

HRP-HBV DNA 探针在临检应用中的研究

兰荣良 刘玉京* 陈玉芳 乔虹 唐焰

(北京生化免疫制剂中心 100012)

(* 北京医科大学人民医院中心实验室 100044)

摘要 本文介绍了一种简便的检测血清 HBV DNA 的方法。参照 Renz 等人的标记方法, 构建了直接酶标 HRP-HBV DNA 探针。此探针经与固定在硝酸纤维素滤膜上的血清靶 DNA 杂交后, 可通过化学发光自显影检测技术观察结果。

敏感度可检测 0.1pg 靶 DNA, 相当于同位素探针的灵敏度。对 63 份 HBsAg HBeAg 和 Anti-HBe ELISA 阳性血清以及 24 份 HBsAg Anti-HBe 阳性, HbeAg 阴性血清用 HRP-HBV DNA 探针进行检测, 结果探针 HBV DNA 阳性率分别为 100% (63) 和 58% (14); 对 50 份 HBsAg, ELISA 阴性和 ALT 正常的血清, 探针 HBV DNA 全部阴性。

实验结果表明本方法具有很大的推广应用价值。

关键词 HRP-HBV DNA 探针, 杂交, 化学发光自显影

1 前言

乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)感染机体后即将其特异基因带入人体, 并在体内增殖, 从而引起乙型肝炎。在我国大约有 1/10 左右的人口感染了 HBV, 其中包括急慢性乙型肝炎, 肝硬化, 肝癌及无症状带毒者等, 严重地损害了人民的身体健康。乙型肝炎及与 HBV 感染有关的疾病的防治是医疗卫生工作的一项重要内容, 而 HBV 感染的诊断又是这项工作中必不可少的一部分。

七十年代初, 以瑞典的 Engvall 为首的科学家首次介绍了 ELISA 实验方法, 此后该技术在乙型肝炎的诊断中发挥了重要的作用。迄今为止, 该技术仍不失为血清学试验中最重要的技术之一。

近几年来, 随着分子生物学及相关学科的飞速发展, 基因检测技术不断得到创新并且日趋完善, 核酸探针是检测特异, 互补序列的有力工具, 是基因检测技术中一项重要内容。对于 ELISA 技术而言, 核酸探针具有更高的灵敏性, 是病毒感染快速诊断技术的一个新发展。

核酸探针技术发展如此之快, 首要的原因就在于核酸的标记及检测技术不断得到改进和提高。以往的核酸探针多采用放射性同位素标记技术进行检测, 虽然这种方法灵敏度高, 但也存在许多不利因素, 如半衰期短, 易对人体产生伤害和对环境造成污染, 不利于储存和运输, 而且价格也比较昂贵。因

而, 人们进行了大量的研究, 终于发现了许多非放射性标记化合物可以进行核酸标记, 其中, 应用较为普遍的有利用光促标记的光敏生物素(Photobiotin)和生物素化补骨脂素(Biotin-11-psoralen), 利用酶促标记的生物素化脱氧尿嘧啶核苷三磷酸(Biotin-11-dUTP)和地高辛脱氧尿嘧啶核苷三磷酸(Digoxigenin-11-dUTP)。这些非放射性化合物的核酸标记虽然有许多优越性, 如安全, 效期长, 操作简便, 省时省力, 价格便宜, 但其灵敏度一般还低于同位素探针^[1]。

近几年, 随着研究工作的不断深入, 出现了一类新型的利用辣根过氧化物酶(HRP)化学发光体系进行的核酸直接酶标基因检测技术^[2], 将该技术应用于 HBV DNA 的标记与检测, 则称 HRP-HBV DNA 探针。该探针在临检应用中有很好的发展前景。

2 实验方法:

2.1 HBV DNA 基因组的制备: 本室基因工程菌株(宿主菌 HB101, 质粒 pBR322 4.3kb, HBV DNA 基因组 3.2kb)。经 LB 培养和质粒扩增, 用碱裂解法提取质粒, 再用 EcoR1 内切酶酶解, 最后用 DNA 琼脂糖凝胶电泳洗脱器分离纯化 HBV DNA。

2.2 HRP-PEI 标记试剂的制备^[3]: 取 200mg HRP (Sigma, RZ ≥ 3.0) 溶于 200 μ l 90mmol/L 磷酸缓冲液(PB) pH6.0 中, 加入 60 μ l 3% 对苯醌(PBQ) (Sig-

ma) 乙醇溶液, 37℃暗处放置 1 小时, 过 Sephadex G-50 柱, 收集棕色洗脱液。然后加入 1/10 体积 1mol/L 碳酸氢钠溶液, 再加入相当于 HRP 1/150 量的 5% PEI 2.7μl (BASF, Ludwigshafen), 混匀后置暗处 37℃用 PB 液 pH6.8 透析 20 小时, 即获得浓度为 7μg/μl 的酶标复合物。

2.3 探针的制备: 将纯化的 HBV DNA 定量后, 用三蒸水稀释成 100ng/μl, 取 20μl 含 200ng 的 HBV DNA 置于 0.5ml Eppendorff (Ep) 管中, 97℃5 分钟, 立即置 0℃5 分钟, 加入 20μl HRP-PEI 标记物混匀, 5 分钟后加入 0.5% 戊二醛 20μl 混匀, 37℃30 分钟。

2.4 血清样品的筛选: HBsAg, HBeAg 和抗-HBc 三项指标同时阳性血清 63 份, 及 HbsAg、抗-HBc 阳性, HbeAg 阴性血清 24 份 (法国巴斯德 ELISA 药盒), 以上血清来自北京第二传染病医院。HbsAg 阴性 (荷兰 AKS ELISA 药盒)、ALT 正常 (美国 Anchr 2 型全自动生化分析仪) 血清 50 份, 来自北京红十字血液中心。

2.5 杂交膜的制备:

1) 杂交灵敏度检测: 取 HBV DNA (1ng/μl) 2μl, 加 HBV DNA 阴性血清 (本室 HBV DNA-PCR 药盒检测) 50μl 混匀, 加入病毒裂解液 200μl, 室温放置 10 分钟, 加酚/氯仿/异戊醇 (24/24/1) 200μl 轻轻混匀, 12000rpm 离心 10 分钟, 取上清 150μl, 移入一个新管中, 加入 20μg 糖元, 再加入 200μl 异丙醇混匀, 室温放置 5 分钟, 12000rpm 离心 5 分钟, 70% 乙醇洗沉淀, 12000rpm 离心 5 分钟, 倒净乙醇, 37℃烘干, 再加三蒸水至 400μl, 此液浓度为 5pg/μl, 取 40μl (200pg HBV DNA) 作为梯度稀释的初始液。做梯度稀释时, 取 9 只 0.5ml Ep 管, 依次标记为 A、B、C、D、E、F、G、H、I 字样, 从初始液中取 20μl 入 A 管 (100pg), 在剩余 20μl 中加三蒸水 20μl, 混匀后取 20μl 入 B 管 (50pg), 在剩余液中加三蒸水 80μl, 混匀后取 20μl 入 C 管 (10pg), 从剩余液中取 20μl (10pg), 加三蒸水 20μl, 混匀后取 20μl 入 D 管 (5pg), 依此类推, 使从 A 到 I 管的 HBV DNA 浓度依次是 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 和 0.01pg。然后, 在各管中分别加入 20μl 0.4N NaOH 混匀, 室温变性 5 分钟, 备用。

2) 杂交特异性分析: 取 λDNA (1ng/20μl), HBV DNA (5pg/20μl), pBR322 (1ng/20μl), HBV DNA (0.5pg/20μl), HCMV DNA (1ng/20μl) 和 HBV DNA (0.5pg/μl) 分别加入 0.5ml Ep 管, 然后每管再

加入 0.4N NaOH 20μl, 室温变性 5 分钟, 备用。

3) 血清 HBV DNA 的制备: 取待检血清 50μl 入 0.5ml Ep 管, 加病毒裂解液 200μl, 室温作用 10 分钟, 加酚/氯仿/异戊醇 (24/24/1) 200μl 轻轻混匀, 12000rpm 离心 10 分钟, 取上清 150μl, 移入一个新管中, 加入 20μl 糖元混匀, 再加入 200μl 异丙醇混匀, 室温放置 5 分钟, 12000rpm 离心 5 分钟, 70% 乙醇洗沉淀, 12000rpm 离心 5 分钟倒净乙醇, 37℃烘干, 先加入三蒸水 20μl 混匀, 再加入 0.4N NaOH 20μl 混匀, 室温变性 5 分钟, 备用。

4) 点膜: 将 0.45μm 的硝酸纤维素 (NC) 滤膜浸入双蒸水中浸泡 10 分钟, 再用 2×SSC 浸泡 5 分钟, 在点样器上放置适当大小的用 2×SSC 浸泡过的新华滤纸一张, 将浸好的 NC 膜放在滤纸上, 对准点样孔, 其余点样孔用塑料薄膜封盖, 锁紧点样器, 连接负压水泵。将上述 1) 和 2) 的 DNA 液以及 3) 的血清 HBV DNA 液分别点膜, 抽干, 再用 0.4N NaOH 40μl 点膜, 抽干, 而后点入 2×SSC 100μl, 抽干。取下膜再用 2×SSC 漂洗一次, 待膜自然凉干后, 用滤纸和玻片夹住, 80℃烘烤 1.5 小时, 使 DNA 固定在膜上。

2.6 杂交: 将烤过的膜置于塑料薄膜袋内。事先按 0.25ml 杂交液/cm² 膜的比例准备好杂交液, 在杂交液中再按 5% (W/V) 的比例加入封闭剂, 充分溶解, 然后加入杂交袋中, 赶尽气泡, 密封杂交袋, 42℃50rpm 预杂交 30 分钟, 将杂交袋重新剪开缺口, 再按 3μl/探针/ml 杂交液的比例加入 HRP-HBV DNA 探针, 并使其在杂交液中分布均匀, 重新封袋, 继续 42℃50rpm 过夜杂交。

2.7 检测: 杂交后的膜置于平皿中, 先用洗膜液 1 在 42℃50rpm 的条件下洗膜, 10 分钟×2, 之后, 换洗膜液 2, 室温漂洗, 5 分钟×2, 取出膜沥干, 然后按 0.125ml 检测液/cm² 膜的比例添加等体积混合好的发光检测液 1 和 2, 均匀涂布后, 沥干, 用保鲜膜覆盖膜 DNA 面, 并将 DNA 面朝上置于暗盒中, 在暗室压上 X 光胶片, 曝光 3—10 分钟后显影, 定影。

3 实验结果:

3.1 杂交灵敏度分析: 从图 1 中可以看出, 用纯化的 HBV DNA 点膜杂交, 从 100pg 到 0.1pg 的 7 个斑点呈明显的梯度递减趋势, 且 0.1pg 仍可显示清晰的斑点, 而 0.05pg 和 0.01pg 则无斑点显示, 说明该探针灵敏度可达 0.1pg, 相当于同位素探针所具有 的 敏 感 度。

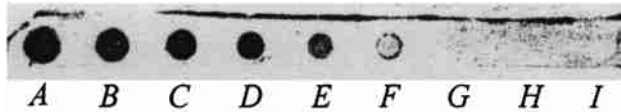


图 1 杂交灵敏度分析

从 A 到 I 依次为 100pg, 50pg, 10pg, 5pg, 1pg, 0.5pg, 0.1pg, 0.05pg 和 0.01pg, 在 0.1pg 处仍有斑点可见。

3.2 杂交特异性分析: 如图 2 所示, 1, 3, 5 号分别是 λ DNA, pBR322, HCMV DNA, 且 DNA 含量各为 1ng, 远高于 HBV DNA 量, 但无斑点显示, 而 2, 4, 6 号均为 HBV DNA, 2 号 DNA 含量为 5pg, 4 和 6 号各为 0.5pg, 均有斑点显示, 斑点光密度也均与灵敏度分析中相应的斑点光密度相当, 说明该探针所用方法不但具有可靠性, 也具有重复性。对于任何其他非同源序列不具有互补性, 是不能杂交的, 因而具有 100% 的特异性。

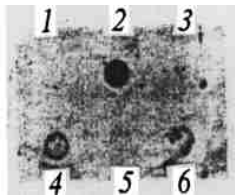


图 2 杂交特异性分析

1, 3, 5 分别为 λ DNA, pBR322 和 HCMV DNA, DNA 含量各为 1ng, 无斑点显示; 2, 4, 6 号均为 HBV DNA, 2 号 DNA 量为 5pg, 4 和 6 号各为 0.5pg, 均有斑点显示。

3.3 血清样品检测分析: 表 1 中列出了 63 份 ELISA 法 HBsAg, HBeAg 和抗-HBc 三阳血清及 24 份 HBsAg, Anti-HBc 阳性和 HBeAg 阴性血清经 HRP-HBV DNA 探针杂交检测, 阳性率分别为 100% (63) 和 58% (14), 50 份 HBsAg 阴性 ALT 正

表 1 HRP-HBV DNA 探针检测血清 HBV DNA 结果

组别	样品数	HBsAg	HbeAg	抗-HBc	ALT	HRP-P*	
						(+)	%
1	63	+	+	+		63	100
	24	+	-	+		14	58
2	50	-			正常	0	0

注: HRP-P*, HRP-HBV DNA 探针

常的血清经 HRP-HBV DNA 探针杂交全部阴性。上述结果说明 HRP-HBV DNA 探针与 ELISA 法有很好的一致性, 而且该探针具有更高的敏感性, HRP-HBV DNA 探针可有助于进一步诊断。

4 讨论

通过用本文所报导的方法对人血清 HBV DNA 的检测, 其结果显示了与同位素探针有相同的杂交灵敏度和特异性, 且方法简便、快速, 是目前替代同位素探针检测血清 HBV DNA 的首选方法, 由于该方法所需设备简单, 极易在各等级医院使用, 具有推广应用价值。

关于如何能获得满意的实验结果, 根据文献报导^[4]及我们在实验中的一些体会, 应注意以下几个问题: 1、为了确保杂交特异性, 首先用于标记的 HBV DNA 必须纯化, 使其不含有其他 DNA 存在, 如果 HBV DNA 不纯, 会产生非特异杂交信号。2、待检血清标本不能直接用于检测, 要从标本中抽提 HBV DNA, 如果不经纯化, 可能混有杂蛋白和脂类等物质, 而这些物质也因易与膜结合而影响检测结果, 本方法中用酚/氯仿/异戊醇抽提和异丙醇沉淀二步法基本保障了 HBV DNA 的纯度, 因而, 保证了杂交的高特异性。3、在抽提过程中操作应小心, 一定要将酚类物质除净, 以避免酚类物质具有一定的增加光强作用而影响实验的准确性。

参考文献

[1] Molden, D. P., R. M. Nakamura, H. Suzuki, S. Greer, R. G. Pergolizzi and C. L. Brakel, 1985. Clin. Physiol. Biochem. 3: 174-183.

[2] Labeling and detection of nucleic acids using ECL, Amersham, 1991.

[3] Renz M, et al. Nucleic Acids Res, 1984, 12: 83435

[4] 王申五, 基因诊断技术-非放射性操作手册, 1993, 111-116

Application of HRP-HBV DNA Probe in Clinic Detection

Lan RongLiang Liu Yujing* Chen Yufang Qiao Hong Tang Yan

(Beijing Biochemical Immune Reagents Center, 100012)

(* Central Laboratory, People Hospital, Beijing Medical University, 100044)

Abstract A simple method for detection of HBV DNA in sera is described in this thesis. A direct enzyme labeled HRP-HBV DNA probe was constructed according to Renz et al. After hybridization of the probe with target DNA in sera immobilized on nitrocellulose membrane, the result could be observed by the method of chemiluminescence autoradiographic detection.

The sensitivity is as low as 0.1pg of target DNA, comparable with that of isotope probe, HBV DNA was detected in 63 sera of HBsAg, HBeAg and Anti-HBc ELISA positive and 24 of HBsAg, Anti-HBc positive, HBeAg negative with HBV DNA positive rates of 100% (63) and 58% (14), respectively; 50 sera of HBsAg ELISA negative and ALT normal with HBV DNA all negative by the probe.

The result shows that this method is of great value to popularize.

Key words HRP-HBV DNA Probe, Hybridization Chemiluminescence Autophotographic Detection.

《生物工程信息快报》征订通知

由中国科学院生命科学与生物技术局等单位主办的《生物工程信息快报》是我国生物技术领域的信息性月刊,内容包括:

国内外生物技术最新研究进展;国内外生物技术开发动态;生物技术专利动态;商业生物技术情报;生物技术产品与市场;有关政策信息。

《生物工程信息快报》及时报道生物工程最新消息、动态、进展,旨在促进我国生物技术信息交流和生物工程产业化。《快报》设有国内动向、研究进展、论坛、动态、发展战略、产品开发、技术与方法、专题评论、市场、中国生物工程学会消息、会议预告、新书评介等栏目。

《生物工程信息快报》(月刊)2000年度全年12期,信息费共计110元。订户请汇款至:中国科学院文献情报中心,并注明“信息快报款”,并写清详细地址、单位、邮编、联系人等,以便寄刊。

开户银行、帐号:中国工商银行北京海淀分理处 891626-17 户名:中国科学院文献情报中心 通信地址:北京市中关村科学院南路8号(100080) 联系人:孟建华 电话:(010) 62562547, 62562548 传真:(010) 62562548