文章编号:0253－3626(2003)01－0036－03

鸭乙型肝炎病毒核酸荧光定量 PCR 方法的建立及应用

陈压西,黄爱龙,齐珍元,郭树华

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:建立鸭乙型肝炎病毒核酸(DHBV DNA)荧光定量的方法。方法:根据 DHBV DNA S 基因区的序列设计扩增所需 3 条引物,通过偶联反应用 AmpliSensor 荧光信号标记半巢式引物,经过前期不对称扩增、半巢式扩增及在线检测建立 DHBV DNA 阳性标准品 QPCR 的标准曲线,并将 70 份鸭血清分别用荧光定量 PCR 方法和地高辛标记的 DHBV DNA 探针斑点杂交的方法检测,比较结果的相关性。结果:DHBV DNA 阳性标准品经过 30 次循环后,扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,可以看出有 180bp、70bp 两个片段,与设计的片段大小相符,扩增产物的浓度与标准品的起始浓度成正比,扩增指数的数值大小与该循环时已合成的扩增产物的量成正比,起始浓度的大小与要合成的一定扩增产物的量所需的循环次数成反比。用荧定量 PCR 方法和斑点杂交的方法检测血清中 DHBV DNA 的结果有良好的相关性($r=0.97, P<0.01, \nu=58$)。结论:荧光定量 PCR 方法可作为检测 DHBV DNA 含量的一个重要手段。

【关键词】鸭;乙型肝炎病毒;荧光定量 PCR

【中国图书分类法分类号】R512.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－04－09

Establishment and application of the method for detecting DHBV DNA with fluorescence quantitative PCR

CHEN Yaxi, et al

(*Institute of Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To establish the method for detecting duck hepatitis B virus (DHBV) DNA using fluorescence quantitative PCR. *Methods*: Three primers derived from DHBV DNA S gene were designed. The semi－nested primer was labelled by AmpliSensor using coupling reagent. The standard curve of the positive standards of DHBV DNA was established after asymmetric preamplification, semi－nested amplification and on－line detetion. 70 samples of duck serum were tested by fluorescent quantitative DHBV DNA PCR method and dot blot hybridization assay using digoxigenin－labelled DHBV DNA probe. The correlation of results between the two methods was analysed. *Results*: After 30 cycles, amplification products showed two bands about 180bp and 70bp by 2% agarose gel electrophoresis. The concentration of amplification products was in direct proportion to the initial concentration of the positive standards. The magnitude of detection index was in direct proportion to the amount of amplification products accumulating at the current cycle. The initial concentration of the positive standards was inversely proportional to the number of cycles needed for the amount of amplification products. The correlation coefficient of results was 0.97 ($P<0.01$) between fluorescent quantitative PCR method and dot blot hybridization assay. *Conclusion*: Fluorescence quantitative PCR can be used as a method to detect DHBV DNA.

【Key words】 Duck; Hepatitis B virus; Fluorescence quantitative PCR

与人乙型肝炎病毒(HBV)一样,鸭血清中的 DHBV DNA 是病毒复制活动最直接和可靠的标志。通过检测血清中肝炎病毒核酸的含量,可以分析病毒在体内的复制活动情况,从而为研究病毒性肝炎的发病机理,评价和预测抗病毒药物的疗效提供重要依据。然而,如何进行准确、客观的肝炎病毒核酸定量,是我国乃至全世界研究肝病的工作者致力于研究的热点及难点。目前,应用荧光定量 PCR 方法进行 HBV DNA 的定量检测已在临床开始应用[1－3],而对于鸭乙型肝炎病毒 DNA 的定量研究,国内外尚无文献报道。

1 材料和方法

1.1 材料

作者介绍:陈压西(1969－),女,副研究员,硕士,主要研究方向:病毒性肝炎发病机理与治疗。

基金项目:重庆市教委科学技术研究项目基金(编号:000101)。

1.1.1 通用 AmpliSensor 标记试剂盒，购于美国 Biotronics 公司。

1.1.2 DHBV DNA PCR 扩增所需三条引物参照 DHBV DNA S 基因区的序列设计如下，5′－tggcctaatcggattactgg－3′(20bp)限量引物(上游引物)；5′－cctgggcatccccacgggcagg－3′(22bp)过量引物(下游引物)；5′－gggacgcgcgctttccaagatactg－3′(25bp)半巢式引物。合成于上海生物工程公司。

1.1.3 TaqDNA 多聚酶，购于德国罗氏公司。

1.1.4 血清标本中提取 DNA 试剂盒购于德国罗氏公司。

1.1.5 96 孔加热块 PCR 仪、AG－9600Analyzer 荧光光度计、ASAP 专用数据软件，购于深圳百雅克泰公司。

1.1.6 含鸭乙肝病毒留置血清(本所提供)。

1.1.7 DHBV DNA 阳性标准品系克隆有 DHBV DNA 全基因序列的 pBR325 质粒经 EcoRI 酶切、低融点琼脂凝胶回收 DHBV DNA 全序列，再经紫外分光光度计定量，系列稀释成 6 个梯度 $2.76\times10^{6}\sim2.76\times10$ 拷贝/μl。

1.2 方法

1.2.1 QPCR 方法的建立

1.2.1.1 连接反应 应用通用 AmpliSensor 标记试剂盒进行偶联反应标记半巢式引物(即 5×AmpliSensor 引物浓缩液)，5×偶联试剂 10μl，5×通用荧光信号 10μl，半巢式引物 0.5μg 加水至 50μl；37℃ 孵育 90min，加 50μl 水后 90℃ 加热 5min 灭活酶，以终止反应。

1.2.1.2 接反应后的效果测算 分别设定 2 孔样品(每孔含 5×AmpliSensor 引物浓缩液 1μl 和 1×PCR 缓冲液 4μl、5μlPCR 延伸反应液)、2 孔阴性对照(每孔含 5×AmpliSensor 引物浓缩液 0.1μl 和 1×PCR 缓冲液 4.9μl、5μlPCR 延伸反应液)作为本底信号对照、2 孔标准品(每孔含 5×AmpliSensor 引物浓缩液 0.1μl 和 1×PCR 缓冲液 4.9μl、5μlPCR 延伸反应液)作为最大能量传递的参照、2 孔空白对照(每孔含 H_2O5μl 和、5μlPCR 延伸反应液)经 94℃ 20s，55℃ 20s，72℃ 30s，再于 20℃ 30s 平衡信号。读取荧光值作为基本读数。在样品孔和标准品孔中各加入 1μ 的 TaqDNA 多聚酶经 94℃ 20s，55℃ 20s，72℃ 30s，运行 3 个循环，再于 20℃ 30s 冷却，比较延伸反应后样品与标准品相对荧光增强的读数，就可估测偶联的效果。

1.2.1.3 前期不对称扩增 扩增的理论片段长度为 182bp。在 1.5ml 离心管中加入以下试剂，配备 PCR 主反应液 10×PCR 缓冲液 110μl，40mmol/L $MgCl_2$ 110μl，10×dNTP 110μl，10×过量引物 110μl，10×限量引物 110μl，加水至 880μl 可做 100 次反应。设立阴性孔(5μl 水)、峰值孔、标准品孔(5μl 不同梯度的阳性标准品)、样品孔(5μl 待测样品)，除峰值孔加 10μl 的 PCR 主反应液，其余孔各加 5μl PCR 主反应液，0.5U Taq 酶。按 94℃ 30s，55℃ 30s，72℃ 30s 程序运行 25 个循环，循环结束后再 72℃ 30s，20℃ 30s 冷却。

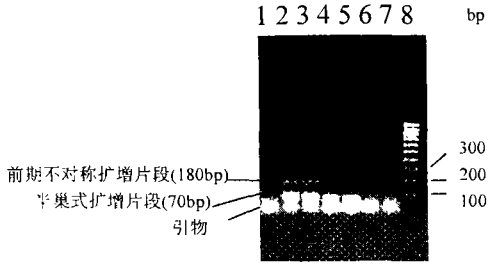
1.2.1.4 半巢式扩增及在线检测 扩增的理论片段长度为 70bp。在 0.5ml 离心管中配制 AmpliSensor 反应液(5×AmpliSensor 引物浓缩反应液 66μl，10×PCR 缓冲液 33μl，40mmol/L $MgCl_2$ 33μl，加水至 330μl)，每孔加入 5μl 的 AmpliSensor 反应液，经 94℃ 30s，55℃ 30s，72℃ 30s，再于 20℃ 30s 冷却以平衡信号。经 AG－9600Analyzer 应用标准模式读取荧光值，将此数据贮存为基本读数。按一定的循环数继续扩增，每 2 次循环读取荧光值，贮存为检测循环读数，应用 A-PAS 软件将每次读数转换为检测指数(Omega 指数)，检测指数的数值大小应该与该循环时已合成的扩增产物的量成正比。启动报告窗口，显示每个样品的定量数据。

1.2.2 用 QPCR、DHBV DNA 地高辛标记的探针经斑点杂交检测含 DHBV DNA 不同滴度的鸭血清 70 份。血清斑点结果用 Vuego Scan(Brisa－620ST)扫描仪进行胶扫描；用安发马西亚公司的 the Discovery Series Quantity One 软件对斑点进行定量分析，用斑点值表示，斑点值＝色强度×斑点面积(mm^2)。

2 结 果

2.1 通用 AmpliSensor 标记试剂盒进行偶联反应标记半巢式引物偶联的效果

检测指数 2 个样品孔为 424.79、551.28，偶联指标为“＋”，表示样品的连接反应的效果大于 70，可用来做不对称 PCR。



1. 阴性对照
2-7. DHBV DNA 阳性标准品(2.76×10^{6}-2.76×10^{1} 拷贝/μl)
8. 标准分子量

图 1 2%琼脂凝胶电泳检测不同浓度 DHBV DNA 阳性标准品 QPCR 的结果

2.2 DHBV DNA 阳性标准品 QPCR 的检测结果

DHBV DNA 阳性标准品 10 倍稀释 6 个梯度 $2.76\times10^{6}\sim2.76\times10$ 拷贝/μl，经过 30 次循环后，扩增产物经 2% 琼脂凝胶电泳检测，可以看出有 180bp、70bp 两个片段，与我们设计的片段大小相符。扩增产物的浓度与标准品的起始浓度成正比。见图 1。

2.3 DHBV DNA 阳性标准品 QPCR 的标准曲线

图 2 所示 DHBV DNA 阳性标准品 Std1－Std5

($2.76\times10^6\sim2.76\times10^2$ 拷贝/μl)扩增指数 Omega 值与循环次数的曲线，扩增指数的数值大小与该循环时已合成的扩增产物的量成正比。DHBV DNA 阳性标准品的起始浓度与循环次数的曲线(略)，起始浓度的大小与要合成的一定扩增产物的量所需的循环次数成反比，该曲线的线性关系良好，相关系数 $r=0.992$。

2.4　两种方法检测鸭血清 DHBV DNA 结果

将 70 份鸭血清分别用百雅克泰公司荧光定量 PCR 仪和地高辛标记的 DHBV DNA 探针检测，并比较结果的相关性。结果表明二者有良好的相关性($r=0.97$，$P<0.01$，$\nu=58$)见表 1。其中用荧光定量 PCR 方法检测 DNA 在$<\times10^2$ 拷贝/ml 时，用斑点杂交方法检测不出核酸。

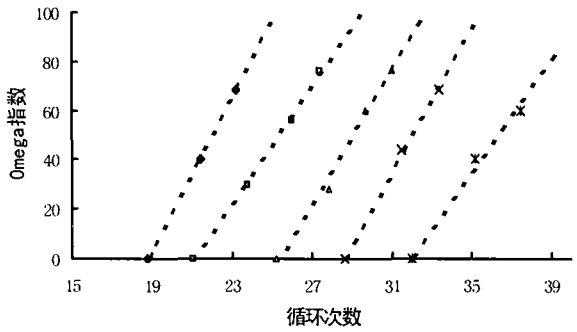


图 2　DHBV DNA 阳性标准品扩增指数标准曲线

表 1　两种方法检测 70 份血清标本 DHBV DNA 定量结果的相关性分析

血清	百雅克泰 QPCR($\bar{x}\pm s$)拷贝/ml	地高辛标记探针斑点定量($\bar{x}\pm s$)(volume)
10 份	$(2.37\pm1.70)\times10^2$	—
10 份	$(2.44\pm1.71)\times10^3$	1154.60±25.46
10 份	$(4.47\pm1.96)\times10^4$	1241.00±32.20
10 份	$(5.02\pm2.14)\times10^5$	1352.90±26.92
10 份	$(1.83\pm1.03)\times10^6$	1427.70±24.74
10 份	$(4.81\pm2.61)\times10^7$	1550.40±40.17
10 份	$(5.16\pm2.72)\times10^8$	1747.70 ±118.13

3　讨　论

以往，对于乙肝病毒核酸的定量研究有许多报道，如竞争性 PCR、同位素掺入 PCR、分支链 DNA 信号放大法、斑点杂交法、液相杂交法、杂交捕获法等，这些实验方法因定量标准不够客观，受影响因素多，难于应用在实际工作中。荧光标记聚合酶链反应(AmpliSensor－PCR)是最近发展起来的一项世界领先的技术，该方法是根据测定荧光能量的转换，来进行 DNA 分子的定量分析，设计的双链信号引物的两条链上，分别标记了荧光供体基团和荧光受体基因，未进行扩增循环时，这种信号引物处于双链互补结构，产生荧光；随着 PCR 循环的重复进行，信号引物的双链结构被破坏，其中的一条链参与到产物的合成中，荧光就消失，这种荧光强度的变化，与反应中特异性的扩增产物的量成比例关系，即荧光强度的减少程度与起始靶 DNA 含量及扩增程度成正比，因此，通过荧光光度计在线检测 PCR 反应体系中的荧光强度的变化、ASAP 专用数据软件进行数据处理即可推算出样品中模板核酸的含量。AmpliSensor 方法的信号产生的机理与引物紧密相关，经典的 PCR，其单链引物是可能引导非特异扩增的主要因素，AmpliSensor 引物是稳定的双链结构，即是半稳定状态的双链寡核苷酸，每条链分别标记上荧光素能量的供体与受体，其中一条长链的5′末端比短的一条多7个核苷酸(5′－gcgtccc－3′)，而半巢式引物的 5′末端的 7 个核苷酸正好与其互补，偶联反应在 T_4 连接酶的作用下能有效进行，该引物不会随机引导扩增，而且对应于所有能量传递效应的荧光信号是可预测的和序列特异性的，能直接监测扩增产物的量。作为一种简便而均一的定量 PCR 方法，AmpliSensor 技术是靶特异性的，并可标化信号量及样品量，因此，当调整不同反应扩增效应的差异，就能准确计算出扩增后产物的量。AmpliSensor－PCR 技术正逐渐成为分子生物学领域中又一经典技术，为病毒核酸定量检测、遗传病的分析，癌症的诊断等方面的研究，提供了新的手段。目前，国内外应用该技术进行人类乙、丙型病毒性肝炎(HBV、HCV)的临床诊断、评价和监测抗病毒药物以及干扰素的疗效的预测等方面的研究正在起步。

鸭乙型肝炎病毒(DHBV)与人乙型肝炎病毒(HBV)同属于嗜肝 DNA 病毒科，二者有着相似的分子生物学特征，其核酸序列的同源性达 40%，研究 DHBV 的分子生物学特性及其感染(下转第 52 页)

1999;21(3):175 - 178.

[2] Escuret E. Cerebral ischemic cascade[J]. Ann Fr Anesth Reanim, 1995;14(1):103.

[3] Holland JP, Sydserff SGC, Taylor WAS, et al. Calcitonin gene - related peptide reduces brain injury in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 1994;25(10):2055 - 2059.

[4] 王 峰,刘 敏,杨连春,等.咖啡酸、阿魏酸:新的非肽类内皮素拮抗剂[J].中国临床药理学与治疗学杂志,1999;4(2):85 - 91.

[5] Pak H. Chan. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain[J]. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2001;21(1):2 - 14.

[6] Durmaz R, Inal M, Angin K, et al. The effects of MK - 801 and U - 83836E on post - ischemic reperfusion injury in rat brain[J]. Acta - Neurobiol - Exp - (Warsz), 1999;59(2):99 - 104.

[7] Branghler JM, Slis H, Meldrun BS. Central nervous system trama and stroke: Biochemical consideration[J]. Free Radical Biolmed, 1989;6(2):289 - 292.

[8] Rajdev S, Hara K, Solway KE, et al. Overexpression of rat inducible heat shock protein 70 confers resistance to permanent focal ischemic injury in transgenic mice[J]. Soc Neuroxce Abstracts, 1998;24(3):496 - 498.

[9] Nishimura RN, Dwyer VE, Clegg K, et al. Comparison of the heat shock protein in cultured cortical neurons and astrocyte [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1991;9(1):39 - 45.

(上接第 38 页)宿主、体内复制的过程,疾病的转归,筛选有效的抗病毒药物等是目前研究人类乙型肝炎的重要实验手段。应用鸭乙型肝炎动物模型进行新药抗乙型肝炎病毒药效学评价的试验,用以往的实验方法(DHBV DNA 斑点杂交法)来检测病毒血清学标志,以及 Southern blot、原位杂交法检测肝组织中 DHBV DNA 从而进行药物抗病毒治疗效果的评价和监测及其预后的判断,虽有重要的参考价值,但若能应用 AmpliSensor - PCR 这一世界领先技术,建立动物乙肝病毒核酸定量的标准方法,使得新药药效学考核的动物学试验有一个客观的量化指标,将会为开发治疗病毒性肝炎的新药提供更科学、更有参考价值的实验资料。

参 考 文 献

[1] Nagata I, Colucci G, Gregorio GV, et al. The role of HBV DNA quantitative PCR in monitoring the response to interferon treatment in chronic hepatitis B virus infection [J]. J Hepatol, 1999;30(6):965.

[2] Kessler H H, Preininger S, Stelzl E, et al. Identification of different states of hepatitis B virus infection with a quantitative PCR assay [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000;7(2):298.

[3] Chen T, Luk J M, Cheung S T, et al. Evaluation of quantitative PCR and branched - chain DNA assay for detection of hepatitis B virus DNA in sera from hepatocellular carcinoma and liver transplant patients [J]. J Clin Microbiol, 2000;38(5):1977.