

• 技术方法 •

# PCR 技术检测尿中人巨细胞病毒的方法学研究

廖利民<sup>1</sup> 石炳毅<sup>1</sup> 梁春泉<sup>1</sup> 庄玉辉<sup>2</sup> 沈荣森<sup>3</sup>

**摘要** 应用 HCMV 早、晚期两对 DNA 引物,建立了聚合酶链反应 (PCR) 检测尿中人巨细胞病毒 (HCMV) 的方法。肾移植术后 HCMV 感染的临床尿样检测结果表明,该方法具有快速、特异性强、灵敏度高等优点,与血清 HCMV-IgM 检测结果符合率为 83.3%。使用早、晚期基因组的双引物分别对临床尿样进行 PCR 扩增,减少了由于自然点突变所致的假阴性,且引物与 HCMV 同属其它病毒及组织 DNA 间无交叉反应;以 HCMV 组织培养液作模板,灵敏度可达 625fg。本方法为诊断肾移植受者 HCMV 感染提供了新的手段,适于临床推广。

**关键词** 巨细胞病毒 肾移植 聚合酶链反应

**Detection of Human Cytomegalovirus in Urine by Polymerase Chain Reaction** Liao Li-min, Shi Bing-yi, Liang Chun-quan, et al. Dept. of Urology, The Beijing 309th Hospital, Beijing 100091

Polymerase chain reaction (PCR) amplification was set up with double primer pairs of major immediate-early and late gene in order to detect human cytomegalovirus (HCMV) from urine. This method was applied to the detection of HCMV in clinical samples of urine from renal transplant recipients. The result indicated that the primers did not cross react with other members of the herpes family of virus and human genomic DNA; that the HCMV AD169 tissue culture mixture used and the dilutions to estimate the sensitivity of PCR relative to tissue culture, 2.5 $\mu$ l of a 10<sup>-3</sup> dilution of the culture (625fg HCMV DNA) assayed were detected by direct gel analysis; that 25 of 30 samples of urine from the renal transplant recipients (serum HCMV IgM positive) were positive. It is concluded that PCR amplification is a valuable tool for diagnoses of HCMV infection in renal transplant recipients.

**Key words** HCMV Renal transplantation PCR

健康人群感染人巨细胞病毒后,一般表现为轻微症状或无症状感染,但在免疫低下患者(如器官移植受者及 AIDS 患者)中则可导致严重的疾病;妊娠妇女 HCMV 感染,可致胎儿发育畸形,故 HCMV 感染是一个值得重视的问题。诊断 HCMV 感染有多种方法,传统的组织培养法耗时长、灵敏度低;ELISA 检测早期抗原及 DNA 探针杂交等方法,也有灵敏度较低的不足之处;80 年代日趋成熟的聚合酶链反应技术,为病原诊断带来了变革,也为 HCMV 检测展示了广阔前

景。本研究应用由 HCMV 基因组不同部位设计合成的两对引物进行 DNA 扩增,检测 HCMV 组织培养液及肾移植受者尿样,建立了 PCR 诊断 HCMV 的方法。与培养法、ELISA 及 DNA 探针杂交法相比,具有快速、特异性强、灵敏度高等优点,为进一步临床

1 中国人民解放军第三〇九医院泌尿外科 100091  
北京市

2 中国人民解放军结核病研究中心

3 中国人民解放军军事医学科学院二所 PCR 实验室

应用奠定了基础。

### 材料与方 法

一、材料与试剂来源: HCMV AD169 株由解放军第三〇二医院病毒室提供; PCR 缓冲液、4 种 dNTP、TaqDNA 聚合酶以及 PCR 扩增仪均为 Perkin Elmer Cetus 公司产品。

二、临床尿样: 30 份尿样均采自 30 例我科施行的异体肾移植患者。其血清 HCMV-IgM 均为阳性, 或恢复期血清 IgG 呈 4 倍以上增高。

三、引物及探针序列: 根据 AD169 株即刻早期基因组<sup>[1]</sup>及晚期基因组<sup>[2]</sup>序列设计合成两对引物及一个探针 (表 1)。

表 1 引物和探针序列及其在 HCMV 基因组中的位置

| 引物及探针     | 序列(5' → 3')               | 扩增物长度(bp) | 扩增产物位置    |
|-----------|---------------------------|-----------|-----------|
| 即刻早期引物 P1 | GCAGAGCTCGTTTAGTGAACC     | 123       | -20~-2    |
| P2        | GGCACGGGGAATCCGCGTTCC     |           | 70~92     |
| 晚期引物 P3   | CACCTGTCACCGCTGCTATATTTGC | 400       | 2101~2125 |
| P4        | CACCACGCAGCGGCCCTTGATGTTT |           | 2500~2476 |
| 探 针       | GTCGCCTGCACTGCCAGGTGCTTCG |           | 2301~2325 |

四、尿标本前处理: 采用两种方法并比较其结果。

1. 煮沸法: 取初离心后尿样 100μl, 煮沸 10 分钟后即可用于 PCR 扩增。

2. 酚-氯仿抽提法: 初离心后的尿样 400μl 加入 10% SDS 5μl, 37℃ 恒温 30 分钟, 分别用苯酚及氯仿各抽提一次, 上清中加入 1/10 体积的 NaAc 及 2.5 倍体积的乙醇, -20℃ 过夜或液氮 20 分钟, 次日 12 000r/min 离心 20 分钟, 沉渣用 75% 乙醇洗涤 1 次, 干燥后加双蒸水 40μl 溶解沉淀备用。

五、PCR 扩增条件: 取 2.5μl 10× buffer, 使终反应液中含 50mmol/L KCl, 10nmol/L Tris-HCl, pH8.4, 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 0.01% 明胶; 加入 P1P2 或 P3P4 引物混合液 2.5μl, 使各引物反应浓度为 25ng/μl; 再加入 2.5μl 4 种 dNTP 混合液 (各种 dNTP 浓度为 2mmol/L), 使其终反应浓度为 0.2mmol/L; 加入阳性对照 DNA 模板或尿样提取物 2.5μl, 双蒸水 5μl, 混匀后置于扩增仪中, 97℃ 300s, 冰浴 3 分钟, 短暂离心后加入 0.625 单位 TaqDNA 聚合酶, 使总反应体积为 25μl, 混匀后加 2 滴石蜡油, 使两界面清晰, 置入 PCR 仪。循环参数: 变性 94℃ 45s; 退火 54℃ 45s; 延伸 72℃ 90s, 共循环 35 次, 最后延伸 72℃ 10 分钟。

六、扩增产物分析: 取 10μl 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳 (80V、20mA、30min), 以溴化乙锭显色, 紫外线灯下观察, 于 123bp 或 400bp 处出现光带者判为阳性结果, 拍照光带不能肯定者进行 Dot blot 核酸杂交分析。

### 结 果

一、灵敏度试验: 将 AD169 株培养液按 10<sup>-1</sup> 进行倍比稀释, 当稀释至 10<sup>-3</sup> 时仍可出现阳性结果, 10<sup>-4</sup> 时则为阴性结果, 直接电泳法的灵敏度为 10<sup>-0.6</sup> TCID<sub>50</sub>, 约相当于 625fg 的 HCMV DNA; 若配合探针杂交, 可将灵敏度提高至 62.5fg 水平。

二、特异性试验: 分别以 HSV、VZV、EBV、HBV、组织 DNA、蒸馏水以及 HCMV 作为模板进行 PCR 扩增, 仅 HCMV 及标准对照为阳性结果, 其余均为阴性。

三、肾移植受者尿样检测: 30 例 HCMV-IgM 阳性的肾移植受者尿样中, 25 例 PCR 结果为阳性, 阳性率为 83.3% (25/30)。

1. 两种尿样前处理方法结果比较: 见表 2。

一致性检验:  $P = 0.021, P < 0.05$ , 说明两法结果具有显著的一致性, 一致者占 66.7% (20/30)。优劣性检验:  $\chi^2_M = 8.1, P <$

0.01,说明两种尿样前处理法的结果有优劣之分,酚-氯仿抽提法优于煮沸法,前者较后者诊断 HCMV 感染更为灵敏。

表 2 两种尿样前处理方法 PCR 比较

| 抽提法 | 煮沸法 |    | 合计 |
|-----|-----|----|----|
|     | +   | -  |    |
| +   | 15  | 10 | 25 |
| -   | 0   | 5  | 5  |
| 合计  | 15  | 15 | 30 |

2. 两对引物的 PCR 结果比较:见表 3。

表 3 不同基因组两对引物的 PCR 结果

| P3P4 | P1P2 |   | 合计 |
|------|------|---|----|
|      | +    | - |    |
| +    | 22   | 2 | 24 |
| -    | 1    | 5 | 6  |
| 合计   | 23   | 7 | 30 |

两法结果的一致性试验: $P=0.000083$ , $P<0.001$ ,说明两法检测结果具有极显著的一致性,一致者占 90%(27/30)。优劣性检验: $\chi^2_M=0$ , $P>0.05$ ,说明两法结果无优劣之分。P1P2 阴性而 P3P4 阳性者 2 例,P1P2 阳性而 P3P4 阴性者 1 例,这种差异未达显著性界值。两对引物检测结果只要一对阳性,即可判为阳性结果。

## 讨 论

本研究建立了不同基因组双引物扩增的 PCR 方法,并将其初步应用于诊断肾移植术后 HCMV 感染,取得了满意结果。

进行 PCR 试验时,诸多因素影响 DNA 的扩增效益。首先, $Mg^{2+}$  浓度对扩增的特异性和灵敏度影响较大, $Mg^{2+}$  过量时,非特异性扩增产物增加, $Mg^{2+}$  不足时扩增产量降低,使 PCR 灵敏度降低,本研究通过梯度试验证实终反应浓度 1.5mmol/L 为  $Mg^{2+}$  的最佳浓度。其次,4 种 dNTP 浓度也可影响 PCR 扩增,浓度过高可导致错误掺入率增高,浓度过低则降低检测的灵敏度。我们通过梯度试验发现 4 种 dNTP 的最佳反应终浓度为 0.2mmol/L。再次,Taq DNA 聚合酶用量也可影响 PCR 扩增,酶量过大可使非特异

性扩增产物增多;酶量过小,可降低扩增产量,我们的实验发现最佳的 Taq 酶用量为 0.625 单位。另外,退火温度对扩增的影响也较大,温度过高可增加产物特异性,降低产量;温度过低虽可增加产物产量,但却降低了产物特异性。我们选择的最佳退火温度为 54℃。本研究中 PCR 反应体系的灵敏度可达 625fg(直接电泳法),与 Demmler<sup>[3]</sup> 所报道的结果相似,但较 Olive<sup>[4]</sup> 报道的灵敏度为低,其原因在于所使用的标准 DNA 模板不一,Olive 使用 HCMV DNA 质粒,纯度较高,而我们所用的是组织培养液,其中含有蛋白及其它 Taq 酶抑制物,可抑制酶促扩增,降低扩增产量。本研究所得的灵敏度远高于 ELISA 及探针法检测 HCMV 灵敏度(分别为  $10^{1.7}$  TCID<sub>50</sub> 及  $10^3$  TCID<sub>50</sub>)<sup>[5]</sup>。特异性研究表明:本实验中所使用的引物与 HCMV 同属其它病毒(HSV、VZV、EBV)、HBV 及组织 DNA 之间无交叉反应。说明本实验的特异性较高;每次实验均设置空白阴性对照,避免了由于 DNA 污染所致的假阳性。

## 参 考 文 献

- 1 Akrigg A, Wilkinson GWG, Oram JD. The structure of the major immediate early gene of human cytomegalovirus strain AD169. *Virus Res*, 1985, 2: 107.
- 2 Weston K. Sequence of the short unique region, short repeats and part of the long repeats of human cytomegalovirus. *J Mol Biol*, 1986, 192: 117.
- 3 Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, et al. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infectious Disease*, 1988, 158: 1177.
- 4 Olive DM, Simsek M, Al-Mufti S, et al. Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol*, 1989, 27: 1238.
- 5 Olive DM, Mekki AE, Mulla WA, et al. The use ELISA and nonradioactive DNA hybridization assays for the detection of human cytomegalovirus. *J Virol Meth*, 1988, 19: 289.

(收稿:1994-05-16 修回:1994-08-16)