

乙肝病毒 PCR 产物的鉴定及单项抗 HBc 阳性血清的 HBV 基因扩增*

吕 凌** 姚集鲁 彭文伟 黄仰甦

(中山医科大学附属第三医院传染病科; 广州, 510630)

提 要 本文报道 HBV 基因扩增产物的限制性酶切分析和寡核苷酸探针杂交鉴定、应用血清 HBV DNA 的 PCR 扩增产物制备基因探针和单项抗 HBc 阳性血清的 HBV 基因扩增。PCR 用 adr、adw、ayw 3 种亚型 HBV 的 C 基因区共有序列为内外两对引物分单次或套式扩增, 产物为 664bp 或 428bp, 两者序列中段共含一 Bgl I 酶切点并与一寡核苷酸探针同源。428bp 产物被用以缺口平移标记³²P 探针作斑点和转印杂交检测。结合分子杂交的 PCR 结果从单项抗 HBc 阳性的 8/42 例慢性肝炎和 2/12 例无症状受测者血清中检出 HBV DNA, 证实病毒低度复制和传染性。

关键词 多聚酶链反应; 分子杂交; 乙型肝炎病毒; 脱氧核糖核酸

中图分类号 R512.62; Q523.1

检出血清乙型肝炎病毒(HBV)DNA 提示病毒复制、肝病活动和传染性。分子杂交检测 HBV DNA 的低限是 0.1pg 或 10⁵ 个毒粒^[1], 多聚酶链反应(PCR)由于将病毒基因组的一个区段进行几何级数扩增, 故灵敏度提高至 ag 水平, 相当于 3~5 个毒粒^[2]。本文报道 3 个方面的有关研究: ① HBV 基因扩增产物的限制性酶切分析和寡聚核苷酸探针杂交鉴定。② 应用 HBV 基因扩增产物制备 DNA 探针。③ 单项抗 HBc 携带者血清的 PCR 研究。

1 材料与方 法

1.1 单项抗 HBc 阳性病例

均为本科住院或门诊就医的 42 例慢性肝炎病人和 12 例无症状查血者。RIA 检测 HBsAg 和抗 HBs、ELISA 检测 HBeAg 和抗 HBe、斑点杂交检测血清 HBV DNA 均阴性, ELISA 检测抗 HBc 阳性。

1.2 HBV 基因引物

设计序列后委托中国科学院上海细胞生物研究所合成。序列(图 1)均为 HBV 之 adr、adw 或 ayw 3 种亚型基因组 C 基因区共有的保守序列^[3], 在 HBV 基因组中呈嵌套式间隔, 既可作嵌套式 PCR, 又可作寡聚核苷酸探针杂交, 以提高 PCR 的敏感性与特异性。C₁和 C₂为内引物, 可扩增 DNA 长 428bp, C₃和 C₄为外引物, 可扩增 DNA 长 664bp。两对引物的扩增产物共含 1 个 Bgl I 限制性酶切点, 酶切后 664bp 产物产生 406bp 和 254bp、428bp 产物产生 299bp 和 125bp 各 1 个限制性片段。C₅为设计的寡聚核苷酸探针序列, 基因位置处于所扩增基因区段的中间。

1.3 PCR 扩增

同文^[4]。嵌套式 PCR 第 1 次用引物 C₁和 C₂, 模板为萃取之血清 DNA; 第 2 次用引物 C₃和 C₄, 模板为 5μl 第 1 次 PCR 产物。防污染措施按文^[5]要求进行。

1.4 限制性酶切分析

* 本课题获广东省科研基金资助

** 第一作者, 36 岁, 男, 副研究员

PCR 产物酚提取后以 Bgl I (BRL) 37°C 酶切2h。

1.5 Southern 转移杂交
同文^[6]。

1.6 PCR 产物制备探针
血清 HBV DNA 以 C₁和 C₂引物扩增,产

物经 Bgl I 酶切和 C₃探针杂交鉴定、用低熔点琼脂糖凝胶电泳分离、NACS·PREPAK™ 微柱层析纯化和³²P 缺口平移标记。

1.7 斑点杂交
同文^[7]。

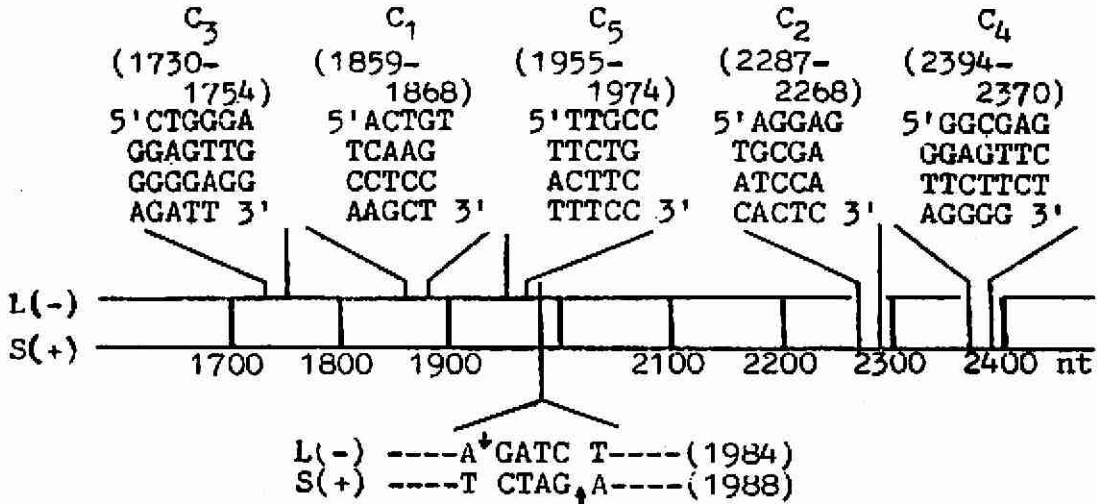


图1 HBV 基因引物与探针系统

2 实验结果

2.1 HBV 基因扩增产物的限制性酶切分析和寡聚核苷酸探针杂交鉴定

用 C₁/C₂引物扩增的 PCR 产物经或不经 Bgl I 酶切后在 EB/UV 下拍摄的电泳结果示图2。可见未酶切的产物为单一的核酸带(第2、4、5和7电泳道),与123bp 的 DNA 分子量标准(BRL)参比,位于492bp 和369bp 标准带之间,与由引物推算的预期产物428bp 大小一致。经 Bgl I 酶切后(第1和8电泳道)产生3条带。最小者靠近123bp 标准带,第2条带位于369bp 和246bp 标准之间,分子量分别推算为125bp 和299bp,是428bp 扩增产物酶切后产生的两个限制性片段。此外,在428bp 位置还有较淡的1条带,是属于不被酶切者,可能是扩增过程中 FD 耐热性 DNA 多聚酶

识别模板错误导致碱基错掺(mis-incorporation),从而使扩增产物丧失特异性酶切位点。



图2 以引物 C₁/C₂扩增的产物之酶切鉴定
M, 123bp 的 DNA 分子量标准

将图2的 DNA 电泳模式 Southern 转印至尼龙膜后与³²P5' 末端标记的 C₃探针杂交,结果示图3。可见未经酶切的4个电泳道的 PCR 产物全部在428bp 原位放射显影,而酶切后的2个电泳道的 PCR 产物都只有299bp

位置显影,125bp 位置不显影,这是由于前者含有而后者不含有与 C₃探针同源的 DNA 序列。至于因碱基错掺致不能酶切的 DNA 带,可能由于量相对较少,因此,杂交信号太弱,故尔很难辨见显影。

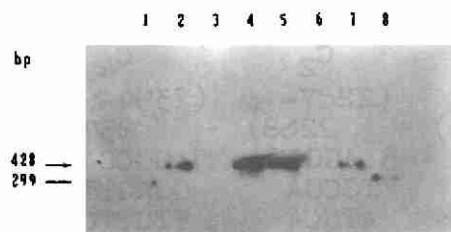


图3 以引物 C₁/C₂扩增的产物之杂交鉴定



图4 以引物 C₃/C₄扩增的产物之酶切鉴定
M,123bp 的 DNA 分子量标准

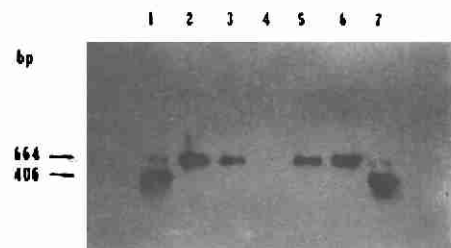


图5 以引物 C₃/C₄扩增的产物之杂交鉴定

以 C₃/C₄引物扩增的 PCR 产物经或不经过 Bgl I 酶切后在 EB/UV 下拍摄的结果示图4。可见未酶切的产物(第2、3、5和6电泳道)电泳位置位于738bp 和615bp 标准带之间,与预期产物664bp 大小一致。经 Bgl I 酶切后(第1和7电泳道)也产生3条带,最小者靠近246bp 标准带,第2条位于492bp 和369bp 标

准带之间,分子量推算分别为406bp 和254bp,这是664bp 扩增产物酶切后产生的两个限制性片段。此外在664bp 位置也有1条非常淡的 DNA 带,可能也属碱基错掺所致的酶切扩增产物。

将图4的 DNA 电泳模式与 C₃探针作 Southern 转印杂交,其结果示图5。可见未酶切的664bp 产物全部显影,而抗酶切的664bp 产物也淡淡显影。酶切产生的两个限制性片段则只有406bp 位置显影,而254bp 位置不显影,原因也是前者含有而后者不含与 C₃探针同源的 DNA 序列。

2.2 PCR 扩增产物制备的 HBV DNA 探针用于分子杂交检测同源序列

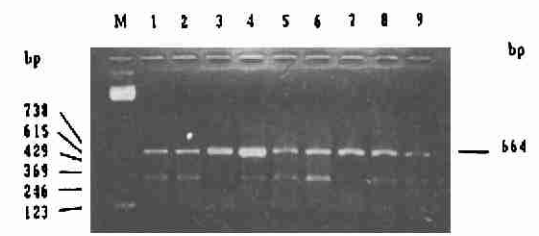


图6 C₃/C₄引物扩增的血清 HBV 基因

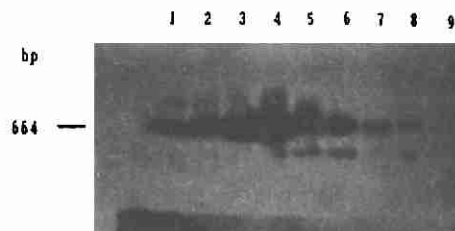


图7 应用 PCR 探针 Southern 转移杂交检测结果

2.2.1 Southern 杂交检测结果 图6的664bp 扩增带同图4,另外在369bp 和246bp 之间还有另1条带,可能是模板 DNA 存在 DNA 复制断裂热点所产生的亚长度特异扩增片段^[8]。与428bp 产物制备的探针杂交,结果(图7)全部664bp DNA 带和部分 EB 深染的亚长度特异扩增片段杂交显影。因此,428bp 的探针与664bp 的产物两者通过类似

于嵌套式 PCR 的原理而相互证实其特异性。

2.2.2 斑点杂交结果 以 HBsAg 和 HBeAg 双阳性血清分别用 428bp 产物制备的探针和同法标记的克隆 HBV DNA 探针进行斑点杂交,结果(图8)两者相当。

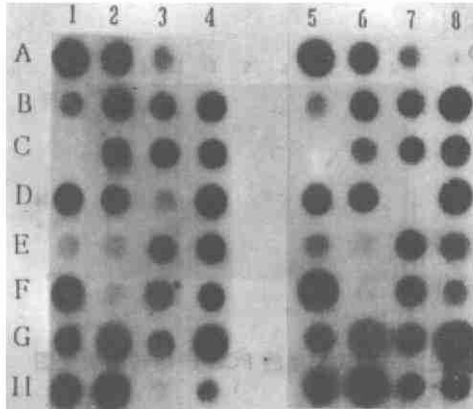


图8 斑点杂交结果

左,PCR 产物探针杂交结果;右,克隆基因探针杂交结果,A₁和 A₁₁阴性对照,B₁和 B₁₁阳性对照,其余均为待测血清

2.3 单项抗 HBc 阳性血清的 HBV 基因扩增

2.3.1 应用外引物进行单次 PCR 扩增 图9示8例单项抗 HBc 阳性慢性肝炎患者的血清以 C₃和 C₁引物扩增的产物电泳结果。可见第1、4、5和6电泳道各有1条664bp 的扩增带,并在 Southern 杂交图(图10)上全部显影。其中第1和5电泳道条带单一,而第4和6电泳道却连有涂抹状显影,后者可能是不规则长度的特异扩增。

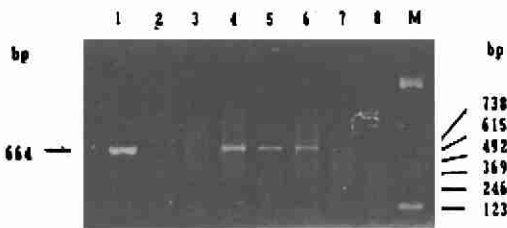


图9 外引物单次扩增的 PCR 产物电泳图

M:123bp 的 DNA 分子量标准

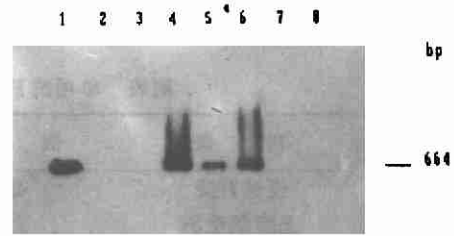


图10 外引物单次扩增的 PCR 产物转印杂交图

2.3.2 应用内引物进行单次 PCR 扩增

对图9同样血清用 C₁和 C₂引物扩增,产物电泳结果示图11,可见第1~7电泳道均有428bp 预期扩增带。与图9相比,外引物扩增阴性的4份样本,内引物扩增3份阳性(第2、3和7电泳道)。转印杂交结果(图12)也是这样。因此可以认为,内引物扩增灵敏性高于外引物。



图11 内引物单次扩增的 PCR 产物电泳图

M:123bp 的 DNA 分子量标准

2.3.3 嵌套式 PCR 扩增

对图9中4份无664bp 扩增带的 PCR 产物用内引物再作嵌套式扩增,其产物电泳结果(图13)均示有428bp 扩增带,但伴有一些非特异扩增。Southern 杂交结果(图14)则鉴定了该扩增带的特异性。

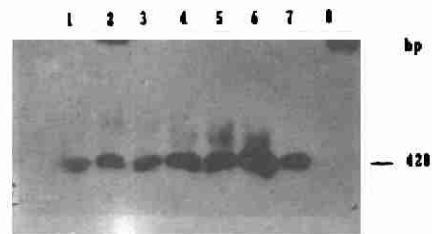


图12 内引物单次扩增的 PCR 产物转印杂交图

2.3.4 54例血清的 PCR 检测情况 见附表。

附表 单项抗 HBc 阳性血清的 HBV DNA 检测结果

对象	例数	HBV DNA 阳性数 %
慢性肝炎	42	8(19.1)
无症状受测	12	2(16.7)

限制性内切酶能识别双股 DNA 链上的一些特殊序列,通常是呈双斜对称排列的4~6个碱基对,并能在轴对称或斜对称位置选择性切开每股 DNA 链上这一特殊序列中的一个特定磷酸二酯键,由此造成 DNA 双链断裂。内切酶的这一限制性用以鉴定 DNA 的特定序列,相比分子杂交而言,更为简单快速且方便应用。

3 讨论

分子杂交检出血清 HBV DNA 提示病毒复制、肝病活动和传染性。杂交阳性通常伴有 HBeAg 存在,尽管一些 HBV 有变异者 HBeAg 可能不分泌^[9]。杂交检测 HBV DNA 的低限是0.1pg 或10⁵毒粒,仍未达到最低血清感染水平^[11]。PCR 由于将病毒基因组的一个区段进行几何级数扩增,故其检测灵敏度提高至 ag 水平,相当于能检出血清中的3~5个毒粒^[2]。不惟敏感性高而且特异性也强。在所加引物的引导和限定下,扩增产物与模板上的目的基因互补,序列长短也与模板上的两条引物的基因间距相等,再以一条位置处于所扩增区段中间的寡聚核苷酸探针序列杂交,鉴定了扩增产物与目的基因的同源性。

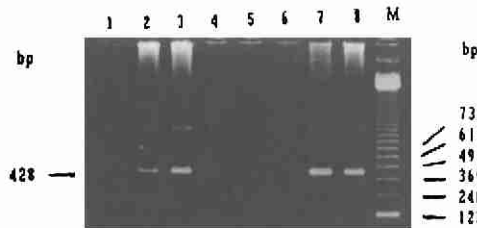


图13 套式扩增的 PCR 产物电泳图 M;123bp 的 DNA 分子量标准



图14 套式扩增的 PCR 产物转印杂交图

最初制备 HBV DNA 探针是提取 Dane 颗粒 DNA,后者的不完整 S(+)股以颗粒所含的 DNA 多聚酶修复,其中掺入³²P 标记探针。后来 HBV 基因克隆成功,因此成为制备分子探针的 DNA 来源。尽管用以标记探针的方法有多种,但应用最多的还是³²P 缺口平移标记。该法被用以标记血清的病毒基因扩增产物制备 HBV DNA 探针,这是一个新的尝试。优点是基因来源方便,纯化制备简单,适于基层单位开展。应用结果表明,该种探针不论是斑点杂交还是 Southern 杂交检测同源序列,效果与同法标记的克隆基因探针相若。

血清 HBV 毒粒同病毒抗原的相关性^[10]表现为①HBsAg 和 HBeAg 双阳性时血清毒粒 > 10⁶/ml;②HBsAg 阳性而 HBeAg 阴性时血清毒粒介于 10⁴~10⁵/ml 之间;③HBsAg 和 HBeAg 均阴性时血清毒粒 < 10²/ml。应用 PCR 检出单项抗 HBc 阳性者中8/42例慢性肝炎和2/12例无症状受测者的血清 HBV DNA,反映了③这种情况。这是一种能引致进行性轻微肝炎活动的低水平 HBV 感染,由于病毒滴度太低,因此常规方法不能测

出。当然也应考虑以下可能:(1)体细胞裂解,胞内 HBV DNA 释放;(2)HBV 基因变异,抗原不表达或被修饰;(3)PCR 带转污染。关于(1),已有研究表明,肝和肝外组织均有 HBV DNA 整合^[11],而且在 HBsAg 被清除的慢性 HBV 感染者的循环血细胞中依然还有染色体外形式的非复制状态的 HBV DNA 存在^[12~13]。关于(2),目前发现某些 HBV 感染个案会发生病毒基因突变,受累基因有 S 区^[14]、前 C 区和 C 区^[9],因此会出现相应的抗原表达异常。以上两种情况就本文目前的情况而言还较难确定。至于(3),采取了严格的防带转污染措施并设置多层阴性对照加以防范。

参 考 文 献

- Prince AM, Stephan W, Brotman B. β -propiolactone/ultraviolet irradiation: a review of its effectiveness for inactivation of viruses in blood derivatives. *Rev Infect Dis*, 1983,5:92
- Ulrich PP, Bhat RA, Seto B, et al. Enzymatic amplification of hepatitis B virus DNA in serum compared with infectivity testing in chimpanzees. *J Infect Dis*, 1989,160:37
- Ono Y, Onda H, Sasada R, et al. The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA: subtype adr and adw. *Nucleic Acids Res*, 1983; 11:1747
- 吕 凌,姚集鲁,彭文伟,等. 多聚酶链反应检测血清 HBV DNA. *中山医科大学学报*, 1992,13(3):44
- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 1989, 339:237
- 吕 凌,姚集鲁,罗章炎,等. 电泳印迹技术研究肝癌的乙型肝炎病毒 DNA 分子状态. *中华实验与临床病毒学杂志*, 1992,6:390
- 吕 凌,姚集鲁,彭文伟,等. 随机引物引导的乙型肝炎病毒 DNA 探针标记与重复杂交. *中山医科大学学报*, 1993, 13(2):21
- Chou Q, Russell M, Birch DE, et al. Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20:1747
- Brunetto MR. Identification of HBV variants which cannot produce precore-derived HBeAg and may be responsible for severe hepatitis. *Ital J Gastroenterol*, 1989, 21:151
- Di Bisceglie AM, Waggoner JG and Hoofnagle JH. Hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in liver of chronic carriers: correlation with serum markers and changes associated with loss of hepatitis B e antigen after antiviral therapy. *Gastroenterology*, 1987, 93:1236
- Brechot C, Degos F, Lugassy C, et al. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med*, 1985, 312:270
- Pasquinelli C, Laure F, Chatenoud L, et al. Hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells: a frequent event in hepatitis B surface antigen positive and -negative patients with acute and chronic liver disease. *J Hepatol*, 1986, 3:95
- Mason A, Yoffe B, Noonan C, et al. Hepatitis B virus DNA in peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis B after HBsAg clearance. *Hepatology*, 1992, 16:36
- Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet*, 1990, 2:325

(1993-04-05 收稿 1993-10-21修回)

AMPLIFICATION AND DETERMINATION OF HEPATITIS B VIRUS SEQUENCES IN SERUM POSITIVE TO ANTI-HBc AND THE NICK TRANSLATION TO GENERATE DNA PROBE

Lu Ling Yao Jilu Peng Wenwei Huang Yangsu

(Department of Infectious Diseases The 3rd Affiliated
Hospital Sun Yat-sen University of Medical Sciences. Guangzhou, 510089)

Four oligonucleotides from the C ORF of the HBV genome and co-conserved by adr, adw and ayw subtype were used as paired or nested primers in polymerase chain reaction to amplify HBV DNA in serum characterized by a single marker anti-HBc positive. Two products one 428 bp another 664 bp, were determined, both sharing a Bgl I restrictive site and homologous to a ^{32}P labelled oligonucleotide probe. By this technique HBV DNA was detected in 8 out of 42 chronic hepatitis and 2 out of 12 healthy carriers.

Key words polymerase chain reaction; molecular hybridization; hepatitis B virus; deoxyribonucleic acid