

用新型汉坦病毒通用引物检测 HFRS 患者血清中病毒核酸

付萍^{1,2} 李晴³ 杨占秋¹ 陈文¹ 肖红¹

¹武汉大学医学院病毒学研究所/病毒学国家重点实验室 湖北 武汉 430071

²武汉市江夏区人民医院 湖北 武汉 430200

³厦门大学医学院基础医学部 福建 厦门 361005

摘要 目的:提高汉坦病毒(HV)的检出率。方法:设计了两对新的汉坦病毒(HV)通用引物,建立新的 RT-PCR 方法,对流行于湖北省不同地区的肾综合征出血热(HFRS)患者血清进行了检测。结果:在对 166 份血清中 HV RNA 的检测显示 HTN 型阳性率为 80.1%(133/166),SEO 型为 19.9%(33/166);对不同浓度的 HV RNA 检测结果显示,本法最低可检测出血清中 72 pg 病毒基因组。结论:说明本法用于检测 HFRS 患者血清中 HV RNA 的特异性和敏感性均很高,且我国中部地区 HFRS 流行以 HTN 为优势型,这一结果不仅为 HFRS 的诊断提供了新的手段,也为 HFRS 的防治提供了新的依据。

关键词 汉坦病毒; PCR; 引物设计; 肾综合征出血热

中图分类号 R373.3⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 1671-8852(2008)04-0423-04

Detection of Hantavirus Genome by New Pairs of Hantavirus Universal Primers in HFRS Patients' Serum

FU Ping^{1,2}, LI Qing³, YANG Zhanqiu¹, CHEN Wen¹, XIAO Hong¹

¹ State key Laboratory of Virology/ Institute of Medical Virology, School of Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, China

² Peoples Hospital of Jiangxia District of Wuhan, Wuhan 430200, China

³ Dept. of Basic Medicine, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract

Objective: To improve the detection rate of Hantavirus. **Methods:** Two new pairs of Hantavirus universal primers was designed to detect the Hantavirus genome RNA in hemorrhagic fever with renal syndrome(HFRS) patient's serum in Hubei Province by RT-PCR. **Results:** In the 166 serum, 80.1% (133/166) were detected to be HTN and 19.9% (33/166) were SEO in serology typing. At the same time, even a low level of Hantavirus genome RNA (72 pg) could be detected by this method. **Conclusion:** It is an excellent method to detect Hantavirus genome in HFRS patient's serum with both high specificity and sensitivity, and HTN is a dominant Hantavirus serotype in Hubei province.

Key Words Hantavirus; PCR; Primers Design; Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome

课题来源:国家“863”计划(编号:2007AA02Z465);国家自然科学基金资助项目(编号:30770096)

作者简介:付萍,女,1972-,主治医师,医学硕士生,主要从事传染性疾病和消化系统疾病的研究

通讯作者:杨占秋,男,1952-,教授,博士生导师,主要从事临床病毒学研究

肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)是由汉坦病毒(Hantaviruses, HV)引起、经啮齿类动物传播的急性自然疫源性疾病^[1]。HFRS 疫区已扩大到全国 31 个省市,同时疫区类型亦发生改变,最初为汉滩型(HTN 型)疫区,之后又出现汉城型(SEO 型),目前 HTN 和 SEO 型混合疫区大量存在,2003 年又报道有普马拉型(PUU 型)出现^[2,3]。目前,ELISA 法和检测 HFRS 患者血清中抗 HV IgM、IgG 抗体的方法已有较多的报道,但抗体检测仅是一个侧面的间接指标。用 PCR 法检测组织和细胞中 HV RNA 已有报道,并认为这一方法直观优越^[4],但检测血清中病毒 RNA 的研究较少,阳性率也不高。为了提高血清中 HV 的检出率和准确性,我们设计了两对新型通用引物,建立了一种检测血清中病毒 RNA 的新方法,并用于 HFRS 的分子流行病学研究。

1 材料与方 法

1.1 细胞和毒株 Vero E6 细胞、HTNV 76-118 株和含 SEOV R22 株 M 片段的质粒(pG34 + M)由中国预防医学科学院病毒学研究所杭长寿教授惠赠。HV 114 株由本室首次分离并保存^[5]。

1.2 血清标本和 HV 分离株 共 229 份血清均收集自 1985-2000 年武汉大学中南医院及人民医院、武汉市江夏区人民医院、咸宁市人民医院、钟祥县人民医院、武汉市新洲区人民医院和华中科技大学附属协和医院收治住院的 HFRS 患者。所有患者都经以下标准筛选: 年龄 14 岁; 发热时间 4 d;

临床确诊为 HFRS,包括发热、蛋白尿等症状; 有暴露于病原的暴露史或与感染者接触史; 所有急性期血清经 ELISA 抗体捕捉法检测抗 HV 特异

性 IgM 抗体阳性,且滴度在 1 200 以上。其中 1985-1989 年间收集的 179 份血清标本均接种至 Vero E6 细胞分离传代,间接免疫荧光检测阳性率达 80% 以上后收获做为病毒分离株保存于 - 80 。

1.3 阳性模板的制备 Vero E6 细胞按常规培养成单层后,分别接种 HTNV 76-118 和 HV 114 株病毒,吸附 2 h 后换含 2% 胎牛血清的维持液,CO₂ 培养箱内 37 培养 14 d;刮取少量细胞,进行特异性免疫荧光检测。收获感染细胞提取总 RNA 做为阳性模板。同时设置阴性对照(Vero E6 细胞)和空白对照(一抗加入空白 PBS 溶液孵育)。

1.4 RNA 提取及 RT-PCR 试剂 提取 RNA 的 SV 总 RNA 提取试剂盒为 Promega 公司产品;Sensiscript 逆转录酶为 Qiagen 公司产品;Taq DNA 聚合酶和 PCR Markers 为 Promega 公司产品;RNA 酶抑制剂(RNasin)及 dNTPs 购自华美生物工程公司。分别取 200 μl 血清标本和病毒培养液提取病毒 RNA。取 1 μl RNA 样品 100 倍稀释后,核酸蛋白分析仪(Eppendorf)检测 260 nm/280 nm 处 OD 值比,确定 RNA 样品的浓度及纯度。

1.5 引物设计 从 GenBank 中获得 HTNV 76-118、HTNV-84Fli、HTNV-CUMC、HTNV-HoJo、HTNV-HV114、HTNV-Lee、HTNV-NC167、SEO Biker-1、SEO HR80-39、SEO KF83-262、SEO KF85-1、SEO KF88-15、SEO L99、SEO R22、SEO SR-11 共 15 株汉坦病毒 M、S 片段氨基酸序列和 cDNA 序列。将所有氨基酸序列和 cDNA 序列输入 DNA Star MegAlign 软件用 Clustal W 程序排列,寻找氨基酸序列及对应 cDNA 序列均保守区域作为引物设计区(见表 1)。引物设计后交由上海生工工程有限公司合成。

表 1 汉坦病毒引物设计

Tab. 1 Design of HV Primers

引物	序列(5'-3')	位置	极性	退火温度(°C)	片段长度(bp)
SF	GA TTGAAGATA TTGA GTCACC	921-941	+	50.1-50.5	242
SR	GTTGTATCCCCA TTGA TTGTG	1142-1162	-		
MF	TGA GAAA TGTGTATGACATGA	96-116	+	49.1-49.9	248
MR	ACTAGACACTGTTTCAAATGA	323-343	-		

1.4 RT-PCR 取 1 μg RNA 模板,加入 200 U M-MLV 逆转录酶(Promega)、50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)、75 mmol/L KCl、3 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L DTT、10 mmol/L dNTP Mix 1 μl、40 U RNasin 和 0.4 μg 六聚随机引物(Promega),无 RNase 水补足体积至 20 μl,充分混匀,短暂离心收

集反应液至管底。37 反应 1 h,然后 93 5 min 终止反应,迅速置冰浴冷却,-80 保存待用。取上述反应 cDNA 产物 5 μl,加入总体积 50 μl 的反应体系中,其中含 1 U Taq DNA 聚合酶(Fermentas)、10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl₂、0.5 mmol/L dNTPs 和特异性

引物各 10 pmol。充分混匀后,放入 PCR 扩增仪 (Eppendorf) 中加热盖反应。循环反应参数为 94 预变性 3 min, 94 变性 1 min, 50 复性 1 min, 72 延伸 1 min, 循环 35 次, 最后 72 延伸 5 min。整个实验从 RNA 提取开始设置阴性对照和阳性对照。

1.5 琼脂糖凝胶电泳 取 5 μ l PCR 扩增产物在含 5 mg/L 溴化乙啶(EB)的 1.5%琼脂糖凝胶上电泳, 5 V/cm, 40 min 后紫外透射反射仪上观察结果。

1.6 序列测定与分析 取 40 μ l PCR 扩增产物同上条件电泳,在紫外透射仪上切下 HV 特异性片段, 分管装于 EP 管中,封口后送北京天根公司纯化测序。测序结果用 DNA Star 软件分析,将其与 GenBank 上已登陆的汉坦病毒序列比较。

2 结果

2.1 阳性模板的制备

2.1.1 病毒滴度 根据 Reed-Muench 法,计算 50% 的免疫荧光呈阳性反应的终点浓度。结果 HTNV 76-118 的 TCID₅₀ 值为 10^{7.75}/L, HV 114 的 TCID₅₀ 值为 10^{9.5}/L。

2.1.2 间接免疫荧光法检测细胞中汉坦病毒特异性抗原 将接种 HTNV 76-118 和 HV 114 株的 Vero E6 细胞涂片并进行间接免疫荧光染色,结果可见感染病毒的细胞胞质内散在分部针尖大小的黄绿色荧光颗粒,而正常细胞中只看到被伊文思蓝染成桔红色的细胞核,未发现特异性荧光颗粒。

2.2 汉坦病毒 RT-PCR 法的建立

2.2.1 RNA 的纯度和浓度检测 分别测量 RNA 标本在 260 nm 和 280 nm 波长下的光密度值比 OD₂₆₀/OD₂₈₀,确定 RNA 纯度;同时获得 RNA 标本的浓度值。结果显示,所有 RNA 标本 OD₂₆₀/OD₂₈₀

1.9,表明 RNA 纯度较高,无 DNA 和蛋白质污染;根据各个 RNA 样本浓度的不同,分别取 50 ng RNA 作为逆转录模板。

2.2.2 RT-PCR 方法的准确性 扩增产物测序结果与 GenBank 上的 HV 序列一致(资料未显示,结果将另文发表)。

2.2.2 RT-PCR 方法的特异性 用 HTN 型特异性引物(P0/P1)分别扩增 HTN 型和 SEO 型阳性模板,并设 Vero E6 细胞、双蒸水做阴性对照。结果显示 HTNV 76-118 株和 HV 114 株病毒核酸扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,在约 250 bp 处出现一条特异性核酸带;而阴性对照扩增产物电泳后未见特异性核酸带(见图 1)。将 HTN 型和 SEO 型引物分别用

于扩增正常人血清及本科室保留的 CVB3 和 HSV-1,均未见特异性核酸带。同时,我们所设计引物经 DNA Star PrimerSelect 软件检测其特异性,结果显示两对引物对 15 株 HV cDNA 序列进行扩增时均只产生一个目的片段产物,无非特异性扩增。

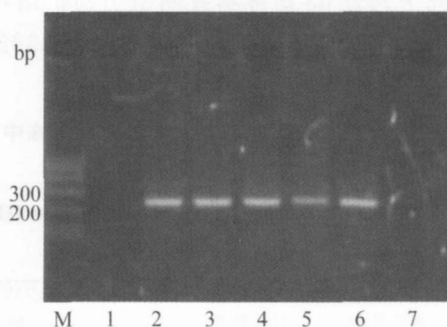


图1 HTN型引物 RT-PCR 方法的特异性

Fig.1 Specificity of HTN Primers by RT-PCR

M:分子量标准;1:未感染细胞对照;2:阳性模板对照;3: HV 76-118 病毒株;4-5: HFRS 患者血清;6: HV 114 病毒株;7: ddH₂O 对照

2.2.3 RT-PCR 的扩增效率 将 200 μ l HTNV 76-118 株病毒培养液中提取的总 RNA 在紫外分光光度计上进行定量为 0.72 μ g,经 10 倍系列稀释, RT-PCR 方法可检出的最高稀释度为 10⁻⁴,即相当于 72 ng 核酸中的病毒 RNA(见图 2)。

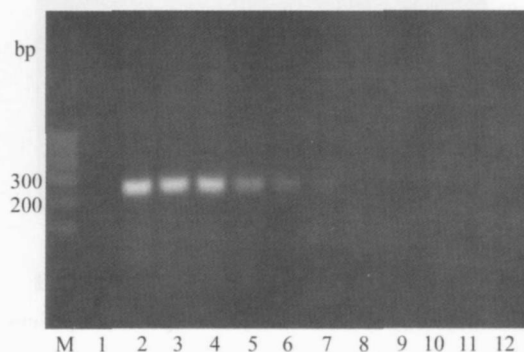


图2 RT-PCR 方法的扩增效率

Fig.2 Efficiency of HV RNA amplification by RT-PCR

M:分子量标准;1:未感染细胞对照;2: HV 76-118 病毒株;3-11:10 倍倍比稀释的 HV 76-118 病毒株;12: ddH₂O 对照

2.3 湖北地区 HFRS 患者血清或其分离毒株的基因型

2.3.1 RT-PCR 法对 HFRS 患者标本的检测 通过使用 HTNV 或 SEOV 特异性引物对每一份提取的核酸标本进行分管平行扩增以确定其型别。在 229 份 HFRS 患者血清或其分离毒株中,有 166 份可被 HTN 型或 SEO 型引物扩增出特异性 PCR 产

物,经琼脂糖凝胶电泳可见与相应阳性模板一致的扩增条带。基因分型结果显示湖北地区流行的 HV 以 HTN 型为主,166 份基因分型阳性标本中,有 133 份为 HTN 型,占总阳性产物的 80.1% (133/166),而 SEO 型仅占 19.9% (33/166)。见表 2 和图 3。本研究中共有 63 份标本经两型引物扩增均未出现阳性产物,RT-PCR 的扩增总效率为 72.5% (166/229)。

表 2 各年度 HFRS 患者血清或其分离毒株中检测 HTNV 和 SEOV 数

Tab. 2 Numbers of HTNV & SEOV detected in HFRS patients' serum or isolated strains

年度	ELISA 法检测阳性数	RT-PCR 法检测阳性数	HTNV 型阳性数 (%)	SEOV 型阳性数 (%)
1985	37	25	20 (80.0)	5 (20.0)
1986	59	44	31 (70.5)	13 (29.5)
1987	52	32	27 (84.4)	5 (15.6)
1988	16	14	12 (85.7)	2 (14.3)
1989	12	9	8 (88.9)	1 (11.1)
1996	7	6	5 (83.3)	1 (16.7)
1997	11	7	5 (71.4)	2 (28.6)
1998	12	10	10 (100.0)	0 (0.0)
1999	10	9	7 (77.8)	2 (22.2)
2000	13	10	8 (80.0)	2 (20.0)
总计	229	166	133 (80.1)	33 (19.9)

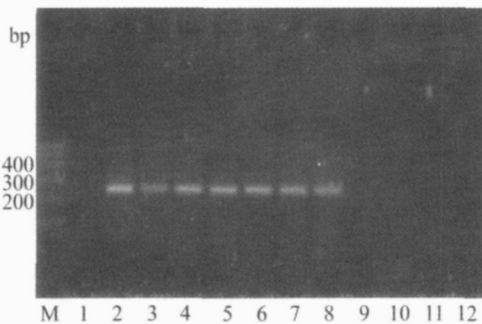


图 3 RT-PCR 法对 HFRS 患者标本 HV 的检测

Fig. 3 Detection of HV RNA in HFRS patients' specimen
M: 分子量标准; 1: 未感染细胞对照; 2: HV R22 阳性对照; 3-11: HFRS 患者血清样本; 12: ddH₂O 对照

3 讨论

湖北地区是中国肾综合征出血热的重疫区,该病的发病率和死亡率均高。现已证实,该地区为家鼠型和野鼠型混合疫区,至少有 HTN 和 SEO 两种血清型存在。近年来的研究表明 HFRS 在中国的流行特征有日趋复杂的趋势,新的血清型的出现是导致流行特征发生改变的原因之一。刘刚等首先提出在中国东北地区有 PUUV 的存在,而刘京梅等也通过血清学分型的方法指出中国很可能已有 DOBV

的流行^[3,6]。

HV 基因变异多发生在 M 片段 G1 区^[7,8]。因此,我们根据 HTNV 和 SEOV 基因组 M 片段 G1 区分别设计了两条 HTNV 和 SEOV 特异性寡核苷酸下游引物。为了增强引物的特异性,我们在引物 P1 的 5 端添加了 2 个碱基。通过对所有标本及阳性模板进行分管平行扩增试验,证明我们设计的这套分型引物的特异性是可行的,可以用于 HV 的基因分型研究;同时这套分型引物其扩增产物覆盖了 G1 区变异最大的区域(870-1 080 bp),从而能保证最大可能地筛选变异株。由于本研究中所涉及的标本年限跨度比较大,我们研究的样本保存时间又比较长,因此从标本中高效完整地提取 RNA 是进行 RT-PCR 反应成功的关键。由于 HV RNA 极易因为长时间保存而发生降解,且因 HV 感染后呈一过性病毒血症导致血液标本中的 HV RNA 含量少,因此我们采取了一些措施来提高 RNA 提取的效率。一方面,考虑到 1985-1989 年间收集血清标本保存时间太长,为保证有效地提取 RNA 进行后续试验,我们没有直接使用血清标本,而是从经过分离培养的病毒悬液中提取 RNA。关于从 HFRS 患者的血清标本中分离培养 HV 株的工作,本室在 20 世纪 80 年代已完成^[5]。另一方面,在提取 RNA 试剂的选择上,我们经比较选用了专门从液体标本中提取 RNA 的 SV Total RNA 提取试剂盒,该试剂基于离子吸附原理可有效地提取液体标本中的总 RNA,去除 DNA 和蛋白质污染;同时又因具备无需低温操作、离心时间短等优点可尽量减少 RNA 降解和破坏,得到高品质的 RNA 样品。通过检测 RNA 样品的纯度并进行 RNA 琼脂糖凝胶电泳,可看到我们提取的 RNA 样品纯度高且完整性好,为基因分析研究奠定了良好的基础。另外,我们选用了针对陈旧性标本中少量 RNA 进行逆转录的 Sensiscript 逆转录酶,该酶能将少于 50 ng 的总 RNA 高效逆转录为 cDNA,且具有 RNase H 活性,能降解 RNA-DNA 杂合子中的 RNA,为 PCR 反应提供纯品的 cDNA 模板。目前国内外报道的有关 HFRS 临床标本的扩增多限于 2-3 年间的回顾性研究。

229 份确诊为 HFRS 患者的血清标本或分离毒株中,只有 72.5% (133/229) 经 RT-PCR 法检测为 HV 阳性。根据 Xu 等关于 HV 114 株血清学特征的研究结果,HV 114 株与 HTNV 76-118 株, K27 株(PUUV)和 R22 株(SEOV)有着很密切的血清学

(下转第 531 页)

gamma knockout in pancreatic epithelial cells abolishes the inhibitory effect of rosiglitazone on caerulein-induced acute pancreatitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293(1): 319-326.

- [7] 聂盛丹, 吕品, 苗雄鹰, 等. 过氧化物酶体增殖物激活受体激动剂治疗急性胰腺炎的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 17(5): 539-542.
- [8] Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, et al. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute pancreatitis induced by cerulein[J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30(5): 951-956.
- [9] 谷俊朝, 王宇. 急性胰腺炎动物模型的研究进展[J]. *国外医学·外科学分册*, 2005, 32(6): 462-464.
- [10] Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, et al. Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, ligands of

the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut[J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 140(2): 366-376.

- [11] Sidell RJ, Cole MA, Draper NJ, et al. Thiazolidinedione treatment normalizes insulin resistance and ischemic injury in the Zucker fatty rat heart[J]. *Diabetes*, 2002, 51(4): 1110-1117.
- [12] Umrani DN, Banday AA, Hussain T, et al. Rosiglitazone treatment restores renal dopamine receptor function in obese Zucker rats[J]. *Hypertension*, 2002, 40(6): 880-885.

(2007-12-26 收稿)

编辑 张峻

(上接第426页)

关系,且这些不同血清型的HV株在ELISA反应中有发生血清学交叉反应的可能性,因此不能排除本研究中经ELISA法筛选的HFRS血清标本中有其它血清型病毒的存在^[9]。由于本研究中所用引物能对HTNV和SEOV进行有效扩增,因此如果我们的标本中有第三种血清型毒株存在,那么在63份RT-PCR反应阴性的标本中则可能出现假阴性结果。鉴于已有报道在中国东北地区首次发现PUUV,所以即使目前没有确切证据证明湖北地区也有HTN型和SEO型以外的HV血清型存在,我们仍不能排除这种可能性。从RT-PCR的结果可以看出,1985-1989年收集标本的检出率为70.5%(124/176),明显低于1996-2000年标本的检出率79.2%(42/53)。这表明保存条件、时间跨度和所研究片段的长度都可能影响标本的检测效果。尽管我们采取了一些措施希望尽量提高RNA得率,但还是有部分标本发生了RNA降解,因此可能会降低RT-PCR反应对RNA序列进行扩增的效率。此外,如果能排除RNA提取效率及RT-PCR方法敏感性对结果的影响,病毒基因组出现变异也可能是导致RT-PCR扩增失败的另一个因素。当待检病毒RNA核苷酸序列在引物对应区域,特别是引物3端发生改变,将会导致扩增失败。

参考文献

- [1] Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, et al. Hantavirus infections in Europe[J]. *Lancet Infect Dis*, 2003,

3(10):653-661.

- [2] 宋干. 肾综合征出血热流行病学研究与防治[J]. *中国公共卫生*, 2004, 20(6): 766-768.
- [3] 刘刚, 李德新. 普马拉型汉坦病毒[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2003, 17(2): 192-194.
- [4] Weidmann M, Schmidt P, Vackova M, et al. Identification of genetic evidence for Dobrava virus spillover in rodents by nested reverse transcription (RT)-PCR and Taq-man RT-PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(2): 808-812.
- [5] 杨占秋, 朱宝莲, 张美英, 等. 流行性出血热患者血浆和尿液中EHF病毒的分离与鉴定[J]. *湖北医学院学报*, 1988, 9(4): 310-306.
- [6] 刘京梅, 李泉根, 李新军, 等. 以汉坦病毒重组核衣壳蛋白为抗原进行ELISA血清分型的研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001, 13(3): 269-299.
- [7] Aviscupance T, Toney A, Anderson K, et al. Genetic and antigenic properties of Dobrava virus: a unique member of Hantavirus genus, family Bunyaviridae[J]. *J Gen Virol*, 1995, 76(11): 2801-2808.
- [8] Antic DC, Kang Y, Spik K, et al. Comparison of the deduced gene products of the L, M and S genome segments of hantavirus[J]. *Virus Res*, 1992, 24: 35-46.
- [9] Xu FL, Yang ZQ, Yang CC, et al. Serological characterization of a hantavirus from Hubei, China[J]. *Acta Virol*, 2004, 48(11): 5-8.

(2008-02-25 收稿)

编辑 孙孝云