

核 酸 杂 交

——病毒性感染快速诊断的发展方向

王 用 楫

(卫生部北京生物制品研究所)

核酸杂交 (nucleic acid hybridization), 在分子生物学中是近年才建立起来的、正在发展的一项新技术。在生物学各个领域内已经开始应用。本文内容为, 核酸杂交在人类病毒性感染快速诊断中的使用情况和前景。

(一) 诊断病毒感染的两个途径

分离病毒和检测病毒成分, 是诊断病毒感染的两个途径。分离病毒, 是认识一种新的病毒感染的基础。只有分离得到新病毒, 才能制备相应的特异性抗原, 建立相应的特异性血清学诊断方法。分离病毒, 虽然是传统使用的认识病毒感染的基础, 但在常规病毒感染诊断中, 并非经常使用。这是因为: 第一, 收集临床材料后, 必须经过数日, 甚至数周, 才能得到分离和鉴定病毒的结果; 第二, 有些病毒, 如乙型肝炎病毒、轮状病毒、甲型肝炎病毒等, 目前尚难在一般实验室内常规分离; 第三, 分离病毒需要某些特殊的设备、技术和经验。

检测病毒成分, 是近年才提出的诊断病毒感染的另一个途径。病毒成分, 包括病毒结构蛋白、病毒所产生的某种酶活力和病毒核酸。病毒的结构蛋白, 可根据检出其抗原性, 而获得病毒感染的快速诊断, 使用的较新方法有: 免疫荧光显微技术、免疫过氧化酶显微技术、放射免疫检查法和酶联免疫吸附检查法等。某些病毒特异性酶活力的检测, 在一般诊断室内, 已经开始使用于诊断。例如, 乙型肝炎病毒的 DNA 多聚酶、流感病毒的神经氨酸酶、单纯疱疹病毒的胸苷激酶、逆转录病毒的逆转录酶和细小 RNA 病毒的蛋白酶等。至于应用核酸杂交技术, 以诊断临床样品和活检、尸检样品中的病毒特异性核酸, 则是进入 80 年代才提出来的新课题。

(二) 核酸杂交的应用

核酸杂交能够用于检测病毒性核酸, 基于下面的事实: 第一, 极短的核苷酸序列, 已被证明具有病毒特异性的独特基因组; 据此, 利用极短的核苷酸序列, 即可制备出来高度特异性的探针。第二, 彼此互补的核酸链, 具有高度结合力 (avidity), 从而亦可制备相应的探针, 建立起有高度灵敏性的互补核酸杂交方法。

第三, 应用分子克隆技术, 可以制得无限量的各种病毒核酸的标准试剂。

1980 年曾报告^[1], 核酸杂交用于检测特异性肠病毒的基因组。近数年来, 检测病人标本中病毒核酸的报告, 尤如雨后春笋, 接踵而至。主要目的在于, 建立病毒感染的快速诊断方法和研究病毒在某些疾病发病机理中所起的作用。前者是本文要讨论的内容; 后者如乙型肝炎与肝细胞癌^[2]、乳头瘤病毒与宫颈癌^[3]之间的相关性。

根据病人材料中待检靶病毒核酸位置移动与否, 可区分为两类核酸杂交。其一, 为原位核酸杂交 (in situ nucleic acid hybridization), 即检测细胞学制片或组织学切片中原位的病毒 DNA 或 RNA^[4]。另一, 可称为移位核酸杂交或称固体支持杂交 (solid support hybridization), 即检测由临床样品转移到固定在硝酸纤维素膜上的 DNA 或 RNA^[5]。

检测固定在硝酸纤维素膜上的核酸, 在概念上比较简单。DNA 分子极为稳定, 可耐受像 0.3M 的 NaOH 于 60℃ 的严峻条件, 而无改变。此项条件常常用于使临床样品中的病毒 DNA 释放出来, 使临床样品 DNA 不含蛋白、RNA 和经降解的宿主细胞膜成分。经处理得到的变性单链 DNA, 由吸印 (blotting) 或过滤, 转移到硝酸纤维素膜上, 再经焙烘、脱水、干燥, 使核酸紧密固定在膜上, 甚至在高温条件下, 亦难冲洗下来。这样就制得一个来自临床材料固定的固相核酸样品。用经标记的病毒特异性核酸探针, 与此固定在膜上的靶核酸杂交, 即可测知和鉴定原来临床材料内的病毒性核酸。

(三) 核酸探针的制备

首先用限制性内切酶, 从经纯化的待检病毒核酸链, 获得病毒基因组的分子断片 (molecular fragment), 亦称病毒的亚基因组 (subgenome)。经分子克隆技术处理, 产生大量相同的分子断片。同一病毒核酸链, 经不同内切酶处理, 可得到不同的病毒基因组断片。根据对待检病毒的广泛毒株具有反应性, 而对其它病毒或宿主细胞 DNA 却无反应的标准, 来选择能够制备探针的基因组断片。核酸探针可用多种方法标记。最

初的、目前最常采用的,是在切口-转移(nick-translation)中,即在 DNA 酶和 DNA 多聚酶分别用于切口和修复病毒特异性 DNA 分子的过程中,掺入 ^{32}P 标记的三磷酸脱氧核苷(deoxynucleoside triphosphates)^[47]。探针与膜上固定的临床样品 DNA 发生杂交后,由放射性自显影术,即可显出放射标记的结合物。此膜上的临床样品核酸,与不同病毒基因组断片所制备的探针,可多次反复进行检测。这是因为,在不足以除去膜上临床样品 DNA 的条件下,却能使膜上杂交的探针解离、除去。此种膜上固定的 DNA,保存数月,仍可使用。

(四) DNA 探针的灵敏性

1983 年 Redfield 等氏^[47],曾用单纯疱疹病毒(HSV)特异性 DNA 的几种克隆断片进行研究。以限制性内切酶得到的这些断片,插入载体质粒 pBR322 内,转导至大肠杆菌,经复制获取大量断片,从大肠杆菌肉汤培养液中纯化。使用如此制备的、以 ^{32}P 标记的探针,进行核酸杂交检测时,可查出 1% 的纯化 HBV DNA,或 10^4 个 HSV 的空斑形成单位(PFU),或 4 个受染 HSV 的细胞。使用由 HSV-1(单纯疱疹病毒 1 型)制备的探针,当检测 HSV-2(单纯疱疹病毒 2 型)阴部病变拭子病毒培养阳性的样品时,其灵敏性相当于培养阳性的 78%;如用于检测受染 HSV-1 病例眼部病变拭子病毒培养阳性的样品,其灵敏性相当于培养阳性的 90%。这表明培养法的灵敏性稍高于核酸杂交法。

1984 年 Spector 等^[48],用 ^{32}P 标记的人巨细胞病毒(HCMV) AD169 株的克隆断片,建立了检测临床样品中 HCMV DNA 的诊断方法。如此标记的探针,能检出 10% 的 HCMV DNA,而不与疱疹病毒组中 HCMV 以外其它成员的 DNA 或人细胞的 DNA 杂交。此方法得到的结果为:(1)在 24 份密封的培养阳性尿样中,能正确检出 92%(22/24);在 26 份密封培养阴性的尿样中,88%(23/26)以探针法检测为阳性,且有证据说明确为阳性。(2)在 67 份骨髓移植受者的血液黄膜(buffy coat)回顾性检测中,14 份培养法阳性样品有 93%(13/14)检出 HCMV DNA。(3)剩余 53 份培养法阴性结果的黄膜样品中,32 份以杂交法未能检出 HCMV DNA;杂交法和培养法的阴性符合率为 60%(32/53)。(4)余 21 份培养法阴性的样品,以杂交检测时,却为阳性,其中 20 份有证据说明,杂交法得到的阳性结果是正确的。(5)总的看来,杂交法检测 HCMV DNA 诊断 HCMV 感染的灵敏性,高于现有的组织培养技术。

(五) DNA 探针的特异性

DNA 探针的特异性,随选用探针基因组断片的组成不同,而有极大的出入。已经证明,HSV 和 HCMV 的一些基因组断片,能与哺乳动物的 DNA 杂交。此种

交叉反应的本质,不管与来自真正的序列相同,或者与富含鸟嘌呤-胞嘧啶(guanosine-cytosine)序列有关;这类断片,原则上不应用以制成探针,来检测可能带有细胞成分的临床样品。当然,探针的病毒特异性,取决于所选择的基因组断片。肠病毒基因组的 3' 端断片,可用于检测大部分的肠病毒^[49],而 5' 端首 220 个核苷酸组成的灰质炎病毒探针,仅只与灰质炎病毒的 RNA 反应^[12]。

1984 年 Richman 等^[13],制出了对 HSV-1 和 HSV-2 检测特异性不同的三种基因组断片探针——Bam HIA(来自 HSV-1 核酸链)、601(来自 HSV-1 核酸链连结区)和 801(来自 HSV-2 核酸链连结区)。用 Bam HIA 来检测 HSV-2 DNA 时,其灵敏性只相当检测 HSV-1 DNA 时的 1/2—1/4。来自连结区断片所制备的 HSV-1 的探针和 HSV-2 的探针,不仅可以用来检测 HSV-1 和 HSV-2 的临床样品,而且当用以检测流行病学目的所采取的、与病例表现无关的样品时,显然还可以同时达到检测和分型的双重目的。

(六) 生物素标记的探针

由于 ^{32}P 标记的探针有使用有效期短至两周、操作和处理的潜在危险、费用昂贵等缺点,1981 年 Langer 等介绍了一种生物素(biotin)标记的核酸^[44]。这就改变了不用放射物来标记核酸探针。此种生物素化的三磷酸脱氧尿嘧啶核苷,像 ^{32}P 标记的三磷酸脱氧尿嘧啶核苷一样,在缺口-转移经过中掺入^[44]。如此制得的生物素标记探针,可用于检测固定在膜上的和处在细胞或组织内原位的两类核酸^[13]。此种探针,效期长久,可达一年或以上。如采用高浓度的探针,杂交时间可缩短至一小时^[44],还可以省去自显影的时间。

判定生物素存在的原理为:生物素经过与其有紧密结合能力的结合素(avidin),使之与酶形成“生物素-结合素-酶”的复合物,然后与酶的底物孵育,出现有色产物,由肉眼判定生物素存在。在完成杂交反应中,将带有固定样品的膜,首先与“生物素-结合素-酶”复合物,然后与底物孵育,在 1—2 小时内,即可检出是否存在有结合在样品上的生物素探针^[44]。

用生物素探针原位杂交技术,Sixbey 等已证明在传染性单细胞增多症过程中,患者的脱落口咽上皮细胞内,有 EB 病毒复制^[16];Beckman 等检测人阴部湿疣(condyloma)内有乳头瘤病毒^[17]。Janssen 等用生物素标记探针的检测法,检测细胞培养中的 HCMV DNA^[48]。

(七) 存在问题

上述结果,颇满人意,上述方法,快速可行。但核酸杂交的应用,确受一些限制,存在一些问题;必须加以克服才能得到推广。

1. 临床材料处理问题

从临床材料,提取核酸,十分繁琐。用眼拭子或袍

疹水泡液或溃疡,制备 DNA 时,方法尚属简单。用血液黄膜或含有大量粘液的呼吸道分泌物或子宫颈拭子,制备 DNA,颇多困难。从这类材料制备 DNA 时,常常需要酚提取,除去蛋白,以避免蛋白与核酸竞争固定膜上的结合位置。

采用杂交技术,检测临床样品中的单链 RNA,困难更多。用于提取 DNA 的 NaOH 提取法,能水解单链 RNA,因而不能使用。此外,欲检测呼吸道或粪便中的单链 RNA,其临床材料含有高水平的核酸酶活力。当 RNA 从病毒体(virion)或宿主细胞,一旦被提取出来,即刻就会为核酸酶活力所降解。在这一严峻情况下,可采用加核酸酶抑制物的种种改良 RNA 提取技术,从呼吸道分泌物提取甲型流感病毒的 RNA。将此 RNA 转移、固定到硝酸纤维素膜上,用含有互补于甲型流感(H_3N_2) NP(核蛋白)和 M(基质)基因的 DNA 克隆的质粒所制备的探针,进行杂交检测。检测流感 RNA 的初步结果,令人十分满意。同样,检测肠病毒临床样品中的 RNA,也得到令人鼓舞的结果^[12]。

2. 检测灵敏度提高问题

本文前已述及,在诊断 HSV 感染中,核酸杂交法的灵敏度,稍低于病毒组织培养法。杂交法放射自显影术所表现信号的强度,与样品中感染性病毒的含量,有正相关性。病毒滴度低的样品,也正是杂交法所漏掉的。与此相反,在本文前面述及的诊断 HCMV 感染中,就没有核酸杂交法灵敏度低于病毒细胞培养法的问题。这显然与 HCMV 难于在细胞培养中繁殖的性质有关。不管怎样,对任何病毒感染的诊断,都应提高核酸杂交检测法的灵敏度。为此,研究的改进方向有;第一,使用 RNA 转录断片(transcripts)作为探针^[19]。此种转录断片可标记到高度活力的特异性。已有用 RNA 探针检测 HCMV DNA 的报告^[20]。第二,

使用灵敏度更高的标记物,代替³²P,来标记探针,从而提高检测的灵敏度。其中当然也包括在改进中的生物素标记的探针。

(八) 前景

核酸杂交,是当前正在广泛而深入研究的课题,其应用范围在继续扩展。核酸杂交,在某些病毒与某些临床慢性疾病或某些肿瘤相关的研究中,将会发挥重要作用。核酸杂交,用于病毒感染的快速诊断,具有广阔的前景。诊断病毒感染的核酸杂交技术,将会更加简单,更加快速。

参 考 文 献

- [1] Moseley SL et al.: *J. Infect. Dis.* 142: 892, 1980.
- [2] Karayiannis P et al.: *J. Hepatol.* 1: 99, 1985.
- [3] Choo KB et al.: *J. Med. Virol.* 21: 101, 1987.
- [4] Forghani B et al.: *J. Clin. Microbiol.* 22: 656, 1985.
- [5] Meinkeoth J et al.: *Anal. Biochem.* 138: 267, 1984.
- [6] Rigby PW et al.: *J. Mol. Biol.* 133: 237, 1977.
- [7] Redfield DC et al.: *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 1: 117, 1977.
- [8] Spector SA et al.: *J. Infect. Dis.* 150: 121, 1984.
- [9] Peden K et al.: *Cell.* 31: 71, 1982.
- [10] Shaw SB et al.: *J. Virol.* 55: 843, 1985.
- [11] Hypia T et al.: *J. Clin. Microbiol.* 19: 431, 1984.
- [12] Roubart HA et al.: *J. Clin. Microbiol.* 20: 1105, 1984.
- [13] Richman DD et al.: *J. Infect. Dis.* 149: 298, 1984.
- [14] Langer PR et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 6633, 1981.
- [15] Brigati et al.: *Virol.* 126: 32, 1983.
- [16] Sixbey JW et al.: *N. Engl. J. Med.* 310: 1225, 1984.
- [17] Beckman AM et al.: *J. Med. Virol.* 16: 265, 1985.
- [18] Janssen HP et al.: *J. Virol. Methods.* 17: 311, 1987.
- [19] Green M et al.: *Cell.* 32: 681, 1983.
- [20] Schuster V et al.: *J. Infect. Dis.* 154: 309, 1986.