

· 技术交流 ·

石蜡分隔的热启动 PCR 技术 扩增血清 HBV-DNA^①

吕 凌^② 姚集鲁 彭文伟 杨 湛

(中山医科大学附属第三医院传染病科, 广州, 510630)

提 要 将聚合酶链反应(PCR)成份分两组。先加一组含 dNTPs、引物和 $MgCl_2$, 并加 1 粒组织切片用石蜡凝固为盖层。再加另一组反应液含待扩增模板、Taq DNA 聚合酶和 KCl, 以与第一组反应液分隔。PCR 循环时高温可使中隔蜡层融化, 两组反应液相混, 蜡油上浮作为防蒸发屏障。由此避免室温混合加样和预置导致引物聚体形成和错导非特异扩增, 提高 PCR 特异性和灵敏性。作者应用这一技术检测 53 例单项抗 HBc 阳性血清, 检出 HBV DNA 13 例; 检测 69 例 HBsAg 阳性和抗 HBe 阳性血清, 检出 HBV DNA 61 例。而同样样本用标准 PCR 检测, HBV DNA 阳性分别为 10 例和 52 例。两种方法对 HBsAg 和抗 HBc 双阳性血清的 HBV DNA 检出率差别有显著意义 ($P < 0.05$)。

主题词 聚合酶链反应/方法; 乙型肝炎病毒; 脱氧核糖核酸, 病毒/化学合成; 石蜡

中图分类号 R512.62; Q523.1

能检测单拷贝基因的特点使得聚合酶链反应(PCR)^[1]技术在生命科学的多个领域中得到广泛应用。但在标准^[2]条件下, 当靶基因低于 10 个拷贝时其扩增结果多数不理想, 而需要探针杂交、标记物掺入或嵌套式 PCR 再行检测。造成 PCR 灵敏性下降的原因主要是引物错导(mispriming)非目的基因扩增和引物聚体形成引起副合成反应竞争抑制所致。错导和聚体形成与否在很大程度上取决于扩增前引物是否发生非特异退火, 即引物与错误模板不完全互补结合。标准 PCR 是先将各反应成份在室温下混匀, 然后进行 PCR 循环, 加热扩增之前只要在室温下静置数分钟就足够使引物和模板发生非特异退火。手工热启动 PCR^[3]改在反应体系温度升至 94℃ 时加入 Taq DNA 多聚酶。这种方法能减少引物错导和聚体形成, 从而提高 PCR 检测灵

敏性。石蜡分隔的热启动 PCR^[4]则是利用石蜡在 60℃ 融化而在室温下凝固的特性而将 PCR 成份分隔为两组, 加温熔蜡后再使之混匀。这较手工方法精细, 也更为标准化。本文报道这种技术在检测血清 HBV DNA 中的应用。

1 材料和方法

1.1 血清 HBV DNA 提取

用文献[5]方法。

1.2 HBV 基因引物

同文献[6]。C₁ 和 C₂ 用以扩增, C₃ 用以制备探针。

1.3 电泳、转移、杂交和一般 PCR

同文献[6]。

① 1992 年广东省科委科学基金资助课题; 编号 920448

② 第一作者, 1958 年出生, 男, 博士, 副研究员

1.4 石蜡珠制备

将组织切片用石蜡灭菌后保持熔化状态点于 Bio-Rad 96 孔点样器之芯板的圆孔内赋形成蜡珠,每粒含石蜡 60 μl 。操作按无菌要求进行。

1.5 石蜡热启动 PCR

防污染按文献[7]要求进行。

1.5.1 缓冲液 为两种含 25 mmol/L Tris, Cl pH 8.3 的溶液。缓冲液-1 还含 12.5 mmol/L MgCl_2 , 缓冲液-2 还含 250 mmol/L KCl。

1.5.2 加样 向 0.5 ml Eppendorff 离心管内依次加进:缓冲液-1 20 μl 、0.2 mmol/L dNTPs 5 μl 、一对引物各 1 μl (C_1 和 C_2 各 25 pmol)、蒸馏水 23 μl 和 1 粒石蜡珠。置 TC1 型 PCR 热循环仪 (Perkin Elmer Cetus) 上先 65 $^{\circ}\text{C}$ 后 20 $^{\circ}\text{C}$ 各 3 min, 使石蜡先熔化浮于水相上层, 后凝固形成蜡盖以使再加成份与已加溶液彼此分隔。取出离心管再加进:缓冲液-2 20 μl 、Taq DNA 聚合酶 2U 和溶有 DNA 提取物的蒸馏水 28 μl 。置预热 72 $^{\circ}\text{C}$ 的 PCR 循环仪上。

1.5.3 循环 双阶变温循环 30 周。起始 2 周为 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 65 $^{\circ}\text{C}$ 2min。后 28 周为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 90s。最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6min。

2 结果

图 1 为琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭 (EB) 染色后在紫外线 (uv) 下所见的扩增产物, 其分子量大小一致, 位于 492 bp 和 369bp 标准带之间与文[8]所鉴定的特异序列 428 bp 大小相符 (图 1)。其中 1~4 和 5~8 电泳道血清样本和顺序相同。1~3 为热启动 PCR 扩增产物, 5~7 为标准 PCR 扩增产物, 显而易见前三者无, 而后三者有呈涂抹状核酸带, 这属于非特异扩增。类似结果于图 2 更为明显。在图 2 中标准 PCR 扩增的产物 (5~7 电泳道) 不仅伴有上下呈涂抹状的非特异扩增, 而且在最下端尚有明显呈云雾状模糊亮

带的引物二聚体。同样样本用热启动 PCR 法扩增 (1~3 电泳道), 则非特异扩增和引物二聚体均消失。两种方法对同一阴性对照血清进行扩增, 其电泳结果在这方面的差别就更明显 (4 vs 8 电泳道)。

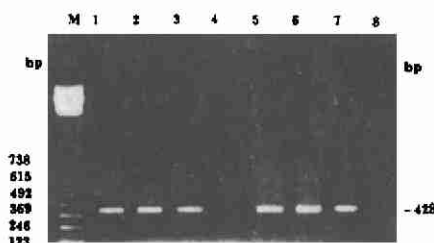


图 1 热启动 PCR 与标准 PCR 电泳图

M: 123bp 的 DNA 分子量标准, 1~4, 热启动 PCR 产物, 5~6, 标准 PCR 产物。其中 4 与 8 为阴性对照



图 2 热启动 PCR 与标准 PCR 电泳图

M: pBR 322/Hae $\square$, 1~4, 热启动 PCR 产物, 5~8, 标准 PCR 产物。其中 4 和 8 为阴性对照

对 53 例单项抗 HBc 阳性血清 (取自 42 例慢性肝炎和 11 例无症状受测者) 分别用热启动 PCR 和标准 PCR 检测, 结果见 (表 1) 热启动法 13 例、标准法 10 例 HBV DNA 阳性。其中 2 例慢性肝炎和 1 例无症状受测者为标准 PCR 扩增阴性而热启动 PCR 扩增阳性 (图 3)。其结果显示热启动 PCR 扩增出单一 428 bp 核酸带, 而标准 PCR 只有高分子量涂抹带。经 Southern 转移杂交 (图 4) 后, 428bp 核酸带显影而高分子量涂抹带不显影, 因此扩增产物特异性得以确定而 EB/uv 结果假阴性也被排除。

表1 单项抗 HBc 阳性血清的 HBV DNA 检测结果

对象	例数	标准 PCR	热启动 PCR
慢性肝炎	42	8	10
无症状受测	11	2	3

表2 HBsAg、抗 HBc 阳性血清的 HBV DNA 检测结果

		热启动 PCR		合 计
		+	-	
标准 PCR	+	50	2	52
	-	11	6	17
合 计		61	8	69

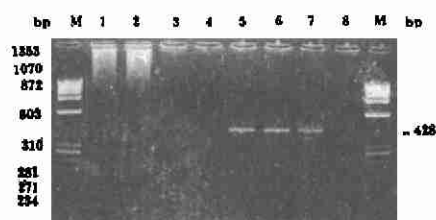
 $P < 0.05$ 

图3 单项抗 HBc 阳性病人的 PCR 产物电泳图

M, Φ 174/Hae I DNA 分子量标准。

1~4, 4 和 8 为阴性对照



图4 图3的 Southern 杂交结果

还对 69 例 HBsAg 和抗 HBc 双阳性血清分别用热启动 PCR 和标准 PCR 进行检测, 结果见表 2。热启动法 61 例、标准法 52 例 HBV DNA 阳性。统计学比较差别有显著意义 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

标准 PCR 是在室温下先将待测 DNA 与各反应成份预混, 然后上覆盖石蜡油进行 3 阶变温循环。当背景 DNA 量少且靶基因达 $10^5 \sim 10^6$ 分子时所扩增的目的基因电泳后可经溴化乙锭染色和紫外线透射直接辨认。但当靶基因减少, 扩增效果就下降。如果背景 DNA 多, 则可能出现引物错导导致大量非特异扩增并掩盖特异产物确认; 如果背景 DNA 少则会出现引物对相互交连引起自身延伸和扩增形成引物二聚体和寡聚体, 从而竞争性干扰特异产物合成。尤其是当靶基因少于 10 个分子时, 目的产物要借助分子杂交技术才能检测。

1988 年 Frohman 报道 cDNA 扩增的 RACE 技术, 首次阐述了手工热启动 PCR 方法^[3]。即在室温下将模板与引物预混, 先 95°C 变性, 再降温至 72°C 加入 Taq DNA 聚合酶, 然后按标准 PCR 循环。后来 Ward^[8]和 Newton^[9]也分别应用该法。后者认为引物与模板退火温度升高, 减少碱基错配是该法扩增效率提高的原因。

最近 Chou 报道石蜡分隔的热启动 PCR^[4]。这种方法将 PCR 各反应成份分为两组, 室温下先预混一组, 含 dNTPs、引物和 MgCl_2 , 石蜡分隔后再加另一组, 含待扩增模板、Taq DNA 聚合酶和 KCl。借此: ①使引物和有助于引物退火的 KCl 分隔, 减少引物对自身交连形成聚体。②使 Taq DNA 聚合酶和有助于其酶活性发挥的 MgCl_2 分隔。③使 Taq DNA 聚合酶与待扩增模板分隔。④最重要是使引物与待扩增模板分隔, 避免室温下发生非特异退火。此中石蜡作用重要, 它在室温下凝固而在 60°C 融化。因此, 先加石蜡与第一组反应液。升温融蜡后形成油层盖住反应液, 降温则凝成蜡盖。这时加入第二组反应液可与第一组反应液分隔。进行 PCR 循环时, 升温石蜡融化, 两组反应液被热分子运动

混匀,熔化的石蜡上浮形成油层,作为防止热蒸发屏障。反应液混匀的温度就是石蜡熔化的温度。

PCR 中 DNA 合成有 3 条途径,即特异扩增、引物聚体形成和引物错导。特异扩增是目的所在,后两者则是副反应,可竞争抑制特异扩增。目的基因少时容易出现两种副反应,背景 DNA 多时则加速错导;引物聚体形成虽然比错导更易抑制特异扩增,但错导却是影响 PCR 特异性与精确性的主要原因。热启动 PCR 就是通过抑制副反应来增进特异性和敏感性。

Chou^[4]发现,在 PCR 前室温下混合各反应成份后随着预置时间延长,经 EB 染色所见的非特异扩增逐渐增加,而探针杂交的特异显影带则相应减少。改用石蜡分隔的热启动 PCR,引物聚体形成减少,错导产物消失,EB 染色和 Southern 杂交结果清晰只见特异扩增。

本文结果热启动 PCR 的 HBV DNA 检出率明显高于标准 PCR。后法不仅可见引物聚体,还可见明显的非特异扩增,而热启动 PCR 则无此副合成反应(图 2)。提示抑制引物交连和错导会提高基因扩增效率。

单项抗 HBc 阳性可能是一种引致轻微肝炎活动的低水平 HBV 感染。其时血清 HBV 毒粒 $<10^2$ 个/ml,常规方法极难检出病毒,但 PCR 则可能阳性^[10]。本文 53 例这种受测血清,标准 PCR 法可从 10 例、热启动 PCR 法可从 13 例测出 HBV DNA,这反映了一个易被忽视的健康问题。为了避免低估其介导 HBV 传播的危险性,应尽量改进检测方法。对这种低水平的 HBV 感染,热启动 PCR 或许是一种值得推荐的检测手段。

抗 HBe 阳性的 HBsAg 携带者,其血清 HBV 毒粒介于 $10^6 \sim 10^2$ 个/ml 之间。抗 HBe 出现并不能使感染者丧失传染性,其肝炎活动有可能呈进行性。这类病人分子杂交检出 HBV DNA 的阳性率明显低于 PCR^[10]。而本文应用热启动 PCR 的 HBV DNA 检出率又

明显高于标准 PCR ($P < 0.05$),说明提高 HBV-DNA 检出率关键之一就是在作 PCR 实验过程中如何抑制副合成反应以增进基因的特异扩增。

参 考 文 献

- 1 Saiki R, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230(4732): 1350
- 2 Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, California: Academic Press Inc, 1990. 3
- 3 Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(23): 8998
- 4 Chou Q, Russell M, Birch DE, et al. Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplification. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(7): 1717
- 5 Yotsumoto S, Okamoto H, Tsuda F, et al. Subtyping hepatitis B virus DNA in free or integrated forms by amplification of the S-gene sequences by the polymerase chain reaction and singletrack sequencing for adenine. *J Virol Meth*, 1990, 28(2): 107
- 6 吕 凌,姚集鲁,彭文伟,等. 乙肝病毒 PCR 产物的鉴定及单项抗 HBe 阳性血清的 HBV 基因扩增. *中山医科大学学报*, 1994, 15(1): 12
- 7 Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 1989, 339(6021): 237
- 8 Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, et al. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, 1989, 341(6242): 544
- 9 Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA: the am-

- plification refractory mutation system markers and changes associated with loss of
(ARMSO). Nucleic Acids Res, 1989, 17(7): hepatitis B e antigen after antiviral therapy.
2503 Gastroenterology, 1987, 93(6): 1236
- 10 Di Bisceglie AM, Waggoner JG, Hoofnagle JH, et al. Hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in liver of chronic carriers: correlation with serum (1993-04-05 收稿 1994-10-06 修回)

AMPLIFICATION OF HEPATITIS B VIRUS SEQUENCES FROM SERUM BY WAX-MEDIATED HOT-START POLYMERASE CHAIN REACTION

Lu Ling Yao Jilu Peng Wenwei Yang Zhan

(Department of Infectious Diseases, The 3rd Affiliated Hospital
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

A wax-mediated hot-start PCR was established in which the reactants were divided into two groups, one containing primers, dNTPs and $MgCl_2$; another template, Taq DNA polymerase and KCl. The first group was added to reaction tubes together with a wax (used in tissue processing) bead, the other after the wax melted at $68^\circ C$ and solidified at room temperature to form a layer that covered the first, by which the two were made separated. When PCR begins, the wax melts, the oil rises to the surface to form an insulation barrier, and the reactants mix at a high temperature, not the room temperature that prevents primer dimerization and pre-PCR mis-priming, to improve the specificity and sensitivity of the amplification. The technique was used to detect HBV-DNA from 53 sera which were positive to anti-HBc and 69 sera which were positive to HBsAg and anti-HBe. HBV-DNA was picked up in 13/53 of the former and 61/69 of the latter. The standard PCR was also applied to the same sera and the positivity of HBV-DNA were 10/53 and 52/69 respectively. The difference between 61/69 and 52/69 has a statistical significance ($P < 0.05$) suggesting that the specific HBV-DNA amplification can be improved by decreasing the primer dimerization and mispriming.

Subject headings polymerase chain reaction/methods; hepatitis B virus; DNA, viral/chemical synthesis; paraffin