

应用 PCR-RFLP 法作脊灰炎病毒型内分析的研究

Studies on Intratypic Analysis of Poliovirus Strains by PCR-RFLP Assay

古绍文 刘 巍 王树声 班华国
Gu Shaowen Liu Wei Wang Shushen Ban Huaguo

(广西卫生防疫站 南宁市桃源路 530021)

(Guangxi Hygienic and Anti-epidemic Station, Taoyun Road, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 用 PCR-RFLP 法对近年来从麻痹病人分离到的 26 株脊灰炎病毒 (PV) 作了型内分析研究。16 株 PV₁ 的 RFLP 图式呈现多样性, 毒株的图式可与 Sabin 1 型疫苗株完全相同或不同, 某些毒株亦可无电泳条带出现。7 株 PV₂ 与 3 株 PV₃ 的 RFLP 图式则分别与疫苗株 Sabin 2 型和 3 型完全相同。全面分析这些 RFLP 后, 我们认为 16 株 PV₁ 为野毒株, 而 7 株 PV₂ 及 3 株 PV₃ 则可能是疫苗相似株。鉴于近年来广西的麻痹病例仍主要由 PV₁ 所致。故此, 加强突击普服 OPV 运动及作好分离毒株的型内分析已成为消灭脊灰炎的关键。

关键词 脊灰炎病毒 PCR-RFLP 法 型内分析

Abstract Intratypic analysis of 26 poliovirus strains isolated from paralytic poliomyelitis cases in Guangxi in the past few years had been done by PCR-RFLP assay. The results showed that RFLP patterns from 16 poliovirus type 1 strains (PV₁) were various, some PV₁ strains were similar or unsimilar to Sabin 1 strains in RFLP pattern. Other PV₁ strains have no bands after electrophoresis; RFLP patterns from 7 poliovirus type 2 strains (PV₂) and 3 poliovirus type 3 strains (PV₃) were the same as those of Sabin 2 and Sabin 3 strains, respectively. According to the results, we think that 16 PV₁ strains would be wild poliovirus strains, 7 PV₂ strains and 3 PV₃ strains might be vaccine-related strains. In recent years, most paralytic poliomyelitis cases in Guangxi have been caused by PV₁ wild strains. So it is very important to strengthen OPV vaccination and develop the intratypic analysis of poliovirus strains for eradicating paralytic poliomyelitis.

Key words poliovirus, PCR-RFLP assay, intratypic analysis

我们曾报道过用 PCR 法对近几年从麻痹病人分离到脊灰炎病毒 (PV) 进行定型及型内分析的研究结果^[1], 在这基础上我们又结合应用 RFLP 法 (Restriction fragment length polymorphism assay 限制性片段长度多态法) 对 PV 毒株作进一步的型内分析研究, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标准 PV 毒株。3 个型 Sabin 疫苗株由中国医科院生物研究所提供

1.2 PV 分离株。选取 1986 年以来从麻痹病人分离到的 26 株 PV 作研究, 计 PV₁ 16 株, PV₂ 7 株及 PV₃ 3 株 (详见表 1)

1.3 限制性内切酶。Hae III, Hinf I, Sty I, Rsa I 及 Xba I 酶均购自华美生物工程公司, 除 Rsa I 及 Hinf I 酶为美国 Promiga 产品外, 其余的酶均为该公司产品。按照使用说明书, 用相应的酶缓冲液配制各种酶反应物。

1.4 PCR-RFLP 法

1.4.1 cDNA 的制备。按文献 [1] 法, 用 Sabin 各型引物^[2]扩增相应型别的 PV 株核酸, 即得到其产物 cDNA。

1.4.2 cDNA 的酶消化。参阅文献 [3] 法, 取 10 μL cDNA 加 2 μL 3 mol/L NaAc 及 20 μL 无水乙醇混匀, 放 -20℃ 过夜, 次晨离心 12 000 r/min, 去上清, 加入 20 μL 酶反应物, 置 37℃ 消化过夜即为酶消化物。

1994-09-19 收稿。

表 1 用于 PCR-RFLP 法分析的 PV 毒株

Table 1 Poliovirus strains for PCR-RFLP assay

型别 Type	株数 No. strains	毒株编号 Strain No.								
PV ₁	16	86-157	90-124	90-125	90-133	90-135	90-180	90-188	90-196	
		90-220	90-230	91-93	91-108	91-126	92-92	92-108	93-20	
PV ₂	7	90-121	90-128	90-132	90-135	90-185	90-254	90-264		
PV ₃	3	90-144	90-246	92-19						

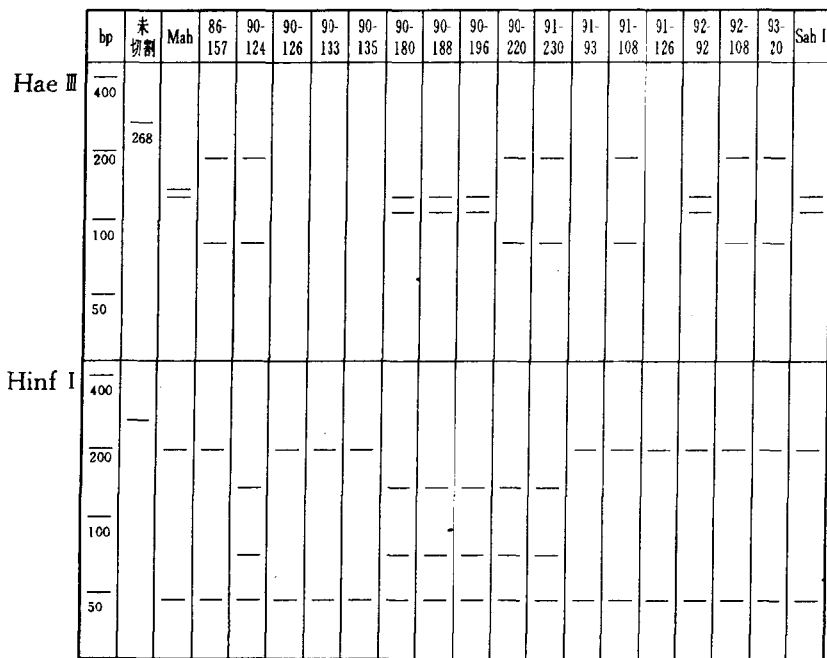


图 1 PV₁ 株 PCR-RFLP 结果示意图

Fig. 1 Sketch graph of PCR-RFLP of strain PV₁

Mah = Mahoney, 为 PV₁ 野毒代表株 Mahoney is representative of PV₁ wild strains. 86-157: 该株系 1986 年从贵港市死亡病例的神经组织中分离到。86-157 strain was obtained from the neural tissue of the dead in Guigang city in 1986.

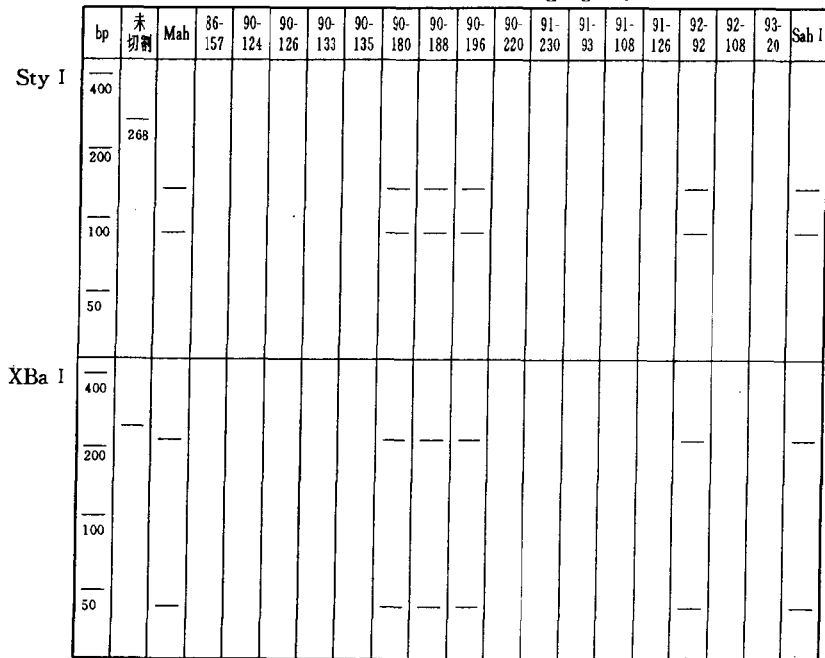


图 2 PV₁ 株 PCR-RFLP 结果示意图

Fig. 2 Sketch graph of PCR-RFLP of strain PV₁

1.4.3 12% PAGE. 参见文献[1]法, 取上述酶消化液 10 μL 加 2 μL 样品缓冲液 (40%蔗糖、10%甘油、0.25%溴酚蓝) 混匀即为电泳样品, 以 12%聚丙烯酰胺凝胶, 室温下 140 V 电泳 5~6 h, 再用 0.5 μg/mL EB 染色, 紫外灯下观察及照相。

2 结果

2.1 PV₁ 毒株的 RFLP 图式

用 Sahin 1 型引物扩增 PV₁ 毒株核酸所得的 cDNA 片段长度为 286 bp, 分别用有酶切点的 4 种酶 (Hae III (129, 111, 28 bp), Hinf I (199, 12, 47 bp), Sty I (92, 176 bp) 及 XBa I (46, 222 bp) 对 cDNA 进行消化后得到的 RFLP 图式呈多样性, 即毒株的 RFLP 图式可与 Sahin 1 型相同或不同, 有些毒株则无条带出现 (见示意图 1~2)。

2.2 PV₂ 的 RFLP 图式

Sabin 2 型引物扩增 PV₂ 毒株核酸得到的 cDNA 片段长度为 146 bp, 用对该片段有切点的 Sty I (43, 103 bp) 酶消化后, 7 株 PV₂ 的 RFLP 图式均与 Sahin 2 型相同, 表现为出现的条带数及条带位置均相同 (见示意图 3)。

2.3 PV₃ 的 RFLP 图式

Sahin 3 型引物扩增 PV₃ 毒株核酸得到的 cDNA 片段为 233 bp, 用对该片段有酶切点的 Hinf I (24, 109) 及 Rsa I (32, 112, 33, 56 bp) 消化后 3 株 PV₃ 的 RFLP 图式与 Sahin 3 型亦完全相同 (见示意图 4)。

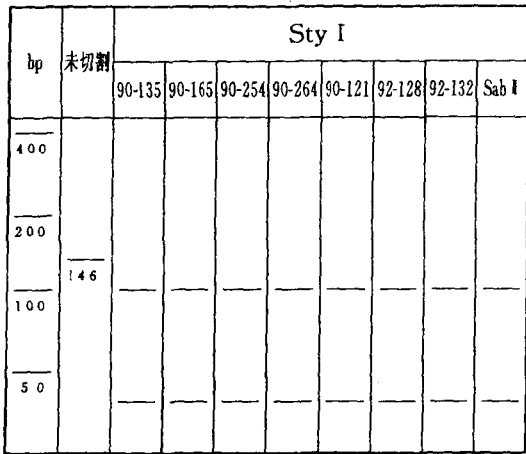


图3 PV₂株 PCR-RFLP 结果示意图

Fig. 3 Sketch graph of PCR-RFLP of strain PV₂

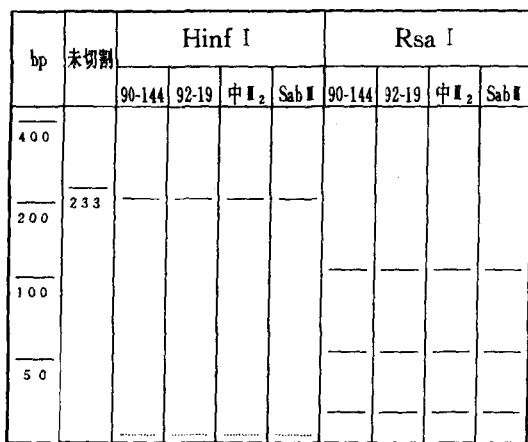


图4 PV₃株 PCR-RFLP 结果示意图

Fig. 4 Sketch graph of PCR-RFLP of strain PV₃

3 讨论

本文用 PCR-RFLP 法对近年来从麻痹病人分离到的 26 株 PV 作了分析研究, 发现了 PV₁ 毒株 RFLP 图式的多样性, 即部分毒株的 RFLP 图式与 Sahin 1 型相同, 表现为出现的电泳条带数及条带位置均相同, 部分毒株则与 Sahin 1 型完全不同, 而某

些毒株则无条带出现。PV₂ 及 PV₃ 毒株的 RFLP 图式则分别与 Sahin 2 型及 Sahin 3 型相同。经全面的综合分析, 我们认为 16 株 PV₁ 为野毒株, 而 7 株 PV₂ 及 2 株 PV₃ 则可能是疫苗相似株。

目前已公认 PV 基因组极易发生突变, 但 80% 的突变为同义性突变, 表现出抗原性上的保守和基因的漂移^[4]。如果这种基因的漂移正好发生在所扩增的 CDNA 片段的酶切点上, 则酶不能识别和切割, 就会表现为酶消化后无电泳条带出现, 本文某些 PV₁ 毒株在酶切后未见条带出现, 正好反映了 PV 的这一变异规律。根据 Balanant 等人的报告^[3], 我们认为我们的判断标准是正确的。

由于 PCR-RFLP 法只反映某段扩增基因的几种内切酶切点的几个核苷酸的变化, 不如核酸序列分析那样, 全面了解到每个核苷酸的变化, 又因我们所扩增的基因片段较短, 尤其是 PV₂ 的扩增片段更短 (仅 146 bp), 难于找到更多有酶切点的酶进行酶切分析, 因而在一定程度上对客观分析毒株的性质亦有影响, 尽管如此, PCR-RFLP 法仍在一定程度上反映了毒株基因组的变异, 为进行脊灰炎病毒内分析提供了一种新的手段。

鉴于近年来造成本区麻痹病例的仍主要是 PV₁^[5], 故加强 OPV 的实击普服及对毒株性质的监测则是消灭脊灰炎的关键。

参考文献

- 1 古绍文等. 应用聚合酶链反应作脊灰炎病毒定型及型内分析的初步研究. 广西医学, 1994, 16 (2): 116~118.
- 2 孔 健等. RT-PCR 用于脊灰炎病毒检测及定型. 中华微生物学和免疫学杂志, 1993, 13 (6): 399~421.
- 3 Balanant J et al. The natural genomic variability of poliovirus analysed by a restriction fragment length polymorphism assay. Virology. 1991, 184: 645~654.
- 4 Olen M Kew et al. Molecular epidemiology of wild poliovirus. Applied virology research, 1990, 2: 199~121.
- 5 王树声. 脊灰炎现状及消灭脊灰炎的策略. 广西医学, 1991, 13 (6): 382.

(责任编辑: 蒋汉明)