技术方法

树鼩腺病毒(TAV)PCR 方法的建立及初步应用

王淑菁,付 瑞,李晓波,王 吉,卫 礼,巩 薇,贺争鸣,岳秉飞

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所;国家实验动物质量检测中心,北京 100050)

【摘要】 目的 建立树鼩腺病毒(TAV)PCR 检测方法,并进行初步应用。**方法** 根据 NCBI 公布的 TAV 基因组序列,选择 19418-19917 区域人工合成一段 DNA 序列并转入质粒中,作为阳性标准质粒。设计 1 对特异性引物建立 TAV PCR 检测方法,考察其特异性和灵敏度。应用该 PCR 方法对 60 份树鼩血 DNA 及 56 份树鼩粪便 DNA 进行检测。**结果** 所建立的 PCR 检测方法经特异性和灵敏度测定,最低可检测 13.5 x10^{-7} μg/mL,与其他腺病毒无交叉,特异性好,灵敏度较高。60 份树鼩血 DNA 检测均为阴性,56 份树鼩粪便 DNA 检测有 24 份阳性,通过测序证实树鼩粪便中 TAV 感染率为 42.9%,与扩增结果一致。**结论** 建立的树鼩腺病毒 PCR 检测方法特异性强,灵敏度高,可用于树鼩腺病毒的常规检测中。

【关键词】 树鼩;腺病毒;PCR;检测

【中图分类号】R33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2014) 12-0042-05

doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2014.012.009

Establishment and application of a PCR method for detection of the *Tupaia* (tree shrew) adenovirus (TAV)

WANG Shu-jing, FU Rui, LI Xiao-bo, WANG Ji, WEI Li, GONG Wei, HE Zheng-ming, YUE Bing-fei

(National Institute for Food and Drug Control, Institute for Laboratory Animal Resources; National Center for Monitoring of Laboratory Animal Health, Beijing 10050, China)

【Abstract】 Objective To establish and apply an effective PCR assay for detection of the *Tupaia* (tree shrew) adenovirus (TAV). **Methods** According to NCBI Genbank, TAV genome DNA from 19418 to 19917 were synthetized and inserted into a plasmid as positive standards. One pair of primers was designed based on this sequence. Sixty blood samples and fifty-six stool samples from tree shrew were detected with this PCR assay. **Results** A PCR method for detection of TAV was successfully established, with a high specificity and the sensitivity was 13.5 ×10^{-7} μg/mL. The PCR results of testing sixty tree shrew blood DNA samples were negative. 24 positive cases were tested among 56 stool DNA samples. Sequencing of the samples confirmed a 42.9% infection rate of TAV in tree shrew stool samples, well consistent with the PCR results. **Conclusions** The PCR method for detecting TAV established in this study has good specificity and high sensitivity, therefore, can be used in conventional detection of tree shrew adenovirus.

【Key words】 Tupaia (tree shrew); Adenovirus; PCR; Detection

树鼩(tree shrew, *Tupaia belangeri*),属于攀鼩目树鼩科,主要生活在热带和亚热带森林、灌丛、村落附近,在东南亚和我国云南、广西、海南、贵州等地有较多分布。树鼩被认为是灵长类最亲密的近

[基金项目]实验动物新品种的种群建立与质量标准化研究(2011BAI15B01);实验动物质量检测关键技术研究(2013BAK11B01)。

[作者简介]王淑菁(1985 -),女,助理研究员,研究方向:实验动物病毒学。Email: wsj2008gogo@163.com。

[通讯作者]岳秉飞(1960 -),男,博士,研究员,研究方向:实验动物遗传学。Email: y6784@126.com。

亲,已有报道表明树鼩非常适合用于研究人体的近视、心理应激和肝炎等问题[1]。因此,树鼩作为一种新型实验动物资源越来越受重视。目前研究中使用的树鼩大多来自野外或驯化后代,实验动物的质量难以保证,其自然携带病毒尚不清楚。将野生树鼩进行人工驯化、饲养、繁殖与规范化管理,对其携带的病毒、细菌、寄生虫指标进行控制,建立标准化的树鼩种群势在必行[2,3]。

腺病毒(adenovirus, ADV)属于腺病毒科。迄今为止已发现至少 100 多种腺病毒可感染人、哺乳动物和禽类。腺病毒可引起多种急性上呼吸道感染、急性眼结膜炎、急性出血性膀胱炎、腹泻等[4]。80 年代以来,国内外学者从野生树鼩的咽拭子、肾组织培养物和粪便中分离出树鼩腺病毒。目前尚未建立相应的树鼩腺病毒血清学和分子生物学检测方法。因此,本研究将建立树鼩腺病毒(TAV)PCR 检测方法,并进行初步应用。

1 材料和方法

1.1 阳性标准质粒和毒种

由于目前无树鼩腺病毒标准毒种及分离株,将构建阳性标准质粒作为阳性对照。查询 NCBI 上树鼩腺病毒(TAV)序列,选择树鼩腺病毒基因组保守特异区域(19418-19917 区域),委托 Takara 公司合成约 500bp 目的片段,插入 pMD18-T 载体,构建阳性标准质粒。禽腺病毒 I 型(CELO VR-432 株)购买于 ATCC,禽腺病毒 III 型(EDS AV127 株)购于中国兽药监察所。猴腺病毒-1 和猴腺病毒 -20 均为本科室保存。

1.2 引物设计

使用 primer 5 软件在 TAV 19418-19917 区域设计引物。上游引物:GCGGAGCGGGTTGTA GGGTA;下游引物:TCGTGCGGCTGGCGTTTT。委托 Takara 公司合成。

1.3 样本采集及 DNA 提取

样本均为云南来源树鼩。无菌采集 60 份树鼩 EDTA 抗凝血,使用 Qiagen 的 Dneasy Blood & Tissue Kit 试剂盒(Cat. No69504)提取血 DNA。采集 56 份树鼩粪便,使用 Qiagen 的 DNA Stool Mini Kit 的试剂盒(Cat. No51504)提取粪便 DNA。详细操作根据产品说明书。

1.4 PCR 扩增体系

PCR 反应体系为 25 μL,包括:10 x PCR buffer 2.5 μL,dNTP 2 μL,ddH_2O 17.35 μL,引物各 1 μL,DNA 1 μL,HS Taq 酶 0.15 μL。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 1 min,退火温度 1 min,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物进行琼脂糖电泳测定。PCR 产物送 Takara 公司进行序列测定。

1.5 特异性测定

将扩增得到的目的片段测序,与 NCBI 序列比对确定是否为特异性片段。提取禽腺病毒 I 型、禽腺 III 型、猴腺病毒-1,猴腺病毒 -20,考察该方法的特异性。

1.6 灵敏度测定

阳性标准质粒的 DNA 浓度为 13.5 μg/mL,将其倍比稀释从 13.5 $\times 10^{0}$ 至 13.5 $\times 10^{-9}$ μg/mL,以考察该 PCR 方法的灵敏度。

1.7 初步应用

使用该 PCR 方法检测 60 份树鼩血 DNA 及 56 份树鼩粪便 DNA。

2 结果

2.1 反应体系的建立

TAV 经特异性扩增得到 495 bp 目的片段,将扩增得到的目的片段经测序后,与 NCBI 网站上的序列一致率为 100%。

2.2 特异性测定

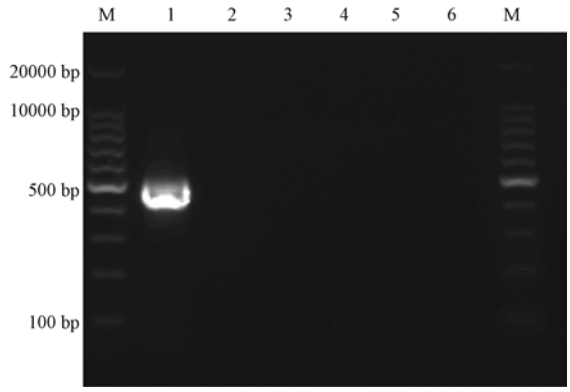
以禽腺病毒 I 型、禽腺 III 型、猴腺病毒-1,猴腺病毒-20 做对照,结果显示仅树鼩腺病毒阳性质粒扩增得到 495 bp 目的片段(图 1)。

2.3 灵敏度测定

倍比稀释树鼩腺病毒阳性质粒 DNA,浓度从 13.5 $\times 10^{0}$ 至 13.5 $\times 10^{-9}$ μg/mL,结果显示其灵敏度至 13.5 $\times 10^{-7}$ μg/mL(图 2)。

2.4 初步应用

提取 60 份树鼩血 DNA,PCR 方法检测树鼩腺病毒结果均为阴性。提取 56 份树鼩粪便 DNA,使用该引物扩增,有些 DNA 样品在 495 bp 左右出现两条疑似条带(图 3)。由于这两条带片段大小十分相近,无法判定哪条是所扩增的目的条带,即 495 bp-A、495 bp-B(图 4),将两条带均切胶纯化后测序。测序得到的序列与 NCBI 网站序列比对,495 bp-A 与树鼩腺病毒序列一致,说明该条带为目的片段;而 495 bp-B 与亚希热菌属序列一致率为 93%,为非特异扩增。此外,将 495 bp-A 与 495 bp-B 比对,无任何相似序列。

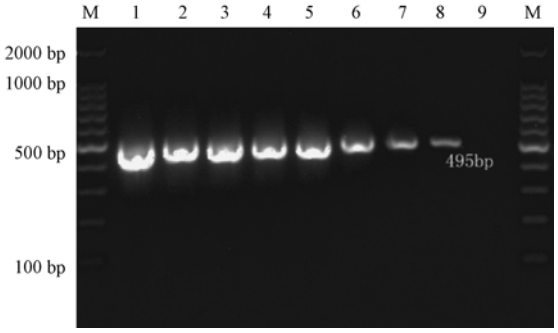


M:100 bp marker;1:树鼩腺病毒阳性质粒;
2:禽腺病毒 I 型;3:禽腺病毒 III 型;
4:猴腺病毒-1;5:猴腺病毒-20;6:阴性对照

图 1 特异性实验

M:100 bp marker;1:TAV positive plasmid;
2:CELO;3:EDS;4:SAdv-1;
5:SAdv-20;6:Negative control

Fig. 1 Specificity of the PCR test

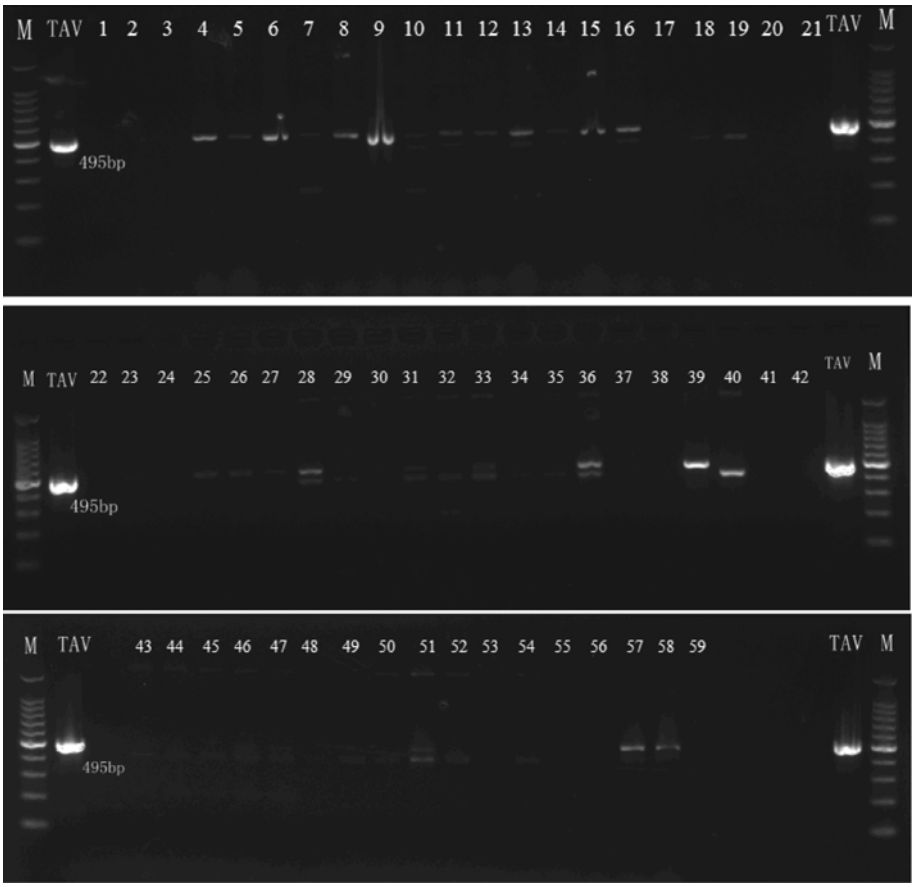


M:100 bp marker; 1:13.5 μg/mL; 2:13.5 $\times 10^{-1}$ μg/ml; 3:13.5 $\times 10^{-2}$ μg/mL; 4:13.5 $\times 10^{-3}$ μg/mL; 5:13.5 $\times 10^{-4}$ μg/mL; 6:13.5 $\times 10^{-5}$ μg/mL; 7:13.5 $\times 10^{-6}$ μg/mL; 8:13.5 $\times 10^{-7}$ μg/mL; 9:13.5 $\times 10^{-8}$ μg/mL.

图 2 灵敏度实验

M:100 bp marker; 1:13.5 μg/mL; 2:13.5 $\times 10^{-1}$ μg/mL; 3:13.5 $\times 10^{-2}$ μg/mL; 4:13.5 $\times 10^{-3}$ μg/mL; 5:13.5 $\times 10^{-4}$ μg/mL; 6:13.5 $\times 10^{-5}$ μg/mL; 7:13.5 $\times 10^{-6}$ μg/mL; 8:13.5 $\times 10^{-7}$ μg/mL; 9:13.5 $\times 10^{-8}$ μg/mL.

Fig. 2 Sensitivity of the PCR test



M:100 bp marker;TAV:树鼩腺病毒阳性质粒;1 – 20、22 – 41、43 – 58: 56 份树鼩粪便 DNA;21、42、59:阴性对照

图 3 56 份树鼩粪便 DNA PCR 扩增结果

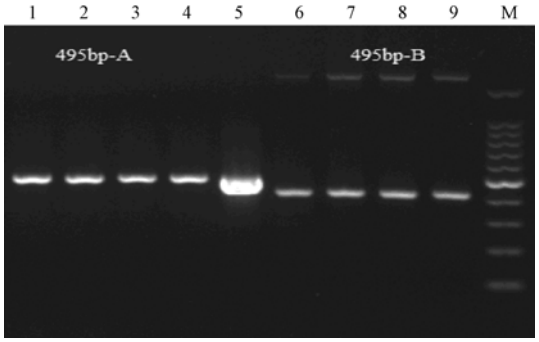
M:100 bp marker;TAV:*Tupaia* (tree shrew) adenovirus positive plasmid;
1 – 20,22 – 41,43 – 58: 56 stool DNA samples of tree shrews; 21,42,59:Negative control

Fig. 3 The PCR results of 56 stool DNA samples of tree shrews

使用 DNAstar 软件将 495 bp-A 序列与 NCBI 网站上提供的树鼩腺病毒、猴腺病毒 I 型、人腺病毒、禽腺病毒 I 型及 III 型序列进行同源性比对，并作出遗传进化树（图 5、6）。由图可知，TAV-495-A 与树鼩腺病毒比对一致率为 100%。与禽腺病毒相比，树鼩腺病毒与同为灵长类的人腺病毒、猴腺病毒 I 型序列同源性最高。

3　讨论

Darai 等[5] 1980 年报道从 38 份树鼩肾组织培养物中分离到 1 株 TAV，能凝集大鼠和人“O”型红细胞。陈元鼎等[6] 1987 年报道，从 90 份成年云南树鼩大便中检测到 12 份腺病毒阳性样本，阳性率为 3%。吴小闲等[7] 1990 年报道，从云南野生树鼩咽拭子、肾细胞培养物和粪便中分离出 10 株 TAV，并鉴定为 2 个血清型（TAV-1 和 TAV-2）。韩建保等[8] 使用人源 ELISA 试剂盒对 272 份野生俘获和人工繁殖的中缅树鼩血清样本进行腺病毒等六种病毒的检测，结果腺病毒 IgG 抗体均为阴性。



M：100 bp marker；1－4：495 bp-A 条带；
5：树鼩腺病毒阳性质粒；6－9：495 bp-B 条带

图 4　测序用 495bp-A 与 495bp-B 片段

M：100 bp marker；1-4：495 bp-A band；
5：TAV positive standard plasmid；6-9：495 bp-B band

Fig. 4　495 bp-A and 495 bp-B bands for sequencing

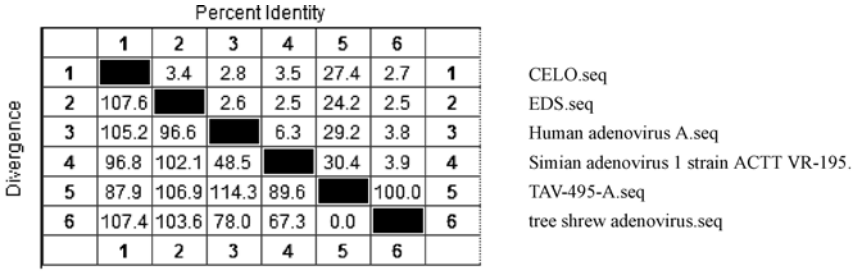


图 5　TAV-495-A 与多个种属腺病毒序列的同源性比较

Fig. 5　Homology comparison of the sequences of TAV-495-A and multiple species adenovirus

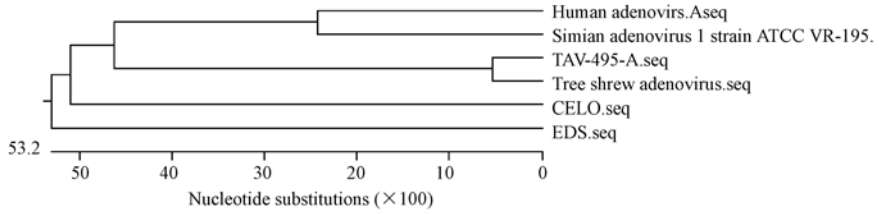


图 6　TAV-495-A 与多个种属腺病毒间的遗传进化树

Fig. 6　Phylogenetic tree for the TAV-495-A and multiple species adenovirus sequences

本研究中由于没有标准毒株及分离株，人工构建了阳性标准质粒作为阳性对照。根据 NCBI 网站提供的 TAV 序列，通过与人腺病毒、猴腺病毒、鼠腺病毒及禽腺病毒的序列比对，选择其特异区域（即 19418-19917 区域）人工合成一段 DNA 序列，插入 pMD18-T 载体，构建了阳性标准质粒。

根据构建的阳性标准质粒的序列，设计 1 对特异性引物，并进行反应体系的优化，建立了 TAV 的 PCR 检测方法，结果显示该方法特异性好，灵敏度可至 13.5 x10^{-7}μg/mL。

使用该 PCR 方法对 60 份树鼩血 DNA 检测，结果均为阴性。对 56 份树鼩粪便 DNA 检测，结果显示有目的条带扩增，此外发现有非特异性条带扩出。由于非特异性条带与目的条带的大小相近，对两个片段均进行测序验证。结果显示，测序证实树鼩粪便中 TAV 感染率为 42.9%，与 PCR 扩增结果一致。非特异条带的测序结果与亚希热菌属序列一致率为 93%，这说明粪便样本中可能存在这类菌属感染。实验中对 56 份树鼩粪便进行 DNA 提取

时,未对粪便进行稀释后除菌过滤,而是将粪便中所含的病毒、细菌 DNA 均进行提取后实验。这提示做病毒 PCR 检测时,最好将样本除菌过滤,以降低细菌的非特异性扩增的几率。

本研究对云南来源树鼩粪便样本检测中,显示腺病毒的阳性率达 42.9%。树鼩作为近年来最有潜力的实验动物之一,并进行系统的实验动物化工作,其病毒感染情况应引起实验动物科技界的足够重视。

参考文献:

[1] 沈培清, 郑红, 刘汝文, 等. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望[J]. 动物学研究, 2011, 32(1): 109-114.

[2] 角建林, 刘汝文, 陈丽玲, 等. 树鼩资源的开发利用与标准化研究——我国实验动物资源建设发展战略探讨[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(7): 73-78.

[3] 贺争鸣. 我国资源动物的实验动物化潜力与展望[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(3):1-7.

[4] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 1104-1129.

[5] Darai G, Matz B, Flügel RM, et al. An adenovirus from tupaia (tree shrew), growth of the virus, characterization of viral DNA and transforming ability[J]. Virology, 1980, 104-122.

[6] 陈元鼎, 戴国珍, 李军, 等. 树鼩大便中腺病毒的实验研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 1987, 3(3): 2-4.

[7] 吴小闲, 唐恩华, 张新生, 等. 树鼩腺病毒(I 和 II 型)的生物学性状、抗原关系和血清抗体的研究[J]. 中国医学科学院学报, 1990, 12(2): 153-156.

[8] 韩建保, 张高红, 段勇, 等. 中缅树鼩自然感染六种病毒的血清流行病学[J]. 动物学研究, 2011, 32(1): 11-16.

〔修回日期〕2014-09-27

(上接第 38 页)

[7] 孟雁, 宋昌, 奥本正昭, 等. 10 个近交系小鼠的微卫星位点分析及其在遗传监测中应用的探讨(一)[J]. 中国实验动物学报,1996, 4(1): 5-9.

[8] 商海涛, 魏泓, 岳秉飞, 等. 应用微卫星标记对三个昆明小鼠封闭群的遗传学研究[J]. 实验动物科学, 2009, 26(2): 1-6.

[9] 朱亮, 蔡月琴, 屠珏, 等. 应用微卫星标记研究 Dunkin Hartley 豚鼠封闭群的遗传背景[J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(1): 51-55.

[10] 刘迪文, 杨伟伟, 吴宝金, 等. 豚鼠基因组 26 个多态性微卫星标记的筛选[J]. 中国实验动物学报,2014, 22(3):78-80.

[11] Burgos-Paz W, Cerón-Munoz M, Solarte-Portilla C. Genetic diversity and population structure of the Guinea pig (*Cavia porcellus*, Rodentia, Caviidae) in Colombia[J]. Genet Mol Biol, 2011,34(4):711-718.

[12] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南(第 3 版)[M]. 北京:科学出版社, 2002:1-47.

[13] Loparev VN, Cartas MA, Monken CE, et al. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents[J]. J Virol Methods, 1991, 34(1):105-112.

[14] Hartl DL, Clark AG. Principles of population genetics[M]. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates ,1989:41-85.

[15] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics ,1978, 89(3): 583-590.

[16] Nei M. Genetic distance between populations[J]. Am Naturalist, 1972, 106: 283-292.

[17] 刘俊娥, 乔传令, 侯鑫, 等. 一个实用的群体遗传学分析软件包—GENEPOP 3. 1 版[J]. 生物多样性, 2000, 8(2): 238-240.

[18] Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. Introduction to Conservation Genetics[M]. Cambridge University Press, 2002, 29-62.

[19] Degorge J. Genetic evaluation of outbred rat in microbial status and genetic evaluation of mice and rats[J]. Proceedings of the 1999 US/Japan Conference, 2000: 47-50.

[20] Kloting I, Nitschke C, Van den Brandt J. Impact of genetic profiles on experimental studies: outbred versus wild rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2003, 189(1): 68-71.

[21] Wright S. Evolution and the Genetics of Populations Variability within and among Natural Populations[M]. 1st edn. Chicago, University of Chicago Press, 1978, 395-486.

〔修回日期〕2014-10-25