

PCR-ELISA 检测 HBV DNA 的研究

¹ 詹群珊 * 陈禹保 林玉兵 肖文元

(¹ 深圳市人民医院 518001; * 北京美迪科生物技术有限公司 100012)

摘要 目的: 建立一种敏感、特异的乙型肝炎病毒(HBV) DNA 检测方法。方法: 应用 PCR 扩增技术和核酸杂交技术结合酶促显色技术(即 PCR-ELISA 技术)来检测血清中的 HBV DNA。结果: 应用 PCR-ELISA 技术能够检出许多 PCR 琼脂糖凝胶电泳所检测不到的 HBV DNA, 大大地提高了检出率, 而且, 特异性强。结论: PCR-ELISA 方法灵敏度高, 特异性强, 检测结果数据化, 不受主观因素的影响。

关键词 乙型肝炎病毒 多聚酶链式反应 酶联免疫分析

对于 HBV DNA PCR 扩增产物的检测通常是采用琼脂糖凝胶电泳方法, 这种方法方便、简单、经济, 但是, 该法对于阳性很弱的标本检测不到, 而且应用该方法有溴化乙锭(EB)污染环境和紫外线伤害人体等缺点。本文旨在建立一种安全、准确、灵敏、特异的 HBV DNA 检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源: 乙型肝炎血清标本由北京平谷县人民医院, 通县人民医院, 大兴人民医院, 山东临沂市人民医院提供, 共 268 份标本。乙型肝炎病毒标准血清由卫生部临检中心提供, 其中包括 5 个毒粒/ml, 10 个毒粒/ml, 50 个毒粒/ml, 100 个毒粒/ml, 1000 个毒粒/ml, 10000 个毒粒/ml, 100000 个毒粒/ml 等规格的标准血清。

1.1.2 引物和探针: 引物的设计与合成由北京美迪科生物技术有限公司提供。

HBV 引物为基因 C 区的一段高度保守序列, 其正链为: 5'-TAG AGG CTC CCA GAC TTG TCG G-3', 其负链为: 5'-GAT GAA TGC GAC TAC ACA CT HBV 探针由美国 PE 公司合成与标记, 探针的 5' 端用生物素(Biotin)标记。探针为: 5'-GGA GCA TCT GTG GAG TTA-3'。

1.1.3 地高辛标记的 dUTP(Digoxigenin dUTP) 和抗地高辛标记的辣根过氧化物酶(AntiDigoxigenin POD)等试剂购自 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 标本处理: 所有血清标本和标准品都按下述方法处理: 取血清加入 25μl 样品处理液, 混匀, 100℃水浴 10 分钟, 然后 12000rpm 离心 10 分钟, 取上清即可直接用于 PCR 扩增。

1.2.2 PCR 扩增反应: 取标本处理上清 2μl 与 23μl PCR 缓冲液及 1U Taq DNA 聚合酶混匀, 滴加一滴石蜡油封顶, 离心数秒, 按如下参数扩增 35 个循环: 94℃/45 秒, 55℃/45 秒, 72℃/45 秒 HBV PCR 缓冲液中掺入一定比例(一般 1: 20)的 Digoxigenin dUTP, 这样, 在扩增出来的产物中就带有一定数量的 digoxigenin dUTP, 以利于检测。

1.2.3 扩增产物的检测: 扩增产物用微孔板液相杂交和酶联显色的方法来测定, 其过程为: 取 1: 1000 的链亲和素(streptAvidin)4℃包被微孔板条过夜(使链亲和素吸附在微孔板壁)3%的 BSA4℃封闭板条过夜(封闭板上的空位)37℃包被 1: 10000 的探针 1 小时(探针上的 Biotin 与 StrepAvidin 的结合使得探针固相化在微孔板上)→取 10μl 经变性过的扩增产物与 90μl 杂交液加入到微孔板中, 42℃温育 1 小时(扩增产物与探针特异地结合)→加入 1: 1500 的 AntiDig POD37℃温育 30 分钟(AntiDig-POD 与产物中的 Dig dUTP 特异性地结合)→加入底物 A、底物 B 显色→终止显色, 立即在酶标仪 450nm 处测定 OD 值。

2 结果

2.1 敏感性实验(表 1)

2.2 敏感性实验: (表 2)

2.3 特异性实验: (表 3)

2.5 重复性实验 1: 取 HBV 血清标本做批间实验

* 联系人: 北京美迪科生物技术有限公司 e-mail: yubaochen@yahoohoo.com

(批间重复实验)。(表4)

表1

ELISA 检测标本例数共268例		大三阳 104例	小三阳 87例	HBsAg 阳 42例	阳性 35例
PCR 电泳结果	阳性例数	104	19	2	0
	弱阳性例数	0	22	3	1
	阴性例数	0	46	37	34
	阳性例数	100%	47.1%	11.9%	2.9%
PCR-ELISA 结果	阳性例数	104	31	5	1
	弱阳性例数	0	20	6	3
	阴性例数	0	36	31%	31
	阳性率	100%	58.6%	26.2%	11.4%

表2

标本病毒含量 (毒粒/ml)		10	50	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
PCR 电泳结果		-	-	-	-	+/+	+
PCR-ELISA 结果	OD 值	0.008	0.658	1.529	2.679	OVER	OVER
	阴阳性	-	+	+	++	+++	+++

表3

标本类别		HBV 阳性 血清 15 份	HCV 阳性 血清 15 份	HEV 阳性 血清 4 份	TP 阳性 血清 3 份
PCE-ELISA 结果	阴性	0	15	4	3
	阳性	15	0	0	0

表4

标本性质	实验次数	PCR-ELISA 检测各种结果出现的次数		
		阳性次数	弱阳性次数	阴性次数
阳性	10	9	1	0
弱阳性	10	1	7	2
阴性	10	0	0	10

批间 CV 值为 9.12%。

2.6 重复性实验 2: (批内重复实验)

取 0 个毒粒/ml 血清在同一次实验中测定 6 次, 其 OD 值为: 0.012±0.008

取 50 个毒粒/ml 血清在同一次实验中测定 8 次, 其 OD 值为: 0.666±0.072

取 1000 个毒粒/ml 血清在同一次实验中测定 6 次, 其 OD 值为: 2.690±0.081

批内实验平均 CV 值为: 4.92%。

3 讨论

在乙型肝炎的诊断和治疗过程中, 人们一直希望能找到一种可以准确地反映 HBV 感染者体内 HBV 病毒复制水平的标志, 从而能够准确地诊断、指导用药和治疗评估。HBV DNA 的检测是判断机体是否受到 HBV 感染及反映病原体在机体内复制水平最直接、最有说服力的指标, 因此, 如何提高

HBV DNA 检测水平, 建立一种高灵敏度、高准确度的测定方法对于乙型肝炎的诊断和治疗有着重要的意义。

目前, 使用最普遍, 最便于临床接受的 HBV DNA 检测方法就是 PCR 琼脂糖凝胶电泳法, 该法的确能起到一定的检测功效, 但是, 该法的局限性也较大。从表 1 可以看到, PCR 电泳法对于 HBV 小三阳标本检测率较低, 只有 47.1%, 对于那些潜伏的 HBV DNA 就更难检测了。而 PCR-ELISA 方法对于这些低水平复制的 HBV DNA 有较高检出率, 并能检出潜伏的含量极低的 HBV DNA。从表 2 可以知道, PCR-ELISA 方法的灵敏度比电泳法要高 100 倍左右, 大大提高了 HBV DNA 检出率, 尤其对于 HBV 小三阳等弱阳性标本更是一种理想的测定方法。从表 3 可以明确, PCR-ELISA 方法检测 HBV DNA 特异性很高, 不受其他病毒感染的影响, 测定结果准确, 我们又经过对 PCR-ELISA 方法重复性的考察, 发现 PCR-ELISA 方法具有很高的稳定性, 其批间 CV 值为: 9.12%, 批内 CV 值为 4.92%。

综上所述, 应用 PCR-ELISA 方法来测定 HBV DNA 具有高敏感度、高特异、高稳定性, 克服了 PCR 电泳法的不足与缺点, 同时使测定结果数据化, 避免了主观因素的影响。而且, 一次实验可做大量标本, 96 份标本可以在一块酶标板上同时测定, 省时省材, 大大地减少了做大量样本时的烦琐与复杂性。为临床诊断和研究提供了一种方便/有效的工具。

参考文献

[1] Ann Vander Borgh, Jef Raus, et al. Journal of Immunological Methods(1999) 47- 61.

[2] Arai M, Kunisada K, Kawais, et al. Nucleoacides and Nucleotides 1994, 6: 1363.

[3] Hwang SJ, Lee SD, Lu RH, et al[J]. J virol Methods 1996, 62(2): 123 - 129.

[4] Jalava T, Lringle ring TOVAARA P, kallio A, et al[J]. Biotechniques 1993, 15(2): 134- 139.

[5] Journal of Medical Virology 1996, 48: 161- 170.

[6] Journal of Medical Virology 1997, 69: 209- 222.

[7] 廖晓辉, 戚中田, 孔宪涛. 第二军医大学学报, 2000 Vol. 21 P. 35- 45.

[8] 高巍. 北京医科大学学报. 酶免疫法量化分析乙型肝炎病毒核酸产物.

[9] 张龙兴, 汤林华等. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16 (1): 11- 15.

Studies on the detection of HBV DNA from human serum by PCR-ELISA Technique

Zhan Qunshan Chen Yubao* Lin Yubin Xiao Werryuan

(Beijing MDC Biotech Co., Ltd. 100012)

Abstract A sensitive, accurate method is important for early diagnosis of patients with HBV infected, so we established ELISA assay for the detection of PCR amplified sequence of HBV DNA in human serum. Through this method, 268 sera from HBV positive or negative patient were detected, the result showed that the ELISA assay based on PCR product is more sensitive and more specific than electrophoresis assay. This method in clinical application was discussed in details in the paper.

Key words HBV, polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay

* correspondence: yubaochen @ yahoo. com

(接第 33 页)

功地区分出基因中的功能性和非功能性突变^[19]。通过定向进化来研究蛋白质的结构和功能的关系,可为蛋白质的理性设计提供理论依据。

参考文献

- [1] Arnold Frances H. Accounts of Chemical Research, 10/ 3/97: 1-15.
- [2] Harayama Shigeaki. TIBTECH, 1998, 16: 76- 82.
- [3] Arnold Frances H. and Moore Jeffrey C. Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, 1997, 58: 1- 14.
- [4] Arnold F. H. In IBC Directed Enzyme Evolution. San Diego. 1998.
- [5] Zhang Ji-hu , Daves Glenn and Stemmer Willem P. C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 4504- 4509.
- [6] Chen Keqin and Arnold F. H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90: 5618- 5622.
- [7] Zhao Huimin and Arnold Frances. Current Opinion in Structural Biology, 1997, 7: 480- 485.
- [8] Moore Jeffrey C. and Arnold Frances H. Nature Biotechnology, 1996, 14: 458- 467.
- [9] Moore Jeffrey C. and Arnold Frances H. Nature Biotechnology, 1996, 14: 458- 467.
- [10] Stemmer W. P. C. Nature, 1994, 370: 389- 391.
- [11] Stemmer Willem P. C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91: 10747- 10751.
- [12] Shao Zhixin, Zhao Huimin, Arnold F. H. Nucleic Acids Research, 1998, 26(2): 681- 683.
- [13] Zhao H, Giver L, Shao Z, Affholter JA and Arnold FH. Nat Biotechnol 1998, 16(3): 258- 61.
- [14] Seiichi Taguchi, Akiyoshi Ozaki and Hanio Momose. Applied and Environment Microbiology, 1998, 64(2): 492- 495.
- [15] Greener, A. and Callahan. M. Perform Random Mutagenesis. Strategies, 1994, 7: 32- 34.
- [16] Zhao Huimin and Arnold Frances H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 7997- 8000.
- [17] Zhao Huimin and Arnold Frances H. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 1307- 1308.

Advances in Study on Directed Evolution of Proteins

Xiao Zhizhuang Liu Menghai Wang Tianhong Qu Yinbo

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, P. R. China)

Abstract Directed evolution is a new powerful strategy for engineering proteins. It mainly mimics the process of natural evolution in the laboratory to generate random mutations in the genes coding for useful proteins by the techniques of error-prone PCR and mutator strain, then in vitro recombines positive mutations through such methods as high fidelity DNA shuffling, random priming recombination and staggered extension process. Finally, the desired mutants are selected out with high-throughput screening. It not only can provide rapidly new enzymes for industrial application, but also has much theoretical importance for studying the relationship between protein structure and function.

Key words Directed evolution, random mutagenesis, DNA shuffling, random priming recombination, staggered extension process.