基础研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0027-03

新疆伊犁地区马的尼帕病毒感染情况研究

刘妍汐[1,2],谢 鹏[1,2,3],曾志磊[1,2],翟 红[1,2],徐鸣明[1,2],张英英[1,2],余建萍[1,2],陈 晓[1,2],彭 丹[1,2],朱 丹[1,2]

(1.重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016;2.重庆医科大学基础研究所,重庆 400016;
3.感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨尼帕病毒(Nipah virus,NiV)在新疆伊犁地区马群中的自然感染情况。方法:采用尼帕病毒一步法实时定量逆转录聚合酶链反应(One step real time reverse transcriptase polymerase chain reaction,Real-time RT-PCR)检测120匹马外周血液单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)中的 NiV N基因片段,对阳性产物进行基因序列测定、同源性和氨基酸顺序分析。结果:所检测120匹马PBMCs NiV N基因片段阳性率为0%(0/120)。结论:本研究未发现新疆伊犁地区马中存在尼帕病毒自然感染。

【关键词】尼帕病毒;Real-time RT-PCR;一步法;Taqman探针

【中国图书分类法分类号】R51 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Research on Nipah virus infection in equine of Yili, Xinjiang Uygur Autonomous Region

LIU Yan-xi, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the epidemics of Nipah virus(NiV)in Yili, Xinjiang Uygur Autonomous Region. *Methods*: One step real time reverse transcriptase polymerase chain reaction(real-time RT-PCR)was performed to detect the NiV N in peripheral blood mononuclear cells from 120 equines. Gene sequence and amino acid sequence were analyzed for positive products. *Results*: The positive rate of NiV N in PBMCs from 120 equines was 0%(0/120). *Conclusion*: The investigation do not support that NiV infection exist in Yili, Xinjiang Uygur Autonomous Region.

【Key words】Nipah virus; Real-time RT-PCR; One step; Taqman probe

NiV感染于1998~1999年在马来西亚和新加坡首次爆发,导致100万头猪被宰杀和111人死亡(死亡率48%)[1]。它是一种与亨德拉病毒极其相近的病毒,具有典型的有囊膜的连续单股不分节负链RNA病毒,含有大约18 246 bp基因组,属于副粘病毒科、副粘病毒亚科的一个新属,即亨尼帕病毒属[2]。尼帕病毒具有广泛的宿主范围,在自然条件下可以感染人、猪、猫、犬马、鼠、蝙蝠,并造成人兽共患病性疾病—尼帕病毒病(Nipah virus disease,NVD)。尼帕病毒可侵害中枢神经系统和呼吸系统,损害脑、心、肾和肺,但不损害生殖系统,其特征为伴有发热的神经症状,如震颤、惊厥、昏迷、严重头痛、肌痛、脑脊膜炎,并出现呼吸道症状,如咳嗽等[3]。迄今为止,国内外尚未见到我国NiV自然感染的研究报道。为此,我们课题组采用尼帕病毒一步法Real-time RT-PCR检测我国新疆伊犁地区马外周血液中的NiV N基因片段,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

全部120份马外周血液标本均来自新疆伊犁地区牧场上放养的马匹。

1.2 主要试剂及仪器

(1)引物。P1: 5'-AAA CAT CAG CAG GAA GGC -3'(18 bp),P2:5'-CCA CTC TGT TCT ATA GGT TCT T-3'(22 bp)。(2)荧光探针的序列:5'-FAM-AAA TTT GCT GCA GGA GGT GTG CTC AT -3'(均由上海生工公司合成)。(3)

作者介绍:刘妍汐(1981-),女,硕士,
研究方向:中枢神经系统感染。
通讯作者:谢 鹏,男,教授,E-mail:pengxie58@gmail.com。

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA02Z196)。

Rotorgene 6000型荧光定量PCR仪(Corbett Research公司)。(4)马淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司)。(5)采用组织/细胞RNA(小量)抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)。(6)Nipah病毒一步法双色荧光定量RT-PCR检测试剂盒(上海吉玛制药技术有限公司,GenePharma)。

1.3 方法

1.3.1 提取细胞总RNA 将每份10ml EDTA-Na_2抗凝的马外周血用马淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMCs),采用组织/细胞RNA(小量)抽提试剂盒提取细胞总RNA,标本置于−80℃保存。

1.3.2 RNA样本的浓度计算及纯度和完整性检测 随机取5份RNA样本,RNA样本做1:25稀释,用紫外分光光度计测D_{260}、D_{280}值,并计算二者比值。根据公式计算RNA浓度(μg/μl)D_{260}×核酸稀释倍数×40/1 000。然后于1%琼脂糖凝胶中进行RNA样品电泳,在凝胶扫描系统中观察结果并照相。

1.3.3 NiV质粒标准曲线制作 将NiV一步法双色荧光定量RT-PCR检测试剂盒中的RNA标准品连续6次10倍稀释,稀释成10^7、10^6、10^5、10^4、10^3、10^2 拷贝/μl浓度梯度,在Rotorgene 6000型荧光定量PCR仪上进行一步法Real time RT-PCR反应。反应结束后,由该PCR仪附带软件Rotor-Gene 6000 series Software 1.7自动分析出定量结果,并生成标准曲线。

1.3.4 一步法Real-time RT-PCR 在DEPC处理的Eppendorf管中加入一步法RT-PCR Mster Mix 10μl,上下游引物混合物2μl,逆转录酶MMLV 0.2μl,荧光标记探针2μl,RNA2μl,去离子水ddH_2O 3.8μl,总反应体积 20μl,反应条件:42℃逆转录30min;95℃预变性15min;95℃ 12s,55℃ 20s,72℃ 20s,共循环40周期。每次试验设阴性对照。所有步骤按Gene Pharma 公司的NiV一步法双色荧光定量RT-PCR检测试剂盒按操作说明进行。

1.3.5 PCR产物纯化、测序及氨基酸序列分析 对阳性PCR产物进行纯化并测序和进行氨基酸序列分析。

2 结 果

2.1 RNA的提取

随机提取5例马血的RNA样本用紫外分光光度计测OD_{260}、OD_{280},计算OD_{260}/OD_{280}值分别为1.962、1.946、2.009、2.06、2.061,RNA浓度分别为0.261、0.325、0.235、0.622、0.552μg/μl。作琼脂糖凝胶电泳显示明显的28S、18S、5S 3条带(见图1),说明RNA样品纯度高、完整性好、无降解。

2.2 制作荧光扩增标准曲线

把重组NiV RNA标准品连续10倍稀释,将获得的10^7、10^6、10^5、10^4、10^3、10^2拷贝/μl的RNA作为模板,进行一步法Real time RT-PCR反应,荧光扩增标准曲线见图2。

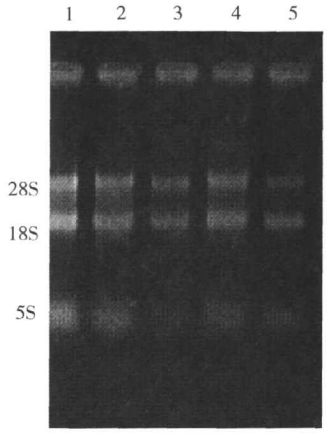


图1 RNA电泳图(1、2、3、4、5为马PBMCs RNA样本)

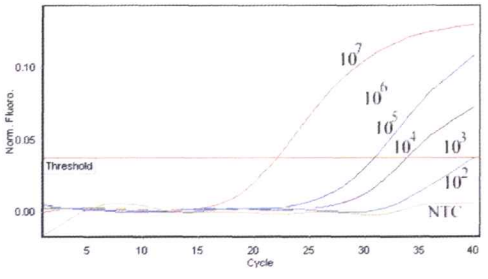


图2 一步法Real time RT-PCR 荧光扩增曲线(6条S形曲线依次10^7、10^6、10^5、10^4、10^3、10^2拷贝/μl级标准模板扩增动力曲线)

根据不同浓度的RNA标准品进行一步法Real time RT-PCR反应时的荧光扩增信号,由Rotor-Gene 6000 series Software 1.7软件自动生成NiV荧光定量标准曲线:CT = −3.571×log(conc)+48.209,斜率为−3.571 24,R^2=0.981 08,见图3。

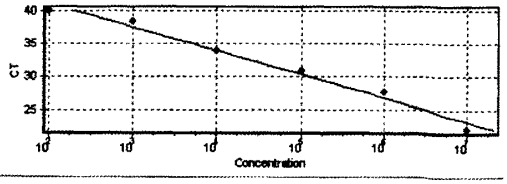


图3 一步法Real time RT-PCR测定NiV N的标准曲线图

2.3 马外周血PBMCs中NiV基因片段阳性率

所检测的120份马外周血PBMCs中NiV N基因片段阳性率均为0(0/120)。

3 讨 论

近年来病毒性感染疾病在许多国家呈爆发性流行。例如,1998年的NiV脑炎和2002年的西尼罗病毒脑炎均导致感染区内数千人在短时间内迅速死亡。2003年SARS的肆虐和2004年以来发生的人感染高致病性禽流感病毒等都引起了人类的极度恐慌,造成了巨大的经济损失。这些疾病的出现也引起了研究者们对新发病毒感染性疾病的高度关注和重视。

NiV是新发病毒感染性疾病中的一种病原体,研究者们近年对其进行了广泛的研究。NiV的自然宿主动物是属于狐蝠科(Pteropid)的食果蝙蝠[4],其它动物如猪等可因暴露于携带NiV的蝙蝠或接触其污染物而感染从而成为中间宿主。NiV的发生和流行可能与人类活动和自然条件的改变有关[5]。在过去20年中,大量采伐森林和气候环境改变,使东南亚果蝠的森林栖息地逐渐缩小,食物不足,使得果蝠从传统的森林中迁移到森林边缘附近的果园摄取食物。果蝠的活动范围和人类过于接近,中间宿主捡食了果蝠吃剩或被尿液等排泄物污染的带毒果实而感染;另外,将猪场修建在果蝠的栖息地边缘也可以直接导致了病毒传入猪群,集约化饲养使病毒在本地猪群中快速地传播和流行,由于存在高密度的、具有放大作用的中间宿主动物,使病毒传播给人类成为可能。

已有的研究表明在马来西亚、新加坡、孟加拉国、印度、柬埔寨和泰国等国家均发现了NiV的存在,并且引起了严重的疫情[6-8]。因此,有存在更大范围蔓延的可能。NiV在全球,尤其在这些国家以外其它国家地区动物中的流行情况尚不清楚。我国与已发现NiV存在的国家地理位置靠近,地域广阔,并且具备NiV传播流行的条件,所以有进行NiV相关研究的必要,做好预防调查工作迫在眉睫。我国对NiV的研究处于起步阶段,国内已有肖昌、刘勇军、王喜军、胡森等人[9-12]进行了一些NiV的相关研究,但国内外尚未见到我国NiV自然感染的研究报道。

目前NiV的检测方法主要有以下几种:病毒分离与鉴定、血清中和试验(Serum neutralization test,SNT)、酶联免疫吸附检测(Enzyme-linked immunosorbent assays,ELISA)、PCR检测等。病毒分离是最基础、最重要的诊断手段。对于新发疾病病例,病毒分离是最有价值的工作,但NiV分离需在生物安全4级(P4)条件下进行。NiV的血清中和试验和ELISA均为免疫学检测方法,敏感性高,但特异性较差,并存在一定的交叉反应。而一步法Real-time RT-PCR具有较高的敏感性,可以检测出每份标本中10~100个基因拷贝,同时由于在反应体系中加了特异性荧光探针,还具有较高的特异性[13,14]。针对NiV N基因所设计的引物和探针能检测出绝大多数现有已知的NiV病毒株,不与其它病毒产生阳性结果,且不易出现污染引起的假阳性结果。我们选择了新近建立的一步法Real-time RT-PCR方法检测马外周血单个核细胞中NiV N基因片段。运用该方法检测了新疆伊犁地区120匹马,没有阳性发现。这提示本研究结果不支持新疆伊犁地区马群中存在NiV感染。至于我国马是否存在NiV自然感染,还有待于多中心、大样本的进一步研究。

总之,本课题组所进行的前期研究结果未发现新疆伊犁地区马群中存在NiV自然感染。

参 考 文 献

[1] CDC.Outbreak of Hendra-like Virus-malaysia and Singapore,1998-1999[J].MMWR Morb Mortal Wkly Rep,1999;48(13):265-269.

[2] Wang LF,Harcourt BH,Yu M,et al.Molecular bio log y of Hendra and Nipah viruses[J]. Microbes and Infection,2001;3:279-287.

[3] 包世俊,扈荣良.猪的副粘病毒病简介[J].中国兽医科技,2002;32(10):44-46.

[4] Chua KB,Koh CL,Hooi PS,et al.Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes[J]. Microbes Infect,2002;4(2):145-151.

[5] Chua KB,Chua BH,Wang CW.Anthropogenic deforestation, El Nino and the emergence of Nipah virus in Malaysia[J]. Malays J Pathol,2002;24(1):15-21.

[6] Wacharapluesadee S,Lumlertdacha B,Boongird K,et al.Bat Nipah virus,Thailand[J]. Emerg Infect Dis,2005;11(12):1949-1951.

[7] Chadha MS,Comer JA,Lowe L,et al.Nipah virus-associated encephalitis outbreak,Siliguri,India[J]. Emerg Infect Dis,2006;12(2):235-240.

[8] Wong ML,Medrano JF.Real-time PCR for mRNA quantitation [J]. Biotechniques,2005;39(1):75-85.

[9] 肖 昌,刘勇军,徐兴然,等.尼帕病毒和亨德拉病毒核蛋白单克隆抗体的制备与鉴定[J].中国兽医学报,2007;27(4):433-436.

[10] 刘勇军,肖 昌,王贵平,等.尼帕病毒融合蛋白受体结合蛋白的表达及特异性高免血清的制备[J].微生物学报,2007;47(3):465-470.

[11] 王喜军,王清华,葛仓英,等.表达尼帕病毒G囊膜糖蛋白重组牛痘病毒的研究[J].微生物学报,2006;46(4):644-648.

[12] 胡 森,王清华,王喜军,等.尼帕病毒F糖蛋白在重组牛痘病毒中的表达及鉴定[J].病毒学报,2006;22(3):220-224.

[13] Morris T,Robertson B,Gallagher M.Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by u sin g the TaqMan fluorogenic detection system[J]. J Clin Microbiol,1996;34(12):2933-2936.

[14] 徐 平,谢 鹏,邹德智,等.博尔纳病病毒荧光定量巢式RT-PCR检测方法的建立[J].重庆医科大学学报,2003;28(6):688-696.