

α -³²P HBV DNA 探针的制备及其 在血清检测中的应用

丁清泉 陈少俊 柯丽华

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

提 要

采用缺口转移 (Nick-translation) 方法标记克隆化的乙型肝炎病毒 (HBV) DNA 制备探针, 能特异地与 HBV DNA 杂交, 在本实验条件下, 其最低检测量为 0.2pg, 同位素参入率为 23.5—67.0%, 使用 100 μ Ci ³²P dCTP, 比放射活性为 10⁸cpm/ μ g DNA 左右。临床血清检测统计分析表明: HBV DNA 与 HBsAg、HBeAg、HBcAg、DNAP 的阳性符合率分别为 53.3%、69.7%、78.6%、81.7%, 其灵敏性和特异性均比免疫学检测法高。

关键词: 乙型肝炎病毒, 探针, 缺口转移, 血清检测。

乙肝病毒 (HBV) 引起的乙型肝炎是对人类危害极大的传染病。临床上常用免疫学方法作为检测 HBV 存在的主要依据。随着分子生物学技术的发展, 用放射性同位素标记 HBV DNA 作探针直接检测 HBV DNA 的存在比免疫学方法更为直接可靠。目前, HBV DNA 探针已用于临床^[1-5]。许多研究者从乙肝患者血清中分离 DNA 制备探针^[6-9]。由于患者血清来源有限, 近年来应用 DNA 重组技术已将 HBV DNA 克隆进大肠杆菌^[10-13], 能方便地获得大量高纯度的 HBV DNA。我们用 α -³²P dCTP 标记克隆化的 HBV DNA 制备探针, 经本实验室及三十多家医疗卫生单位的实验和应用, 均获得满意的结果。

材 料 和 方 法

- 一、HBV DNA 从本室克隆的 pHBV, 质粒中分离提纯。
- 二、缺口转移合成系统 α -³²P-dCTP (6000Ci/mmol), 缺口转移药盒 (Nick Translation Kit) 均系 Amersham 公司产品。
- 三、Sephadex G 50 Pharmacia 公司产品。
- 四、加样抽滤器 由本室设计, 江苏泰县医疗器械厂生产。
- 五、硝酸纤维素滤膜 孔径 0.3—0.45 μ , 北京化工学校附属工厂产品。
- 六、医疗用 X 光软片 上海感光胶片厂产品。
- 七、探针制备 参照药盒说明书之方法^[14], 即一次反应液中含 HBV DNA 1 μ g, α -³²P dCTP

本文于1987年7月20日收到。

100 μ Ci, 100 μ M dATP, 100 μ M dGTP, 100 μ M dTTP, 6 单位 DNA 聚合酶 I, 120pg DNase I, 终体积 100 μ l。15 $^{\circ}$ C 反应两小时后加终止反应液 200 μ l (50mmol/L Tris-HCl 中含 150mmol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 0.1% SDS, pH7.5), 混匀后经 Sephadex G50 柱层析, 用 1 \times TNE (10mmol/L Tris-HCl, 1 μ mmol/L EDTA, 100 μ mmol/L NaCl, pH7.5) 洗脱, 分管收集, 测定各收集管每分钟脉冲数 (cpm), 合并第 I 峰即为探针。第 II 峰为未参与合成反应的游离的 32 P dCTP。

八、放射性测定 常规放射性测定在国营二六一生产的 FH-408 自动定标器 (FT-603 井型^r闪烁探头) 上进行, 为了得到相对准确的数据, 我们将同一样品分别在 FH-408 自动定标器和 Beckman 公司 LS9800 液体闪烁计数器上同时计数, 根据三次测定结果, 得到平均校正系数为 49.5。文中所列数据均为经校正后的值。

九、血清检测 取待检血清 40 μ l 点在加样抽滤器的硝酸纤维素滤膜上, 经碱溶液变性处理后进行预杂交。按常规方法杂交, 漂洗、放射自显影^[16]。有斑点阴影者为阳性, 每 100 人份血清样品滤膜的探针用量为 0.2×10^8 cpm 左右。

结果和讨论

一、同位素参入率及探针的比活

经 LS 9800 液体闪烁器校正, 100 μ Ci dCTP 的放射性为 $1.2-2.2 \times 10^8$ cpm (缺口转移前同位素的半衰期不同), 因而经校正后的结果可信。我们采用缺口转移方法制备探针, 100 μ Ci 32 P dCTP 参入率为 50% 左右, 最高时可达 67%, 探针比放射性为 10^8 cpm/ μ g DNA 左右, 最高时可达 1.5×10^8 cpm/ μ g DNA。Rigby 采用 15—20 μ mol/L α - 32 P dATP 和 α - 32 P dCTP (比活为 100—250Ci/mmol) 双标记探针的比活为 $1-3 \times 10^8$ cpm/ μ g DNA^[16]。Weinstock 采用 2 μ M α - 32 P dNTP (比活为 300—350Ci/mmol) 四标记探针比活为 3×10^8 cpm/mg DNA^[17]。杜绍财采用 1mol/L μ α - 32 P dCTP、 α - 32 P dATP 双标记制备的 HBV DNA 探针比活性为 4.8×10^8 cpm/ μ g DNA^[9]。我们采用高比活的 α - 32 P dCTP (6000Ci/mmol) 单标记 HBV DNA 探针已取得令人满意的结果。

二、探针制备条件的探讨

在同样条件的缺口转移反应体系中分别用 0.25 μ g、0.5 μ g 和 1 μ g HBV DNA 合成探针, 随后分三次柱层析, 其洗脱曲线见图 1, 三次反应的同位素参入率及探针比放射性比较见表 1。

图 1 用不同量 DNA 合成探针的洗脱曲线
——0.25 μ g DNA - - - - -0.5 μ g DNA
- · - · - · - 1 μ g DNA

Fig. 1 Elution curves of the nick-translated probes with different quantities of DNA in three columns.

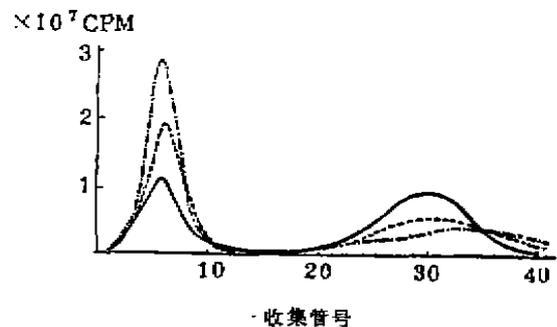


表 1 相同反应系统中 HBV DNA 与参入率及比放的关系
Table 1 Relation among HBV DNA, incorporation rates and specific activities in the same reaction system.

HBV DNA (μg)	$\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 参入率 % (incorporation rates)	比放射活性 cpm/ μg DNA (specific activities)
0.25	23.9	2.1×10^5
0.50	40.3	1.3×10^6
1.00	46.5	1.2×10^8

从图 1 可以看出, 当 DNA 量为 $0.25 \mu\text{g}$ 时, I 峰 (探针) 最高 cpm 收集管为 1.14×10^7 cpm, II 峰 (游离的 dCTP) 最高 cpm 收集管为 0.95×10^7 cpm, 两管 cpm 接近, 但 II 峰总 cpm 值高于 I 峰。DNA 量为 $1 \mu\text{g}$ 时, I 峰最高管为 2.85×10^7 cpm, II 峰最高管为 0.26×10^7 cpm, I 峰总 cpm 值明显多于 II 峰, 从表 1 的比较可以进一步看出: DNA 量为 $0.25 \mu\text{g}$ 时的 dCTP 参入率为 23.9%, 合成探针仅 0.5×10^8 cpm, 随着 DNA 量的增加, $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 参入率增加, 合成探针量也增加。因此, 我们认为每次反应加入 $1 \mu\text{g}$ DNA 既可以充分利用同位素, 又可最大限度地增加探针的总量。

应用 Sephadex G50 层析柱回收探针, 能有效地将合成的探针与游离的 $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 分离开。我们比较了一柱用一次及一柱用多次的结果。一柱用一次, 回收探针量少, 一柱反复使用, 则第二次后回收的探针明显增加, 图 2 为两次同条件的合成反应液在同一柱分离的结果, 第一次回收探针量为 0.5×10^8 cpm, 第二次回收量为 1.34×10^8 cpm 在其它几次相同内容的实验中都发现有这种趋势, 只不过差异没有这样悬殊。我们认为: Sephadex G50 层析柱初次使用时对探针具有一定的非特异性吸附。

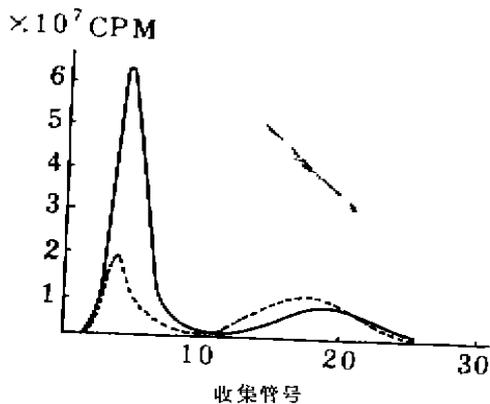


图 2 两次同条件合成的探针在同一柱分离的洗脱曲线

--- 第一次过柱 — 第二次过柱

Fig. 2 Elution curves of two nick-translated probes through one column respectively

三、探针特异性

为了检查 HBV DNA 探针的特异性, 我们分别用几种不同类型的 DNA——单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、棉铃虫核型多角体病毒、家蚕核型多角体病毒等病毒 DNA 以及 λ 噬菌体 DNA、小牛胸腺 DNA、根瘤菌 DNA——与探针杂交。结果表明探针只能与 HBV DNA 杂交出现自显影斑点, 异源 DNA 均为阴性反应。

四、探针敏感性

将系列不同稀释度热变性的 HBV DNA 点在硝酸纤维素滤膜上, 80°C 干燥后按血清检测方法预杂交、杂交、漂洗、干燥, 将杂交膜置于 x 光软片中放射自显影。图 3 为 870125# 探

针(比放射活性为 1.34×10^8 cpm/ μ g DNA、杂交探针量为 0.27×10^8 cpm, 放射自显影 4 天, X 光软片按上海感光片厂推荐的 X 光软片显影液、定影液配方显影 4—6 分钟、定影 15 分钟观察结果, 照片经 X 光软片反拍按常规曝光冲洗条件洗印) 敏感度检测结果, 其最低检测量为 0.2pg HBV DNA 在临床检测中, 实际可检测到的血清中的 HBV DNA 含量要高于这个极限。



图 3 探针敏感度检测

探针批号: 870125 探针比活: 1.34×10^8 cpm/ μ g DNA
探针量: 0.27×10^8 cpm 放射自显影时间: 4 天

Fig. 3 Detection of the probe's sensitivity.

probe No. 870125 probe's specific activity: 1.34×10^8 cpm/ μ g DNA
probe's quantity: 0.27×10^8 cpm autoradiograph, 4 days

五、温度对放射自显影的影响

一般认为, 放射自显影应在低温下 (-70°C) 进行^[16]。考虑到使用探针单位不一定具备这种条件, 我们比较了在不同温度下放射自显影的效果。图 4 结果表明不同温度对结果的判断无明显影响, 在低温 (-70°C 、 -28°C) 下放射自显影的斑点外圈清晰, 而 4°C 自显影斑点外圈模糊, 但不会导致结果的误判, 也不会降低探针的敏感度。因此只要具备有普通冰箱的单位即可开展此项工作。

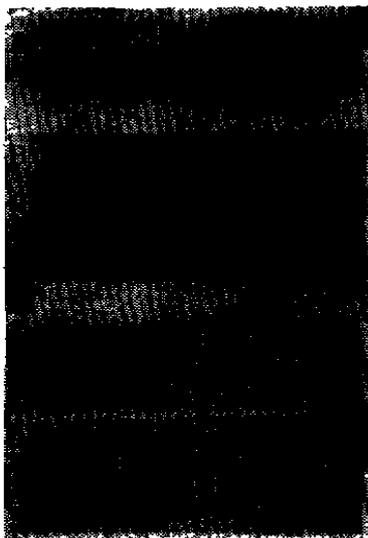


图 4 不同温度条件下放射自显影结果

A: -70°C B: -28°C
C: -18°C D: 4°C

Fig. 4 Autoradiograph of the hybridized filter at different temperature.

六、临床检测分析

将 HBV DNA 指标与其它免疫学指标进行比较, 既可以评价 HBV DNA 探针检测

的可靠性, 又可以评价免疫学指标的临床意义。我们对各种免疫学指标为阳性的血清中 HBV DNA 阳性符合率进行了统计, 结果见表 2。

从表 2 可以看出: DNA 与 HBeAg、HBsAg、HBcAg、DNAP 的阳性符合率均大于 50%, 而与其相应的抗 HBe、抗 HBs、抗 HBc 的阳性符合率均小于 50%。HBV DNA 与免疫学指标的阳性符合率顺序是 DNAP (81.7%)、HBcAg (78.6%)、HBeAg (69.7%)、HBsAg PHSA (68.3%)、HBsAg (53.3%)。由此可见, DNA 与各抗原相关性密切, 抗原为阳性的血清中大都可以检出 DNA, 而相应抗体为阳性的血清中 DNA 检出率就低。

表 2 免疫学阳性例中的 DNA 阳性率
Table 2 DNA positive rates in positive immunoassay sera

	HBsAg	HBsAg -PHSA	抗 HBs Anti-HBs	HBcAg	抗 HBc Anti-HBc	抗 HBc-IgM Anti HBc-IgM	DNAP	HBeAg	抗 HBe Anti-HBe
免疫学阳性例 Positive immunoassay	591	104	24	42	449	78	60	324	115
HBV-DNA 阳性例 Positive HBV DNA	315	71	7	33	221	20	49	226	36
DNA 阳性率 DNA Positive rate	53.3	68.3	29.2	78.6	49.2	34.5	81.7	69.7	31.3

有关 HBV DNA 与 HBeAg 系统的关系, 许多研究者作了不少工作, 但结果不尽相同, DNA 与 HBeAg 的阳性符合率相差很大 (49—100%) [2,3,4,8,18,19,20]。我们随机抽查的结果与 Liberman (68.6%) [4] 和闻玉梅等 (52.9%) [2] 的结果相近。

Krogsgard 等对 HBeAg 和 HBV DNA 均为阳性的患者进行追踪观察发现, HBeAg 与 HBV DNA 的存在和消除与患者的病期及免疫状态有关, 阳性符合率随患者病期不同而显示出差异 [20]。因此, 仅以 e 系统作为传染性指标是不够的。HBeAg 阳性血清中 DNA 阳性率高, 但二者并不完全相符。

Brechet 在对慢性肝病患者血清中 HBV DNA 的研究中发现, 13 例无任何 HBV 感染的免疫学指标的血清中 HBV DNA 全部为阳性。他认为此类病人 HBV 基因在肝细胞中表达缺陷或缺乏对 HBsAg 和 HBcAg 的体液免疫反应 [21]。Feinman 发现用免疫学最敏感的检查方法——放射免疫测定 (RIA)——不能检出 HBsAg 和 HBeAg 的血清仍能传播乙肝, 用 DNA 杂交法则可检测相当于感染水平的 10^{-8} 稀释度 [6]。Krogsgard 的另一研究表明, 在 HBsAg 阳性献血者血清中, 即使 HBeAg 和抗 HBc-IgM 阴性, HBV DNA 仍可在血清中存在, 只要 HBV DNA 存在, 都将使受血者感染 HBV, 并且后果严重 [22]。

上述有关结果及报道提示我们, 应对目前临床应用的一些免疫学检测手段的评价加以保留。因为一些免疫学指标在某些情况下并不能直接反映 HBV DNA 是否存在以及存在的状态, 而只有查出 HBV DNA 才是感染 HBV 的直接证据和传染性指标。HBV DNA 分子杂交探针在临床检测中的广泛应用必将推动人们对乙型肝炎的更深入研究。

致 谢

本文采用的临床检测原始数据由同济医科大学附属协和医院曾令兰、同济医科大学附属同济医院胡克勤、宜昌市传染病院刘明瑜、黄石市传染病院冯丽菲、广州军区武汉总医院潘南胜、湖北医学院附属二医院程仕奇、武汉市第十医院朱丽群、武汉市第七医院王国珍等同志提供，在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Brechot, C., et al, 1981 *Lancet*, 2: 765,
- [2] 闻玉梅等, 1985 病毒学报, 1: 313,
- [3] Scotto, J., et al, 1983 *Hepatology*, 3: 279,
- [4] Liherman, H.M., et al, 1983 *Hepatology*, 4: 285.
- [5] Feinman, S.V., et al, 1984 *J.Virol.Meth.*, 8: 199.
- [6] Landers, T.A., et al, 1977 *J.Virol.*, 23: 368.
- [7] Burrell, C.T., et al, 1979 *Nature*, 279: 43,
- [8] Sninsky, J.J., et al, 1979 *Nature*, 279: 346,
- [9] 杜绍财等, 1984 上海免疫学杂志, 4: 229,
- [10] Charnay, P., et al, 1979 *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 76: 2222,
- [11] Edman, J.C., et al, 1981 *Nature*, 291: 503,
- [12] Markey, P., et al, 1981 *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 78: 4501,
- [13] 敖世洲等, 1983 遗传学报, 10: 254,
- [14] Amersham International, Amersham, Technical Bulletin, 80/3, 1980
- [15] Maniatis, T., et al, 1982, in "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p326
- [16] Rigby, P.W.J., et al, 1977 *J.Mol.Biol.*, 113: 237,
- [17] Weinstock, R., et al, 1978 *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 75: 1209,
- [18] 韩凤莲等, 1986 上海免疫学杂志, 6: 116,
- [19] 闻玉梅等, 1986 中华医学杂志, 66: 9,
- [20] Krogsgard, K., et al, 1985 *Hepatology*, 5: 778,
- [21] Brechot, C., et al, 1985 *N.Enol.J.Med.*, 321: 270,
- [22] Krogsgard, K., et al, 1986 *J.Infect.Dis.*, 153: 298,

Preparation of α -³²P HBV DNA Probe and its Application in the Serum Detection

Ding Qing-quan Chen Shao-jun Ke Li-hua

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Hepatitis B virus (HBV) DNA purified from the cloned plasmid pHBV₁ and labelled by nick-translation with α -³²p dCTP was as probe, which can be hybridized specifically with HBV DNA. The minimum amount about 0.2pg of DNA has been detected by high specific activity probes. The range of the isotope incorporation rates were 23.5—67.0 per cent. The probes's specific activities were 1—1.50×10⁸cpm/ μ g DNA. According to clinical statistics the positive proportions of HBV DNA Correspond to 53.3% 69.7% 78.6% and 81.7% for HBsAg, HBeAg and HBcAg as well as DNAP respectively The HBV DNA hybridization method for serum detection is more sensitive and specific than immunoassay methods.

Key word, Hepatitis B virus, Probe, Nick translation, Serum detection.