



猴腺病毒(SAdV)PCR检测方法的建立及初步应用

张荣建, 贺争鸣

(中国食品药品检定研究院, 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050)

【摘要】 **目的** 建立 SAdV 特异的 PCR 检测方法并研究实验猴群和猴源性生物制品中 SAdV 感染或污染情况。**方法** 比对分析多株 SAdV 序列, 设计 SAdV 特异引物, 优化 PCR 实验条件, 建立的 PCR 方法经验证后检测实验猴群和猴源性生物制品, 阳性产物测序并构建进化树。**结果** 经特异性和敏感性鉴定, 在设计的 5 对引物中确定一对最佳引物, 可以区分 SAdV 和 MAD, ICH, CELO 且可以检测到的最小 DNA 量为 47.9 pg/mL。PCR 方法检测实验猴群, 阳性率 49.2%, 测序及进化分析表明, SAdV 感染型别呈广泛基因多样性。主要分布在 G 亚属和以 SAdV-49 为代表的分支。**结论** 经测序验证, PCR 检测方法具有很好准确性, 初步应用表明我国实验猴群中 SAdV 高度流行, 应加强实验猴群及相关生物制品中 SAdV 的监测, 避免人类感染 SAdV 的潜在风险。

【关键词】 猴腺病毒; PCR; 检测; 应用; 猴

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)12-0041-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.012.011

Establishment and Preliminary Application of a PCR Detection Method for Simian Adenovirus

ZHANG Rong-jian, HE Zheng-ming

(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 **Objective** To establish a PCR detection method for simian adenovirus (SAdV) and study the SAdV infection status in monkeys. **Methods** To design a primer based on SAdV sequences and optimize the PCR experiment, test the method, to detect the virus in monkeys and vaccines, and sequencing and constructing the phylogeny trees. **Results** A PCR detection method for SAdV was established, which could distinguish SAdV from MAD, ICH, CELO and was sensitive to 47.9 pg/mL viral DNA. The results of this study showed a positive rate of 49.2% and a large genetic diversity of simian adenoviruses in Chinese primate colony. Most of them belong to G subgroup and twig of SAdV-49. **Conclusions** This PCR detection method established in our laboratory has a good accuracy. We found a high prevalence of SAdV in Chinese primate colony. It is necessary to enhance detection and control for SAdV in monkeys and relevant biological products, and avoid potential risk of human infection.

【Key words】 Simian adenovirus; PCR; Detection; Application; Monkeys

猴腺病毒(simian adenovirus, SAdV), 是灵长类动物呼吸道和消化道的常见病毒之一, 可引起肺炎、咽炎、肠胃炎、结膜炎等, 以粪口途径传播为主,

主要感染猕猴、非洲绿猴、黑猩猩和狒狒等^[1]。SAdV 为线性双链 DNA 病毒, 属腺病毒科, 哺乳动物腺病毒属。Esona 等人发现 SAdV 在外观无异常的

[基金项目] 国家科技支撑计划课题(No. 2011BAI15B01)。

[作者简介] 张荣建(1986-), 男, 免疫学硕士, 研究方向: 实验动物病毒学。

[通讯作者] 贺争鸣(1957-), 男, 研究员。研究方向: 微生物学。E-mail: hezm@nicpbp.org.cn。

实验猴群中高度流行且感染株系呈广泛的基因多样性^[2],并存在变种传染给人的风险^[3,4],也有报道称在生产用猴肾细胞和脊灰减毒疫苗检定中分离出一些 SAdV 毒株^[5]。

目前国内关于 SAdV 感染流行情况的研究很少,现有检测方法如病毒分离培养等周期长、特异性较差。我们建立的 PCR 方法能够实现快速批量检测猴群中 SAdV 的感染情况,并且灵敏度较高。本方法只需一步 PCR 就可以将 SAdV 与鼠腺病毒(MAD)、犬腺病毒(ICH)、禽腺病毒(CELO)区分开来,并且能检出不同亚属的猴腺病毒(SAdV-1、SAdV-3、SAdV-20)。

1 材料和方法

1.1 样品与毒株来源

65 份食蟹猴和恒河猴粪便样本采集自国家药物安全评价中心和协尔鑫生物资源研究所。中国医学科学院医学生物学研究所生产的五批口服脊髓灰质炎减毒活疫苗(批号分别为:990420A, 990422A, 990423A, 990428A, 990505A)和北京天坛生物生产的一批脊髓灰质炎减毒活疫苗(批号:20091106)。BSC-1 细胞,本实验室保存;阳性对照 SAdV-1(VR-195TM)、SAdV-3(VR-1449TM)、SAdV-20(VR-541TM)购自美国 ATCC;鼠腺病毒(MAD)、禽腺病毒(CELO)、犬腺病毒(ICH)均本实验室保存。

1.2 试剂及仪器

胎牛血清购自杭州四季青公司;PCR 热启动反应体系、DL1500 DNA marker、基因组 DNA 提取试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;PCR 反应用引物均由上海生工合成;DNA 胶回收试剂盒购自杭州 Axygen 公司。粪便基因组 DNA 快速提取试剂盒购自北京 Abigen 公司;日立 CP70ME 低温超速离心机。质粒小量快速提取试剂盒(Axygen)购自经科宏达公司。

2 实验方法

2.1 靶基因的选择及引物设计

用 Vector NTI 多序列比对分析已报道的不同亚属 SAdV 和 MAD、ICH、CELO 基因组序列,选择 SAdV 保守性高且与 MAD、ICH、CELO 序列有差异区域 hexon 基因和 pol 基因部分序列作为靶序列。针对该区域用 Primer Premier 5.0 设计五组引物并合成。同时,与文献报道的引物进行比较。

五组引物(1, 2, 4, 5, 6)及文献引物(3)的序列见表 1:

2.2 SAdV 病毒基因组 DNA 提取

SAdV 病毒的细胞培养液经反复冻融 3 次后 10 000 r/min 离心 5 min,收集上清液。

口服糖丸疫苗先用 1 mL PBS 溶解。培养液上清、疫苗溶剂和液态疫苗按照基因组 DNA 提取试剂盒的说明书提取 DNA,400 μ L 样品提取 20 μ L DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 PCR 反应

2.3.1 PCR 反应体系:反应体系总体积 25 μ L,其中引物体积 0.5 μ L(1 μ M),Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L(1 U),10 \times PCR buffer 2.5 μ L, dNTP mixture (2.5 mM each) 2 μ L, dd H₂O 17.3 μ L,待检样品 DNA 模板 2 μ L。反应条件,95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。

2.3.2 PCR 反应条件的优化:引物浓度选取 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 μ mol/L 等 5 个梯度,退火温度选取 60 $^{\circ}$ C、59.5 $^{\circ}$ C、58.6 $^{\circ}$ C、57.2 $^{\circ}$ C、55.5 $^{\circ}$ C、54.3 $^{\circ}$ C、53.5 $^{\circ}$ C、53.0 $^{\circ}$ C 等 8 个梯度,Taq 酶的量选取 0.5 U、1 U、1.5 U、2 U 等 4 个梯度,循环数选择 20、25、30、40 等 4 个梯度。

扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL EB)进行电泳鉴定。

表 1 SAdV PCR 引物序列
Tab. 1 Sequences of the SAdV primers

引物名称 Primers' names	上游引物(5'-3') Upstream primers (5'-3')	下游引物(5'-3') Downstream primers (5'-3')
1	TTGTCMAGYTTGCTKGGCAAAGAC	CTTGCGGTGARGACTGGGAA
2	CATGAAGTCTCGGAGTACCTGAG	CGGATGTCAAAGTATGTACTGGC
3	GCCSCARTGGKCDTACATGCACATC	CAGCACSCNCGRATGTCAAAA
4	GGATGACTCGGAGTACCTGAG	CTTGGGAGCCAGGGAGTTGTA
5	GTTTCYTACCTYGVGTCTCCATGA	CTCCCTCTCACCAGMTSTACGACTA
6	CAGGATGCCTCGGAGTACCTGAGC	TTGGCRGGRATGGGGTASAGCATGTT

表 2 PCR 条件优化结果
Tab. 2 Optimization results of the PCR assay

引物名称 Primer names	产物长度/bp Product length	引物浓度/ μ M Primer concentration	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature	Taq 酶量/U Taq katal	循环数 Cycles
1	429	0.4	57	1.5	40
2	260	0.4	57	1.5	35
3	301	0.5	55	1	35
4	328	0.2	56	1	35
5	1143	0.4	55	1	35
6	1862	0.4	55	1.5	35

2.4 特异性鉴定

2.4.1 琼脂糖凝胶电泳鉴定:取禽腺病毒(CELO)、鼠腺病毒(MAD)、犬腺病毒(ICH)及正常BSC-1细胞培养液。用前述SAdV病毒基因组提取方法提取DNA,分别以这四种DNA为模板,以设计的五组引物及文献报道的引物在优化后的条件下分别进行PCR扩增,扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.4.2 测序鉴定:利用DNA胶回收试剂盒回收PCR产物与pGEM-T克隆载体连接,转化DH5 α 大肠杆菌,通过初步酶切鉴定,选择阳性克隆送上海生工公司测序。

2.4.3 敏感性的测定:将起始浓度为47.90 μ g/mL的SAdV DNA样本做倍比稀释,分设 10^{-1} ~ 10^{-9} 九个浓度梯度,使用上述6对引物进行PCR扩增,扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.5 PCR检测方法的初步应用

2.5.1 实验猴群粪便样本的检测:采集单笼饲养的食蟹猴和恒河猴粪便样本65份,粪便样本核酸的提取按照粪便基因组DNA快速提取试剂盒说明书进行。用特异性与敏感性最佳的PCR方法对粪便样本核酸进行检测,扩增产物按上述方法进行琼脂糖凝胶鉴定和测序鉴定。

序列用Bioedit软件编辑,不同株系的HAdV和SAdV hexon基因序列引自Genbank。利用MEGA4软件进行系统发生进化分析,基于引物之间的序列用Neighbor-joining法构建系统发生进化树。

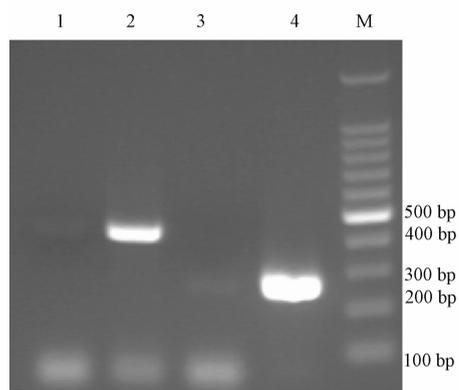
2.5.2 动物源性生物制品的检测:取六批口服脊髓灰质炎减毒活疫苗,分别按前述SAdV病毒基因组提取方法提取DNA。选择特异性与敏感性最佳的PCR方法进行检测,扩增产物经电泳鉴定。

3 结果

3.1 PCR反应及条件优化结果

选取SAdV-1的阳性对照按将各个因素分别进

行PCR,PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,按电泳条带选取最佳反应条件。各个引物PCR反应优化结果如表2所示。优化条件后各个引物PCR产物电泳结果如图1,图2所示。



M:100 bp DNA marker;1:BSC-1 细胞阴性对照;2:引物 1 SAdV-1 扩增;3:BSC-1 细胞阴性对照;4:引物 2 SAdV-1 扩增

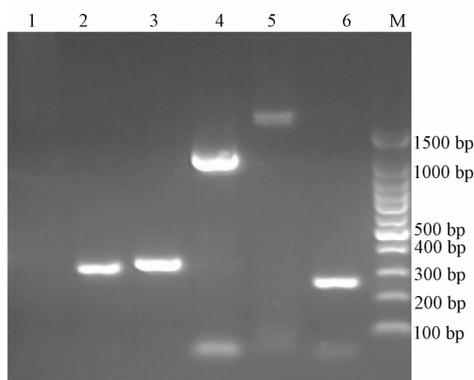
图 1 引物 1、2 PCR 反应优化后结果

M:100 bp DNA marker; 1, 3: BSC-1 negative control; 2: PCR product with primer 1; 4: PCR product with primer 2

Fig. 1 Optimization results of PCR with the primer 1,2.

3.2 PCR方法特异性验证

3.2.1 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定:五组引物在以SAdV为模板时均有明显目的条带出现,阴性对照BSC-1细胞均无目的条带。引物1中ICH有微弱扩增,引物2中CELO、ICH、MAD均有扩增,见图3。引物3(文献引物)PCR特异性检验结果显示G亚属、A亚属和F亚属的SAdV-1、SAdV-3和SAdV-20均有明显的目的条带出现,说明此PCR方法检测谱系广,不同亚属的猴腺病毒均能检出,但ICH和MAD也有微弱条带出现表明此方法特异性不是很好,见图4。引物4中只有SAdV-1、SAdV-3和SAdV-20有明显的目的条带出现,ICH、MAD、CELO均无目的条带,见图5,说明检测谱系广且特异性好。引物5中只有SAdV-1有明显目的条带出现,ICH、MAD、CELO均无目的条带,说明第五组引物有



M:100 bp DNA marker; 1: BSC-1 细胞阴性对照; 2: 引物 3 SAdV-1 扩增; 3: 引物 4 SAdV-1 扩增; 4: 引物 5 SAdV-1 扩增; 5: 引物 6 SAdV-1 扩增; 6: 引物 2 SAdV-1 扩增。

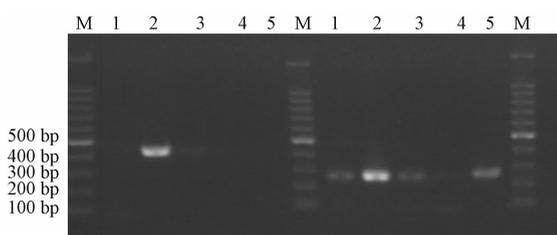
图 2 引物 3、4、5、6 PCR 反应优化后结果

M:100 bp DNA marker; 1: BSC-1 negative control; 2, 3, 4, 5 represent the PCR products with primer 3, 4, 5, 6, respectively.

Fig. 2 Optimization results of PCR

with the primer 3, 4, 5, 6.

较好的特异性, 见图 6。



M:100 bp DNA marker; 1: CELO; 2: SAdV-1; 3: ICH; 4: BSC-1 细胞阴性对照; 5: MAD

图 3 引物 1、2 特异性检测

M:100 bp DNA marker; 1: CELO; 2: SAdV-1; 3: ICH; 4: BSC-1 negative control; 5: MAD

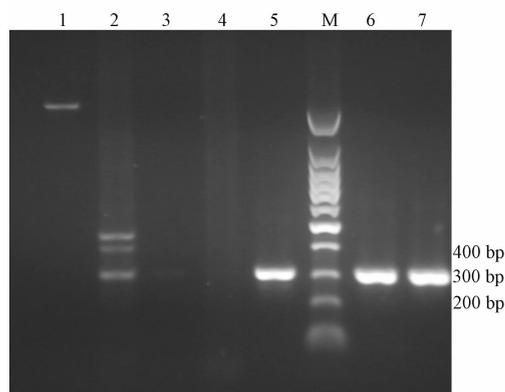
Fig. 3 Specificity test for the primer 1, 2.

与文献引物相比, 引物 1、4、5 均有较好的特异性, 结果见图 3、4、6、8。

3.2.2 测序鉴定: 将阳性扩增片段进行克隆测序, 测序结果用 BLAST 与 NCBI 中 SAdV-1 序列比对, 核苷酸符合率达 99% (325/328), 证明是要扩增的 SAdV-1 目的片段, 说明该法特异性好。

3.2.3 敏感性鉴定: PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳显示引物 3 (文献引物) 能检测到的 SAdV 模板最高稀释度为 10^{-4} , 所能检测到的最小基因组浓度是 4.79 ng/mL。而设计的 1、2、4、5 组引物能检测到的最高稀释度分别为: 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-3} 。引物 4 的灵敏性为文献引物的 100 倍。

六组引物不同的 PCR 检测方法经特异性和敏感性鉴定可看出, 引物 4 进行的 PCR 检测方法的特

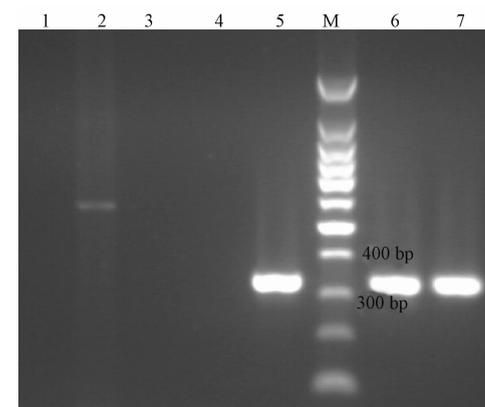


M:100 bp DNA marker; 1: CELO; 2: ICH; 3: MAD; 4: BSC-1 细胞阴性对照; 5: SAdV-1; 6: SAdV-3; 7: SAdV-20

图 4 引物 3 (文献引物) 特异性验证

M:100 bp DNA marker; 1: CELO; 2: ICH; 3: MAD; 4: BSC-1 cell negative control; 5: SAdV-1; 6: SAdV-3; 7: SAdV-20

Fig. 4 Specificity test for the primer 3.



M:100 bp DNA marker; 1: CELO; 2: ICH; 3: MAD; 4: BSC-1 细胞阴性对照; 5: SAdV-1; 6: SAdV-3; 7: SAdV-20

图 5 引物 4 特异性验证

M:100 bp DNA marker; 1: CELO; 2: ICH; 3: MAD; 4: BSC-1 cell negative control; 5: SAdV-1; 6: SAdV-3; 7: SAdV-20

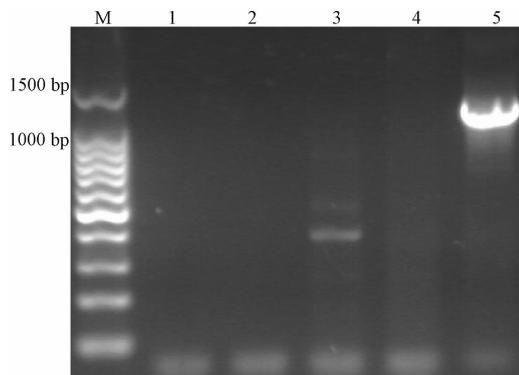
Fig. 5 Specificity test for the primer 4.

异性、灵敏度最佳, 检测谱系广, 不同亚属的猴腺病毒均能检出, 适合作为检测猴腺病毒的分子生物学方法。

3.2.4 检测方法的初步应用:

3.2.4.1 猴粪便样本的 PCR 检测: 经 PCR 检测, 其中有 15 份食蟹猴样本和 17 份恒河猴样本出现 328 bp 的目的条带, 呈 SAdV 阳性。我国实验猴群中 SAdV 感染流行情况见表 3, 食蟹猴感染率高于恒河猴为 57.7%, 广东地区感染率为 60%, 高于其它三个地区。

3.2.4.2 SAdV 阳性样本的测序鉴定: 选取 23 份 SAdV 阳性样本测序, 并将序列与 NCBI 收录的



M:100 bp DNA marker; 1: CELO; 2: ICH; 3: MAD; 4: BSC-1 细胞阴性对照; 5: SAdV-1

图 6 引物 5 特异性验证

M:100 bp DNA marker; 1: CELO; 2: ICH; 3: MAD; 4: BSC-1 cell negative control; 5: SAdV-1

Fig. 6 Specificity test for the primer 5.

SAdV 序列进行比对, 同源率为 91% ~ 100%。证明了检测方法的准确性, 同时也说明建立的 PCR 方法能够同时检测出不同型别的 SAdV。

3.2.4.3 SAdV 系统发生进化树构建: 如图 7 所示, 系统进化分析表明实验猴群中感染的 SAdV 型别呈广泛的基因多样性, 主要分为 3 个大基因簇, 其中最大一簇与 HAAdV-G 亚属腺病毒进化距离很近, 属于 HAAdV-G 亚属如 17M. f 等; 另一簇与其它亚属相比, 与 HAAdV-G 亚属进化距离较近, 但与上一簇是明显两个分支如 11M. f, 与 G 亚属的 SAdV-7 序列同源率为 91%。最后一簇与新发现的 SAdV-49 和 SAdV-50 株系接近如 xie32M. m, 这一基因簇还没有命名且与其它亚属进化距离较远, 是否代表新的 SAdV 亚属还需进一步详细研究。

3.4.2.4 猴源性生物制品的检测:

脊髓灰质炎减毒活疫苗分别提取 DNA, 经 PCR 检测, 均未检出 SAdV 核酸序列, 见图 8。

4 分析与讨论

PCR 方法由于其安全、简便快速的特点被广泛应用。SAdV 基因组全长约 34 000 bp, G + C 含量为 55.2% [5], hexon 基因和 pol 基因部分序列进化上高度保守是 PCR 引物设计的靶序列, 也常用于系统发生进化分析 [6]。最近, Esona 等 [7] 人针对 hexon 基因设计了一对简并引物建立了 SAdV PCR 检测方法并对广州地区猴群进行了筛查, 发现 SAdV 高度流行且感染株系呈广泛的基因多样性。经特异性验证该 PCR 检测方法特异性较差, 不能将 SAdV 与犬腺病毒 (ICH) 和鼠腺病毒 (MAD) 区分开来。

本实验成功筛选出一对特异性好、灵敏度更高的引物, 目的条带大小为 328 bp, 测序结果与 NCBI 发表的 SAdV-1 序列同源率为 99%。对引物浓度、Taq 酶用量、退火温度、循环次数进行优化, 确定了最佳 PCR 反应条件, 建立了 SAdV 的 PCR 检测方法。本方法只需一步 PCR 就可以将 SAdV 与 MAD、ICH、CELO 区分开来, 并且能检出不同亚属的猴腺病毒 (SAdV-1、SAdV-3、SAdV-20), 所能检测到的最小 DNA 模板浓度为 47.9 pg/mL, 比文献引物灵敏度提高 100 倍。

Roy 的研究表明 SAdV 可能感染猴小肠上皮细胞, 造成 SAdV 慢性感染并由肠道持续向外排毒, 粪便中检出率高 [8]。用建立的 PCR 检测方法调查 SAdV 的感染流行情况, 发现我国实验猴群中 SAdV 高度流行且呈现出广泛的基因多样性, 与 Esona 等人报道一致。

由于 SAdV 经常呈慢性持续感染状态 [9], 且在外观无异常的恒河猴和食蟹猴种群中高度流行, 最早发现的几株猴腺病毒如 SAdV-1、SAdV-3 等是从脊灰疫苗生产和检定过程中分离, 因此, 需要加强对实验猴群和猴源性生物材料以及相关生物制品

表 3 PCR 方法调查猕猴粪便样本中 SAdV 的感染流行情况

Tab. 3 The epidemiological study of SAdV infection detected in rhesus monkey feces by PCR

来源 Resource	恒河猴阳性率 Rhesus positive rate	食蟹猴阳性率 <i>M. fascicularis</i> positive rate	区域 SAdV 阳性率 Regional SAdV positive rate
广东 Guangdong province	/	12/20	12/20 (60%)
海南 Hainan province	/	3/6	3/6 (50%)
北京 Beijing	16/30	/	16/30 (53.3%)
成都 Chengdu	1/9	/	1/9 (11.1%)
不同物种 SAdV 阳性率 SAdV prevalence of different species	17/39 (43.6%)	15/26 (57.7%)	32/65 (49.2%)

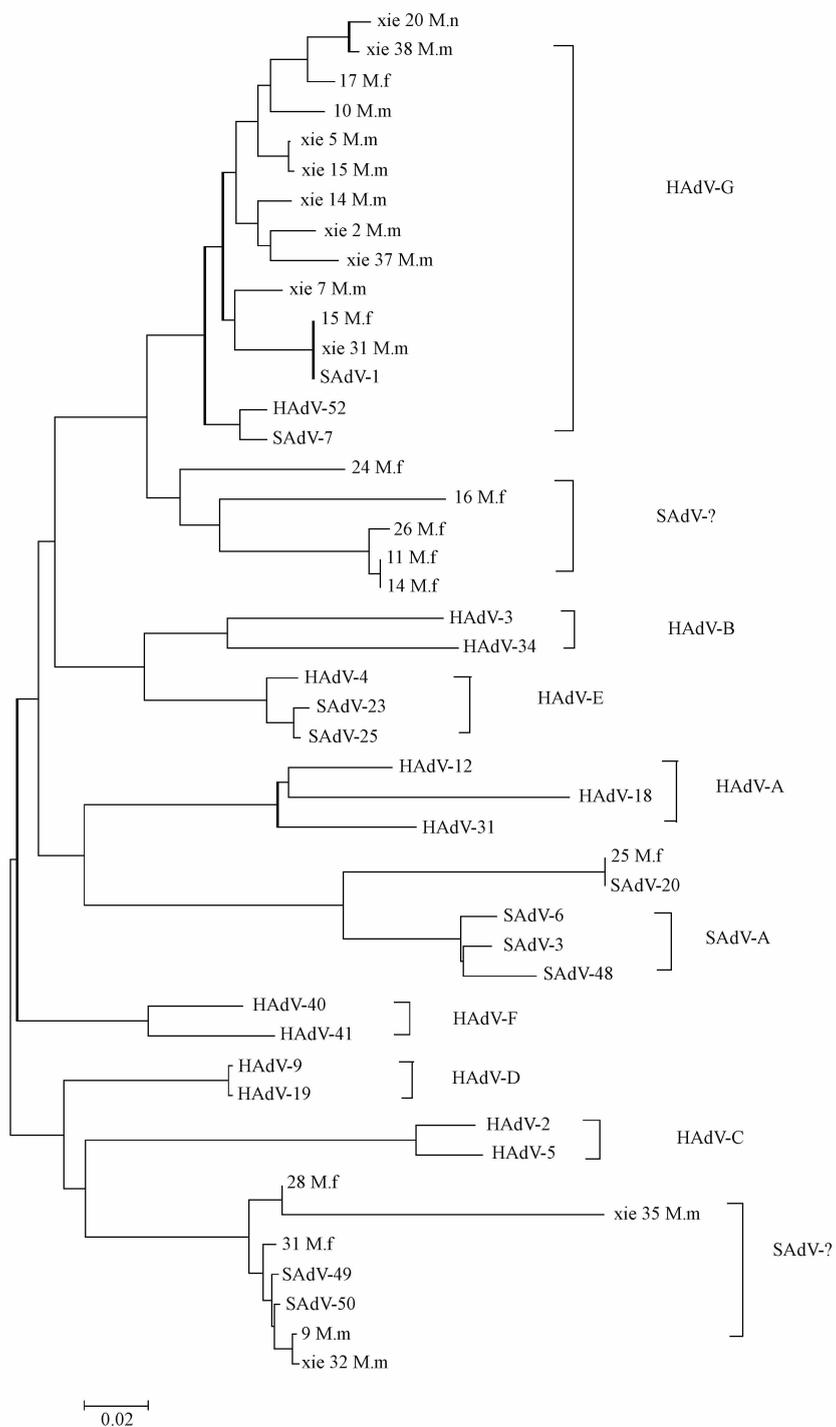


图 7 Mega 软件比对人腺病毒和猴腺病毒六邻体基因一段序列 (286 bp)

建立进化树 (HAdV、SAdV 序列来自 GenBank 中, M. m 代表恒河猴, M. f 代表食蟹猴)

Fig. 7 Generation of an evolutionary tree by comparing the sequences (286 bp) of a fragment of

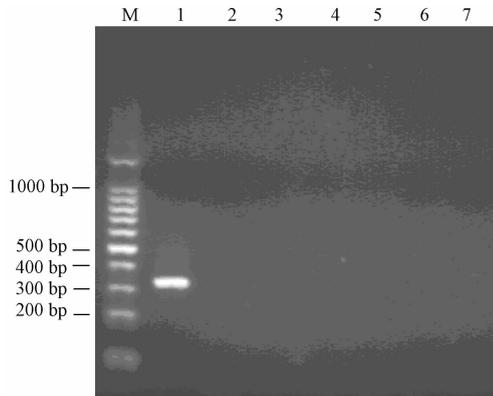
hexon gene of human and monkey adenoviruses using Mega software.

Root in GenBank; M. m represents rhesus; M. f represents *Macaca fascicularis*.

中 SAdV 的检测,避免人类感染 SAdV 的潜在风险。用建立的 PCR 法对猴源性生物制品进行检测,未检测到 SAdV 核酸序列,初步说明目前猴源性生物制

品污染 SAdV 的几率较小,生产和检定过程中质量控制很严格。

我们所建立的检测 SAdV 核酸的 PCR 方法具



M:100 bp DNA marker;1:SAdV-1 阳性对照;2:疫苗 0422 A; 3:疫苗 0423A;4:疫苗 0428A;5:疫苗 0505A;6:疫苗 0420A; 7:疫苗 20091106。

图 8 猴源性生物制品的检测

M:100 bp DNA marker; 1: SAdV-1 positive control; 2: Vaccine 0422A; 3: Vaccine 0423A; 4: Vaccine 0428A; 5: Vaccine 04505A; 6: Vaccine 0420A; 7: Vaccine 20091106.

Fig. 8 Detection of SAdV in monkey-origin biological products.

有快速、简便、准确等优点,可实际应用于监测猴群 SAdV 感染,通过隔离持续向外排毒个体,切断粪口途径,可以有效避免 SAdV 在猴群中的传播,也适用于猴源性生物制品 SAdV 污染的检测,对于建立高质量的实验猴群和保证猴源性生物制品安全意义重大。

参考文献:

[1] Kovacs GM, Harrach B, Zakhartchouk AN, et al. Complete genome sequence of simian adenovirus 1: an Old World monkey adenovirus with two fiber genes [J]. J Gen Virol, 2005, 86: 1681 - 1686.

[2] Hoffert WR, Bates ME, Cheever FS. Study of enteric viruses of simian origin [J]. Am J Hyg, 1958, 68:15 - 30.

[3] Tong SX, Singh J, Ruone S, et al. Short report: identification of adenoviruses in fecal specimens from wild chimpanzees (Pan troglodytes schweinfurthii) in Western Tanzania [J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 82(5):967 - 970.

[4] 李文贵,俞乃胜. 核酸扩增技术在人腺病毒诊断检测的研究进展 [J]. 中国人兽共患杂志,2001,17(1):78 - 81.

[5] 殷震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 科学出版社. 1104 - 1113.

[6] Roy S, Vandenberghe L H, Kryazhimskiy S, et al. Isolation and characterization of adenoviruses persistently shed from the gastrointestinal tract of non-human primates [J]. PLoS, Pathogens. www.plospathogens.org.2009(5), 7. e1000503.

[7] Mwenda JM, Nyachio A, Langat DK, et al. Serological detection of adenoviruses in non-human primates maintained in a colony in Kenya [J]. J East Afr Med. 2005, 85(7):371 - 375.

[8] 金玉霞. 腺病毒六邻体蛋白的免疫学研究进展 [J]. 国外医学免疫学分册,2002, 25(4):172 - 173.

[9] W. C. Russell. Adenoviruses: update on structure and function [J]. J Gen Virol, 2009, 90:1 - 20.

[修回日期]2012-10-25