351—355 6782(13)

维普资讯 http://www.cqvip.com

第10卷 第4期 中国病毒学 Vol. 10 No. 4
1995年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1995

Nested PCR 在检测牛白血病病毒前病毒中的应用*

王汉中 S852.653

(中国科学院武汉病毒研究所，武汉 430071)

提要 用 Nested PCR 检测牛白血病病毒的前病毒形式。从牛白血病病毒基因 gp51 上选择两对引物进行 Nested PCR 体外扩增，产物经2% agarose 凝胶电泳和用生物素标记的探针鉴定，证实其特异性。结果表明该方法能从两个 BAT-BLV 细胞内检测出 BLV 的前病毒 DNA 形式。

关键词 牛白血病病毒，前病毒，Nested PCR 聚合酶链反应

牛白血病病毒是逆转录病毒科的一种致瘤病毒，在全世界广泛分布。该病毒主要感染 β-淋巴细胞。在被牛白血病病毒感染的牛群中，大约有12%的牛将发展成淋巴细胞增多症或者淋巴肉瘤。

该病毒基因组由 ssRNA 组成，分子量在7×10^6至10×10^6道尔顿之间，病毒粒子内含有逆转录酶，在病毒复制过程中，病毒基因组经反转录酶作用转录成 dsDNA。该 DNA 具有感染性，并能整合于宿主细胞 DNA 中，这种病毒 DNA 形式被称作前病毒。

由于该病毒具有极大危险性，给畜牧业造成巨大损失。长期以来，世界各国都在寻找有效的检测方法。传统的检测方法主要以血清学方法为主。如放射免疫测定法(RIA)、ELISA、琼脂糖免疫扩散法(AGID)以及补体结合实验等。虽然这些方法操作简单，能有效地检测 BLV 的感染，防止其流行，然而这些方法也存在着某些不可弥补的局限性，例如：1. 在病毒早期感染阶段不能检测出抗体；2. 易产生假阴性结果；3. 由于新生小牛能从母乳中获得抗体，因此血清学方法不能区别是被动免疫或主动免疫。

本研究的主要目的是利用 Nested PCR 技术直接检测白细胞内的前病毒 DNA，因此能有效地克服血清学检测所面临的缺陷，提供了一个安全、有效、快速的检测方法。

材料和方法

1 **细胞培养** 利用 FLK 细胞系增殖 BLV，并以此被感染的细胞作为阳性对照。利用携带有 BLV 前病毒 DNA 的 BAT-BLV 细胞系测定 Nested PCR 检测前病毒的敏感性，这两种细胞的培养方法见文献[1]。

2 **引物和探针的选择** 参照 GenEMBL databank(Accession Ko2120)和 Sagata *et al* 等[2]有关 BLV 序列，分

本文于1994年11月24日收到，1995年3月6日修回

* 大部分工作在瑞典国家兽医研究所完成

维普资讯 http://www.cqvip.com

析资料，从BLV基因组的env-gp51基因区域中选择下列序列作为探针和引物。引物1和2是一对外部引物，引物3和4是内部引物。选择两对引物之间的一段寡聚核苷酸作为探针来检测产物的特异性。见表1。

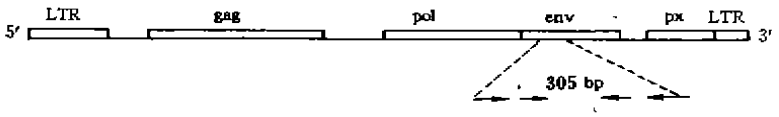

图1 所示两对引物在BLV基因组内的位置
Fig. 1 Schematic representation of the BLV genome indicating the position of the primer pairs

表1 引物的核苷酸序列及Nested PCR产物的长度(bp)
Table 1 Nucleotide sequence of the primers used for nested PCR, and length of the expected nested PCR products

引物 Primer	序列 Sequence	位置 Position	产物 Product (bp)
External			
Primer-1	5′-GTC CCA AGT CTC CCA GAT ACA-3′	5035-5055	
Primer-2	5′-TAT AGC ACA GTC TGG GAA GGC-3′	5462-5442	
Internal			
Primer-3	5′-CAC AAG GGC GGC GCC GGT TTG GGA GCC AGG-3′	5101-5130	305
Primer-4	5′-GAC AGA GGG AAC CCA GTC ACT GTT CAA CTG-3′	5405-5376	
探针序列	Probe sequence: 5′-ACC TGG GAG ATA TGG GGA TAT GAT CCC CTG-3′	5294-5323	

3 外周血淋巴细胞的分离

利用Ficall-Paque分离方法从临床血样中分离外周淋巴细胞。Ficall-Paque为Pharmacia产品，具体操作见产品说明。

4 样品的处理

为了破坏细胞膜，释放核酸，用两种方法进行比较。

A、酚-氯仿抽提法。详细操作见Maniatis *et al.* (1982)[3]。

B、螯合树脂处理法。把0.1—0.2 g螯合树脂(Pharmacia产品)同80—100 μl细胞悬液于Eppendorf管中，均匀混合，在匀浆器上震荡20秒后，把样品置于56—60℃保温20分钟后，再震荡10秒钟，随后把样品置于98℃保温10分钟，再震荡10秒后，立即把样品置于冰盒中保持5分钟，于14000 r/min离心2分钟，取5—10 μl上清可直接进行PCR扩增。

5 Nested PCR体外扩增

在DNA扩增仪(Perkin-Elmer cetus, Norwalk, CT, USA)中进行Nested PCR扩增。第一次扩增和第二次扩增的条件基本一样。扩增的第一阶段的五个循环条件为：在80℃热启动，随后94℃变性45秒，48℃退火1分钟，72℃延长1分钟，此后，退火温度为43℃ 1分钟，而最后一次循环的延长时间为7分钟。整个PCR过程为32个循环。第一次扩增完成后，从中吸取5 μl产物转移到含有一对内部引物在Eppendorf管中进行第二次扩增。二次扩增的反应体积均为50 μl。PCR的缓冲液成分见文献[4]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

6　敏感性的测定

如图2所示，用不含镁和钙的 PBS 稀释 BAT-BLV 细胞，随后进行 Nested PCR，测定其敏感性。

7　Nested PCR 扩增产物的鉴定

7.1　吸取10 μl Nested PCR 扩增产物于2% agarose 凝胶上电泳（220V，25分钟），随后用溴化乙锭染色在紫外灯下观察结果，根据产物分子量大小鉴定结果。

7.2　产物的特异性检测　采用 Southern blot 杂交方法鉴定产物的特异性。利用末端脱氧核糖核苷转移酶于 BLV-特异性探针的3′末端标记 Biotin-6-UTP。按照 Maniatis *et al*[3]描述的方法进行 Southern blot。

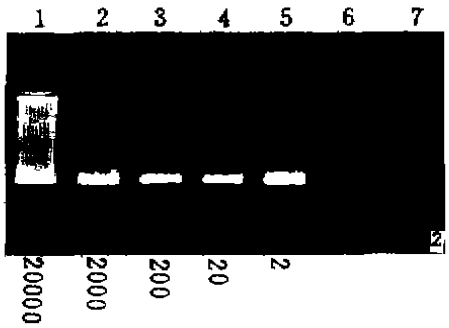

图2　Nested PCR 检测 BLV 前病毒 DNA 的敏感性测定。细胞计数后，按下列比例稀释 BAT-BLV 细胞。20000、2000、200、20、2个细胞。

Fig 2　Sensitivity of detection of the nested PCR mothods, BAT-BLV cells were diluted as follows: 20000, 2000, 200, 20, 2 cells.

结　果

1　Nested PCR 检测 BAT-BLV 细胞内前病毒 DNA 的敏感性

细胞计数后（见图2），按10倍系列稀释法稀释 BAT-BLV 细胞。结果证明 Nested PCR 扩增能从仅含有两个 BAT-BLV 的细胞悬液中检测出 BLV 的前病毒 DNA。

2　两种制备 DNA 方法的比较

采用蛋白酶 K/酚抽提法和螯合树脂处理法制备核酸（见图3）。结果表明两种方法都能取得满意结果，但螯合树脂处理法具有操作简单、省时、经济等优点。

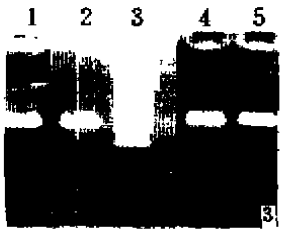

图3　两种制备 DNA 方法的比较。1和4为 BAT-BLV 细胞悬液，2、5为从血清检测为阳性的牛分离的淋巴细胞悬液。（1和2分别被蛋白酶 K 和酚处理后提纯的 DNA，4和5仅为螯合树脂处理过的样品，3为 DNA 标准分子量。经 Nested PCR 扩增后，产物经2% agarose gel 电泳和溴化乙锭染色后，照像）。

Fig. 3　Electrophoresis of the nested PCR products on ethidium bromide stained agarrose gel. Amplification of proviral DNA from BAT-BLV cell suspensions (1, 4,) and PBL cell suspensions (2, 5) isolated from seropositive cows was made following two preparation procedures. (1, 2, DNA were purified by proteninase K/phenol treatment, 4, 5, the samples were only treated by chelating resin. 3. DNA ladder).

3　Nested PCR 扩增产物的特异性

图4显示出 Nested PCR 扩增产物经2% agarose 凝胶电泳和溴化乙锭染色后呈现出一条明显的预定带，分子量大小为305 bp，和设计相一致。Southern blot 杂交结果表明该产物是 BLV 的前病毒 DNA 的特异带。

维普资讯 http://www.cqvip.com

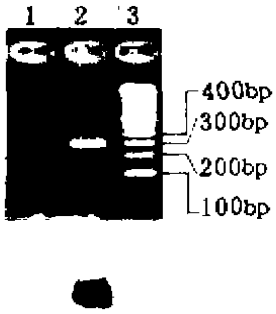

图4 Nested PCR 扩增产物特异性的检测。产物经电泳后，进行 Southern blot 杂交。1. 阴性对照（未感染 BLV 的 FLK 细胞）。2. 阳性对照（BAT-BLV 细胞）。3. 标准 DNA 分子量（100 bp DNA ladder，Gibco BRL，MD，USA）。

Fig. 4 Detection of BAT-BLV cells by nested PCR. The amplicons were analyzed by electrophoresis or by Southern blot hybridization with biotinylated probe. 1. Negative control (uninfected FLK cells). 2. Positive control (BAT-BLV cells). 3. DNA ladder. (100bp DNA ladder, Gibco BRL, MD, USA).

4

4 临床血样的检测

血样分别采自具有临床症状和非临床症状的牛，随后分别进行血清学诊断和 Nested PCR 扩增，见图5。结果证明两种方法的诊断结果非常一致（血清学诊断结果将另行报道）。

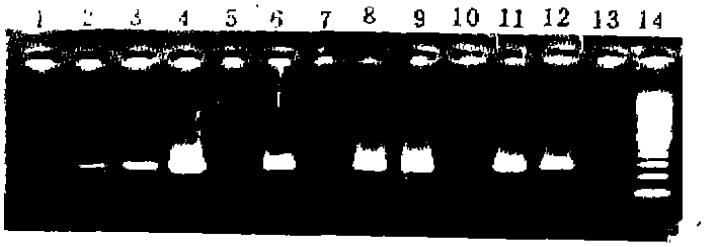

图5 临床样品的快速检测

Fig. 5 Rapid detection of the bovine leukemia virus by nested PCR in blood of calves

讨 论

实验结果证明从 BLV 基因组的 env gp51区域内选择的两对引物是非常有效的，能从两个 BAT-BLV 细胞内检测出 BLV 的前病毒 DNA。由于每个 BAT-BLV 细胞含有2—4个 BLV 的前病毒 DNA，因此可推测这种 Nested PCR 方法至少能从 BAT-BLV 细胞或从被感染的淋巴细胞内检测出拷贝数少于8的 BLV 前病毒 DNA。在临床检验中不需经过逆转录作用而直接从被感染的淋巴细胞中检测出前病毒 DNA 的存在，结果和某些常规血清学方法检测结果一致。同时 Nested PCR 方法能弥补血清学方法的某些缺陷，它不仅为牛白血病的早期诊断提供一个可靠的诊断方法，也为防止该病毒的传播及其分子流行病学研究提供了一个有效手段。

目前，国外很多研究者都在利用 PCR 和 Nested PCR[5-7]技术检测牛白血病病毒和它的前病毒形式。各国研究者采用病毒基因组内不同区域的寡聚核苷酸作为引物，例如用 gag-p24，pol 和 px 等区域内的序列作引物，都取得好结果。笔者采用 env-gp51区域内的序列作为引物，

维普资讯 http://www.cqvip.com

主要考虑下列两种因素:1. env-gp51基因产物是牛白血病病毒的主要表面抗原,Nested PCR的检测结果能和某些血清学方法相比较;2. env-gp51基因具有高度保守序列,不易产生变异,这样就能有效防止假阳性结果出现。

参 考 文 献

1 Burny A, C Bruck, Y Cleuter, *et al*. Bovine leukeamia virus and enzootic bovine leukosis. Onderstpoort J Vet Res, 1985; 52:133-144

2 Sagata N, T Yasunaga, J Tsuzuku-Kawamura, *et al*. Complete nucleotide seguence of the genome of bovine leukeamia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. Proc. Nat l. Acad Sci USA, 1985; 82:677-681

3 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J, *et al*. Molecular Cloning. 1st ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982

4 Barbara Wirz, Jon-Duri Tratschin, Heinzk Muller, *et al*. Detection of hog cholera virus and differentiation from other pestiviruses by polymerase chain reaction. J of Clinical Microbiology, 1993; 31: 1148-1154

5 Naif H M, Daniel, R C W, Cougle W G, *et al*. Early detection of bovine leukeamia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. J Clin Micribiol, 1992; 675-679

6 Brandon R B, Naif H, Daniel R C W, *et al*. Early detection of bovine leukosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction. Res Vet Sci, 1991; 50:89-94

7 Poon H, Jimenez e, Jacobs R M, *et al*. Detection of bovine leukeamia virus RNA in serum using the polymerase chain reaction. J Vir Methods, 1990; 41:101-112

Rapid Detection of Proviral DNA of Bovine Leukaemia Virus Using Nested PCR

Wang Hanzhong

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan* 430071)

This paper reported that proviral DNA of bovine leukaemia virus (BLV) was detected by nested PCR. External and internal primers were selected from gp51 gene in BLV genome. The products of the nested PCR were identified by 2% agarose gel electrophoresis and were comfirmed by hybridization with a biotinylated oligonucleotide probe. The results of the nested PCR show that DNA forms of the provirus were detected from two host cells.

Key words Bovine leukaemia virus, Provirus, Nested PCR