

SHBV 的 PCR 检测方法的建立及其检测*

钟 翎¹, 田克恭²

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

摘 要: 以新分离的猴 B 病毒毒株为材料, 建立了一种 PCR 快速鉴定 SHBV 的方法, 并通过对 PCR 产物的限制性酶切分析可与 HSV-1 相区分, 并对这一新分离的 B 病毒毒株的克隆片段进行了序列分析.

关键词: 恒河猴; 猴 B 病毒; 人单纯疱疹病毒-1 型; PCR 检测

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 05-0100-03

恒河猴是目前我国出口的主要的实验动物, 也是广东省具有优势与特色的大型实验动物之一, 在新药尤其是新药研制中具有重要作用, 恒河猴的质量标准化对生命科学研究、医学及制药工业都具有重要的作用与意义. 猴疱疹病毒(simian herpes B virus, SHBV) 也称 B 病毒, 是恒河猴的一种 α -疱疹病毒^[1], 是惟一一种从非人类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.

目前国内的诊断方法仍然采用人单纯疱疹病毒(herpes simplex virus type 1, HSV-1) 作标准抗原建立的酶联免疫吸附试验和玻片免疫酶法, 由于 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. 实际上, SHBV 和 HSV-1 在 DNA 水平上是能区分的, 因此, 建立一种特异的 PCR 诊断技术, 就能在 DNA 水平上对 B 病毒进行快速鉴定, 对建立无 B 病毒猴群也将起到重要作用.

1 材料和方法

1.1 材 料

(1) 灭活 B 病毒: 实验用的 B 病毒是由北京军事医学科学院实验动物中心田克恭博士, 从猕猴口腔溃疡灶中分离得到.

(2) HSV-1 病毒: 由北京军事医学科学院实验动物中心惠赠.

1.2 方 法

1.2.1 病毒 DNA 的制备与纯化 采用 CTAB 法制备病毒 DNA. 取适量病毒抗原液于 1.5 mL 离

心管中 12 000 r/min 离心 2 min, 收集病毒粒子, 加入 500 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的 4 $\times$ CTAB ($w = 4\%$ CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 mol/L NaCl, 25mmol/L EDTA, pH 8.0, $\varphi = 0.2\%$ β -巯基乙醇), 65 $^{\circ}$ C 保温 30 min, 经等体积氯仿/异戊醇(24:1) 抽提, 12 000 r/min 离心 10 min, 水相加入 2 倍体积的无水乙醇, 12 000 r/min 离心 10 min, DNA 用 $\varphi = 70\%$ 乙醇洗 2 次, 晾干, 适量 TE 溶解. DNA 纯化采用 DPS 法 (Pharmacia 公司生产).

1.2.2 PCR 引物的设计与合成 通过 Internet 查找国际分子生物学数据库, 采用 DNASIS 软件对 SHBV 和 HSV 序列进行分析比较, 利用 DNASTar 设计特异的引物. 用于 PCR 检测 SHBV 和 HSV 的特异引物为位于糖蛋白 D 基因内的 DF1 (5'-GAACCCGTTCCAGACCCCCAG 3'), DR1 (5'-GATGCGCTGTTCTCGGGGATG 3'), 由美国 LTI 公司合成.

1.2.3 PCR 及其产物的酶切 50 μ L PCR 反应液中含有: 10 $\times$ Buffer, 0.2 mmol/L dNTPs (A, C, G, T), 15 mmol/L MgCl₂, 0.50 μ mol/L 引物对, 1 U Taq DNA 聚合酶 (购自广州华运公司).

PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min 之后, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 0.5 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5 min.

Kpn I 消化: PCR 产物用等体积的 Tris 饱和酚/氯仿 (体积比为 1:1) 抽提 1 次, 12 000 r/min 离心 5 min, 水相加 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2), 2 倍体积无水乙醇 cDNA 沉淀 DNA, 适量 TE Buffer 溶解备用. 10 μ L 酶消化反应液包含: 1 μ L 10 $\times$ Buffer, 5 μ L 纯化的 PCR 产物, 1

* 收稿日期: 2001-02-19; 作者简介: 钟翎 (1963-), 女, 副教授.

μL *Kpn* I (Takara 公司产品). 37 °C 保温 2~5 h, 终止反应.

PCR 产物和酶切产物在 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶上电泳, 紫外观察照相 (Kodak 凝胶成像系统). DNA 相对分子质量标准为 Takara Biotech 公司生产的 DNA MarkerDL 2 000.

1.2.4 临床检测 取 300 μL 灭活的 B 病毒抗原液加入等体积的 PBS (pH 7.4), 沸水中煮 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 分别以不同梯度的上清为模板 (5, 1, 0.5 μL) 做 PCR, 方法同前.

1.2.5 PCR 产物的克隆及序列分析 PCR 产物经 DEAE 纤维素膜回收纯化之后, 与 T-vector 室温连接 1 h (Promega 公司的 pGEM-T Easy Vector System), 转化 TG1, 阳性克隆 DNA 经限制性内切酶消化和 PCR 鉴定后, 进行序列测定 (上海基康生物有限公司测定), 采用 DNASIS 软件进行序列的同源性分析.

2 结果和讨论

2.1 SHBV DNA 的制备

由于 SHBV 属于一种人畜共患的烈性病毒, 其分离培养均须在 P3 实验室中进行. 因此得到的抗原液是经脱氧胆酸钠处理的灭活液, 从而对 DNA 的提取造成极强的干扰, 经过反复摸索, 我们总结出一套制备 B 病毒 DNA 的有效方法, 改良的 CTAB 法, 结合 DPS 纯化, 获得了较好的效果.

2.2 SHBV 的 PCR 检测

SHBV 和 HSV-1 具有明显的抗原交叉反应, 早期的诊断是通过它们相近的血清关系而进行的, 因而用血清学方法很难将二者区分^[2~5]. 近年来有人采用 PCR 的方法检测 B 病毒, 但必须配合寡核苷酸探针的杂交实验才能实现^[6].

通过计算机分析, 在 B 病毒的 HSV-1 同源基因糖蛋白 D (glycoprotein D, gD) 基因内设计了一对引物 DF1 和 DR1, 经 PCR 扩增 B 病毒和 HSV-1 分别可得到 559 bp 和 560 bp 的产物, 在 B 病毒序列内有一个 *Kpn* I 限制性位点, 经消化, B 病毒的 PCR 产物可被切成 170 bp 和 391 bp 两个片段, 而 HSV-1 的 PCR 产物不能被 *Kpn* I 消化 (图 1, 图 3). 这一结果表明, 利用特异性引物 DF1/DR1 进行 PCR 扩增, 结合 PCR 产物的限制性内切酶消化, 能够检测 B 病毒和 HSV-1 并将

二者区分, 达到快速诊断的目的.

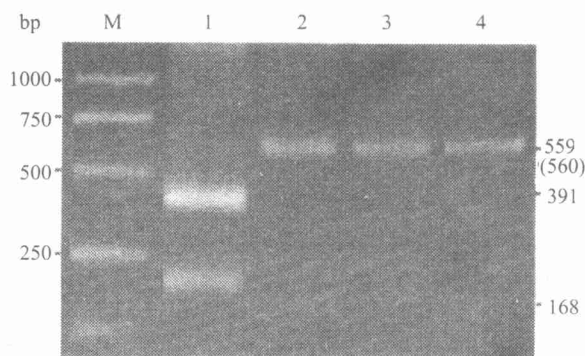


图 1 SHBV 和 HSV-1 DNA 的 PCR 扩增产物及其 *Kpn* I 酶切的电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis patterns of PCR products and their digestion with *Kpn* I of SHBV and HSV-1 DNA 引物 DF1/DR1; M DNA 相对分子质量标准;

- 1 SHBV DNA PCR 产物 *Kpn* I 消化;
- 2 HSV-1 DNA PCR 产物 *Kpn* I 消化;
- 3 SHBV DNA PCR 产物;
- 4 HSV-1 DNA PCR 产物

2.3 PCR 检测在临床中应用的预测

采用煮沸法对 B 病毒抗原液进行 PCR 检测, 结果表明, 在试验的几个样品浓度梯度中, 5 μL 和 1 μL 均可扩增出 559 bp 的产物, 也就是说最少至 0.5 μL 抗原液即可检出 B 病毒 (图 2).

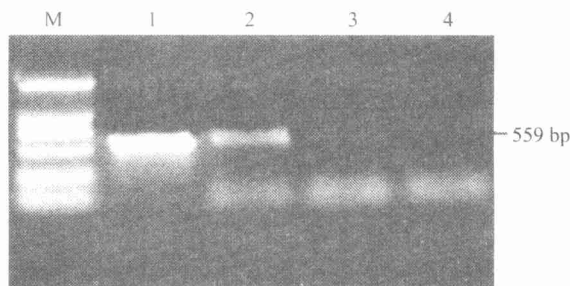


图 2 B 病毒抗原液的 PCR 检测的电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis pattern of PCR detection of B virus 引物 DF1/DR1; M DNA 相对分子质量标准;

- 1 正对照, 以质粒 pBV01 DNA 为模板的 PCR;
- 2 2.5 μL B 病毒抗原液; 3 0.5 μL B 病毒抗原液;
- 4 0.25 μL B 病毒抗原液;
- 5 负对照, 以水为模板的 PCR

这一结果暗示 PCR 方法的灵敏度应足以检出猴群病料中的 B 病毒; 同时, 还试验了几种病毒 DNA 混合模板, 用引物 DF1/DR1 进行 PCR, 结果显示, 只有在 B 病毒 DNA 存在的情况下才能扩增出 559 bp 的产物 (结果未显示), 表明该对用于检测 B 病毒的 PCR 引物 DF1/DR1 具有其特异性和专一性. 我们将在感染 B 病毒的恒河猴上取样 (包括唾液、血液、粪便), 进行 PCR 检测, 并进一步将此方法应用于实验猴的常规检测

之中。

2.4 新分离的 B 病毒部分核苷酸序列的分析

用于实验的 B 病毒, 是由北京军事医学科学院实验动物中心田克恭博士, 从外形健康的老龄恒河猴口腔病灶中分离培养得到的, 这在亚洲尚属首例。我们将上述 PCR 产物进一步克隆到

载体上, 并进行了序列测定 (该序列已输入 GenBank, 收录号为 AF285961), 利用 DANsis 软件与 GenBank 中的 B 病毒和 HSV-1 序列进行了同源性比较 (图 3), 结果表明, 新分离到的 B 病毒克隆片段与发表的序列同源性为 97%, 与 HSV-1 同源基因的同源性为 94.7%。

	DFI	
BVOI	AGAACCCGTT CCAGACCCCG AGCGTCCCG TCGCGTGTA CTACGCCGTG CTGGAGCGCG CCTGCCGCG	CGTCTCTCTC 80
GenBank	-----G-----	1220
HSV-1	C-G-----C-----C-----GA--A-G-T-----T-----G-----A	138710
	TGGGCGCGCA CGGAGGCGGT CCAGGTCGTG CGGGGAGCCC CCGAGGCGAC GCGGCCGAC GC*GCGCTAC AACCTCACCG	159
	-----A-----T-----*-----	1299
	AAC--A--T-----CCC--A-T--C--C--G--T-----*--G--A--T-----A--AA-C-----G-----A	138786
	KpnI	
	TGGCCTGGTA CCGCAGCAGC GACGACTCGC CCATCCCGAT CCTCGTCATG GAGTACGCCG AGTGCCCGTA CGACCGGCCC	239
	-----A-----AA-----	1369
	-C--T--T--G-T-G-A--G-A--T--T--C--ACG-----A-----A--T-C--A--AA-T-T	138866
	CTGGGCGCCT G*CCCGTCCG CAACCTGCCG CGCTGGAGCT TCTACGACAA CTTGCGCGCC ACGAGCGACG ACGACCTGGG	318
	-----C-----G-----A-----G-----	1459
	-----G-----T-----A-----A-CG-A-----A-----A-----G-----GTC-----G--TA-----	138946
	CCTCGTCATG CACGCGCCCG CCTTCGAGAC CGCGGGGACC TACGTGCGCC TGGTGAAGGT CAACGGGTGG GTGGAGGTCA	398
	-----C-----A-----	1539
	GT--C-G--C-----G--T-----C--C--G--C--G--C-----A--A--AC--AC--A-T	139026
	CGCAGTTCAT CTTGAGCAC CGCGGCAAGG GCCCTGTGCG GTACACGCTT CCGCTGCGCA TCCTCCCCGC GGCCTGCCTC	478
	-----A-----	1619
	-A-----T--C-G-----A-C-----T-----AA--G-C--C-----C--GT--A-----	139106
	DR1	
	CGCGGCGCCG TCTTCGAGCA GGGCGTGACG GTGGACGCA TCGGCATGCT CCCCCGGTTC ATCCCCGAGA ACCTGCGCAT	C 559
	-----C-----A-----C-----G-----G-----A-----	1640
	TC-CC--A--C--A-C-----G-----A-----G-----G-----C-----A-----C--	139187

图 3 SHBV 克隆片段与 GenBank 中的 B 病毒序列 (S48101) 及 HSV-1 (X14112) 同源序列的比较

Fig.3 Sequence alignment of cloned SHBV segment (AF285961) and B virus from GenBank (S48101) and HSV-1 (X14112)

- 表示相同的碱基; * 表示缺失

参考文献:

- [1] ROIZMAN B, DESROSIERS R C, FLECKENSTEIN B, et al. The family herpesviridae: an update [J]. Arch Virol, 1992, 123: 425 - 449.
- [2] Centers for Disease Control. B virus infection in humans Pensacola, Florida [J]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 1987, 36: 289 - 290; 295 - 296.
- [3] Centers for Diseases Control. B virus infection in humans Michigan [J]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 1989, 38: 453 - 454.
- [4] van HOOSIER G L, MELNICK J L. Neutralising antibodies in human sera to herpes virus simiae [J]. Texas Reports in Biology and Medicine, 1961, 19: 365 - 380.
- [5] AEDA Y, TAGAYA I, SHIROKI S. Immunological relationship between herpes simplex virus and B virus [J]. J Experimental Medicine, 1968, 59: 115 - 135.
- [6] SLOMKA M J, BROWN D W G, CLEWLEY J P, et al. Polymerase chain reaction for detection of herpesvirus simiae (B virus) in clinical specimens [J]. Arch Virol, 1993, 131: 89 - 99.

PCR Identification of SHBV and Its Detection

ZHONG Ling¹, TIAN Ke-gong²

(1. School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. Lab Animal Center, Academy of Military Medicine Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: A method for quickly identification of SHBV by PCR with recent separated SHBV strain is established. SHBV and HSV-1 can be differentiated from each other by restrict enzyme analysis of PCR products. It play important role that this method was established for quality standardization of lab animal and establishment of non-virus rhesus group. The cloned segment of the recent separated B virus strain is sequenced and compared with HSV-1 and database from Genbank.

Keywords: rhesus; SHBV; HSV-1; PCR detection