维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)02－0140－04

碱性磷酸酶直接标记核酸探针检测血清中鸭乙型肝炎病毒 DNA 方法的建立及应用

陈压西，齐珍元，黄爱龙

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:建立碱性磷酸酶直接(AlkPhos Direc)标记核酸探针检测血清中鸭乙型肝炎病毒核酸(DHBV DNA)方法。方法:应用 AlkPhos Direc[TM]将碱性磷酸酶直接标记纯化的 DHBV DNA 全基因制备探针,与目标核酸杂交后加入 CDP－Star 化学发光试剂,用胶片放射自显影检测 DHBV DNA。同时检测了探针的灵敏度和特异性。比较了 AlkPhos Direc 标记 DHBV DNA 探针与地高辛标记的 DHBV DNA 探针检测鸭血清标本 100 份结果。并用 AlkPhos Direc 标记探针检测血清中鸭乙型肝炎病毒核酸的方法考核了活性肽类物质保尔佳(Polyerga)及其 8 种单体体内抗鸭乙型肝炎病毒作用。结果:探针灵敏度为 10pg,无非特异性的结果出现,与地高辛探针比较,用 AlkPhos Direct 标记探针检测方法的敏感性为 100%，特异性为 100%，符合率为 100%；抗鸭乙型肝炎病毒作用动物实验表明，保尔佳 001 号单体(CMS001)能使血清中 DHBV DNA 明显降低($P<0.05$)。结论:AlkPhos Direc 标记 DHBV DNA 探针检测血清中鸭乙型肝炎病毒核酸方法灵敏、特异,与地高辛标记的 DHBV DNA 探针检测结果完全相符合,可作为药物抗鸭乙型肝炎病毒作用动物实验疗效评价的手段。

【关键词】碱性磷酸酶;标记;鸭乙型肝炎病毒;核酸

【中国图书分类法分类号】R521.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－03－04

Establishment and application of the method for detecting DHBV DNA in serum using DHBV DNA probe labeled directly by alkaline phosphatase

CHEN Yaxi, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To establish the sensitive and specific technique for detecting DHBV DNA in serum using DHBV DNA probe labeled directly by alkaline phosphatase (AlkPhos Direct probe). *Methods*: The probe that purified DHBV DNA sequence was labeled directly by alkaline phosphatase and chemiluminescent substrate CDP－star for AP were used in the hybridization assay. DHBV DNA was detected by autoradiography on the film. The test compared the chemiluminescent dot blot hybridization assay for 100 samples with digoxigenin－labeled DHBV DNA probe detective method . The antiviral effects of polypeptide Polyerga and 8 kinds of monomers on duck hepatitis B virus in vivo were observed by AlkPhos Direct probe detective method. *Results*: The sensitivity of the probe labeled directly by alkaline phosphatase was 10pg at least. The coincidence was 100% compared with digoxigenin－labeled DHBV DNA probe detection. The monomer CMS001 could significantly reduce the serum level of DHBV DNA($P<0.05$). *Conclusion*: The method detecting DHBV DNA in serum by DHBV DNA AlkPhos Direct probe is sensitive and specific. The results between two methods with AlkPhos Direct and digoxigenin－labeled HBV DNA probe are coincident completely. The method might be useful for the evaluation on anti－DHBV effects of drugs.

【Key words】 Alkaline phosphatase; Label; Duck hepatitis B virus; Nucleic acid

鸭乙型肝炎动物模型不仅是国内外研究乙型肝炎病毒感染和复制规律的重要参考动物模型,而且是卫生部规定的新药抗乙型肝炎病毒药效学评价的唯一动物模型。血清中肝炎病毒核酸的含量是评价和预测抗病毒药物的疗效的重要依据。然而,如何进行准确、客观的肝炎病毒核酸定量,是目前研究的热点及难点。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、液相杂交法、杂交捕获法等,这些

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)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

实验方法因成本高，费时，不利于大量样本检测，难于应用在实际工作中。我们用碱性磷酸酶直接标记核酸探针检测血清中鸭乙型肝炎病毒核酸，旨在建立快速、简便、灵敏、特异的 DHBV DNA 定量检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 AlkPhos Direct 标记和检测系统(RPN3690)购于安发马西亚生物技术(中国)有限公司。

1.1.2 含 DHBV DNA 全序列的 pBR_{325} 质粒，本所提供。

1.1.3 质粒中量提取试剂盒(A7640)购于 promega 公司。

1.1.4 Agarose Gel DNA Extraction Kit(1696505)购于德国 Boehringer Mannheim 公司。

1.1.5 DU^R Series 600 分光光度仪(Bankman 公司)。

1.1.6 保尔佳(水剂)及其单体(冻干粉剂)，由益桥(湖南)制药有限公司提供。拉米夫定(批号：B038238，葛兰素威康英国行动有限公司)。

1.1.7 动物模型 采用健康成年的重庆麻鸭产蛋孵化的 1 日龄雏鸭，经腹腔接种 0.1ml DHBV DNA 阳性病毒血清。接种 1 周后，分别颈外静脉抽血，用地高辛标记的 DHBV DNA 探针[1]经斑点杂交检测筛选出感染阳性鸭，饲养至 2 周龄作为实验动物。

1.2 方法

1.2.1 按试剂盒说明中量提取 pBR_{325} 质粒，经 EcoRI 酶切后回收 DHBV DNA。将回收的 DNA 溶液用 DU^R Series 600 分光光度仪定量。

1.2.2 标记探针 用消毒双蒸水稀释待标记的 DHBV DNA 至 10ng/μl，按 AlkPhos Direct 标记试剂盒进行标记。标记好的探针贮存于 50%(V/V)甘油，-20℃ 可保存 6 个月以上。

1.2.3 检测探针的灵敏度及特异性 将已知浓度的 DHBV DNA 回收液倍比稀释点样于硝酸纤维膜上，用 AlkPhos Direct 标记的探针进行杂交检测探针的灵敏度。分别用 20 份鸭血清(其中 10 份血清地高辛探针斑点杂交 DHBV DNA 为阳性)、20 份人血清和 20 份大白鼠血清用 AlkPhos Direct 标记的探针进行杂交检测探针的特异性。

1.2.4 血清检测 将待检血清 40μl 抽滤点样于硝酸纤维膜上，1NNaOH 碱变性，80℃ 烤膜 2h。预杂交 15min，加入 AlkPhos Direct 标记的探针 100ng，55℃ 水浴杂交过夜。膜经洗膜液 155℃ 漂洗 20min，洗膜液 II 室温漂洗 10min。将膜放在一干净不吸水的平皿，吸取 CDP-Star detection reagent 到膜上(30～40μl/cm^2)，保留 2～5min。将膜放入暗盒，正面朝上。在暗室将胶片放入暗盒，爆光 1h 后，取出胶片冲洗。将 AlkPhos Direct 标记的探针检测的胶片的斑点用 Vuego Scan (Brisa-620ST)扫描仪进行胶扫描；用 ImageMaster TotalLab v1.11. Ink 软件对斑点进行定量分析，斑点值为 Volume (volume = intensity × mm^2)。

1.2.5 与地高辛标记的 DHBV 探针检测结果比较 将 100 份鸭血清分别用地高辛标记 DHBV DNA 的检测试剂检测和 AlkPhos Direct 标记的 DHBV DNA 探针检测，并比较结果。

1.2.6 将 DHBV 感染阳性模型鸭 98 只随机分为 11 组 ①病毒对照组(9 只)；用生理盐。②阳性药物对照组(8 只)；用拉米夫定，剂量为 50mg/(kg. d)。③保尔佳(8 只)：剂量为 100μg/(kg. d)。④CMS001(9 只)；⑤CMS002(10 只)；⑥CMS003(9 只)；⑦CMS007(10 只)；⑧CMS008(8 只)；⑨CMS010(9 只)；⑩CMS011(9 只)；⑪CMS015(9 只)；剂量均为 50μg/(kg. d)。除拉米夫定每日口腔灌喂 1 次外，其余各组均每日腹腔注射 1 次，实验用药时间为 4 周，停药观察 1 周。于用药前、用药 1～4 周、停药 1 周分别颈外静脉抽血，分离血清于 -20℃ 保存待检。采用斑点杂交法，用 AlkPhos Direct 标记试剂盒制备 DHBV DNA 探针、CDP-Star 化学荧光测定试剂(RPN3690)统一检测，用 Vuego Scan(Brisa-620ST)扫描仪进行胶片扫描；用 Image Master TotalLab v1.11. InK 软件对斑点进行定量分析。

1.3 统计方法

采用 spss 软件，配对 t 检验。

2 结 果

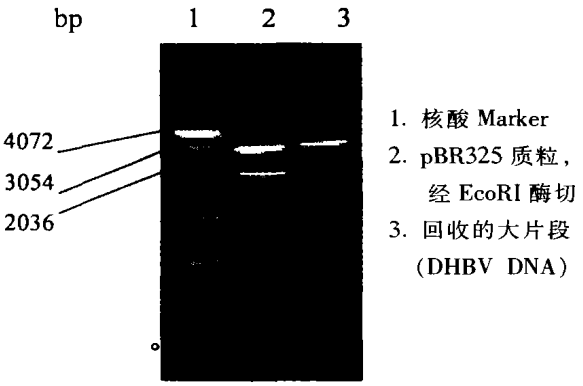


图 1 1%琼脂糖电泳检测 pBR_{325} 质粒经 EcoRI 酶切后回收的大片段

2.1 中量提取 pBR_{325} 质粒，经 EcoRI 酶切后回收大片段，见图 1。回收的 DHBV DNA 片段约为 3.0Kb，浓度为 28μg/ml，$OD_{260}/OD_{280} = 1.9$。

2.2 用 AlkPhos Direct 标记的 DHBV DNA 探针的灵敏度和特异性的检测

探针灵敏度至少为 10pg，见图 2。无非特异性的结果出现，见表 1。

2.3 与地高辛标记的 DHBV DNA 探针比较

按诊断性试验评价方法，与地高辛探针比较，用

维普资讯 http://www.cqvip.com

AlkPhos Direct 标记探针检测方法的敏感性为 100%(60/60),特异性为 100%(40/40),符合率为 100%(100/100)。见表 2。

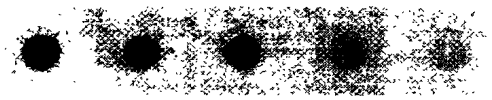


图 2 AlkPhos Direct 标记的 DHBV DNA 探针的灵敏度检测

2.4 活性肽类物质保尔佳及其 8 种单体体内抗鸭乙型肝炎病毒的效果

病毒对照组(生理盐水)、保尔佳、CMS002、CMS003、CMS007、CMS008、CMS010、CMS011、CMS015 等各组用药 1～4 周分别与同组用药前比较,均无 DHBV DNA 滴度总体水平降低。阳性药物对照组(拉米夫定)用药 1～4 周、CMS001 组用药 4 周分别与同组用药前比较,DHBV DNA 滴度总体水平有降低,统计学上有显著意义($P<0.05$)但停药 1 周后两组均有 DNA 回升现象。见表 3。

表 1 AlkPhos Direct 标记的 DHBV DNA 探针检测不同种属血清结果

	DHBV DNA 阳性	DHBV DNA 阴性
鸭血清 20 份	10	10
人血清 20 份	0	20
鼠血清 20 份	0	20

表 2 两种方法标记的 DHBV DNA 探针检测 100 份血清标本结果比较

	地高辛标记探针	AlkPhos Direct 标记探针
阳性	60	60
阴性	40	40

3 讨 论

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,研究 DHBV 的分

表 3 用药前后血清 DHBV DNA 滴度改变情况($\bar{x} \pm s$)

组别	DHBV DNA(volume)					
	用药前	用药 1 周	用药 2 周	用药 3 周	用药 4 周	停药 1 周
生理盐水	25798.67 ± 11543.49	45202.22 ± 31186.70	48904.11 ± 22879.45	102133.0 ± 66140.01	60050.89 ± 38349.37	49745.78 ± 42886.09
拉米夫定	21452.50 ± 9494.94	5828.38** ± 4035.06	7229.25** ± 6069.89	8046.75** ± 6674.15	8232.25* ± 5311.44	19504.88 ± 19035.86
保尔佳	13169.75 ± 12632.3	26215.25 ± 18238.17	33606.88 ± 19412.99	21192.00 ± 16690.22	14183.75 ± 13182.66	15445.75 ± 11963.46
CMS001	20623.67 ± 18383.35	11071.44 ± 13093.29	19599.44 ± 18173.31	14253.11 ± 13971.44	5209.56* ± 3473.86	18336.78 ± 16023.60
CMS002	19535.90 ± 15316.79	29101.90 ± 23220.30	31724.50 ± 37811.88	41767.30 ± 32522.10	24467.10 ± 19505.53	17433.30 ± 17812.28
CMS003	22240.67 ± 20665.68	19020.11 ± 13996.44	23896.00 ± 15179.90	17463.33 ± 10037.64	8033.11 ± 7607.17	15283.89 ± 12645.26
CMS007	28342.20 ± 13373.59	36312.20 ± 18757.55	30031.10 ± 18462.87	23680.60 ± 12571.79	26757.50 ± 13124.19	25977.40 ± 13813.33
CMS008	24349.63 ± 13382.59	42121.25 ± 25126.05	42728.88 ± 21013.07	43756.00 ± 24252.81	39790.13 ± 18173.96	30589.88 ± 18297.95
CMS010	15038.44 ± 10545.14	32016.89 ± 32832.86	58912.11 ± 46945.99	56148.89 ± 35501.25	48809.44 ± 52192.04	58644.56 ± 62426.37
CMS011	31178.56 ± 23019.80	52201.11 ± 33351.34	53856.11 ± 39719.46	59682.78 ± 41469.27	39479.89 ± 22799.52	45201.33 ± 20007.57
CMS015	17196.33 ± 9878.43	3735.67 ± 33565.84	36502.89 ± 35015.50	38831.00 ± 22663.55	29718.22 ± 15402.16	26160.22 ± 14623.17

维普资讯 http://www.cqvip.com

子生物学特性及其感染宿主、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。然而，如何进行鸭乙肝病毒核酸定量，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，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，一直是我们工作的重点及难点。多年以来，核酸的标记检测一直用同位素的方法来做，因为同位素标记灵敏度高且已经建立了一套完整的操作方法，而非同位素检测和标记的灵敏度相对较低，但同位素的安全性和探针的保存时间都是要考虑的因素。近年来，非同位素的标记和检测有了较大的发展，尤其是化学发光和化学荧光的应用，灵敏度有了很大的提高，理论上，可达 50fg 或更高。非同位素标记可以采用间接和直接标记两种方法，以往的鸭乙型肝炎动物模型实验中多采用非直接标记核酸的方法，如利用随机引物标记法将地高辛作为一个"半抗原"挂在探针上[1]；用碱性磷酸酶直接标记核酸是最新推出的方法，最大的优点是快速、方便，且不降低灵敏度，直接标记免去了与抗体偶联物温育的时间及相关的封阻、洗脱等时间。不仅检测快速，并能使探针剥离，重新用同一张膜再杂交更方便、灵敏度更高，可重新杂交的次数也更多。同时碱性磷酸酶可用化学发光，放射自显影检测，也可用化学荧光配合合适的激光扫描仪进行检测。CDP－Star 是通过 dioxetane CDP－Star 在碱性磷酸酶的作用下不稳定发光进行检测，灵敏度高。Chen Y 等报道[2]用碱性磷酸酶直接标记 EB 病毒 DNA 斑点杂交化学发光检测灵敏度可达 4pg，与用碱性磷酸酶直接标记 DHBV DNA 斑点杂交化学发光检测灵敏度可达至少 10pg 相当。如何进一步提高探针的灵敏度，使之接近理论水平还需不断优化标记条件。应用 AlkPhos Direct 直接标记的核酸探针，进行了活性肽类物质保尔佳及其 8 种单体体内抗鸭乙型肝炎病毒作用考核。保尔佳是从动物脾脏中提取的活性肽类物质，除具有直接抑制肿瘤作用外，还有刺激免疫系统，促进细胞因子（IL－2，IL－3，γ－干扰素）的释放，增加 T 细胞活性等功能。本实验结果表明：保尔佳及其 8 种单体中，CMS001 用药 4 周后能使血清中 DHBV DNA 含量明显降低，但停药后有 DNA 回升现象。值得进一步深入研究。AlkPhos Direct 直接标记的核酸探针可以替代地高辛标记的核酸探针，作为药物抗鸭乙型肝炎病毒作用动物实验疗效评价的手段。

参 考 文 献

[1] 陈压西，郭树华，陈学华. 地高辛标记 DHBV DNA 探针的制备及应用[J]. 重庆医科大学学报，1994；19(4)：295－297.

[2] Chen Y, Chen Y, Li H, et al. Chemiluminescence detection of Epstein－Barr virus DNA with an oligonucleotide probe [J]. Clin Chim Acta, 2000；298(1－2)：45－53.