

• 技术交流 •

# 以二氧化硅快速提取 HBV-DNA 用于双阶变温 PCR 检测

吕 凌\* 姚集鲁 彭文伟

(中山医科大学附属第三医院传染病科,广州,510630)

**提 要** 以异硫氰酸胍裂解血清释放核酸使被二氧化硅吸附,经乙醇洗涤后用水悬浮,上清即含纯化 DNA。结合双阶变温 PCR 建立一种简单快速的血清 HBV-DNA 检测方法。该法只需检测 10ul 血清,完成提取和扩增只要 3h,操作很易掌握。用之检测 56 例 HBsAg<sup>+</sup>/HBeAg<sup>-</sup> 的血清、42 例 HBsAg<sup>+</sup>/HBeAg<sup>+</sup> 的血清和 54 例 HBsAg<sup>-</sup>/HBeAg<sup>-</sup> 的血清,结果 HBV-DNA 检出率分别为 86%、57% 和 13%。应用表明这是一种简捷有效的核酸纯化和扩增方法,适于对大量临床样本作检测之用。

**关键词** 乙型肝炎病毒;多聚酶链反应;脱氧核糖核酸

**中图分类号** R512.62; Q523.1

多聚酶链反应(PCR)检测病毒核酸在病毒性肝炎诊断中的应用已日益普及。但目前国内所用由临床样本中纯化核酸的方法一般比较费力耗时。本文介绍一种简单的不用苯酚和氯仿抽提的核酸提取方法,可以快速纯化血清中的 HBV-DNA,以便进行双阶变温 PCR 检测。

## 1 材料与方 法

### 1.1 二氧化硅悬液

二氧化硅按下法处理:60g SiO<sub>2</sub>以 500ml 去离子水悬浮,置室温自然沉降 48h。恒流泵吸除 430ml 上清,再加水至 500ml。剧摇悬浮 SiO<sub>2</sub>,再置室温沉淀 5h。去 440ml 上清并加 HCl 调 pH 为 2。

### 1.2 含胍裂解液

称取异硫氰酸胍(GuSCN, Serva)120g,依次加进 100ml 0.1mol/L Tris. Cl pH6.4. 22ml 0.2mol/L EDTA pH8.0 和 2.6g Triton

X-100 溶解。

### 1.3 血清 DNA 萃取

血清取自本科住院或门诊的肝炎病人和查血者。在 0.5ml 离心管内按下比例加进:90ul 裂解液、8ul SiO<sub>2</sub>悬液和 10ul 血清。颠倒摇动混匀,室温下自然沉淀 10min(可在 56℃ 加速沉淀),以带细长吸尖的恒流泵小心吸除上清,加 400ul 80%乙醇悬浮洗涤,微量离心机(军事医学科学院)1 000r/min 离心 2min,吸除上清,开盖置金属盒内,56℃ 干燥 10min 迄止 SiO<sub>2</sub>沉淀出现裂痕,加 35ul 双蒸水悬浮,56℃ 置 10min,1 000r/min 再离心 2min 吸 15ul 上清进行 PCR 扩增。

### 1.4 PCR 扩增

依文献<sup>[1]</sup>原则进行。在 0.5ml 离心管内加进:1ul FD 耐热性 DNA 多聚酶、PCR 反应液、0.2mmol/L dNTPs、各 10pmol 的引物 C<sub>1</sub> 和 C<sub>2</sub>及 15ul 经萃取的上清液。

不混匀上覆 30ul 矿物油(Sigma),置 TC 1 型 DNA 热循环仪(Perkin Elmer Cetus)

\* 第一作者,36岁,男,博士,副研究员

94℃30s、63℃1min 双阶变温循环30周,最后置72℃延伸7min。引物 C<sub>1</sub> 序列为5'-ACT-GTTCAAGCCTCCAAGCT3', C<sub>2</sub> 为5'-AG-GAGTGC GAATCCACACTC3', 均为 HBV 之 adr, adw 和 ayw 3种亚型基因组 C 基因区共有的保守序列, 依 Ono 记位法, C<sub>1</sub> 为1859-1968 碱基顺序, C<sub>2</sub> 为2287R-2268R 碱基顺序<sup>[2]</sup>。

### 1.5 限制性酶切分析

PCR 扩增产物以上述 SiO<sub>2</sub> 方法再萃取, 上清液以 Bgl I (BRL) 37℃ 酶切2h。

### 1.6 电泳

用0.67倍 TBE 液和2%琼脂糖加0.5ug/L 溴化乙锭(EB)制成凝胶平板。每个电泳孔取10ul PCR 产物或酶切产物上样, 在同倍 TBE 液中以5V/cm 条件电泳60min, 然后在2537 Å 紫外光(UV)下观测拍照结果, 并与同步电泳的 Φ174/Hae III DNA 分子量标准(Promega)参比。

## 2 实验结果

### 2.1 PCR 产物鉴定

图1示 EB/UV 下所拍摄的产物电泳结果。M 为 Φ174/Hae III DNA 分子量标准。A 为本法萃取扩增的 HBsAg<sup>+</sup> 和 HBeAg<sup>+</sup> 双阳性血清的 PCR 产物, 为一分子量介于603bp 和310bp 标准带之间的核酸带, 与由引物推算的产物428bp 大小一致。B 为 A 产物经 Bgl I 限制酶切的结果, 呈现两条核酸带, 一位于234bp 和118bp 标准带之间, 另一位于310bp 和281bp 标准带之间, 分子量推算分别为125bp 和299bp, 是428bp 扩增产物 Bgl I 酶切后产生的两个限制性片段, 与 Ono 记位法 HBV 基因组之1983-1989bp 顺序的 Bgl I 酶切点位置相符<sup>[2]</sup>。C 为同法萃取和扩增的克隆 HBV DNA (pAM6) 的 PCR 产物, D 为 C 产物的 Bgl I 酶切结果, 核酸带数目位

置分别与 A、B 一致。E、F、G、H 样本依次与 A、B、C、D 相同, 只是按文<sup>[3]</sup>法以酚仿萃取和三阶变温循环。两法结果相当, 只是本法血清加量仅其1/10(10:100), 全程省时一半以上(3h:8h), 方法简便快速。

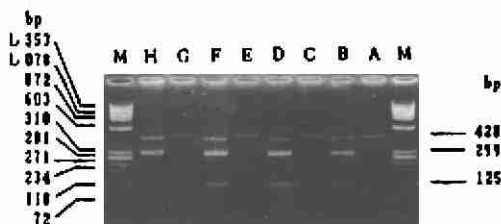


图1 EB/UV 下 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果  
M, Φ174/Hae III DNA 分子量标准

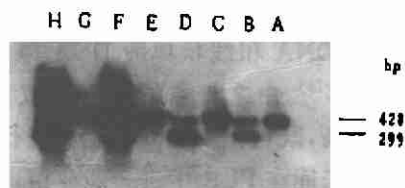


图2 PCR 产物的 Southern 转移杂交结果

### 2.2 检测应用

对152例血清用本法萃取和双阶变温 PCR 检测, 结果见附表。

## 3 讨论

包括分子杂交和多聚酶链反应(PCR)在内的核酸检测技术在感染性疾病诊断中的作用已越显重要<sup>[4-5]</sup>。但常用的由血液、尿液和组织中提取核酸的方法却很费力耗时并涉及许多步骤, 如需用去垢剂裂解、蛋白酶消化、苯酚变性、仿醇洗涤和酒精沉淀等<sup>[3]</sup>, 不仅核酸容易丢失, 而且要多次转移试管, 增加样本间污染, 造成 PCR 检测结果的假阳性。

附表 152例血清的 HBV DNA 检测结果

血清 HBV 标记	例数	HBV DNA 阳性数	%
HBsAg <sup>+</sup> /HBeAg <sup>+</sup>	56	48	86
HBsAg <sup>+</sup> /HBeAg <sup>-</sup>	42	24	57
HBsAg <sup>-</sup> /HBeAg <sup>-</sup>	54	7	13

前人已对 SiO<sub>2</sub> 在 NaI 或 NaClO<sub>4</sub> 存在时能够结合核酸的特性作过研究, 但很少直接用以检测临床样本<sup>[6~7]</sup>。异硫氰酸胍可以溶解细胞壁并灭活核酸酶, 因此也被用以萃取核酸, 尤其是被用于酸-胍-酚-仿 (AGPC) 法萃取 RNA<sup>[8]</sup>, 这是目前逆转录 (RT)-PCR 检测临床样本所含丙型肝炎病毒 (HCV) 基因的模板提取方法。在此基础上有人将 SiO<sub>2</sub> 与异硫氰酸胍结合应用, 建立了一种不需有机酚仿萃取的核酸纯化方法, 可以从血液和尿液中有效地提取核酸, 包括共价键连结的密闭环状 DNA、松弛环状 DNA、线状双股 DNA 和线状单股 DNA 以及核糖体 RNA 等<sup>[9]</sup>。由之提取的核酸不仅量多而且质素也高, 既可作限制酶切也可进行连接。但该技术未能在 PCR 中进一步应用, 而且缺点是每提取 1 份样本, 需加 2 次含胍液共 1.8ml, 成本相对提高; 并且还要洗涤 3 次, 既耗时又增加污染, 不利于临床检测。为此作者作了改动, 将萃取血清量减为 10ul 并使含胍液减为 1 次 90ul 以降低成本, 只用乙醇 400ul 洗涤 1 次以简化操作程序。然后用以双阶变温 PCR 快速检测 HBV DNA。整个萃取和 PCR 共耗时 3h, 可谓简便快速。应用结果 HBV DNA 检出率在 HBsAg 和 HBeAg 双阳性血清为 86%、HBsAg 阳性/HBeAg 阴性血清为 57%、HBsAg 和 HBeAg 均阴性血清为 13%, 比较酚萃取方法而言其检出率虽无明显提高, 但优点是: 耗价低廉, 操作简单, 1h 可完成萃取, 无需具专门生化知识和技术, 因此方便基层检测大量临床样本应用。更重要是全部纯化在 1 支试管内完成, 减少了样本间和管内外的污染, 因此有利于防止 PCR 的假阳性。

## 参 考 文 献

- 1 Kwok S and Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989, 339:237
- 2 Ono Y, Onda H, Sasada R, et al. The complete nucleotid sequences of the cloned hepatitis B virus DNA, subtype adr and adw. *Nucleic Acids Res* 1983, 11:1747
- 3 Yotsumoto S, Okamoto H, Tsuda F, et al. Subtyping hepatitis DNA in free or integrated forms by amplification of the S-gene sequences by the polymerase chain reaction and single-track sequencing for adenine. *J Virol Meth* 1990, 28:107
- 4 Tenover FC. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin Microbial Rev* 1988, 1:82
- 5 Schochetman G, Ou CY, Jones WK. Polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1988, 158: 1154
- 6 Marko MA, Chippetfield R, Birnboim HC. A procedure for the large scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal Biochem* 1982, 121:382
- 7 Yamada O, Matsumoto T, Nakashima M, et al. A new method for extracting DNA or RNA for polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 1990, 27:203
- 8 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1988, 174:485
- 9 Boom R, Sol CJ, Salimans MM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990, 28:495

(1993-04-05收稿 1993-10-29修回)

## EXTRACTION OF DNA FROM SERUM USING SILICA DIOXIDE AND ITS APPLICATION TO A PCR WITH TWO-STEP THERMAL CHANGES

Lu Ling    Yao Jilu    Peng Wenwei

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

A method of nucleic acids purification without phenol and chloroform was improved. Guanidinium isothiocyanate was used to lyse protein and release nucleic acids, the latter was bound by silica dioxide. After an ethanol wash and a water suspension, the bound nucleic acids was freed to the supernatant that can directly be detected. Combining with a polymerase chain reaction that involves only two-step thermal changes, a rapid and simple technique for detection of HBV DNA in serum was established which needs only 10ul serum as sample, 1 hour for purification and 2 hours for the amplification. By applying it to a test in 56 sera of HBsAg<sup>+</sup>/HBeAg<sup>+</sup>, 42 of HBsAg<sup>+</sup>/HBeAg<sup>-</sup>, and 56 of HBsAg<sup>-</sup>/HBeAg<sup>-</sup>, the HBV DNA was detected in 86%, 57% and 13% respectively.

**Key words**    hepatitis B virus; polymerase chain reaction; deoxyribonucleic acid