

## 疱疹病毒定量 PCR 的建立\*

左 丽      袁 静\*\*      郭辉玉\*\*\*

(贵阳医学院免疫学教研室 贵阳 550004)

关键词 疱疹病毒, PCR

分类号 R373

随着分子生物学研究的不断深入,常规 PCR 对病毒基因的定性检测已不能满足探索病毒感染与临床疾病发生和发展之间的关系,以及临床对抗病毒药物的选择和疗效的监测,竞争 PCR 提供了这一技术<sup>[1]</sup>。目前,国内外定量 PCR 的报道,都需要体外构建突变模板作为内参标准。突变模板的设计和制备繁琐,且因是人工构建,结构较野生型模板简单,易出现竞争优势,以致影响可靠性<sup>[2]</sup>。本研究利用疱疹病毒科病毒 DNA 多聚酶高保守区的一对引物,同时扩增巨细胞病毒 (CMV) 和 I 型单纯疱疹病毒 (HSV<sub>1</sub>) DNA,通过琼脂糖电泳对扩增产物加以区别,满足了竞争模板的基本要求<sup>[3]</sup>。建立了对疱疹病毒的定量 PCR 法,并对无环鸟苷 (ACV) 对 HSV<sub>1</sub> 的抑制作用进行了考察。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 毒株: CMV (AD169) 和 HSV<sub>1</sub> (SM<sub>44</sub>) 为本室保存。

1.1.2 引物: 按参考文献 [4] 发表的序列,扩增序列位于疱疹病毒科病毒 DNA 多聚酶基因区。HSV<sub>1</sub> 扩增片段为 518bp, CMV 扩增片段为 589bp, 委托中山医科大学遗传室合成。

1.1.3 试剂和药物: Taq DNA 聚合酶、dNTP、蛋白酶 K、限制性内切酶等购于广州天象人生物工程有限公司; 无环鸟苷 (ACV) 购于湖北省化学工业公司; 其它为国产分析纯试剂。

#### 1.2 方法

1.2.1 病毒 DNA 提取: 取 CMV 或 HSV<sub>1</sub> 400 $\mu$ l 加入等量病毒裂解液 (0.2mol / L Tris · HCl pH7.5, 25mmol / L EDTA, 0.3mmol / L NaCl, 2%SDS 和 400 $\mu$ g / ml 蛋白酶 K), 56 $^{\circ}$ C 4h。常规酚·氯仿·异戊醇抽提。溶于无菌三蒸水中, -30 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增: 反应体积为 50 $\mu$ l, 常规加入 Taq DNA 聚合酶 Buffer、dNTP、引物、病毒模板, 无菌三蒸水补足体积。混匀后 94 $^{\circ}$ C 变性 7min, 72 $^{\circ}$ C 加入 Taq DNA 聚合酶 1.5u, 30 $\mu$ l 无菌石蜡油封顶; 三孔三温电热恒温水槽手工进行 PCR 循环: 94 $^{\circ}$ C 60S, 58 $^{\circ}$ C 60S, 72 $^{\circ}$ C 90S, 循环 30 次, 末次 72 $^{\circ}$ C 7min, 每次实验设阳、阴性对照。

\* 本课题由贵州省科委基金资助。

\*\* 贵阳医学院临床医学系 93 级学生。

\*\*\* 中山医科大学微生物学教研室。

收稿日期: 1997-06-11

**1.2.3 PCR产物检测:** 取 PCR 产物 10 $\mu$ l 置 1.0% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭 0.5 $\mu$ g / ml) 电泳, 电流 40mA, 电压 5V / cm, 电泳缓冲液 0.5  $\times$  TBE, 40min。紫外透射仪观察结果, 电泳时设 DNA 分子量标准对照。

**1.2.4 CMV 竞争模板的纯化:** 取 10 $\mu$ l CMV PCR 产物, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 得 589bp DNA 带。用 0.5% 低熔点琼脂糖 (LMA) 回收此带, 紫外透射仪观察下切含 589bp LMA 凝胶带。加约 5 倍体积的 20mmol / L Tris · Cl (pH8.0)、1mmol / L EDTA (pH8.0), 65 $^{\circ}$ C 5min 以熔化凝胶。经酚 · 氯仿抽提, 醋酸钠 · 乙醇沉淀, 无菌三蒸水溶解, 得纯化 PCR 产物。取 2 $\mu$ l 纯化 PCR 产物作模板, 按前法再次进行 PCR 扩增, 鉴定后紫外分光光度计准确定量, -30 $^{\circ}$ C 备用。

**1.2.5 敏感性实验:** 将已定量的竞争模板或待测模板分别作 10 倍梯度稀释后进行 PCR 扩增。

**1.2.6 竞争 PCR 反应:** 将竞争模板 (CMV) 和待测模板 (HSV<sub>1</sub>) 按不同比例混合进行 PCR, 观察其经 1.0% 琼脂糖凝胶 (含溴乙锭) 电泳后的泳带荧光强度比例。以上实验均分别重复 2 次以上。

**1.2.7 特异性鉴定:** 将 PCR 产物与 DNA 分子量标准比较, 观察是否符合目的片段扩增产物片段大小, 并用 SmaI 作酶切鉴定。

**1.2.8 考察 ACV 对 HSV<sub>1</sub> 的抑制作用:** 将 ACV 作倍比稀释后分别与等量 200TCID<sub>50</sub> HSV<sub>1</sub> 混合, 37 $^{\circ}$ C 2h; 接种 Hep-2 单层细胞, 24h 常规收集病毒, 提取 DNA, 与竞争模板混合作 PCR 扩增, 设阳、阴性对照。

## 2 结果

### 2.1 敏感性

实验结果表明, 可检出 1fg 纯化 CMV DNA (图 1) 和 1.5fg HSV<sub>1</sub> DNA。

### 2.2 特异性

将 CMV 或 HSV<sub>1</sub> PCR 产物与 DNA 分子量标准对照比较, 长度分别约 589bp 或 518bp; 用 SmaI 酶切, CMV 不被酶切, HSV<sub>1</sub> 被切为 442bp 和 76bp (图 2)。

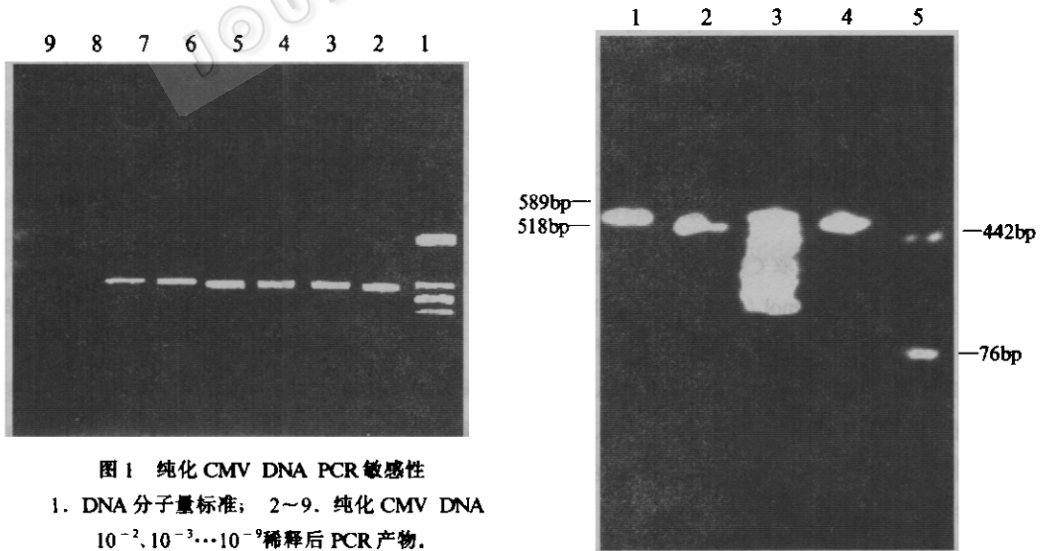


图 1 纯化 CMV DNA PCR 敏感性

1. DNA 分子量标准; 2~9. 纯化 CMV DNA  
10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>...10<sup>-9</sup> 稀释后 PCR 产物。

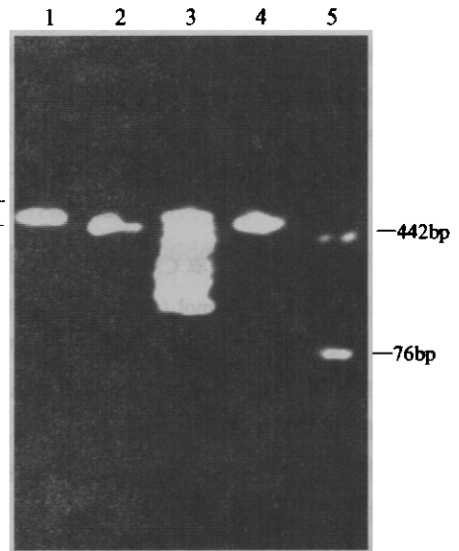


图 2 CMV、HSV<sub>1</sub> DNA PCR 产物及其酶切产物

1, 2. CMV、HSV<sub>1</sub> PCR 产物; 3. DNA 分子量标准;  
4, 5. CMV、HSV<sub>1</sub> PCR 产物被 SmaI 酶切。

### 2.3 竞争 PCR

把竞争和待测模板按不同比例混合后在同一管内作 PCR 扩增, 竞争扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶带上荧光强度相等时(图 3), 两种模板(CMV:HSV<sub>1</sub>)比例为 1.5:1。

### 2.4 ACV 对 HSV<sub>1</sub> 的抑制作用

结果显示, 随 ACV 浓度增高, HSV<sub>1</sub> 扩增产物电泳条带荧光强度逐渐减弱, 而竞争模板 PCR 产物荧光强度逐渐增强。证明随 ACV 浓度增高, HSV<sub>1</sub> DNA 逐渐减少, 当 ACV 为 0.843mg/ml 及其以下时, 不再显示其抗 HSV<sub>1</sub> 作用。

## 3 讨论

常规 PCR 法扩增产物量不仅与靶序列初始量有关, 还与反应体系中各试剂浓度、温度, 甚至与各反应管在热循环仪中的位置都有密切关系<sup>[5]</sup>。竞争 PCR 吸收了常规 PCR 高灵敏度和特异性的优点, 尽量减少对扩增效率有影响的固有因素。利用已知量的竞争模板与靶序列用同一对引物,

在同一反应管中进行竞争扩增, 并比较一系列已知量的竞争模板与靶序列的竞争扩增结果。在扩增效率一致的前提下, 必然获得与竞争模板一致的靶序列量<sup>[6]</sup>。竞争 PCR 成功的关键之一是要求竞争模板必须能与靶序列平等竞争引物, 避免出现竞争优势。而竞争模板如系体外构建, 结构较靶序列简单, 易出现竞争优势, 使靶序列不扩增或低效率扩增。而且体外构建突变模板, 设计策略和制备步骤都很复杂, 还具有许多不尽人之处, 从而限制了竞争 PCR 的应用<sup>[2]</sup>。

本研究利用通用引物, 将野生型 CMV 提取 DNA 后加以纯化, 制备竞争模板。将 HSV<sub>1</sub> 作为待测靶序列, 两者扩增产物仅相差 69bp, 扩增效率几乎一致。此法不用构建突变模板, 操作简单, 并有良好的敏感性、特异性和稳定性。目前, 尚未见同类报道。如推广应用, 将为疱疹病毒基因定量检测提供有力的手段, 在基础研究和临床应用中具有重大意义。

## 参 考 文 献

- [1] Lundeberg J, Wahlberg J, Vhlen M. *Biotechniques*, 1991, 10(1):68~75.
- [2] Francesco S C, Michael E Z, Alan R S et al. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(4):1047~1050.
- [3] Volkenandt M, Dicker A P, Banerjee D et al. *Proc Soc Exp Biol Med*, 200: 1~6.
- [4] Rozenderg F, Lebon P. *J Clin Microbiol*, 1991, 29(11): 2412~2417.
- [5] Brillanti S, Garson J A, Tuke P W et al. *T Med Virol*, 1991, 34:136~141.
- [6] Wang A M, Doyle M V, Mark D F et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(24): 9717~9721.

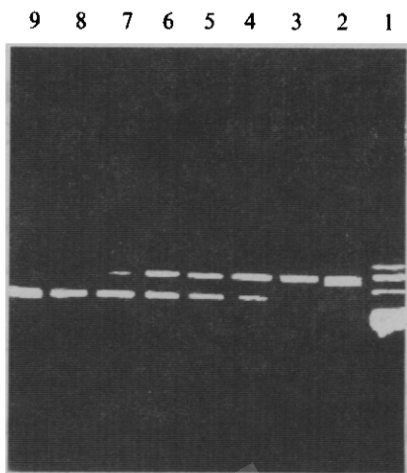


图 3 两种模板竞争 PCR 结果

1. DNA 分子量标准; 2~9. 竞争模板与靶序列按不同比例混合后的 PCR 产物。  
(其中 5,6 竞争模板:靶序列 = 1.5:1)

## THE EXPERIMENTAL STUDY ON COMPETITIVE PCR FOR QUANTITATION OF HERPESVIRUSES

Zuo Li Yuan Jing Guo Huiyu

(Department of Immunology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004)

**Abstract** A single pair of oligonucleotide primer selected within a highly conserved region of the DNA polymerase gene in herpesviruses was synthesized. The competitive template DNA purified from cytomegalovirus (CMV) DNA was used to carry out competitive PCR amplification with herpes simplex virus type 1 (HSV<sub>1</sub>) DNA (target sequences). And anti-HSV<sub>1</sub> effects of acyclovir (ACV) was investigated by the method. The results showed that the efficacy of PCR amplification was equal to each other (the ratio of the quantity of competitor template with DNA to the target sequence was 1.5:1). As the concentration of ACV was increased, the quantity of HSV<sub>1</sub> DNA was decreased. It suggests that this method is practicable and some defects of mutant template can be overcome.

**Key words** Herpesvirus, PCR

### 一九九八年中国微生物学会学术会议计划

会 议 名 称	时 间	地 点	筹 备 单 位	联 系 人
第二次全国发酵工程学术讨论会	5月	无锡	无锡轻工业大学生物工程学院	诸葛健
第三届全国弓形虫病学术研讨会	5月	北京	北京热带病研究所	甘绍伯
第四届中日国际真菌学会议	7月	珠海	北京医科大学第一医院	李若瑜
首届全国生物毒素研讨会	8月	大连	中国预防医科院营养与食品所	刘秀梅
第四届全国病毒学学术会议	8月	香港	军事医科院五所	朱关福
微生物学普及教育研讨会	8月	武汉	武汉大学生命科学学院	彭珍荣
全国酿酒新技术、新成果学术研讨会	9月	宜昌	中国食品发酵工业研究所	朱庆裴
第五届中日国际酶工程会议	10月	昆明	中科院微生物所	黎高翔
第七届全国杀虫微生物学术讨论会	10月	武汉	华中农业大学生命科技学院	喻子牛
第六次全国干扰素及细胞因子治疗肝炎临床研讨会	10月	太原	第二军医大学微生物教研室	范中善
全国立克次体钩体支原体衣原体学术讨论会	10月	佛山	中国预防医学科学院流行病所	张健之
第三届全国分析生物学暨第七届分析微生物学学术讨论会	10月	厦门	军事医科院五所	周 方
中国微生物学会七届二次理事会	11月	石家庄	中国微生物学会办公室	