DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.007
第25卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 6
478 2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)06-0478-03

应用PCR和RT-PCR检测猪内源性逆转录病毒及其意义

郭海涛,王英杰,刘鸿凌,王宇明,黄燕萍,于乐成 (第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察猪内源性逆转录病毒(Porcine endogenous retrovirus, PERV)在中国实验小型猪的感染情况。方法 针对PREV gag区的序列,选用特异性引物,采用PCR方法检测猪肝脏、皮肤前病毒序列;以及RT-PCR方法检测血清中PERV-RNA序列。结果 该法在猪肝脏组织中可检测出PERV前病毒序列;此外,在猪血清标本亦检测出病毒序列,而其它2份HBV、HCV阳性血清及2份其它动物血清(大鼠、兔)检测结果均为阴性,说明该方法特异性较高。结论 中国实验小型猪均携带该病毒,并可以释放到血清中;采用该法具有特异、简便的特点,为进一步研究PERV感染及生物安全性奠定了基础。

关键词:猪逆转录病毒;逆转录酶;聚合酶链反应
中图法分类号:R373.9;R394-33;R446.9 文献标识码:A

Detection of PERV by polymerase chain reaction and reverse transcription polymerase chain reaction and the significance

GUO Hai-tao, WANG Ying-jie, LIU Hong-ling, WANG Yu-ming, HUANG Yan-ping, YU Le-cheng (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the situation of PERV infection in Chinese Guizhou experimental pig. Methods Proviral PERV gag sequences in liver and skin tissue samples were detected by polymerase chain reaction (PCR) and PERV RNA sequences in serum samples by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific primers. Results Proviral PERV sequences were detected in liver tissue in pig. Negative results were also found in tissue and serum samples from 2 HBV patients, 2 HCV patients and 2 serum samples from animals (1 rat, 1 rabbit). Conclusion PERV can be released from widely used Chinese experimental pig. The method we adopted is of high specificity and convenience and is helpful to the further study of PERV infection and biosafety.

Key words: PERV; reverse transcriptase; polymerase chain reaction

猪器官、组织和细胞是目前异种组织及细胞移植使用较多的生物材料之一,具有良好的应用前景。近年,自Patience等报道猪逆转录病毒(Porcine endogenous retrovirus, PERV)感染体外培养人细胞来[1~4],跨种族间感染越来越引起人们的重视。为建立简便、特异的PERV感染检测系统,我们选用了PERV特异性引物进行RT-PCR检测,以为进一步研究PERV感染及其生物安全性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

10例动物标本购自我校实验动物中心。其中6例为1周龄中国实验香猪,另2例分别为兔、鼠标本,雄雌不限,并同时收集血清标本。2例HBV、HCV阳性血清标本及2例HBV、HCV阳性患者肝脏标本、2例正常人肝脏及血清标本均由我所提供。

1.2 标本收集

动物肝脏组织在净化间收集,标本大小约1 cm×1 cm×1 cm,取材后于液氮冷冻;血液标本收集后离心取上层血清分装;血清HBV、HCV病毒载量分别为10^7和10^5。

1.3 引物设计

参照PREV RNA gag区的序列合成2对引物,由上海生工合成,上游引物序列P1:5′-GCGACCCACGCAGTTGCATA-3′;下游引物序列P2:5′-CAGTTCCTTGCCCAGTGTCCTT-3′,目的片断为662 bp。套式PCR上游引物序列为P3:5′-TGATCTAGTGAGAGAGGCAGAC-3′;下游引物序列P4:5′-CGCACACTGGTCCTTGTCG-3′,扩增目的片断为262 bp。用β-actin为参照。

1.4 主要试剂和仪器

PCR Markers购自华美生物工程公司;扩增仪为iCyclerPCR仪(美国BIO-RAD公司);RT-PCR试剂盒购自Promga公司,Trizol试剂购自Roche公司,GET DOC2000型凝胶成像仪购自Bio RAD公司(美国)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30027001)
作者简介:郭海涛(1976-),男,江苏省阜宁市人,硕士研究生,医师,主要从事生物人工肝相关基础课题方面的研究。电话:(023)68754475
收稿日期:2002-09-08;修回日期:2002-12-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5　组织中 DNA 的提取

解冻后研碎, 8 ml 消化缓冲液重悬, 50 ℃温育 12~16 h, 等体积酚:氯仿:异戊醇, 1 700× g 离心 10 min, 取上清, 加入 1/2 体积 7.5 mol/L 乙酸铵和 2 体积无水乙醇, 1 700× g 离心 2 min, 70%乙醇洗涤制成 PCR 模板。

1.6　血清总 RNA 提取

按 Trizol 试剂操作说明提取血清总 RNA。干燥、沉淀后作逆转录。

1.7　PCR 扩增

100 μl 反应体系中含 0.5 μmol/L 引物, 200 μmol/L dNTP, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 1 μl 模板, 扩增条件: 95 ℃, 10 min; 95 ℃, 1 min; 55 ℃, 1 min; 72 ℃, 1 min; 72 ℃, 1 min; 共 35 个循环。产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后于凝胶成像仪上拍照。参照 DNA Marker, 在 662 bp 处出现特异性扩增核酸带为阳性, 而β-actin 在 323 bp 处出现条带为阳性。

1.8　RT-PCR 扩增

血清 RNA 抽提后, 其 RT-PCR 扩增按 Promga 公司试剂盒进行, 稍作变动。提高镁离子浓度为 1.5 mmol/L, 逆转录温度不变, 余扩增条件同 PCR, 以未行逆转录 PCR 作对照。

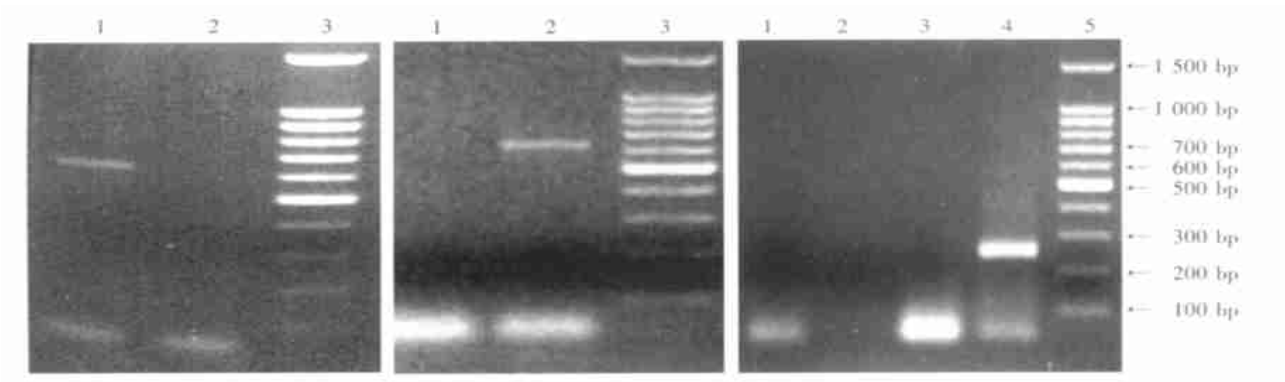
1.9　扩增产物鉴定

使用套式 PCR 鉴定扩增产物, 取扩增产物 5 μl, 加入内循环引物按上述条件进行再次扩增, 在 262 bp 处出现特异性扩增核酸带为阳性。

2　结果

2.1　PCR 扩增

在 6 例中国实验香猪肝脏标本中均可检测出 PERV 前病毒序列, 阳性率为 100%, 而在兔、鼠、正常人及 HBV、HCV 感染患者肝脏中均未检测出其前病毒序列, 见图 1。



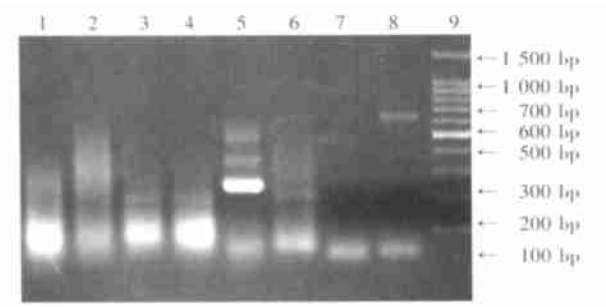
Left 1: porcine liver tissue; 2: rabbit liver tissue; 3: Marker; Middle 1: rat liver tissue; 2: porcine liver tissue; 3: Marker; Right 1: normal human liver tissue; 2: HBV positive liver tissue; 3: HCV positive liver tissue; 4: second PCR of porcine liver tissue; 5: Marker

图 1　PCR 检测 PERV 前病毒序列

Fig 1　Detection of PERV proviral DNA in different liver tissues by PCR

2.2　血清 RT-PCR 扩增

图 2 可见, 在中国实验香猪血清标本中均可检测出 PERV RNA 序列, 而在正常人、HBV、HCV 感染患者血清以及其它动物血清中均未检测出其病毒序列。



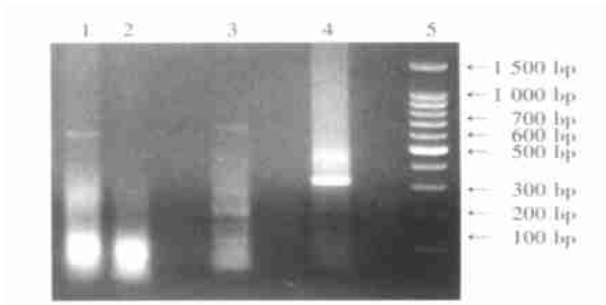
1: normal human plasma; 2: HBV positive plasma; 3: HCV positive plasma; 4: rabbit positive plasma; 5: second PCR of PERV RNA from porcine plasma; 6: HCV positive plasma; 7: no RT PCR of porcine plasma; 8: RT-PCR of porcine plasma; 9: Marker

图 2　RT-PCR 检测血清 PERV 序列

Fig 2　Detection of PERV gene sequence in different serums by RT-PCR

2.3　反应条件的优化

镁离子浓度的选择: 配制镁离子浓度分别为 1.0、1.5、3.0 mmol/L 的浓度体系进行 RT-PCR 扩增, 镁离子浓度为 1.5 mmol/L 时条带相对清晰, 见图 3。



Mg^{2+} concentration; 1: 1.5 mmol/L; 2: 3.0 mmol/L; 3: 1.0 mmol/L; 4: positive control of kit; 5: Marker

图 3　镁离子浓度选择

Fig 3　Selection of different Mg ionic concerntration

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

猪的组织、器官和细胞一直是异种移植较为理想的供体来源，自1997年来，有报道PERV感染体外培养人细胞，并建立了PERV感染SCID鼠的动物模型[5,6]，跨种族间感染及异种移植的生物安全性越来越受到重视。

PERV是一类C型逆转录病毒，颗粒大小约为110 nm，自Patience[1]报道PERV感染体外培养人细胞，PERV的携带及感染问题越来越受到重视。Switzer等[7]较早使用PCR或RT-PCR方法检测PERV，并且在猪血清或组织细胞培养上清中亦检测到病毒颗粒，发现在某些患者血浆中可出现PERV-RNA水平升高，但未检测到可提示活动性PERV感染的猪组织细胞微嵌合体的存在。目前大多数检测方法采用对gag、pro/pol序列进行扩增，其主要原因是这些片断在不同变体中较为保守，一对引物可检测出已知及未知的PERV，甚至可测出含有同源序列的亚型，对发现新型病毒亚型有一定的意义，而且这些引物对在其它逆转录病毒阳性患者(如HIV、HTLV)血液样本中未发现交叉反应现象。

根据PERV前病毒及RNA序列，选用特异性引物，可用于肝脏、皮肤等组织PERV序列检测；使用RT-PCR方法检测血清中PERV RNA序列，除严格操作外，并用未逆转录的PCR作为对照以明确无DNA污染。由于尚未见该病毒在猪体内可引起某种疾病文献报道，但病毒是否释放及其载量如何应引起关注，血清中检测到该病毒，对今后异种移植动物的选择有一定的意义。

RT-PCR反应条件的选择是建立本法的关键，适当提高镁离子浓度可提高目的片段的清晰度；本方法只能扩增检出PERV，不能检出HCV及HBV病毒，对其它实验动物的检测均为阴性，同时对照组亦为阴性，说明本法是特异的。

人类在使用异种生物的组织或器官的同时，亦面临着来自生物界不同种族的威胁。逆转录病毒基因组可能与人类基因组进行重组，并可能整合到人基因组中，不仅影响到个体本身，还可能遗传给后代。亦有可能经过筛选、适应而变成能够在人体内生存的新型病毒。再加之，目前低水平的感染尚不能检测、病毒感染途径还不很清楚、对患者远期评估尚无足够的长期随访证据。因此，PERV的实验室监测对使用异种生物材料的生物安全性十分重要，对已行异种移植的患者进行外周血及血清监测、对灵长类动物进行长期研究、对使用猪源性组织进行生物人工肝及细胞移植等治疗的患者进行监测，以期并尽快阐明PERV感染可能性、感染途径及方式等，以推动生物人工肝及细胞移植的广泛开展。

参考文献：

[1] Patience C, Takeuchi Y, Weiss R A. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs[J]. Nat Med, 1997, 3(3): 282－286.

[2] Weisis R A. Xenografts and retroviruses[J]. Science, 1999, 285(5431): 1221－1222

[3] Birmingham K. FDA subcommittee finds no evidence of PERV transmission [J]. Nat Med, 1999, 5(8): 855.

[4] Tacke S J, Kurth R, Denner J. Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation[J]? Virology, 2000, 268(1): 87－93.

[5] Van der Laan L J, Lockey C, Griffeth B C, *et al*. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice[J]. Nature, 2000, 407(6800): 90－94

[6] Deng Y M, Tuch B E, Rawlinson W D. Transmission of porcine endogenous retroviruses in severe combined immunodeficient mice xenotransplanted with fetal porcine pancreatic cells[J]. Transplantation, 2000, 70(7): 1010－1016.

[7] Switzer W M, Shanmugam V, Chapman L, *et al*. Polymerase chain reaction assays for the diagnosis of infection with the porcine endogenous retrovirus and the detection of pig cells in human and nonhuman recipients of pig xenografts[J]. Transplantation, 1999, 68(2): 183－188.

(编辑 王 红)

(上接477页)

讨论

术前判断垂体腺瘤组织质地的软硬度，对垂体腺瘤的手术选择准备及预后有重要意义。

临床症状和体征：临床表现主要有肢端肥大症、巨人症，其肿瘤组织质地较软。症状以泌乳、停经及月经紊乱病人，多数肿瘤组织质地也较软。Cushing综合征主要临床表现，如肥胖、皮肤粗糙、毛发增多等，其肿瘤质地较硬。

神经影像学检查：CT平扫肿瘤为低、等密度，增强CT明显，提示肿瘤质地软，其肿瘤血丰富。CT检查示肿瘤为高密度，CT无明显增强或无增强，提示肿瘤质地较硬。MRI检查：T_1为等信号、低信号，T_2高信号，MRI有增强，提示肿瘤质地较软，其肿瘤血丰富。MRI：T_1为低、等信号，在T_2上显示较低信号强度的垂体瘤质地较韧。T_1为高信号，T_2为高信号，提示肿瘤有出血[1]。

内分泌激素测定：GH、PRL分泌明显增高的垂体腺瘤组织质地软。ACTH增高的肿瘤组织质地较硬。

手术效果与肿瘤的大小、发展方向以及质地有关，质地坚韧的肿瘤往往难以获得满意的切除。特别是肿瘤质地的软、硬、韧度对于手术中切除肿瘤多少有直接关系，所以术前的对垂体腺瘤组织质地的判定有一定的临床实际意义。

关键词：垂体；腺瘤；手术，外科

中图法分类号：R736.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] 许百男，徐新民，张 记，等. 大型垂体腺瘤手术入路选择[J]. 中华神经外科杂志，1998，14(5)：313－314.

(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net