206—212 艾滋病毒；聚合酶链反应；DNA 120/8(5) 维普资讯 http://www.cqvip.com

第9卷 第3期 中国病毒学 Vol. 9 No. 3
1994年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1994

用PCR方法证实HIV-1感染性病毒颗粒携带有前病毒DNA

董关木[1] Guido Antonelli[2] Anton., G
[1](中国药品生物制品检定所，北京 100050)
[2](罗马大学病毒研究所，罗马，意大利)

R373.9
A

提要 用多聚酶链反应(PCR)为检测手段，证明了成熟的人免疫缺陷病毒I型(HIV-1)可携带前病毒DNA。用细胞病毒裂解液处理病毒样品或在病毒样品中只加磷酸盐缓冲液(PBS)代替细胞裂解液，结果发现只有病毒裂解液处理样品后才能检测到特异DNA。完整的病毒颗粒对DNA酶不敏感，而只有在病毒裂解以后才能对DNA酶敏感。当靶细胞膜上的CD_4受体被特异的单克隆抗体覆盖后不能吸附病毒时，DNA也不能被检测到，而且DNA的数量和病毒滴度的高低相一致。这些证据都提示这种和病毒相关的DNA存在于完整的有感染性的成熟病毒颗粒内部。

关键词 人免疫缺陷病毒I型，前病毒-DNA，多聚酶链反应

人免疫缺陷病毒I型(HIV-1)是人类获得性免疫缺陷综合症(AIDS)的病原体[1,2]。该病毒对人的CD_4阳性的T淋巴细胞有特殊的亲嗜性[3,4]。它属RNA逆转录病毒[5]，病毒的复制过程依赖于它的逆转录酶(RT)，以RNA为模板逆转成负链DNA互补链。此时RT的H活性可将RNA酶解，继而再合成相应的正链DNA[6]。这种DNA可整合到宿主细胞的基因组中，在合适的条件下可被激活而合成病毒RNA和病毒蛋白，这些蛋白先以前蛋白的形式被表达。包括gag/pol的基因产物，然后经酶切成为成熟的RT[7,8]。RT具有多种酶活性功能：a. 依赖RNA的DNA多聚酶活性；b. 依赖DNA的DNA多聚酶活性；c. RNA酶H活性。后者可酶解掉已逆转录完成的RNA[5]。另外，某些依赖RT的DNA病毒在复制过程中的逆转录作用可合成一种不完全的DNA形式。而这种不完全的DNA形式可被成熟的病毒粒子所携带[9,10]。

我们在观察AIDS病人接受AZT治疗效果及体外筛选抗AZT的抗药性毒株的试验中[11,12]，发现用RT-PCR方法测定病毒RNA时，有难以消除的可疑DNA。为了证明这一现象，我们进一步用DNA酶酶解DNA和抗CD_4单抗中和CD_4受体等方法处理样品，发现HIV-1的DNA来自成熟的有感染性的病毒颗粒内部。

材料和方法

1 细胞

1.1 C_{8166}细胞，CD_4阳性的T淋巴细胞株[13]培养于$RPMI_{1640}$培养液中，含10%胎牛血清(Flow Lab., Inc., Irvine, U K)，具体方法见文献[14]。

1.2 H_9细胞，维持于$RPMI_{1640}$培养液中，含10%胎牛血清。来源和具体方法见文献[14]。

* 本文于1993年5月20日收到，11月4日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 病毒

2.1 HTLV-ⅢB株：制备于HIV-1持续感染的H_9细胞株（由M. Cloyd博士赠送，U. T. M. B. TX）[11]的上清液，经7000r/m离心10分钟，弃沉淀。上清液再经2500ur/m超速离心2.5小时（Backmam. SW55）。弃上清，沉淀病毒用$RPMI_{1640}$重悬浮[14]，分装，保存于－80℃备用。

2.2 HIV-1 P1株：由罗马大学病毒研究所分离自意大利AIDS病人血液。常规感染[14]C_{8166}细胞，培养至第四天，观察到大量合胞体时收集，制备方法同ⅢB株。病毒滴定方法见文献[15]。

3 多聚酶链反应（PCR）

PCR方法见文献[11]，反应混合液中含50μl细胞裂解液（0.01%Triton X-100，0.001% SDS，0.6mg/ml蛋白酶K（Boehringer Mannheim）0.01mol/L Tris-HCl pH8.0，0.001mol/L EDTA）裂解后的细胞病毒混合液或50μl用PBS（pH7.2）制备的经病毒感染后的细胞悬液。引物用gag基因区的SK38/39（Cynthetic Genetics. San Diego）。或env基因区的SK68/69（同SK38/39）。扩增反应样品取20μl作琼脂糖凝胶电泳分析，另取30μl样品与r-^{32}P-ATP末端标记的探针（SK19.，Gag，或SK70.，env）混合作液相杂交。以10%聚丙烯酰胺电泳分离，干胶后用Kodak XAR胶片自显影16—20小时[3]，分析结果。

4 样品裂解液处理方法

经超速离心后的病毒0℃吸附C_{8166}细胞1小时或经吸附1小时后继续培养24小时。样品用PBS洗涤3次，以去掉未吸附的病毒或游离的核酸。洗涤后样品分别加PBS或裂解液，再以PCR检测样品。

5 抗CD_4单抗（Leu 3a）处理细胞CD_4受体

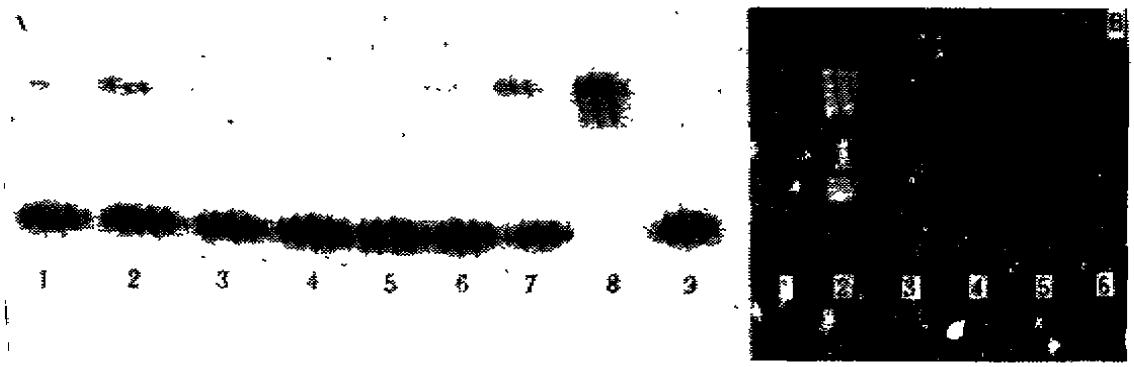
细胞先用PBS洗涤3次，制备成50μl $RPMI_{1640}$培养液中含5×10^4的C_{8166}细胞。加10μl Leu 3a单抗，37℃作用1小时后以0.1和0.01M. O. I.的病毒在0℃条件下吸附1小时，再用PBS洗涤3次，PCR分析病毒DNA。另用同一样品作病毒滴定。

6 DNA酶处理样品

细胞经病毒吸附和培养后，用PBS洗涤3次。加100μl裂解液裂解样品后95℃作用15分钟灭活蛋白酶K。再加10μl DNA酶（Boehringer Mannheim，Milan，Italy）37℃酶解60分钟。95℃灭活DNA酶15分钟。另用上述经病毒吸附或继续培养的样品，PBS洗涤3次，重悬于100μl PBS中，加10μl的DNA酶，37℃孵育60分钟，再经95℃灭活DNA酶15分钟。样品分别用PCR分析。

结　果

1 多聚酶链反应　我们用PCR方法检测经感染HIV-ⅢB和P1株的C_{8166}细胞中前病毒DNA，得到了令人满意的结果，见图1。a为扩增产物经琼脂糖凝胶电泳的图谱；b为用末端标记r-^{32}P-ATP探针[11]与扩增产物杂交后的放射自显影图，可进一步证明其扩增产物的敏感性和特异性。图中ACH-2细胞（由G. Pantaleo博士赠送，HIH，Bethesda，MD），为每一细胞中含单一HIV-1考贝数的DNA。证明其敏感性可达到样品中含10个以下的DNA考贝量。



维普资讯 http://www.cqvip.com

图1 以SK38/39为引物进行PCR的结果

a. 杂交后的放射自显影结果

1—3. HIV-1感染C_{8166}细胞的裂解物

4—7. ACH-2细胞，分别为1、10、100、1000个DNA拷贝

8. 阳性对照 9. 阴性对照

b. 琼脂糖凝胶分析结果

1. 阳性对照 2. DNA标准分子量 3. 阴性对照

4—6. HIV-感染C_{8166}细胞的裂解物

Fig. 1 a. The DNA was subjected to PCR using the SK38/39 primer pair (gag gene) and hybridized with the labeled probe (SK 19).

The DNA derived from the lysis of C_{8166} cells infected with HTLV-ⅢB (lanes 1—3).

Serial dilution of DNA extracted from ACH-2 cells, 1, 10, 100 and 1000 DNA copy respectively (lanes 4—7).

Lane 8 is positive control. Lane 9 is negative control.

b. The DNA was subjected to PCR using the SK38/39 primer pair and analysis by agarose gel.

Positive control (lane 1). Standard molecular weight (lane 1). Negative control (lane 3).

The lysis of C_{8166} cells were infected with HIV-1 (lanes 4—7).

2 病毒样品分别加PBS或裂解液后所测定的结果见图2。结果显示不管病毒样品是经0℃吸附或吸附后继续培养，只要是样品中加裂解液，病毒粒子破裂核酸能暴露的，PCR结果均为阳性，而样品只加PBS病毒粒子不破裂的，PCR检测结果均为阴性。

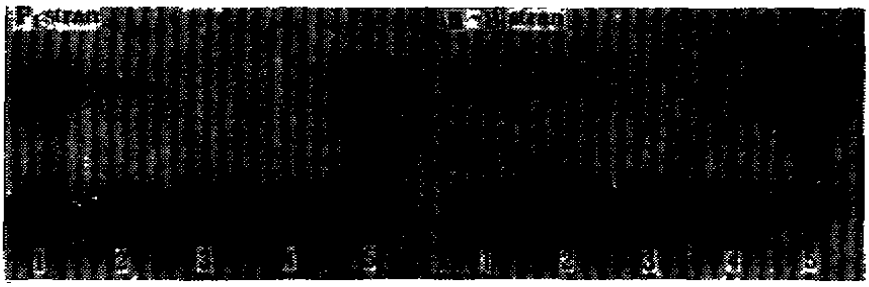


图2 病毒样品分别加细胞病毒裂解液或PBS后所做PCR和杂交后的结果

1. 病毒感染细胞继续培养37℃后加裂解液 2. 0℃吸附后的样品+裂解液 3. 同1. 但加PBS

4. 同2但加PBS 5. 阳性对照

Fig. 2 PCR analysis to detect viral DNA in HIV-1 exposed cells after different treatments.

HIV-1 exposed cells and incubated at 37℃ for 24 hrs, then added lysis buffer (lane 1).

HIV-1 absorbed cells at 0℃ for 1 hr, then added lysis buffer (lane 2).

HIV-1 exposed cells and incubated at 37℃ for 24 hrs, then added PBS (lane 3).

HIV-1 absorbed cells at 0℃ for 1 hr, then added PBS (lane 4).

3 细胞病毒样品经DNA酶处理后PCR结果见图3。为了排除DNA是样品中游离的DNA所致，我们将样品分别在加裂解液的前后用DNA酶处理。结果显示：样品先用DNA酶处理后再加裂解液，不管是在0℃吸附一小时或37℃继续培养24小时均为阳性。当样品先经裂解后再

维普资讯 http://www.cqvip.com

用DNA酶处理都显阴性。此结果进一步提示只有病毒裂解后释放核酸，所带的DNA才能对DNA敏感。而完整的病毒颗粒因不释放DNA，故对DNA酶不敏感[16]。

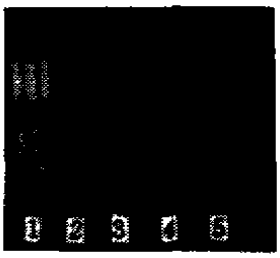


图3　细胞病毒裂解前后用DNA酶处理的样品再以PCR法分析DNA的结果(琼脂糖凝胶电泳)

1. DNA分子量

2和4. 先用DNA酶处理，再用裂解液的PCR结果

3和5. 先裂解后用DNA酶处理的PCR结果

Fig. 3　PCR analysis to detect viral DNA in HIV-1 exposed cells and treatment with DNase.

DNA standard molecular weight (lane 1).

The sample was treated with DNase before lysis of cells and virus(lanes 2 and 4).

The sample was treated with DNase after lysis of cells and virus (lanes 3 and 5).

4　用单抗中和CD_4受体的PCR结果见图4和表1。从图中可以看出，病毒吸附到经单抗处理后的细胞进行PCR结果为阴性，而未经单抗处理的样品结果为阳性。并且用高感染复数吸附和培养的样品，PCR产物也相应多于低感染复数样品，而且扩增的DNA量和样品中病毒滴度的高低有关。也就是说，这种DNA和完整的病毒颗粒有关。

图4　用单抗处理后的PCR产物，再经探针杂交的结果

1和4. 经单抗处理后的样品　2和3. 未经单抗处理的对照　5. 阴性对照　6. 阳性对照

Fig. 4　PCR analysis to detect viral DNA in HIV-1 exposed cells and treatment with McAb

Present of McAb (lanes 1 and 4).

Absent of McAb(lanes 2 and 3).

Negative control (lane 5).

Positive control (lane 6).

表1　靶细胞经单克隆抗体处理后的病毒滴度

Table 1　Virus titer after the target cells were treated with McAb

	McAB处理 With McAb	未处理 Without McAb
0.1 MOI	2.3	5.0
0.01 MOI	<2	3.6

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨 论

本文报道的实验结果有几种迹象表明 HIV-1 完整的病毒颗粒可携带前病毒 DNA：(1)我们用细胞病毒裂解液处理样品后所进行的 PCR 结果能测定到特异的 DNA 片段。而用 PBS 悬浮细胞的样品不裂解病毒时不能测到 DNA；(2)完整的病毒粒子样品中加入 DNA 酶酶解处理时，样品中的 DNA 对 DNA 酶不敏感。而将病毒样品经裂解处理后对 DNA 酶就变得敏感[16]；(3)病毒在 0℃条件下吸附细胞 1 小时，也很容易测到 DNA。这些事实都提示其 DNA 存在于有感染性的完整的病毒粒子内部。因为病毒在 0℃条件下吸附 1 小时，不可能穿入细胞进行核酸复制[11]。用 PCR 方法测到的 DNA 除了样品被外来的 DNA 污染或者是病毒样品中原已整合在细胞基因组的 DNA 而游离于样品中外，不可能有新的逆转录成的前病毒 DNA。Kim 等报道[17] HIV-1 病毒感染细胞后需经 16 小时以上的培养才能检测到特异的 DNA。Dianzani 等也报道，病毒感染细胞后需 4 小时方能穿入细胞，黑暗期长达 16 小时，子代病毒 24 小时后达到高峰[11]，因此病毒在 0℃吸附 1 小时，排除上述假设外，测到的应为病毒所携带的 DNA。

为了排除外源 DNA 污染的可能，我们用 DNA 酶处理。在病毒粒子完整的条件下，样品中的 DNA 对 DNA 酶不敏感。只有当病毒被裂解后加入 DNA 酶，才能对 DNA 酶敏感。所以本试验结果似可排除是游离于病毒粒子外的 DNA。当靶细胞膜上的 CD_4 受体被单抗封闭后，病毒的吸附也相应受阻，进而这种 DNA 亦相应减少或消失，而且这种 DNA 的量和病毒滴度呈对应关系。我们还用酚、氯仿提取的 DNA 样品吸附细胞，结果表明这种 DNA 不能特异地吸附细胞(资料未显示)，均证明该 DNA 不是游离的或被污染所致。

最近 Franco Lori 等也报道，他们用不同来源的 HIV-1 感染不同种类的细胞，也观察到病毒携带 DNA。我们从意大利 AIDS 病人分离到的 HIV-1 P1 株以及 ⅢB 株都观察到此现象，提示这种现象有其普遍性。

目前尚不清楚这种病毒相关的 DNA 对病毒的感染过程是否必需，也不清楚它的复制机制和来源以及以什么方式包裹进入病毒粒子。不过有些资料表明，这种 DNA 可能来自病毒复制过程的早期[16]，在逆转录阶段的初期。它可能是由 gag/pol 基因的前体产物被不成熟地切割成 p66/p55 的逆转录酶或者是 gag/pol 前体蛋白逆转录所致[18-21]。而这种 RT-DNA 复合物可被包裹进入病毒颗粒。

另有文献报道，在病毒的复制过程中，逆转录酶的酶促作用可合成一种不完全的 DNA 形式，这种 DNA 是由完整的负链和一个部分合成的正链组成[9,22,23]。我们用 env 基因的引物 SK68/69 扩增样品，其阳性率都比 gag 基因低，即使能扩增成功的样品，其 DNA 产量也较 gag 基因片段少，可能是该 DNA 缺乏 env 基因序列所致。

总之以上结果对研究 RNA 逆转录病毒的复制机制有积极意义。目前尚有许多未知因素，需进一步研究。

参 考 文 献

1 Popovic M. Sarngadharan, M. G, Read E, *et al*. Detection isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-Ⅲ) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science, 1984; 224:497—500

2 曾毅，王必常，汤得骥，等. 血友病患者血清中淋巴腺病病毒/人 T 细胞Ⅲ型病毒抗体检测. 病毒学报，1986;2:97—100

3 曾毅. 艾滋病病源—淋巴腺病病毒/人 T 细胞Ⅲ型病毒. 病毒学报，1986;2(2):190—195

维普资讯 http://www.cqvip.com

4 Sodroski J G, Rosen C A., Haseltion W A, *et al*. Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. Science, 1984; 225:381—385

5 Brun-Vezinet F. Prog Med Virol, (Karger Basel) 1985; 32, 189

6 Varmus H E, Swanstrom R. Replication of retroviruses. In: Weiss R, Teich N, Varmus H, *et al* ed, RNA tumour viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1984; 369—512

7 Baltimore D, RNA-dependent DNA polymerase in virus of RNA tumour viruses. Nature(London), 1970; 226:1209—1211

8 Temin H, Mizutani S. RNA-dependent DNA Polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature (London), 1970; 226,1211—1213

9 Summers J, Mason W. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. Cell, 1982; 29:403—415

10 Bavand M R, Lanb O. Two proteins with reverse transcriptase activities associated with hepatitis B virus-like particles. J Virol, 1988; 62, 626—628

11 Dianzini F. Guido A. Ombretta T, *et al*. In vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3′-azido-3′-deoxythymidine. Antiviral Research, 1992; 18:39—52

12 Mitsuya H, Weinhold K, Furman P, *et al*. 3′-azido-3′ deoxythymidine (BW A509U), an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotrepic virus type Ⅲ/lymphadenopathy-associated virus in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985;82:7096—7100

13 Clapham P R, Weiss R A, Dalgleish A G, *et al*. Human immunodeficiency virus infection of monocytic and T-lymphocytic cell; Receptor modulation and differentation induced by phorbol ester. Virology, 1987;158,44—51

14 Dianzini F, Guido A, Capobianchi M R, *et al*. Replication of human immunodeficiency virus; Yield of infections virus under single growth cycle conditions. Arch Virol, 1988; 103: 127—131

15 Anna Alcovini, Bruce D Walker. Techniques in HIV Research. New York: M. Stockton Press. 1990:71—76

16 Franco L, Fulvia M. V, Anthony L, *et al*. Viral DNA carried by human immunodeficiency virus type 1 virions. J Virol, 1992; 66:5067—5074

17 Kim. S. 4th inter. conference on AIDS., Stockholm, Sweden. June,12—16 1988: 110

18 Crawford S. Goff S P. A deletion mutation in the 5′ part of the pol gene of moloney murine leukemia virus blocks proteolytic processing of the gag and pol polyproteins. J Virol, 1985; 53:899—907

19 Lori F, Soovassi A.I, Zella D, *et al*. Enzymatically active forms of reverse transcriptase of the human immunodeficiency virus. AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1988; 4,383—398

20 Lori F, Achilli G, Cattaneo E, *et al*. Activity gel analysis of reverse transcriptase of HIV-1 and other retroviruses. Arch AIDS Res. 1990; 4:1—8

21 Peng C, Chang N T, Chang T W. Identification and characterization of human immunodeficiency virus type 1 gag-pol fusion protein in transfected mammalian cells. J Virol, 1991; 65:2751—2756

22 Ganem D, Varmus H E. The molecular biology of the hepatitis B viruses. Annu Rev Beochem, 1987; 56:651—693

23 Mason W S, Taylor T M, Hull R. Retroid virus genome replication. Adv Virus Research, 1987,32:35—96

维普资讯 http://www.cqvip.com

Demonstration of Infectious Mature HIV-1 Carrying Pre-viral DNA by PCR

Dong Guanmu[1] Guido Antonelli[2]

[1](*National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products*, *Beijing* 100050)

[2](*Institute of Viology*, *University of Roma*, *Roma*, *Italy*)

Infectious mature human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) carring pre-virus DNA was evidenced by polymerase chain reaction(PCR). When the samples were treated with lytic buffer, the result of PCR should be positive; however when PBS was added instead of lytic buffer, the DNA was not detected. The DNA was sensitive to DNase treatment after lysis of viral particles. However, the DNA was not sensitive to DNase treatment for the intact viral particles. The DNA was not detected after the CD_4 receptor of the C_{8166} cells were covered by anti-CD_4 receptor monoclonal antibody (Leu 3a), and the virus could not absorb to the cells. Furthermore, the number of DNA was correlative with virus titer. This evidence supported the HIV-1 virus carrying pre-virus DNA.

Key words HIV-1, Pre-virus DNA, PCR