DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.03.028

技术与方法

逆转录—聚合酶链反应同步法检测血清 HCV RNA 方法的建立与应用

杨建民 刘为纹 罗元辉 (第三军医大学西南医院消化内科) 630038

丙型肝炎病毒(HCV)RNA 的检测,国外虽已有较多报道[1,2,3],国内广州和北京也建立了类似的方法[4,5]。但现行的检测方法,由于将逆转录(RT)合成 cDNA 和聚合酶链反应(PCR)分步进行,既繁琐费时,又耗资很大。为此,我们就血清 HCV RNA 的检测方法进行了一些探索,根据逆转录酶和 DNA 聚合酶活性均依赖镁离子,DNA 聚合酶在 42℃左右可长时间保持活性并具有聚合能力的原理,建立了 RT-PCR 同步扩增法。

1 材料与方法

1.1 试剂来源

引物:为 HCV 序列非编码区的两组引物。外引物起自 250R 和 7,分别为 22 和 21NT,扩增片段长 244bp;内引物起自 190R 和 46,两端外接含限制酶位点各 9NT,共各 28NT,扩增片段长 163bp[4]。由中科院上海细胞所合成。

AMV 逆转录酶(批号 115902)购自 Promega 公司。DNA 聚合酶(LY112-004)、RNasin(SL114)及四种脱氧核苷酸(dNTP)均由华美公司提供。HCV 抗体 EIA 试剂盒由上海科华公司提供。

1.2 血清标本

HCV 抗体阳性的慢性肝病 19 例,献血员 2 例;HCV 抗体可疑阳性的慢性肝病 3 例。

1.3 HCV RNA 提取

按 Garson[1]和周荣[4]等方法进行。血清 100μl 经 SDS 裂解、蛋白酶 K 消化、酚氯仿抽提和乙醇沉淀后,以半导体冻干机抽干,沉淀物溶于 10μl 水中,于-70℃冻存,作为待检样品。

1.4 cDNA 合成与扩增

RT 和第一轮 PCR:在同一反应管中一次完成,反应体积 20μl。取待检样品 5μl,加入反应混合液 15μl(其中含外引物各 10pM,逆转录酶 2^U,RNasin 10^U,DNA 聚合酶 1.5^U)。于 42℃温育 40min,完成 RNA—cDNA 的合成过程。紧接着进行 35 周 PCR 循环。

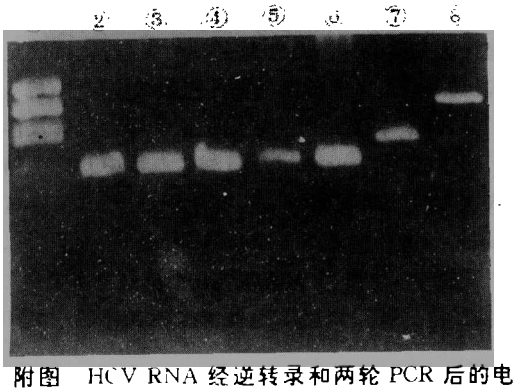
第二轮 PCR:反应体积 20μl。取上述产物 2μl,加反应混合液 18μl(含内引物各 10pM,DNA 聚合酶 1.4^U),循环 35 周。

扩增产物分析:取产物 10μl 在含溴乙锭的 2%琼脂糖中电泳后,紫外灯下观察荧光条带。以 pGEM-7zf(+) DNA Hae Ⅲ 酶切产物作为分子量标志。

2 结果

2.1 RT 和第一轮 PCR 同步法与分步法的比较

以两份血清按 Garson[1]和周荣等[4]的 RT 和第一轮 PCR 分步法先合成 cDNA,然后分别以 cDNA 和第一轮 PCR 产物为模板进行两轮 PCR 扩增,同时与本文方法作对比检测,结果相同,重复 4 次实验结果完全一致。扩增产物经与 HBV X 基因(228bp)和 HBV S 基因(413bp)的 PCR 扩增产物及 DNA 分子量标志对照,电泳位置符合 163bp。见附图。



附图 HCV RNA 经逆转录和两轮 PCR 后的电泳结果

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

①为 DNA 分子量标志；②～⑧为 HCV RNA 扩增产物(163bp)，其中②～④为同份血清，②以 RT 和 PCR 分步法检测，③～⑥以 RT-PCR 同步法检测；⑦为 HBV X 基因 PCR 扩增产物(228bp)；⑧为 HBV S 基因 PCR 扩增产物(413bp)。

2.2 方法敏感性

分别取 HCV RNA 阳性血清 15μl、30μl、60μl、80μl 和 100μl，以水补足 100μl，经裂解消化和抽提后检测，15μl 血清即可出现强阳性结果。

2.3 HCV RNA 在 HCV 抗体阳性血清中的检出率

21 例 HCV 抗体阳性血清中共检出 11 例，阳性率为 52.4%。其中，2 例献血员中检出 1 例，3 例慢性重症乙型肝炎中检出 2 例，6 例肝硬化中检出 5 例，10 例肝癌中检出 3 例。此外，在 HCV 抗体可疑阳性的 2 例肝硬化中检出 1 例，1 例肝癌未能检出。

3 讨论

由于现行的 HCV RNA 检测方法有前述的缺点，难以适用于大样本检测。本文方法使逆转录合成 cDNA 和第一轮 PCR 扩增在同一反应管中一次完成，只需使用一种反应缓冲液和一次加样，避免了 Garson 和周荣等方法使用 3～5 种反应缓冲液和两次加样的繁琐操作，可节省加样和反应时间 2 小时以上，使整个实验可于 14 小时内完成，且检测一份样本的成本费只需周荣等方法 50～60 元的三分之一。因此，这一基因诊断方法的建立，对丙型病毒肝炎的流行病学调查和实验与临床研究具有重要应用价值。

本组 HCV 抗体阳性血清中 HCV RNA 的检出率为 52.4%，说明多数 HCV 抗体阳性者存在病毒复制。未能检出 HCV RNA 的病例，可能为既往感染的免疫反应、抗体假阳性反应、病毒株不同的序列差异使引物难以互补结合或感染水平低于本文方法的检测极限所致。HCV 抗体可疑阳性病例中仍可检出 HCV RNA，提示 HCV 抗体不能检出全部 HCV 感染者，HCV 感染的诊断，尤其对现存感染，需依赖 HCV RNA 的检测来进行。

本组血清 HCV RNA 阳性的慢性肝病，血清 HBV 五项标志除 1 例肝癌全阴性外，其余病例均有二项以上标志阳性。表明 HCV 在重庆地区多以与 HBV 混合感染的形式存在。这种混合感染的临床效应问题值得进一步研究。

关键词 肝炎；病毒性；非甲乙型；核糖核酸；病毒；逆转录酶类

参考文献

1. Garson JA, Tedder RS, Briggs M, et al. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. Lancet 1990;335(8703):1419
2. Villa E, Ferretti I, Palma MD, et al. HCV RNA in serum of asymptomatic blood donors involved in post-transfusion hepatitis (PTH). J Hepatology 1991;13(2):256
3. Hagiwara H, Hayashi N, Mita E, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in serum of patients with chronic hepatitis C treated with interferon-α. Hepatology 1992;15(1):37
4. 周 荣 梁炽森 骆抗先。聚合酶链反应对输血后丙型肝炎的诊断研究。第一军医大学学报 1991;11(3):181
5. 杜绍财 陶其敏 孙炎，等。双 PCR 检测丙型肝炎病毒 RNA。北京医科大学学报 1991;23(6):429

(收稿：1992-04-03；修回：1992-05-06)

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