

· 实验研究报道 ·

呼吸道合胞病毒荧光探针的制备及应用

俞海国, 廉国利, 赵长安, 赵晓东, 杨锡强

(重庆医科大学附属儿童医院免疫研究室, 重庆 400014)

【摘要】 目的 初步建立用荧光法标记的探针检测呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)的方法。方法 采用随机引物法标记呼吸道合胞病毒 A2 株(RSVA2)G 蛋白胞外区段编码基因的 cDNA 克隆片段, 制备荧光探针, 建立 RSVA2 RNA 斑点杂交实验。结果 探针可检测到 1×10^3 RSV 感染的细胞, 并且与同为副粘病毒属的麻疹病毒(measles virus MV)之间无交叉反应。结论 该方法具有较高的敏感性与特异性, 可用于病毒基因表达以及评价抗病毒药物的研究。

【关键词】 呼吸道合胞病毒; 荧光探针; 斑点杂交

【中图分类号】 R-331 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1008-8830(2003)02-0151-02

呼吸道合胞病毒(RSV)属于副粘病毒, 可引起婴幼儿毛细支气管炎, 并可进一步发生哮喘, 严重者可引起死亡。在本实验中我们采用随机引物标记荧光探针, 用核酸斑点杂交的方法检测呼吸道合胞病毒 A2 株, 其结果如下。

1 材料与方法

1.1 材料

人气道上皮细胞株 9HTE, 购自美国 ATCC 公司。呼吸道合胞病毒 RSVA2 标准株, 由军事医学科学院提供。含呼吸道合胞病毒 A2 株 G 蛋白胞外区 RNA 第 386-918 碱基的质粒 pAGEC, 由美国亚拉巴马大学 Sullender 教授惠赠。荧光探针标记及检测试剂盒(CDP-STAR)购自美国安发玛西亚公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及体外 RSV 感染细胞模型的建立

培养液为 RPMI1640, 接种 1×10^4 9HTE 细胞于 6 孔培养板内, 待细胞长满培养板的 80% 后感染 10^{-5} 稀释度 RSV(病毒感染量为 0.01 moi), 在 37℃ 二氧化碳孵箱中孵育 72 h 待细胞出现明显病变, 搜集细胞 -72℃ 冻存。

1.2.2 标本的固定^[1] 用真空泵抽 7 点样器将不同数量的 RSV 感染的细胞或麻疹病毒(MV)感染的细胞吸附在 NC 膜上, 然后在含 1% 戊二醛固定液(3% NaCl-100mM NaH₂PO₄-40mM NaPO₄)中

固定 1 h, 用 20 μg/ml 的蛋白酶 K 在 37℃ 消化 30 min, 在空气中自然干燥置于热封口袋中, -72℃ 保存或迅速杂交。

1.2.3 质粒的转化扩增、克隆片段的酶切与纯化
受体菌为 E. coli. TOP 10, 用中量质粒提取试剂盒(OMEGA 公司产品)抽提质粒, 内切酶选用 Hind III 与 Ecor I(Promega 公司产品), 用凝胶回收试剂盒(上海华顺公司)回收酶切小分子片段, 以上实验操作均参照试剂盒说明书以及分子克隆实验指南^[2]。

荧光探针的标记、预杂交、杂交以及曝光自显影按照试剂盒说明书操作。

2 结果

2.1 待标记 DAN 片段的获得

质粒 pAGEC 经 Hind III 与 Ecor I 双酶切后可得到 532 bp 大小的 DNA 片段, 如图 1 所示, 回收纯化后测其浓度为 450 μg/ml。

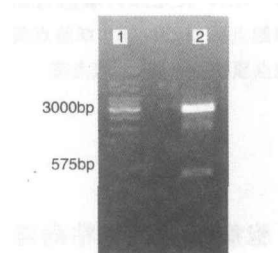


图1 质粒 pAGEC 双酶切
1: marker, 2: 酶切 DNA 片段

[收稿日期] 2002-06-05; [修回日期] 2002-09-24
[基金资助] 国家自然科学基金部分资助(NO:30070331)
[作者简介] 俞海国(1973-), 男, 博士研究生。

2.2 RSV 荧光探针特异性的检测

分别以 RSV, MV 感染负荷为 5×10^{-5} 的呼吸道上皮细胞(9HTE)以及正常未感染病毒的呼吸道上皮细胞固定于 NC 膜上,杂交过夜后只有 RSV 感染的上皮细胞检测到阳性信号,而 MV 感染的细胞及正常细胞均未检测到杂交信号,结果见图 2。

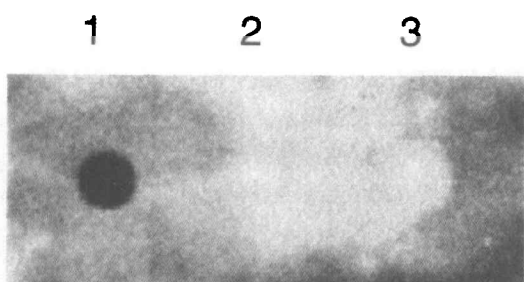


图 2 RSV 探针特异性检测结果
1: RSV 感染的细胞, 2: MV 感染的细胞, 3: 正常细胞

2.3 RSV 荧光探针敏感性的检测

将不同数量 RSV 感染的呼吸道上皮细胞固定到 NC 膜上,过夜杂交后检测阳性信号,结果发现病毒负荷为 25×10^3 以上的细胞杂交信号较强,而病毒负荷为 10×10^3 的细胞杂交信号较弱,病毒感染负荷为 1×10^3 的呼吸道上皮细胞仍可检测到微弱的阳性信号,结果见图 3。

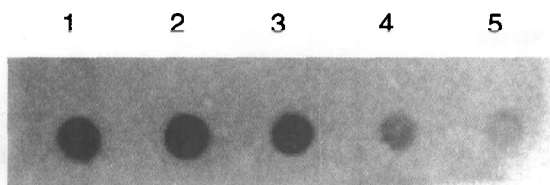


图 3 RSV 荧光探针敏感性的检测
1: 100×10^3 细胞点膜, 2: 50×10^3 细胞点膜, 3: 25×10^3 细胞点膜, 4: 10×10^3 细胞点膜, 5: 1×10^3 细胞点膜

3 讨论

呼吸道合胞病毒属于副粘病毒属的一种负链 RNA(-ssRNA)病毒,是婴幼儿感染的主要病原菌,

常引起毛细支气管炎及肺炎的流行,憋喘症状严重的患儿甚至导致死亡,因此对病原学的诊断就显得非常重要。目前诊断 RSV 感染主要采用病毒分离、培养和免疫学方法,但是病毒分离培养时间周期较长,抗原、抗体反应的免疫学检查又不能替代病原学检测,随着分子生物学技术的发展,国外学者^[3-5]采取了 P 蛋白电泳、单管巢式 RT-PCR 等方法检测呼吸道合胞病毒,这些检测方法与普通病毒培养及血清学检查相比敏感性有所提高,但由于成本较高且有假阳性反应又限制了其在临床上的应用。我们采用了荧光探针斑点杂交的方法,在实验中应用戊二醛固定 RSV 感染的上皮细胞,然后进行核酸杂交,实验结果表明这种方法不仅具有较高的特异性和敏感性,而且具有以下几个优点:将 RSV 感染的细胞点膜杂交,操作简单,又可避免直接抽提病毒 RNA 点膜时 RNAase 对 RNA 的降解,与传统放射性物质(P32)标记的探针相比没有放射性危害,克服了 P32 运输、储藏及实验操作时的不便。荧光探针稳定性高可保存半年以上,有利于实验室检查。荧光素分子量小,在标记时容易掺入。随机引物法标记探针比缺口平移法标记效率高。该方法的建立有助于研究呼吸道合胞病毒基因表达以及抗病毒药物疗效的评价。

【参考文献】

- [1] Sullender W, Anderson LJ, Anderson J, et al. Differentiation of respiratory syncytial virus subgroups with cDNA probes in a nucleic acid hybridization assay [J]. J Clin Microbiology, 1990, 28(8): 1683-1687.
- [2] 金冬雁,黎孟枫. 分子克隆实验指南 [M]. 北京:科学出版社, 1996, 495-525.
- [3] Walpita P, Mufson MA, Stanek RJ, et al. Distinguishing between respiratory syncytial virus subgroups by protein profile analysis [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(4): 1030-1035.
- [4] Falsey AR, Formica MA, Walsh EE. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(3): 817-820.
- [5] van Elden LJ, van Kraaij MG, Nijhuis M, et al. Polymerase chain reaction is more sensitive than viral culture and antigen testing for the detection of respiratory viruses in adults with hematological cancer and pneumonia [J]. Clin Infect Dis, 2002, 35(2): 177-183.

(本文编辑:吉耕中)