准型和五株国内分离株蓝舌病病毒,同时也扩增了 EHD2、EHD6、Ibraki 病毒,结果如表 1。第一次扩增的产物为 270bp,第二次扩增的产物为 100bp。电泳结果如图 1。

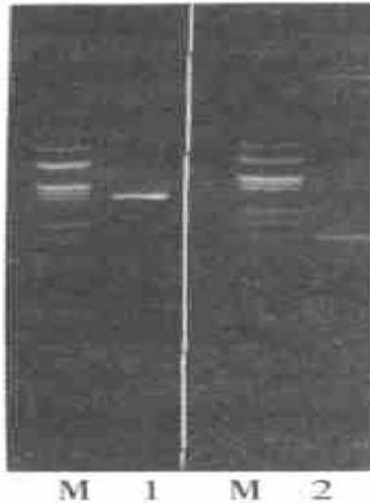


图 1 Nested-PCR 检测蓝舌病病毒 RNA 二次扩增产物的电泳图 1 一次扩增产物; 2 二次扩增产物; M, DNA 分子量标准 P^{GEM}-3Zf(+) Hae III Marker。

Fig. 1 Electrophoretogram of Nested-PCR products for detecting BTV-RNA. 1 First amplified products. 2 Second amplified products. M, DNA standard Molecular weight P^{GEM}-3Zf(+)/Hae III

表 1 Nested-PCR 二次扩增检测 BT 病毒、EHD 和 Ibraki 病毒核酸的结果 T4、T10、T11、T16、T20 为标准型蓝舌病毒株、AF6、CF4、G14、Z1、H1 为中国分离株, EHD2、EHD6、Ibraki 为国际标准毒株

Table 1 The amplified result of Nested-PCR for detecting BTV and EHDV RNA. T4 T10 T11 T16 T20 and T20 are BTV standard strains, AF6 CF4 G14 Z1 and H1 are china isolates, EHD2 EHD6 and Ibraki are standard strains

毒株 Strain	T4	T10	T11	T16	T20	AF6	CF4
结果 Result	+	+	+	+	+	+	+
毒株 Strain	G14	Z1	H1	EHD2	EHD6	Ibraki	
结果 Result	+	+	+	-	-	-	

2.2 应用分光光度计测定了病毒 RNA 的浓度,并对 RNA 进行了连续十倍稀释,取每一稀释度的 RNA 各 5ul,按照上面的方法进行反转录及二次 PCR。电泳分析的结果如表 2。

表 2 Nested-PCR 检测蓝舌病病毒核酸的检测灵敏性实验结果

Table 2 The detective rate of Nested-PCR for Blue tongue virus RNA

稀释度 Dilution	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
RNA 浓度/(ul)	7.2	0.72	0.072	7.2	0.72	0.072	7.2	0.72	0.072
RNA concentration	ng	ng	ng	pg	pg	pg	fg	fg	fg
一次 PCR First result	+	+	+	+	-	-	-	-	-
二次 PCR Second result	+	+	+	+	+	+	+*	+*	-

+ 强阳性结果, 扩增带明亮, 单一; +* 弱阳性结果, 扩增带稍弱, 单一; - 阴性结果, 无任何扩增带

2.3 将第二次扩增的产物, 经地高辛标记后作为探针和 BTV、EHDV、Ibraki 病毒的 RNA 进行打点杂交, 结果如表 3。

表 3 核酸探针杂交检测实验显色结果
Table 3 Northern blot hybridization results

毒株 Strain	T4	T10	T11	T16	T20	AF6	CF4	EHD2	EHD6	Ibraki
结果 Result	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

3 讨 论

图 1 中的 DNA 分子量标准各带的碱基数由大到小分别为 587、458、434、323、314、289、267、174、142、102、80bp。由于 458 和 434、323 和 314 相差较小, 在电泳图谱中没有分开; 所以图中的第五带实际是第七带, 第一次扩增产物位于第七带上方, 比 267bp 稍大一点, 而设计为 270bp, 第二次扩增产物位于第八带, 同样应是第十带的位置, 即为 102bp, 设计为 100bp。二次扩增的产物和实验设计是一致的, 这说明实验结果是可靠的。

由表 1 可见, Nested-PCR 方法检测 5 株标准型蓝舌病病毒以及 5 株国内蓝舌病病毒分离株均为阳性, 而相关环状病毒为阴性。证实已建立的 Nest-PCR 为群特异性检测方法, 能够成功区分蓝舌病和相关环状病毒。方法特异性强, 用于检测蓝舌病病原比 AGID 更具优越性。

由表 2 可见, 普通的一次扩增 PCR 检测蓝舌病病毒可检出 35pg 的 RNA, 而套入式二次扩增可检出 3.5fg 的病毒 RNA, Nested-PCR 将反应灵敏性提高了 10^4 倍, 这使得应用 Nested-PCR 方法检测临床样品时其检出率将大大提高。

表 3 所列的核酸探针实验以第二次扩增的产物经地高辛标记作为探针, 和蓝舌病病毒、鹿流行性出血热病毒、茨城病病毒的 RNA 进行杂交, 结果和 PCR 结果是一致的, 进一步证明了 PCR 扩增产物确为蓝舌病病毒基因片断, 和其它环状病毒没有交叉反应。

综上所述, 已建立的 PCR 方法具有高度的灵敏性和特异性。可特异灵敏地检测蓝舌病病毒。实验建立了完善的反应体系和操作方法, 为将来用于临床检测, 研究蓝舌病的流行病学, 控制疾病流行提供了技术上的保障。但由于 PCR 为高度敏感的检测方法, 在实验过程中一定要谨慎, 避免污染, 出现假阳性结果, 每次实验必需设立阴、阳性对照以确保结果的准确性。

参 考 文 献

- 1 殷 震, 等. 动物病毒学(第 2 版). 北京: 科学出版社, 1997, 549~ 554
- 2 Sambrook J. Molecular Clone ——A laboratory manual, 第 2 版. 美国 CSH, 1989, 7. 18 —7. 19 节
- 3 OIE 委员会 Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines 第 3 版. 法国 OIE, 1996, (1): 109~ 119
- 4 林万明. PCR 技术操作和应用指南. 北京: 人民军医出版社, 1993
- 5 Shad G, Wilson WC. Bluetongue virus detection: a safer reverse transcriptase polymerase chain reaction for prediction of viremia in sheep. J Vet Diagn. Invest 9: 118~ 124
- 6 Wilson W C, Chase C C L. Development of a nested-PCR test based on sequence analysis of epizootic hemorrhagic

- disease viruses non-structural protein 1(NS1). Journal of virological methods, 1993, 45: 39~ 47
- 7 Allan R, Gould L I, Pritchard. Nucleotide and deduced amino acid sequences of Nonstructural protein NS1 of Australian and south African bluetongue virus serotype 1. Virus Research, 1998, 11: 97~ 107
 - 8 Wade A M, Evans. Development of the polymerase chain reaction for the detection of blue tongue virus in tissue samples. Journal of Virological Methods, 1990, 30: 15~ 24
 - 9 Geoffery Y, Akita. Detection of blue tongue virus in clinical samples by polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest, 1993, 5: 154~ 158
 - 10 Charles A, Dangler. Identifying blue tongue virus ribonucleic acid sequences by the polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, 1990, 28: 281~ 292
 - 11 Geoffery Y, Akita. Detection of blue tongue virus serogroup by polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest, 1992, 4: 400~ 405

NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF BLUETONGUE VIRUS

Ma Hongchao¹, Sun Shufang¹, Tao Maohui², Yin Yanbo¹, Jiang Zhengjun¹,
Ding Yousheng³, Huang Yunsheng³, Chen Shukun³

(1. Agriculture Animal Quarantine Institute; 2. Hebei
Agricultural University; 3. Shenzhen Animal and Plant Quarantine Service)

Abstract

A Nested-PCR method was established, and used for the detection of five standard BTV strains (T4, T10, T11, T16, T20) and five China local BTV isolates (Cf4, Af6, Z1, H1, G14) all with positive result. We also tested the related orbiviruses (es EHD2, EHD6, Ibraki), resulting in negative reaction. The study proved that the PCR method was highly sensitive, The detective rate can reach 3.5fg BTV-RNA. It's a more advanced method compared with the AGID for it can distinguish BTV from other orbiviruses. The higher sensitivity and specificity of the PCR method is more useful for clinical diagnosis.

Key words BTV, Nested-PCR, Primer, Nucleic Acid Probe