

应用 TD-PCR 技术和限制性内切酶技术鉴定猴 B 病毒*

刘忠华¹, 黄 韧¹, 钟 翎²

(1. 广东省实验动物监测所, 广东 广州 510260;

2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 从 DNA 水平上鉴定猴 B 病毒, 并区别单纯疱疹病毒 (HSV-1); 用 PCR 技术对猴 B 病毒和 HSV-1 进行扩增, 并用限制性内切酶技术对扩增产物进行酶切, 对 PCR 扩增产物和酶切产物进行电泳; 电泳结果显示猴 B 病毒和 HSV-1 的 PCR 扩增产物为 128 bp, 酶切后, B 病毒能产生 72 bp 和 56 bp 片段, 而 HSV-1 不能产生酶切产物; 该方法能较好地鉴定猴 B 病毒, 同时也将密切抗原关系的 HSV-1 区分开来。

关键词: B 病毒; 单纯疱疹病毒; 聚合酶链反应 (PCR); 限制性内切酶技术; 降落 PCR

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) S1-0235-03

猴是我国出口的主要实验动物, 在新药研制中具有重要作用。猴疱疹病毒也称 B 病毒 (simian herpes B virus, SHBV), B 病毒最先从被猴咬后发病而导致死亡的人脑中分离到, 猕猴为自然宿主。感染 B 病毒的猕猴常无临床症状, 可自发地或在精神紧张状态条件下被激活而从唾液或生殖道向外排毒^[1], 人类感染 B 病毒主要表现为致死性脑炎, 在接触猴的工作人员中发生的死亡事故, 提醒人们注意建立防范措施的重要性。目前, 我国主要使用与 B 病毒密切相关的 HSV-1 作为抗原, 用免疫酶法检查猴群中 B 病毒感染情况。我国猴群中 B 病毒抗体阳性率高达 10% ~ 60%, 该免疫酶方法易出现漏检。

本文将从基因组水平上比较 B 病毒和 HSV-1 的差异, 通过引物设计, 降落 PCR (TD-PCR) 扩增和酶切分析方法来准确安全地鉴定 SHBV。

1 材料与方法

1.1 毒株

SHBV 毒株和 HSV-1 毒株由北京农业部兽医诊断中心提供。

1.2 主要仪器

PCR 仪, 型号 GEN02V0C-E (TECHNE1997) 英国; 紫外透射检测仪, 温州市孚华分析仪器厂; 倒置生物显微镜, 型号 XDP-1, 上海徕卡显微镜有限公司。

1.3 引物

参考文献 [2-5] 报道的 B 病毒序列, 同

HSV-1 序列比较, 遵循引物设计原则^[6], 应用 Pcrdesn 软件设计出上下游引物 (引物由上海生工公司合成)。其扩增产物长度为 128 bp。

1.4 模板病毒 DNA 的制备

取 B 病毒和 HSV-1 培养物 300 μ L, 加入等体积的 4 $\times$ CTAB (4% CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1.4 mol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, 2% 巯基乙醇) 混匀, 于 60 $^{\circ}$ C 水浴中保温 30 min, 加入等体积的 Tris 饱和酚/氯仿/异戊醇 (体积比为 25:24:1) 抽提 1 次, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上层水相, 加 2/3 异丙醇 - 20 $^{\circ}$ C 作用 3 h 以上或过夜, 10 000 r/min 离心 10 min, 沉淀 DNA, TE 溶解, 储于 - 20 $^{\circ}$ C 备用。

1.5 PCR 方法的建立

采用 20 μ L 反应体系, 其组成包括: 10 $\times$ PCR 缓冲液, 2.5 mmol/L dNTP, 25 mmol/L MgCl₂, 16 pmol/ μ L 的上下游引物各 2 μ L, 模板 2 μ L, 加灭菌双蒸水至总体积为 20 μ L, 灭菌的石蜡油 20 μ L, 预变性后加入 1 U 的 TaqDNA 多聚酶, 进入 PCR 循环。PCR 结束后取 8 μ L 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外线灯下观察结果。

1.5.1 PCR 反应条件

PCR 循环参数的选择: 96 $^{\circ}$ C 预变性, 将预变性时间设为 300 s 和 600 s。循环变性温度设为 96 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 参考 TD-PCR 方法将退火温度分别设为 60 ~ 51 $^{\circ}$ C 梯度降落, 每降落 1 $^{\circ}$ C 进行 2 个循环, 然后从 50 $^{\circ}$ C/53 $^{\circ}$ C/55 $^{\circ}$ C/56 $^{\circ}$ C/58 $^{\circ}$ C 中选最佳退

* 收稿日期: 2003 - 04 - 29

基金项目: 广东省重点科技攻关资助项目 (1997 第 35 号)

作者简介: 刘忠华 (1970 年生), 硕士, 助理研究员。

火温度进行15循环;退火时间为60 s, 72 °C延伸, 将延伸时间分别设为60 s、90 s、120 s;将循环总次数分别设为20次、25次、30次、35次。最后72 °C延伸10 min。

1.5.2 PCR产物鉴定

(1) 内切酶 *Sac* II 消化: 将PCR扩增产物用等体积的Tris饱和酚/氯仿(体积比1:1)抽提, 12 000 r/min离心5 min, 水相加1/10体积的3 mmol/L NaAc (pH 5.2), 2倍体积无水乙醇沉淀DNA, 适量TE Buffer溶解备用。20 μ L酶消化反应液包含: 2 μ L 10 $\times$ Buffer, 5 μ L纯化的PCR产物, 1 μ L *Sac* II (华美公司产品), 0.1% BSA 2 μ L, 补水10 μ L。65 °C保温2 h, 反应完成后加1% 10 $\times$ Loadingbuffer终止反应。

(2) 电泳分析: 将PCR扩增产物和酶切产物在2%的琼脂糖凝胶上电泳, 紫外观察照相(温州市孚华分析仪器厂)。DNA标准相对分子质量为50 bp DNA Ladder (GeneRuler产品, 购自华美公司)。

1.5.3 敏感性和特异性鉴定 将100 μ L B病毒的细胞培养物(HA 1:5120)中抽提的DNA, 分别按1:20、1:50、1:100、1:150、1:200的比例稀释, 每个稀释度各取2 μ L分别作为模板, 按上面试验中选出的最佳条件进行PCR扩增, 并设标准阳性和阴性对照, 电泳观察扩增产物的结果。

用所设计的引物对SHBV、HSV-1和细小病毒进行扩增, 电泳观察扩增产物的结果。

2 结果

2.1 确定出PCR最佳反应条件

选择不同的预变性温度、变性温度、退火温度、延伸时间和循环次数进行PCR反应, 确定出最佳的反应条件。即扩增条件为96 °C预变性10 min;接着进入循环:96 °C变性60 s, 退火温度为60~51 °C梯度降落, 每降落1 °C进行2个循环, 然后55 °C退火温度进行15循环, 72 °C延伸60 s;最后, 72 °C延伸10 min。

2.2 PCR产物鉴定

根据设计的引物, 对B病毒和HSV-1进行PCR扩增, 结果产生了128 bp目的片段。

用内切酶 *Sac* II 对128 bp目的片段进行酶切, 理论上B病毒可得到72 bp和56 bp 2个片段, 而HSV-1不能得到酶切产物, 电泳结果如图1所示, 与理论值相符。证明SHBV扩增产物与设计的片段有相同的酶切位点。

2.3 敏感性和特异性测定结果

将模板DNA分别按1:20、1:50、1:100、1:

150、1:200的比例稀释, 在相同条件下, 用所设计引物进行PCR扩增, 结果显示PCR方法能检测出1%稀释的SHBV DNA, 用紫外分光光度计对1%稀释的SHBV DNA进行DNA浓度测定, 结果每 μ L 1%稀释的液体中所含DNA量约4 ng。亦即该PCR反应可检测出8 ng的SHBV DNA。用所设计的引物对SHBV、HSV-1和细小病毒进行扩增, 结果SHBV和HSV-1能产生128 bp片段的产物, 而细小病毒不能产生相应片段。

3 讨论

聚合酶链反应(PCR)是一种选择性体外扩增DNA的方法, PCR技术以其灵敏、特异、操作简便和快速等特点在生物学科各个领域得到广泛而迅速的发展, 特别在疾病诊断方面更是显示出其无可比拟的优越性。TD-PCR技术是一种优化PCR扩增的方法^[7], 它不象常规PCR反应需要许多次反应或许多反应管来确定最佳循环参数, 只要一个反应管或一小组反应管, 就能确保第一引物和模板杂交事件发生在最互补的反应物之间, 是一种潜在的一步法找到最佳扩增条件的方法。猴是我国具有优势与特色的大型实验动物之一, 它的质量标准化对生命科学研究, 医学及制药工业都有重要作用与意义。猴B病毒是唯一一种从非人灵长目动物中分离的人兽共患病原体。极易传染给人类引起破坏性神经感染, 迅速导致致死性脑炎。猴B病毒和HSV-1之间虽具有密切的抗原关系, 但毕竟是不同的病毒, 因而利用人的HSV-1抗原来检测猴B病毒在实践中经常出现假阴性或假阳性。从DNA水平上区分二者, 对B病毒进行特异鉴定, 将对建立无B病毒猴群起到重要作用, 也将能更好地保证实验动物的质量, 保证出口贸易及国内的迫切需要, 也将保证实验科技人员的生命安全。

B病毒全基因组迄今尚未全部测序, 只获得了部分序列, Harrington等^[2]通过限制性内切酶消化分析确定了B病毒基因组的物理图谱, B病毒基因组比HSV-1基因组稍大些, 大约为165 kb, G+C含量为75%, 与HSV-1一样, B病毒基因组由一个长独特区(UL)和一个短独特区(US)组成。在长独特区上, 完全测序的基因有糖蛋白基因(gp)C和B, 部分测序的基因有胸苷激酶基因(tk)。B病毒tk基因虽然只获得了部分序列, 但根据已获得的序列与HSV-1的UL23编码序列相比, 大部分仍很保守^[8]。在短独特区上, 完全测序的基因有糖蛋白G和J、10K, 部分测序的基因有gpD、US10, SHBV的糖蛋白G的核苷酸序列与HSV-1和非洲绿

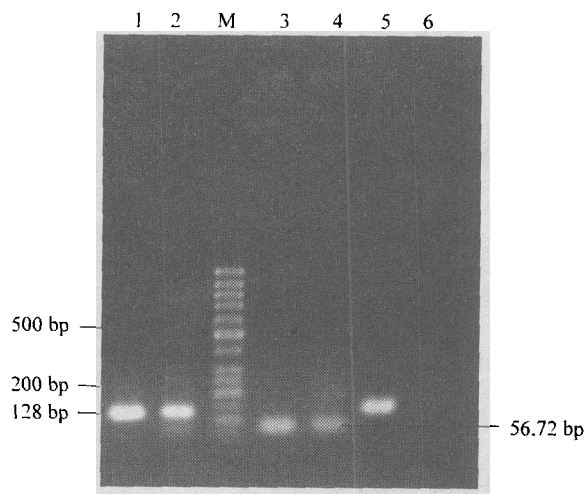


图1 TD-PCR 扩增结果和 *Sac* II 酶切电泳图

Fig.1 TD-PCR amplification products and products digested with *Sac* II

M: 50 bp DNA Ladder;

1, 2: SHBV 产物; 3, 4: SHBV 酶切产物;

5: HSV-1 产物; 6: HSV-1 酶切产物

猴疱疹病毒 (SA8) 的同源性不高, 具有病毒特异性抗原性^[9]。

在长独特区的保守区 gB 基因上设计了一对引物。实验结果显示此引物扩增 SHBV 和 HSV-1 产生相似大小的产物, 用内切酶 *Sac* II 消化 SHBV 的 PCR 产物, 能产生不同的片段, 而 HSV-1 不能产生酶切产物。由于 B 病毒对人的危害性极大, 而新药开发和医学科研的发展都迫切需要使用实验动物猴, 因此, 在准确诊断 B 病毒的同时, 也要加强预防, 目前没有有效的 B 病毒疫苗, 一般用无环鸟苷和二羟丙氧甲基鸟苷治疗 (患者要终身用药), 中断将会导致病毒活化, 排毒再次感染^[10]。

致谢: 感谢田克恭博士支持。

参考文献:

- [1] 田克恭. 实验动物病毒性疾病[M]. 北京: 农业出版社, 1992.
- [2] Harrington L. Molecular cloning and physical mapping of the genome of simian herpes B virus and comparison if genome organization with that of Herpes simplex virus type 1[J]. J Gen Virol, 1992, 73(Pt5):1217 - 1226.
- [3] Bzik D J, Fox B A, Deluca N A, et al. Nucleotide sequence specifying the glycoprotein gene-gB of herpes simplex virus type 1[J]. Virology, 1984, 133: 301 - 314.
- [4] Bennett A M, Harrington L, Kelly D C. Nucleotide sequence analysis of genes encoding glycoproteins D and J in simian herpes B virus[J]. J Gen Virol, 1992, 73:2963 - 2967.
- [5] Borchers K, Weigelt W, Buhk H J, et al. Conserved domains of glycoprotein B (gb) of the monkey virus, simian agent 8, identified by comparison with herpesvirus gBs [J]. J Gen Virol, 1991, 72:2299 - 2304.
- [6] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1995.
- [7] 黄培堂, 俞炜源, 陈添弥, 等. PCR 技术实验指南[M]. 北京: 科技出版社, 1998.
- [8] Eberle R. The simian herpesviruses[J]. Infect Agents Dis, 1995, 4(2):55 - 70.
- [9] Slomka M J, Harrington L, Arnold L, et al. Complete nucleotide sequence of the herpesvirus simian glycoprotein G gene and its expression as an immunogenic fusion protein in bacteria[J]. J Gen Virol, 1995, 76:2161 - 2168.
- [10] Holmes G P. B virus (*Herpesvirus simiae*) infection in humans: epidemiologic investigation of a cluster[J]. Ann Intern Med, 1990, 112(11):833 - 839.

Identification of *Herpesvirus simiae* (B virus) by TD-PCR and Restriction Enzyme

LIU Zhong-hua, HUANG Ren, ZHONG Ling

(Guangdong Laboratory Animal Monitoring Intituate, Guangzhou 510260, China)

Abstract: To develop a polymerase chain reaction (PCR) for detecting and distinguishing B virus from HSV-1. Suspected virus culture were detected for B virus DNA using TD-PCR method and the PCR products were examined by electrophoresis and restriction enzyme digestion. Result of PCR amplification of B virus and HSV-1 showed the same PCR products of 128 bp length, PCR products of B virus could be digested into two fragment (72 bp and 566 bp) by the restriction enzyme *Sac* II, but PCR product of HSV-1 couldn't produce that. TD-PCR method of B virus was developed successfully, and it could be an alternative technique for routine B virus diagnosis.

Key words: B virus; herpes simplex virus typel; polymerase chain reaction (PCR); restriction enzyme; touchdown PCR (TD-PCR)