

简化 HBV-DNA 抽提用于 多聚酶链式基因扩增

高志良 姚集鲁 吕凌 黄仰苏 郑锡澄

(附属第三医院传染病科)

摘要 采用异硫氰酸胍、柠檬酸钠、2-巯基乙醇、十二烷基肌氨酸钠作为变性裂解剂,结合水饱和酚、氯仿、异戊醇等进行快速程序式抽提血清 HBV-DNA 模板用于多聚酶链式(PCR)基因扩增。该提取法比一般方法简单、稳定、不易污染,抽提过程可在 1 h 内完成。PCR 应用结果表明敏感性高于地高辛素标记探针斑点杂交法。经酶切及 α - ^{32}P 标记放射自显影鉴定 PCR 产物具有良好的特异性。

关键词 多聚酶链反应;乙型肝炎病毒;脱氧核糖核酸

中图分类号 R 512.62; Q 523.1

目前检测 HBV-DNA 常用斑点杂交或多聚酶链式反应(PCR)技术。由于 PCR 技术许多方面都优于斑点杂交,因而将会逐步广泛地得到应用。现有用于 PCR 中 HBV-DNA 模板制备,一般采用十二烷基磺酸钠(SDS)、乙二胺四乙酸(EDTA)及蛋白酶 K^[1]等作为裂解剂以消化核蛋白,再用酚,氯仿等抽提。亦有不用抽提的直接微量法^[2]。但这些方法都需时较长或步骤较多,不适于临床医疗单位应用。我们采用异硫氰酸胍等作为蛋白变性裂解剂,参用 Chomczynski^[3]一步法快速制备 HBV-DNA 模板,改进 PCR 检测过程,有利于推广普及应用。

材料与方 法

试剂 A液:4.2 mol/L 异硫氰酸胍、25mmol/L 柠檬酸钠、0.1 mol/L 2-巯基乙醇、0.5%(W/V) 十二烷基肌氨酸钠。B液:的比例 2 mol/L 醋酸钠, pH 5.0。C液为混合液:即水饱和酚:氯仿:异戊醇为 25:24:1。D液:冰冻无水乙醇。PCR 检测 HBV-DNA、ELISA 检测 HBsAg/抗-HBs、HBeAg/抗-HBe、抗-HBc 等物由本科制备^[4,5]。地高辛素标记探针检测 HBV DNA 斑点杂交试剂由上海科华提供。检

测标本为本科门诊及住院病人血清。

HBV-DNA 模板快速制备 1.5 ml 带盖离心管中加 A 液 280 μl , 待检血清 100 μl 混匀。立即加 B 液 40 μl , 水平晃动 10s, 加 C 液 400 μl , 混匀。于 -20℃ 静置 10 min 后, 1 0000 rpm 离心 10 min。吸上清液于另 1 个 1.5 ml 离心管, 加 D 液 800 μl 及 B 液 100 μl , -20℃ 静置 20 min, 10 000 rpm 离心 15 min。用恒流泵由液相界面小心吸除管内全部液体, 余留沉淀物即为 HBV-DNA 模板用于 PCR 检测。PCR 试剂及操作常规见前文^[4], 用 PCR 热循环仪(Perkin Elmer Cetus)进行基因扩增。

结 果

抽提液水相 pH 值变化对检出的影响 10 份 HBsAg、HBeAg 双阳性血清标本抽提时分别调节 B 液 pH 值, 来改变抽提液水相的酸碱度, 当 pH 为 5~6 时, HBV-DNA 检出率最高, 10 份全阳性, 其次是 pH 4 和 7 时, 9 份检出阳性, 当 pH 过高(>8.0)或过低(<4.0)的情况下, 检出率明显降低。

另外, 对 20 份水相阳性标本, 将酚相用等量蒸馏水洗 1 次, 1 0000 rpm 离心 5 min, 吸出上清再做 PCR 检测, 结果 18 例 HBV-DNA

检出阳性。

PCR 扩增产物特异性分析 预扩增产物 664 bp, 由同步电泳的分子量标准估算。该产物在 HBV 基因组中位于 1780~2390 碱基对位置, 并含 Bgl II 内切酶位点: 1984nt, A GATCT。取 4 μ l 产物抽提液, 加 4 μ l Bgl II 内切酶, 2 μ l 酶切缓冲液, 14 μ l 蒸馏水, 37 $^{\circ}$ C 消化 4h 后, 以 10 mmol/L EDTA 终止, 再进行琼脂糖凝胶电泳, 酶切后 664 bp 产物分为: 254 bp 和 410 bp 2 条, 见图 1。以上凝胶经电转移至尼龙膜上, 再用 α - 32 P 标记探针杂交放射自显影, 方法参见前文^[6,7], 见图 2。

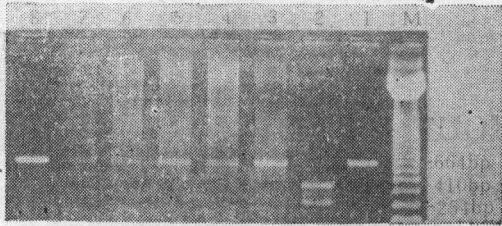


图1 EB 染色 PCR 产物电泳结果
注: M: 123bp 分子量标准。
2: 酶切产物
1.3~8: PCR 产物 (664bp)

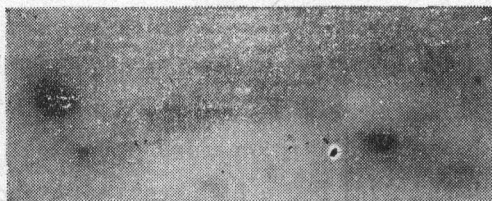


图2 图1中产物电转移至尼龙膜, 用 α - 32 P 标记探针杂交后放射自显影结果

比较 PCR 与斑点杂交敏感性 40份 HBV 标志物阳性标本用 PCR 与 斑点杂交法平行检测, 结果示: 快速抽提模板 PCR 法 HBV-DNA 检出率为 45% (18/40), 明显高于地高辛素标记探针斑点杂交法为 25% (10/40) ($P < 0.005$)。

讨 论

PCR 检测 HBV-DNA 技术中, 有关 HBV-

DNA 模板的制备目前常用 SDS 或非离子去污剂: 如 NP-40 等加蛋白酶 K, 然后 65 $^{\circ}$ C~70 $^{\circ}$ C 消化 2h~3h, 再用酚及氯仿抽提 2~3 次。由于操作步骤多, 耗时长、污染机会相应增加, 对常规标本量大的临床检测时这些方法显得不适应。本文采用异硫氰酸胍、2-巯基乙醇及十二烷基肌氨酸钠作为蛋白裂解剂用来抽提检测血清中的 HBV-DNA 模板。这些物质由于对核酸酶的强有效抑制作用, 故最早 COX^[8]用以作为 RNA 分离时的去蛋白剂。后来发现加热的水饱和酚与其结合能提高纯化效果, Chomczynski 就此发展了 RNA 一步抽提法^[3], 即本文所述方法。但以前的资料认为该方法只能作为 RNA 抽提, 而不能用于 DNA。本文用该法抽提的水相中 HBV-DNA 模板成功地用于 PCR 检测, 且经酶切和 α - 32 P 标记探针杂交鉴定证实属特异性。

该法能有效地进行 DNA 的抽提用于 PCR 技术中, 一方面说明水相肯定有 DNA 的存在。另一方面, 作者又通过对酚相经过再抽提后, 仍能用 PCR 检出 HBV-DNA, 说明整个抽提液中含 HBV-DNA。不管水相或酚相中哪一层 DNA 含量多, 由于 PCR 技术的高灵敏性, 因而用此方法抽提的水相中 HBV-DNA 模板足以满足日常 PCR 检测需要。对 40 份 HBV 标志阳性血清标本进行检测, 结果示 HBV-DNA 检出率为 45%, 远高于平行检测的地高辛素斑点杂交法: 25% ($P < 0.005$)。

DNA 与 RNA 在抽提时受 pH 因素的影响, 一般 RNA 适于用偏酸环境下抽提。本文比较抽提液水相 pH 在 4~9 范围变化对 HBV-DNA 检出的影响, 发现 pH 为 5~6 时, 检出结果最理想, 过高、过低 pH 都会影响检出率。

这种改良的快速制备 HBV-DNA 模板的方法, 被证明是一种有效的程序法用于 PCR 技术。其操作方便, 省时, 检出结果稳定, 适于临床检测及科研等需要, 值得推广应用。对其它 DNA 类抽提也提供了一种可资借鉴的方法。

参 考 文 献

1. Larzul A, et al. An automatic modified polymerase chain reaction procedure for hepatitis B virus DNA detection. *J. Virol. Methods* 1990;27:49
2. Baginski A, et al. Detection of hepatitis B Virus. In: Michael A, eds, *PCR protocols: A guide to methods and applications: California*, 1992:348
3. Chomczynski P, et al. Single-step method of isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. biochem* 1987;162:156
4. 吕 凌,等. 建立多聚酶链反应技术检测血清 HBV-DNA. 中山医科大学学报 1992;13(3):49
5. 姚集鲁,等. 单克隆抗体酶免疫一孔一期培育法检测 HBeAg/抗-HBe. *中华传染病杂志* 1988;9(3):165
6. 谢彦博,等. 生物素标记乙型肝炎病毒 DNA 探针的制备及应用. 中山医科大学学报 1987;8(1):15
7. 吕 凌,等. 原发性肝癌的肝内 HBV-DNA 整合状况. 中山医科大学学报 1990;11(2):40
8. Cox R. A. In *methods in enzymology* (Grossman, L, and moldave, K, EDS) 1968, vol12, part B. PP120-129 Academic Press, or Lando, FL
(1992-09-14收稿 1993-03-20修回)

A SIMPLIFIED TECHNIQUE OF HBV-DNA ISOLATION IN PCR

Gan Zhiliang Yao Jilu Lu Ling
Huang Yangsu Zheng Xicheng

(Department of Infectious Diseases, the Third Affiliated Hospital)

A new method of HBV-DNA isolation by a simple extraction with an acid guanidium thiocyanate-phenol saturated with water in PCR was described. The method was simple and can be completed in 1 hour. Compared with spot hybridization using probe labeled by digoxigenin for detection of HBV-DNA, this technique had a high sensitivity, and was particular useful in processing large number of clinical samples.

Key words Polymerases chain reaction; Hepatitis B virus; DNA