310—315
3960(2)
维普资讯 http://www.cqvip.com

第8卷 第4期 中国病毒学 Vol. 8 No. 4
1993年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1993

HBV-DNA的生物素寡聚核苷酸探针快速检测

吴云涛 蔡宜权
(中国科学院武汉病毒研究所,武汉 430071)

R373.21

A

提 要 本文建立一种快速HBV-DNA检测方法。此法是基于生物素标记的寡聚核苷酸与硝酸纤维素滤膜上的靶DNA杂交,然后通过Streptoavidin-碱性磷酸酶偶联体及生色底物进行检测。本文研究了此法的实用性,表明对于实验室及临床的HBV-DNA检测,此法是一种快速(4小时)、灵敏(1—10pg)、特异、方便的方法。

关键词 HBV-DNA,DNA杂交,生物素寡聚核苷酸探针 生物素;探针;乙型肝炎病毒;DNA;

HBV-DNA的检测在实验室及临床检测中具有重要意义,但由于传统的^{32}P标记探针的局限性[1-2],主要是放射性、半衰期、操作复杂及费时等原因限制了它的大面积推广运用。因此人们试图建立各种新方法以克服上述缺点[3—7],但目前仍未能解决操作复杂、费时等问题。因此我们研究了一种快速、操作简便的生物素HBV-DNA检测方法,在4小时内便可检测出HBV-DNA分子,且操作简便、灵敏度接近同位素法,可望用于实验室及临床诊断中HBV-DNA的快速检测。

材料和方法

1 探针的制备

选取HBV-DNA序列中保守性较高区域序列:5′ TCGCCGCGTCGCAGAAGATC3′(中科院上海细胞研究所代为合成)。该寡聚核苷酸序列在合成中5′具有氨基。通过化学方法对其5′端进行生物素标记[8],在0.1mol/L磷酸钠(pH7.5)溶液中通过N-羟基琥珀酰生物素(N-hydroxysuccinyl biotin)与其氨基反应从而将生物素标记在5′端。标记好的探针通过PAGE纯化,溶于TE(10mmol/L Tris.Cl pH8.0, 1mmol/L EDTA)中,置-20℃保存。

同位素标记HBV-DNA探针制备如下[9]:0.5mgHBV-DNA, 20μmol/L dNTPs、100μci[α-^{32}p]dCTP(福瑞生物工程公司产品),5U DNA Polymerase I, 0.05μg/ml DNase I,15℃保温2小时、标记好的探针经SephadexG-50分离、收集。测比活大于10^8cpm/μg DNA。

2 杂交条件的选择

生物素寡聚核苷酸探针的杂交条件如下:按Bolton法[10]计算出此寡聚核苷酸探针的Tm值,然后通过实验确定其Ti值。杂交条件选择在Ti值以下5—10℃进行。预杂交液为6×SSC、5×Denhart's液,预杂交时间30分钟。杂交液同上,加入生物素标记寡聚核苷酸探针,浓度为1pmol/L,杂交时间1小时。杂交后洗膜条件为2×SSC,0.1%SDS溶液中洗涤三次。每次2—3分钟,室温,然后转入0.2×SSC, 0.1%SDS中洗涤5分钟,温度为45℃。

^{32}P标记的HBV-DNA探针的杂交条件如下:预杂交液为6×SSC,5×Denhart's液,68℃预杂交1小时、杂交液同上,加入^{32}P标记探针,68℃杂交过夜。杂交后洗膜条件为:2×SSC、0.1%SDS溶液中洗涤三次,每次5分

* 本文于1992年12月12日收到,1993年3月17日修回。

维普资讯 http://www.cqvip.com

钟，室温。0.2×SSC，0.1%SDS中68℃洗涤1小时。然后转入0.2×SSC，0.1%SDS溶液中室温洗涤5分钟。

3　检测方法

生物素寡聚核苷酸探针杂交后的硝酸纤维素滤膜、经洗涤后在TBS-Tween20中洗涤1分钟，然后于37℃下封闭液中浸泡30分钟。加入Streptoavidin-碱性磷酸酶偶联体置室温10分钟。再将此膜于TBS-Tween20中洗涤三次，每次3分钟。加入BCIP、NBT(BRL公司产品)于黑暗中显色。BCIP、NBT的配制如文献[11]。同位素探针杂交后经过洗涤的硝酸纤维素滤膜，通过X光片感光，加增感屏于-70℃曝光一周。

4　检测血清样品的处理

取待检血清50μl，加等体积新鲜配制的变性液(10×SSC、2N NaOH及15%甲醛)混合，70℃保持10分钟，然后通过抽滤器加到硝酸纤素滤膜上，干燥后用1mol/L Tris. Cl(pH7.5)，0.5mol/L NaCl中和三次。置80℃烘烤2小时。杂交前置6×SSC中浸泡1分钟。

结　果

1　生物素寡聚核苷酸探针Ti值的估测[12]

如图1，取10ng HBV-DNA分子点于硝酸纤维素滤膜上，于25℃下同寡聚核苷酸探针杂交2小时，然后分别置于图中所示温度下洗涤5分钟。显色后可见如下结果：(1)此探针与HBV-DNA杂交后，杂交点显色的强度随洗涤温度上升而减弱。(2)在25℃下洗涤时，杂交点显色最强；在70℃洗涤时，杂交点完全消失。(3)25℃－40℃下洗涤时，随温度上升杂交点颜色减弱较慢；50℃－55℃时减弱较快；60℃－70℃时杂交点逐渐消失。(4)最强显色强度50%的杂交点存在于50℃－55℃洗涤温度之间。因以上杂交点显色的强弱代表杂合分子的解离程度，25℃洗涤时解离最少，70℃洗涤时完全解离，50℃－55℃时有50%解离，因此寡聚核苷酸探针的Ti值在50℃－55℃之间。

维普资讯 http://www.cqvip.com

图1 生物素寡聚核苷酸探针Ti值的测定。10ng HBV-DNA变性后点于硝酸纤维素滤膜上，20℃杂交2小时。杂交后将此滤膜于上述温度下洗涤5分钟，通过avidin-碱性磷酸酶偶联体显色步骤显色。

Fig. 1 Determination of Ti of biotinylated oligonucleotide probe. 10ng HBV-DNA was denatured and spotted onto nitrocellulose filters and hybridized at 25℃ for 2hr. After hybridization, the filters were washed for 5 min at the indicated temperature and visualized with the standard avidin-alkaline phosphatase detection procedure.

2 杂交时间对杂交结果的影响

如图2，将HBV-DNA样品与生物素寡聚核苷酸探针进行杂交。杂交时间分别为15分钟至12小时不等。其结果如下：当杂交时间为15分钟时，即能出现大部分阳性杂交点；但30分钟杂交时较15分钟时强；30分钟至3小时杂交时间、各种杂交时间下杂交点强弱无明显变化，且检测下限相同。7小时至12小时，杂交点有微弱增强，但并未增加检测灵敏度。故30分钟为快速杂交的最佳杂交时间，多于30分钟对于HBV-DNA的检测灵敏度无明显效果。

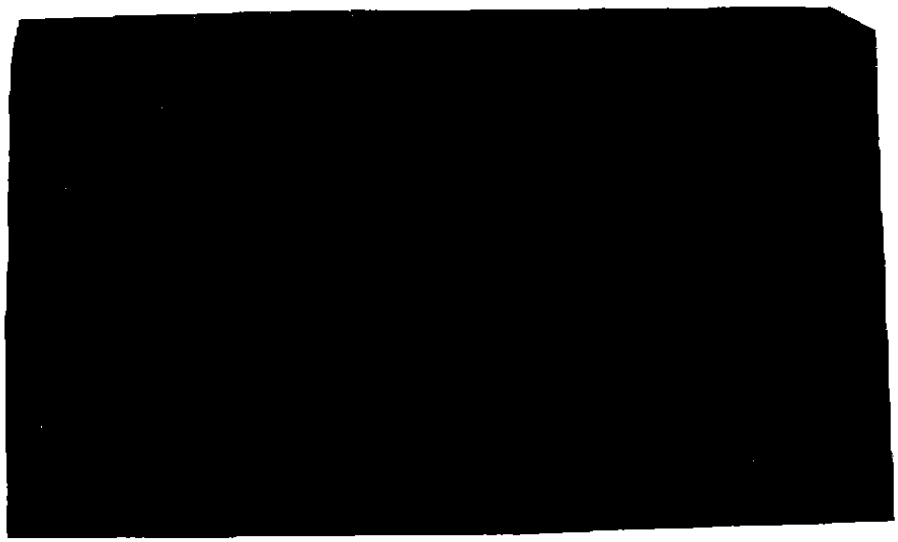

图2 杂交时间分析。HBV-DNA通过梯度稀释后点于硝酸纤维素滤膜上，按上述杂交时间于42℃下杂交。

Fig. 2 Hybridization time analysis. HBV-DNA was serially diluted and spotted onto nitrocellulose filters and hybridized at 42℃ for the indicated time.

3 杂交中探针浓度的研究

如图3，将HBV-DNA点于硝酸纤维素膜上，然后分别置于0.01pmol/L至10pmol/L各种探针浓度下杂交，其结果表明：1pmol/L浓度下杂交效果最佳，低于1pmol/L杂交点有减弱趋势，0.01pmol/L浓度下已无杂交点出现。但大于1pmol/L浓度时，增加探针深度，无明显效果。

4 灵敏度的测定

如图4，将HBV-DNA点于硝酸纤维素膜上，其量分别从100pg至0.5pg之间，按最佳杂交条件进行杂交。结果表明：此探针在4小时内检测HBV-DNA的最低量在1—10pg之间。

维普资讯 http://www.cqvip.com

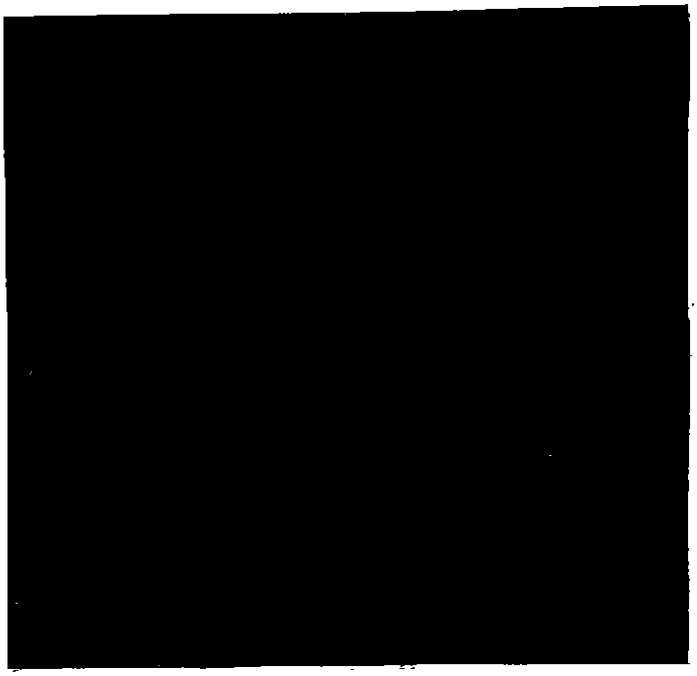

图3 探针浓度对杂交的影响。HBV-DNA按梯度稀释后点于硝酸纤维素滤膜上,42℃杂交2小时,杂交液中的探针浓度如上。

Fig. 3 Dependence of the hybridization on probe concentration. HBV-DNA was serially diluted and spotted on nitrocellulose filters and hybridized at 42℃ for 2hr in the solution containing the indicated probe concentration.

图4 杂交灵敏度分析。HBV-DNA按梯度稀释,点于硝酸纤维素滤膜上,42℃杂交30分钟,探针浓度为1pmol/L。

Fig. 4 Sensitivity of the hybridization assay. HBV-DNA was serially diluted and spotted on nitrocellulose filters and hybridized at 42℃ for 30min in the solution containing1pmol/L biotinylated oligonucleotide probe.

5 临床检测运用中与同位素探针的相关性

将待检血清点于两张硝酸纤维素膜上,分别与同位素探针及生物素寡聚核苷酸探针杂交,其结果如图5。96份血清中,同位素探针检出16份阳性,其中1份弱阳性血清用生物素寡聚核苷酸探针未检出;生物素寡聚核苷酸探针检出阳性血清17份,其中有2份阳性结果在用同位素探针检测时为阴性。

维普资讯 http://www.cqvip.com

图5 人血清样品分析。人血清样品点于硝酸纤维素滤膜上，分别于生物素寡聚核苷酸探针(A)及^{32}P-标记HBV-DNA探针杂交。

Fig. 5 Human serum samples analysis. Human serum samples were applied to nitrocellulose filters and hybridized with biotinylated oligonucleotide probe(A)and ^{32}p-labeled HBV-DNA probe separately.

讨 论

生物素寡聚核苷酸探针用于HBV-DNA的临床检测，大大缩短检测时间，同时具备操作简便、探针易于长期存放、无放射性等优点。但在灵敏度及特异性方面仍不及同位素法。

Ruth[13]曾系统研究过标记数量及位点对生物素寡聚核苷酸探针灵敏度的影响，相信通过在适当位置引入更多的生物素基团能将其灵敏度提高至同位素探针水平，同时如与PCR方法结合，则能大大缩短PCR扩增后的杂交检测时间，达到高灵敏度及较快的检测速度。目前我们正在从事这方面的探讨。

在特异性方面，生物素探针在检测血清样品时不如同位素方法，可能是部分血清中含有能与生物素或Streptoavidin结合的杂质所致，详细机理有待探讨。此外杂交后洗膜温度的控制对于消除非特异性杂交十分重要，如图1中，在25℃－40℃洗涤5分钟，并未能去除非特异性吸附，硝酸纤维素滤膜上背景较深，且λDNA斑点也明显存在，只有在45℃以上洗涤时才能消除这种非特异性吸附。

综上所述，尽管生物素寡聚核苷酸探针在灵敏度及特异性方面尚不能超过同位素探针，但用安全、快速的检测方法取代同位素法是大势所趋，而其中用寡聚核苷酸探针是达到快速检测的重要途径之一。我国是乙肝高发区，生物素寡聚核苷酸探针的使用将特别有助于乙肝的临床诊断、流行病学调查和科研工作。

参 考 文 献

1 吴云涛，方勤. 核酸分子探针制备技术新进展. 国外医学分子生物学分册，1989；11(3)：101－103

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 Langer P. R. ,Waldrop A. A,Ward D. C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polyunucleotides:Novel nucleic acid affinity probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,1981;6633—6637

3 Richardson R. W. ,Gumport R. I. ,Biotin and fluorescent labeling of RNA using T4RNA ligase. Nucl. Acids Res,1983;11;6167—6183

4 Forster A. C. ,Mcinnes J. L. ,Skingle D. C. ,*et al*. Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labeling of DNA and RNA with a novel reagent,photobiotin. Nucl. Acids Res,1985;13;745—761

5 Renz M. Polynucleotide-histone H1 complexes as probes for blot hybridization. EMBO J,1983;2;817—822

6 Jablonski E. ,Moomaw E. W. ,Tullis R. H. ,*et al*. Preparation of oligodeoxynucleotide-alkaline phosphat as conjugates and their us as hybridization probes. Nucl. Acids. Res,1986;14;6115—6128

7 Tchen P. ,Fuchs R. P. P. ,Sage E. ,*et al*,Chemically modified nucleic acids as immunodetectable probes in hybridization experiments. Proc. Natl. Acad. Sic. *USA*,1984;81;3466—3470

8 Urdea M. S. ,Running J. A. Horn T. ,*et al*. A novel method for the rapid detectionn of specific nucleotide sequence in crude biological samples without blotting or radioactivity application to the analysis of hepatis B virus in human serum. Gen,1987;61;253—264

9 Maniatis T. ,Fritsch E. F. ,Sabrook J. ,*et al*. Molecular cloning,USA:CSH press,1982;109—111

10 Bolton E. T. ,McCarthy B. J. ,A general method for the isolation of RNA complementary to DNA. Proc,Natl,Acad,Sci,USA,1962;48;1390—1397

11 Leary J. T. , Darid J. ,Brigti. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labled DNA probes hybirdized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose, Bio-blots. Proc,Natl. Acad. Sci,USA,1983; 80;4045—4049

12 Maniatis T. ,Fritsch E. F. Sambrook J. ,*et al*,Molecular cloning,USA: CSH Press,1989,1155—1157.

13 Ruth J. L. . Chemical synthesis of non-radioactively-labeled DNA hybridization probes. DNA,1984;3;123

Rapid Detection of HBV-DNA by Using Biotinylated Oligonucleotide Probe

Wu Yuntao Cai Yiquan

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan* 430071)

A rapid method for detection of HBV-DNA was developed. This assay was based on the hybridization of biotinylated oligonucleotide probe to target DNA immobolized on nitrocellulose membrane which was then incubated with avidin-alkaline phosphatase conjugator and measured with chromogenic substrates. The practicality of the method was investigated. It was found that the method was fast (4hr),sensitive(1—10pg)and expedient for laboratory and clinical detection of HBV-DNA.

Key words HBV-DNA, DNA Hybridization, Biotinylated oligonucleotide