

· 技术交流 ·

HBV DNA 与 HCV RNA 同步 扩增技术的建立与应用^①

高志良^② 姚集鲁

(中山医科大学附属第三医院传染科; 广州, 510630)

提 要 同一份血清中的 HBV DNA 与 HCV RNA 经热变性直接法一步裂解, 先用针对 HCV 特异的外引物将 HCV RNA 逆转录为 cDNA, 然后采用 HBV, HCV 各自特异的 2 套引物进行 PCR 同步扩增。结果按预定大小, PCR 产物出现 2 条带, 分别为 428 bp, 144 bp。将产物转移至尼龙膜上, 经 α -³²PdCTP 标记 HCV 探针及地高辛素标记 HBV 探针进行重复杂交, 证明 144 bp 为 HCV 所特有, 428 bp 为 HBV 特有。用该方法对 30 份单独检测证实 HBV, HCV 核酸均阳性血清测验, 其结果完全吻合。该二联技术可明显缩短检测时间, 具有简便、快速、敏感的特点。

主题词 核糖核酸, 病毒/分析; 脱氧核糖核酸, 病毒/分析; 乙型肝炎病毒; 丙型肝炎病毒; 聚合酶链反应

中图分类号 R 512.63

近年来, 丙型肝炎病毒(HCV)所引起的肝炎正在成为又一种引起人们关注的疾病。同一个病人重叠 HBV 与 HCV 2 种肝炎病毒感染的情况并不少见^[1]。

应用 PCR(聚合酶链反应)技术检测肝炎患者血中 HBV DNA 或 HCV RNA 在国内外已逐步推行, 该技术可以判断病毒在体内的存在以及复制状态, 对疾病的诊断与药物疗效判断有较大的实用价值。一般的 PCR 检测 HBV DNA 约须 1 d 时间, HCV RNA 检测约须 2 d 时间, 本研究根据 PCR 的基本原理, 设计将同一方法抽提 HBV DNA 与 HCV RNA, 然后采用 2 种病毒各自特异的引物进行同一反应管中 PCR 扩增, 对 PCR 技术进行改良。该技术的建立能大大节省人力、物力及时间。

1 材料与方 法

1.1 HBV 与 HCV 引物设计

HBV 与 HCV 均设计嵌套式引物, 即各有 1 嵌套外引物与嵌套内引物。HBV 引物以 adr, adw 和 ayw 3 种亚型所共有 C 基因序列部位设计、参见文献[7]。其中外引物 B₁, B₂ 产物 664 bp, B₃ 与 B₄ 为内引物, 产物为 428 bp。HCV 引物以 HCV-J^[2] 序列 5' 末端编码区与 C 区设计。C₁: 5' - ACATCCAC-CATAGATCACT - 3' (6~24), C₂: 5' - TCACGTCTACCTCGAGGTT - 3' (512~494)。G₃: 5' - TTCACGCAGAAAGCGTC-TAG - 3' (446~65), C₄: 5' - GTTGATC-CAAGAAAGGACCC - 3' (190~171)。其中 C₁ 与 C₂ 为外引物, 产物为 506 bp, C₃ 与 C₄ 为内引物, 产物 144 bp。

1.2 血清 HBV DNA 与 HCV RNA 同步热变性及逆转录

裂解液采用 0.5% 的 2-巯基乙醇用热变性处理 2 种病毒核酸, 有关 HBV DNA 或

① 广东省科委资助课题; ② 第一作者, 1962 年出生, 男, 硕士, 副研究员

HCV RNA 均能用热变性法处理后直接扩增的方法参见文献[3]和[6],裂解上清直接进行逆转录^[3]。

1.3 第1次 PCR

反应体积30 μ l,含 B₁、B₂引物各10 pmol/L、C₁、C₂引物各20 pmol/L、200 μ mol/L dNTPs、5 \times Taq 酶 Buffer 6 μ l、Taq 酶 2 μ l、加入逆转录反应液中,30个周期循环。

1.4 第2次 PCR

引物为 B₃、B₄各20 pmol/L、C₃、C₄各30 pmol/L,余成分同 PCR-1,加 PCR-1产物10 μ l后进行30个循环。

1.5 产物分析

将 PCR-2产物10 μ l在含0.5 mg/L 溴化乙锭(EB)的琼脂糖凝胶上电泳(100 mA/100 V) 1h,然后在302 nm 的紫外光(UV)上观察结果,以同步电泳的 PBR 322/MSP I DNA 片段长度标准作为参照;PCR 产物428 bp 处为 HBV 条带,144 bp 处为 HCV 条带。日常检测时,可用相应的 HBV 与 HCV 阳性产物代替 Marker 作对照判断结果。

1.6 探针标记

HCV 探针系在其内引物 C₃与 C₄之间再设计1套引物: C₅, 5' - CGTTAGTAT-GAGTGTCGTGC (72 ~ 91), C₆, TG-GCAATTCGGGTGTA CTCA (162~143)经扩增后用 α -³²PdCTP 采用北京福瑞生物工程公司缺口平移试剂盒(批号:930401)标记。HBV 探针地高辛标记及检测试剂采用西德柏林格尔曼海姆中国有限公司产品,其 HBV DNA 探针为全基因型探针。

1.7 Southern 转印、重复杂交

将二联 PCR 产物经电转移至尼龙膜上,参见文献^[4],先用 α -³²P 标记 HCV cDNA 探针按 Sambrook^[5]法杂交及放射自显影。继之将同一张转移膜用0.4 mol/L NaOH 浸置,42 $^{\circ}$ C 30min 除去探针,0.1 \times SSC、0.5 \times SDS、0.2 mol/L Tris, pH 7.5 液中置42 $^{\circ}$ C 30min 以中和碱液,处理后的尼龙膜再次进行放射自显影,检查同位素探针被除去后,再

用地高辛素标记的 HBV 探针(杂交液适当用预杂交液稀释,且缩短杂交时间)重复杂交。

1.8 抗-HCV 试剂

该试剂由上海科华生物工程公司提供,吸光度(A)>0.19判为阳性。

2 结 果

2.1 二联 PCR 产物特异性鉴定

分析二联产物的特异性,图1为 EB 染色结果,以 PBR 322/MSP I DNA 片段长度标准为参照,428 bp 为 HBV DNA 阳性,144 bp 处为 HCV RNA 阳性。用同位素与地高辛素的重复杂交结果分别见图2、图3。结果所示, HCV RNA 在1、3相应位置上经放射自显影显示,1、2为碱性磷酸酶标记的地高辛素抗体底物显色,阴性对照4不显色,提示用2种不同病毒类型的引物进行同时 PCR 扩增,能分别产生2种特异的扩增条带。

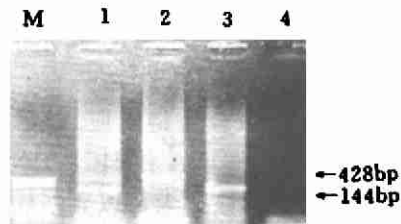


图1 二联 PCR 产物 EB 染色紫外光下分析
M, PBR 322/msp I DNA 片段长度标准; 1, HBV DNA、HCV RNA 双阳性; 2, HBV DNA 阳性; 3, HCV RNA 阳性; 4, 阴性对照

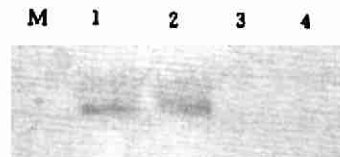


图2 地高辛素标记 HBV 探针杂交显色

2.2 敏感性与重复性试验

2.2.1 二联 PCR 法与单独 PCR 检测敏感性比较 30份单独检测证实为 HBV DNA 与 HCV RNA 双阳性血清,用二联 PCR 法

亦得到同样结果,提示二联法敏感性与单独检测的相同。



图3 α - ^{32}P 标记 HCV 探针杂交及放射自显影

2.2.2 重复性试验 6份 HBV DNA 与 HCV RNA 双阳性及2份阴性对照血清,分别于当天、隔天及第5天时,每份血清在3个管中(每管100 μl 血清),同时抽提及用二联 PCR 检测,结果阳性血清全部阳性,阴性对照全部阴性,重复性满意。

2.3 二联 PCR 技术检测应用

233份本科住院及门诊肝病病人血清标本分为4组:①组为 HBsAg(+),抗-HCV(+);②组为 HBsAg(+),抗-HCV(-);③组为 HBsAg(-),抗-HCV(+);④组为 HBsAg(-),抗 HCV(-)。用二联 PCR 技术进行检测,其对 HBV DNA 及 HCV RNA 检测情况见表。结果示:①组为乙、丙型肝炎指标均阳性,其 HBV DNA 阳性率 80.56%(58/72),HCV RNA 为 66.67%(48/72),而二者双阳性为 50%(36/72);抗-HCV 阴性组(②、③)中可检出 7.06%(6/85) HCV RNA,且在②组有 HBsAg 阳性血清中发现有 3.17%(2/63)重叠隐藏的 HCV 感染。

表1 233例肝病病人血清二联 PCR 检出 HBV DNA、HCV RNA 结果

组别	n	HBV DNA(+)	HCV RNA(+)	双阳性
1	72	22	12	36
2	63	54	—	2
3	76	1	49	—
4	22	—	4	—

3 讨 论

本研究所使用的为2种扩增完全不同基因的2套引物,在运用过程中解决了以下几个关键问题。

3.1 采用热变性法处理核酸模板

DNA 与 RNA 同时抽提用于 PCR 技术中 HBV 属 DNA 病毒,HCV 系 RNA 病毒。本文所采用的为热变性2种病毒核酸直接用于逆转录,该方法我们已报道^[3]。

3.2 逆转录过程对 DNA 的影响

HCV 为一单链正股 RNA 病毒,须先经逆转录过程使其转变为 cDNA 才进行扩增,由于本文逆转录仅采用 HCV 的 C₂引物,不含 HBV 引物,况且 HBV DNA 的双链在逆转录 43℃ 条件下不会解链,HCV 的引物只能引导特异的 HCV cDNA 合成,因此,逆转录过程对 HBV DNA 没有影响。

3.3 引物选择

经过严格筛选,选定 HBV 与 HCV 双套式引物之间没有互补序列,另一方面 HBV 与 HCV 在各自特异引物引导下所扩增的片段相差约 264 bp 左右,以方便 PCR 产物在紫外光上 EB 染色结果的判断。

3.4 产物分析

本研究采用的为双嵌套式 PCR,其特异性即相当于在 HBV 与 HCV 外引物扩增产物的序列中再用内引物扩增,如果第1次 PCR 扩增的产物为非特异性,那么,用内引物即无法扩增出相应的片段,如果嵌套式 PCR 阳性,则说明其为该引物所引导的是特异的目的基因片段。日常检测的判断则因为预先设计好 HBV DNA 与 HCV RNA 产生的条带相差约 264 bp,只要电泳时同时加入 DNA 分子量标准或者另外二联 PCR 阳性产物作对照,即可判断系 HBV 或 HCV,或者二者均阳性。本文对二联 PCR 产物经 Southern 转移至尼龙膜上,然后用同位素标记 HCV 探针,地高辛素标记 HBV 探针进行重复杂

交,证明该2种引物可以分别扩增出清晰的各自特异条带,其意义不仅使乙型、丙型肝炎病毒核酸能快速、准确的被扩增,而且对PCR技术本身亦增加了新的内容。

3.5 检测应用

对233份肝病病人血清检测,其HBV DNA与HCV RNA检出率均达到目前一般PCR的检出水平,其中HBV DNA与HCV RNA双阳性有50%在重叠感染乙型、丙型肝炎病毒感染者中被检出,而在抗-HCV阴性组中检出的7.06%的HCV RNA,可能与HCV感染早期者的存在或抗-HCV试剂的假阴性有关。

参 考 文 献

- 1 山田村圭二. 丙型肝炎病毒与其它病毒的重叠感染. 日本医学介绍, 1992, 13:156
- 2 Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, *et al.* The

5'-terminal sequence of hepatitis C virus genome. *Jpn J Exp Med*, 1990, 60:167

- 3 高志良,姚集鲁. 热变性法处理HCV RNA模板直接扩增. 中山医科大学学报, 1994, 15(3): 223
- 4 吕 凌,姚集鲁,彭文伟. 随机引物引导的乙型肝炎病毒DNA探针标记和重复杂交. 中山医科大学学报, 1992, 13(2):21
- 5 Sambrook J, Fritch E, Maniatis T. 著. 金冬雁,黎孟枫,张 励,等译. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京:科学出版社, 1992. 538~569
- 6 高志良,姚集鲁,吕 凌,等. 简化HBV DNA抽提用于多聚酶链式基因扩增. 中山医科大学学报, 1993, 14(3):232
- 7 卢红艳,姚集鲁,吕 凌,等. Nested PCR检测HBV DNA技术的建立与应用. 中山医科大学学报, 1992, 13(3):48

(1994-05-31收稿 1995-01-22修回)

APPLICATION OF A NEW TECHNIQUE FOR SIMULTANEOUSLY AMPLIFYING WITH HBV DNA AND HCV RNA IN SERUM

Gao Zhiliang Yao Jilu

(Department of Infectious Diseases, The 3rd Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

A new technique which amplified HBV DNA and HCV RNA in serum at the same time was established. The template was extracted by a hot-denatured method. Reverse transcription was carried out, used primer derived from HCV genome alone, then HBV DNA and HCV RNA was amplified simultaneously by HBV and HCV nested primers respectively. The preassigned size of amplified products was 428 bp and 144 bp, which were determined in ethidium bromide (EB) stained agarose gel after electrophoresis under ultraviolet(UV) light. The products were electrophoretically transferred to nylon membrane and rehybridized with α -³²P and digoxisine-labelled probes of HCV and HBV respectively.

Subject headings DNA, viral/analysis; RNA, viral/analysis; hepatitis B virus; hepatitis C virus; polymerase chain reaction