维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol. 19 No. 4
1994 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1994

地高辛标记DHBV DNA探针的制备及应用

第二医院病毒性肝炎研究所 陈压西 郭树华 陈学华

提 要 采用随机引物法制备地高辛标记含鸭乙型肝炎病毒(DHBV)基因片段的质粒PBR322作为探针，建立DHBV DNA斑点杂交试验，结果：探针可检出1.0pg同源DNA片段，不与人乙肝病毒(HBV)及鸭肝细胞DNA发生杂交，与^{35}S—DHBV DNA探针的灵敏度相似。该探针检出重庆地区2—3月龄麻鸭血清DHBV自然感染率为25.48%；用DHBV血清经腹腔感染1—2日龄雏鸭，1周后阳性感染率为82.90%，并可持续感染至少2月。

关键词 鸭乙型肝炎病毒；地高辛；探针；斑点杂交；动物模型
中图分类号 R512·6

DHBV与HBV同属于嗜肝DNA病毒科(Hepadnavirus)。国内外用鸭乙肝动物模型不断进行了乙肝发病机理、病毒复制过程及筛选有效的抗病毒药物的研究。随着基因工程技术的发展，应用核酸杂交技术检测DHBV的方法正不断建立和完善。DNA是乙肝感染最直接、特异和灵敏的指标，本文应用地高辛标记含DHBV基因片段质粒作为探针，建立了检测DHBV DNA基因片段质粒作为探针，建立了检测DHBV DNA的斑点杂交技术，获得了快速、特异、敏感的检测结果，为实验研究提供了可靠的检测手段。

材料与方法

1. **含DHBV DNA片段的PBR322质粒** 由北京第一传染病院赠送。

2. **地高辛标记药盒** 购自德国Boebringer—Mannheim公司。

3. **^{35}S—DHBV DNA探针**：购自北京第一传染病医院，灵敏度为2.5pg。

4. **质粒扩增、提取与纯化** 受体菌为LE392Ecoli(本所提供)，采用碱变性裂解法[1]，酚氯仿抽提，无水乙醇沉淀，氯化铯密度梯度离心(55.000rpm，16小时)纯化，用紫外分光光度计测定质粒的浓度，琼脂糖凝胶电泳分析质粒的纯度。

5. **DHBV DNA探针标记** 参照产品说明书，用随机引物标记法进行。

6. **标本来源**

(1)临床HBV DNA阳性乙肝病人血清20份。

(2)取10只未感染DHBV的鸭肝组织各200mg制成匀浆，经0.5M EDTA pH8.0，100μg/ml proteinaseki0.5%sarcosyl溶解，酚/氯仿抽提，乙醇沉淀[5]，沉淀溶于100μlIE内，即为鸭肝组织DNA提取液，—20℃保存，待检。

(3)采集重庆郊郊2—3月龄麻鸭血263份，分离血清后于—20℃保存待检。

(4)一次性经腹腔注射DHBV DNA(+)血清给

维普资讯 http://www.cqvip.com

76只1—2日龄雏鸭(0.1ml—1ml/只)，于接种病毒血清后1—8周经颈外静脉抽血，分离血清，—20℃保存待检。

7. DNA斑点杂交试验　按产品说明书进行，探针浓度为1.18μg/ml，用96孔微量抽滤器将标本分别加到硝酸纤维薄膜上，经NaOH变性、中和液中和后于80℃烘烤2小时，预杂交4小时，杂交18小时，于暗处显色2小时后观察记录结果。

结　果

1. 地高辛标记的DHBV DNA探针的特异性和灵敏度

(1)特异性　探针仅与DHBV DNA和同源性的质粒发生杂交、不与20份HBV DNA(+)乙肝病人血清及10份鸭肝组织DNA发生杂交反应。

(2)灵敏度同源性的质粒系列稀释后，地高辛探针可检出1pg的量，见图1。



100ng 10ng 1ng 100pg 10pg 1pg

图1　地高辛标记的DHBV DNA探针的灵敏度

2. 与^{35}S—DHBV DNA探针比较

从263份鸭血清中随机抽取72份分别用^{35}S和地高辛标记的DHBV DNA探针检测：^{35}S探针检测24例阳性，其中22例地高辛探针检测阳性；^{35}S探针检测48例阴性，其中47例地高辛探针检测阴性。按诊断性试验评价方法，地高辛探针敏感性为91.67%(22/24)，特异性为97.92%(47/48)，与^{35}S探针符合率为95.83%(69/72)。

3. 动物血清标本检测

(1)在采集的263份鸭血清中有67份为DHBV DNA阳性，占25.48%(67/263)。

(2)人工感染鸭乙肝动物模型的观察，各周阳性率与第1周比较无显著性差异($P>0.05$)，说明动物模型DHBV DNA无自然转阴现象，见表1。

表1　接种DHBV阳性血清1—8周后平均阳性感染率

	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第7周	第8周
鸭数(只)	76	42	39	36	37	37	38
阳性数(只)	63	30	26	30	32	27	33
感染率(%)	82.90	71.43	66.67	83.33	86.49	72.49	86.84

讨　论

地高辛是一种甾族半抗原化合物，它借一交联臂与duTP相连，地高辛与duTP作为底物掺入DNA而合成地高辛标记的探针，在与靶DNA杂交后，利用抗地高辛抗体—碱性磷酸酶复合物进行酶联免疫试验检测，地高辛标记的探针具有灵敏性高、特异性强、操作方便、易于贮放、适当保存稳定性可达2年以上等优点[1]。

同位素标记探针虽有特异性好、敏感性高等优点，但由于其半衰期短，运输及放射性污染等问题难以解决，限制了其在一般实验室和临床的常规应用。地高辛DHBV DNA探针检测灵敏度与同位素探针的检测灵敏度相当，这除了与地高辛配基的分子较小、标记时易于掺入，且对探针杂交的空间阻遏效应较小，使探针杂交更容易、更牢固外，还可能与探针标记方法有关，制备地高辛探针使用的随机引物标记法[2]代替了缺口平移法[3]，前者有更高的掺入率。

对72份鸭血清芽测结果显示，我们自制的如高辛DHBV DNA探针具有较高的敏感

维普资讯 http://www.cqvip.com

性和特异性，与^{35}S—DHBV DNA 探针检测结果有较高的符合率，因而在实验研究中，可用地高辛探针代替同位素探针。

以往的鸭乙肝动物模型实验中，常用^{35}P或^{35}S探针进行实验检测，而改用地高辛探针后无需放射自显影过程，3 天便可得到结果，可以缩短动物实验周期，节约开支，更有利于抗病毒药筛选的研究。用人工感染动物模型观察，DHBV DNA 至少在 2 个月内无自然转阴现象，使得治疗药物观察的结果稳定、可靠。

地高辛标记的 DHBV DNA 探针的特异性结果表明，该探针不与人 HBV DNA 发生杂交反应，人 HBV 与 DHBV 的 DNA 序列同源性为 40%，因而国内有报道 DHBV 与 HBV 的 KNA 可以发生杂交，且 DHBsAg 与 HBsAg 有部份交叉反应[4]，是否与我们的血清样本未经浓缩处理，DNA 滴度低，且作为探针的 DHBV DNA 仅是完整的 DNA 的片段有关，有待于我们进一步研究。

参 考 文 献

1 Nuoumov N，et al. J. Hepatolog. 1991；12：382
2 Feinberg A. P，et al. Anal Biochem. 1983；132：6
3 Rigby PWJ，et al. J Mol Biol. 1977；113：237
4 朱万孚，等。北京医科大学学报。1987；19：223
5 Sambrook J，et al. Molecular cloning，a laboratory mannal. cold spring Harbor Laboratory. 1989；9：31

（收稿日期 1994—02—22）

（上接第 337 页）

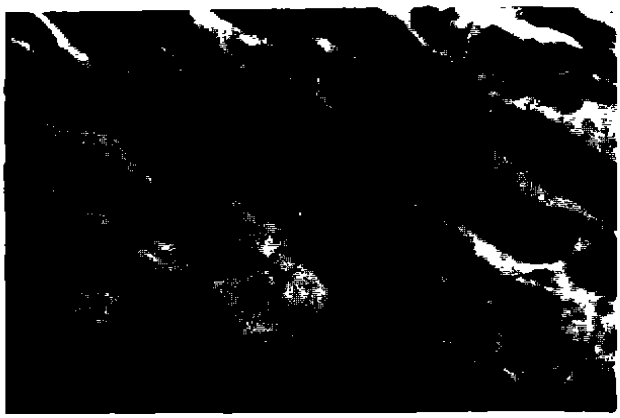


图 心内膜心肌活检组织学改变 A：HE×200，B：HE×400。说明见正文。

参 考 文 献

1 Dec—GW，et al. J Am Coll Cardiol 1992；20(1)：85
2 Lindsay J，et al . Am J cardiol 1984；54：902
3 Miklozed CL，et al. Am Heart J 1988；115，768
4 Cosfanzo—Nordin MR，et al. Br Heart J 1985；1：25
5 李志明，等．北京医科大学学报 1991；23(3)：251

（收稿日期 1994—01—05）