

苏丹型埃博拉病毒焦磷酸测序方法的建立

赵永刚, 邹艳丽, 张永强, 吴晓东, 王清华, 王志亮

(中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032)

摘要: [目的] 本研究旨在通过对埃博拉病毒进行序列信息分析的基础上, 利用焦磷酸测序技术对苏丹型埃博拉病毒进行快速检测和鉴定。[方法] 通过序列信息比对, 设计苏丹型埃博拉病毒基因保守区段的扩增引物及测序引物。通过人工方法合成一段基因序列, PCR 扩增目的基因片段, 经体外转录制备 cRNA, RT-PCR 扩增目的基因片段, 采用焦磷酸测序技术针对目的基因进行保守核苷酸区段的测序分析。[结果] 通过序列信息比对寻找到苏丹型埃博拉病毒基因型的核苷酸保守区段, 经焦磷酸测序后能进一步确证毒株的序列信息为苏丹型埃博拉病毒。经过与华大基因公司进行 Sanger 法测序比较, 结果完全一致。[结论] 基于序列分析的焦磷酸测序技术可以作为进一步确证方法使用。

关键词: 苏丹型埃博拉病毒; 序列比对; 焦磷酸测序

中图分类号: S852.65⁺9.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-944X (2015) 09-0077-05

Establishment of Pyrosequencing Assay for Detection of Sudan Ebola Virus

Zhao Yonggang, Zou Yanli, Zhang Yongqiang, Wu Xiaodong, Wang Qinghua, Wang Zhiliang

(China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032)

Abstract: [Objective] To establish a new molecular method for simultaneous and rapid detection and confirmation of Ebola virus by using sequence analysis combined with pyrosequencing technology. [Methods] Amplification primers and a sequencing primer were designed according to the published sequences of conserved L gene regions of three Sudan Ebola viruses in GenBank. A gene sequence was synthesized artificially, and the target gene were amplified by PCR, to prepare cRNA through in vitro transcription. RT-PCR was developed for conserved regions of the gene, and the RT-PCR products were pyrosequenced. [Results] The characterized nucleotide segment was obtained by sequence analysis, and then the segment was confirmed as Sudan Ebola virus. Compared to the Sanger method of Huada, they showed 100% agreement. [Conclusion] Pyrosequencing technology based on sequence analysis can be used to confirm Sudan Ebola virus.

Keywords: Sudan type EBOV virus; sequence comparison; pyrosequencing

近几年, 外来动物疫病传入我国的风险不断上升, 随着小反刍兽疫等外来动物疫病的发生, 非洲猪瘟、尼帕、埃博拉等外来动物疫病步步紧逼我国。至今未查明其自然宿主动物通过与病人接触或者通过院内感染传播的埃博拉出血热于 1976 年首次出现^[1], 很快以其高度传染性的暴发流行和高度致死性引起研究者极大关注, 并引发了对埃博拉病毒及埃博拉出血热的一系列研究。

埃博拉出血热 (Ebola hemorrhagic fever,

EBHF) 是由埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV) 引起的人类和灵长类严重出血热疾病^[2-6], 因 EBOV 首次是 1976 年在扎伊尔北部的埃博拉河流附近一个名叫杨博科的小村庄发现, 故命名为埃博拉病毒和埃博拉出血热。

EBOV 属丝状病毒科 (Filoviridae), 与马尔堡病毒 (Marburg virus) 共同构成丝状病毒属 (Filovirus)。根据发现地点的不同 EBOV 可分为五个亚型, 即埃博拉病毒-扎伊尔型 (EBOV-Z)、

埃博拉病毒 - 苏丹型 (EBOV-S)、埃博拉病毒 - 莱斯顿型 (EBOV-R)、埃博拉病毒 - 科特迪瓦型 (EBOV-C)^[7] 和埃博拉病毒 - 本迪布焦型 (EBOV-B)^[8]。不同亚型的毒力各不相同, 其对人类毒力的强弱顺序为: EBOV-Z>EBOV-S>EBOV-B>EBOV-C>EBOV-R^[8-9]。其中扎伊尔型、苏丹型、本迪布焦型、科特迪瓦型对人类有致病性, 莱斯顿型仅在非人灵长类中引发疾病和死亡, 人类也可能感染这种病毒从而成为无症状的病毒携带者^[10-11]。世界卫生组织已将 EBOV 列为对人类危害最严重的病毒之一, 即第 4 级病毒。试验操作要求必须在 P4 级高度安全实验室中进行^[12]。2009 年菲律宾发生猪感染莱斯顿型病毒并传染给人的疫情^[13], 目前, 我国尚没有埃博拉病毒感染或输入的报道, 因此需要高度重视, 并做好检测和防控的技术储备。

埃博拉病毒可以人-人传播, 对人类危害极大, 易被恐怖分子用作生物战剂。《国际禁止生物武器公约》已将 EBOV 列为潜在的致死性生物试剂, 应引起高度重视。深入研究埃博拉病毒的致病机制及建立埃博拉病毒检测方法, 对预防和控制埃博拉出血热具有重要的意义。

焦磷酸测序技术 (Pyrosequencing) 是近几年发展起来的一种能够进行定量序列测定的新技术, 具有高通量、快速、敏感等特点。目前该技术在物种鉴定、病毒快速鉴定和分型、微生物的检测等方面已有广泛的应用^[14]。本研究根据埃博拉病毒基因序列的保守性, 建立了埃博拉的 PCR-焦磷酸测序检测方法。

1 材料

1.1 材料

苏丹型埃博拉病毒 L 基因保守区段由大连宝生物工程有限公司合成, 由中国动物卫生与流行病学中心保存。

1.2 主要试剂和仪器

Transcriptor One-Step RT-PCR Kit, 体外转录试剂盒购自 Promega 公司; IDEXX BVDV Ag Serum Plus 病原检测试剂盒购自 IDEXX 公司; Pyro Gold SQA Reagents 1×96 Pyromark ID 购自 Biotage AB

公司; PyroMark Q96 MD 仪器购自 QIAGEN。

2 方法

2.1 引物设计

选取 GenBank 中 EBOV 的毒株及其登录号 Reston Ebola virus (AF522874.1)、Sudan Ebola virus EBOV-S-2004 (EU338380.1)、Zaire Ebola virus strain Zaire 1995 (AY354458) 等 100 多条核苷酸序列, 经 Megalign 比对, 选出 L 基因高度保守且特异核苷酸区域, 运用 PSQ Assay Design 软件进行分析, 设计一对扩增引物和一条测序引物(表 1, 2), 其中通用引物的下游引物在 5 端采用生物素标记。引物均由大连宝生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 扩增引物及序列

引物	序列 (5' → 3')
EBOV3	TAATACGACTCACTATAGGG TGGCAATCA GTTGGACACATGATGG
EBOV2 (Biotin)	CCTTGAATGAACTGACCTCATTCTT

表 2 测序引物及序列

引物	序列 (5' → 3')
EBOV1	TGGCAATCAGTTGGACACATGATGG

2.2 阳性克隆质粒的构建

以合成的 L 基因为模板, 用含有 T7 启动子的扩增引物 EBOV3/EBOV2 (Biotin) 扩增 EBOV-S L 基因保守区。反应体系为: 模板 1μL, PCR Mix 25μL, 上下游引物各 2μL, 最后添加灭菌 dd H₂O 至 50μL。反应条件为: 95℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s, 56℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 45s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 7min。预期扩增片段长度为 274bp。PCR 结束后, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用胶回收试剂盒切胶回收目的条带, 并克隆到 pGEM-T 载体, 转化大肠杆菌 Ecoli JM109 感受态细胞。经蓝白斑筛选, PCR 鉴定获得含目的基因片段的重组质粒, 纯化后并测序。-20℃ 保存备用。

2.3 体外转录

2.3.1 体外转录模板的制备

以构建的阳性克隆质粒为模板, T7 启动子的扩增引物 EBOV3, EBOV2 为引物扩增的目的片段即为体外转录的模板。反应液用 Fermentas 公司的普

通PCR试剂盒。扩增条件为:95℃预变性5min;94℃30s,56℃30s,72℃45s,35个循环;最后72℃延伸7min。PCR产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像观察结果。切下阳性条带,用胶回收试剂盒回收目的片段,用核酸浓度测定仪定量。

2.3.2 体外转录

用购自 Fermentas 生物试剂公司 TranscriptAid T7 High Yield Transcription kit 进行体外转录,操作步骤按照说明书进行。

2.4 RT-PCR 扩增

将以上体外转录模板稀释100倍,进行RT-PCR扩增:体外转录稀释的模板1μL,RT-PCR Mix 25μL,EBOV2 2μL,EBOV3 2μL,ddH₂O 20μL,总体系50μL。扩增程序为:50℃30min;95℃预变性5min;94℃变性45s,57℃退火45s,72℃延伸45s,扩增35个循环;最后72℃延伸7min。结果用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,RT-PCR产物胶回收后进行浓度测定。

2.5 焦磷酸单链模板制备

根据 Gene Company Limited 公司的焦磷酸测序反应操作说明制备测序单链模板。将45μL RT-PCR单链模板分别加入到PSQ 96板的孔中,并加入测序引物,在85℃的烘箱中放置2min,取出冷却后即可进行焦磷酸测序。

2.6 焦磷酸测序反应

将放有样品的PSQ96孔板80℃孵育2min,冷却至室温后进行焦磷酸测序反应。将酶混合物、底物混合物和四类核苷酸(A、T、C和G)分别加入试剂舱固定位置。设定程序,将试剂舱和PSQ96孔板放入PSQ TM 96 MD System仪器中进行测序反应。根据PSQTM 96MA System仪器的软件说明在试剂舱中分别加入的底物APS、dNTP和酶混合物(DNA聚合酶、荧光素酶、ATP硫酸化酶和三磷酸腺苷双磷酸酶);然后将试剂舱和PSQ 96板放入,进行焦磷酸测序(pyrosequencing)反应。

2.7 敏感性试验

以体外转录产物为模板,用优化好的RT-PCR

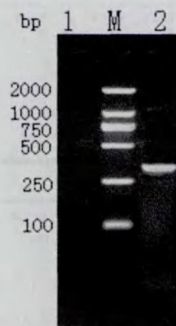
反应条件进行扩增,取5μL扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,并进行浓度测定。将RT-PCR产物进行2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、128倍、256倍稀释后,进行焦磷酸测序反应,确定试验的敏感性。

2.8 重复性试验

将扩增的RT-PCR产物分别进行3次焦磷酸测序,比较每次测得的序列结果,确定试验的重复性和稳定性。

3 结果

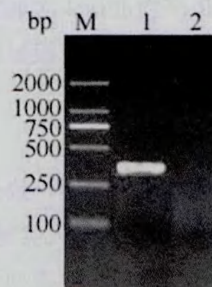
3.1 PCR扩增结果 利用设计引物扩增埃博拉病毒的特异基因片段,扩增出长度为274bp的目的片段(图1)。



1. 阴性对照; M. DNA Marker DL2000; 2. PCR产物
图1 苏丹型埃博拉病毒L基因PCR扩增结果

3.2 RT-PCR 扩增结果

按RT-PCR程序扩增埃博拉病毒核酸基因材料,所设计的扩增引物能扩增出与设计相符的试验结果(294 bp)。将反应体系增加到100 μL以获得足够量的目的片段。扩增后的PCR产物用DNA纯化回收试剂盒纯化,并送华大基因公司进



M. DNA Marker DL2000; 1. RT-PCR产物; 2. 阴性对照
图2 苏丹型埃博拉病毒L基因RT-PCR扩增结果

的基因片段,然后制备测序单链模板。将待测单链模板与测序引物杂交结合,放入PSQTM 96MD System中进行测序反应。与普通RT-PCR和real time RT-PCR等检测技术相比,本技术无需将PCR产物电泳及无需送交公司测序以便确诊,从而大大减少了病原确诊时间。焦磷酸测序操作简单方便,可程序化,便于构建标准化操作流程和规范,从而保证试验结果的稳定性和准确性^[18]。苏丹型埃博拉病毒焦磷酸测序方法的建立为今后动物疫病检测技术的研究提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Towner J S, Rollin D G, Bausch D G, et al. Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome[J]. *J Virol*, 2004, 78(8): 4330-4341.
- [2] 殷震, 刘景化. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997, 773-776.
- [3] 任金法. 致命的埃博拉病毒病[M]//中国现代医学理论与实践. 北京: 中国环境科学出版社, 1998, 1309-1311.
- [4] 刘沛. 埃博拉出血热研究现状[J]. 临床内科杂志, 2005, 22(8): 514-516.
- [5] 宋干. 埃博拉出血热研究进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13(2): 51-53.
- [6] 陈化新, 唐浏英. 埃博拉出血热的研究进展[J]. 临床内科杂志, 2000, 17(4): 201-203.
- [7] Weidmann M, Muhlberger E, Hufert F T. Rapid detection protocol for filoviruses[J]. *J Clin Virol*, 2004, 30(1): 94-99.
- [8] Towner J S, Sealy T K, Khristova M L, et al. Newly discovered Ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda[J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4(11): e1000212.
- [9] 杨涛, 尹文. 埃博拉病毒的研究概况[J]. 国外医学: 病毒学分册, 2002, 9(5): 152-155.
- [10] Fisher-Hoch S P, Brammer T L, Trappier S G, et al. Pathogenic potential of filoviruses: role of geographic origin of primate host and virus strain[J]. *J Infect Dis*, 1992, 166(4): 753-63.
- [11] Hartman A L, Towner J S, Nichol S T. Ebola and Marburg hemorrhagic fever[J]. *Clin Lab Med*, 2010, 30(1): 161-177.
- [12] 张海军. 埃博拉病毒及埃博拉病[J]. 生物教学, 2001, 26(8): 1.
- [13] Barrette R W, Metwally S A, Rowland J M, et al. Discovery of swine as a host for the Reston Ebolavirus[J]. *Science*, 2009, 325(5937): 204-206.
- [14] 陈之遥, 周国华. 焦磷酸测序技术的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(8): 1573-1576.
- [15] Mason C. The strains of Ebola[J]. *CMAJ*, 2008, 178(10): 1266-1267.
- [16] Geisbert T W, Jabring P B. Towards a vaccine against Ebola virus[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2003, 2(6): 777-789.
- [17] Elahi E, Ronaghi M. Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2004, 255: 211-219.
- [18] Tschentscher F, Ulrich H, Frey U H, et al. Amelogenin sex determination by pyrosequencing of short PCR products[J]. *Int J Legal Med*, 2008, 122(4): 333-335

(责任编辑: 胡藕祥)