维普资讯 http://www.cqvip.com

血清直接斑点杂交试验检测HBV-DNA及其影响因素的探讨

病毒性肝炎研究所 何念海 张定凤

提 要 本文介绍了一种只用5—10uL血清样本的直接斑点杂交试验，并探讨了影响该方法效果的各种因素和临床应用意义。该法灵敏度达0.1pg，特异性好，检测322份样本中HBV-DNA(+)116例。HBeAg(+)组HBV-DNA(+)百分率为88.9%，比抗HBe(+)组(17.6%)和HBeAg(-)/抗HBe(-)组(11.0%)高($P<0.005$)。本法具有敏感、特异、简便和快速等特点，可用于实验室和临床研究及抗病毒药物疗效的考核

关键词 斑点杂交；HBV-DNA；乙型病毒性肝炎

近年来由于基因工程的飞速发展，通过DNA重组技术可获得大量高纯度的克隆HBV-DNA，经用放射性同位素标记，制成探针，进行DNA分子杂交试验，为乙型肝炎的发病机理研究和临床诊断提供了重要的工具。最初国外学者报道用Southern吸印法[1]检测肝脏和血清中HBV-DNA，方法复杂[2]，之后报道用斑点杂交试验检测HBV-DNA，方法灵敏、特异，但需纯化HBV-DNA，成本高费时且DNA丢失明显[3,4]。最近国内外均报道了简单的直接斑试，灵敏度高、特异、简便，但大多血清用量较大，点样时间长，易引起血清渗透[4-7]。本文报道了一种简化的斑试方法，并探讨了影响其效果的各种因素和临床应用意义。

材料与方法

1.材料

(1)32P-HBVDNA探针由本所标记，放射比活性为5×10^7—2×10^8cpm/ugDNA。

(2)λDNA和pBR322购于上海华美公司。

(3)硝基纤维素滤膜(NC膜)，孔径0.45μm，浙江黄岩人民化工厂生产。

(4)抽滤器购于江苏太仓医疗器械厂。

(5)检测血清共322例，其中门诊病例208例，住院病例108例和6例健康献血员。

2.方法

(1)斑试操作步骤：NC膜用2×SSC(1×SSC为0.15MNaCL/0.015M柠檬酸钠)浸泡10min，铺于抽滤板上，真空负压下将待测样本、阴性和阳性对照各5-10ul点于NC膜上，40-50℃烘干NC膜；用0.5NNaOH/1.5MNaCl变性10min；1MTris-HCLpH7.6/0.5MNaCL中和5-10min，使NC膜上pH达7.0；80℃烤干2h，NC膜在含变性鱼精DNA2.0mg的预杂交液(6×SSC-10×Denhardt(1×Denhardt为0.02%的Ficoll400、PVP和BSA))10ml的塑料盒中65℃孵育3h；吸去预杂交液5ml，加入甲酰胺原液5ml使其终浓度为50%和100℃水浴变性的32P-HBVDNA(7×10^5～5×10^6cpm/100份样本)，42℃杂交24h。NC膜取出后在1.5×SSC/0.25% SDS和0.5×SSC/0.25%SDS中40—50℃各浸泡10min，40—50℃烘干。NC膜对X光胶片于-60℃放射自显影1-5天。将X光胶片显影3-5min，定影5-10min，自来水冲洗10-20min，凉干。

维普资讯 http://www.cqvip.com

在X光胶片上出现斑点即为阳性结果。

（2）HBV血清学标志的检测：HBsAg用RPHA法，1:16以上为阳性；HBeAg、抗HBe、抗HBs和抗HBc用ELISA法，P/N大于2.5为阳性。试剂购于中国军事医学科学院和北京生物制品研究所。

（3）统计学处理：选用X^2检验和四格表资料相关分析。

结　果

1.血清直接斑试的特异性和灵敏度　每次实验均设置对照，包括λDNA鱼精DNA、正常人血清，纯化的HBV-DNA和阳性病人血清。32P-HBVDNA探针检测λDNA、鱼精DNA和正常人血清无显影痕迹；纯化的HBV-DNA及阳性病人血清出现斑点。用32P-PBR322探针检测70份血清，无1例阳性。说明病人血清中含PBR322的可能性很小，32P-HBV DNA探针检测结果是特异的。将克隆HBV-DNA定量稀释为0.1～1,000pg浓度做直接斑试，结果放射自显影1、3和5天可分别显示2.0、0.5和0.1pg的HBV-DNA斑点（图1）。

2.影响斑试效果的各种因素　1份HBV-DNA阳性血清点样量依次为5-100ul，结果5ul足以出现阳性斑点。说明直接斑试的血清用量可少至5ul。53份样本用7mm孔径抽滤板在大负压下点样，除纯化的HBV-DNA阳性外，其余均无显影痕迹；而用2mm孔径抽滤板在小负压下点样则出现满意结果。6份阳性血清和0.1～50pgHBV-DNA各5ul先用1N NaOH/3.0M NaCl5ul变性10min后点膜，上述样本5ul按文中方法点膜变性，其他条件相同，结果先经碱变性比先点膜后变性的效果好。7种浓度的克隆HBV-DNA和5份血清点膜后于80℃分别烤干0-4h和0-2h，其他条件相同，结果以烤干2h以上的效果为好。未预杂交的NC膜，在其杂交液中加入变性的鱼精DNA，结果进行预杂交和未预杂交的效果无明显差异。32P-HBVDNA探针量最少用7×10^5cpm/100份样本可出现满意结果。同一批样本分别杂交6-48h，结果杂交6和12h的斑点密度低，含少量HBV-DNA血清未出现斑点，杂交18h以上的结果无明显差异。同1张杂交NC膜分别放射自显影1-5天，结果天1时间太短，含微量HBV-DNA的样本未出现斑点，2-4天的效果相差不明显，5天的阳性斑点密度很高，费时较长。

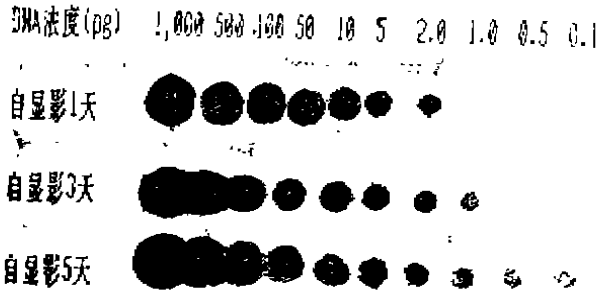


图1　克隆HBVDNA定量稀释后，取5ul点在NC膜上按本文介绍的方法进行杂交制备的放射自显影。

3.斑试的临床应用（图2）：

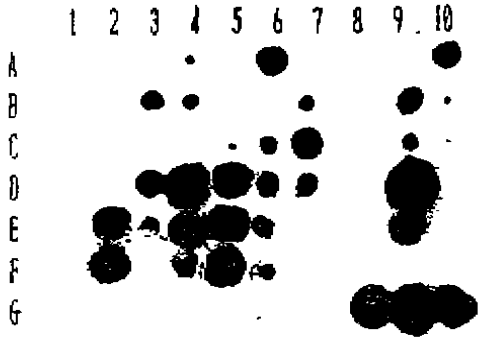


图2　病例血清斑点杂交放射自显影：G8.9.10为阳性对照；G1.2.3.4.5.6.7为阴性对照；A6.10，B3.4.7.9，C6.7.9，D3.4.5.6.7.9，E2.4.5.6.9，F2.4.5.F6为阳性结果；A1.3.4，B10，C5.10，E3.7.8为弱阳性；余为阴性。

（1）HBV-DNA在HBV血清学标志不同的各组血清中的检出：316例病人血清中

维普资讯 http://www.cqvip.com

HBV-DNA(+)116例.6例献血员均阴性。116例阳性病例血清抗HBc除7例复查两次以上均阴性外，余均为阳性。116例中HBsAg(+)105例 (90.5%)，同时HBeAg(+)80例(69.0%)，抗HBe(+)19例 (16.4%)，而HBeAg(−)/抗HBe(−)6例 (5.2%)；余11例(9.5%) HBsAg(−)，包括抗HBe(+)9例(7.8%)和抗HBs(+)1例，另1例血清学标志全部阴性的重症肝炎，其结果经过3次以上复查均阳性。

(2)322例检测血清中HBV-DNA和HBeAg/抗HBe的关系 (表1)：HBV-DNA阳性百分率在HBeAg(+)组为88.9%，与抗HBe(+)组 (17.6%)及HBeAg (−) 抗HBe(−)组 (11.0%)间均有高度显著性差异(X^2=118.9，P<0.005；X^2=98.5，P<0.005)。HBeAg(+)、抗HBe(+)及HBeAg(−)/抗HBe(−)与HBV-DNA(+) 间均有相关关系 (P均<0.005)，r分别为0.686、-0.379和-0.283。322例中有HBeAg (+)/HBV-DNA (−) 10例，抗HBe(+)/HBV-DNA(+) 28例，抗HBs(+)/HBV-DNA(+)1例，全部标志阴性而HBV-DNA(+)1例，总体不符合率为14.0% (40/286)。

表1 322例血清HBV-DNA与HBeAg/抗HBe的关系

组别	例数	HBV-DNA 阳性数	阳性率%	构成比%	P	r
HBeAg(+)	90	80	88.9	69.0	P_1<0.005	0.686
抗HBe(+)	159	28	17.6	24.1	P_2<0.005	−0.379
HBeAg(−)/抗HBe	73	8	11.0	6.9	NS	−0.283
合计	322	116	100.0	100.0		

P_1P_2分别是HBeAg (+)与抗HBe (+) 及HBeAg(−)/抗HBe(−)组比较 (X^2=118.88和98.54)。NS是抗HBe(+)与HBeAg(−)/抗HBe(−)间比较(X^2=1.69)。Y是相关系数。

(3)8例慢性肝炎病人的药物疗效观察：8例病人经肝活检确诊，2例CPH和6例CAH。口服强的松 (40、30、20mg各10-14天) 减量撤除后静滴阿糖腺苷(600mg×10天或400mg×15天) 和肌注干扰素 (3万U×10-15天)。结果2例CAH用药后HBV-DNA阴转，HBeAg滴度下降，1月后阴转，但未出现抗HBe。1例CPH用药后HB_eAg阴转，且出现抗HB_e，但HBV-DNA仍(+)，余5例HBV-DNA及HB_eAg均未阴转。

讨论

国外学者报告了一种简单的分子杂交技术，灵敏度为0.01～0.05pg[4,5]。国内学者报告用直接斑试可检出0.5～1.0pg的克隆HBV-DNA[6,7]。Walter[8]对影响斑试特异性和灵敏度的因素进行了系统研究，改进了方法，其灵敏度比Scotto[4]的方法高5倍，较Lieberman[5]的方法高15倍。本文介绍的方法采用国产NC膜，只用5～10ul血清，方法简便，特异性好，省时，可检出0.1pg克隆HBV-DNA。

本文发现用大孔径抽滤板在大负压下点膜，易使Dane氏颗粒通过NC膜，血清HBV-DNA大量甚至完全丢失，致使杂交信号减弱甚至消失；而克隆HBV-DNA丢失不明显，与Walter[8]的结果相符，可能系血清蛋白质与核酸竞争NC膜上的结合位点，从而减弱了血清HBV-DNA的杂交信号。用盐和NaOH处理血清样本可使Dane氏颗粒包壳破裂，释放出HBV-DNA，同时将双链DNA变为单链DNA，容易吸附在NC膜上，有利于提高检测灵敏和增强杂交信号。在预杂交和杂交过程中鱼精DNA加入量均能封闭和竞争NC膜上非特异结合位点，因而

维普资讯 http://www.cqvip.com

可省去预杂交步骤。我们选用50%甲酰胺杂交系统，32P-HBVDNA量为$7\times10^5\sim5\times10^6$Cpm/100份样本，42℃杂交18h以上可获得满意的杂交效果。

一般认为HBsAg(+)携带者血清中HBeAg(+)是活动性病毒复制的标志，通常与传染性有关；而抗HBe(+)则认为是低传染性的[4,5]。本文检测90例HBeAg(+)中80例HBV-DNA(+)(88.9%)，文献报告的阳性百分率为76～100%[6,9]，HBeAg(+)与HBV-DNA(+)间有正相关关系，说明HBeAg可作为判定HBV活动性复制和传染性的指标之一。但尚有11.0%HBeAg(+)病例HBV-DNA(−)，有研究提示少数HBeAg(+)携带者的传染性并不高[10]，可能存在一种血清类型，其血清中含有富余的HBeAg而病毒颗粒太少以至不能检出HBV-DNA[4]，HBeAg(+)/HBV-DNA(−)可能代表病毒复制减弱发生在足量HBeAg消失和抗HBe出现之前，可预测血清的转换和HBsAg的消除。8例药物治疗病人的结果也证实了这一点。

部分抗HBe(+)血清中也检出HBV-DNA，阳性百分率为0-60%[2,11]。本文在抗HBe(+)159例中检出28例HBV-DNA(+)(17.6%)。既往有HBV从抗HBe(+)母亲传播给婴儿和从抗HBe(+)献血员传播给受者的报告，抗HBe(+)血清中检出HBV-DNA为这种传播提供了证据。本文还发现HBeAg(−)，有时抗HBs(+)，甚至血清学标志全部阴性的病例出现HBV-DNA(+)，文献也有类似报告[4]，从而解释了从HBsAg(−)血清传播而致的乙型肝炎。说明抗H(Be+)甚至抗HBs(+)不总是表示HBV清除，血清无传染性和慢性肝病的消退；提示有部分长期HBV携带者，不论HBeAg/HBe血清转换状态如何都在继续HBV复制。抗HBe(+)/HBV-DNA(+)病例的肝脏病变重，转氨酶的起伏变动与HBV-DNA的检出有一定关系[9]，说明抗HBe(+)/HBV-DNA(+)代表一种不同的病毒复制和肝脏疾病演类型。

用血清直接斑试检出HBV-DNA是HBV感染的直接证据和传染性指标。本方法目前只对血清HBV-DNA进行半定量，如果用密度计测定杂交斑点的密度进行定量检测，有利于更有效地判定药物疗效和估价应用乙肝疫苗后阻断母婴垂直传播的效果。

参考文献

[1] Southern EM. J Mol Biol 1975; 98:503

[2] Brechot C, et al. The Lancet 1981, 2: 765

[3] Weller IVD, et al. JMed Virol 1982, 9: 273

[4] Scotto J, et al. Hepatolgy 1983; 3:279

[5] Lieberman HE, et al. Hepatology 1983; 3:285

[6] 陈渊卿，等．中华传染病杂志 1983; 1:63

[7] 杜绍材，等．北京学院学报 1985; 17:36

[8] Walter E, et al. Hepatology 1987; 7:557

[9] Imazeki F, etal. Hepatology 1985; 5: 783

[10] Alter HJ. etal. Ann Intern Med 1976; 85:671

[11] 倪贤珍，等．中华传染病杂志 1987; 5:28

SERUM DIRECT SPOT HYBRIDIZATION TEST DETECTION OF HBV-DNA AND THE FACTORS INFLUNCING ITS SENSITIVITY AND SPECIFICITY

This paper described a direct spot hybridization test using 5-10ul sera sample and various factors related its sensitivity and specificity were discussioned. The procedure is

维普资讯 http://www.cqvip.com

综合医院对肺结核认识水平的调查

第一医院肺科 罗永艾 王宏林 王正中

因症就诊是发现肺结核的主要方式[1]，综合医院医生担负着发现和处理肺结核的重要责任。他们对肺结核的认识水平如何？存在什么问题？怎样解决？为探讨这些问题，我们用非随机抽样方法向四川省部分综合医院寄发思考病例400份，从41家综合医院收回答卷321份，兹将调查结果报告如下。

思考病例

请您填写以下空白，（要求不查书，不讨论，独立思考）

病例1 24岁，男，工人，半个多月以来下午体温37.8～38.8℃，咳嗽轻，痰少，痰中带血两次，在车间工作稍感乏力，过去体健，无心悸、气急或咯脓痰史，二年前曾体检胸透肺部正常。

1. 您的初步印象（按可能性顺序）
（1）
（2）

2. 您会为病人作如下检查（1）
（2）

3. 如果检查结果是 ，您将给病人的处理是（药物剂量、疗程）

并叮嘱病人

病例2 28岁，女，农民，低热一个月，近一周下午体温高达38.9℃，稍有咳嗽，很少痰。五周前顺产一女婴，产后无腹痛、腹泻，阴道分泌物无异常。化验：白细胞6800，中性0.70。

1. 您的初步印象（按可能性顺序）（1）
（2）

2. 您会为病人作如下检查（1）
（2）

3. 如果检查结果是 ，您将给病人的处理是（药物剂量、疗程）

并叮嘱病人

填表者（不必写您的姓名）只填：

as follow: 1) spoting sample on the smaller diameter hole of filtration appartus under lower vaccum; 2) denaturating sample befor spoting, baking filter paper membrance more than 2 hours at 80℃; 3) 32p-HBVDNA amount more than 7×10^5cpm/100 sample, hybridizating with probe at more than 18 hours and autoradiography 2-4 days. Its sensitivity was 0.1 pg. 322 serum samples of patients and donors were determined, 116 of 322 samples showed HBV DNA positive, 80 of 90 HBsAg and HBeAg positive serum samples were HBV DNA positive (88.9%) and 28 of 159 anti-HBe positive samples HBV-DNA positive(17.6%) and 8 of 73 both HBeAg and anti-HBe negative samples HBVDNA positive (11.0%, $p<0.005$, HBeAg (+) vs. anti-HBe (+) and both (−)). We inclined to think this was a sensitive, specific and simple method for clinical and laboratory studies

KEY WORDS spot hybridization test; HBV-DNA; virus hepatitis B