

改良分子信标- 双重实时荧光 PCR 快速检测 SARS 病毒

扈庆华 刘小立 庄志雄 石晓路 何雅青 刘建军 王冰 刘涛 张永有¹
李庆阁¹ 赵锦 何建凡 杨洪 房师松 张丹² 周俊安²
深圳市疾病预防控制中心, 深圳 518020

摘要:目的 建立改良分子信标- 双重实时荧光 PCR 检测 SARS 病毒的方法, 用于 SARS 的早期诊断和动物溯源。方法 利用改良分子信标技术、装甲 RNA 和双片段双色荧光技术, 根据 GenBank 公布的 SARS 病毒聚合酶基因 1b 的阅读开放框架结构的保守序列, 自行设计一对引物和探针, 以部分临床标本的酶联吸附实验结果和传统细胞培养方法作为对照, 建立分子信标检测 SARS 病毒的方法。对 368 份临床标本(咽漱液、血液、粪便、尿液)、52 份细胞培养液和 50 份动物标本进行荧光 PCR 扩增。结果 分子信标检测 SARS 病毒的方法灵敏度为 10~ 100 个拷贝/ml, 与流感病毒等呼吸道病毒无交叉反应。分子信标检测 368 份临床标本, 20 份阳性。其中确诊病例阳性率为 21. 27% (10/47), 确诊病例的咽漱液阳性率为 43. 48%, 还分别从粪便和血清中检测到 SARS 病毒。52 份细胞培养液, 29 份阳性, 阳性率为 55. 77%。50 份动物标本, 23 份阳性, 阳性率为 46%。结论 改良分子信标- 双重实时荧光 PCR 检测 SARS 病毒方法灵敏度高、特异性强, 可用于 SARS 的临床早期诊断和动物溯源。

关键词: SARS 病毒 改良分子信标 双重实时荧光 PCR 早期诊断 动物溯源
中图分类号: R375 Q 331 **文献标识码:** A

Modified molecular beacon based dual real-time PCR for detection of SARS virus and its application

Hu Qing-hua, Liu Xiao-li, Zhuang Zhi-xiong, Shi Xiao-lu, et al.
Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China

Abstract: Objective To develop the modified molecular beacon based dual fluorescent PCR assays for detection of SARS virus. The assay was applied to the early clinic diagnosis & animal tracking. **Methods** On the basis of the obtained core sequence of open reading frame 1b of the coronavirus polymerase gene sequences, which was published in GenBank, using modified molecular beacon probe, artificial virus technique and two different fragments amplification with different fluorescence, one set of primers and probe were designed. Then fluorescent PCR assays for specific and sensitive detection of the SARS virus was established, while the ELISA & the traditional method were used as control. 368 clinical specimens such as the throat swab, serum, feces, and urine from different cases, 52 cell cultures and 50 animal specimens were detected by the molecular beacon based PCR. **Results** The sensitivity of real-time PCR was 10- 100 copies/ml, there was no cross reaction to other respiratory viruses such as influenza virus etc. Of 368 specimens, 20 were positive by using molecular beacon based fluorescence PCR. The positive rate of SARS case (10/47) were 21. 27%, the positive rate of the throat swab of SARS cases (10/23) were 43. 87%. Among 52 SARS cell cultures, 29 were positive. The positive rate of SARS cell cultures was 55. 77%. Of 50 animal specimens, 23 were positive. The positive rate was 46%. Furthermore, SARS virus RNA was detected in feces and in serum during the acute phase. **Conclusion** The molecular beacon based PCR is sensitive and specific, it could be applied to the early diagnosis and animal tracking. This molecular beacon based PCR kit is useful for the different units.

Key words: SARS virus, modified molecular beacon, dual real-time PCR, early diagnosis, animal tracking

SARS 又称急性呼吸窘迫综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS)。2003 年 1 月 2 日广东省首先报告非典型肺炎

炎病例至今, 全球已有 33 个国家和地区报告 SARS 病例, 累计 8098 例, 死亡 774 例。在我国, SARS 已涉及到 24 个省(市), 其中广东省有 14 个地级市发现此病例。SARS 传染性强, 尤其医务人员感染比例高, SARS 被认为是 21 世纪以来最具传染性的新发传染病。在我国 SARS 已作为第 36 种传染病, 作为甲类传染病进行管理。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30300281); 广东省卫生厅资助项目 (No. A2003709); 深圳市科技局资助项目 (No. 200404139)

作者简介: 扈庆华, 女, 硕士, 主任技师

¹ 厦门大学生命科学学院

由于 SARS 是新发传染病, 有关它的致病机理、传播途径

和传染源等都不清楚,如何控制SARS的发生和降低死亡率,早发现和早诊断是控制此病的关键。同时部分流行病学资料显示:SARS的发生与人类吃野生动物有关,因此把动物溯源研究摆在了一个很重要的位置。尽早研究出SARS与野生动物的关系,能有效地预防和控制SARS的发生。

SARS病毒具有培养时间长,分离率低等缺点,随着分子生物学技术的发展,人们采用PCR技术应用于病毒的快速诊断和大量样品的快速筛选。然而传统PCR技术易污染,造成检测失败。自1995年美国PE公司提出实时PCR检测原理后,实时PCR以其快速、定量、无需后电泳、无交叉污染等突出优点而被广泛采用。改良分子信标是我们分子信标探针基础上提出的一种新型分子探针,以它为基础建立的实时PCR技术,可以更好地实现多重实时PCR检测多种病毒。

本文采用改良分子信标-实时荧光PCR技术建立双片段双色荧光PCR技术快速检测SARS病毒的方法,用于SARS的临床早期诊断和动物溯源。现将结果报道如下。

1 材料和方法

临床标本:采集368份SARS确诊病例、疑似病例和观察病例的咽漱液、粪便、尿液、血液等标本和50份动物鼻拭子标本。52份细胞培养液、流感病毒RNA和呼吸道合胞病毒RNA由本室提供。所有标本保存于-70℃低温冰箱中。

SARS病毒的分离和培养:部分上述标本经处理后用VeroE6细胞进行培养,采用免疫荧光方法检测有细胞病变的培养液。

SARS IgM 抗体检测:采用华达基因试剂公司生产的酶联免疫反应试剂盒检测确诊病例抗SARS IgM 抗体。

模板提取:采用Qiagen试剂盒提取所有标本的病毒RNA,并保存于-70℃低温冰箱中。

引物的设计和合成

(1) 外标引物和探针:根据WHO公布的SARS病毒引物序列和GenBank公布的SARS病毒基因组序列,选择RNA聚合酶1阅读开发框架的一段保守序列,采用分析软件设计特异性强的探针。BF2: 5'-GCTCGCAACATAACACTTGG 3', IR1: 2: 5'-ACATATAGTGAGCCGCCACACATG 3', Probe: FAM-5'-CCGCACTACAGGTTAGCTAACGAGTGTCCGG 3'-Dabcyl。

(2) 内标引物和探针: RBCS rF: 5'-CGTTCGTTACTGGA-CAATGTG 3', RBCS LF: 5'-CGAATCCAATGATA-CGATGAA 3', HEX 5'-CCAGGCATTCTTCG AGCTCAAAACCTGGG 3'-Dabcyl

PCR反应:反应总体积为25 μ l。内含5 μ l模板RNA,10 \times buffer, dNTP, Taq酶,外标引物1和2,内标引物1和2,外标探针,内标探针, M-MLV, Rnasin。反应参数:42℃ 30min, 95℃ 3min反应后,95℃ 10s, 56℃ 20s, 72℃ 20s,共40个循环,采用iCycler实时PCR扩增仪(Bio Rad公司)退火阶段检测荧光。

灵敏度分析:采用装甲RNA技术制备假病毒,提取含SARS病毒基因片段的假病毒RNA,并进行一系列稀释,做灵敏度分析。同时检测23份确诊病例的咽漱液标本和20份细胞培养液,并以相对应的23份确诊病例血清标本的酶联免疫吸附试验和部分细胞培养液(含动物标本和人标本)的免疫荧光试验作对照。

特异性分析:以流感病毒、呼吸道合胞病毒及其它种属的冠状病毒RNA作对照,检测假病毒和部分咽漱液。

应用:对368份临床标本、50份动物鼻拭子标本和52份有细胞病变的细胞培养液进行荧光PCR检测。

2 结果

2.1 灵敏度

荧光PCR检测SARS病毒的灵敏度为10~100个拷贝/毫升。荧光PCR检测细胞培养液的灵敏度比传统方法高,其检测结果和对照试验见表1。

表1 SARS病毒荧光PCR灵敏度检测结果

Specimen	n	Positive number of ELISA	Positive number of IFA to cell culture	Positive number of real time PCR
Throat swab	23	/	/	10
Serum	23	16	/	/
Cell culture	20	/	2	20

(1) 23 throat swab & 23 serum specimens were collected from the same 23 SARS cases one by one

2.2 特异性

流感病毒和呼吸道合胞病毒无荧光信号产生,只有SARS病毒有荧光信号。见图1。

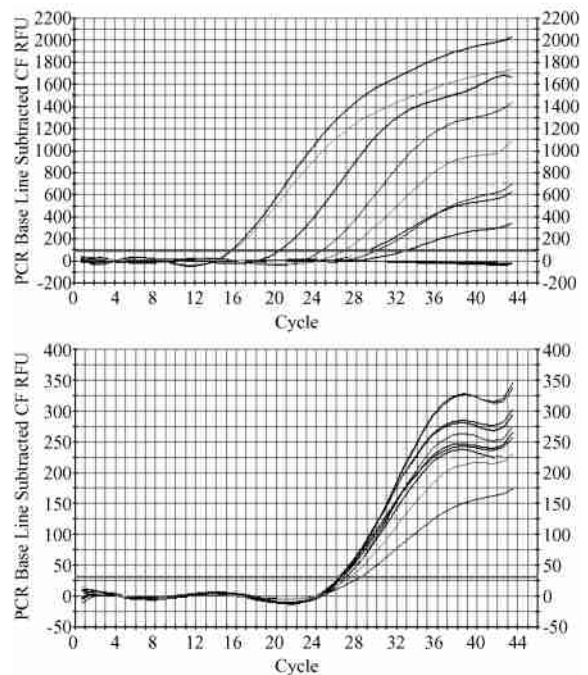


图1 SARS病毒荧光PCR特异性分析

Fig. 1 The specificity analysis of real time PCR of SARS virus

2.3 确诊病例结果

检测47例确诊病人共73份各类标本(咽漱液、血清、粪便和尿液),11份阳性。其中23份咽漱液,10份阳性,阳性率为:43.48%;33份血清,1份阳性,阳性率为:3.03%;9份粪便,全部为阴性;8份尿液,全部为阴性,见表2。

2.4 疑似和观察病例结果

检测128例疑似和观察病例共295份各类标本(咽漱液、血清、粪便),9份阳性。其中164份咽漱液,8份阳性,阳性率为4.88%;84份粪便,1份阳性,阳性率为1.19%;47份血清,全部为阴性。见表3。

表 2 确诊病例标本荧光 PCR 检测结果⁽¹⁾

Table 2 The results of clinical specimens of SARS cases by real time PCR

Specimens	n	Positive number of real time PCR	Positive rate (%)
Throat swab	23	10	43.84
Serum	33	1	3.03
Feces	9	0	0
Urine	8	0	0

(1) SARS virus RNA was detected from swab & serum of one patient by real time PCR

表 3 疑似和观察病例标本荧光 PCR 检测结果⁽¹⁾

Table 3 The results of clinical specimens of suspected & observed cases by real time PCR

Specimens	n	Positive number of real time PCR	Positive rate (%)
Throat swab	164	8	4.88
Feces	84	1	1.19
Serum	47	0	0

(1) SARS virus RNA was detected from throat swab and feces of one suspected patient by real time PCR

2.5 动物鼻拭子标本

共检测 50 份动物鼻拭子标本,其中 30 份果子狸、1 份貉、10 份蛇、6 份穿山甲和 3 份盲鼠。共 23 份荧光 PCR 阳性:包括 22 份果子狸和 1 份貉,其余标本都为阴性。

2.6 细胞培养液结果

检测 52 份细胞培养液(27 份 SARS 确诊病例细胞培养液、25 份动物标本细胞培养液),共 29 份阳性。其中 27 份确诊病例细胞培养液,有 19 份荧光 PCR 阳性;20 份动物咽拭子标本细胞培养液,有 10 份荧光 PCR 阳性。见表 4。

表 4 细胞培养液荧光 PCR 检测结果

Table 4 The results of cell cultures by real time PCR

Cell cultures	n	Positive number of IFA	Positive number of real time PCR
SARS cases	27	6	19
Civet cat	11	2	9
Racoon dog	1	1	1
Snake	1	0	0
Manis pentadactyla	6	0	0
Rat	1	0	0

3 讨论

本文在改良分子信标技术的基础上,建立了双重实时 PCR 检测 SARS 病毒的方法。研究表明:(1)此方法灵敏度高,咽漱液、血清、尿液、粪便和鼻咽拭子标本含 10~100 个拷贝的病毒即可检出。(2)特异性强,与对照组流感病毒等呼吸道病毒无交叉反应。(3)操作简单,结果观察直观明了,可一次检测 96 份标本(含阴阳性对照)。(4)检测时间仅需 2 小时。由于检测时间短,检测灵敏度比传统细胞培养方法高,而免疫学方法需在病人体内出现抗体后,才能检测出,因此本文所研究的荧光 PCR 方法适用于 SARS 临床早期诊断和动物溯源中大量动物样本的快速筛选。本文研究结果还表明:咽漱液是荧光 PCR 检测最好的标本,其次是粪便、血清、尿液。因此在

SARS 早期诊断中,首先要及时采集咽漱液标本。在双重实时 PCR 研究的基础上,最终实现多重实时 PCR 同时诊断相关的呼吸道病毒,满足常见呼吸道疾病快速诊断的要求。

改良分子信标探针是为了提高杂交效率,在原来分子信标原理基础上提出的。改良分子信标的突出特点是将分子信标的臂部分也作为靶识别序列,而不仅仅是用于形成发夹结构的无关添加序列。对于同样长度的检测靶序列,改良分子信标比分子信标更短,而且由于臂序列不再悬空,因而与靶序列的结合更趋紧密。已经证明,改良分子信标比分子信标更易设计且成功率更高,同时对扩增条件要求不严,因此对于多个靶序列的同时检测,改良分子信标的优势更加明显。本文采用改良分子信标的设计思路,进行内外标双重 PCR 的同时检测,且 SARS 病毒 PCR 检测的灵敏度没有受到任何影响,进一步说明了改良分子信标的优势。另外为了更好地监控 PCR 反应体系和分析检测结果,本文在每管的 PCR 反应体系里加入内标,内标包括与目的 DNA 序列无关的一段 DNA 片段以及相应的探针和引物,结果表明:粪便标本对荧光 PCR 扩增有抑制作用。内标体系可用于荧光 PCR 反应的内对照,便于分析结果,更适用于制备商品化的试剂盒。

SARS 是 21 世纪以来最具传染性的新发传染病,部分地区病人病死率达 10% 以上。SARS 作为一种新发现的传染病,相关病原学、流行病学等研究都不太清楚。由于 SARS 病死率高,对人类危害大,因此早发现、早诊断、早隔离、早治疗是控制此病的关键。其中快速诊断又是控制此病的关键环节。国内外有采用 TaqMan- 荧光 PCR 检测 SARS 病毒的文献报道和相关试剂盒,未见分子信标和双标体系检测 SARS 病毒的文献报道。本文在 WHO 和 GenBank 公布 SARS 病毒基因序列的基础上,建立了改良分子信标快速检测 SARS 病毒的方法,并应用于日常检验和动物样本的大量筛选,可节省时间,减少工作量,提高检出率。本文研究结果表明:在 50 份动物样本和 25 份动物标本的细胞培养液中,果子狸的 SARS 荧光 PCR 阳性率远远高于其它类动物,也间接提示了果子狸可能是 SARS 病毒感染宿主的前体。有关野生动物与 SARS 之间的关系还有待进一步研究。改良分子信标技术为动物溯源提供了一种很好的分子生物学检测手段。

目前研究表明:SARS 发病早期的临床症状与流感等呼吸道疾病症状相似,因此早期鉴别诊断有助于分级处理疫情,减少不必要的经济损失,更好更有效地控制相关呼吸道疾病的发生和蔓延。因此多重荧光 PCR 同时检测多种病毒是未来发展的趋势。

4 参考文献

- 1 Ksiazek TG, Goldsmith CS, Zaki SR, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New Eng J Med*, 2003; 348: 1953-1966
- 2 Marra MA, Jones SJM, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS associated coronavirus. *Science*, 2003; 1-5
- 3 Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in severe acute respiratory syndrome. *New Eng J Med*, 2003; 1-10
- 4 Poutanen SM, Low DE, Henry B, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *The New England J Med*, 2003; 1-11

(2004-08-23 收稿)