DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.03.024

竞争性聚合酶链反应定量检测血清HBV－DNA*

Quantitation of serum hepatitis B Virus DNA by competitive polymerase chain reaction

刘重阳 周子成 杨建民 罗元辉 鲁 荣 房殿春 （第三军医大学附属西南医院消化科）重庆,630038

现有定量检测HBV－DNA的方法主要是分子杂交法，敏感性为0.1～1 pg，但仍不能达到血清最低感染水平。近年发展的聚合酶链反应(PCR)技术，具有极高的敏感性，灵敏度可达1 fg，相当于3×10^2个病毒颗粒，已被广泛用于血清、肝组织和白细胞中HBV－DNA的检测[1~3]。但迄今几乎均为定性诊断，难以满足临床与研究工作的需要。我科最近成功地利用PCR技术制备出缺失序列，以此作为竞争模板，建立了竞争性PCR定量检测血清HBV－DNA的方法，现报道如下：

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清标本 来源于1994年我院住院肝硬化及原发性肝癌患者，各15例。

1.1.2 寡核苷酸引物 系自行设计，扩增片段位于HBV S基因保守区，由中科院上海细胞所合成。正链引物a对应于427～448位碱基区段，序列为5′－CATCTTCTTGTTGGTTCTTCTG－3′。负链引物c对应于822～842碱基区段，序列为5′－TTAGGGTTTAAATGTATACCC－3′。负链缺失引物bc为对应于687～701碱基区段的b段连接引物c而成，序列为5′－TTTAGGGTTTAAATGTATACCCACCACTGAACAAATG。

1.1.3 DNA聚合酶、四种脱氧核苷酸(dNTP)、PCR缓冲液、DNA分子量标志均由华美公司提供。

1.1.4 HBV－DNA全基因质粒PBR_{322} 由重庆医科大学肝炎研究所惠赠。

1.2 方法

1.2.1 竞争模板制备

1.2.1.1 原理及方法 应用引物a与bc扩增全基因质粒，引物c充法“外接序列”连接于引物b的5′端，它在扩增时能一起被复制，使产物在b段的5′端带上了一段c，但并不影响扩增的特异性。扩增产物由于“缺失”了120 bp，但仍保留引物a和c的结合序列，故可作为竞争模板。如图1所示。

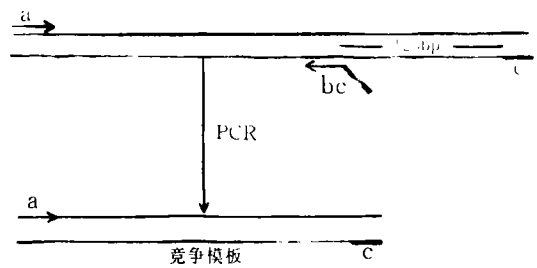


图1 竞争模板制备原理

PCR扩增：在0.5 ml Eppendor管中加入10×反应缓冲液2 μl，每种2.5 mmol/L dDNTP 1.6 μl，引物a和引物bc各10 pm，DNA聚合酶1.5 u，HBV全基因质粒1 pg，加去离子水至20 μl。将不含酶的反应混合液先在95℃变性5 min，接着进入热循环参数为94℃ 30 s，55℃ 45 s，72℃ 90 s，循环35周，最后72℃ 10 min结束。

1.2.1.2 竞争模板的鉴定回收及定量 取产物20 μl在含溴化乙淀的2%琼脂糖中电泳后，于紫外灯下观察，在295 bp处见到DNA条带，证实扩增成功，切下包含此区带的胶条，冻融法回收，酚氯仿抽提，乙醇沉淀，冻干机抽干后重悬于TE缓冲液中。将回收所得竞争模板收集后，微量分光光度法定量。

1.2.2 血清HBV－DNA抽提 参照文献[4]将400 μl血清经SET缓冲液裂解，蛋白酶K消化，酚/氯仿抽提，乙醇沉淀，抽干后重悬于40 μl TE缓冲液中，于－20℃冻存待检。

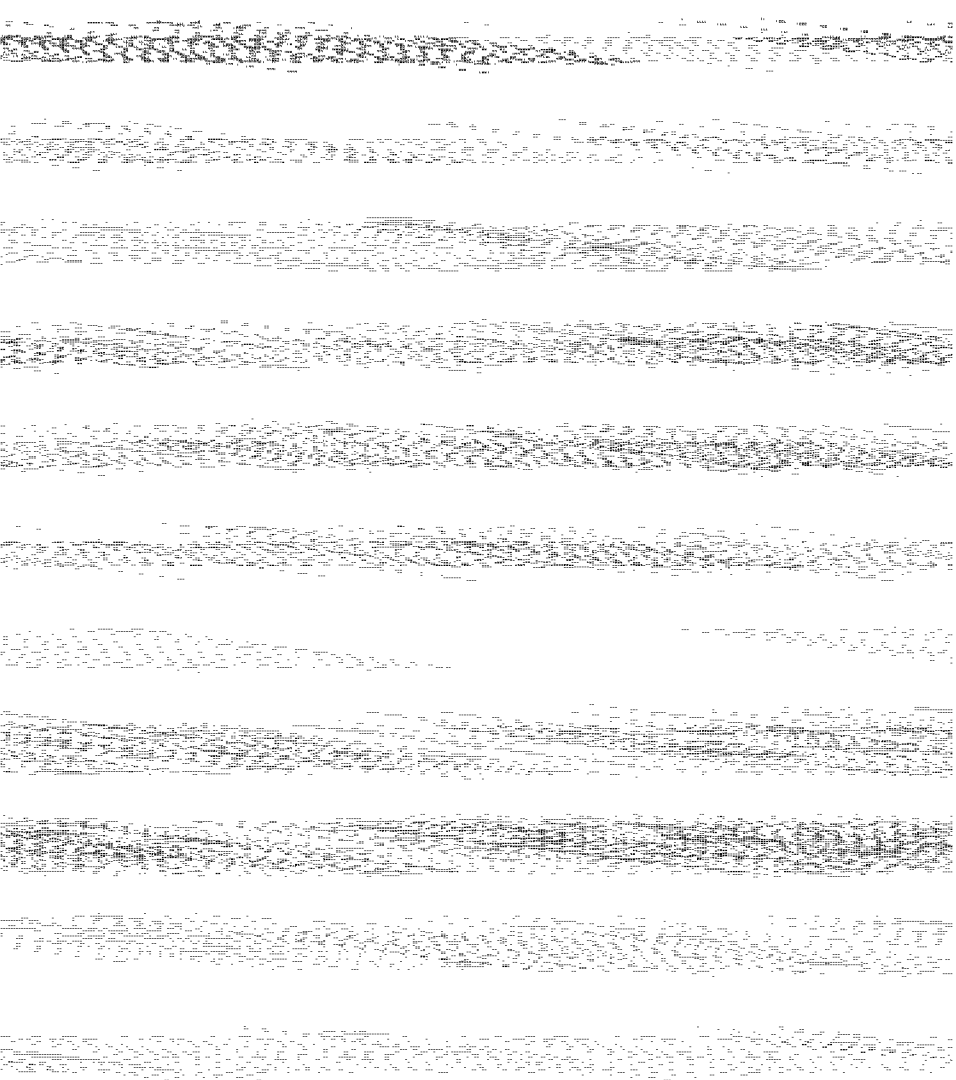
1.2.3 HBV－DNA的定性检测 反应管中包含5 μl待检样品及反应混合液(引物a与c各10 pm，其余成份同竞争模板扩增反应混合液)，去离子水至20 μl，循环参数同前。

产物分析：取10μl扩增产物在含溴乙淀的2%琼脂糖中电泳后，于紫外灯下观察荧光条带，以PBR_{322}质粒DNA HaeⅢ酶切产物作为分子量标志。

1.2.4 HBV－DNA的定量检测 将10倍梯度稀释的竞争模板分别加入6支0.5 ml Eppendor管中，使每管含竞争模板分别为10^8、10^7、10^6、10^5、10^4、10^3拷贝，各管中加入5 μl待检标本及反应混合液(同定性检测)，去离子水至20 μl。循环与产物分析同前(如图2所示)。

* 重庆市中青年科技专家基金资助项目

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net