

应用套式 PCR 在 MDCK 细胞系中发现犬细小病毒

杨德威, 宋延华, 刘福安

(华南农业大学动物医学系, 广东 广州 510642)

摘要: 本研究自 1997 年至 1999 年从国内部分大学实验室、卫生防疫站和动检局陆续收集 11 个犬肾(MDCK)细胞系样品, 选取犬细小病毒基因组的 VP₂ 基因上 4 段核苷酸序列作引物, 对样品 DNA 进行套式 PCR(Nested PCR)检测; PCR 扩增产物经 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳和克隆到 pGEM⁺ 载体并进行核苷酸序列测序鉴定后, 发现我国 MDCK 细胞系中存在犬细小病毒的传代病毒株。该病毒基因组部分序列测定结果显示与犬细小病毒 CPV-N 株有 91% 同源性。

关键词: 犬细小病毒; MDCK 细胞; 套式 PCR

中图分类号: S852.655 S852.659.2

文献标识码: A

MDCK 细胞系是由 Madin 和 Darby 两人在 1958 年 9 月从 1 只成年的曲架 Cocker Spaniel 母犬的肾脏分离得到。在注册成为细胞系前检测霉形体、细菌和真菌感染结果为阴性。

MDCK 细胞系可以用作多种病毒的繁殖和纯化^[1,2] 如: 呼肠孤病毒(reovirus), 腺病毒(adenovirus)和细小病毒(canine parvovirus), 禽流感病毒(AIV)等。目前国内外部分犬病毒弱毒疫苗的繁殖也多采用 MDCK 细胞系。犬细小病毒能持续感染 MDCK 细胞系^[1]。如果传代细胞中存在细胞病变不明显的传代病毒感染时, 则对病毒的繁殖、纯化和疫苗生产构成潜在威胁, 细胞内的传代病毒可因某种原因返强将会带来意想不到的污染^[1,2]。

本研究的目的是利用套式 PCR 技术直接从 MDCK 细胞样品中检测 MDCK 细胞系内是否存在有传代的犬细小病毒污染。

1 材料和方法

1.1 材料

细胞系: 采用来自国内部分大学、研究所、卫生防疫站和动检局的 MDCK 传代细胞, 再在华南农业大学动物医学系实验室作多次传代。

药物试剂: Advantage-HF PCR Kit 和 pGEM⁺ 载体购自 Clontech 公司; RPM 1640 培养基购自 GibcoBRL 公司。

引物: 参照 Reed 等人报道的资料^[3]。从细小病毒的 VP₂ 结构基因上设计引物 Y₁、Y₃、Y₄ 和 Y₅, Y₁、Y₅ 为外侧引物, Y₃、Y₄ 为内侧引物。

引物的合成自上海生工公司。Y₁、Y₅ 为外侧引物, 跨幅预计约 750 bp, Y₃、Y₄ 为内侧引物, 跨幅预计约 500

bp; 用于扩增犬细小病毒 VP₂ 基因的抗原域部分。

引物 序列

Y₁ 5' CCGAATTCATGAGTGATGGAGCAGTTCA 3'

Y₅ 5' TTTCCTGGGCATCTGGATCTGTACCATGG 3'

Y₃ 5' CGGAATTCCTGGGTACTTTCAATAATCAG 3'

Y₄ 5' TTTCCTGGGAGTTGGTATGGTTGGTTTCC 3'

1.2 核酸的抽取

煮沸法^[4]: 样品用 PBS 以 1:2 稀释处理, 混匀, 煮沸 10 min; 冰浴 10 min。10 000 r/min 离心 3 min 后, 取上清液 10 μ L 做 PCR 的 DNA 模板。

蛋白酶 K 酚: 氯仿抽提法^[4]: 样品(新鲜或冰冻细胞培养物)用玻璃研磨器尽量磨碎, 加 TE 缓冲液 400 μ L(再以 100 μ L TE 冲洗匀浆器, 冲洗液一并转入 EP 管中), 加入 0.2 g/mL SDS 至终浓度 0.01 g/mL 混匀后置 60 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后, 37 $^{\circ}$ C 水浴 12~24 h, 中间不时摇动数次, 加 500 μ L 平衡酚, 混匀 10 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取含核酸水相加入 2.5 倍预冷无水乙醇, 离心后弃乙醇, 再加 $\varphi=70\%$ 乙醇漂洗, 离心后弃乙醇, 在超静台自然吹干, 加入 50 μ L TE 溶解, 置 -20 $^{\circ}$ C 或 4 $^{\circ}$ C 保存。或取 5 μ L 上清直接进行 PCR 扩增。

1.3 套式 PCR

(1) 用外侧引物 Y₁、Y₅ 进行第一次扩增。方法一, 反应体积为 50 μ L, 其中含量为: 10 $\times$ buffer 5 μ L, Y₁ 2 μ L, Y₅ 2 μ L, 取煮沸法^[2] 的模板 DNA 10 μ L, dNTP 5 μ L, dH₂O 25 μ L。预热后加 Taq DNA 聚合酶, 立即进行 PCR 扩增。第一次反应程序用 35 个循环, 其条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。

方法二, 反应体积为 50 μ L, 其中含量为 10 $\times$

buffer 5 μ L, Y₁ 2 μ L, Y₅ 2 μ L, 取蛋白酶 K、酚:氯仿抽提法^[4]的模板 DNA 5 μ L, dNTP 5 μ L, dH₂O 30 μ L. 预热后加 Taq DNA 聚合酶, 立即进行 PCR 扩增. 第一次反应程序用 35 个循环, 其条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min.

(2)内侧引物 Y₃、Y₄ 进行第二次扩增. 方法一, 反应体积为 50 μ L, 其中含量为: 10 $\times$ buffer 4.9 μ L, Y₃ 2 μ L, Y₄ 2 μ L, 将煮沸法^[2]的 Y₁、Y₅PCR 产物 5 μ L, dNTP 5 μ L, dH₂O 30 μ L. 预热后加 Taq DNA 聚合酶, 立即进行 PCR 扩增, 条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min.

方法二, 反应体积为 50 μ L, 其中含量为: 10 $\times$ buffer 4.9 μ L, Y₃ 2 μ L, Y₄ 2 μ L, 将蛋白酶 K、酚:氯仿抽提法^[2]的 Y₁、Y₅ PCR 产物 5 μ L, dNTP 5 μ L, dH₂O 30 μ L. 预热后加 Taq DNA 聚合酶, 立即进行 PCR 扩增, 条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min.

1.4 扩增基因片段的克隆与鉴定

将从 MDCK 细胞上扩增到的细小病毒 VP₂/Y₃、Y₄ 片段克隆到 pGEM-T Easy 载体上进行 DNA 序列分析.

2 结果

2.1 电泳结果

11 个 MDCK 细胞系的 DNA 巢式 PCR 电泳结果中只有 1 个没有出现细小病毒 VP₂/Y₃、Y₄ 的 DNA 条带, 其他 10 个全部出现细小病毒 VP₂/Y₃、Y₄ 的 511 bp DNA 条带, 见图 1.

2.2 测序结果及序列比较

对犬细小病毒 VP₂/Y₃、Y₄ 片段测试的结果: 该片段基因序列长 511 bp. 与 GENBANK 所有犬细小病毒的基因序列比较, 发现同源性最高的是 CPV-N 株, 为 91%, 同源性最低的是 CPV-2a, 为 88%.

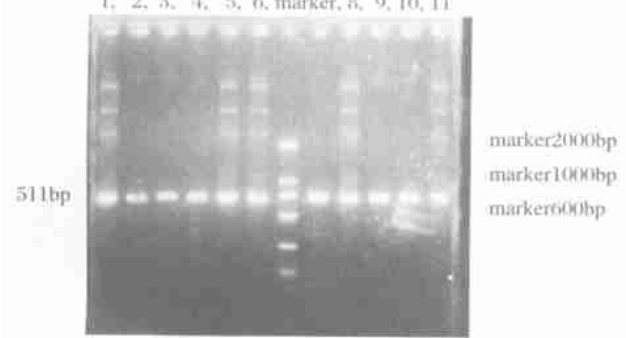


图 1 套式 PCR 电泳图

Fig. 1 Nested PCR

3 讨论

MDCK 细胞系于 1958 年从美国的 1 头曲架犬的肾脏组织培育而成, 而犬细小病毒的发现则是 20 年后的 1978 年, 由 Kelly 和 Thomson 首次从患肠炎的病犬中分离得到. 大部分研究者都喜欢用 MDCK 细胞系繁殖犬细小病毒. 究竟是在发现犬细小病毒的前 20 年 MDCK 细胞系就已经有犬细小病毒或是发现犬细小病毒后因某种原因而使 MDCK 细胞系受到污染, 其机理仍不清楚, 需要作进一步的深入研究.

需要指出的是我国的部分大学、研究院、卫生防疫站和动检局研究所 MDCK 细胞大多来自同一地方和经常作科研交换, 如果在购买时或索取时已经污染, 这样也会产生一定程度数据出入.

近年来华南地区某些养犬场, 使用一些传代细胞为材料的犬弱毒苗时, 结果仍有大量的幼犬发病死亡. 笔者从该厂家赠送的 MDCK 细胞中检测到传代的细小病毒, 说明此厂家的 MDCK 细胞系内的原为缺陷形病毒的传代犬细小病毒, 有可能获得疫苗的某些核酸片段而被激活, 变为有致病性的强毒.

本研究采用两种核酸抽提方法: 煮沸法和蛋白酶 K、酚:氯仿抽提法, 两种方法所获得的核酸样品经巢式 PCR 扩增的结果是一致的, 比较而言, 前者较后者操作更为简便快捷.

4 小结

用套式 PCR 的检测方法能检测出存在细胞系极少量的病毒^[1], 可以克服血清学方法的缺陷, 为犬细小病毒的早期检测提供一个敏感特异和安全的检测方法.

Hallaur 用血清学和病毒分离方法检测 1960 ~ 1971 年从欧洲某些实验室收集到的 43 株人传代细胞系, 发现其中 38 株受到了细小病毒的污染^[3]. 本研究则发现在 MDCK 细胞系存在潜伏性犬细小病毒污染.

参考文献:

[1] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996. 1 145—1 174.
[2] 王汉中, 梁 莉. 应用套式 PCR 检测猪细小病毒[J]. 病毒学报, 1996 12(2): 177—182.
[3] REED A P, JONES E V, MILLER T J. Nucleotide Sequence and Genome Organization of Canine Parvovirus[J]. J Virol, 1988, 266—276.

[4] 朱新产,张涌,廖祥儒. PCR 技术战略[J] . 生物技术通报, 1998 (3): 29—33.

[5] HALLAUER C. Parvovirus as contaminants of permanent cell lines[J] . Arch Ges Virusforsch, 1971, 35: 80—91.

Presence of a Vertically Transmitted
Canine Parvovirus in MDCK Cell Line Revealed with a Nested PCR

YANG De-wei(YEUNG De-wei), SONG Yan-hua, LIU Fu-an
(Dept. of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Eleven samples of MDCK cell lines collected from various university laboratories, epidemic prevention stations and quarantine bureaus within China since 1997. Utilizing 4 stretches of nucleotide sequences reported for the VP₂ gene of canine parvovirus as primers, the DNA of the samples were screened with a nested PCR procedure. The PCR-amplified product was subjected to electrophoretic analysis in 0.01 g/mL agarose, cloned in a PGEM-T vector and the nucleotide sequence determined. The findings revealed the presence of a vertically transmitted canine parvovirus. Partial sequencing of the virus genome showed 91% nucleotide homology with the canine parvovirus, strain CPV-N. This is the first case report of canine parvovirus in MDCK cell lines in our country.

Key words: canine parvovirus; MDCK cell line; nested PCR

【责任编辑 柴 焰】

欢迎订阅 2001 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物。本刊主要报道我校各学科的科研学术论文、研究简报、文献综述等,分为农学、植物保护、生物学、动物科学与医学、农业工程与食品科学、基础科学、综述、简报等栏目。本刊附英文目录和英文摘要。读者对象是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业干部。

本刊为中国科学引文数据库固定刊源,并排列在被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内。被《中文核心期刊要目总览》确认为综合性农业科学核心期刊、植物保护类核心期刊。为国内外多家著名文摘的固定刊源。

国内外公开发行、季刊、大 16 开。每期 94 页,定价 5.00 元,全年 20.00 元、自办发行,参加高等学校学报联合征订发行。

订阅办法: 1. 将订阅款邮汇至: 100054 北京右安门外首都医科大学期刊社; 2 银行汇款至: 户名: 首都医科大学期刊社; 开户银行: 工商银行北京宣武支行樱桃园分理处, 帐号: 144659—713; 3. 订阅款邮汇至: 510642 广州五山华南农业大学学报编辑部。

《华南农业大学学报》编委会