

## 猴血中 SFV 病毒基因 PCR 检测方法的建立及应用

任丽虹, 白巍, 林凌, 孙明, 李华, 全文琦, 易红昆, 侯宗柳

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医学生物学研究所, 云南昆明 650118)

## Detection of SFV Gene with Nested-PCR in Rhesus Monkey Blood

REN Li-hong, BAI Wei, LIN Ling, SUN Ming, LI Hua, YI Hong-kun, HOU Zhong-liu

(Institute of Medical Biology, CAMS &amp; PUMC, Kunming 650118, China)

**Abstract:** Two pairs of primers were used for amplifying SFV gene with nested-PCR in Rhesus Monkey blood. The nearly 500 bp PCR products were cloned into vector pUC-19. The fragment was detected as 465 bp SFV pol gene by sequence analysis. The homology of the fragment to 425 bp pol gene of the SFV-1 was the highest, it was 92.00%. 158 samples of Rhesus Monkey blood were used to detect SFV gene with nested-PCR. Among them, 54 were positive, the positive rate was 34.2%. It appeared a high present of SFV infection in Rhesus Monkey.

**Key words:** Simian Foamy Virus(SFV); Blood DNA of Rhesus Monkey; Nested-PCR.

**摘要:** 针对猴泡沫病毒 SFV(Simian Foamy Virus)多聚酶区(pol区)设计两对引物,以猴血 DNA 为模板进行嵌套式 PCR 扩增,得到 500 bp 左右基因片段,克隆进入 pUC-19 载体,经测序鉴定为 SFV 465 bp 的 pol 区基因片段。将此段序列与 SFV 各型 425 bp 的 pol 区基因片段进行同源性比较,它与 SFV-1 型的同源性最高,为 92.00%。在此基础上,用这两对引物对 158 例猴血 DNA 进行检测,阳性 54 例,阳性率为 34.2%。发现在猴群中有较高的 SFV 病毒

的感染。

**关键词:** 猴泡沫病毒 SFV; 猴血 DNA; 嵌套式 PCR

**中图分类号:** Q93-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)02-0179-04

泡沫病毒 FV(Foamy Virus)属反转录病毒科的泡沫病毒属(*Spumavirus*),FV 可从许多哺乳动物如苍鼠、猫、牛、猴及人中分离得到<sup>[1,2]</sup>。FV 可在不同种类的细胞中繁殖并形成空泡样细胞病变<sup>[3]</sup>。在猴体中,FV 可从脑、肺、肾以及外周血淋巴细胞中分离到<sup>[4]</sup>。而以外周血淋巴细胞 DNA 为模板进行检测,可以提前预知猴泡沫病毒的感染情况<sup>[5]</sup>。并且 SFV 在感染过程中可形成 DNA 前病毒,可直接用 PCR 方法检测病毒基因。但由于血淋巴细胞中 SFV 的量极少,一次 PCR 扩增不能有效检测,因此设计了嵌套式 PCR 检测方法。本文采用的两对

引物是针对多聚酶区(pol区)的保守部位设计,可至少扩增 12 个型别的猴泡沫病毒和 2 个型的人泡沫病毒<sup>[6]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 恒河猴全血来源及 DNA 提取

恒河猴全血来自本所自繁猴及野生猴,DNA 提取采用 TaKaRa9081CA 全血抽提试剂盒。

### 1.2 恒河猴全血中 SFV 基因克隆及测序鉴定

参照文献<sup>[6]</sup>针对 SFV 的 pol 区设计引物,在第 3、4 引物的 5' 端分别增加 *EcoR* I 酶切位点

收稿日期:2000-04-21,修回日期:2000-08-14

作者简介:任丽虹,女,重庆籍,助理研究员,硕士,研究方向为分子病毒学。

GAATTC,引物序列分别为:

引物 1: 5'GCCACCCAAGGGAGTTATGTGG 3'  
(SFV-3: 5930-5951)

引物 2: 5'GCTGCACCCTGATCAGAGTG 3'(SFV-3: 6519-6500)

引物 3: 5'CGAATTCCTGGATGCAGAGTTGG-ATC 3'(SFV-3: 5974-5993)

引物 4: 5'CGAATTCGAAGGAGCCTTAGTGGG-GTA 3'(SFV-3: 6438-6419)

以恒河猴肾细胞培养出现泡沫样病变的恒河猴全血 DNA 为模板,用引物 1、2 进行第一次 PCR 扩增。再以第一次 PCR 产物 2  $\mu$ L 为模板,用引物 3、4 进行第二次 PCR 扩增。将扩增片段及克隆载体 pUC-19 用 *EcoR* I 酶切、连接并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  后筛选重组子,PCR 和酶切鉴定以后,再进行全序列测定(测序仪为 ABI100 Model 377 Version3.3)。

### 1.3 恒河猴全血 DNA 中 SFV 基因检测

以恒河猴全血 DNA 为模板,用以上两对引物进行嵌套式 PCR 以检测 SFV 基因。将第二次 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析,出现 500 bp 左右条带的判为阳性。共对 158 例 DNA 样品进行了检测。

## 2 结果

### 2.1 恒河猴全血中 SFV 基因克隆及测序鉴定

以经细胞培养判断为 SFV 感染阳性的恒河猴全血 DNA 为模板,用引物 1、2 进行第一次 PCR 扩增。再以第一次 PCR 产物为模板,用引物 3、4 进行第二次 PCR 扩增。第二次 PCR 后得到 500 bp 左右的基因片段。片段及克隆载体 pUC-19 经 *EcoR* I 酶切及抽提处理、连接并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取单菌落培养并提取 DNA,初步酶切筛选出重组子,再进一步用 PCR 和酶切鉴定(图 1)。挑取阳性克隆,DNA 纯化后测序。经全序列测定,扩增片段确为设计的 SFV 465 bp 的 pol 区基因片段。

### 2.2 同源性分析

465 bp 去掉上下引物的碱基 40 bp 得到 425 bp 的序列,将这段序列与 SFV 各型 425 bp 的 pol 区同段序列用 pcgene 进行了同源性分析(图 2)。此段序列(SFV-X)与 SFVmac 的同源性为 90.82%,与 SFV-1 型的同源性为 92.00%,与 SFV-2 型的同源性为 91.29%,与 SFV-3 型的同源性为 83.06%,与其他型的同源性均低于以上各型。

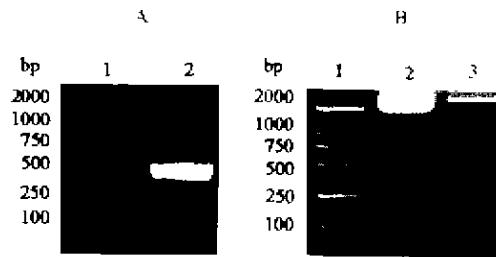


图 1 克隆载体的 PCR 及酶切分析鉴定

A PCR 分析:1, Marker; 2, PCR fragment. B 酶切分析:1, Marker; 2, pUC19 + *EcoR* I; 3, Cloned plasmid digested by *EcoR* I.

Fig. 1 Identification of recombinant clone by PCR and digestion of *EcoR* I

### 2.3 恒河猴全血 DNA 中 SFV 基因检测

用以上两对引物对 158 例猴血 DNA 进行检测,阳性 54 例,阳性率为 34.2%。发现在猴群中有较高的 SFV 病毒的感染(图 3)。

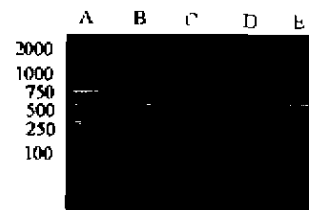


图 3 猴血 DNA 中 SFV 基因的嵌套式 PCR 检测

Fig. 3 Detection of SFV gene by nested-PCR in the blood DNA of Rhesus monkey

A, DL2000 Markers; B, E, Positive SFV gene in the Rhesus blood; C, D, Negative SFV gene in the Rhesus blood.

## 3 讨论

泡沫病毒已列入实验动物的第二类病毒,为必检项目。而猴作为实验动物的用途是很广泛的,比如猴是常用的动物模型、猴肾可用于疫苗生产,许多生物制品的鉴定都需要上猴体。因此需建立有效的 SFV 检测方法以保证实验动物的质量。长期以来, SFV 的检测都是通过细胞培养的方法,但这种方法需要在处死动物以后,进行组织培养,而结果判断至少需要 21 d 时间。结果为阳性时已经造成了资源的浪费,并且大多数实验还需要用活体进行。而对于血清学的方法,由于猴泡沫病毒的型别较多,因此难度也大。所以本实验采用了 PCR 检测方法。FV

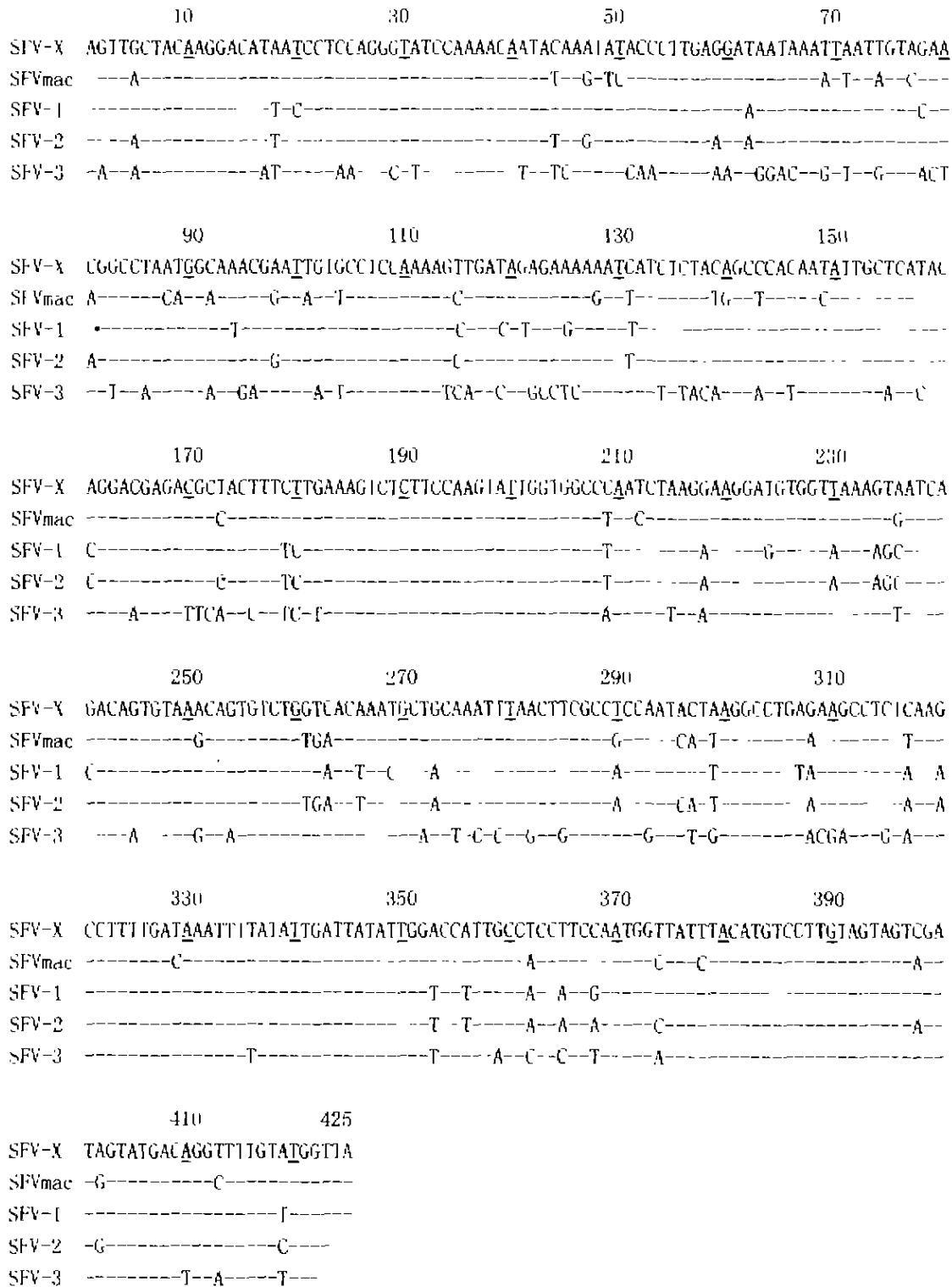


图 2 SFV 4 个型的 425 bp pol 区序列与测序片段 SFV-X 的比较

只有 SFV-1 在 81 位有一缺口。

Fig. 2 Alignment of 425 bp gene in 4 primate foamy viruses and the sequenced fragment SFV-x

The only gap inserted into the nucleotide sequences by the program (at position 81 is due to the distance of SFV-1 to the 4 FVs.

虽为 RNA 病毒,但由于在繁殖中可形成大量的 DNA 前病毒,因此用 PCR 直接检测病毒基因是可行的<sup>[7]</sup>。本实验只需要 100  $\mu$ L 全血就可提取 DNA 进行多次检测,从抽血到出结果可在 1~2 d 内完成。为提高灵敏度,又设计了嵌套式 PCR 检测方法。考虑到 SFV 多型别的关系,引物设计在 pol 区的保守部位,对各型别的 SFV 都能扩增。本实验对一例扩增到的基因片段进行测序的结果看,与 SFV-1 型的同源性最高,但不是很高。究竟是由于突变造成,还是一种新的 SFV 型,还需进一步研究鉴定。

从对 158 例猴血 DNA 的检测结果看, SFV 在猴群中有一定的感染率。国外的研究发现,在幼年猴中,由于有来自母体的抗体可抵抗 SFV 感染,而到青年时期, SFV 感染可上升到 10%,到成年可上升到 100%,因而推测 SFV 可通过口径和性传播<sup>[8]</sup>。有了可靠的 SFV 检测方法,可将带毒者与未感染者隔离饲养,从而根本上阻断 SFV 在猴群中传播。

SFV 检测方法的建立,可为跟踪调查 SFV 的传播途径以及对猴群进行的泡沫病毒抗体或抗原免疫提供基本的保证。

## 参考文献

- [1] Hooks JJ, Detrick-Hooks B. Spumavirinae. Foamy virus group infections: Comparative aspects and diagnosis[M]. San Diego: Academic Press, 1981. Vol 4, 599-618.
- [2] Flügel RM. Spumaviruses: A group of complex retroviruses[J]. J AIDS, 1991, 4:739-750
- [3] Flügel RM. The molecular biology of human spumavirus[M]. Oxford: IRL Press, 1993. 193-214.
- [4] Mergia A, Luciw PA. Replication and regulation of primate foamy virus[J]. Virology, 1991, 184:475-482.
- [5] Von-Laer D, Neumann-Haefelin D, Heeney JL, et al. Lymphocytes are the major reservoir for foamy viruses in peripheral blood [J]. Virology, 1996, 221:240-244.
- [6] Schweize M, Neumann-Haefelin D. Phylogenetic analysis of primate foamy viruses by comparison of sequences[J]. Virology, 1995, 207:577-582.
- [7] Heneine W, Switzer WM, Sandstrom P, et al. Identification of a human population infected with simian foamy viruses[J]. Nat Med, 1998, 4:403-407.
- [8] Broussard SR, Comuzzie AG, Leighton KL, et al. characterization of new simian foamy viruses from African nonhuman primates[J]. Virology, 1997, 273:349-359