

## 同位素与生物素标记的HCMV DNA 探针检测 婴儿肝炎综合症血和尿标本的比较

洪世雯 余明炎 刘洪 刘觉辉

(中国人民解放军302医院, 北京100039)

### 提 要

用  $^{32}\text{P}$  和生物素标记的克隆化的人巨细胞病毒 (HCMV) AD169株 DNA 片段作探针, 采用 DNA-DNA 斑点杂交法, 对照检测了27例婴儿肝炎综合症患者(血清学检测为非甲非乙型肝炎者)临床血、尿标本的 HCMV-DNA。其中16份血标本呈阳性, 占59%; 9份尿标本呈阳性, 占33%。初步结果表明, 血标本中 HCMV DNA 检出率比尿标本检出率高26%。标记的  $^{32}\text{P}$  探针可检测10pg同源DNA, 生物素探针可检测 50pg同源DNA, 均不与其他疱疹病毒及未感染的人胚肺细胞DNA杂交。将其中26份血标本的 HCMV DNA 杂交结果与抗 HCMV IgM ELISA 检测结果相比较, 符合率为65%。

**关键词:** 人巨细胞病毒  $^{32}\text{P}$  标记探针 生物素标记探针 DNA-DNA 杂交 抗 HCMV IgM

在很多婴儿肝炎综合症患者的临床标本中可检测出人巨细胞病毒 (HCMV) 感染。通常采用组织培养法分离病毒, 但其操作繁琐, 且需数周才能出结果。血清学方法也有一定的局限性。近年来所发展的核酸杂交试验是检测临床标本中病毒核酸的一种敏感、特异且快速的方法。HCMV核酸内切酶片段的克隆, 为核酸杂交试验制备探针所需的核酸提供了可靠的来源。我们用  $^{32}\text{P}$  和生物素标记的克隆化 AD169 株 DNA EcoRI D 片段作探针, 采用 DNA-DNA 斑点杂交法, 比较了婴儿肝炎综合症患者血、尿标本中 HCMV DNA 的检出率。同时, 也将血标本中 HCMV DNA 杂交结果与抗 HCMV IgM ELISA 结果作了比较。现将初步结果介绍如下。

### 材 料 和 方 法

1. **病毒和细胞:** HCMV AD 169 株、单纯疱疹病毒 2 型 (HSV-2) 及 Epstein-Barr 病毒 (EBV) B95-8 株均由中国预防医学科学院病毒所引入。单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 由本实验室分离。HCMV 在人胚肺 (HEL) 细胞中繁殖。

2. **临床标本的来源及处理:** 同一婴儿肝炎综合症患者 (1岁以下婴儿, 肝脾肿大, 肝功异常, 黄疸, 血清学检测排除甲乙型肝炎者), 采集其血、尿标本各一份。由中国人民解放军302医院五科提供。

(1) 尿样处理: 2-20ml 新鲜尿液于 2000Xg 离心 5 分钟后, 上清于 4℃, 20000Xg 离心 2.5

本文于1990年5月24日收到, 8月6日修回。

小时。沉淀溶于200 $\mu$ l含有0.5% SDS和500 $\mu$ g/ml pronase的STE(0.1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris·HCl pH8.0, 10mmol/L EDTA), 置37 $^{\circ}$ C保温1小时<sup>[1]</sup>。此混合液用酚、酚-氯仿-异戊醇50:48:2和氯仿-异戊醇(24:1)各提取一次后, 乙醇沉淀。加200 $\mu$ l TE(10mmol/L Tris·HCl pH7.5, 1mmol/L EDTA)溶解沉淀。

(2) 血样处理: 将2—5 ml 肝素抗凝血轻轻加于等体积分层液(Ficoll-Conray液, 比重为1.070g/ml)中, 于2000r/m水平离心20分钟。吸出血清, 用捕获ELISA法检测抗HCMV IgM。吸出白细胞带, 用Hanks液洗一次, 将白细胞悬于200 $\mu$ l含0.5% SDS, 500 $\mu$ g/ml pronase的STE中, 于37 $^{\circ}$ C保温1小时。以下处理与上述尿样同。

### 3. 核酸探针的制备:

(1) 克隆菌的培养和质粒的提取: HCMV AD 169株DNA EcoRI D片段(17kbp)与载体质粒pACYC 184重组, 在大肠杆菌HB101株中增殖<sup>[2]</sup>(该菌由美国D.H.Spector提供)。按Mannatis法培养和提取质粒<sup>[3]</sup>。质粒的产量可达约2 mg/l培养液。

(2) HCMV DNA D片段的纯化: 提取的质粒经EcoRI消化后, 在0.8%琼脂糖凝胶中电泳分离载体DNA和HCMV DNA D片段。切下含D片段的凝胶带, 放入透析袋中, 电泳回收DNA。用乙醇沉淀DNA, 加适量TE溶解沉淀, 使DNA浓度约为0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l。

(3) 探针的标记: 采用缺口转移法标记<sup>[4]</sup>。 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP为New England Nuclear产品。Bio-11-dUTP为美国ENZO BIOCHEM公司及北京医科大学实验药厂的产品, 分别标记HCMV DNA D片段。<sup>32</sup>P标记的探针, 比活性约为10<sup>8</sup>cpm/ $\mu$ g DNA。生物素标记的探针, 其浓度为20  $\mu$ g/ml。

### 4. 核酸斑点杂交

(1) 点样: 硝酸纤维素膜(NC膜)由北京化工学校生产, 孔径为0.45 $\mu$ m。将NC膜置于斑点杂交点样器中, 待测标本滴入点样孔中。变性和中和均按杜绍财所述方法进行<sup>[5]</sup>。

(2) 预杂交: 将NC膜置于含预杂交液的塑料袋中, 密封后置于42 $^{\circ}$ C保温6小时。预杂交液的组成为: 50% 甲酰胺, 5 $\times$ Denhardt's(1 $\times$ Denhardt's为0.02% 聚乙烯吡咯烷酮, FicoII 400, BSA), 5 $\times$ SSPE(1 $\times$ SSPE为0.18mol/L NaCl, 10mmol/L磷酸钠, pH7.4, 1mmol/L EDTA), 0.1% SDS和100 $\mu$ g/ml的热变性小牛胸腺DNA。

(3) 杂交: 将热变性的探针加到上述塑料袋中, 于42 $^{\circ}$ C杂交24—48小时。

(4) 漂洗: <sup>32</sup>P杂交后的NC膜在室温下用4 $\times$ SSC/0.1% SDS洗三次, 每次5分钟, 在65 $^{\circ}$ C用4 $\times$ SSC/0.5% SDS洗4小时, 在45 $^{\circ}$ C用0.1 $\times$ SSC/0.1% SDS洗2小时, 然后将NC膜置80 $^{\circ}$ C烘干。生物素探针杂交后的NC膜在室温下用2 $\times$ SSC/0.1% SDS洗二次, 每次15分钟, 再用同样漂洗液于65 $^{\circ}$ C洗二次, 每次15分钟, 然后用2 $\times$ SSC于室温下洗15分钟。

(5) 曝光和显色: <sup>32</sup>P探针杂交后的NC膜置于X光片上曝光1—10天。生物素探针杂交后的NC膜的显色, 采用碱性磷酸酶显色系统, 按北京医科大学实验药厂出售的显色系统的操作程序进行。其中所用的抗生物素蛋白(SA), 生物素-碱性磷酸酶(Bio-Ap), 5-溴-4-氯-3-磷酸吲哚(BCIP)和氮兰四唑(NBT)均购自北京医科大学实验药厂。

5. 血清中抗HCMV IgM的ELISA检测: 按刘洪所述方法进行<sup>[6]</sup>。

## 结果和讨论

1. 敏感性和特异性: 标记的<sup>32</sup>P探针和生物素探针均与HCMV AD 169株感染的HEL细胞提取的DNA杂交, 而不与未感染的HEL细胞DNA、HSV-1 DNA, HSV-2

DNA, EBV DNA 及噬菌体  $\lambda$  DNA 杂交 (图版 IV 1, 2)。 $^{32}\text{P}$  探针可检测 10pg 同源 DNA (图版 IV 3), 生物素探针可检测 50pg 同源 DNA (图版 IV 4)。我们曾报道过<sup>[7]</sup>,  $^{32}\text{P}$  标记的 D 片段探针检测临床标本的杂交结果与组织培养分离病毒法相比较, 其特异性为 100%。因此, 上述结果表明, 我们所制备的  $^{32}\text{P}$  和生物素标记的 AD 169 株 DNA EcoRI D 片段探针, 均可用作 HCMV DNA 杂交检测, 其特异性强, 敏感度高。

$^{32}\text{P}$  探针比生物素探针敏感性高 5 倍。这一结果与 N.S. Lurain 等人的报道相符<sup>[8]</sup>。近年来, 很多研究者对生物素检测系统作了一些改进, 可使敏感性提高到 0.25pg<sup>[9]</sup>。生物素探针对人体无放射性损伤, 易于操作, 出结果快, 且较为稳定, 在低温下至少可保存一年以上。因此, 用生物素探针检测, 具有一定的优越性; 同时, 生物素探针还可用于原位杂交的研究。我们用自制的生物素探针, 采用原位杂交法, 检测病理切片的 HCMV 感染, 得到了满意的结果<sup>[9]</sup>。

2. 血、尿标本中 HCMV DNA 检出率的比较: 27 例婴儿肝炎综合症患者的血、尿标本的 DNA 杂交结果列于表 1。 $^{32}\text{P}$  探针检测的 24 例患者的血、尿标本中, 8 例血、尿标本均为阳性, 7 例血标本为阳性, 尿标本为阴性, 其余 9 例血、尿标本均为阴性。生物素探针检测的 3 例血、尿标本中, 1 例血、尿标本均为阳性, 另 2 例血、尿标本均为阴性。由以上初步结果可以看出, 27 份血标本中, 共有 16 份为阳性, 占 59%。27 份尿标本中, 共 9 份呈阳性, 占 33%。婴儿肝炎综合症患者尿标本中 HCMV DNA 为阳性者, 其血标本均为阳性, 而血标本中 HCMV DNA 检出率比尿标本检出率高 26%。血标本的处理不需要较长时间的高速离心, 比尿标本的处理简单、易行。图版 IV 5 为  $^{32}\text{P}$  探针检测 17 份临床标本的核酸杂交图。图版 IV 6 为生物素探针检测 6 份临床标本的核酸杂交图。

3. 血标本 HCMV DNA 杂交结果与抗 HCMV IgM ELISA 结果的比较: 26 份血标本的 DNA 杂交结果与 IgM ELISA 结果的比较列于表 2。其中 9 份 DNA 杂交阳性的标

表 1 27 例婴儿肝炎患者血、尿标本 HCMV DNA 杂交结果的比较

Tab 1 Comparison of the results of HCMV DNA hybridization for blood and urine specimens of 27 infant patients with hepatitis

Specimens	Probe	No. of specimens	Positive	Total positive	Positive rate
Blood	$^{32}\text{p}$	24	15	16	59%
	Biotin	3	1		
Urine	$^{32}\text{p}$	24	8	9	33%
	Biotin	3	1		

表 2 26 份血标本 HCMV DNA 杂交结果与 IgM ELISA 结果的比较

Tab 2 Comparison of HCMV DNA hybridisation and anti-HCMV IgM for 26 blood specimens

Hybridisation	IgM ELISA		Agreement
	Positive	Negative	
Positive	9	7	65%
Negative	2	8	

本, IgM ELISA 也为阳性; 8 份 DNA 杂交阴性的标本, IgM ELISA 也为阴性, 其符合率为 65%。7 份 DNA 杂交为阳性的标本, IgM ELISA 为阴性; 2 份 DNA 杂交为阴性的标本, IgM ELISA 为阳性。表 2 列出的结果显示, 26 份血标本中, 16 例 DNA 杂交呈阳性, 占 62%, 11 例 IgM ELISA 呈阳性, 占 42%。二种检测结果部分不符合, 可能是由于检测方法本身的敏感性、特异性不同所引起, 也可能是由于潜伏感染或患者血液中的 HCMV 与抗 HCMV IgM 的存在并不完全同步所致。

### 参 考 文 献

- [1] Lurian NS et al., 1986, *J Clin Microbiol*, 24: 724.
- [2] Tamaahiro JC et al., 1982, *J Virol*, 42: 547.
- [3] Maniatis T et al., 1982, *Molecular cloning (a laboratory manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp88.
- [4] Maniatis T et al., 1982, *Molecular cloning (a laboratory manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp110.
- [5] 杜绍财等, 1983, 北京医学院附属人民医院年刊, 第12页。
- [6] 刘洪等, 实验和临床病毒学杂志, 待发表。
- [7] 洪世雯等, 中华微生物学和免疫学杂志, 待发表。
- [8] Norval M et al., 1987, *Arch Virol*, 97: 151.
- [9] 朱纯吾等, 待发表。

## Comparison of Detected Results of Blood and Urine Specimens of Infant Patients with Hepatitis Using <sup>32</sup>P and Biotin-Labeled HCMV DNA Probes

Hong Shi-wen Yu Ming-yan Liu Hong Liu Jue-hui

(The PLA 302nd Hospital, Beijing 100039)

Human cytomegalovirus (HCMV) DNA in clinical blood and urine specimens of 27 infant patients infected with hepatitis were detected by DNA-DNA dot blot hybridization using <sup>32</sup>P and biotin labeled cloned HCMV AD169 DNA fragment. The hybridization results of blood and urine specimens were compared. 16 of 27 blood specimens were positive (59%). Of 27 urine specimens, 9 were positive (33%). The preliminary results indicate that the positive rate of HCMV DNA in blood specimens is 26% higher than that in urine specimens by DNA-DNA hybridization. The <sup>32</sup>P labeled HCMV DNA probe can detect 10 pg of homologous DNA, and biotinylated HCMV DNA probe can detect 50 pg of homologous DNA. Both of them fail to hybridize to DNA extracted from other herpesviruses or uninfected human embryonic lung (HEL) cells. The results of HCMV DNA-DNA hybridization of 26 blood specimens were compared with that of ELISA of anti-HCMV IgM. The agreement of detected results for the two methods was 65%.

**Key words:** Human cytomegalovirus <sup>32</sup>P-labeled probe Biotin-labeled probe DNA-DNA hybridization Anti-HCMV IgM