

HBV-DNA 的 PCR 二步法扩增及其快速检测

方勤 吴云涛 蔡宜权

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

关键词 HBV-DNA, 二步温控 PCR, Southern 杂交, 生物素寡聚核苷酸杂交

R446.5

乙型肝炎是危害人类健康的主要疾病之一, 其病原常用的检测方法多采用血清学技术, 由于核酸杂交法在检测具有增殖活力 HBV 上的直接性和可靠性日益显示其重要性, 但经典杂交法(Dot blot 和 Southern blot)的固有缺陷除耗时繁琐外, 更为突出的是灵敏度较差, 只能检测出 Pg 水平左右的核酸, 故远不能满足实际上的需要。已能克服灵敏度不足之 PCR 技术^[1]多以三步法进行, 本文采用 PCR 二步法^[2]进行 HBV-DNA 扩增, 并就其特异性、灵敏度进行了实验, 获得满意结果, 加之与生物素标记寡聚核苷酸杂交法^[3]相结合, 从而提供了一个特异、灵敏、快速、简便的 HBV-DNA 检测系统, 现将实验结果报告如下:

材料与方 法

- 1 HBV-DNA 的制备 克隆于大肠杆菌 HB101 中的 HBV-DNA 重组质粒, 通过小量碱法^[4]进行抽提, 样品纯化后, 经 E. coRI(华美生物工程公司产品)酶切, 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收 HBV-DNA 片段。
- 2 HBV-DNA 探针的制备 采用缺口平移法^[5]对纯化 HBV-DNA 分子进行标记, 反应中所用 α -³²P dCTP 为北京亚辉生物工程公司产品, 生物素标记寡聚核苷酸探针由上海细胞生物学研究所代为合成。
- 3 血清中 HBV-DNA 的制备 血清中 HBV-DNA 的提取参照 Shuichi Kaneko^[6]等方法并略加改进。
- 4 PCR 反应系统 PCR 反应所用二引物由上海细胞生物学研究所代为合成, 其二步法参照文献^[2]方法进行, Taq DNA 聚合酶购于上海复华生物技术公司。
- 5 PCR 产物分析 PCR 扩增产物在 1% Agarose 凝胶电泳分析基础上, 然后采用分子杂交技术^[3, 4]作进一步鉴定。

结果与讨论

1 三步及二步温控 PCR 扩增特异性研究

以 100pg HBV-DNA 及 100pg λ -DNA 为模板, 同时进行三步及二步温控 PCR 扩增, Agarose 凝胶电泳结果见图 1a。该结果表明, 两种反应条件下, HBV-DNA 都能大量扩增, 而对应的 λ -DNA 却不能进行扩增, 并且该 HBV-DNA 二种扩增产物在 1% Agarose 凝胶电泳中的迁移率完全相同。通过分子量标准测得该 PCR 产物分子量与理论推导数值一致, 经³²P 标记的 HBV-DNA 探针与扩增产物进一步杂交结果(见图 1b)表明该扩增产物为 HBV-DNA 特异序列。

* 本文 1993 年 5 月 11 日收到, 11 月 4 日修回

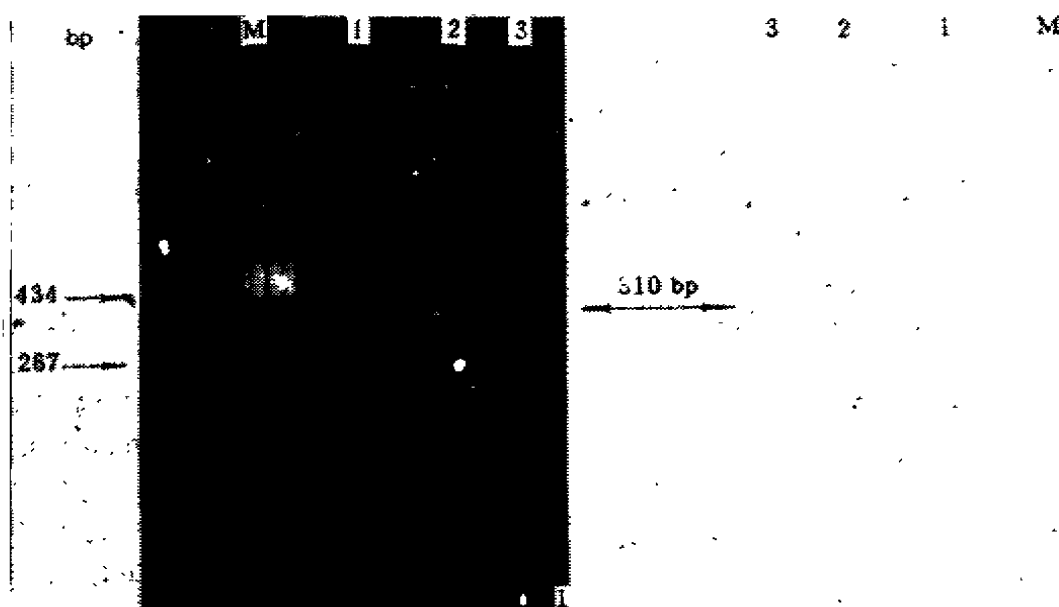


图1 1% Agarose 凝胶电泳分析 HBV-DNA 三步及二步 PCR 扩增产物(a)及 Southern blot 杂交(b)结果
注, M. pBR³²²Hca III 片段作分子量标准。1. 三步 PCR 扩增产物 2. 二步 PCR 扩增产物 3. 阴性对照(λ -DNA 为模板)

Fig1. The results of Both three and two-temperature PCR amplification for HBV-DNA by agarose-EB Analysis (a) and Southern Blot Hybridization(b).

Notes, M. pBR³²²Hca III fragments as molecular weight marker.

1. Amplification products of three-step PCR. 2. Amplification of two-step PCR.
3. Negative control (λ -DNA as template)

2 琼脂糖凝胶电泳及生物素寡聚核苷酸杂交对 HBV-DNA 的二步 PCR 扩增灵敏度、特异性测定

将不同稀释度(5ag—500pg)的模板 DNA 通过二步温度控制法进行 PCR 扩增,然后通过 1% Agarose 凝胶电泳检测扩增产物,结果如图 2a 所示,该结果表明,二步温度控制法 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,灵敏度可达 50ag。

取 25 μ l 二步 PCR 扩增产物(模板浓度分别为 5fg、500ag、50ag、5ag)经碱变性后直接点于硝酸纤维素滤膜上,然后与生物素标记寡聚核苷酸探针杂交,经显色后可见上述扩增产物都能与该探针杂交,而对照 λ -DNA 无杂交点出现(见图 3b),该结果说明使用上述生物素寡聚核苷酸探针完全能快速、准确地鉴定出 HBV-DNA 特异性扩增产物,而二步 PCR 法与生物素寡聚核苷酸杂交相结合可检测大约 1—2 个 HBV-DNA 分子。

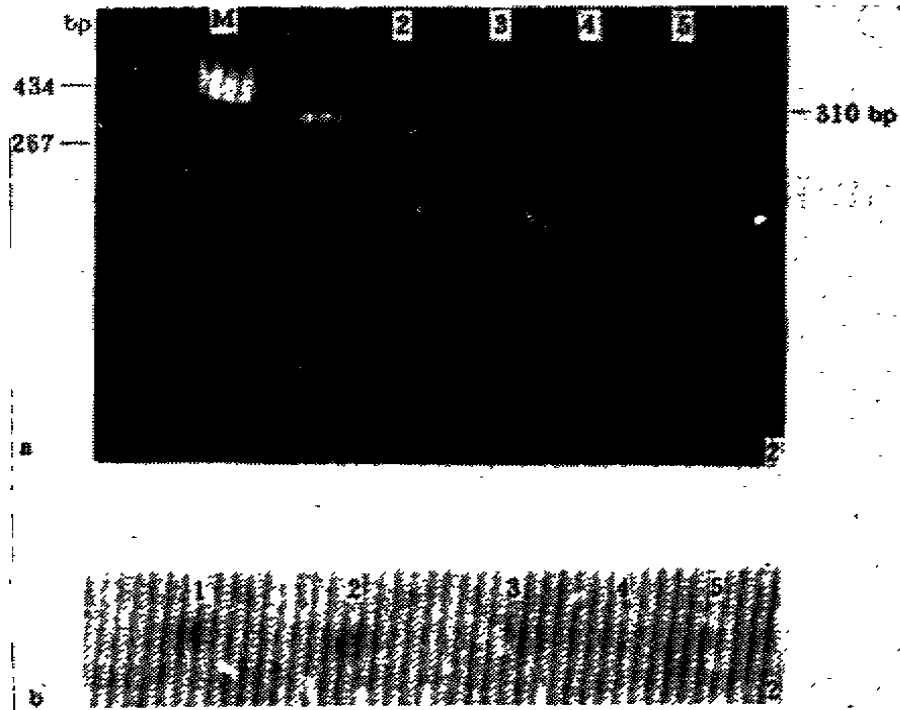


图2 .HBV-DNA 的二步 PCR 扩增灵敏度、特异性琼脂糖凝胶电泳及生物素寡聚核苷酸杂交分析

注: M. pBR322/Hea III 为分子量标准, a. 1-5 分别以 500pg、5fg、500ag、5ag HBV-DNA 为模板, b. 1-4 分别以 5fg、500ag、50ag、5agHBV-DNA 为模板经 PCR 扩增与生物素寡聚核苷酸杂交结果, 5 为阴性对照(λ -DNA)。

Fig.2 sensitivity, specificity assay of HBV-DNA detection by PCR EB- stained agarose gel and biotinylated oligonucleotide hybridization method.

Notes M, pBR322/Hea III as marker.

a. 1-5 are respectively 500pg, 5fg, 500ag, 5ag HBV-DNA as template.

b. 1-4 are respectively 5fg, 500ag, 50ag, 5ag HBV-DNA as tempete with biotinylated oligonucleotid hybridization positive results, 5 is negative contral (λ -DNA).



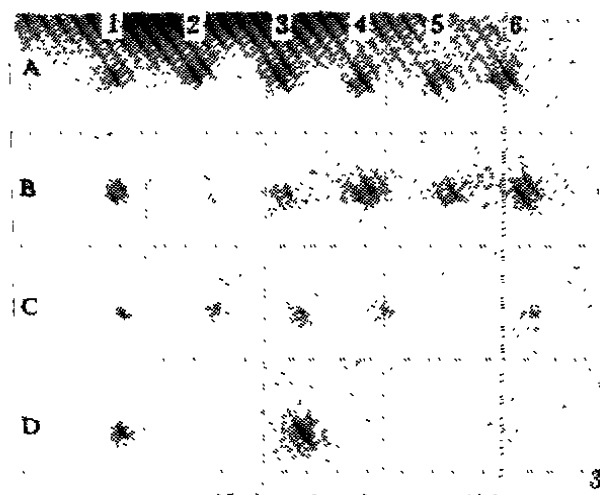


图3 血清中HBV-DNA的PCR扩增琼脂糖凝胶电泳及生物素寡聚核苷酸杂交结果

注:P₁D₁D₂为克隆株HBV-DNA阳性对照 N₁D₂为λ-DNA阴性对照

Fig 3 The analysis for PCR amplification of HBV-DNA in serum by 1% agarose gel and biotinylated oligonucleotide hybridization

Notes P₁D₁D₂ is positive control

N₁D₂ is negative control

A₁-₆, B₁-₆, C₁-₆ is serum sample number

3 PCR 二步法扩增及生物素寡聚核苷酸探针杂交用于血清样品的诊断

本实验通过对 18 份血清样品(由市传染病院提供)进行 PCR 二步法扩增经琼脂糖凝胶电泳及生物素寡聚核苷酸探针杂交, 所得结果见图 3。结果显示, 经 PCR 二步法扩增的 18 份血清样品, 其中 16 份出现特性扩增带, 且在 1% Agarose 凝胶电泳中的迁移率与标准克隆 HBV-DNA 分子扩增产物带完全吻合, 对照 λ-DNA 未见扩增带出现。将上述扩增产物与生物素标记寡聚核苷酸探针进行点杂交, 结果表示, 上述 16 份阳性样品全部能与该探针杂交。另外的样品 C₆ 在 Agarose 电泳时未出现扩增带, 而杂交时出现杂交点。

迄今病毒性疾病的诊断主要依赖免疫学、细胞学、分子杂交方法等。PCR 的问世, 不仅为病毒检测提供了准确方便的手段, 而且使临床诊断更趋完善和简化, 其灵敏度是一般核酸分子杂交所不及的。在 HBV-DNA 实际检测应用中, 核酸杂交法检测水平为 P₈ 级水平, 相当于 10⁴—10⁶ 病毒颗粒, 少于 10⁴ 病毒颗粒的样品往往被漏检。Printe A M 等曾对黑猩猩做过试验, 发现每毫升样品中含 10² HBV 病毒颗粒即能导致黑猩猩感染, 而我们常用的临床检测方法其灵敏度远不能达到检测最低病毒感染极限的要求, 已有报道证实采用 PCR 方法在正常献血员中检测出 HBV-DNA 携带者^[6], 为预防控制乙型肝炎的发生, 迫切需要建立一种灵敏快速的检测手段, 本实验建立的检测系统将为 HBV-DNA 的临床快速准确诊断提供极大的便利。

致谢 浙江淡水水产所曹铮同志曾协助工作, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 Saiki R K, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985; 230, 1350—1354
- 2 Kim HS, Smithies O. Recombinant fragment assay for gene targeting based on the polymerase chain reaction. *Nucl Acid Res*, 1988, 16, 8887—8903
- 3 吴云涛、蔡宜权. HBV-DNA 的生物素寡聚核苷酸探针快速检测, *中国病毒学*, 1993, 8(4), 310—315
- 4 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J, et al. *Molecular cloning*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982

- 5 Keneko S, Mille R H, Feinstone S M, *et al.* Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay, *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1989; 86, 312—316
- 6 Sun C—F, Pao C C, Wu S—Y, *et al.* Screening for hepatitis B virus in healthy blood donors by molecular DNA hybridization analysis, *J Clin Microbiol* 1988; 1848—1852

Researches on Two-step PCR Amplification and a Rapid Detection of HBV-DNA

Fang Qin Wu Yuntao Cai Yiquan

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

A specific, sensitive, fast and convenient HBV-DNA detection system has been developed by using two-step PCR combining with a biotinylated oligonucleotide hybridization method. The specificity of the system was proved by hybridizing both ^{32}P -labelled HBV-DNA and biotinylated oligonucleotide probes with PCR products. We also explored the sensitivity of the system, which can detect as less as about 1—2 HBV-DNA molecules. The convenience of the system was demonstrated by the simple two temperature PCR steps and fast products detection with biotinylated oligonucleotide probe. This system can be used for both laboratory and clinical detection of HBV-DNA.

Key words HBV-DNA, Two-step PCR, Southern blot, Biotinylated oligonucleotide, Hybridization