

PCR制备地高辛配基标记的探针 检测登革病毒核酸*

庄 坚 郭辉玉 陈火胜

(微生物学和免疫学教研室)

提 要 用聚合酶链反应(PCR)技术,以重组质粒PDEⅠ305 DNA为模板,在底物中补充标记的脱氧尿嘧啶核苷三磷酸(DIG-dUTP),经扩增反应制备了地高辛配基标记的登革病毒2型(DEN₂) cDNA 探针。DNA-RNA 斑点杂交表明该探针有 DEN₂ 型特异性,可检出 0.1 pg DEN₂-RNA。PCR 扩增标记只用 10 ng 模板 DNA,数小时内可制备约 1 μg 标记的 cDNA 探针,而用六聚核苷酸随机引物(RHP)标记,从质粒 DNA 酶切、片段回收得到标记获得探针,至少需数 10 h。可见 PCR 技术直接制备地高辛配基标记的 cDNA 探针较方便、快速、标记率高、特异性强,具有一定的应用前景。

关键词 地高辛配基;聚合酶链反应;登革病毒;斑点杂交

中图分类号 R 373.33

核酸探针是核酸杂交技术中必不可少的工具。国内外采用多种方法制备核酸探针,并成功用于检测多种病毒核酸。近年,有报道认为应用 PCR 技术直接制备标记的核酸探针较简便、快速^[1,2]。据此,我们在 4 种脱氧核苷酸底物中加入适量的地高辛配基(digoxigenin)标记的脱氧尿嘧啶核苷三磷酸(DIG-11-dUTP),应用 PCR 扩增 DEN₂ 特异 cDNA 片段,制备了地高辛配基标记的 DEN₂-cDNA 探针,并初次用于检测登革病毒核酸。

材 料 和 方 法

毒种、细胞株 本实验用的登革病毒原型株有 DEN₁ (Hawaii)、DEN₂ (NGC)、DEN₃ (HD₅₀)。地方株有 DEN₂ (HN₉₈、海南, 1986)、DEN₄ (广州, 1978) 分离自登革热患者血清。血清型经本室制备的型特异单克隆抗体间接免疫荧光染色证实。日本乙型脑炎病毒中山株(JE),本实验室保存。C6/3b 白纹伊

蚊细胞系由广东省卫生防疫站赠。

血清标本 来自广州市传染病院住院(1991年9~10月间)的登革热患者。发病后第 3~6 天采血,血清-20℃冻存备用。

PCR 引物及试剂 引物自行设计扩增 DEN₂E 基因第 1~305 位核苷酸(305 bp)片段,由军事医科院基因工程室代合成。上游引物序列: 5'-ATGCGTTGCATAGGAATATC-3'; 下游引物序列: 5'-CCCCATCCTCTGTCTACCA-TG-3'。PCR 试剂为复旦遗传所产品。DNA 扩增仪(FR-300)为复旦大学生物实验研究所产品。

其他试剂盒 非放射性 DNA 标记与检测试剂盒、DIG-11-dUTP、biotin-16-dUTP 为 Boehringer Mannheim 公司产品。逆转录(reverse transcription, RT)试剂盒为 Promega 公司产品。

模板 DNA 提纯 以克隆的重组质粒 PDEⅠ305 DNA 为模板。该质粒由 305 bp 登革病毒 2 型(HN₉₈) cDNA 片段插入载体 PUC₁₈ 的 SmaI 位点构建而成,转化至 E. coli JM₈₃。质粒 DNA 按文献^[3]方法提纯。

DEN₂-cDNA 探针的标记

* CMB 基金及卫生部医学重点科技项目基金资助,第一作者为我校 1968 届校友,国内访问学者(汕头大学医学院);第二作者为导师

1. PCR扩增标记 PCR总反应体积50 μ l。在Eppendorf管中依次加入5 \times 缓冲液10 μ l、dNTP底物(各2mmol/L)5 μ l、25nmol/L。DIG-11-dUpT 2 μ l、上下游引物各1 μ l(100ng/ μ l)、模板DNA 2 μ l(约10ng)、灭菌双蒸水28 μ l,置DNA扩增仪中92 $^{\circ}$ C 3min,加FDNA多聚酶1.5U,混匀后覆盖石蜡油开始PCR循环:92 $^{\circ}$ C 45s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 30s \rightarrow 70 $^{\circ}$ C 60s,30个循环。在扩增DEN₂特异cDNA片段同时标记上DIG-11-dUTP作为探针,简称PCR-DIG探针。同法扩增DEN₂cDNA,但不加DIG-11-dUTP作对照。

2. RHP标记 按非放射性DNA标记与检测试剂盒说明书程序标记探针。纯化的模板DNA约500ng,标记20h。简称RHP-DIG探针。

病毒RNA制备 所有毒株按常规感染C6/36细胞,分别收集感染上清和DEN₂感染的细胞沉渣。感染上清用PEG 6000浓缩后高速离心,沉淀物溶于适量TE缓冲液。用碘化钠法^[4]加异硫氰酸胍,醋酸钠提取感染上清中病毒RNA,其中HN₉₈的RNA用紫外分光光度计法作定量测定(100ng/ μ l)。DEN₂感染的细胞沉渣及血清标本中总核酸(包括病毒RNA)也用同法提取。-20 $^{\circ}$ C冻存备用。

斑点杂交 按非放射性DNA标记与检测试剂盒说明书进行。样品(若为DNA须95 $^{\circ}$ C变性10min,置冰浴骤冷3min)适当稀释后点样于预处理的硝酸纤维膜上,以未标记的PDE_{II}305DNA为阳性对照,正常C6/36细胞上清,TE缓冲液为阴性对照。已点样的NC膜80 $^{\circ}$ C烘干2h,继与杂交液(含50%甲酰胺)密封于杂交袋中42 $^{\circ}$ C预杂交1h,换含变性探针(40ng/ml)的杂交液,42 $^{\circ}$ C杂交过夜。次日42 $^{\circ}$ C洗膜。最后用抗地高辛配基碱性磷酸酶结合物(<DIG>-AP)催化底物NBT、BCIP显色,1~20h终止反应,蓝紫色斑点为阳性。

逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR) 以病人血清中提取的总核酸为模板,PCR下游引物

为逆转录引物,按逆转录试剂盒说明书进行逆转录合成cDNA。取5 μ l逆转录产物为模板,如上法作PCR扩增;同时对HN₉₈-RNA作RT-PCR为阳性对照,正常人血清总核酸作RT-PCR为阴性对照。

结 果

PCR标记产物鉴定 取10 μ l PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶(含0.5 μ g/ml EB)作水平电泳,在透射式紫外线发生仪上观察:对照扩增产物在305bp处有清晰单一的荧光条带;PCR标记产物在相当于400bp处也有一明亮的荧光条带(图1),表明扩增产物与模板大小相符。另取1 μ l PCR产物作系列稀释后点膜,用<DIG>-AP结合物检测扩增产物的DIG标记。图2之C表明1:2 $\times 10^8$ 稀释的PCR产物仍可检出DIG标记。

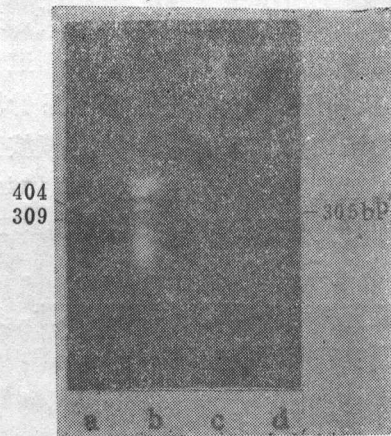


图1 PCR标记产物电泳

a. PCR标记产物 b. DNA分子量标记(PBR³²²/MspI)
c. 对照扩增产物 d. 305bpDNA片段

DEN₂-cDNA探针标记效果 依上法检测<PCR-DIG>、<RHP-DIG>探针、对照已标记DNA(试剂盒提供)的标记效果。图2示<RHP-DIG>探针浓度高于标记的对照DNA,<PCR-DIG>探针浓度高于<RHP-DIG>探针。

DEN₂-cDNA探针灵敏度 用不同含量的HN₉₈-RNA点膜分别与<PCR-DIG>探针、<RHP-DIG>探针和<PCR-Biotin>探针(PCR制

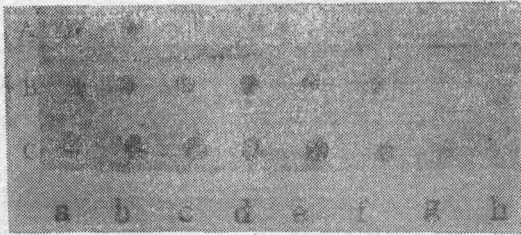


图2 DEN₂-cDNA 探针标记效果

A. 标记的对照DNA B. <RHP-DIG>探针

C. <PCR-DIG>探针 a~h: 1:2×10¹~1:2×10⁸(10倍系列稀释)

备的生物素探针)作cDNA-RNA杂交,可检出的HN₉₈-RNA最小量分别为0.1pg、0.3pg和1~3 pg(图3),可见<PCR-DIG>探针较敏感。

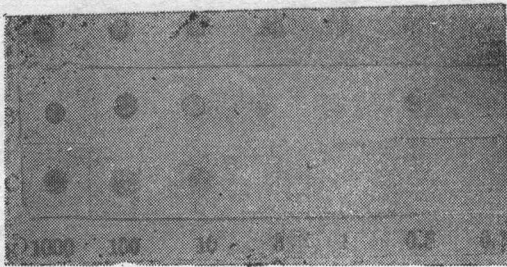


图3 DEN₂-cDNA 探针的敏感性

A. <PCR-DIG>探针 B. <RHP-DIG>探针

C. <PCR-Biotin>探针

(样品: HN₉₈感染C6/36细胞上清中病毒RNA)

地高辛配基标记的 DEN₂-cDNA 探针的特异性 <PCR-DIG>探针与 DEN₂ (NGC 和 HN₉₈) 感染的C6/36细胞培养上清及细胞中病毒 RNA、HN₉₈-RNA 及 DEN₂ 感染者血清的 RT-PCR 产物呈阳性杂交反应;而 DEN₁、DEN₃、DEN₄、JE的RNA, 正常C6/36细胞培养上清及 TE 缓冲液杂交后不显色, 无交叉反应, 显示地高辛配基标记的 DEN₂-cDNA探针具有DEN₂型特异性(图4)。

RT-PCR 与斑点杂交检测登革热病人血清中的病毒RNA 取10μl PCR产物用琼脂糖电泳鉴定, 结果如图5。在305 bp 处有明显荧光条带。RT-PCR产物与<PCR-DIG>探针呈强阳性杂交反应(图6), 提示扩增产物含 DEN₂特

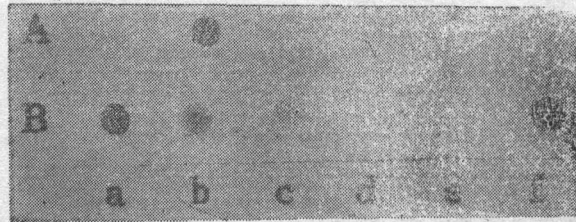


图4 DEN₂-cDNA 探针的特异性

A a. c. d. e. DEN₁, DEN₃, DEN₄, JE的RNA; A b. HN₉₈-RNA的RT-PCR产物; A f. TE对照; B a. HN₉₈-RNA; B c. NGC-RNA; B d DEN感染细胞中病毒RNA; B e. C6/36细胞培养上清; B f. 305bpDNA片段

异片段, 为 DEN₂ 感染。斑点杂交结果也表明 RT-PCR 结合核酸杂交易于以临床标本中快速检出微量的登革病毒RNA。

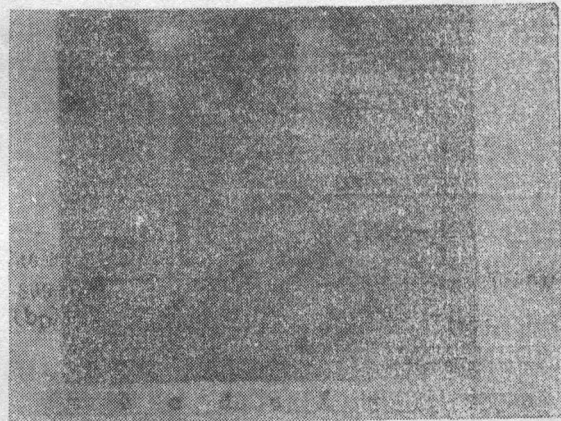


图5 RT-PCR产物琼脂糖电泳

a. DNA 分子量标记 (PBR³²²/MspI); b~g. 登革热病人血清的RT-PCR产物; h. 正常血清的 RT-PCR 产物; i. HN₉₈-RNA的RT-PCR产物

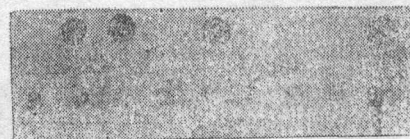


图6 RT-PCR产物的斑点杂交

a. DNA 分子量标记 (PBR³²²/MspI); b~g. 登革热病人血清的RT-PCR产物; h. 正常血清的RT-PCR产物; i. HN₉₈-RNA的RT-PCR产物

讨 论

地高辛配基(又称洋地黄毒苷配基)是从植物洋地黄中提取的固醇类半抗原物质,由一个较长的间臂共价结合到尿嘧啶环的5位上,构成地高辛配基标记物(DIG-11-dUTP),在PCR扩增时作为dTTP结构类似物掺入到DNA链中。由于掺入DIG-11-dUTP,其分子量比不含有DIG-11-dUTP的扩增产物大,故电泳时迁移速度相对较慢。

近年国外采用PCR法制备³²P标记,地高辛配基标记探针已有多篇报道^[1,2,5,6]。国内也有用PCR制备³²P标记探针的报道^[7],但未见用PCR技术制备地高辛配基标记的DEN₂-cDNA探针的报道。我们首次用PCR扩增DEN₂E基因第1~305位核苷酸片段制备地高辛配基标记探针获得成功,并用cDNA-RNA斑点杂交检测了DEN₂-RNA,鉴定RT-PCR产物,结果表明该探针具DEN₂型特异性,可检出0.1pg DEN₂-RNA,灵敏度高于³²P缺口翻译标记的DEN₂-cDNA探针(可检出1pg DEN₂-RNA)^[6]以及生物素标记的DEN₂-cDNA探针,配合RT-PCR易于快速检出临床标本中微量的DEN₂-RNA。

本文结果还表明,用PCR技术制备标记探针确比其他方法方便、快速、标记率高,PCR技术也适于制备其他标记探针用于临床检测,是值得推广使用的探针标记方法。

参 考 文 献

1. Schowalter DB, et al. The generation of radiolabeled DNA and RNA probes with polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1989;177:90
2. Lion T, et al. Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1990;188:335
3. Maniatis T, et al. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York: CSH Lab, 1989:1.25~1.28
4. Loparev VN, et al. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infection agents. *J Virol Methods* 1991;34:105
5. Lanzillo JL, et al. Preparation of digoxigenin-labeled probes by the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1990;8(6):621
6. Griffais R, et al. Synthesis of digoxigenin-labeled DNA probes by polymerase chain reaction: Application to Epstein-barr virus and chlamydia trachomation. *Res Virol* 1990;141:331
7. 周荣,等. 应用聚合酶链反应制备高比放³²P-HBV DNA 探针. *中华实验和临床病毒学杂志* 1991;5(3):344
8. Henchal EA, et al. Detection of dengue virus RNA using nucleic aci dhybridization. *J Virol Methods* 1987;15:187

(1992-07-05 收稿 1992-09-20 修回)

DETECTION OF DENGUE VIRUS RNA USING DIGOXIGENIN-LABELLED PROBE PREPARED BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Zhuang Jian Guo Huiyu Chen Huosheng

(Department of Microbiology)

The digoxigenin-labelled cDNA probe of dengue virus type 2 (DEN₂) was directly prepared by polymerase chain reaction (PCR). The recombinant plasmid PDE_{II}305 DNA inserted with a fragment of cDNA DEN₂ was used as template. A pair of specific primers was applied to prime the amplification of 305bp PDE_{II}305 cDNA. Digoxigenin-11-dUTP was incorporated into the synthesized DEN₂-cDNA. The DIG-labelled probe was used to detect dengue virus RNA by dot-blot hybridization. The results of cDNA-RNA hybridization show that the PCR-DIG-cDNA probe exhibits DEN₂ specificity and can detect as tiny as 0.1pg of DEN₂-RNA. The reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) coupled to nucleic acid hybridization with the PCR-DIG probe can rapidly detect minimal amount of dengue virus RNA from clinical serum specimens. The results suggest that direct preparation of DIG-labelled DEN₂-cDNA probe is much faster and simpler than preparation of the purified DEN₂ DNA by random hexanucleotide primer labelling. The method may have great value in generating labelled probe.

Key words digoxigenin; polymerase chain reaction; dengue virus; dot-blot