

25-29

第8卷第1期
1993年3月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol.8 No.1
Mar, 1993

人巨细胞病毒的生物素DNA探针的制备和应用

程丽 陈曼 陈文凯 郭淑芳

(湖北医学院病毒研究所, 武汉430071)

提 要

本研究用克隆的HCMV AD169株DNA片段, 制备了生物素标记的DNA探针, 建立了检测临床脐带血、尿标本中HCMV DNA的核酸探针杂交方法。该探针可测出100pg同源DNA, 不与人胚肺细胞、Hep-2细胞DNA以及其他疱疹病毒的DNA发生反应。用核酸杂交方法检测了30份脐带血标本, 有11例阳性, 阳性率为33%。10例孕妇尿标本中, 3例阳性, 阳性率为30%。检测结果表明: 我们建立的生物素标记的HCMV DNA探针的点杂交法, 具有高度的特异性、敏感性, 比分离病毒法更迅速, 可用于HCMV感染的临床标本的病毒核酸检测。

关键词: 人巨细胞病毒 生物素探针 脐带血 尿

DNA探针

人巨细胞病毒(Human Cytomegalovirus, HCMV)感染的普遍性及对人类造成的严重危害在世界范围内受到高度重视。大量的血清流行病学资料证实90%的人都存在有HCMV抗体^[1]。HCMV也是引起人类先天性畸形的重要原因之一。孕妇的原发或新的复发感染均可引起新生儿宫内感染或围产期感染^[2], 此种感染严重者可导致新生儿的一系列疾病, 直接影响优生优育和人口素质的提高。因此建立一种特异性强、敏感性高的快速诊断技术用于临床诊断, 对HCMV病的预防将会有非常重要的作用。近年来, 国内外相继建立了³²P标记的探针诊断HCMV感染的新技术, 但同位素本身存在着半衰期短和对人体有损害等不足。本文介绍用生物素-7-dATP标记的克隆化HCMV DNA酶切片段做探针, 采用核酸斑点杂交法检测临床标本取得满意的结果, 现报道如下。

材 料 和 方 法

1. HCMV探针的制备 HCMV AD169株DNA片段的重组质粒pACYC184由美国加利福尼亚大学D. H. Spector教授赠送。HCMV DNA EcoR 1 D片段克隆到质粒pACYC184的EcoR 1酶切部位见参考文献^[3,4]。重组质粒用冷氯化钙法转化到大肠杆菌, 在含有选择性抗菌素的LB培养液中生长, 然后用酚-氯仿方法分离提纯重组质粒。用限制性内切酶EcoR 1降解重组质粒, 将酶解片段进行电泳分离, 用透析膜电泳洗脱法, 从琼脂糖凝胶中回收DNA片段。

生物素标记HCMV DNA核酸探针的制备: 使用BRL(Bethesda Research Laboratories Ma-

本文于1991年12月21日收到, 1992年6月2日修回。

ryland Nick Translation Kit, Kito kit) 缺口翻译法将 Biotin-7-dATP 标记到纯化的 HCMV DNA 片段上, 过程简述如下: 反应混合物包括适量的 dGTP、dTTP、dCTP、Biotin-7-dATP、DNase I、DNA 聚合酶 I, 14℃ 水浴保温过夜, 加 2 μ l 0.5mol/L EDTA (pH 8.0) 终止反应, 用 2 倍体积 95% 乙醇混合过夜, 4℃ 10000r/m 离心 20 分钟, 弃上清, 用适量的 70% 和 95% 乙醇浸洗沉淀物, 室温晾干, 加适量 TE 缓冲液, 存 -20℃ 备用。

2. 病毒培养 HCMV AD169 株用于试验, 当人胚肺纤维母细胞 (HEL) 长成单层后接种 HCMV 100TCID₅₀/0.1ml, 病毒接种后的第 6 小时、12 小时、2 日、4 日、6 日分别将收获细胞做不同处理, 以未接种病毒的 HEL 作为阴性对照, 用于病毒抗原、病毒核酸检测。

单纯疱疹病毒 (HSV) 的培养: HSV 接种于已长成单层的 Hep-2 细胞, 待 CPE 达到 75% 以上同 HCMV 感染一样处理, 按常规方法提取病毒 DNA 及正常细胞 DNA^[2]。

3. 临床标本的处理 标本由湖北医学院附属第二医院妇产科提供。

(1) 尿样处理 取清晨孕妇 30ml 新鲜尿液于 3000r/m 离心 15 分钟, 弃上清。

(2) 血样处理 将加有肝素的脐带血 10ml, 2000r/m 离心 15 分钟, 吸取白细胞层, 用 3 倍体积 0.83% 氯化铵溶解红细胞, 置 4℃ 冰箱 15 分钟, 4500r/m 离心 10 分钟, 反复 2—3 次, 弃上清。

处理过的血和尿标本沉淀物溶于 DNA 缓冲液 (pH 8.0 TE), 分别用 SDS、RNase 和 Pronase 处理, 然后用等量混合的酚、氯仿、异戊醇提 2 次, 乙醇沉淀, 溶于 TE 缓冲液中 (50mmol/L Tris, 0.1mmol/L EDTA)。

4. 杂交试验:

(1) 点样: 点杂交试验用于检测病毒感染的细胞和临床标本。将标本 DNA 打点到硝酸纤维膜 (西德 Schleicher & Schuell 公司产品) 上, 置 80℃ 干燥 2 小时。

(2) 预杂交: 将膜放入大小适合的聚乙烯塑料袋里, 加入预杂交液 (4×SET, 10×Denhardt's, 10-50 μ g/ml 变性小牛胸腺 DNA), 使膜全部浸入, 热封袋口, 置 42℃ 水浴保温 1—3 小时, 中途不时摇动, 以防膜相互贴附。

(3) 杂交: 剪开袋口, 倒出预杂交液, 加入预热 (42℃) 杂交液 (45% 甲酰胺, 4×SET, 2×Denhardt's, 10 μ g/ml 变性小牛胸腺 DNA, 20-40 μ g/ml 变性探针), 热封袋口, 置 42℃ 水浴保温过夜, 中间不时摇动。

(4) 漂洗: 杂交结束后剪开袋口, 倒出杂交液。加入足量 2SSC-0.5% SDS 溶液, 室温漂洗三次, 每次 5—10 分钟。

改换足量 0.2SS-0.5% SDS, 室温漂洗三次, 每次 5—10 分钟。

更换 0.2SSC-0.5% SDS 溶液, 50~55℃ 水浴漂洗 15 分钟 (必要时可重复一次)。

5. 酶联显色

将膜浸入封闭液 (2% BSA, 0.1mol/L Tris·Cl pH 7.5, 1mol/L NaCl, 2mmol/L MgCl₂, 5% Tween 20, 0.05% Triton-X-100) 中, 室温作用 1 小时。用链霉亲和素-碱性磷酸酶 (SA-AP) 处理, 将膜浸入酶联介质 (0.1mol/L Tris·Cl pH 7.5, 0.15mol/L NaCl, 1 μ g/ml SA-AP) 中, 室温反应 10 分钟; 又将膜浸入足量的不含有 SA-AP 的溶液中, 室温漂洗二次, 每次 10 分钟; 改换 (0.1mol/L Tris·Cl, pH 9.5, 0.1mol/L NaCl, 50mmol/L MgCl₂ 溶液, 室温漂洗 10 分钟; 将膜置于显色介质 (0.1mol/L Tris·Cl pH 9.5, 0.1mol/L NaCl, 50mmol/L MgCl₂, 0.33mg/ml NBT 和 0.17mg/ml BCIP) 中, 置暗处显色 15—60 分钟。最后将膜浸入 10mmol/L Tris·Cl pH 7.5, 1mmol/L EDTA 溶液中终止反应。

观察结果, 出现紫兰色沉淀圈为阳性, 阴性无色。

结 果

1. 生物素标记HCMV DNA探针特异性的检测:

该法标记的生物素探针与 HCMV AD169 株感染的 HEL 细胞 DNA 及 HCMV D 片段-pACYC184 重组体杂交, 不与未感染的 HEL 细胞、HSV-1、HSV-2、Hep-2 细胞的 DNA 及小牛胸腺 DNA 杂交 (图 1)。

2. 生物素标记 HCMV DNA 探针敏感性观察:

我们将 HCMV 感染 HEL 细胞后, 第 6 小时、12 小时、2 日、4 日、6 日分别提纯 HCMV DNA, 用生物素标记的 DNA 探针均检测到 HCMV DNA, 而未感染 HCMV 的 HEL 细胞则未检测到 HCMV DNA (图 2)。同时进行了定量检测, 该探针可检测到 100pg 的同源 DNA (图 3)。

3. 临床标本检测:

该 DNA 探针检测 30 份脐带血标本有 11 例阳性, 阳性率为 33% (图 4), 10 例尿标本有 3 例阳性, 阳性率为 30% (图 5)。

讨 论

本实验进行了生物素标记 HCMV DNA 探针的制备以及应用于 HCMV 感染的研究。结果表明, 该探针不仅可在细胞水平上研究 HCMV 的感染, 而且可检测 HCMV 感染后的临床标本及临床诊断。这就改变了过去 HCMV 感染诊断常用病毒分离和检测血清中的 IgM 抗体等方法, 为 HCMV 的早期诊断提供了一个敏感性高, 特异性强的新手段。

实验室所用的 HCMV DNA 片段是 AD169 株用 EcoRI 酶切的 D 片段, 该片段与人细胞 DNA 无同源性, 用 D 片段制备的 HCMV 生物素 DNA 探针不与 HEL 细胞发生反应, 也不与其他疱疹病毒如 HSV-1 和 HSV-2 发生反应, 该探针的敏感性高特异性强, 可检测到 100pg 的同源 DNA。

我们用该探针检测 HCMV 感染的 HEL, 发现在病毒感染 6 小时后就能测到病毒 DNA。该法敏感性高, 有利于在临床标本上作早期诊断。我们在临床标本中, 检测 30 份脐带血和 10 份孕妇尿标本, 阳性率分别为 33% 和 30%, 与国内报道同位素探针检测脐血、孕妇尿的阳性率为 25%~38%^[5,7] 相符合。在妊娠早、中、晚期 HCMV 检出率各有所不同, 晚期较高一些。孕妇 HCMV 感染会严重影响胎儿的生长发育。脐带血的 HCMV 检出证明了 HCMV 母婴传播的重要性。因此在妊娠早期, 用核酸探针方法对孕妇进行 HCMV 感染的常规检查, 同时配合血清学的检测, 进行 HCMV 感染的临床诊断, 避免婴儿宫内 HCMV 感染是非常必要的。

生物素核酸探针是继同位素核酸探针以后发展起来的新方法, 同位素尽管有很高的敏感性, 但本身存在着放射性和半衰期短等问题, 对实验人员和周围环境都有危害, 在推广方面受到一些条件的限制。而生物素则不然, 其稳定性强, 保存期长, 对人体和环境无危害, 整个实验周期短, 24 小时内可观察结果, 可在基层医院实验室普及应用, 具有较高的实用价值, 是值得推广的技术。

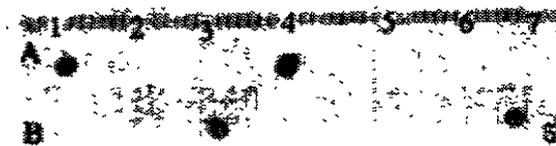


图5. 生物素标记的HCMV DNA探针检测10份孕妇尿标本结果

Fig 5. Result of hybridization of biotin-labelled HCMV probe to 10 urine specimens

B4, HEL DNA.

B5, HSV-1 DNA.

B7, DNA extracted from HEL cells infected with HCMV strain AD169.

A2, A3, A5, A6, A7, B1, B2, HCMV negative specimens.

A1, A4, B3, HCMV positive specimens.

参 考 文 献

- [1] Hanshaw, JB, et al., 1976, *N.Engl. Med.* 295: 468-470.
- [2] 黄荫祥主编, 1990, 医学病毒学基础及实验技术, 科学出版社, p830.
- [3] Spector SA, et al., 1984, *J.of Infection Diseases*, 150: 121-128.
- [4] Spector DH., Hock L, Tamashiro JC., 1982, *J Virol*, 42: 558-582.
- [5] 王淑凤等, 1988, 病毒学报, 4(1): 74-78.
- [6] 洪世雯等, 1990, 中华微生物和免疫学杂志, 10(4): 225-228.
- [7] 黄树林等, 1989, 第二次全省医学病毒学术会议资料汇编, P102.

Preparation and Application of Biotin-labelled Human Cytomegalovirus Nucleic Acid Probe

Cheng Li Chen Man Chen Wenkai Guo Sufang

(Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan 430071)

A diagnostic assay has been developed to detect human cytomegalovirus (HCMV) DNA in clinical specimens with biotin-labelled DNA probe, cloned fragment of HCMV strain AD169. The biotin-labelled probe can detect 100 pg of homologous DNA and does not hybridize with DNA from other herpesvirus or human embryonic lung cells (HEL) and Hep-2 cells. 30 umbilical cord blood and 10 urine specimens from pregnant women were examined by hybridization assay with biotin-labelled probe. Among 30 umbilical cord blood specimens, 11(30%) and, among 10 urine specimens, 3(33%) were positive for HCMV DNA respectively. The results suggest that the DNA-DNA hybridization assay with biotin-labelled DNA probe is high specific and sensitive, and more rapid than routine tissue culture techniques. Biotin-labelled HCMV probe can be used in clinical diagnosis of human cytomegalovirus infection.

Key words: Human Cytomegalovirus Biotin-labelled Umbilical cord blood Urine