

采用 RT-PCR 技术进行 SARS 冠状病毒基因检测

闫梅, 刘敬忠, 肖白, 吕月平, 丁洁, 谭淑珍, 王臻, 梁燕, 李兴旺, 徐作军, 于常海, 王辰
(首都医科大学附属北京朝阳医院基础医学研究中心, 北京 100020)

摘要: 目的 建立 RT-PCR 检测 SARS 冠状病毒基因的方法, 用于早期诊断。方法 对临床确诊的 20 例 SARS 患者的血、鼻拭子、咽拭子、尿、便等 69 份标本进行总 RNA 提取, 反转录成 cDNA 后再以本研究室自行设计合成的一对特异引物进行 PCR 扩增, 2% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 出现 140bp 带者为 SARS 病毒阳性。采用测序仪对 140bp 带进行特异性检测, 并进行灵敏度试验。结果 140bp 扩增序列与公布的 SARS 病毒的基因序列完全一致, 灵敏度可达 10 个拷贝。SARS 患者 11 份尿标本中 6 份检出 140bp 阳性扩增带, 8 份便标本中检出 3 份阳性, 从 15 份鼻拭子和 15 份咽拭子中分别检出 6 份和 5 份阳性标本, 血清 15 份、白细胞 5 份分别检出 2 份阳性。20 例 SARS 患者中送检 1 至 4 种标本检测到 SARS 病毒阳性者共 15 例 (75%)。结论 本研究建立的 RT-PCR 方法灵敏、特异, 可用于早期诊断。尿、便标本中的 SARS 病毒检出率较高且取材简便、病人无痛, 是取材的极好选择。每例待测患者最好同时取其尿、便、拭子、血等多种标本, 可以提高 SARS 病毒检出率。

关键词: SARS 冠状病毒; 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)

中图分类号: Q939.4

文献标识码: A

文章编号: 1562-9031 (2004) 11-0001-03

Detecting SARS-coronavirus RNA by RT-PCR technique

YAN Mei, LIU Jing-zhong, XIAO Bai, et al (The Capital University of Medical Science Affiliated Beijing Chaoyang Hospital, Beijing 100020, China)

Abstract: **Objective** To found a technique detecting SARS-coronavirus (SARS-CoV) RNA to the early diagnosis of the SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome). **Methods** Collecting 69 samples from 20 cases of SARS patients. Isolating total RNA from the samples and reverse transcript the RNA to the 1st chain of the cDNA. A 140bp fragment of SARS genome was amplified by PCR using a pair of primers, which were designed by ourselves. The PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis followed by EB staining. The 140bp band were analyzed by ABI 373 DNA Sequencer and made sensitive test. **Results** The 140bp fragment of SARS genome is consistent with SARS genome sequence of proclamation. The technique's sensitivity attained 10 copies. The 140bp band was found in 6 urine samples among 11 samples, in 3 stool samples among 8 samples, in 6 nasal swabs among 15 samples, in 5 among 15 throat swabs samples, in 2 among 15 serum samples and in 2 among 5 WBC samples. Among the 20 cases of SARS patients, each of 15 cases has one to four samples detected as SARS-CoV. **Conclusion** The founded technique were a good specificity and good sensitivity. It can be used to detect the SARS-CoV RNA in samples to early determine whether the patients were infected by the SARS-CoV or not. Urine and stool are good source for the detection of the SARS-CoV with a potential high positive rate. It is beneficial for higher detection positive rate to collect more categorized samples from every patient.

Key words: SARS-coronavirus (SARS-CoV); RT-PCR.

严重急性呼吸综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS) 是新出现的快速传染性疾病。去年 4 月中旬, 世界卫生组织宣布, SARS 病原体为一种人类从未发现过的、属冠状病毒科的新型冠状病毒^[1-4]。目前研究的检测方法包括血清检测方法和基因检测。血清学检测方法检测抗体, 患者病程较长, 不能作为早期诊断指标。基因检测是通过逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 特异性检测 SARS 病毒 RNA, 因此从理论上讲可作为早期诊断的指标^[5]。本研究建立在 RT-PCR 和凝胶电泳技术基础上, 自行合成了引物并优化了反应条件。用该方法检测了 69 份 SARS 患者标本, 现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象 按卫生部发布的诊断标准确诊的 20 例 SARS 患者, 10 例在北京朝阳医院确诊, 4 例在协和医院, 6 例在地坛医院确诊。20 例 SARS 患者的血、咽拭子、鼻拭子、尿、粪共 69 份标本: 其中 11 份尿标本, 8 份粪便标本, 鼻拭子、咽拭子各 15 份, 5 份白细胞, 15 份血清标本。

1.2 RT-PCR: 总 RNA 提取采用 Qiagen 公司生产的试剂盒, 按其说明书进行。-80℃ 保存。

反转录 (RT) 采用 Promega 公司生产的 Reverse Transcription System 试剂盒, 按其说明书进行。

收稿日期: 2004-04-09; 修回日期: 2004-05-30

PCR 反应:

引物序列 SARS 5' gAA gCT ATT CgT
CAC gTT Cg 3'

SARS2 5' TAA CCA gTC ggT
ACA gCT AC 3'

特异扩增产物长 140bp。

25 μl 扩增体系含 1×buffer, MgCl₂, dNTP (2.5mM), 引物各 0.1 μg, Ex Tap DNA 聚合酶 1U, RT 产物 1 μl。

循环条件: 94℃2 分钟, (93℃15 秒, 55℃15 秒, 72℃20 秒) 10 个循环, 再 (93℃15 秒, 58℃30 秒) 25 个循环; 最后 58℃30 分钟, 4℃保存。

1.3 2%琼脂糖凝胶电泳检测, 出现 140bp 扩增带者, 为 SARS 病毒阳性; 无 140bp 带者为阴性。

1.4 序列分析: 采用安发玛西亚分公司的测序试剂盒, 用 SARS1 及 ASRS2 引物分别从 140bp 片段两端测序, 在 ABI-373 型测序仪上测定 140bp 产物的序列, 并

与公布的 SARS 病毒序列比对。

2 结果

2.1 RT-PCR 方法的建立: 采用本研究室自行设计合成的引物及热循环条件扩增出 140bp 特异性扩增带。本方法检测灵敏度可达 10 个拷贝, 特异性好, 无非特异性扩增带 (见图 1)

2.2 测序结果: SARS 患者标本 RT-PCR 产物 140bp 片断测序结果与 WHO 公布的 SARS 病毒相应片段序列完全一致 (见图 2)。

2.3 20 例 SARS 患者 69 份标本检测结果见表 1。11 份尿标本中 6 份阳性 (54.6%), 8 份便标本中 3 份阳性 (37.5%), 鼻拭子、咽拭子各 15 份中分别检出 6 份 (40%) 和 5 份阳性 (33.3%), 5 份白细胞中检出了 2 份阳性 (40%), 而 15 份血清中仅检出 2 份阳性 (13.3%)。20 例 SARS 患者中送检 1 至 4 种标本检测到 SARS 病毒阳性者共 15 例 (75%)。

表 1 用 RT-PCR 检测 20 例 SARS 患者 69 份标本的检测结果

NO.	标本类型及检出结果						发病日期	取材日期
	血清	WBC	咽拭子	鼻拭子	大便	尿液		
1	-	++					03/4/2	03/4/20
2	-	-					03/4/8	03/4/20
3	-						03/4/10	03/4/20
4	-	+++					03/4/10	03/4/20
5	-	-					03/4/15	03/4/20
6	-		-	++			03/4/15	03/4/22
7	-		-	-	++	++	03/4/2	03/4/24
8	-		-	-	++	+++	03/4/5	03/4/24
9	-		+	++	+	++	03/4/8	03/4/24
10	-		-	-	-	-	03/4/9	03/4/24
11	+++		-	-	-	-	03/4/9	03/4/24
12	-		-	-	-	-	03/4/14	03/4/24
13	-		-	+			03/4/15	03/4/24
14	-		++	-		+++	03/4/18	03/4/24
15	-		+	-			03/4/18	03/4/24
16	-		+	++		+++	03/4/18	03/4/24
17	-		+	++	-	-	03/4/18	03/4/24
18	+		-	-	-	-	03/4/22	03/4/24
19	-		-	-		+++	03/4/22	03/4/24
20	-		-	++			03/4/13	03/4/24
检出阳性例数/总例数	2/15	2/5	5/15	6/15	3/8	6/11	总: 15 人*/20 人	
各类标本检出率	13.3%	40%	33.3%	40%	37.5%	54.6%	总: 75%	

说明: +++, ++, + 为目测电泳图谱中 140bp 带相对强弱的符号; - 为该标本在 140bp 无带出现; 空白为没取到该患者该类标本。*至少有一种标本检测结果为阳性的病例总数为 15 例。

3 讨论

SARS 具有起病急、传播快、人群普遍易感和

病死率高等特点,这使得早期、快速诊断显得尤为重要。本研究建立了 RT-PCR 方法,自行设计引物并优化了 RT-PCR 实验条件。其灵敏度可达 10 个拷贝,其测序结果表明此 140bp 片段的序列与网上公布的 SARS 病毒的基因序列完全一致^[6]。因此该 140bp 带的出现代表了被检测标本中存在 SARS 病毒。采用该技术对 20 例 SARS 患者的 69 份不同样本进行检测,可看出血清检出率最低(13.3%);鼻拭子(40%)、咽拭子(33.3%)检出率较高,但标本取材过程危险性较大;尿(54.6%)、便(37.5%)检出率较高且取材方便、无痛,是较好的取材选择。其中 15 例 SARS 患者送检 1 至 4 种标本被检出 SARS 病毒阳性,占到 75%(15/20)。在 5 例没有检出阳性的患者中有 3 例是只取了一种标本,即血。假如这 3 例取到更多种标本进行检测,则很有希望检出阳性。提示在今后实际应用中,每位待检患者最好同时取尿、便、拭子(或漱口水)、血等多种标本送检,以便提高 SARS 病毒检出率,为临床医生确诊和鉴别诊断提供依据。本研究样本取材日期在病人发病之后 1 至 6 天、及 10 天之内均有检出阳性者,与免疫学检测方法一般要在确诊 10 天以上才能检出阳性相比,显然早得多。本次研究检测标本量不大,应扩大标本量进一步深入细致的研究,但从本研究的灵敏度、特异性来看,具有早期辅助诊断价值。

(编辑 嘉应)

● 临床医学 ●

癫痫发作致烫伤 4 例

曾庆湖, 林桂松

(解放军第 188 医院烧伤科, 广东 潮州 521000)

2002 年 1 月-2003 年 10 月,我科收治因癫痫发作致烫伤 4 例,现报告如下。

1 临床资料

本组 4 例院前发作症状相似,为突发意识丧失、跌倒在地、全身抽搐、口吐白沫、持续时间约 1-3min、清醒后对整个发作过程无记忆,发作时均有家属在场。男 1 例,18 岁,因跌地撞倒热水瓶,被热水烫伤,面积 8%TBSA,为 II 度伤,右面部软组织挫伤,既往有类似发作史,有家族史,从未治疗,近几个月来发作较频繁,2-5 次/月,入院查脑电图有棘-复合波。女 3 例,年龄 28-46 岁,做饭时因跌倒,被热稀饭或热汤烫伤,烫伤面积 5%-20%TBSA,均为 II 度伤,既往均有类似发作史,2 例在外院已明确癫痫诊断,有不规范治疗,另外 1 例从未治疗,除烫伤外,其它查体无异常,查脑电图均正常。诊断:①烫伤,②癫痫大发作。处理:创面换药,抗生素抗炎,对症治疗,口服卡马西平治疗癫痫。治疗 2 周

参考文献:

- [1] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 16, [epub ahead of print].
- [2] Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003, 10, [epub ahead of print].
- [3] World Health Organization. Summary on major findings in relation to coronavirus by members of the WHO multi-centre collaborative network on SARS aetiology and diagnosis. Geneva: WHO, 2003, 4.
- [4] Peiris JSM. Coronavirus as possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, 11:361.
- [5] Liu Jingzhong. Direct Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction from whole Blood without RNA Extraction. *GATA*, 1992, 9(5-6):149.
- [6] Marra M. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Sciencepress/WWW. sciencepress.org*/1 May 2003.

左右,4 例创面愈合出院,住院期间无再发作。

2 讨论

癫痫大发作以突发意识丧失,全身抽搐为特征^[1],患者常因此跌倒在地致自身遭受伤害,甚至可招致生命危险。本组 4 例在突发意识丧失、跌倒在地招致烫伤,根据病史、脑电图及创面体征,诊断:烫伤,癫痫大发作。治疗癫痫病人的目标是防止发作时威胁生命,自伤和伤人,消除病因,预防再发作及教育病人家属对癫痫的正确认识和对特^[2]。4 例住院期间,治疗创面同时口服卡马西平治疗癫痫,出院时建议到相应专科进一步诊断及规范治疗,预防再发作,日常生活尽量少接触易引起烧烫伤的工作。值得一提的是,睡眠不足、疲劳、便秘、情感变化、代谢紊乱在烧伤病人中是常见的,可诱发癫痫发作^[1],故对有癫痫发作史的病人住院期间,医务人员必须加强巡视,发现癫痫发作,及时处理,避免再受伤,加重病情。

参考文献:

- [1] 侯熙德. 神经病学[M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 1996, 173-177.
- [2] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 第 10 版. 北京:人民卫生出版社, 1997, 2202.

(编辑 钟青)