维普资讯 http://www.cqvip.com

324-328

第6卷第4期 1991年12月
中国病毒学 VIROLOGICA SINICA
Vol.6 No.4 Dec. 1991

利用 PCR 法检测 HIV-1 DNA

宋海峰 郭莉莉 孙中和 朱关福

（军事医学科学院微生物流行病研究所，北京100850）

提 要

通过比较多个 HIV（人免疫缺陷病毒）分离株的核苷酸序列，我们选择膜基因上7373—7514 位的一段保守区为目的片段合成了引物 1（5'—AGCAGCAGGAAGCACTATGGGC—3'）和引物 2（5'—CCAGACTGTGAGTTGCAACA—3'），并分别以质粒 PⅢexE7 和 MT4-HIV-1 DNA 为模板进行了 PCR 反应及敏感性试验。结果表明，用 PCR 法可检测出 1～10个质粒分子及 1×10^6 个细胞中一个感染细胞。因此我们推论，本法可应用于 AIDS 临床标本的检测。

关键词：PCR HIV-1 DNA 检测

自1985年 Saiki RK 等[1]首次建立了多聚酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）以来，PCR技术在许多方面，尤其是病毒学研究及病毒性疾病的诊断中得到了广泛的应用[2,3,4]。至今，国外已有许多学者应用 PCR 法检测 HIV 的前病毒 DNA 并得到了理想结果[5,6,7]。由于 AIDS 病已经传入我国，我们试图建立快速、敏感的 HIV 感染诊断方法，以便及时发现和控制 AIDS。本文报道我们建立的 PCR 技术检测细胞中 HIV前病毒 DNA 的方法。

材 料 与 方 法

1. **模板**：质粒 PⅢexE7（此质粒含有HIV 5'-及3'-LTR，art 基因及 env 基因）和感染有HIV-1的MT4细胞DNA。

2. **引物**：引物1（5'-7373-AGCAGCAGGAAGCACTATGGGC-7394-3'）和引物 2（5'-CCAGACTGTGAGTTGCAAGA-3'，此序列为 7495～7514 之间核苷酸片段的反义互补序列）由本院生物工程研究所合成，二者相隔142bp，距5'端50bp处有一HaeⅢ酶切位点。

3. **PCR反应试剂**：TaqDNA多聚酶为Bio-lab公司产品，2.5u/μl；dNTP购自华美试剂公司。

4. **PCR反应**[1]：各种试剂按下列量加至0.5ml Eppendorf 管中：无菌双蒸水53μl，10倍反应缓冲液10μl，dNTP混合物（每种dNTP1.25mmol/L16μl，引物1(10μmol/L)5μl，引物2(10μmol/L)5μl，模板DNA 10μl，总量为99μl。上述反应混合液于PE公司产的PCR反应仪中95℃变性10分钟，56℃退火1分钟，每管加入1μl(2.5u)的 Taq DNA 多聚酶，轻轻覆盖50μl石蜡油，按下列条件进行PCR 反应30个循环：95℃变性1分钟→56°C退火1分钟→72℃延伸1分30秒，最后一个循环后继续

本文于1991年1月14日收到，3月15日修回。

维普资讯 http://www.cqvip.com

在72℃延伸7分钟。

5. **产物的鉴定：**

（1）琼脂糖凝胶电泳：反应产物于3%琼脂糖凝胶上电泳确定反应产物的大小。

（2）内切酶反应：反应产物经酒精沉淀后溶于缓冲液中，加入HaeⅢ内切酶，37℃下作用2小时，然后于3%琼脂糖凝胶上电泳。

（3）杂交试验：将PCR产物在硝酸纤维素膜上点样，以α-^{32}P标记的来源于质粒PⅢexE7上的HIV SalⅠ-XhoI片段为探针杂交过夜，X-光片自显影。

6. **敏感性试验：**

（1）以质粒为模板的PCR敏感性：将质粒DNA从1μg连续10倍稀释至10^{-5}pg，分别以不同量的质粒为模板进行PCR反应。

（2）以HIV感染细胞DNA为模板的PCR敏感性：用正常细胞依次10倍稀释受感染细胞，分别提取其DNA，取相当于1×10^{6}细胞的DNA为模板进行PCR反应。

反应产物分别通过琼脂糖电泳和斑点杂交进行鉴定。

结　果

PCR反应产物经琼脂糖凝胶电泳后，确定其大小为142bp（图1），经HaeⅢ酶切产生了50bp和92bp两个核苷酸片段（图2）。PCR反应产物与α-^{32}P标记的PⅢexE7上的HIV膜基因片段杂交也得到了阳性结果，而以对照DNA（质粒pSV2-gpt及MT4-DNA）为模板进行的PCR反应得到的则是阴性结果（图5）。

在PCR敏感性试验中，首先将质粒pⅢexE7从1μg连续10倍稀释到10^{-5}pg，然后以每一稀释度的DNA为模板进行PCR反应，反应产物进行琼脂糖凝胶电泳（图3）及斑点杂交（图5）。结果表明，以10^{-5}pg质粒DNA（相当于1～10个DNA分子）为模板的PCR反应产物可经琼脂糖凝胶电泳和斑点杂交检测出来。同样，我们以MT4-HIV-1 DNA为模板进行了PCR敏感性试验。用正常MT4细胞稀释感染细胞，分别提取DNA，每个PCR反应约用1×10^{4}细胞的DNA进行，对反应产物分别进行电泳（图4）和斑点杂交（图5）。结果表明，用PCR法可以测出每1×10^{6}个细胞中的1个感染细胞。

讨　论

PCR用于HIV检测的意义在于它的高度敏感性及对整合态HIV前病毒DNA的检测。HIV感染人体后有部分受感染者体内并不存在复制型的病毒及特异性抗体，也不出现任何异常表现，这些人若出现在献血员、同性恋者或吸毒群体中就会隐秘迅速地传播艾滋病，PCR法是目前能够检测出这些潜伏性感染的唯一有效的办法。

我们比较了多株HIV膜基因的核苷酸序列，选择7373～7514bp一段保守区域为目的片段进行PCR反应。实验结果表明，以质粒pⅢexE7及MT4-HIV-1 DNA为模板的PCR反应为阳性，扩增出一条142bp的目的基因片段（图1），并可被HaeⅢ酶特异性切割成50bp和92bp两个片段（图2），而以对照DNA（pSV2-gpt及MT4细胞DNA）为

维普资讯 http://www.cqvip.com

模板的PCR反应则为阴性结果，由此而证明了实验的特异性。

敏感性实验结果表明，以1～10个质粒DNA分子为模板进行PCR反应即可得到阳性结果，这与国外的有关报道一致。在以病毒感染细胞为模板的PCR敏感性实验中，我们用PCR法检测出了1×10^{7}个细胞中的一个感染细胞。Folks等报道艾滋病人血液中约有万分之一至十万分之一的淋巴细胞受到HIV感染，从我们的结果来看，应用PCR法可以直接检测艾滋病人淋巴细胞中HIV的存在。

Lo等于1988年报道了PCR出现假阳性的情况[9]，我们在实验中也发现了这种假象，即阴性模板对照出现了PCR阳性结果。多方面查找原因后发现是由于我们在操作中不慎，使反应缓冲液中混入了阳性模板所致。PCR实验可以检测到1个模板分子的存在，甚至测出两个不完整但有部分重叠的分子，其高度敏感性使得由于标本污染而出现假阳性的情况非常容易发生。所以，应严格实验操作，尽可能在不同操作场所内进行对照和标本模板提取、PCR反应、产物鉴定等操作，同时还应该考虑吸头，试管、水，气溶胶等污染问题。

目前我们已建立了应用PCR技术检测细胞中HIV DNA的基本方法，希望能够通过多种途径获得有关标本，进行有关HIV DNA检测，以证实此方法的实用性，并使之尽快地用于临床标本的检测。

图1 PCR产物大小的确定

Fig 1 Agarose electrophoresis of PCR products

A and C: PCR products

B and D: DNA MW markers

图2 PCR产物的HaeⅢ内切酶消切图谱

Fig 2 Agarose electrophoresis of PCR products digested with restriction endonuclease HaeⅢ A, B: PCR products (142bp), D: primer (22bp) C: HaeⅢ-digested fragments of PCR product (50bp and 92bp).

维普资讯 http://www.cqvip.com

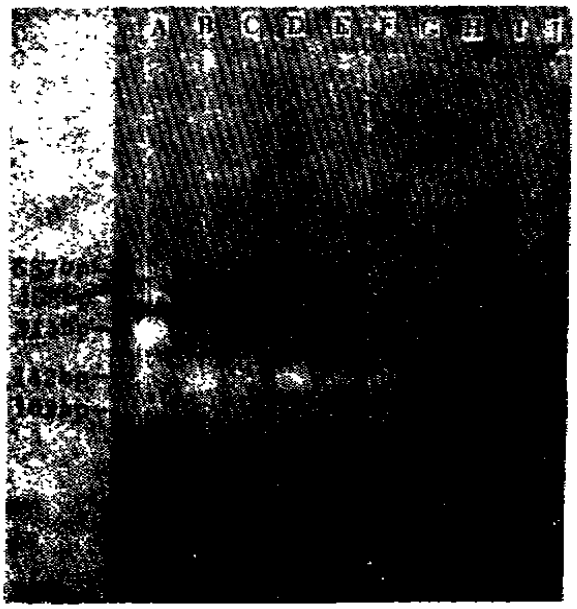

图3　以不同量质粒DNA为模板的PCR产物电泳图谱

Fig 3　Electrophoretogram of PCR products with different quantities of plasmid DNA as templates on agarose gel (B: 100pg, C: 10pg, D: 1 pg, E: 10^{-1}pg, F: 10^{-2}pg, G: 10^{-3}pg, H: 10^{-4}pg, I: 10^{-5}pg). J: plasmid pSV2-gpt control.

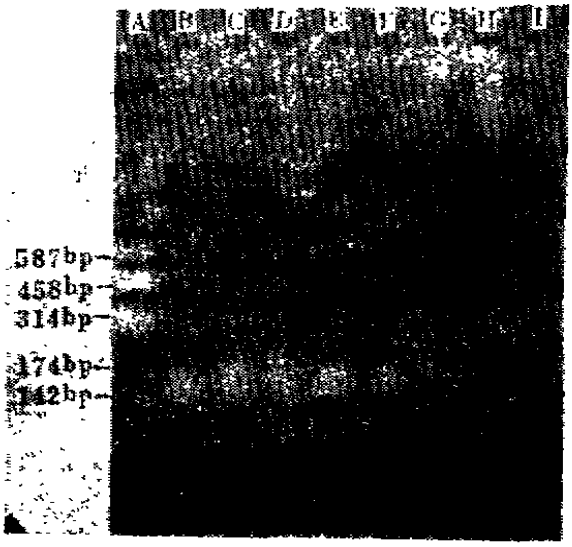

图4　以细胞DNA为模板的PCR敏感性的琼脂糖电泳图谱

Fig 4　Sensitivity of PCR with cell DNA as templates on agarose gel

B—H are PCR products with DNA templates of 10^7, 10^6, …, 10^1 HIV infected MT4 cells in 10^7 MT4 cells, I: normal MT4 cell DNA control.

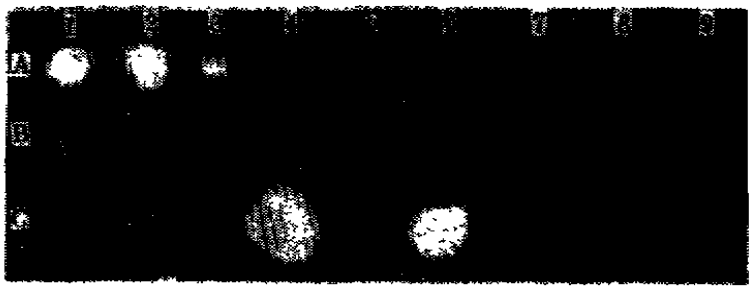

图5　PCR产物的斑点杂交结果

A排为不同稀释度的质粒DNA的PCR结果，A1-A9：1ng，100pg，……，10^{-8}pg，B排为不同稀释度的细胞MT4-HIV DNA的PCR结果，稀释度以每10^7细胞中所含的感染细胞的计算。B1-B7：10^7，10^6，……，10^1，B8为正常MT4 DNA对照，B9为质粒pSV2-gpt对照，C1和C2是以不同稀释度的H9-HIV DNA为模板的PCR产物。C3，C4和C6分别为引物、M13mp18-HIV和pIIIexE7杂交对照。

Fig 5　Dot hybridization of PCR products

A1～A9 are PCR products with 1ng, 100pg, …, 10^{-8}pg of plasmid pIIIexE7 DNA templates, respectively. B1～B7 are PCR products with 10^7, 10^6, …, 10^1 HIV-infected MT4 cell DNA as templates in 10^7 MT4 cell. B8 and B9 are PCR products of normal MT4 cell DNAs and plasmid pSV2-gpt DNAs. C1 and C2 are PCR products of HIV-infected H9 cell DNAs. C3, C4 and C6 are primer, M13mp18-HIV, and pIIIexE7 hybridization control.

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

〔1〕 Saiki, R.K.et al., 1985, *Science* 230 : 1350.
〔2〕 Duggan, D B.et al., 1988, *Blood* 71 : 1027.
〔3〕 Larzul, D.et al., 1988, *J.Virol.Methods* 20 : 227.
〔4〕 Shibata, D.et al., 1988, *J.Infect. Dis.*, 158 : 1185.
〔5〕 Ou, C.Y.et al., 1988, *Science* 239 : 295.
〔6〕 DeRossi, A.et al., 1988, *Lancet* 11 : 278.
〔7〕 Loche, M.and Mach, B., 1988, *Lancet* 11 : 418.
〔8〕 William, F.et al., 1989, *J.Virol Methods* 23 : 277.
〔9〕 Lo, Y.M.D.et al., 1988, *Lancet* 11 : 679.

Detection of HIV-1 DNA by PCR

Song Hai-feng Guo Li-li Sun Zhong-he Zhu Guan-fu

(*Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing*, 100850)

A single pair of oligonucleotide primers within the envelope gene of HIV-1(primer 1, 5′-AGCAGCAGGAAGCACTATGGGC-3′; primer 2, 5′-CCAGACTGAGTTGCAACA-3′), 142bp apart, were synthesized and used to amplify a specific fragment of the HIV-1 DNA in infected cell cultures(MT4 HIV 1), and in plasmid pⅢexE7 carrying HIV-1 envelope gene by means of polymerase chain reaction (PCR). Amplified product was identified as 142bp fragment by agrose electrophoresis and cut into a 50bp and a 92bp fragment with restriction endonuclease HaeⅢ. Hybridization was carried out with α-^{32}P labeled gene fragment corresponding to the relevent region of the HIV-1 genome. All the experimental results showed that the amplified product was the faithful copy of the envelope gene sequence. 10^{-5}pg of plasmid DNA (about 1—10 plasmid molecules) and one infected cell in 10^{5} cells could be detected by this method. From this data, we conclude that PCR is a specific, sensitive and quantitative assay.

Key words: HIV-1 DNA Detection PCR