DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.04.018

经验交流

重庆地区婴幼儿腹泻轮状病毒RNA的分析

王守良 张淑莲 熊大慧* （微生物学教研室）

轮状病毒基因组RNA经聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）分析可分出11个RNA片段。分析该病毒基因组RNA之PAGE图谱类型对了解轮状病毒引起的地区流行规律具有重要意义。Herring[1]等报告可省去密度梯度离心纯化病毒颗粒等步骤直接从病儿粪便中提取轮状病毒RNA做PAGE分析。目前，这种方法已用于轮状病毒感染病人的快速诊断和分子流行病学的调查[2][3]。

重庆地区由轮状病毒引起的婴幼儿腹泻从病原学早已证实[4]，但该病毒基因组RNA的PAGE分析研究未见报导。本文就轮状病毒RNA的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果报告如下。

材料和方法

一、粪便标本收集和处理

于1978～1981年及1985年5次婴幼儿腹泻流行期收集68份病儿粪便标本；非腹泻的其它病儿粪标本13份；健康婴幼儿粪标本7份。标本中加0.1%叠氮钠防腐，贮存于－20°C冰箱。标本处理：取稀粪标本约5ml，在－20°C与室温中反复冻融三次，过滤除去粪渣。以3000～4000rpm离心20～30min，上清液供作RNA提取。

二、轮状病毒RNA的提取

按Herring等的方法进行提取[1]。所得RNA沉淀溶于适量双蒸水中，即为轮状病毒RNA样品。贮存于－20°C待做电泳分析。

三、轮状病毒RNA样品的PAGE分析法

仍按Herring等采用垂直板状不连续PAGE分析法[1]。板胶染色为硝酸银染色法。板胶背地为淡黄色而样品中的RNA区带呈深褐色。

四、ELISA检测法

试剂为成都生物制品研究所生产的轮状病毒ELISA试剂盒。检测法按说明书操作。

五、电镜（EM）检查

按文献[5]用琼脂过滤浓缩法制备电镜样品和观察。

结果

一、轮状病毒RNA的PAGE图谱类型

68份病儿粪标本中有42份的PAGE凝胶图谱显示出8～11条病毒RNA区带；另有14份的PAGE图谱其区带较弱；其他12份未见到任何区带。非腹泻病儿和健康婴幼儿粪标本均为阴性。

在42份RNA区带明晰图谱中可清楚看出它们的RNA区带的迁移率各异。根据迁移距离长短之分，有28份的RNA图谱型属于长L型；14份属于短S型（见图1）。再仔细分析长型和短型图谱至少可分辨出四种类型即Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ型（见图1）。

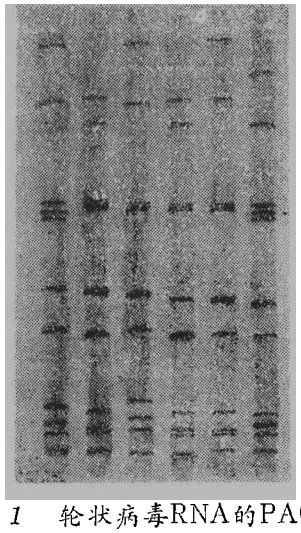


图1 轮状病毒RNA的PAGE图谱类型

* 重庆医科大学附属儿科医院

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

四种类型RNA图谱上的区带分布不同。从图1看，第Ⅰ类型图谱型中11条RNA区带明显分开，其中第2、3条区带之距离较宽，第7、8、9条之间隔分明；第Ⅱ类型者的第2、3两带靠近，第7、8、9三带分开不显著，而第10、11两带相距较宽；第Ⅲ类型者中除第10、11两带相距较近外其余带谱分布与第Ⅰ类型者相同；第Ⅳ类型者的第2、3两带及第10、11两带之间距都较宽，但第7、8、9、三带几乎分不开。这四种轮状病毒RNA的PAGE图谱类型在42份阳性粪标本中出现的频率(即阳性率)，属第Ⅰ类型者为35.7%；属第Ⅲ和第Ⅳ类型者两型均为23.8%；属第Ⅱ类型者仅为16.6%(表1)。

表1　轮状病毒RNA的四种PAGE图谱类型的频率

类　型	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	总计
标本数(份)	15	7	10	10	42
阳性率(%)	35.7	16.7	23.8	23.8	100

二、粪标本中轮状病毒RNA的检出率

用PAGE法检查重庆地区婴幼儿腹泻病儿、无腹泻病史上呼吸道感染患儿及健康婴幼儿粪标本中轮状病毒RNA分析的结果见表2。

表2　用PAGE法检查粪标本中轮状病毒RNA的检出率

粪标本来源	份数	轮状病毒RNA检出	
		阳性份数	阳性%
婴幼儿腹泻病儿	68	56	82.3
非腹泻病儿	13	0	0
健康婴幼儿	7	0	0

自68份腹泻病儿粪标本中检出56份含有轮状病毒RNA，阳性率达82.3%；而非腹泻病儿和健康婴幼儿粪标本均为阴性。此说明应用PAGE法检测粪标本中轮状病毒RNA具有高度敏感性和特异性。

三、比较PAGE、ELISA和EM三法的检出率

从1985年采集的42份粪标本中任意选出26份量较多者用PAGE法分析标本中轮症病毒RNA，用ELISA法测定其中轮状病毒抗原，及用EM法观察病毒形态。比较三种方法的检出阳性率。同时从1978～1981年采集的经EM观察确含有轮状病毒颗粒13份标本，用于考证PAGE法检测轮状病毒RNA的可靠性。所得结果表明，PAGE法的阳性率为73.0%；ELISA法为80.7%；而EM法为46.1%，13份经电镜确定含有轮状病毒的标本PAGE法检查全部为阳性（表3）。

表3　比较三种方法的检出阳性率

标本采集时间	PAGE	ELISA	EM
1978～1981年	13/13 (100.0%)	未做	13/13 (100.0%)
1985年	19/26 (73.0%)	21/26 (80.7%)	12/26 (46.1%)

注：分母为检查数，分子为阳性数，括号内为阳性%

讨　论

我们自重庆地区婴幼儿腹泻病儿粪标本中直接提取了轮状病毒RNA，经PAGE分析，获得了特征性的具有8～11条区带的电泳图谱。区带分布呈四个区段：第一区段为分子量较大近点样端的第1、2、3、4条带；第二区段包括第5、6条带；第三区段包括第7、8、9条带；第四区段为分子量较小泳动较快靠远端的第10、11条带。由于第一区段中第2、3带条和第三区段中第7、8、9条带之间的距离常变异，宽窄不等甚至完全消失。因此，有些轮状病毒RNA的PAGE图谱不是11条带，而是10条、9条或8条带。所见与文献相符[1][6]。

Espejo和Kelica等[7][8]根据第四区段的第10、11条带泳速快慢，将泳速快和泳距较长的RNA电泳图谱型称为长型（L型），泳速慢泳距较短者称为短型（S型）。我们从重庆地区五次流行中采集的42份阳性标本中有28份的轮状病毒RNA之PAGE图谱型属长型；14份属短型。在长型或短型RNA图谱中常见许多变异型。Buiterwert等[9]从150余例病人粪标本中检出19种轮状病毒RNA电泳图谱型；Rodriguez等[10]于1983年一次流行中检出4种不同图型，次年又在该地区

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

流行期间查出7种图谱型，并认为轮状病毒RNA的PAGE图型存在的这种变异性可能反映了该病毒在自然界所产生的基因漂移，或因两种RNA不完全相同的轮状病毒感染同一宿主而产生了基因重组的可能[11]。在我们42份长型和短型图型中至少可区分出四种变异型，它们的阳性率分别为：Ⅰ型35.5%、Ⅱ型16.7%、Ⅲ及Ⅳ型均为23.8%。四种变异型的检出率差别不十分明显。

本文证明轮状病毒RNA的PAGE图谱型有较高的特异性。由电镜观察确含有典型形态轮状病毒的13份标本，用PAGE法分析全部呈阳性特征性RNA电泳图谱型。非腹泻病史的其他患儿及健康婴幼儿的粪标本全部为阴性。

本文比较研究了PAGE、ELISA及EM三种方法的检出阳性率，它们分别为：PAGE法73.0%、ELISA法80.7%、EM法46.1%，故病毒RNA的PAGE分析法的敏感性略低于ELISA抗原检测法，但比电镜检查病毒形态则敏感得多。

参 考 文 献

1. Herring AJ, et al. J Clin Microbiol 1982; 16:473
2. Rodger SM, et al. Ibid 1981;13:272
3. 王长安，等。微生物学报1985；25：153
4. 王守良，等。第三军医大学学报1980；1：50
5. 王守良，等。全国医学生物物理学术会议论文汇编1982，32
6. Rodger SM, et al. J Virol 1979; 30:839
7. Espejo RT, et al. J Infect Dis 1979;139:474
8. Ralica AR, et al. Infect Immun 1981;33: 958
9. Buiterwert J, et al. J Med virol 1983;12:71
10. Rodriguez, et al. J Infect Dis 1983;148:34
11. In"Double-Strained RNA Viruses". Edited by Richard W. Compass. et al, Elsevier Biomedical, New York, 1983:341

（上接第405页）

为提高穿切成功率，术者必须先行肉眼观察所取的标本，以便决定是否需重复穿切，肿瘤组织色深质脆而稍硬。

本针倒钩尚不够锐利，加以改进后，对乳块的诊断确是一种安全有效的方法。与其它辅助检查互为补充，可提高乳癌的术前诊断率。

参 考 文 献

1. 沈寒放，等。改良Abrams胸膜活检针胸膜活检的临床应用。中华结核和呼吸系疾病杂志 1986；9:1947～148
2. Kataoka T, et al. Diagnosis of breast lesions by aspiration biopsy cytologp. Jpn J Surg 1985; 15:361～367
3. Vorherr H. Breast aspiration biopsy. Am J Obstet Gynecol 1984; 15; 127～133
4. Bauermeister DE. The role limitations of frozen section and needle aspiration biopsy in breast cancer diagnosis. Cancer 1980; 46:947～949
5. 关曾文、杨锦明。乳腺癌。第一版，上海：上海科技出版社，1985:140

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n