

技术与方法

不同 DNA 提取法对腺病毒和细小病毒
PCR 检测效果评估

王汉中

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘要: 分别利用硫氰酸胍 (Guanidine thiocyanate, GuSCN) 抽提法、螯合树脂处理法和蛋白酶 K-酚/氯仿抽提法从粪便样品中制备腺病毒 DNA (dsDNA) 或细小病毒 DNA (ssDNA) 然后进行 PCR 检测。结果显示硫氰酸胍抽提法、螯合树脂处理法能有效地去除粪便中影响 PCR 扩增的抑制物, 提高 PCR 检测的敏感性, 而传统蛋白酶 K-酚/氯仿抽提法不能有效地去除 PCR 扩增的抑制物, 影响 PCR 检测结果。在检测粪便中腺病毒时, 硫氰酸胍、螯合树脂和蛋白酶-酚/氯仿抽提法分别允许检测 5TCID_{50} 、 50TCID_{50} 、 50TCID_{50} 的病毒滴度。在用硫氰酸胍、螯合树脂和蛋白酶-酚/氯仿抽提法制备粪便中猪细小病毒核酸进行 PCR 检测时, 3 种方法分别可检测 10TCID_{50} 、 50TCID_{50} 、 100TCID_{50} 的病毒滴度。结果也显示硫氰酸胍、螯合树脂制备法具有价格便宜、检测速度快、灵敏度高等特点, 适合于临床检测。

关键词: PCR, 抑制物, DNA 抽提

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0072-05

EVALUATION OF SENSITIVITY OF PCR AMPLIFICATION FOR ADENOVIRUS
AND PORCINE PARVOVIRUS DETECTION BY THREE DIFFERENT METHODS

WANG Han-Zhong

(Wuhan Institute of virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

Abstract: Using specimens spiked with adenovirus or porcine parvovirus, several DNA extraction methods were evaluated for their ability to remove polymerase chain reaction (PCR) inhibitors from stool samples. It was found that PCR inhibition could be partially overcome by extracting viral DNA with guanidine thiocyanate (GuSCN) or chelex resin methods, but PCR inhibition could be hardly overcome by extracting viral DNA with traditional proteinase-K phenol chloroform extraction method. For adenovirus (dsDNA) in stool samples, GuSCN, chelex resin, proteinase-K phenol chloroform methods respectively allowed 5TCID_{50} , 50TCID_{50} , 50TCID_{50} titer to be detected. For porcine parvovirus (ssDNA) in stool samples, three protocols respectively allowed 10TCID_{50} , 50TCID_{50} , 100TCID_{50} to be detected. Their rapidity and low cost make GuSCN and chelex resin extraction methods the suitable for routine diagnostic testing.

Key words: PCR, Inhibitor, DNA extraction

自从 1985 年发明 PCR 体外扩增技术后, PCR 技术已在生物学各个领域得到广泛的应用, 尤其在临床诊断中, PCR 已成为快速、灵敏的人和动物病毒性病原临床检测方法。但 PCR 技术在实际应用中经常会出现假阳性和假阴性结果, 主要原因是临床样品中含有多种影响 PCR 扩增的抑制物。例如粪便和尿样中含有能螯合 Taq DNA 聚合酶活性所必需的 Mg^{+2} 离子的 EDTA^[1], 结果降低了 Taq DNA 聚合酶的活性, 导致假阴性结果的产生。样品中可能含有 DNase 能降解寡聚核苷酸引物和模板 DNA^[2]。有些研究发现类

收稿日期: 2001-04-05, 修回日期: 2001-06-10

便和尿样中含有血红素^[3]、酚^[4]、多胺^[5]、多糖^[6]都能抑制 Taq DNA 聚合酶活性。为了防止假阴性和假阳性结果的出现,寻找一种简单、快速和有效去除 Taq DNA 聚合酶抑制物的核酸制备方法是临床检测中一个非常重要的环节。应用蛋白酶 K-酚/氯仿抽提法、GuScN (Guanidine thiocyanate 硫氰酸胍) 处理法、螯合树脂处理法分别从猪细小病毒(ssDNA)和腺病毒(dsDNA)中制备核酸进行 PCR 扩增,并比较了 3 种核酸制备方法对 PCR 扩增敏感性的影响以及去除临床样品中影响 PCR 扩增敏感性的抑制物的能力。

利用 3 种不同的核酸制备方法制备这两种不同核酸类型的病毒核酸,成功地进行了 PCR 检测,结果证明 GuScN 和螯合树脂两种核酸制备方法有助于减少 PCR 临床检测中的假阳性或假阴性结果,保证检测结果的灵敏性和准确性。

1 材料与方 法

1.1 细胞与病毒

猪细小病毒由本实验室分离和保存。病毒细胞培养与病毒增殖见文献[7]。将猪细小病毒按 0.01 个感染复数接种到生长良好的单层细胞上,培养 72~86h 后收集细胞悬液,反复冻融,置-20℃保存待用。

腺病毒由本实验室分离和保存。将病毒悬液接种与 239 细胞上,37℃培养 3~4d 后观察细胞病变,直至 70%~90%的细胞产生病变后收集细胞悬液,-20℃保存待用。

1.2 核酸提取方法

1.2.1 蛋白酶 K-酚/氯仿抽提法:见文献[7]。

1.2.2 GuScN 处理法:将 0.5mL 的细胞悬液同 2mL 裂解液〔6 mol/L GuScN, 0.5% N-十二烷基酰肌氨酸(N-Lauroyl sarcosine)、1mmol/L 二硫苏糖醇、300mmol/L 醋酸钠、20μg 糖原〕震荡混合后,置室温下 10min,加入 10~20μg 酵母 tRNA,用酚/氯仿抽提两次,经 2 倍体积乙醇沉淀核酸,-20℃过夜,样品经 14000r/min 离心 30min 后,去上清,用 70%乙醇洗涤沉淀 1 次,真空干燥,将沉淀溶入 40μL 去离子水中。

1.2.3 螯合树脂处理法:见文献[7]。

1.3 引物的设计及序列

表 1 分别显示检测猪细小病毒 ssDNA 的引物和检测腺病毒 dsDNA 的引物所位于的基因区域、位点、核苷酸序列以及预期 PCR 扩增产物的大小。

由于腺病毒具有很多不同的亚型和血清型,因而从腺病毒的保守基因-六邻体基因中选择一对核苷酸序列作引物。

表 1 PCR 引物在病毒基因组中的位置、核苷酸序列以及 PCR 产物的大小

病毒名称	核酸类型	基因区域	核苷酸序列	产物大小
猪细小病毒	ssDNA	VP2	5'-GCAGTACCAATTCATCTTCT-3'	180bp
			5'-TGCCTCTCCTTCGTGGTACG-3'	
腺病毒	dsDNA	Hexon	5'-GCCGCAGTGGCTTACATGCACATC-3'	300bp
			5'-CAGCACGCCGCCGATGTCAAAGT-3'	

1.4 PCR 扩增条件

根据引物具有不同的 Tm 值,选择最佳的退火温度。为了提高 PCR 产物的特异性,在 PCR 扩增的前五个循环采用较高的退火温度,即采用低于引物 Tm 值 2℃的退火温度,而后 25 个循环则采用较低的退火温度,具体步骤见文献[7, 10]。

1.5 3种核酸制备方法在腺病毒和细小病毒的 PCR 检测中敏感性的比较

为了比较 3 种核酸制备方法对不同类型核酸的提取效果以及除掉影响 PCR 扩增效果的抑制物的能力, 作者采用两种不同的实验比较了它们之间的敏感性。方法 1 分别在敏感细胞中测定细小病毒和腺病毒的 $TCID_{50}$, 将病毒悬液稀释成 $200TCID_{50}$ 、 $100TCID_{50}$ 、 $10TCID_{50}$ 、 $1TCID_{50}$ 等不同稀释度, 随后分别采用这 3 种方法制备核酸, 进行 PCR 扩增, 比较这 3 种方法在制备不同类型核酸时对 PCR 敏感性的影响。方法 2 将稀释成 $200TCID_{50}$ 、 $100TCID_{50}$ 、 $10TCID_{50}$ 、 $1TCID_{50}$ 等不同浓度的两种病毒悬液分别同猪粪便或人粪便混合 ($100\mu\text{L}$ 克粪便), 再用这 3 种不同的核酸制备方法制备核酸进行 PCR 扩增, 比较这 3 种方法去除影响 PCR 扩增敏感性的有害物质的能力以及用于临床检测的价值。

1.6 PCR 扩增产物的鉴定

取 $10\mu\text{L}$ PCR 扩增产物, 于 0.7% 琼脂糖凝胶电泳 (200V, 30min, 随后用溴化乙锭染色, 在紫外灯下观察结果。根据标准 DNA 分子量判定产物的分子量大小。

2 结果

2.1 分别利用 3 种不同的核酸制备方法从细胞悬液中制备腺病毒 dsDNA 和细小病毒 ssDNA 进行 PCR 检测结果

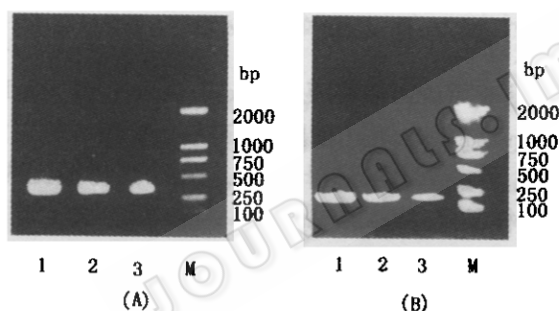


图 1 3 种不同核酸制备方法

A 分别利用 3 种不同的核酸制备方法从细胞悬液中制备腺病毒 dsDNA PCR 检测结果, B 分别利用 3 种不同的核酸制备方法从细胞悬液中制备猪细小病毒 ssDNA 进行 PCR 检测结果, A1: GuScN , A2: PK, A3: 螯合树脂, M: 标准 DNA 分子量 DL2000, B1: GuScN , B2: PK, B3: 螯合树脂, M: 标准 DNA 分子量 DL2000, 腺病毒 PCR 产物的分子量为 300bp, 细小病毒 PCR 产物的分子量为 180bp

图 1A 分别利用 3 种不同的核酸制备方法从细胞培养悬液中制备腺病毒核酸 (dsDNA) 进行 PCR 检测的结果。图 1B 为分别利用 3 种不同的核酸制备方法从细胞培养悬液中制备猪细小病毒核酸 (ssDNA) 进行 PCR 检测的结果。结果显示这 3 种制备方法都能有效地从细胞培养液中制备 dsDNA 和 ssDNA, PCR 检测结果呈阳性, PCR 产物大小和预期的一致。

2.2 3 种不同核酸制备方法在腺病毒和细小病毒 PCR 检测中敏感性的比较 (图 2)

图 2-1 为 3 种不同的核酸制备方法从细胞培养悬液中制备腺病毒 (dsDNA) 进行 PCR 扩增效果比较。结果表明蛋白酶 K-酚/氯仿抽提法和 GuScN 处理具有相同敏感性, 都能检测 $1 TCID_{50}$ 病毒滴度, 而螯合树脂处理法也能检测 $10TCID_{50}$ 的病毒滴度。

图 2-2 为 3 种不同的核酸制备方法从粪便样品中制备腺病毒核酸进行 PCR 检测结果比较。结果显示 GuScN 具有良好地去除粪便中抑制物能力, 其检测敏感性仍可达到 $5 TCID_{50}$ 。而蛋白酶 K-酚/氯仿处理法去除 PCR 抑制物的能力有限, 检测敏感性仅达到 $50 TCID_{50}$, 其检测敏感性大幅下降 50 倍。和图 2-1 的结果相比, 螯合树脂处理法显示出良好的去除 PCR 抑制物的能力, 仍可检测 $50 TCID_{50}$ 的病毒滴度, 其检测敏感性仅下

降 5 倍。

图 2-3 为 3 种不同的核酸制备方法细胞培养悬液中制备细小病毒核酸 (ssDNA) 的 PCR 检测结果。由于细胞培养液中含有 PCR 抑制物较少, 因而 3 种方法都能获得较高的检测敏感性, 其检测滴度分别达到 5、1、5TCID₅₀。

图 2-4 为 3 种不同的核酸制备方法从粪便样品中制备细小病毒核酸的 PCR 检测结果。和图 2-3 的结果相比, 检测灵敏度分别下降至 100、10 和 50-TCID₅₀。从中可以看出蛋白酶 K-酚/氯仿制备法去除 PCR 抑制物的能力最差, 因而 PCR 检测灵敏度大幅度下降。而 GuScN 和螯合树脂处理法都具有良好的去除 PCR 抑制物的能力, PCR 检测灵敏度仅小幅度下降。

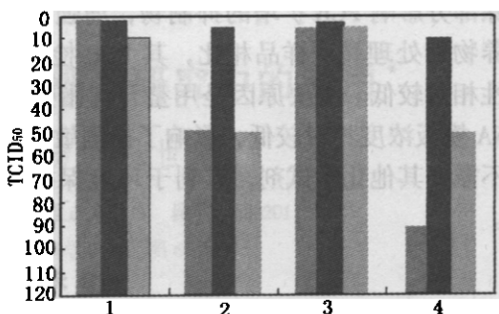


图 2 3 种不同核酸提取方法对腺病毒和猪细小病毒 PCR 检测敏感性的比较

■ PK, ■ GuScN, ■ 螯合树脂

1 3 种不同的核酸制备方法从细胞培养悬液中制备腺病毒核酸 (dsDNA) 进行 PCR 检测敏感性的比较, 2 3 种不同的核酸制备方法从粪便样品中制备腺病毒核酸 ds (DNA) 进行 PCR 检测敏感性的比较, 3 3 种不同的核酸制备方法从细胞培养悬液中制备细小病毒核酸 (ssDNA) 进行 PCR 检测敏感性的比较, 4 3 种不同的核酸制备方法从粪便样品中制备细小病毒核酸 (ssDNA) 进行 PCR 检测敏感性的比较

3 讨论

为了确保 PCR 检测的特异性和敏感性, 有效去除临床样品中影响 PCR 扩增的抑制物是非常重要的, 很多研究者对此进行了研究。例如, Arnal^[8]等在检测粪便样品中甲肝病毒时发现粪便中的酚、多胺以及某些金属离子对 Taq DNA 聚合酶有明显的抑制作用并利用 7 种不同的核酸提取方法分别从粪便或贝类组织中提取甲肝病毒 RNA, 进行 RT-PCR 临床检测, 比较了 7 种方法去除样品中 PCR 抑制物的能力。而 Behzadbehbani^[9]也比较了 7 种不同的核酸提取方法从尿样中去除血红素、尿素等 PCR 抑制物, 比较了它们对 BK 病毒临床检测的敏感性和特异性的影响。在本文中, 作者采用 3 种不同的核酸提取方法从粪便中制备不同核酸类型 (腺病毒、dsDNA 和细小病毒、ssDNA) 的病毒, 比较了它们消除 PCR 抑制物的能力以及对 dsDNA 病毒或对 ssDNA 病毒临床检测的敏感性和特异性的影响。

GuScN 是一种强细胞裂解试剂, 同时能有效灭活 DNase 和 RNase, 因而常用于从临床样品中制备病毒 DNA 或 RNA, 但有些研究结果证明从粪便和尿样中制备核酸时, GuScN 不能完全除去所有 PCR 反应抑制物, 可能会影响 PCR 检测结果, 产生假阴性。实验结果证明直接从细胞培养物中制备病毒核酸进行 PCR 检测时, GuScN 方法和蛋白酶 K-酚/氯仿制备方法一样具有非常高的敏感性, 都能检测 1TCID₅₀ 的病毒滴度, 而且在腺病毒 (dsDNA) 和细小病毒 (ssDNA) 之间没有差别。在从粪便样品中制备核酸进行 PCR 检测时, 敏感性低于从细胞来源的病毒核酸, 但还是高于蛋白酶 K-酚/氯仿制备方法。这主要是由于传统蛋白酶 K-酚/氯仿法去除 PCR 抑制物的能力更差, 特别不能有效去除粪便中影响 TaqDNA 聚合酶活性的抑制物, 如某些重金属离子、多氨和多糖等抑制物, 因而降低了检测的敏感性。

螯合树脂是一种含有一对亚氨基二醋酸根离子的苯乙烯二乙烯苯聚合物, 对多价金

属离子具有很高亲合能力的螯合试剂。在 PCR 扩增前, 用螯合树脂处理粪便样品能有效去除部分影响 PCR 扩增的抑制物, 增强检测敏感性。实验结果显示螯合树脂处理细胞培养物和处理粪便样品相比, 其 PCR 检测敏感性相似。和 GuScN 方法相比, 其检测敏感性相对较低。主要原因是用螯合树脂处理后, 没有用乙醇沉淀浓缩模板 DNA, 因而 DNA 模板浓度相对较低, 影响了检测敏感性。该方法的主要优点是 DNA 模板制备过程中不需要其他化学试剂, 有利于环境保护, 而且操作过程简单、省时、适用于临床检测。

参 考 文 献

- [1] Greenfield L, White T J. American Society for Microbiology, Washington D C, 1993, 122 ~ 137.
- [2] Mullen G P, Sarpersu E H, Ferrin L J, *et al.* J Biol Chem, 1990, 265: 14327 ~ 14334.
- [3] Mercier B, Giaucher C, Clewley B, *et al.* Nucleic Acid Res, 1990, 18: 5908.
- [4] Katcher H L, Schwartz, Biotechniques 1994, 16: 84 ~ 92.
- [5] Shieh Y S H, Wait P, Tai L, *et al.* J Virol Methods, 1995, 54: 51 ~ 66.
- [6] Shioda M, Murakami-Murofushi K, Biochem. Biophys Res Comm 1987, 146: 61 ~ 66.
- [7] 王汉中, 梁 莉. 病毒学报, 1996, 12 (2): 177 ~ 182.
- [8] Arnal C, Ferre-Aubineau V, Besse B, *et al.* J Virol Methods, 1999, 77: 17 ~ 26.
- [9] Behzadbehahani A, Klapper P E, Vallely Pj, *et al.* J Virol Methods, 1997, 67: 161 ~ 166.
- [10] 王汉中, 王 鸣, 周 毅. 中华检验医学杂志, 2001, 24 (1): 37 ~ 38.