

# 血沉标本中人巨细胞病毒 DNA 的检出

孟潞英\* 张文炳 彭华国

(第一军医大学微生物学教研室, 广州 510515)

董自正 石成华

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

**摘要** 用聚合酶链反应 (PCR) 和地高辛标记探针 (dig-probe) 检测临床血沉标本中人巨细胞病毒 (HCMV) DNA。结果表明, 人群血标本中 HCMV-DNA 携带率较高; PCR 技术较 dig-probe 更敏感、快速、简便, 二者检出 HCMV-DNA 阳性率分别为 83.3% 和 60.3%; HCMV-DNA 检出率、HCMV-IgM 检出率与血沉值高低之间无相关性。

**关键词** 人巨细胞病毒 (HCMV), 聚合酶链反应 (PCR), 血沉标本

人巨细胞病毒 (Human Cytomegalovirus, HCMV) 是广泛感染人类的重要病原之一, 尤其是胎儿, 新生儿, 器官移植患者和免疫缺陷患者 (AIDS) 等。感染 HCMV 可形成严重疾病甚至死亡。据国内外报道, 成人 60—90% 以上有 HCMV 抗体<sup>[1]</sup>, 但人群血液中, 尤其在白细胞中 HCMV DNA 携带状况尚未见报道。本文用 digoxigenin 标记探针 (dig-probe) 和聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 检测了 78 份临床血沉标本中的 HCMV DNA,

并对两种方法的检出率、血沉值高低与 HCMV 感染的关系, 以及 IgM 检出与 HCMV DNA 检出的关系作了初步探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒与细胞

HCMV-AD169 株 (北京解放军 302 医院病毒室提供) 用人胚肺细胞 (Human Embryo

1992-02-12 收稿

\* 现在地址: 广深铁路总公司深圳医院, 邮编 518001

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Lung, HEL) 增殖, 待有明显细胞病变时冻融三次, 收集细胞培养液。同时获取单纯疱疹病毒(HSV)和EB病毒培养液(广州市儿童医院病毒室提供)以及正常HEL细胞冻融悬液。

### 1.2 临床标本的收集处理与HCMV-IgM的检测

从第一军医大学附属南方医院门诊检验室收集做血沉值检测后的剩余血标本, 当日用北京解放军302医院病毒室提供的HCMV-IgM检测盒检测。ELISA材料方法按检测盒说明。用淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)提取血标本中的灰黄层, Hank's液洗涤三次,  $-30^{\circ}\text{C}$ 存放。

### 1.3 DNA提取

HCMV、HSV和EBV病毒液, HEL细胞液以及血沉标本灰黄层均用酚抽提法粗提DNA, 即加5/1000体积10%SDS,  $37^{\circ}\text{C}$ 水浴30', 先后用等体积水饱和重蒸酚和氯仿/异戊醇(24:1)抽提1-2次去除蛋白; 加1/10体积NaAc(3mmol/L/pH5.5)和2.5体积无水乙醇 $-30^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀DNA; 后用75%乙醇洗涤两次真空抽干, 加TE缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, 0.1mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH8.0)溶解DNA, 直接用于DNA杂交试验及PCR试验。

### 1.4 Digoxigenin 标记探针及斑点杂交试验

HCMV-AD169株DNA的EcoR I酶切J片段和Hind III酶切L片段(质粒由B. Fleckenstein, University of Erlangen 惠赠)用作探针。Digoxigenin 标记探针方法和斑点杂交试验参照试剂盒说明(DNA Labelling and Detection Kit, Molecular Biology Boehringer Mannheim, West Germany)稍加改进。简言之, 取新鲜变性的EcoR I酶切J片段和Hind III酶切L片段各100ng与4种脱氧核苷(dNTP), dNTP标记混合物(其中含dig dUTP)以及Klenow酶混合,  $37^{\circ}\text{C}$ 过夜, 次日加NaAc和无水乙醇沉淀后, 即为待用的Digoxigenin标记探针(dig-probe)。按常规法于硝酸纤维素膜上点样待检DNA及干烤处理, 加预杂交液 $42^{\circ}\text{C}$ 作用6h, 再加入dig-probe

$42^{\circ}\text{C}$ 杂交18-20h。先后用含有0.1%SDS的2×、1×和0.2×的SSC充分洗膜, 加(dig)碱性磷酸酶标记物室温作用30min, 再加(dig)显色液暗处静置1h-1d, 观察斑点是否呈现紫黑色(阳性)。

### 1.5 HCMV-PCR 试验

引物(Primers, P)的设计同文献[2], 即P<sub>1</sub>: 5'-dGCA GAG CTC GTT TAG TGA ACC-3' (nucleotides-21to-2)和P<sub>2</sub>: 5'-dGGC ACG GGG AAT CCG CGT TCC-3' (nucleotides 91 to 112), P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>由军事医学科学院生物工程所DNA合成仪制备。

每0.5ml无菌塑料离心管中加DNA粗提物10 $\mu\text{l}$ , 8mmol/L dNTP (2mmol/L each dnTP, Perkin-Elmer Cetus) 10 $\mu\text{l}$ , P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>各2 $\mu\text{l}$  (100ng), 10×buffer (170mmol/L 硫酸铵, 670mmol/L Tris-HCl pH8.5, 70mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 100mmol/L 2-巯基乙醇和1.7mg/ml 牛血清蛋白) 10ml, 补足无菌三蒸水至100 $\mu\text{l}$ 。100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸10分钟后加Tag DNA聚合酶(Perkin-Elmer Cetus) 2单位, 覆盖100 $\mu\text{l}$ 无菌石蜡油后开始PCR循环用水浴箱提供所需温度, 秒表控制时间(现已有PCR仪试验), 循环温度时间程序为 $95^{\circ}\text{C}$ 60s- $50^{\circ}\text{C}$ 45s- $70^{\circ}\text{C}$ 90s, 共进行30-35个循环, 最后一个循环温度延长5min。取10 $\mu\text{l}$ 扩增产物用3%琼脂糖凝胶(上海东海制药厂)电泳, 溴乙锭染色, 紫外灯下观察特异电泳带是否出现。

## 2 结果

### 2.1 Dig-probe 检测 HCMV 的特异性和敏感性

由图1可见, HCMV斑点呈现明显紫黑色, 呈阳性, 而HSV、EBV和HEL斑点均无颜色出现, 均呈阴性, 说明该探针与同科其它亚属病毒及人源细胞DNA无交叉反应。为检测dig-probe的敏感性, 将可定量的纯化HCMV AD169株DNA EcoR I酶切J片段连续稀释后点样检测, 其最小检出量为1pg(皮克)DNA。

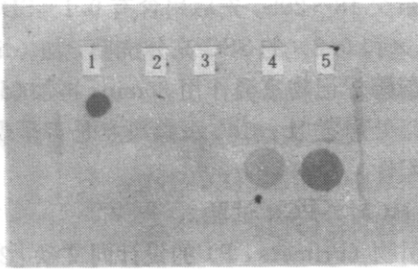


图1 地高辛探针的特异性和敏感性

上行: 1. 组织培养的 HCMV-DNA  
 2. HSV-DNA  
 3. EBV-DNA  
 4. 正常人胚肺细胞 DNA  
 5. 空白  
 下行: 1-5 分别为 0.01, 0.1, 1, 10,  
 100pg 的 HCMV-DNA-EcoRI-J 片段

2.2 PCR 检测 HCMV 的特异性和敏感性

图 2 显示 PCR 检测 HCMV 的特异性和敏感性。引物 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 所限制的 HCMV DNA 片段碱基数为 133bp。HCMV 培养液和 HCMV DNA EcoR I 酶切 J 片段经扩增后电泳可见清晰电泳带, 而所有对照 HSV EBV 和 HEL 等均不见任何电泳带, 即没有出现特异 DNA 扩增产物。用 HCMV DNA EcoR I 酶切 J 片段定量, PCR 检出 DNA 最小量为 0.1fg (毫皮克) 相当于 6 个基因拷贝。

2.3 血沉标本中 HCMV DNA 及 HCMV IgM 的检测

如表 1 所示, 共检测 78 份血沉标本。PCR

表 1 血沉标本中 HCMV-DNA 检出结果

血沉值	人数	检出 HCMV-DNA 阳性数 (百分率)*	
		Dig-probe	PCR
1-20 <sup>#</sup>	52	31 (59.6%)	44 (84.6%)
21 <sup>#</sup> 以上	26	16 (61.5%)	21 (80.8%)
合计	78	47 (60.3%)	65 (83.3%)

\* \* PCR 和 dig-probe 检出 HCMV-DNA 阳性率相差显著, P<0.05

血沉值高低二组的 HCMV-DNA 检出率无明显差异, P>0.05

和 dig-probe 检出 HCMV DNA 的阳性率分别为 83.3 和 60.3%, 相差显著 (P<0.05)。PCR 检出的阳性率明显较 dig-probe 高。但无论是用 dig-probe 检测还是用 PCR 检测, 结果均一致, 表明血沉值高低与 HCMV DNA 检出率之间没有明显关系, 即血沉值低者 (1-20<sup>#</sup>) 组与血沉值高者 (21<sup>#</sup>以上) 组 HCMV DNA 检出率无明显差异 (P>0.05)。

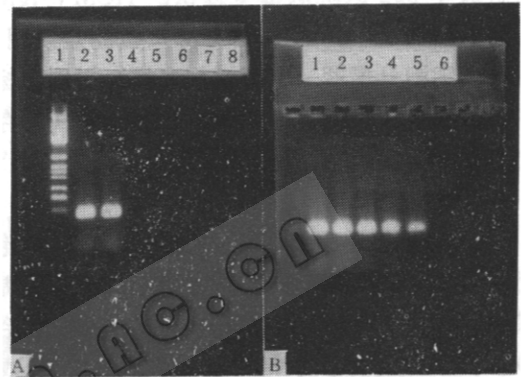


图 2 PCR 的特异性 (A) 和敏感性 (B)

A 图中 1. Marker; 质粒 pBR322DNA 经 BamHI, Bgl I 和 Hinf I 酶切后以 2:3:3 比例混合的 DNA 片段  
 2. 组织培养的 HCMV-DNA  
 3. HCMV-DNA EcoR I 酶切 J 片段  
 4. HSV-DNA  
 5. EBV-DNA  
 6. 正常人胚肺细胞 DNA  
 7、8. 均为空白  
 B 图中 1-6 分别为 1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01fg HCMV-DNA EcoR I 酶切 J 片段

表 2 HCMV-IgM 阳性者血沉标本中 HCMV-DNA 检出结果

血沉标本数	血沉值	IgM 检测结果 (P/N≥2.1)	HCMV-DNA 检测结果	
			Dig-probe	PCR
1	2	+	+	+
2	60	+	+	+
3	50	+	-	+
4	7	+	-	+
5	72	+	-	+
6	10	+	-	+
7	28	+	-	+

用 HCMV-IgM 检测试剂盒检测上述 78 份血沉标本, IgM 阳性数仅有 7 例。从表 2 可见, IgM 阳性者与血沉值高低也无关; IgM 阳性者 PCR 检测 DNA 也呈阳性, 但 dig-probe 检测结果只有 2 例阳性。

### 3 讨 论

目前检测 HCMV-DNA 的方法有两种。一种是 DNA 杂交方法, 采用同位素、生物素和 digoxigenin 等标记探针<sup>[3-5]</sup>, 其中尤以近年来发展的 digoxigenin 标记探针 (dig-probe) 较其它探针更安全、敏感和特异<sup>[5]</sup>, 国外也已商品化。本实验室采用 Kit 中 dig-probe 检测 HCMV DNA 的最小检出量达 1Pg。另一种方法是聚合酶链反应 (PCR)。近二三年来, PCR 检测器官移植者、新生儿和免疫缺陷者 (如 AIDS) 的尿标本报道颇多<sup>[2, 6-8]</sup>, 一致肯定其高度特异性和敏感性, 尤其是其敏感性之高是 DNA 杂交方法所不及。本实验室 PCR 检测 HCMV DNA 的敏感性也高达 0.1fg, 相当于 6 个基因拷贝。

据国内外报道, 成人 60—90% 以上有 HCMV 抗体<sup>[1]</sup>, 但人体血液中带毒状态尚未见报道。其原因主要是由于 HCMV 感染多呈潜伏感染, 其潜伏部位和机制尚不甚明了, 可能潜伏于白细胞或不成熟白细胞内, 一般情况下没有或很少有病毒抗原表达, 故血清学试验难以查出潜伏状态下的 HCMV<sup>[9]</sup>。核酸杂交技术

和 PCR 技术的建立为了解此问题提供了有力手段。本文用 dig-probe 和 PCR 检测血沉标本提取的灰黄层, 初步揭示成人血液中 HCMV-DNA 携带率也较高, 达 60.3—83.3%, 进一步证实了 HCMV 确实潜在于白细胞中。

此外, HCMV IgM 阳性者, PCR 证实 HCMV-DNA 也均呈阳性; 而 dig-probe 检出率不够高。Jackson 曾报道, IgM 阳性血用斑点杂交方法不能测出 HCMV-DNA<sup>[10]</sup>。究其原因可能是杂交方法不如 PCR 敏感; 也可能是因为血标本不如尿标本更能反映 HCMV IgM 阳性者带毒状态。

血沉值增高因素众多, 如活动性结核、疟疾、风湿热和肺炎等, 但与 HCMV 感染无关。本文比较了血沉值高低与 HCMV-IgM 检出和 HCMV-DNA 检出的关系, 也证实了此结论。

### 参 考 文 献

- [1] 闻玉梅等. 中华传染病学杂志, 1984. 2 (3): 193.
- [2] Olive DM, et al. J Clin Microbiol, 1989. 27 (6): 1238.
- [3] Augustin, S, et al. J Clin Microbiol, 1987. 25 (10): 1973.
- [4] Vonsover, A et al. J Virol Methods, 1987. 16: 29.
- [5] Kimpton C P, et al. J Virol Methods, 1989. 24: 335.
- [6] Dermmeler Gj, et al. J Infect Dis, 1988. 158: 1177.
- [7] Olive DM, et al. J Med Virol, 1989. 29: 232.
- [8] Jiwa NM, et al. Transplantation, 1989. 48: 72.
- [9] Einhorn L, et al. J Infect Dis, 1984. 149: 207.
- [10] J Brooks Jackson, et al. J Infect Dis, 1987. 156: 1013.

## DETECTION OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS DNA IN CLINICAL BLOOD SPECIMENS OF DETERMINING ERYTHROCYTE SEDIMENTATION RATE

Meng Luying Zhang Wenbing Peng Huaguo

*(First Medical College of PLA, Guangzhou 510515)*

Dong Zizheng Shi Chenghua

*(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)*

**Abstract** Human cytomegalovirus (HCMV) DNA in 78 clinical blood specimens of determining erythrocyte sedimentation rate (ESR) was detected by polymerase chain reaction (PCR) and digoxigenin labelled probe (dig-probe). Results showed that PCR was more sensitive, simple and high-speed than dig-probe. The positive percentages of HCMV DNA determined by PCR and dig-probe were 83.3% and 60.3% respectively. In addition, there was not any relation between HCMV DNA or Igm positive rate and ESR.

**Key words** Human Cytomegalovirus (HCMV), Polymerase Chain, Reaction (PCR), Blood Specimens