

● 论 著 ●

RT-PCR 结合 GeneScan 检测 SARS 病毒的高灵敏度技术的建立及应用[△]

梁燕, 闫梅, 刘敬忠, 肖白, 谭淑珍, 吕月平, 丁洁, 苏畅, 王臻, 徐莉莉, 李兴旺,
徐作军, 于常海, 王辰

(国家 SARS 防治紧急科技行动北京组: 首都医科大学附属北京朝阳医院, 北京 100020)

摘要:目的 建立高度敏感的检测 SARS 病毒(SARS-CoV)RNA 的技术,提高 SARS 病毒检出率。方法 用 RT-PCR 技术扩增 SARS-CoV 138bp 片段并荧光标记后,用 ABI-310 毛细管电泳仪和 GeneScan 软件对扩增产物进行分析,并以峰高的方式给出产物的相对产量,参考空白对照和阴性对照的峰高定出本批实验检测基线。高于基线者为 SARS 病毒阳性。结果 检测了来自 20 例 SARS 患者的 67 份标本,与常规的琼脂糖凝胶电泳法的结果(23/67)相比, GeneScan 法(38/67)检测 SARS-CoV 的灵敏度提高 22.4%。全部 20 例患者的 1-5 种标本中都有 1 种、2 种甚至 3 种、4 种检出为阳性。病程 1-22 天的患者均能检出阳性。结论 ABI-310 仪检测 SARS-CoV 的灵敏度较高,有助于早期诊断。

关键词: 严重急性呼吸综合征; SARS 病毒; ABI-310 毛细管电泳; GeneScan 反转录-PCR

中图分类号: R442.8

文献标识码: A

文章编号: 1562-9031(2004)07-0001-03

Establish a sensitive technique detecting SARS Virus RNA by RT-PCR and GeneScan and it's application
National Research Project for SARS, Beijing Group

LIANG Yan, YAN Mei, LIU Jing-zhong, et al. (The Capital University of Medical Science Affiliate Beijing Chaoyang Hospital, Beijing 100020, China)

Abstract: Objective To establish a sensitive technique detecting SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) virus RNA. **Methods** Collecting 67 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 138bp fragment marked with 6-FAM was amplified by PCR. The PCR products were analyzed by GeneScan software with ABI-310 Genetic Analyzer. Ones which lip was taller than the baseline were SARS-CoV positive. **Results** PCR conditions were optimized to obtain a good specificity and good sensitivity, and used to detect the all samples. 38/67 were detected by GeneScan, which was 22.4% higher than agarose gel electrophoresis (23/67). 20 cases of SARS patients were all SARS-CoV positive detected by GeneScan which only 15 cases by agarose gel electrophoresis. **Conclusion** GeneScan method was more sensitive than agarose gel electrophoresis.

Key words: SARS; SARS virus; ABI-310; GeneScan; RT-PCR

严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)是一个新出现的由一种新型冠状病毒引起的传染性疾病^[1]。SARS 有发病急,传播快,人群普遍易感和病死率较高,症状复杂、诊断困难等特点。因此 SARS 的实验室诊断作用显得更加突出。目前报道的实验室诊断主要有免疫荧光抗体检测法,酶联免疫吸附法(ELISA),以及 RT-PCR 为基础的基因诊断法^[2]。前二者在病程 10 天以上的患者中检出率可达 90%以上,其缺点是不能作为早期诊断指标。本研究是在我们建立了以 RT-PCR 和以凝胶电泳技术检测 SARS-CoV 的基础上,进一步又建立了 RT-PCR 结合 ABI310 基因分析仪之 GeneScan 技术进行 SARS 早期诊断的方法^[2]。并应用该方法对 67 份 SARS 患者的标本进行检测。

1 对象与方法

1.1 对象 2003 年 3 月-5 月朝阳医院、协和医院、地坛医院等收治的 20 例 SARS 患者的 67 份标本,包

括血清、白细胞、咽拭子、鼻拭子、便、尿等,以及非 SARS 对照。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 用 Qiagen 公司生产的试剂盒,按其说明书进行。-80℃ 保存。

1.2.2 引物 引物参考了 WHO 公开的引物序列,又加上自己的经验,进行改良和搭配。引物序列如下: SARS1: 5' gAA gCT ATT CgT CAC gTT Cg 3' ; SARS2: 5' TAA CCA gTC ggT ACA gCT AC 3' ; 其中引物 SARS1 的 5' 端标记 6-FAM。特异扩增产物长 138bp。

1.2.3 反转录(RT) 每管 RNA 5 μl,加入 15 μl RT-PCR 混合液混合(Promega Co.),台上离心机瞬

收稿日期: 2004-01-07; 修回日期: 2004-02-26

△本研究受国家 SARS 防治紧急科技行动基金及国家 SARS 科技攻关项目(编号: 2003AA208102 资助)。

时离心,按下列程序保温:18℃,10min;42℃,30min;99℃,5min,4℃,5min。

1.2.4 PCR 反应 PCR 反应混合物总体积 25 μl, 含: 1×buffer, MgCl₂ (1.5mM), dNTP (2.5mM), 引物各 0.1 μg, Ex Taq DNA 聚合酶 1U, RT 产物混合物

1 μl。用 PE2400 PCR 仪进行下列热循环: 94℃, 2min 预变性; 先三温循环 (93℃, 15s, 55℃, 15s, 72℃, 20s) 进行 10 个循环; 再进行两温循环 (93℃, 15s, 58℃, 30s) 进行 16 个循环; 最后 58℃, 20min, 产物用 ABI-310 检测或 4℃ 保存。

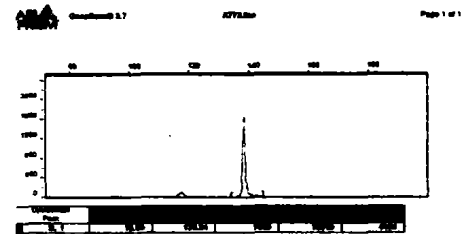
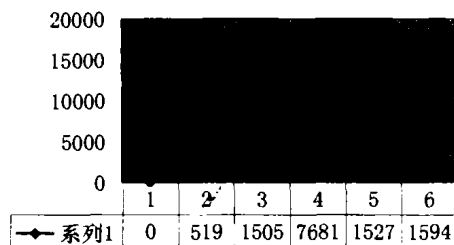
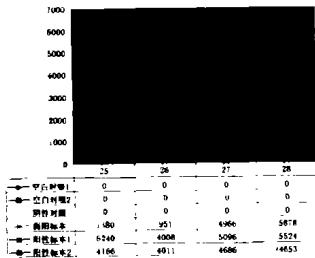


图 1 不同循环条件时不同标本检测结果比较

图 2 26 个循环时不同浓度的阳性标本扩增结果比较

1 至 6 对应的数值分别表示阳模拷贝数从 0 至 10⁶ 时检测出的峰高

附表 20 例 SARS 患者 67 份标本用琼脂糖凝胶电泳与 ABI-310 检测 SARS-CoV 的结果

No.	标本号	标本类型及检出结果						电泳 检出	ABI-310 检出	病程 (天)
		血清	白细胞	咽拭子	鼻拭子	大便	尿液			
1	CY-1	-2421	-0					"-"	"+"	10
2	CY-2		+++369900					"+"	"+"	10
3	CY-5	-78	-0					"-"	"+"	5
4	CY-6	-0	-5160					"-"	"+"	12
5	CY-8	-0	-5151					"-"	"+"	18
6	CY-21	+65650		-1900	-0	-936	-0	"+"	"+"	2
7	CY-22	-0		-0	-2473			"-"	"+"	7
8	CY-23	-0		-0	-0		+++202130	"+"	"+"	2
9	CY-24	-0		-0	+68030			"+"	"+"	1
10	CY-25			-0	+66760			"+"	"+"	9
11	XH-1			+67840	-5032		+++204880	"+"	"+"	6
12	XH-2			+68460	-5072			"+"	"+"	6
13	XH-3			+69580	++210760		+++139440	"+"	"+"	6
14	XH-4			+69050	++134840		-0	"+"	"+"	6
15	DT-02 ¹	+++200740		-195	-0	-1137	-0	"+"	"+"	15
16	DT-03 ¹	+65950		-0	-4256	-0	-0	"+"	"+"	10
17	DT-03 ³	-0		-0	-4910	++407560	+++330650	"+"	"+"	19
18	DT-06 ²	-0		+4809	++204040	+66460	++202180	"+"	"+"	16
19	DT-06 ³	-0		-0	+11288	-0	-2011	"+"	"+"	15
20	DT-07 ²	-0		-0	-4867	++132680	-0	"+"	"+"	22
电泳检出阳性例数		3/14 (21%)	1/5 (20%)	5/15 (33%)	6/15 (40%)	3/7 (43%)	5/11 (45%)	总: 23/67 (34%)		
GeneScan 检出阳性例数		5/14 (36%)	3/5 (60%)	7/15 (47%)	12/15 (80%)	5/7 (71%)	6/11 (55%)	总: 38/67 (57%)		

表中+++, ++, +表示电泳图谱中 138bp 阳性带相对强弱; -表示该标本无 138bp 带出现; 数值为 ABI-310 测出 138bp 带的峰高; "-" 和 "+" 表示检测结果为阴性或阳性; 空白表示未取到患者该类标本。

1.2.5 毛细管电泳及 GeneScan 分析 取 10 μl 甲酰胺变性液, 0.3 μl 内标 (ABI 产品), 1 μl 上述 PCR 产物, 混匀, 离心, 置 95℃ 变性 5min 后, 立即置于冰水浴中 3min 以上, 剪掉管盖, 换上

ABI-310 专用管盖, 上 ABI-310 进行自动毛细管电泳, 用 Data Collection 软件收集数据, 收集时, 参数设定为温度 60℃, 时间 20min。收集的数据用 GeneScan 软件分析, 根据空白对照和阴性对照确定

基线, 记录 138bp 的峰离。

2 结果

2.1 最佳 PCR 循环数的确定 从图 1 中看出从 25 个循环到 28 个循环, 空白对照和阴性对照的峰高均为 0, 而阳性标本的峰高则大于 900。其中 25 及 26 个循环时弱阳标本峰高明显低于阳性标本峰高。

2.2 26 个循环时不同浓度的阳性标本扩增结果比较 (图 2) 图 2 中 1 至 6 号阳性模板原始拷贝数分别为 0, 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 扩增后 138bp 峰高分别为 0, 519, 1505, 7681, 15270, 15941, 由图中曲线看出, 随着模板浓度增加, 扩增产物成正相关增加, 但 10^3 和 10^4 基本持平。

2.3 阳性标本的典型图谱 (图 3) 阳性标本扩增后显示 138bp 扩增产物峰。图 3 所示为 1 例 SARS 阳性模板, 经检测出现 138bp 峰, 且峰高为 1505, 为 SARS-CoV 阳性。

2.4 20 例 SARS 患者的 67 份标本琼脂糖电泳与 GeneScan 结果比较 (见附表) 附表列出取自 20 例 SARS 患者的血清、白细胞、咽拭子、鼻拭子、便、尿共 67 份标本的检测结果, 可以看出, 用普通琼脂糖凝胶电泳六种标本的阳性检出率分别为 3/14、1/5、5/15、6/15、3/7、5/11, 总检出率为 23/67; 而用 GeneScan 技术的阳性检出率分别为 5/14、3/5、7/15、12/15、5/7、6/11, 总检出率为 38/67, 提高 22.4%。20 例 SARS 患者用电泳检出 15 例阳性 (有一种以上标本阳性即为阳性), 而用 GeneScan 技术检出 20 例均为阳性 (有一种以上标本阳性即为阳性)。患者病程从 1 天、2 天、5 天、6 天至 22 天, 均能检出阳性。

3 讨论

严重急性呼吸综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS) 有起病急、传播快、人群普遍易感、病死率较高, 症状复杂, 诊断困难等特点。迫切需要一种快速敏感的检测 SARS-CoV 的技术。国际上已成功鉴定 SARS 的病原体为一种新型冠状病毒, 其基因序列已在 GeneBank 上发表^[1]。由于血清学检测方法只有在病程 10 天以上的患者中检出率可达 90% 以上, 不能作为早期诊断指标, 但基因检测是通过逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 特异性扩增检测 SARS 病毒 RNA。理论上说, 患者感染上 SARS 病毒的早期, 虽然其抗体还没有产生, 但只要有该种病毒颗粒存在, 利用 RT-PCR 技术就可以快速特异地早期检测到病毒 RNA。我们在一条引物的 5' 端标记荧光染料 6-FAM, 利用 GeneScan 技术建立了一个灵敏度高的 SARS 基因检测方法。SARS 病人标本中提取的总 RNA, 经逆转录, 用本研究设计合成的引物扩

增特异的 SARS 病毒基因 138bp 片段, 经 ABI-310 毛细管电泳, GeneScan 软件分析, 出现 138bp 特异峰且峰高大于基线者为 SARS-CoV 阳性。并且其测序结果表明此 138bp 片段的序列与网上公布的 SARS 病毒的基因序列完全一致, 因此该 138bp 带的出现代表了被检测标本中存在 SARS 病毒。

我们通过比较 25, 26, 27, 28 个循环条件时空白对照、阴性标本及阳性标本的峰高, 空白对照及阴性标本均为 0, 阳性标本均高于 900。说明本实验特异性及灵敏度都很好。其中 26 个循环时能看出弱阳标本和阳性标本有明显差异, 因此选定 26 个循环为最佳实验条件。我们比较了 26 个循环时不同浓度阳性模板的结果, 表明随着模板浓度从 0, 10^0 , 10^1 至 10^4 增加, 扩增产物也成正相关增加, 10^3 和 10^4 由于扩增进入平台期, 无显著差异。每批实验都要设置两个空白对照、两个阴性对照以确定 ABI-310 测定之基线。我们运用建立的方法对 20 例 SARS 患者的 67 份标本进行检测, 结果表明对血清、白细胞、咽拭子、鼻拭子、便、尿六种标本 GeneScan 检出的阳性比普通电泳均有提高, 总的检出标本数也从 23/67 (34%) 提高到 38/67 (57%); 并且 GeneScan 技术检出 20 位患者均有标本阳性 (100%), 而普通电泳只检出 15 位阳性 (75%)。说明 GeneScan 检测方法具有很高的灵敏度。患者病程从 1 天、2 天、5 天、6 天至 22 天, 均能检出阳性, 较血清学方法病程 10 天以上才能检出阳性时间大大提前。对于 SARS 患者的早期诊断很有帮助。

该实验的优点是灵敏度和特异性都很高, 但在实验当中我们也发现必须采取非常严格的措施以防止扩增产物对实验室环境的污染, 因此每批检测标本的同时要设置两个弱阳及两个阴性对照。为了更严格地防止扩增产物对实验室的污染, 我们已采取 dUTP/UDG 的措施^[3], 研究结果另文发表。

参考文献:

- [1] Ksiazek TG. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348, 20:1953-1966.
- [2] 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.
- [3] Vanghan P, McCarthy T V. A novel process for mutation detection using uracil DNA glycosylase, *Nucleic Acids Res*, 1998, 26:810-815.