

10

147-151

荧光素标记的庚型肝炎病毒基因探针的制备及应用

宁德刚 刘海燕 雷时美 覃巍巍 项恩鸿

(南宁市卫生防疫站, 南宁 530011)

李天宪

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

R373.21

摘要 参考国内外已完成测序的庚型肝炎病毒(GBV-C/HGV)基因序列,选取毒株间系列较保守的基因片段,并合成与之互补的核苷酸序列(Antisense),用末端转移酶将荧光素- N^3 -dd ATP 标记该片段,制成庚肝病毒基因探针。在严格控制温度的条件下,与固定于硝酸纤维素膜(NC膜)上血清斑点杂交,洗膜后与抗-荧光素-碱性磷酸酶(AP)结合,加底物后化学发光自显影判断结果。该方法检测与套式逆转录-聚合酶链反应(Nested RT-PCR)检测结果的阳性符合率为88.2%,阴性符合率为100%;并且与其他相关病毒基因无交叉反应,具有较好的特异性和灵敏性。其检测结果比EIA法检测庚肝病毒抗体更具临床意义。

关键词 庚型肝炎病毒, 逆转录-聚合酶链反应, 荧光素标记基因探针, 分子杂交

1995年起美国 Abbot 公司与 Genlab 公司相继报道一种新的与人类肝炎相关的病原因子 GBV-C/HGV, 现统称为庚型肝炎病毒。流行病学研究表明^[1-3], 庚肝病毒是一种广泛分布并经肠道外传播的病原因子, 它在急慢性肝炎患者, 献血员和吸毒人群中都存在感染。

国内外已发表多株庚肝病毒基因的全序列^[4-7], 并选择不同地理株间同源性较高的核苷酸序列作为 PCR 引物, 检测病毒 RNA, 并开发了庚肝病毒基因重组抗原 EIA 试剂检测抗体。RT-PCR 是目前检测庚肝病毒最为灵敏的方法, 但试验费用高、操作复杂, 且假阳性率高, 故不能作为常规方法在临床上应用。庚肝病毒抗体一般要在感染数周后才能检出, 且抗体阳性不能直接说明受检者体内庚肝病毒的存在, 而现行的 EIA 试剂检测结果也难以信服。为此本研究建立了荧光素标记基因探针, 利用分子杂交方法检测血清中庚肝病毒 RNA。

1 材料方法

1.1 标本来源

收集本站和南宁中心血站及市内部分医院体检的从业人员、献血员及患者血清, 血清标本于 -70°C 保存。

1.2 RT-PCR 引物及探针 DNA 片段合成

参照 GBV-C 克隆序列(Genbank U₃₆ 380)设计两对引物及用于标记的单链 DNA 片段, 委托中科院上海细胞生物所合成, 引物及探针序列如下:

收稿日期:1998-10-21, 修回日期:1998-12-31

引物 F₁: 5'-CTC TTT GTG GTA GCC GAG AGA T-3' (6902~6926 nt)

引物 F₂: 5'-TCG GTT ACT GAG AGC TCA GAT GAG-3' (6978~7004 nt)

引物 R₁: 5'-AGA TCC CCA GCC CAT GGC AGC-3' (7673~7693 nt)

引物 R₂: 5'-CAT GCT TAG GCA GGC TTG AGC-3' (7610~7629 nt)

探针基因片段(Antisense): 5'-GCG TCG CTC TGT GGA AAT AAG GCT TTG AGT AC-3' (7121~7152 nt)

1.3 探针标记

依照产品操作说明(美国 NEN NEL 公司)进行。3'-末端转移酶 2.0 μL, 氯化钴 2.5 μL, 荧光素-N⁶-ddATP 4.0 μL, 用于标记基因片段 1 μL (100 pmol/μL) 加水至体积 35 μL, 37 °C 30 min, 于 -20 °C 保存备用。

1.4 血清中病毒 RNA 的提取、TR-PCR 检测及 Southern-blot 杂交

血清中病毒 RNA 的提取依文献[5]所述方法进行。病毒 RNA 利用套式 RT-PCR 进行检测, 在 25 μL 总体积中含提取的病毒 RNA 模板和转录系统各成分(均为 Promega 公司产品), 依照产品操作说明合成病毒 cDNA。套式 PCR 第一步反应总体积 50 μL, 含逆转录合成的 cDNA, 引物 F₁、R₁, 以及 PCR 各成分(Promega 公司产品), 经 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 第二步反应取 5 μL 第一步反应产物作为模板、引物 F₂、R₂, 以及 PCR 各成分, 循环方式同第一步反应。2.0% 琼脂糖凝胶观察结果。

RT-PCR 产物依常规方法转移至 NC 膜上^[8], 与用上述方法标记的庚肝病毒基因探针杂交, 化学发光观察结果。

1.5 点膜、斑点杂交

取血清标本用 3:2 的 20 × SSC, 37% 甲醛 65 °C 处理 35 min, 取混合物经加样器真空抽滤至 NC 膜上^[8], NC 膜于真空干燥器 80 °C 1 h, 将 NC 膜置于预杂交液中[5 × SSC, 0.1% SDS, 5 g/L Blocking Reagent, 50 g/L 葡萄糖硫酸酯]于 51 °C 下杂交 1.5 h, 将标记好的探针加入预杂交液中使探针终浓度为 10 pmol/mL, 于 51 °C 下杂交 2 h, NC 膜于洗涤液 I (2 × SSC, 0.1% SDS) 及洗涤液 II (0.1 × SSC, 0.1% SDS) 中 51 °C 各洗 1 次。

1.6 化学发光自显影判断结果

将上述洗膜后的 NC 膜置抗-荧光素抗体缓冲液中[1 × 磷酸盐缓冲液, 0.5% Tween-20, 5 g/L Blocking Reagent, 0.1% (体积分数) Antifluorescein-AP Conjugate] 1 h, 用洗涤液[1 × 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4), 0.05% Tween-2] 洗 2 次, 每次 2 min, 于 NC 膜上加发光剂 CDP-starTM 5 min, x 光片压 10 min, 观察结果, 感光斑点为阳性(参见美国 NEN NEL 公司 3'-end labeling Fluorescein kit with Anti-fluorescein-AP 操作说明)。

2 结果

2.1 血清标本的 RT-PCR 检测

血清标本经套式 RT-PCR 重复检测有 17 例为庚肝病毒 RNA 阳性, 用正常人血清及 HCV-RNA 阳性血清各一份作为对照, 扩增产物经电泳分析, 庚肝病毒-RNA 阳性标本产生 640 bp 条带, 正常人及 HCV-RNA 阳性血清未见扩增产物。结果见图 1-A。

为了证明 RT-PCR 结果的可靠性, 在设计基因探针核苷酸序列时, 选择了位于套式 RT-PCR 所用两对引物之间的互补序列, 以此片段制备的基因探针与 RT-PCR 产物转膜后印迹 (Southern-blot) 杂交, 结果表明该基因探针与 RT-PCR 产物杂交均为阳性, 结果见图 1-B, 说明 RT-PCR 产物为庚肝病毒 RNA 特异性扩增产物。

2.2 探针的特异性及敏感性

为了测定用荧光素标记探针的灵敏度, 将纯化后的 Oxytoxin DNA (NEN NEL 公司提供) 分别按 100、25、6.25、1.56、0.4 和 0.1 pg 点样于 NC 膜上, 将纯化后的 Oxytoxin 基因片段

(Antisense 30 mer 由 NEN NEL 公司提供) 用荧光素标记制成探针, 并与上述斑点杂交, 结果显示可检测出 ≥ 1.56 pg 的基因组 DNA, 结果见图 2。证明该方法制备的基因探针具有极高的灵敏度。由于 HCV 与庚肝病毒在进化顺序上有着很近的亲缘关系, 以 HCV-RNA 与庚肝病毒基因探针进行斑点杂交, 结果表明庚肝病毒基因探针与 HCV-RNA 没有出现阳性结果, 证明该基因探针具有很好的特异性, 结果见图 3。

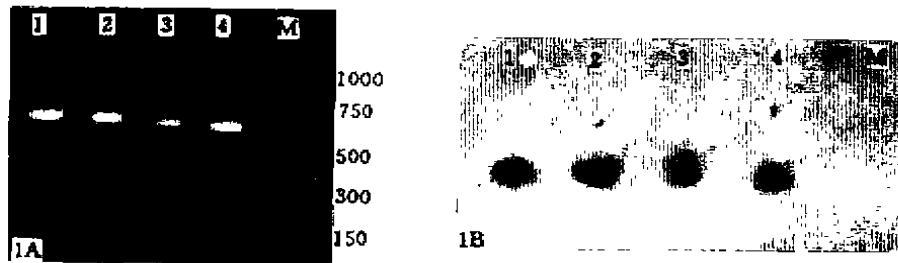


图 1 HGV-RNA RT-PCR 产物凝胶电泳分析(A)及 RT-PCR Southern-blot 与荧光素标记基因探针杂交分析(B)
M: DNA 分子量标准 1~4: HGV-RNA 标本

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product of HGV-RNA (A) and hybridization of RT-PCR Southern blot with fluorescein-labeled oligonucleotide probe (B)
M: DNA marker 1~4: HGV-RNA specimens

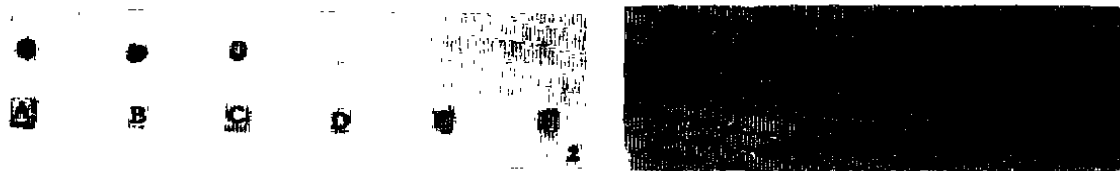


图 2 荧光素标记的 HGV 基因探针灵敏度检测
Fig. 2 Sensitivity of fluorescein-labeled oxytotoxin (30-mer) antisense oligonucleotide for the detection of oxytotoxin sense DNA by hybridization.
Purified DNA from A to F: 100pg, 25pg, 6.25pg, 1.56pg, 0.38pg, 0.01pg.

图 3 荧光素标记探针特异性检测
A-E: RT-PCR 及 Southern-blot 杂交证明为 HGV-RNA 阳性标本, F: 小牛胸腺 DNA, G~T: RT-PCR 检测为 HCV-RNA 阳性标本。
Fig. 3 Specificity of fluorescein-labeled oligonucleotide probe by dot-blot hybridization with HGV-RNA specimens and HCV-RNA specimens, calf thymus DNA. A~E: HGV-RNA positive specimens; F: Calf thymus DNA; G~J: HCV-RNA positive specimens.

2.3 庚肝病毒基因探针检测及与 RT-PCR 检测结果的符合率

庚肝病毒基因探针与部分样品斑点杂交结果如图 4 所示。标本在用基因探针检测的同时, 进行了套式 RT-PCR 检测, 结果表明在 17 例经 RT-PCR 检测阳性的标本中 15 例基因探针检测为阳性, 阳性符合率为 88.2%。30 例经 RT-PCR 检测阴性的血清标本, 经基因探针检测均为阴性, 阴性符合率为 100%, 基因探针检测阳性率低于 RT-PCR 检出率, 其可能的原因为血清中庚肝病毒滴度低, 受基因探针灵敏度的限制而无法检出。



图4 荧光素标记基因探针与部分样品 HGV-RNA 斑点杂交结果(化学发光自显影)

Fig.4 Dot-blot hybridization of HGV-RNA with fluorescein-labeled

HGV oligonucleotide probe (by chemiluminescence autoradiography).

3 讨论

目前在临床诊断中,实验室检测 HGV RNA 乃为诊断 HGV 感染的直接证据。目前医疗单位应用的诊断庚肝病毒的试剂,主要利用人工合成多肽抗原或基因重组抗原包被的 EIA 法检测抗体,在实际应用过程中试剂本身存在诸多尚需改进之处,同时庚肝病毒抗体阳性并不能说明受检者体内庚肝病毒存在。PCR 技术为检测目的基因最为灵敏的方法,但由于 PCR 的影响因素较多,对标本的检测常导致假阴性^[9],并且此法高度敏感,污染又会通过扩增造成假阳性^[10],同时 PCR 技术的应用需要一定的条件,一定程度上限制了它的临床应用。

核酸基因探针杂交技术由于具有很高的特异性和敏感性,而被广泛应用于鉴定特定的核酸。同位素标记的基因探针尽管具有很高的敏感性,

但存在放射性污染和半衰期短等问题,在推广应用方面受到一些条件限制,相对而言非放射性基因探针显示其优越性,放射性转为非放射性,消除了对人和环境的危害,操作方法简单,对核酸的标记适用面广,单链、双链 DNA, RNA 均可,亦可人工合成,稳定性好,保存时间长,不需长时间自显影和特殊设备,成本低,不失为值得推广的技术,尤其对大规模诊断的基层实验室,可采用分子杂交作为诊断依据。

此外,荧光素标记探针相对其他非放射性基因探针具有独特的优点:(1)本研究中根据公式 $T_m = 81.5 - 16.6 \lg[Na^+] + 0.41(G+C)\% - 600/N$ 计算 T_m ,在杂交和洗膜中选择了 $T_m - 16^\circ C$ 即 $51^\circ C$ 的温度严格进行,保证了杂交结果的特异性,该类探针可区分点突变^[9];同时该探针选择了比较保守的 NS₅ 区基因作为探针标记片段,试验结果证明该基因探针不与庚肝病毒在进化顺序上亲缘关系较近的 HCV-RNA 杂交,它可与不同庚肝病毒毒株进行杂交,又具有良好的特异性;并且由于标记物荧光素不象生物素标记的探针,因人体本身就有生物素存在,而使杂交产生非特异的杂交反应。(2)该基因探针采用了 3'-末端拖尾标记的方法,增加了标记物的掺入,提高了杂交信号放大率,而碱性磷酸酶和化学发光剂底物的应用使杂交信号进一步放大。本试验的结果也证明,利用其进行斑点杂交可检测出 ≥ 1.56 pg 的基因组 RNA。(3)由于探针所用的基因片段仅有 31 个核苷酸,杂交时探针容易与标本间目的基因的碱基互补配对,因而杂交时间短^[8];同时由于采用增效化学发光剂,化学发光在 10 min 内足以使普通 X 光片感光。但需要指出的是基因探针还未达到 PCR 的灵敏度,同时目前人们掌握不同病毒株基因序列有限,因此试图用一个寡核苷酸基因探针对庚肝病毒不同变异株进行检测仍有困难。随着庚肝病毒的分子生物学进化研究的不断深入,核酸片段的选用将更为全面可靠。

参 考 文 献

- 1 Maoven I, Bowden D S, Locarnini S A. Hepatitis G virus and hepatitis GB virus. *Today's Life Sci*, 1995, 21: 24
- 2 Nubling C M. Lower J. GBV-C genomes in a high-risk group in plasmapools and in intravenous immunoglobulin. *Lancet*, 1996, 347: 68
- 3 Dawson G J, Schlander G G, Pilot-Mattas T T *et al*. Prevalance studies of GB virus C infection usmg RT-PCR. *J Med Virol*, 1996, 50: 97-103
- 4 Simons J N, Leary T P, Dawson G J *et al*. Isolation of novel virus-like sequence associated with human hepatitis. *Nat Med*, 1995, 1: 564-569
- 5 Leary T P, Muerhoff A S, Simons J N *et al*. Sequence and genomic organization of GB-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol*, 1996, 48: 60-67
- 6 周育森, 王海涛, 何玉光等. 中国庚肝病毒株全基因结构特点及其感染地理分布. *微生物学报*, 1996, 24: 27-30
- 7 周育森, 陈薇, 赵敏等. 中国人庚型肝炎病毒全基因 cDNA 克隆及序列测定. *军事医学院刊*, 1996, 20: 249-254
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Synthetic oligonucleotide probes in molecular cloning, A laboratory manual* 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 11: 1-11. 61
- 9 Eiden JJ, Wilde J, Firoozmand F *et al*. Detection of animal and human group B rotaviruses in fecal specimens by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1991, 29: 539-543
- 10 Kitchin, Szotyryz, Almond N *et al*. Avoidance of false positives, *Nature*, 1990, 334: 20

Detection of HGV-RNA by Hybridization with Fluorescein-Labeled Probe

Ning Degang Liu Haiyan Lei Shimei

(Sanitary and Anti-epidemic Station of Nanning, Nanning 530011)

Li Tianxian

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

Abstract The sequences of HGV gene that had been reported were checked and analyzed. After comparison of HGV sequences from different virus strains, a gene fragment of 31 nucleotides (7121-7152 nt) served as a probe was labeled by fluorescein-N₆-dd ATP with terminal transferase. The specificity of HGV probe was tested by dot-blot hybridization with HCV RNA—related virus RNA, C. T DNA, HGV-RNA, and Southern-blot hybridization with RT-PCR product of HGV. Positive results obtained only from the HGV-RNA of positive sera that was confirmed by nested RT-PCR, all others were negative. The sensitivity of fluorescein-labeled probe was examined. The result showed that the fluorescein-labeled probe was able to check ≥ 1.56 pg of target genome. The conformity of HGV-RNA detection using RT-PCR and HGV gene probe was 97.9%. The experiment suggested that fluorescein-labeled probe can be used in clinic detection and epidemic study.

Key words HGV, RT-PCR, Fluorescein-labeled probe, Hybridization