

· 技术交流 ·

电泳印迹和分子杂交技术在肝内 HBV DNA研究中的应用

吕 凌 姚集鲁 彭文伟

(附属第三医院传染病科)

提 要 应用DNA电泳转移、生物素探针 Southern 杂交及不同探针重复杂交等3项新技术研究肝炎肝癌的肝内 HBV DNA 分子状态。经过方法学比较以电泳印迹取代毛细渗吸法对65例肝炎肝癌病人的101份肝内组织DNA进行尼龙膜快速转移和HBV DNA杂交,结果检出HBV DNA分子状态呈整合型15份、游离型31份、整合型合并游离型30份。其中12例乙型肝炎标本为经生物素探针杂交检测,结果全部检出游离型HBV DNA。还有3例乙型肝炎标本和2例其它肝炎标本为经重复杂交检测,即先用³²P探针杂交继去探针再用生物素探针杂交,结果乙型肝炎标本两次杂交 HBV DNA 都阳性,其它肝炎标本两次均阴性。阳性者表现为3.2kb和2.3kb电泳位置呈现杂交带,代表HBV之松弛环状和超螺旋状结构。由于两种探针各含不同序列,故结果可对待检基因进行初步序列分析。本实验表明,上述3项技术对临床医学研究有广泛的应用价值。

关键词 电泳印迹; 分子杂交; Southern 转移; 生物素; HBV DNA

中图分类号 R 512.62; R 362

Southern 转移是将 DAN 由凝胶转移至滤膜的技术,是 DNA 组份分析和研究表达的基本手段。传统方法是毛细渗吸法(capillary transfer),但它转移效率低、费时长且 DNA 条带模糊^[1]。后来有人发展了电泳印迹法(electrophoretic transfer),该法不仅克服了上述缺点,而且操作也大为简化,故渐已取代渗吸法而被应用^[2]。探针杂交是对含样滤膜进行 DNA 检测的过程。目前国内研究肝炎已能制备多种探针,不过,用于 Southern 杂交者仅限于同位素³²P 标记的探针,生物素探针还只用于斑点杂交^[3~5]。至于DNA转移,目前仍沿袭渗吸法。我们在研究肝病的 HBV DNA 分子状态的过程中,应用了以下几种新技术,现报告如下。

材 料 与 方 法

组织标本来源、DNA提取、酶切、电泳和探针标记及杂交方法同前文^[3,4]。组织DNA渗吸转移方法按 Southern 文方法^[1]进行。

DNA 电泳印迹 将 DNA 电泳凝胶裁至相应大小,先后浸于0.2mol/L NaOH、0.5mol/L NaCl中变性10分钟,5×TAE 中中和10分钟两次,1×TAE中浸泡10分钟1次。然后用相应大小之Zeta-probe (Bio-Rad)尼龙膜紧贴凝胶铸孔背面一同夹于4层滤纸,再夹于双层海绵垫及双层密孔垫板中作成转移三明治(sandwich),后者垂直插入电泳转移槽的凹痕中对TAE溶液在4℃、40mV/100mA条件下电泳6小时。方向为凝胶在负极、尼龙膜在正极。电泳完毕取出尼龙膜用2×SSC轻洗后凉干,80℃烤2小时固定DNA备作杂交。

重复杂交 上法印迹之尼龙膜先用³²P标记的HBV DNA S基因探针(1.4kb)按文^[4]法杂交和放射自显影;后作下处理:0.4mol/L NaOH 42℃洗30分钟以除去探针,0.1×SSC、0.5%SDS、0.2mol/L Tris pH7.5 42℃洗30分钟以中和碱液。然后再用生物素标记的HBV DNA C基因探针(1.8kb)按文^[3]法杂交和显色。

结 果

电泳印迹与渗吸印迹结果比较 电泳印迹法杂交结果显示 DNA 条带明晰, 背景光洁。而渗吸法印迹结果 DNA 条带有些模糊且背景不洁。

电泳印迹实际应用 见附表。

附表 用 DNA 电泳印迹研究HBV DNA 分子状态结果

肝内组织	检测例数	HBV DNA 分子状态			阳性合计
		整合	整合合并	游离	
肝癌癌灶	32	12	8	2	22
肝癌近邻	33	2	16	9	27
肝癌远邻	7	1	3	0	4
乙型肝炎	22	0	3	19	22
其它肝炎	7	0	0	1	1
合 计	101	15	30	31	76

生物素探针 Southern 杂交 表中乙型肝炎有12例标本为生物素探针杂交检测, 结果全部检出游离型 HBV DNA; 其它肝炎 7 例全部亦为生物素探针检测, 结果仅 1 例检出游离型 HBV DNA。杂交探针序列为 C 基因片段。

重复杂交 表中有 3 例乙型肝炎和 2 例其它肝炎为重复杂交检测, 结果乙型肝炎 3 例都为 HBV DNA 重复阳性, 其它肝炎都阴性。阳性 2 例有 3.2kb 和 2.3kb 位置两条杂交带, 1 例只在 3.2kb 有 1 条杂交带, 代表游离型 HBV DNA 的松弛环状和超螺旋状结构。

讨 论

以前 DNA 杂交采用液相法, 检测通过液闪测定比放进行。1975年 Southern 创立渗吸印迹法, 将电泳后的 DNA 转移至硝酸纤维素膜上杂交。这一方法保留了 DNA 原来的电泳模式, 很快成为 DNA 分析和基因研究的基本技术^[1]。1981年 Shafritz 和 Kew 始用该技术研究组织 HBV DNA^[6]。其原理是通过滤纸毛细渗吸作用析出凝胶DNA, 后者经过高浓度盐离子作用与滤膜微孔之硝化基团共价结合而在滤膜上印迹。由于毛细过程缓慢、作用微弱, 故

整个操作需时较长(24小时)且很繁复, 时常效果欠佳。1985年 Reed 基于此发展了电泳印迹法, 原理同上, 只是以低压电场取代毛细渗吸, 以尼龙膜取代硝酸膜, 因而转移时程缩短(6小时), 操作简化。尤其是尼龙膜机械强度高、核酸载量大、核酸结合力强且能结合低分子量寡核苷酸片段以及在低浓度盐离子条件下同样有效, 因而明显增强转移效果, 提高分辨率与灵敏度, 成为 Southern 转移的最具代表性的改良技术^[2]。但国内还很少应用。特别是肝炎研究领域至今仍袭用渗吸法。我们应用这一新技术并与渗吸法相互比较, 结果两者同样行之有效, 但电泳印迹效果更好。既节省时间和材料且结果也更为明晰清洁。因此我们用以取代渗吸法, 用于研究中结果比较理想。

DNA 印迹后就需用探针杂交检测同源序列。探针有同位素标记和非同位素标记两大类, 又以 ³²P 标记和生物素标记为代表, 对此我们有过研制和应用^[3,4]。在此之前, 国内有关 HBV DNA 的印迹杂交只限于用 ³²P 标记的探针进行, 生物素探针则未见有相应报道^[5]。但 ³²P 有诸多缺点, 多数单位不能展开, 而生物素则使用方便, 故易为接受。我们将生物素探针用于 Southern 杂交其目的是试图以此替代同位素探针并推广该技术在临床医学研究中的应用。

本文部分生物素探针所测滤膜曾经 ³²P 探针杂交, 故也有一定的应用意义。以前国内应用 HBV DNA 探针多为 1 张样膜只作 1 次性杂交, 很少有多次重复杂交的报道。研究 HBV DNA 分子状态通常在细胞或组织中进行。一般肝穿刺标本取材极少, 充其量只足作 1 次 Southern 印迹。仅杂交 1 次, 虽可判定有无病毒整合, 但仅仅只是粗浅的结果。如用不同序列的探针重复杂交, 则不仅可以进行序列分析, 而且还可作更深入的研究。反之, 探针序列相同但标记不同, 重复检测还可对结果进行反复验证, 以避免假阳性或假阴性出现。这样, 即使标本有限, 也可进行多方面的研究。从而使 Southern 杂交技术适应范围更广并为

在临床诊断中的普及应用提供条件。本文重复杂交先用探针含S基因(1.4kb),后用探针含C基因(1.8kb),标记不同,序列亦异,但两者加在一起即是一完整的HBV基因组(3.2kb)。检测相同的肝炎标本,结果一致,提示肝内的HBV DNA可能也是完整的基因组。事实上,3.2kb和2.3kb电泳位置的游离型HBV DNA都是完整的病毒基因组,只是一呈松弛环状,一呈超螺旋状结构从而使电泳迁移速率不同而已。可见重复杂交所得的初步序列分析结果与实际情况相符。

参 考 文 献

1. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503
2. Reed KC and Mann DA. Rapid transfer of DNA from agarose to nylon membrane *Nucleic Acids Res* 1985; 13:7207
3. 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
4. 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
5. 闻玉梅,等.93例乙型肝炎患者肝内病毒DNA的研究.中华医学杂志 1986; 66(9): 521
6. Shafritz DA and Kew MC. Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1981; 1(1):1
(1990-10-10收稿 1991-09-10修回)

APPLICATIONS OF ELECTROPHORETIC TRANSFER AND MOLECULAR HYBRIDIZATION IN THE STUDY OF HBV DNA IN LIVER

Lu Ling Yao Jilu Peng Wenwei

(Department of Infectious Diseases, the 3rd Affiliated Hospital)

Applications of electrophoretic transfer, rehybridization and Biotin-probe in Southern-blot were reported. Two methods, capillary and electrophoretic, were compared for DNA transfer, and the electrophoretic was selected due to its more clean DNA bands and clear background. By this method, 101 liver DNA samples from 29 patients with hepatitis and 30 with hepatocellular carcinoma (HCC) were analysed. The molecular status of HBV DNA was found to be in integrated form in 15, free in 31, and both in 30. Among the hepatitis samples, 12 were detected with Biotin-probe and 5 with ³²P-probe then Biotin-probe again. Free form of HBV DNA was pick up in all of the former and 3 of the latter. In the latter, all the positive showed a same pattern in both hybridizations which revealed HBV DNA bands at 3.2 kb and 2.3 kb where are the loose circle and the supercoiled HBV genome located. The rehybridization with different probes on a same nylon proved to be an easy way to sequence HBV DNA, for each probe used has a different sequence which can only be base-paired by its homology that makes it sequenced.

Key words Electrophoretic transfer; Molecular hybridization; Southern-blot; Biotin; HBV DNA