

克隆化探针中载体与临床样品同源性的研究*

伍欣星 杨平 赵文先 刘薇茜 谭云

(湖北医学院病毒研究所生化室, 武汉)

提 要

当前, 克隆化探针(由病毒核酸片段和细菌质粒—载体组成)在临床样品的实验诊断和研究中得到了应用。它具有简便、快速、灵敏等优点, 并有助于检测那些难于或不能培养的病毒。但是克隆化探针中载体与临床样品的同源性问题应引起重视。我们用常见的克隆载体 pBR322 作探针, 用核酸点杂交和 Southern 吸印方法, 检测了来自 173 人的 213 例样品。结果表明, 在常用的临床样品: 人宫颈脱落细胞、宫颈活检组织、血液中都含有 pBR322 DNA 的同源序列, 这就意味着如果用克隆化探针检测这些临床样品时, 可能出现样品与载体发生非特异性反应, 而不是与病毒基因片段的特异性反应。实验还表明, 经一次电泳纯化的病毒基因片段与 pBR322 探针杂交, 阳性信号明显减弱, 但没有完全消失, 说明仍有少量 pBR322 污染。因此, 在运用克隆化探针检测临床各类样品时, 各系统要按常规设载体探针对照, 或者用多次纯化的分离病毒基因片段作探针, 以排除载体与临床样品的同源性问题的。

关键词: 载体同源性; 临床样品; 分子杂交; 克隆化探针

核酸杂交技术已广泛地应用于研究肿瘤的病毒病因以及某些慢性病毒感染的诊断中。它独特的优越性是不依赖于病毒的复制。因此一些难于或不能通过组织培养分离的病毒(如乙肝病毒, 人乳头瘤病毒等)可用核酸杂交方法, 直接检测细胞中存在的病毒基因^[1]。我们和其它实验室通常使用的克隆化探针, 是由病毒基因片段与细菌质粒, 如 pBR322(载体)重组而成。标有同位素的探针和硝基纤维膜上的样品 DNA, 通过变性成为单股, 如果样品中含探针的同源物, 就会与探针 DNA 结合, 然后通过自显影检测出。这种克隆化探针简便、快速、灵敏度高。但在过去的实验中, 我们发现用克隆化探针检测临床样品的阳性率略高于用病毒基因片段作探针的阳性率, 因此考虑: (1)样品中蛋白等杂质的物理吸附, 造成假阳性; (2)临床样品中可能含有与载体同源物质。为了探讨这一问题, 我们做了以下实验。

材 料 与 方 法

一、临床样品的来源与制备

1. 人宫颈脱落细胞: 来自妇检及人工流产术前检查的妇女。

本文于1988年6月26日收到

• 国家自然科学基金资助项目

细胞收集在 3ml 的磷酸缓冲液(PBS)中, 含青霉素 100u/ml, 链霉素 100 μ g/ml, 4 $^{\circ}$ C 保存。50 例样品离心后, 细胞沉淀重悬于 TE 缓冲液中, 40 例样品离心后提取细胞 DNA^[2]。

2. 人宫颈活检组织: 来自临床慢性宫颈炎, 宫颈癌和恶性葡萄胎的宫颈活检组织, 在 -30 $^{\circ}$ C 冻存, 核酸提取按文献^[2]进行。

3. 手术切除组织: 手术切除的子宫体、卵巢和胎盘, 按上法提取核酸。

4. 血液: 为临床检查肝功能的静脉血样品, 取血清 80 μ l, 直接点于硝基纤维素膜上, 减压抽干^[3]。

5. 阳性、阴性对照样品: (1) C-Ha-ras 克隆株(湖南医学院赠); (2) HPV-16 DNA 克隆株; (3) C-Ha-ras 克隆株诱导 NIH/373 细胞发生转化, 6 周后提取转化细胞 DNA (另报道); (4) 鲑鱼精 DNA; (5) 正常的 NIH/373 细胞 DNA; (6) TE 缓冲液。

6. 病毒基因片段: HPV-16 克隆株由西德 Zur Hausen 博士赠送, 扩增培养后提取质粒 DNA^[4], BamHI 消化 2hr, 电泳回收 7.9kb 的 HPV-16 DNA 片段。

二、探针 DNA 的来源及制备 pBR322: 华美公司产品, BamHI 消化 2hr, 取 2 μ g 作探针, 进行 ³²P-dCTP 或 ³⁵S-dATP 标记。

三、缺口转移标记 缺口转移标记试剂盒, 英国 Amersham 公司产品, 按说明进行标记。

四、核酸杂交 各临床样品 DNA 5 μ g 和脱落细胞(约 3×10^6) 以及阴、阳性对照 DNA 各 0.5 μ g, 点于硝基纤维素膜上, 变性, 中和。Southern 吸印转移按文献进行^[5], 脱探针时, 将膜置于 100 $^{\circ}$ C 双蒸水中, 10 分钟后取出, 凉干。

结 果

一、宫颈脱落细胞

来自 50 名妇女的 90 份脱落细胞样品与探针 pBR322 进行杂交。在 50 例脱落细胞直接点样标本中, 33 例出现阳性和弱阳性杂交斑点, 脱落细胞经提取 DNA 后再点样的 40 例样品, 4 例阳性。这些细胞取样前未进行阴道消毒, 见图 1、2。

二、活检组织

80 份活检组织 DNA 与 pBR322 探针杂交, 7 份出现阳性。取样前按常规进行阴道消毒, 见图 3。

三、血液

40 例血清样品有 23 例显示出阳性斑点, 但阳性信号比其它组织样品弱, 且较均匀一致, 见图 4。

四、手术切除的 3 例组织 DNA 均为阴性

五、点杂交阳性的活检 DNA 样品一例, 进行了 Southern 吸印杂交。DNA 用 BamHI 37 $^{\circ}$ C 酶切 16 小时, 结果出现明显的阳性杂交带。

六、取点杂交阳性的样本 3 例, 分别用蛋白酶 k 100 μ g/ml, RNase 100 μ g/ml 37 $^{\circ}$ C 消化 1 小时, 阳性斑点仍然存在, 而用 DNase 20 μ g/ml 37 $^{\circ}$ C 保温 4 小时, 阳性斑点消失。

七、HPV-16 重组质粒(pBR322-HPV-16 DNA) 和作一次电泳纯化的 HPV-16 DNA 片段, 各 0.5 μ g, 与 pBR322 探针杂交, 前者呈强阳性, 后者呈弱阳性反应, 见图 5。

八、3 例阳性对照样品, 均为阳性, 3 例阴性对照样品, 均为阴性。

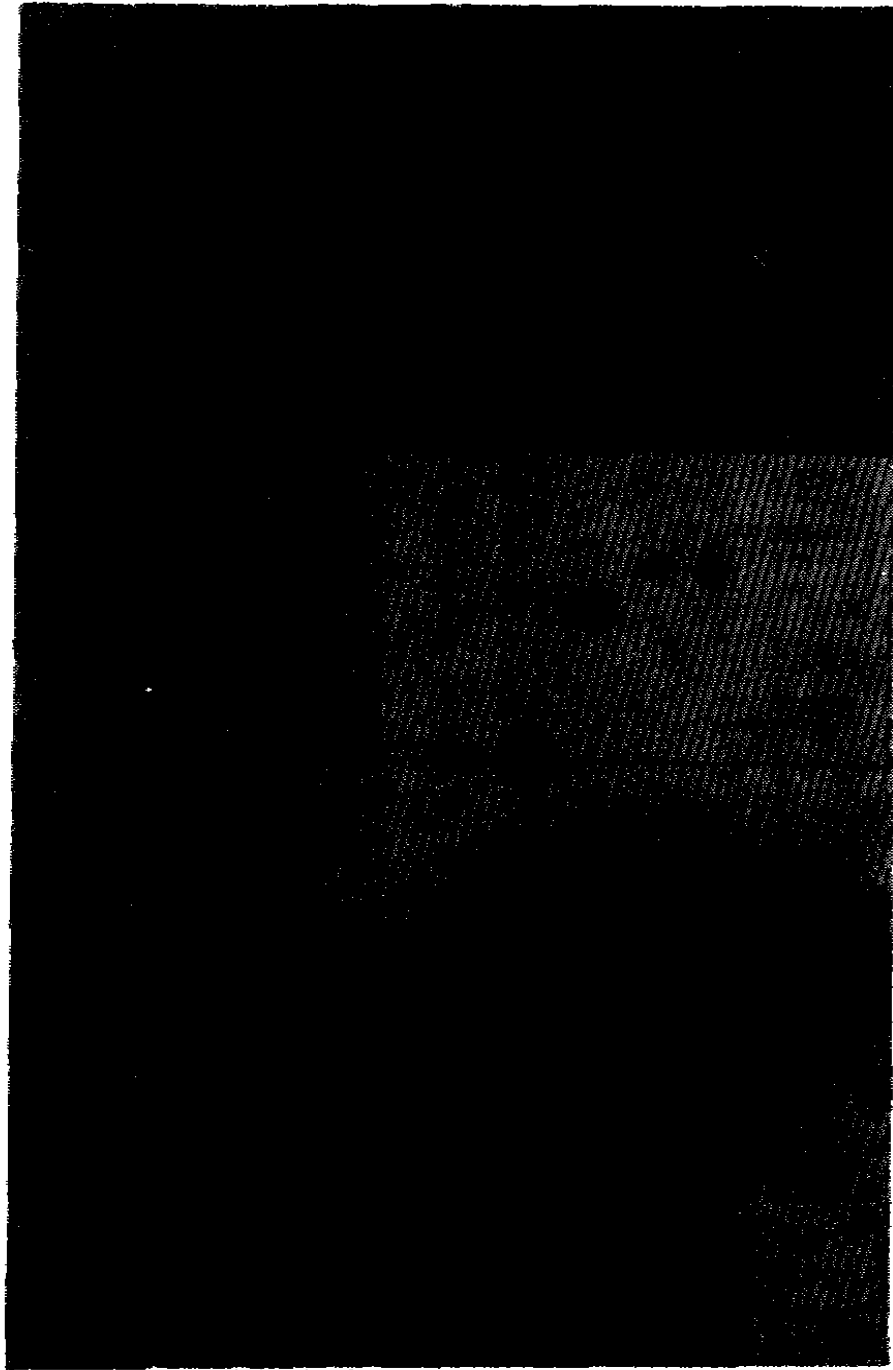
结果汇总于表中。

各类临床样品与 pBR322 探针杂交结果
Hybridization Results of Various Clinical Samples with pBR322 Probe

临床样品 Clinical specimens	例数 No. of cases	阳性数 No. Positive	阳性率 Positive rate (%)
人宫颈脱落细胞 Cervical scrape samples	50	33	66
宫颈脱落细胞 DNA DNA of cervical scrape samples	40	4	10
宫颈活检组织 DNA DNA of cervical biopsies	80	7	8.7
人血清 Serum	40	23	57.5
手术切除组织 DNA DNA of tissue excised	3	0	0
合计 Total	213	67	
阳性对照 Pos. Control	3	3	100
阴性对照 Neg. Control	3	0	0

讨 论

当前克隆化探针正试用于临床样品的实验诊断和研究^[1,2-7]，与常用的检查病毒性疾病的方法（组织培养分离病毒，各种血清学方法检查抗原，电镜观察）比较，核酸杂交技术具有快速、灵敏，不依赖于病毒的复制等优点。但克隆载体与临床样品的同源性问题不得不引起注意。1984年，顾健人和 Barbaeid 就发现了这一现象^[8,9]，1986年，AmBinder 报道，在漱口液、尿液、支气管冲洗液和手术切除的肿瘤样品中，发现有 pBR322 的同源序列，将临床样品中分离得到的大肠杆菌与尿液混合，提取、浓缩后与 pRL₃（带有 HCMV DNA 的重组质粒）和 pBR322 分别试验，出现强杂交信号，说明样品的阳性结果可能是细菌污染所致^[10]。在我们的实验中，用脱落细胞和血清直接点样，阳性率分别达 66% 和 57.5%，而脱落细胞经过一个提取(DNA)过程后，阳性率降至 10%，说明在含杂质多的样品中，假阳性反应较多，这种假阳性可能是由于蛋白等杂质的物理吸附造成。而脱落细胞 DNA 和活检组织 DNA 亦分别有 10% 和 8.7% 的阳性，这种阳性可以排除是由于杂质造成，其根据：（1）Southern 吸印杂交出现阳性杂交带（位于 4.3kb 处）与点杂交结果相符；（2）用蛋白酶和 RNA 酶处理样品后，不改变阳性结果，而用 DNA 酶处理后阳性斑点消失。我们认为在这些临床样品中确实含有 pBR322 的同源性物质。这意味着：如果用克隆化探针（带 pBR322 DNA）检测这些临



各类临床样本与 pBR322 探针杂交自显影图

Autoradiography of pBR322 Probe with Various Clinical Samples Hybridization

- | | | | |
|-------|---|-------------|---------------------------------|
| 图 1 | 人宫颈脱落细胞样品 | Fig.1 | Human cervical scrape specimens |
| 图 2 | 宫颈脱落细胞 DNA | Fig.2 | DNA of cervical scrapes |
| 图 3 | 人宫颈活检组织 DNA | Fig.3 | DNA of human cervical biopsies |
| 图 4 | 人血清样品 | Fig.4 | Human serum specimens |
| 图 5 | HPV-16 DNA 重组质粒 (pBR322-HPV-16 DNA) 和 HPV-16 DNA 片段 (一次电泳纯化) 与 pBR322 DNA 杂交比较 | | |
| Fig.5 | Comparison of hybridization with pBR322-HPV-16 DNA and HPV-16 DNA fragment using pBR322 DNA prebe | | |
| | 1) pBR322-HPV16-DNA | 2) HPV16DNA | 3) TE |

床样品,可能出现临床样品与载体的非特异性反应,而不是与病毒 DNA 片段的特异性反应。这种同源物质是由于细菌污染所致?还是人体细胞本身就有 pBR322 同源序列的 DNA 存在?值得探讨!在本实验中,经一次电泳分离纯化的病毒 DNA 片段,与 pBR322 探针杂交,阳性信号明显减弱,但没有完全消失,说明仍有少量 pBR322 DNA 的污染,因此提示,既使是用病毒 DNA 片段(经一次电泳纯化)作探针,在细菌污染较严重的临床样品中,仍会出现样品与少量 pBR322 DNA 的非特异性反应。

根据本实验结果,我们认为:载体同源性问题应该引起重视,它不仅限于上述几种临床样品,可能涉及到多种类型,并且不仅仅出现在病毒核酸杂交中,而且在所有的分子杂交试验中都要注意。不认识这一问题,将会作出不准确的判断,直接影响检查的可靠性。我们建议,在核酸杂交试验中,各样品最好要经过一个纯化过程;在运用克隆化探针时,各检测系统要接常规作载体探针对照,或者用多次纯化的核酸片段作探针,以减少或排除载体同源性问题。

参 考 文 献

- (1) 谷淑燕等, 1985, 国外医学(微生物学分册) 5: 222.
- (2) Beric R. Henderson et al., 1987, *J. Medical Virol.* 21: 381-393.
- (3) 陈渊清等, 1983, 中华传染病杂志, 1: 63.
- (4) 伍欣星等, 1987, 湖北医学院学报, 8: 305-308.
- (5) Maniatis T. et al., 1982, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- (6) Anasman W. et al., 1983, *J. Insect. Dis.* 148: 967.
- (7) Volker Schuster 1986, *J. Medical Virol.* 19: 277-286.
- (8) 顾健人等, 1984, 中华传染病杂志, 2: 221.
- (9) M. Barbacid., 1984, *Science* 225: 670.
- (10) Richard F. Abinder et al., 1986, *J. Clinical Microbiol.* 24: 16-20.

Study on Vector Homology in Clinical Specimens with Cloned Probes

Wu Xin-xing et al

(Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan)

Nucleic acid hybridization techniques using cloned probes (recombinant plasmids composed of viral fragment and bacterial plasmid vector, such as pBR322) are applied in assay of clinical specimen in research and diagnostic laboratories. They have simple, quick and sensitive advantages, and help to detect those virus gene that are difficult or impossible to culture. However, it should

be noted that there may be a homology problem between cloned probe and clinical specimens. We detected 213 specimens from 173 people using probe of pBR322 by Dot and Southern blot hybridization. It is shown that there was material homologous to pBR322 present in many clinical samples, cervical scrapes and DNA, cervical biopsies and blood. It means that a hybridization may present between samples and vector, other than virous gene, if using cloned probe to detect these samples. It is also shown that the relative intensity of hybridization was much reduced but not eliminated viral fragment isolated by a single gel electrophoresis to pBR322 probe. This implies that non-specific reaction can appear on heavy bacterial contaminant. Therefore, it is essential that all detection systems use a control probe of vector alone or the repetitive gel isolated fragment as a probe in hybridization studies to demonstrate the absence of material with vector homology in the sample tested.

This is the first report in China.

Key words, Vector Homology, Clinical Specimens, Hybridization, Cloned probe