

· 简 报 ·

夹心斑点杂交放大技术的建立和初步应用^①

周元平^② 姚集鲁 彭文伟 黄仰苏

(中山医科大学传染病学教研室, 广州, 510630)

主题词 肝炎病毒, 乙型 分离和提纯; 克隆, 分子 方法
中图分类号 R 512.63

采用分子生物学方法, 在核酸分子杂交中构建了重组单链一级探针和二级标记探针, 建立了夹心斑点杂交放大技术。初步用于血清 HBV DNA 检测, 获得了满意结果。

1 材料和方法

1.1 血清标本

取自 HBsAg 抗 HBe 阳性伴或不伴抗 HBe 阳性慢性乙型肝炎患者, 共 50 例, 为本科门诊或住院病人; 另取 5 例 HBsAg HBeAg 和抗 HBe 3 项阳性的携带者血清为阳性对照, 5 例 HBV 血清学标志均阴性的体检者血清为阴性对照。

1.2 主要试剂

内切酶 *EcoRI*, *T₄* DNA 连接酶, 低熔点琼脂糖, 随机引物 (BM 公司), 质粒 pT7T3, 菌株 NM522, 辅助病毒 M13K07 (Pharmacia 公司), 含 HBV 全基因的 pBR322 重组质粒由第一军医大学肝炎基础研究室惠赠。

1.3 探针制备

按文献方法^[1]将 HBV 基因亚克隆到 pT7T3 中, 转化宿主菌 NM522, M13K07 超感染, 离心取培养上清提取重组的 pT7T3 单链, 纯化后即为一二级探针 (不标记)。pT7T3 空载体 *EcoRI* 酶切使之线性化, 酚-氯仿抽提纯化后的 DNA 片段, 按随机引物法标记地高辛, 纯化后为二级探针。

1.4 夹心斑点杂交方法

50 μl 血清标本点样于硝酸纤维素膜, 经变性, 中和, 烘膜后 42℃ 水中预杂交 2 h, 之后加入一级探针 (5 μg/mL) 杂交 2 h, 2× SSC 洗膜 2 次, 加入经 100℃ 10 min 变性后骤冷的二级标记探针 42℃ 杂交

过夜, 依次漂洗, 封闭, Dig 抗体-AP 偶联物亲和, 洗涤后加入底物显色, 观察和记录结果。

1.5 斑点杂交

地高辛标记 HBV DNA 斑点杂交试剂盒由上海医科大学预防医学研究所提供, 按说明书操作, 为方法学对照。

2 结 果

2.1 夹心斑点杂交方法的特异性和重复性

间隔 3~7 d 对 10 份对照标本重复检测 3 次, 5 份阳性标本均阳性结果, 5 份阴性标本均显示为阴性。

2.2 夹心斑点杂交方法的敏感性

50 份慢性乙肝患者血清分别用夹心斑点杂交法和斑点杂交法检测 HBV DNA, 结果见表 1 图 1 (显示部分结果)。

表 1 两种方法检测 HBV DNA 的比较 (例数)

夹心斑点 杂交法	斑点杂交法		合 计
	+	-	
+	17	6	23
-	0	27	27
合 计	17	33	50

$\chi^2 = 4.17, P < 0.05$

3 讨 论

夹心斑点杂交的原理如图 2 所示。待检靶基因

① 卫生部 and 广东省自然科学基金资助项目; ② 第一作者, 1955 年出生, 男, 博士, 讲师

固定于滤膜后,先用插有探针序列的重组单链与之杂交,形成靶基因-重组探针杂交体,洗膜后再加入不含插入序列但标有地高辛的二级探针作第2次杂交,形成含地高辛标记的夹心杂交物用以显示。这种方法在两个环节上具有明显优势,一是一级探针为单链,避免了双链探针的自身复性问题,杂交效率高,同时其为非标记探针,可使用较高浓度而缩短杂交时间;二是二级探针彼此之间可杂交形成分枝状结构,产生多级放大效应。

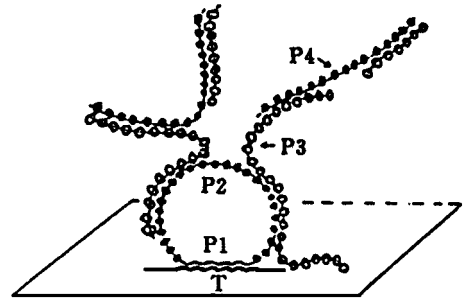


图 2 夹心斑点杂交示意图

标本中靶基因 T 固定在膜上。一级探针分为两部分:插入片段 P1 与 T 特异性杂交, P2 为 pT7T3 序列, 可与 P3 互补结合而放大信号。P3 P4 为 pT7T3 空载体用 Dig-11-dUTP 按随机引物法标记构成的二级标记探针

临床上慢性乙型肝炎患者发生 HBeAg 抗 HBe 转变后,多伴有 HBV 量的减少,斑点杂交检出率偏低,影响了对这部分患者病情活动与 HBV 复制关系的判断。本研究建立的夹心斑点杂交技术初步应用即显示检出率 (46%) 高于斑点杂交法 (34%), 差别有统计学显著性意义。和 PCR 技术相比较,夹心斑点杂交不需特殊设备,可大批量地检测标本,质量容易控制,可在基层医院开展,为一种敏感适用而相对价廉的 HBV DNA 检测技术。

参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 201-227

(1996-05-16收稿 1996-07-15修回)



图 1 夹心斑点杂交和斑点杂交对照检测结果

A 夹心斑点杂交; B 斑点杂交 其中 e7 均为阳性对照, e8 均为阴性对照。其余为抗 HBe 阳性待检标本