

人巨细胞病毒 DNA 检测技术的建立和应用

孟潞英 张文炳 彭华国

(解放军第一军医大学微生物学教研室, 广州 510515)

关键词 人巨细胞病毒 (HCMV), 聚合酶链反应 (PCR), 地高辛 (Dig) 标记 DNA 探针

人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 是广泛感染人类的重要病原之一, 尤其胎儿、新生儿、器官移植患者和免疫缺陷患者 (AIDS) 等感染 HCMV 可致严重疾患, 甚至死亡。传统的分离培养检测过于费时, 各种免疫学方法和 DNA 杂交技术的应用虽改善了检测 HCMV 技术的敏感性和缩短了检测时间, 但与高度特异敏感而简便的聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 相比均显逊色。本实验室建立了 PCR 和地高辛标记探针 (Digoxigenin labelled probe, Dig-probe) 检测 HCMV-DNA 方法并用于临床已取得有意义的结果。

标准毒种为人胚肺二倍体细胞培养的 HCMV-AD169 株毒液, 毒液及临床标本中 DNA 用 SDS 裂解法粗提待测。HCMV-AD169 DNA 的 EcoRI 酶切 J 片段 (质粒由 B. Fleckenstein 惠赠) 用作探针。Dig-probe 制备及斑点杂交法参照试剂盒说明 (DNA Labelling And Detection Kit, Molecular Biology Boehringer Mannheim, West Germany)。J 片段编码 HCMV 即刻早期基因, 引物 P₁ 和 P₂ 位于该基因序列中:

P₁: 5'-dGCA GAG CTC GTT TAG TGA
ACC-3' (nucleotides -21 to -2)

P₂: 5'-dGGC ACG GGG AAT CCG CGT
TCC-3' (nucleotides 91 to 112)

PCR 试验的总量为 100 μ l: 用 Eppendorf 管加待测 DNA 10 μ l, 8mmol/L dNTP (每种 dNTP 均为 2mmol/L, Perkin-Elmar Cetus) 10 μ l, P₁P₂ 各 2 μ l (100 μ g), 10 X buffer 10 μ l, 补足无

菌三蒸水至 100 μ l, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10min 后加 Taq DNA 聚合酶 (Perkin-Elmar Cetus) 2U, 再覆盖上 100 μ l 无菌石蜡油后开始 PCR 循环: 95 $^{\circ}$ C 60s $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 45s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 90s, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延长 5min。PCR 扩增产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭 (1 μ g/ml) 染色, 紫外光检测仪观察 133bp DNA 电泳带。

实验结果表明, 检测 HCMV-DNA 的 PCR 技术和 dig-probe 标记法均具有高度特异性 (图 1 见封 2)。除标准毒株和特异质粒 DNA 呈阳性结果外, 所有对照, 包括单纯疱疹病毒 (HSV) 和 EB 病毒对照, 正常细胞对照等均呈阴性结果, 无交叉反应。二者的敏感性也均高 (图 2 见封 2), 用纯化的 HCMV-EcoRI-J 片段定量, PCR 和 dig-probe 可检出的最小量分别为 0.1fg 和 1pg。PCR 较 dig-probe 敏感性高 10000 倍。

用上述方法检测了临床诊断为婴儿肝的患儿尿标本 63 份, 其中肝穿刺标本 7 份; 肾病综合征患儿尿标本 41 份, 结果 PCR 检出 HCMV-DNA 阳性率分别为 52/63 (82.5%) 和 31/41 (75.6%); dig-probe 检出 HCMV-DNA 阳性率分别为 36/63 (57.1%) 和 22/41 (53.7%)。7 份肝穿刺标本 PCR 检测 HCMV-DNA 全部为阳性。由此揭示 HCMV 是引起婴儿肝的重要病原之一, 肾综病因可能也与 HCMV 感染有关。

用上述二种技术筛选了 78 份临床血沉标本中提取的白细胞。PCR 和 dig-probe 检出

(下转第 46 页)

- 8 Tsang V C W *et al. Methods in Enzymology*, 1983; 92: 377
 9 Harn DA *et al. J Exp Med*, 1984; 159: 1371
 10 Mitchell G F *et al. Parasit Immuno*, 1985; 7:165
 11 Grzych J M *et al. J Immunology*, 1982; 129: 2739
 12 Smith M A, Clegg J A. *Science*, 1985; 227: 535

IMMUNOREACTIVITY OF PATIENT SERA TO SCHISTOSOME JAPONICUM EGG AND ADULT ANTIGENS

XU Alian Zhou Xiaoyin

(Department of Parasitology, Zhejiang Medical University)

Donald A. Harn

(Department of Tropical Public Health, Harvard School of Public Health, USA)

ABSTRACT

A sensitive and specific immunoblot assay was used to analyze 33 cases of immune reactions between sera of Schistosomiasis Japonica patients and schistosome Japonicum egg (SEA) and adult (SWAP) antigens. The assays consists of SDS-PAGE and Western blot. The sensitivity of SEA reaction is 100%, while that of SWAP is 97%, with negative reactivity in the control sera. In most cases (28/33), SEA reactive to patient sera show three wide bands at 180,54 and 32kD while in the case of SWAP it shows two wide bands at 190 and 64kD in 26 cases(26/32). In most patients (21/24) with acute schistosomiasis Japonica, an additional wide band is seen at 34kD. These results suggest clinical value of Western Blot in the diagnosis of schistosomiasis Japonica.

Key words immunoreactivity, schistosomiasis japonica, Western blot, ELISA

(上接第 54 页)

HCMV-DNA 阳性率分别为 83.3% 和 60.3%。从 DNA 水平进一步说明了 HCMV 感染人群的普遍性和严重性,以及 HCMV-DNA 确实潜伏于血液白细胞中。此外尚发现 HCMV-DNA 检出率与血沉值高低之间无任何相关性。

PCR 高度的特异性和敏感性避免了临床标

本的误诊和漏诊。但因 HCMV 感染广泛,且发生潜伏感染,因而 PCR 的高阳性率与临床症状不尽一致。对 HCMV 来讲,PCR 具有诊断价值是一方面;另一方面 PCR 更适用于探讨 HCMV 感染机理、先天性感染的判断与预测、流行病学调查以及血源的筛选。