DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.05.009

生物素标记HBV DNA探针在肝石蜡切片上作原位杂交技术的研究

Ⅱ、与斑点杂交、吸印杂交的比较

朱纯吾* 李奇芬 韩凤莲* 张士敏* 曹 阳* 吴纯清 (西南医院 传染科)

提 要 对生物素标记HBV DNA探针的原位杂交与^{32}P标记的HBV DNA探针的斑点杂交和吸印杂交作了比较。三者阳性率分别为33.33% (25/75)、36.36 (16/44) 和15.38% (4/26)，三者无统计学差异，16例同时用原位杂交和吸印杂交检测，4例二者均为阳性，9例二者均为阴性，原位杂交多检出3例阳性，二者有显著的相关性 ($p=0.0192$)。30例同时作了原位杂交和斑点杂交，其中17例结果一致，13例结果不一致，两者无显著相关性 ($p>0.05$)。并比较了原位杂交与其它两种杂交方法的优缺点。

关键词 原位杂交；斑点杂交；吸印杂交；生物素标记HBV DNA探针；^{32}P标记HBV DNA探针

核酸的分子杂交技术，为乙型肝炎病毒感染后，HBV DNA在人体内的存在状态、复制过程及其与癌变的关系等方面的研究提供了一个崭新的、高度敏感的手段。1975年Southern提出了吸印杂交(Southern blot)技术后，就有人用于HBV DNA的检测[1]，并发现HBV DNA可与人的基因组发生整合。以后又有人用简化的斑点(Spot)法检测血清的HBV DNA[2]。近年来，用原位杂交方法在肝组织切片上检测HBV DNA也迭有报道[4]。国内已先后开展了用^{32}P标记的HBV DNA探针、以斑点法或吸印法检测血清或肝组织的HBV DNA[5-7]。本文用生物素标记的HBV DNA探针 (Enzo Biochem)作原位杂交，并与^{32}P探针的吸印杂交和斑点杂交技术检测结果相比较，以进一步说明原位杂交法的实用性及优缺点。

材 料 与 方 法

病例来源

病例来自解放军302医院和第三军医大学西南医院传染科之乙型肝炎住院患者，无症状携带者系由南京军区总医院从新入伍战士中检出的。

* 解放军302医院

实验方法

1. 原位杂交操作方法及试剂来源参阅本实验报告Ⅰ[10]。

2. 斑点杂交操作方法参阅文献 (6)；吸印杂交方法参阅文献 (7)。所用^{32}P标记的HBV DNA探针来自北京人民医院，比放为 2×10^{7}cpm/μg。

结 果

一、斑点杂交试验检测血清HBV DNA共41例，其中16例阳性，占36.36%。HBV DNA检测显影情况如图1，粗略定量4～500pg之间为阳性。

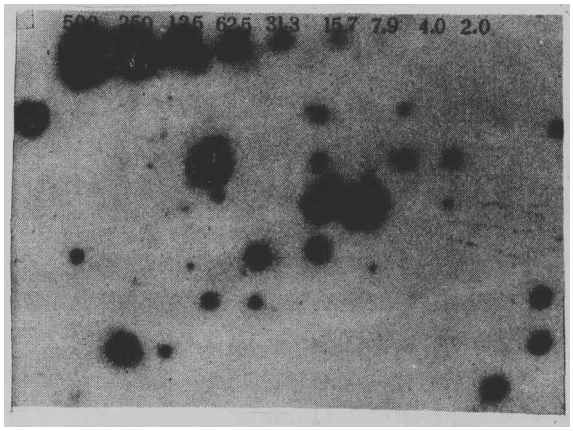


图1 斑点法杂交试验检测血清中HBV DNA显影结果

检出的血清HBV DNA均在4～500pg之间

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

二、吸印杂交试验检测肝组织匀浆HBV DNA共26例，阳性者4例。其中2例在电泳条上显示杂交带在3.2kb以上及较低分子量的位置上，并在3.2kb后有拖带现象，表明同时有整合和游离的HBV DNA。这2例血清HBV DNA均为阳性，原位杂交均显示肝细胞胞浆HBV DNA阳性。另2例电泳条上显示杂交带主要在3.2kb及较低分子量的位置上，表示主要是游离型HBV DNA。这2例原位杂交均为胞浆阳性，血清1例阳性，1例阴性。吸印检测的显影情况（如图2）。

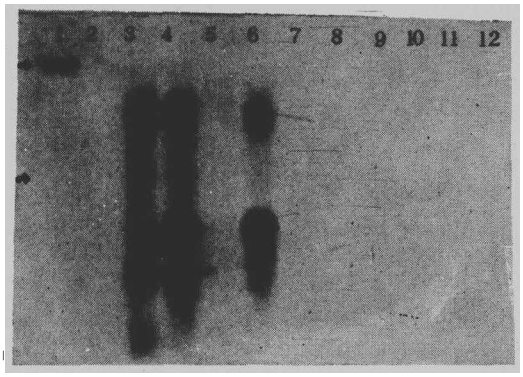


图2　吸印法杂交试验检测肝组织HBV DNA的显影结果

第1轨道　为含有HBV DNA的重组质粒（pA20），分子量7.4kb

第2轨道　为λ噬菌体DNA电泳轨道

第3～12轨道　为肝穿刺标本，每二个相邻号为同一份标本。单号为经E.CoRI或Hind Ⅲ酶解标本，双号为未经酶解标本。

三、生物素标记的HBV DNA探针在肝组织切片上的原位杂交试验共75例，阳性者25例，占33.33%。杂交的HBV DNA经DAB呈色后，表现为胞浆内较粗大之棕黄色颗粒状的阳性物质(图3)。在胞核内亦可见到，但量少而色浅。阳性细胞可散在或成堆，甚至弥漫分布。

四、三种DNA分子杂交方法检测结果之比较：三种方法检出HBV DNA的阳性率，原位杂交与斑点法分别为33.33%与36.36%，二者基本一致。吸印法的阳性率略低（15.38%），但与斑点法及原位杂交相比较，统计学上无显著差异（$p>0.05$）。

本文有16例同时做了原位杂交和吸印杂交试验，二者检测结果之相互关系见表1。

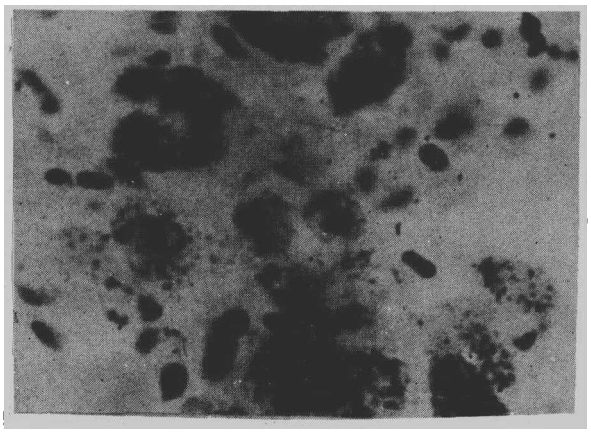


图3　原位杂交试验
肝组织切片上肝细胞内HBV DNA阳性颗粒

表1　原位杂交与吸印杂交检测结果之相互关系

原位杂交	吸印杂交		总计
	阳性	阴性	
阳性	4	3	7
阴性	0	9	9
总计	4	12	16

数字表明：吸印法阳性者，原位杂交法均为阳性；原位杂交法阴性者，吸印法亦均为阴性。差别在于原位杂交多检出3例阳性。

经统计学精确法处理，二者有显著的相关性（$p=0.0192$）。

同时作了斑点杂交和原位杂交试验的共30例，其相互关系如表2所示。

在原位杂交阳性者13例中，斑点杂交检测阳性者6例；原位杂交阴性者17例中，血清中亦有6例阳性。

表2　原位杂交与斑点杂交检测结果之相互关系

原位杂交	斑点杂交		总计
	阳性	阴性	
阳性	6	7	13
阴性	6	11	17
总计	12	18	30

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

统计学处理二者无显著相关性（$p>0.5$）。

讨　论

一、分子杂交技术检测HBV DNA被认为是反映HBV DNA复制的敏感方法。曾有人报告用吸印法在29例乙型病毒性肝炎患者的30份肝标本中，检出27份HBV DNA阳性，阳性率高达90%[6]。本文用三种不同的分子杂交技术，即斑点法检测血清中游离的HBV DNA、吸印法检测肝组织匀浆中游离的及整合的HBV DNA、原位杂交法检测肝组织切片上的HBV DNA。三种方法的阳性率分别为36.36%、15.38%及33.33%。这与近期Negro等人报告20例中用斑点法检出血清HBV DNA阳性7例（35%），吸印法检出阳性8例（40%），原位杂交法6例（30%）[4]，以及Rijntjes等报告用生物素标记的HBV DNA探针原位杂交法检测45例中，20例阳性（42.22%）[3]的结果相近。

二、原位杂交与吸印杂交试验都是检测肝组织HBV DNA的，二者检测的结果理应有很好的相关性。本文以及Negro等[4]、Rijntjes等[3]的研究都以类似的结果证实了这一点。

本文原位杂交试验的阳性率高于吸印杂交试验者。Haase[11]指出原位杂交分析单个细胞，而不是从整个组织来提取核酸，再杂交分析，病毒核酸没有被周围未感染细胞的核酸所稀释，从理论上讲，原位杂交的敏感性应高于吸印杂交试验。

另一方面，吸印杂交试验每次约需肝脏标本10mg，在肝穿刺取材的情况下，往往难以满足。肝组织量的不足可导致假阴性。

吸印法的最大优点在于可判定发生杂交的DNA序列分子量的大小，而原位杂交则可以清晰地看到HBV DNA在组织的哪些细胞内存在、其分布与定位的状况、及其与细胞及组织器官的病理变化的关系，有利于研讨其发病机理。

三、原位杂交与斑点杂交的检测结果显示无明显的相关性，表明血清HBV DNA不一定反映肝脏内病毒的状况。一方面，血清HBV DNA受肝组织内HBV复制、释放情况的影响；另一方面，可能有肝外来源，例如，Shen等在人血白细胞检出了HBV DNA[8]。

参 考 文 献

1. Brechot C, et al. State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with HBsAg positive and HBsAg negative liver disease. Pro Natl Acad USA 1981; 78: 3906
2. Scotto J, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: comparison with results for other viral markers. Hepatology 1983; 3(3):279
3. Rijntjes PJM, et al. Hepatitis B virus DNA detected in formalin fixed liver specimens and its relation to serologic markers and histopathologic feature in chronic liver disease. Am J Pathol 1985; 120 :411
4. Negro F, et al. detection of HBV-DNA by in situ hybridization using avidin-labeled probe. J Med Virol 1985; 15:373
5. 陈渊卿，等。斑点杂交试验直接检测血清中乙型肝炎病毒DNA。中华传染病杂志 1983；1:63
6. 闻玉梅，等。乙型肝炎病毒DNA在患者血清及肝组织中存在状态的研究。病毒学报 1985；1:313
7. 韩凤莲，等。乙型肝炎患者血清中HBV-DNA和抗HBcIgM之间关系的初步探讨。免疫学杂志 1986；2(3):196
8. Shen HD, et al. Hepatitis B Virus DNA in leukocytes of patient with hepatitis B virus-associated liver disease. J Med Virol 1986; 18:201
9. 李奇芬，等。生物素标记HBV DNA探针在肝石蜡切片作原位杂交技术的研究——

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

各型肝病时HBV DNA的定位及形态。第三军医大学学报 1988; 10(1):14
10. 张士敏，等。生物素标记HBV DNA探针在肝石蜡切片作原位杂交技术的研究——Ⅰ。技术操作和经验体会。第三军医大学学报 1988; 10(4):322
11. Haase AT. Analysis of viral infections by in situ hybridization. J Histochem Cytochem 1986; 34(1):27～32

(收稿：1987.7.21，修回：1988.4.30)

A Preliminary Study of in situ Hybridizatiou in Routine Paraffin-embedded Liver-tissue Sections with Biotinylated HBV DNA Probe: Comparison with Spot Hybridization and Southern Blot Hybridization

Zhu Chunwu, et al. (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical College)

The detection rate of HBV DNA was 36.36% (16/44) in spot hybridization, 16.38 (4/26) in Southern blot hybridization with ^{32}P-labelled probe, and 33.33% (25/75) in in situ hybridization with biotinylated probe. No significant difference existed among them ($p>0.05$). Among the 16 cases studied with in situ hybridization and Southern blot hybridization, 4 HBV DNA positive and 9 HBV DNA negative cases were found by both the 2 techniques, but 3 more HBV DNA positive cases were found only by in situ hybridization. There was significant correlation between the 2 techniques ($p=0.0192$). Among the 30 cases tested with in situ hybridization and spot hybridization, the results were coincident in 17 and different in 13. No significant correlation existed between the 2 techniqnes.

The advantages and disadvantages of in situ hybridization were discussed.

Key words: in situ hybridization; Spot hybridization; Southern blot hybridization; Biotinylated HBV DNA probe; ^{32}P-labelled HBV DNA probe

---

(上接388页)

a most significant increase in the combined hypoxia-pulmonary embolism group.

These results indicate that the combined effect of hypoxia and pulmonary embolism can markedly increase PEW and the increase of PEW is related to high pulmonary vascular resistance, , which is the result of the damage of pulmonary microvasculature by hypoxia and pulmonary microembolism.

Key words: Anoxia; Pulmonary embolism; Lungs

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