

¹²⁵I 标记乙型肝炎病毒 DNA 探针的制备及应用

钟雄林 王昌才 马维芳

(第一军医大学分子生物学实验室, 广州)

摘要 本文报道用国产 ¹²⁵I-碘化钠标记乙型肝炎病毒 DNA 制备探针, 可得到较高比度的产物, 一般稳定在 10^7 — 10^8 cpm/ μ g DNA。用该探针在不标记的乙型肝炎病毒 DNA 进行点分子杂交, 可检测到 5 pg 左右 DNA。对 17 例血液标本进行点分子杂交, 结果与 ³²P-标记乙型肝炎病毒 DNA 探针杂交结果基本一致。

关键词 ¹²⁵I-碘化钠; 乙型肝炎病毒 DNA; 分子杂交

乙型肝炎在全世界是一种传播广泛, 但治疗效果很不理想的传染病。临床诊断乙型肝炎常规方法有酶联免疫吸附试验, 免疫扩散, 放射免疫等, 在检测病毒方面, 这些都是一种间接方法, 不能直接估计病毒的水平。近年来随着分子生物学的迅速发展, 核酸杂交技术已应用于乙型肝炎临床的检测和理论研究。该技术具有灵敏度高, 能准确地检测乙型肝炎病毒 DNA, 对判断患者的传染性, 确定治疗方式及预后有重要作用。目前研究或临床应用的核酸探针基本上是应用缺口翻译法 ³²P-标记的乙型肝炎病毒 DNA^[1,2]。其优点是可获得较高比度的核酸探针。但该探针制备较复杂, 需多种酶催化, 价钱昂贵, 而且半衰期短, 在实际应用中很难推广。本文报道用国产 ¹²⁵I-碘化钠标记制备高比度乙型肝炎病毒 DNA 核酸探针, 及应用在检测血液中乙型肝炎病毒 DNA 的初步结果。

材 料 和 方 法

(一) 试剂

1. ¹²⁵I-碘化钠: 北京原子能所产品。
2. 十二烷基磺酸钠; 三氯化铋 (TlCl₃), 英国 BDH 产品。
3. Sephadex G-50; Pharmacia 产品, 进口分装。
4. 小牛胸腺 DNA, 本室提取。

5. 硝酸纤维素滤膜, 浙江黄岩化工厂产品。碘化钾、醋酸钠、2-巯基乙醇和醋酸氨均为国产。

(二) 含乙型肝炎病毒质粒 DNA 分离

分离方法基本按文献进行^[3]。收集带质粒菌体, 悬浮在 TEG 缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0; 10 mmol/L EDTA; 50 mmol/L 葡萄糖) 中, 每毫升加 2 mg 溶菌酶和 30 μ g 核糖核酸酶 (已 90℃ 30 分钟灭活脱氧核糖核酸酶), 冰浴后加氢氧化钠和十二烷基磺酸钠裂解细菌和变性染色体 DNA 及蛋白质。加入 3 mol/L 醋酸钠以沉淀变性染色体 DNA 和蛋白质。离心除去沉淀, 上清液用酚: 氯仿 = 1:1 (v/v) 抽提一次, 取水相用冷乙醇沉淀质粒 DNA。再经 Sepharose-2B 柱层析纯化。

(三) ¹²⁵I-碘化钠标记乙型肝炎病毒 DNA

参照 Getz 等^[4]的方法, 略加改进。乙型肝炎病毒 DNA 5 μ g 溶在 50 μ l 重蒸馏水中, 经 100℃ 变性后, 加入 10 μ l 2.5×10^{-4} mol/L 碘化钾; 10 μ l 1 mol/L 醋酸钠; 10 μ l 三氯化铋 (10 mg/ml); 1-2 mCi ¹²⁵I-碘化钠 (总反应体积 100 μ l), 放 70℃ 水浴保温 40 分钟, 冰浴 5 分钟。加入 0.7 ml 0.1 mol/L 醋酸氨及 4 μ l 2-巯基乙醇, 终止反应。然后通过用 TES 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5; 2 mmol/L

本工作承蒙南方医院传染科骆抗先教授及梁积森副教授的大力支持及提供血清样品, 在此一并致谢。

EDTA; 5mmol/L NaCl) 平衡过的 Sephadex G-50 层析柱 ($\phi 1 \times 25\text{cm}$)。上样后,用 TES 缓冲液洗脱,每管收集 1 ml。然后每管各取 1 μl 点于新华滤纸片上,凉干。用 γ -免疫计数器测脉冲数 (cpm),出现的第一个高峰值为标记 DNA 峰,第二个峰为游离碘。合并第一个高峰的洗脱液即为标记乙型肝炎病毒 DNA。

(四) DNA 分子杂交

1. 点样: 将标准乙型肝炎病毒 DNA 用蒸馏水稀释成几个不同的浓度,在 100°C 变性 10 分钟,然后加等体积 (DNA 溶液体积) 1N NaOH 彻底变性,用 0.5 体积 1N HCl 中和。用真空抽滤点样器点于硝酸纤维素滤膜,抽干后,放 80°C 真空干燥固定 2 小时。

2. 预杂交: 将硝酸纤维素滤膜置于塑料袋内,加入 $4 \times \text{SSC}$, $1 \times \text{Denhardt}$ 溶液 (0.02% 聚蔗糖; 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮; 0.02% 小牛血清白蛋白), $50 \mu\text{g/ml}$ 小牛胸腺 DNA, 50% 甲酰胺。密封后,放恒温振荡器中, 42°C 预杂交 10—15 小时。

3. 杂交: 取出少许预杂交液,加入经 100°C 5 分钟变性的 ^{125}I 标记乙型肝炎病毒 DNA, 最终浓度为 $10^5\text{--}10^6 \text{cpm}$ 。密封后,继续在恒温振荡器中 42°C 杂交 24 小时。

4. 漂洗: 杂交后将硝酸纤维素滤膜置于烧杯内。分别用 $2 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS 洗 2 次,每次 30 分钟; $2 \times \text{SSC}/0.5\%$ SDS 洗 4 次,每次 1 小时,最后用 $0.1 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS 漂洗 1 次。全过程均在 60°C 中振荡漂洗,以充分洗去未杂交的放射性物质。然后 80°C 干燥。

5. 放射自显影: 将硝酸纤维素滤膜用保鲜薄膜包好后,在暗室内膜的二边各夹一张 X 光胶片,放感光屏内,外面用黑纸包好,放 -30°C 冰箱自显影 24—48 小时。

结果和讨论

(一) 高比度 ^{125}I 标记乙型肝炎病毒 DNA 探针的制备

参照 Getz 等用三氯化铈作为催化剂的方法,应用国产 ^{125}I -碘化钠进行乙型肝炎病毒

DNA 标记。在标记反应终了后,用 Sephadex G-50 柱分离纯化分管收集,以除掉未反应的游离 ^{125}I , 结果如图 1 所示。第一个同位素高峰为标记的 DNA, 这和非同位素标记的冷实验 DNA 洗脱图谱 (图 2) 相同。合并第一个高峰洗脱液,平均比活可达 $10^7\text{--}10^8 \text{cpm}/\mu\text{g}$ DNA, 比文献报道高 1—2 个数量级^[9], 每批结果比较稳定。

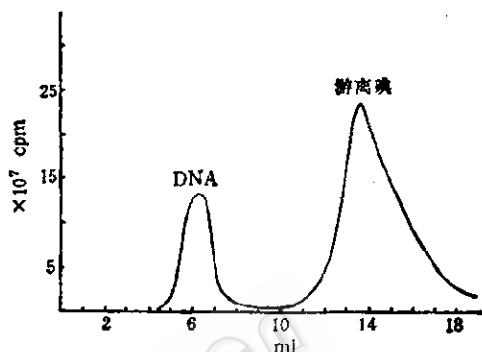


图 1 Sephadex G-50 柱分离标记 DNA

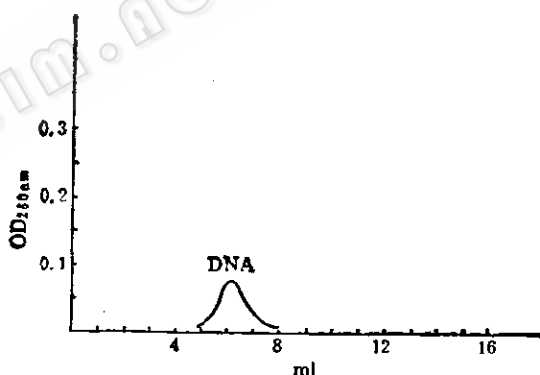


图 2 Sephadex G-50 柱 DNA 冷试验

我们用同样的方法和反应条件,对疟原虫 DNA 和肝脏总 RNA 进行标记,同样得到较高比度的核酸探针,比活稳定在 $10^7\text{--}10^8 \text{cpm}/\mu\text{g}$ DNA (或 RNA)。

(二) ^{125}I -乙型肝炎病毒 DNA 探针灵敏度试验

取标准乙型肝炎病毒 DNA 样品,经变性后在硝酸纤维素膜上分别点 $1 \mu\text{g}$ 、 500ng 、 50ng 、 5ng 、 500pg 、 50pg 和 5pg 七个不同浓度的 DNA 样品,用小牛胸腺 DNA 作对照。然后经杂交,漂洗,48 小时放射自显影。其结

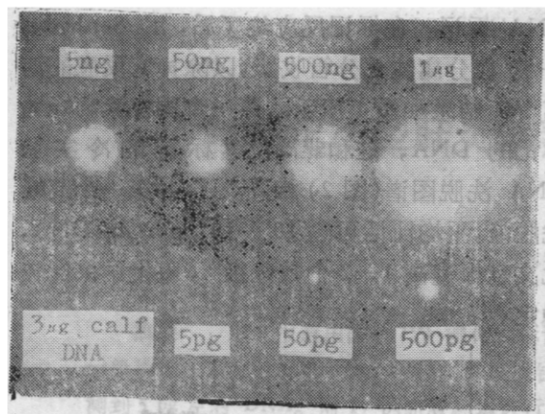


图3 ^{125}I -乙型肝炎病毒 DNA 探针灵敏度斑点杂交结果(图3)可以看出,在5 pg处斑点仍可清晰显示,而对照3 μg 小牛胸腺 DNA 处没有斑点出现。说明 ^{125}I -碘化钠标记的 DNA 探针,检测灵敏度可达5 pg DNA,可以代替 ^{32}P 标记探针。目前国内外一般文献报道用缺口翻译法 ^{32}P 标记 DNA 探针比度都在 10^8 cpm 以上。检测灵敏度约为1 pg 左右,虽然比用 ^{125}I 标记探针灵敏度高,但半衰期短,还要用酶催化,操作较复杂,费用较高,难以推广应用。因此, ^{125}I 标记探针就有一定实用价值了。

(三) 与 ^{32}P 标记物杂交结果的比较

我们取17例经过 ^{32}P 标记乙型肝炎病毒 DNA 探针杂交试验的血清样品(其中强阳性3例,弱阳性6例,阴性8例),分别抽滤点膜,变性后用 ^{125}I 标记乙型肝炎病毒 DNA 作探针,进行杂交,放射自显影。其结果与用 ^{32}P 标记乙型肝炎病毒 DNA 作探针杂交的结果基本一致(图4)。

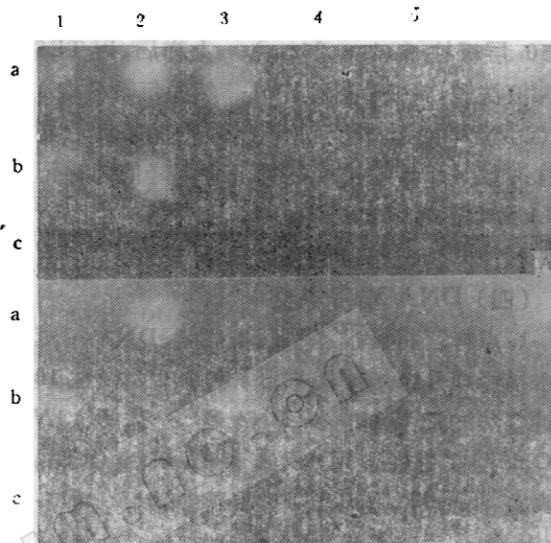


图4 血清样品用 ^{32}P 和 ^{125}I 标记探针杂交结果。
A: ^{32}P 标记探针杂交 B: ^{125}I 标记探针杂交

上述结果表明,应用 ^{125}I -碘化钠制备高比度的 DNA 探针,不仅价钱便宜,而且半衰期比 ^{32}P 长,完全可以代替 ^{32}P 。这一研究为制备 ^{125}I 标记的各种 DNA 探针进行检测,提供了可靠依据。

参 考 文 献

- [1] Weller. V. D., et al.: Journal of Medical Virology. 9: 273—280, 1982.
- [2] 杜绍财等: 上海免疫学杂志, 4(4): 229, 1984.
- [3] 王昌才、钟雄林: 第一军医大学学报, 5(2): 114—116, 1985.
- [4] Getz. M. J., et al.: Biochem Biophysic Acta. 287: 485—494, 1972.
- [5] 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>