

荧光定量 PCR 检测土拨鼠肝炎病毒核酸方法的建立

范晓旭, 肖 冲, 沈绍伟, 刘江宁

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立土拨鼠肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus, WHV)核酸的荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测方法,应用于土拨鼠肝炎病毒模型的研究。**方法** 分别根据土拨鼠肝炎病毒核心抗原(WHcAg)和表面抗原(WHsAg)的 DNA 序列设计 13 对扩增引物,从中筛选无非特异性扩增及引物二聚体且灵敏度高的引物,用于土拨鼠血清中 WHV DNA 的 Real-time PCR 检测。建立感染土拨鼠肝炎病毒的土拨鼠血清中 WHV 核酸的 Real-time PCR 检测方法。**结果** 根据 WHsAg 基因的 5'端设计的一对引物 WHVSF1 与 WHVSR1,检测灵敏度可达 1×10^1 拷贝/ μL ,病毒拷贝数与 Real-time PCR Ct 值的标准曲线的 R^2 值为 0.997,且电泳未见明显非特异性条带及引物二聚体。**结论** 建立了土拨鼠血清中 WHV DNA 的 Real-time PCR 检测方法,该方法为进一步研究土拨鼠肝炎病毒模型奠定了基础。

【关键词】 土拨鼠肝炎病毒; DNA 检测; 实时荧光定量 PCR

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)06-0057-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.06.013

Establishment of Real-time PCR Method for Detection of Woodchuck Hepatitis Virus DNA

FAN Xiao-xu, XIAO Chong, SHEN Shao-wei, LIU Jiang-ning

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish Real-time PCR method for detection of woodchuck hepatitis virus (WHV) DNA. **Methods** 13 pairs of primers were designed according to the coding sequence of woodchuck hepatitis virus core antigen (WHcAg) and woodchuck hepatitis virus surface antigen (WHsAg). The primers demonstrated high sensitivity and specificity were used for Real-time PCR detection of WHV DNA in woodchuck serum. Then, this method was applied in detection of WHV DNA in serum of woodchuck. **Results** The selected primers pair (WHVSF1, WHVSR1) which based on 5' end of WHsAg gene showed a detection limitation of 1×10^1 copies/ μL . The R^2 value of standard curve of viral copy number and the Real-time PCR Ct value was 0.997, and no mixed bands were observed during electrophoresis. **Conclusion** Real-time PCR method for detection of WHV DNA in serum of WHV infected woodchuck was established, which could be used in WHV model.

【Key words】 Woodchuck hepatitis virus (WHV); DNA detection; Real-time PCR

常用的乙肝病毒动物模型包括可感染人乙肝病毒(Hepatitis B virus, HBV)的动物模型和 HBV 相

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费(DWS200901)。

[作者简介] 范晓旭(1980-),男,硕士生,研究方向:比较医学。

[通讯作者] 刘江宁, E-mail: ljn_zb03038@126.com。

关病毒的动物模型,前者如黑猩猩乙型肝炎模型、树鼩乙型肝炎模型;后者如土拨鼠肝炎病毒模型、鸭乙型肝炎模型;HBV 转基因小鼠模型;人鼠肝脏嵌合体小鼠模型等^[1]。1978 年 Summers^[2] 在美国费城动物园的土拨鼠体内发现土拨鼠肝炎病毒 (WHV)。WHV 与 HBV 同属嗜肝病毒科正肝病毒属,WHV 与 HBV 的核苷酸序列同源性达到 70% 以上,且二者在形态学、基因组结构、基因产物、复制过程等方面都非常相似^[3-5]。并且 WHV 感染土拨鼠后的自然经过如慢性肝炎、肝癌等也与 HBV 感染人类后的疾病进程和特征类似^[6,7],因此,土拨鼠肝炎病毒模型已经成为国内外公认的有效动物模型。

在土拨鼠肝炎病毒感染模型中,WHV DNA 是常用的检测指标^[8],可以通过检测 WHV DNA 来筛查待测土拨鼠血清是否存在 WHV 感染,并可通过实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术计算出病毒拷贝数。国外文献虽然有关于土拨鼠肝炎病毒核酸的实时荧光定量 PCR 检测方法的报道^[9],但实验发现,文献中报道的引物在 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μL 的范围内区分度并不理想。

本实验中,我们针对 WHsAg 和 WHcAg 基因设计 13 对扩增引物,从中筛选无非特异性扩增及引物

二聚体且灵敏度高的引物进行 Real-time PCR 检测,建立了土拨鼠肝炎病毒核酸的 Real-time PCR 检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器和试剂

StepOne 实时荧光定量 PCR 系统(美国 ABI 公司)、Power SYBR® Green PCR Master Mix(美国 ABI 公司)、MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 4.0(Takara 公司)

1.1.2 WHV 全基因组由中美泰和公司按照 WHV 7(NCBI 存储号: M18752.1)序列合成。

1.1.3 土拨鼠血清

由中国医学科学院医学实验动物研究所北方资源中心土拨鼠繁育基地提供。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计合成

采用 DNAMAN 软件分析源于 NCBI 的 WHV 全基因组序列,于 WHcAg 和 WHsAg 基因的保守序列处设计引物,见表 1。引物均由 Invitrogen 生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 设计引物列表
Tab.1 Primers used in this experiment

编号 No.	名称 Name	序列 Sequence	所在蛋白 Protein	扩增片段 Amplicon size (bp)
1	WHVCF1	GACATAGATCCCTATAAAG	WHcAg	300
	WHVCR1	ACTTTGTCTCACCTTAAGTCC	WHcAg	
2	WHVCF2	TGGTTTCATTGTCTATGCTC	WHcAg	261
	WHVCR2	GCAGTTGGCAGATGGAGATTG	WHcAg	
3	WHVCF3	GAGCTAACAGGTAGGGAAC	WHcAg	300
	WHVCR3	GAGAATGGGTGCATTAGGAG	WHcAg	
4	WHVSF1	GGCAACAACATAAAAGTCAC	WHsAg	360
	WHVSR1	AACTAAACCACGTGGTATGTC	WHsAg	
5	WHVSF2	GAAATCAAACCTGGGCC	WHsAg	360
	WHVSR2	TCCGAGGAGTCTAGGAGAC	WHsAg	
6	WHVSF3	GAGATGTCACCATCAAGTC	WHsAg	330
	WHVSR3	TGTTGTGGGTTGAAGAGGACAG	WHsAg	
7	WHVSF4	TTGTTGGTTCTCCTGGAC	WHsAg	393
	WHVSR4	AATGTATACCCAAATCAAG	WHsAg	
8	WHVNSF1	GGCAACAACATAAAAGTCAC	WHsAg	300
	WHVNSR1	GAAAGTTTGAGCTGATTG	WHsAg	
9	WHVNSF2	GAAATCAAACCTGGGCC	WHsAg	300
	WHVNSR2	CGTCGAGGGAGGAGACAATATG	WHsAg	
10	WHVNSF3	ACAACAACGGAACGCCAACAC	WHsAg	300
	WHVNSR3	GTGTTTGCAAGTTTGGAAGCTG	WHsAg	
11	WHVNSF4	ATAGCTCAGAATCTAGATTGG	WHsAg	300
	WHVNSR4	TTGTGCAGAG ATTGTGCATTG	WHsAg	
12	WHVNSF5	GCACAAGACATGTATACTC	WHsAg	297
	WHVNSR5	AATGTATACCCAAATCAAG	WHsAg	

此外,选取文献^[9]中报道的引物 WHV-F: 5'-TCCGTGTTGCTTGGTCTTCA-3'、WHV-R: 5'-TCACGGTGAATCCATGGTT-3'作为对照。

1.2.2 土拨鼠血清中 WHV DNA 的提取

应用 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 4.0 提取土拨鼠血清中的 WHV DNA。

1.2.3 Real-time PCR

1.2.3.1 标准曲线的建立

将携带 WHV 全基因组的质粒以 10 倍梯度系列稀释作为模板,稀释范围为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μL ,使用 Power SYBR[®] Green PCR Master Mix 体系,反应体系总体积为 20 μL ,其中引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 25 $\mu\text{mol/L}$ MgCl_2 及 10 $\times$ Reaction buffer 各 1 μL , dNTP 0.5 μL , 模板 1 μL , Power SYBR[®] Green PCR Master Mix 5 μL , rTaq 酶 1U, 三蒸水补齐至 20 μL 。反应条件为: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 10 min 后, 进入循环: 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 循环 40 次, 在每个循环结束后测定吸光值。标准曲线由 StepOne Software v2.0 自动生成。

1.2.3.2 熔点曲线

熔点曲线的测定是从 60 $^\circ\text{C}$ ~ 95 $^\circ\text{C}$ 变性, 每隔 0.3 $^\circ\text{C}$ 测定吸光值。

1.2.3.3 检测方法的应用

以土拨鼠血清中提取的病毒 DNA 为模板, 进行 Real-time PCR 检测, 反应体系及反应条件

同 1.2.3.1。

2 结果

2.1 Real-time PCR 方法的建立

2.1.1 模板梯度扩增曲线

WHV 全基因组质粒从 1×10^8 拷贝/ μL 稀释至 1×10^1 拷贝/ μL , 分别使用表 1 中的各组引物进行 Real-time PCR 扩增, 并以文献中报道的引物为对照, 所得扩增定量曲线见图 1。如图 1A 所示, 文献中报道的引物, 即 WHV-F 与 WHV-R 组, 在 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^3$ 拷贝/ μL 的范围之间具有良好的区分度, 但是 1×10^2 拷贝/ μL 与 1×10^1 拷贝/ μL 的曲线区分度并不理想。图 1B 显示, 第 4 组引物, 即 WHVSF1 与 WHVSR1 组, 1×10^8 拷贝/ μL 样品在 4.03 个循环时进入指数扩增期, 此后的样品依次延迟 3 到 4 个循环, 显示为一组斜率相同, 间距相等的平行曲线。灵敏度为 1×10^1 拷贝/ μL 。

2.1.2 标准曲线

标准曲线由 Step One 根据测得的 Ct 值自动给出, 图 2 显示: WHVSF1 与 WHVSR1 组引物扩增时, 在 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μL 的范围之间, 测定值在一条直线上, 与相应的 Ct 值具有良好的线性相关性, R^2 值为 0.997。

2.1.3 熔点曲线

如图 3 所示, WHVSF1 与 WHVSR1 组引物扩增

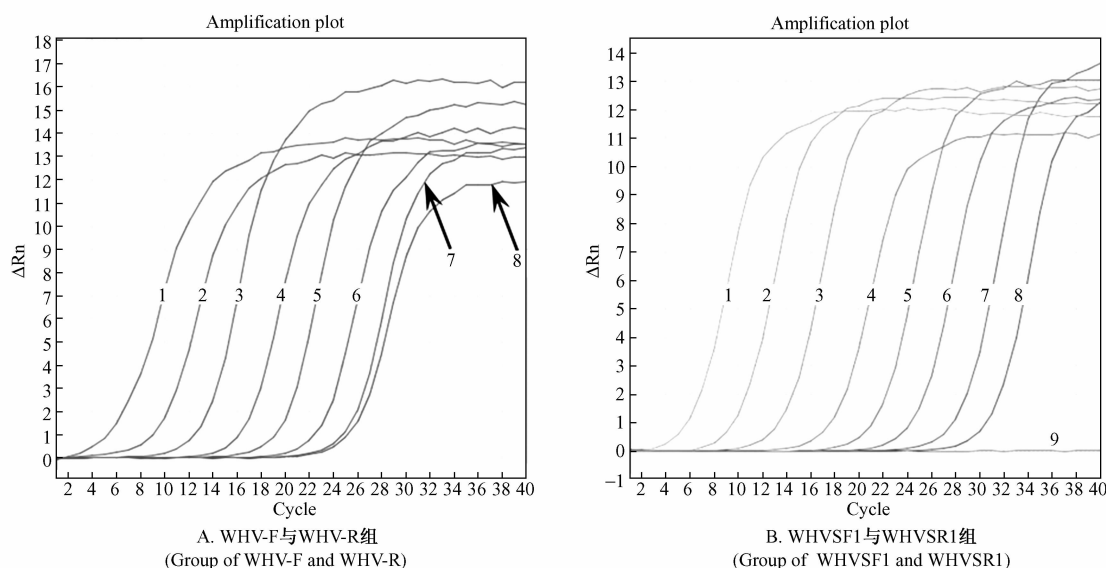


图 1 10 倍系列稀释 WHV 全基因组质粒的定量曲线

Fig. 1 Amplification curve obtained with 10-fold serial dilutions of WHV DNA plasmid

注 (Note): 1: 1×10^8 copies/ μL ; 2: 1×10^7 copies/ μL ; 3: 1×10^6 copies/ μL ; 4: 1×10^5 copies/ μL ; 5: 1×10^4 copies/ μL ; 6: 1×10^3 copies/ μL ; 7: 1×10^2 copies/ μL ; 8: 1×10^1 copies/ μL ; 9: H_2O

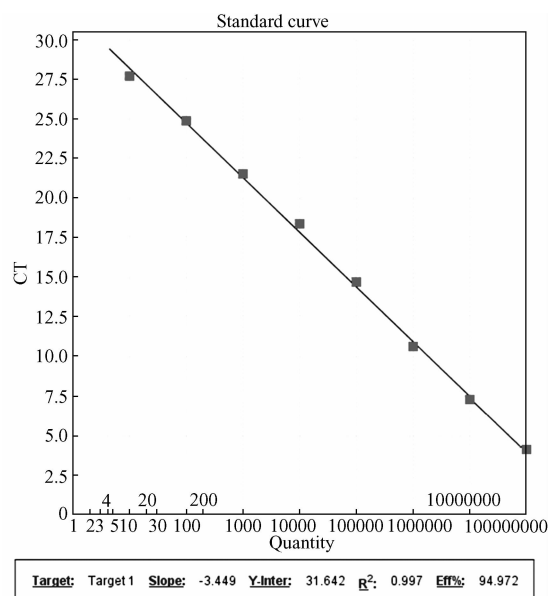


图2 WHVSF1 与 WHVSR1 组 10 倍系列稀释 WHV 全基因组质粒的标准曲线

Fig. 2 The standard curve of 10-fold serial dilutions of WHV DNA plasmid by group WHVSF1 and WHVSR1

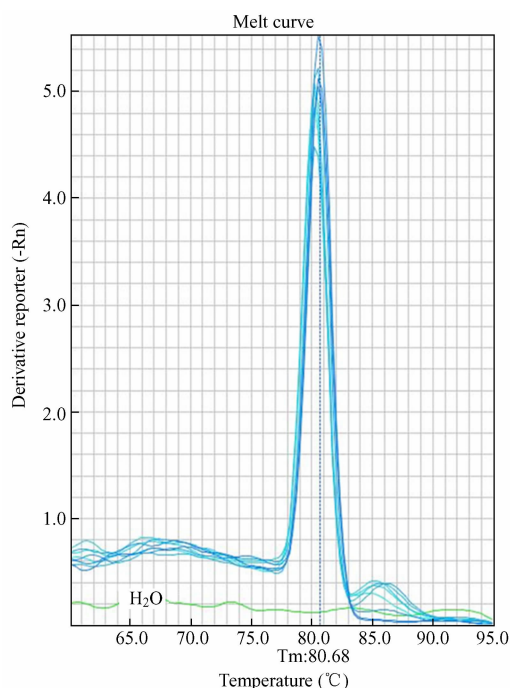


图3 WHVSF1 与 WHVSR1 组 10 倍系列稀释 WHV 全基因组质粒的熔点曲线, 阴性对照是三蒸水

Fig. 3 Melting curve obtained with 10-fold serial dilutions of WHV DNA plasmid by group WHVSF1 and WHVSR1. As a negative control, the template DNA was replaced with 3d water 时,所有 10 倍系列稀释 WHV 全基因组质粒样品均为单一熔点峰,说明无引物二聚体和非特异性扩增产生。阴性对照的三蒸水没有熔点峰。

2.2 Real-time PCR 检测方法的应用

为了验证该方法在检测土拨鼠血清中 WHV DNA 的实用性,使用 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 4.0 从 12 只部分携带 WHV 的土拨鼠血清中提取 DNA,使用 WHVSF1 与 WHVSR1 引物组,按 1.2.3.1 中的反应体系及反应条件进行 Real-time PCR 检测,判断血清中是否存在 WHV 感染并计算拷贝数,结果见表 2。Real-time PCR 阳性土拨鼠血清样品的熔点曲线如图 4A 所示,为单一熔点峰,且与阳性对照一致。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 Real-time PCR 产物,溴化乙锭染色后紫外成像,结果如图 4B 所示。目的条带单一,条带大小与预期设计相符,进一步说明无引物二聚体和非特异性扩增的产生。

表 2 土拨鼠血清 WHV DNA 筛查结果

Tab.2 Result of woodchuck serum WHV DNA screening		
编号 No.	WHV DNA Real-time PCR 结果 Result of WHV DNA Real-time PCR	病毒拷贝数 WHV copies
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	+	$10^{1.57}$
6	-	-
7	-	-
8	+	$10^{1.92}$
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-

3 讨论

WHV 核酸的检测方法主要有 Southern blot 和 Real-time PCR 两种。Southern blot 特异性强,但不能对样品进行准确的定量,不适用于对感染 WHV 土拨鼠的病毒载量进行检测。荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术是近年来发展起来的一项新技术,已广泛应用于各种病原体的检测,并普遍应用于抗病毒药物的评价^[10]。荧光定量 PCR 可以准确检测野生或实验感染 WHV 土拨鼠的病毒载量,更适用于 WHV 感染情况的筛查以及对 WHV 感染情况变化的动态监测^[11]。

本实验发现,文献中报道的引物在高拷贝数范围内(1×10^8 拷贝/ μL ~ 1×10^3 拷贝/ μL)具有良好的区分度,但是 1×10^2 拷贝/ μL 与 1×10^1 拷贝/ μL 的区分度并不理想。

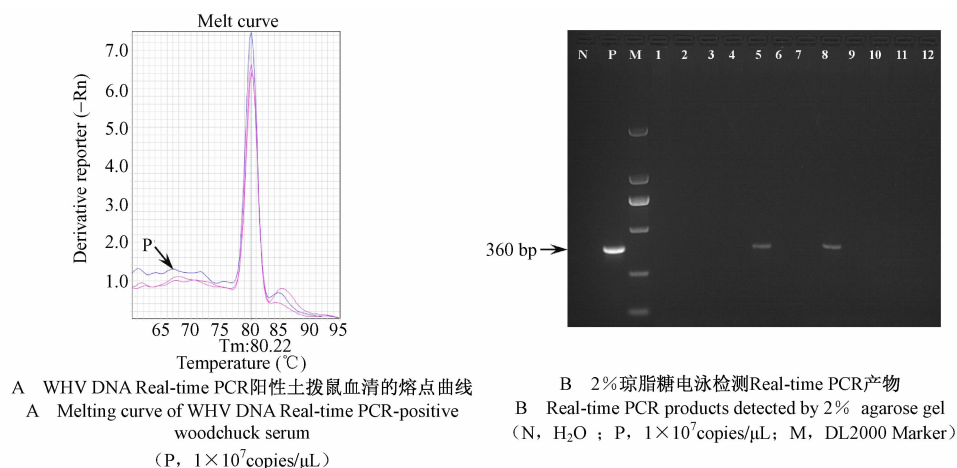


图4 应用 WHVSF1 与 WHVSR1 对土拨鼠血清 WHV DNA 的筛查结果

Fig. 4 Result of woodchuck serum WHV DNA screening by WHVSF1 and WHVSR1

本实验建立的荧光定量 PCR 方法,可检测到 1×10^1 拷贝/ μ L 的 WHV DNA,即在 20 μ L 的反应体系中,如果存在 10 个拷贝的病毒 DNA 即可被检测到。从得到的标准曲线可以看出, 1×10^8 拷贝/ μ L $\sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μ L 的样品在一条直线上, R^2 值为 0.997,且无引物二聚体和非特异性扩增产生,说明此方法准确可靠。标准曲线的建立和对野生土拨鼠进行筛查的结果显示,本实验建立的方法适用于不同基因型的土拨鼠肝炎病毒检测。

综上所述,本实验建立的土拨鼠肝炎病毒核酸检测方法为我国土拨鼠肝炎病毒模型的研究提供方法学基础,具有很好的应用前景。

参考文献:

- [1] Dandri M, Volz TK, Lütgehetmann M, et al. Animal models for the study of HBV replication and its variants[J]. J Clin Virol, 2005, Dec, 34 Suppl 1:S54-62.
- [2] Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75(9):4533-7.
- [3] Gust ID, Burrell CJ, Coulepis AG, et al. Taxonomic classification of human hepatitis B virus[J]. Intervirology, 1986, 25(1):14-29.
- [4] Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy[J]. Science, 1986, 232(4749):477-84.
- [5] Bukhari SS, Tsiquaye KN. Hepadnaviruses, their infections and hepatocellular carcinoma[J]. J Pak Med Assoc, 1990, 40(12):300-6.
- [6] Popper H, Roth L, Purcell RH, et al. Hepatocarcinogenicity of the woodchuck hepatitis virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(3):866-70.
- [7] Tennant BC. Animal models of hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Clin Liver Dis, 2001, 5:43-68.
- [8] Clifford S. Guy, Patricia M. Mulrooney-Cousins, Norma D. Churchill, and Tomasz I. Michalak. Intrahepatic Expression of Genes Affiliated with Innate and Adaptive Immune Responses Immediately after Invasion and during Acute Infection with Woodchuck Hepadnavirus[J]. J Virol, 2008, 82(17):8579-8591.
- [9] D'Ugo E, Kondili LA, Canitano A, et al. Rapid emergence of a viral resistant mutant in WHV chronically infected woodchucks treated with lamivudine and a pre-S/S CHO-derived hepatitis B virus vaccine[J]. Vaccine, 2007, 25:4895-4902.
- [10] MacKay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology[J]. Nucl Acids Res, 2002, 30:1292-305.
- [11] Glebe D, Lorenz H, Gerlich WH, et al. Correlation of Virus and Host Response Markers with Circulating Immune Complexes during Acute and Chronic Woodchuck Hepatitis Virus Infection[J]. J Virol, 2009, 83(4):1579-1591.

[修回日期]2012-03-31