

· 技术交流 ·

# 热变性法处理 HCV RNA 模板直接扩增<sup>①</sup>

高志良<sup>②</sup> 姚集鲁

(中山医科大学附属第三医院传染科,广州,510630)

**提 要** 采用低浓度 2-巯基乙醇作为裂解剂,配合高热变性处理血清等标本中丙型肝炎病毒核糖核酸(HCV RNA)模板,将裂解上清直接逆转录,使 HCV RNA 转变为 c DNA,再行套式多聚酶链反应(PCR)扩增。58 份抗-HCV 阳性血清标本中,可检出 32 份(55.2%)HCV RNA,虽与常规的酸酚抽提方法所检出相当(即 30 份被检出 HCV RNA 阳性,51.7%),由于这种直接法省去了用酚及氯仿抽提和醇类沉淀等步骤,具有明显的实用价值。

**关键词** 热变性; 丙型肝炎病毒; 核糖核酸; 多聚酶链反应

**中图分类号** R512.63

丙型肝炎病毒核糖核酸(HCV RNA)的检测对丙型肝炎诊断、药物(如干扰素)治疗疗效判断等有重要价值。HCV RNA 在感染早期即可由外周血检出,且滴度的高低反映病毒的复制状况。

PCR(多聚酶链反应)技术检测 HCV RNA 自 1989 年开始至今,已在许多实验室开展,但由于该技术受影响因素多,在实际应用当中,仍难为所有医疗单位使用。除了逆转录及 PCR 本身的因素之外,HCV RNA 模板处理相当重要。RNA 易受外界环境中核酸酶的作用而降解,因而从标本收集到 PCR 扩增这阶段应尽量缩短时间及减少中间步骤。常用的 RNA“酸酚酚一步法”<sup>[1]</sup>抽提技术对有关试剂的要求较高,如异硫氰酸胍溶液浓度及配制方法要精确,市售的苯酚先需重蒸,再用 Tris(三羟甲基氨基甲烷)平衡或水饱和,无水乙醇沉淀,低温过夜,高速离心沉淀等。本研究采用核酸处理方法中的“热变性”方法,加上低浓度 2-巯基乙醇作为标本处理裂解液,经处理的 HCV-RNA 模板被直接用于逆转录-PCR 检测。

## 1 材料与方 法

### 1.1 裂解液

0.5% 2-巯基乙醇(2-mercaptoethanol), 稀释液用去离子三蒸水。

### 1.2 引物设计

参照 HCV-J<sup>[2]</sup>序列 5'-端非编码区自行设计,委托上海细胞生物所合成。HCV RNA 非编码区引物为:①C<sub>1</sub>; 5'-ACATC CAACA TAGAT CATC-3'(5~23); ②C<sub>2</sub>; 5'-TCACGTCTAC CTCGA GGTT-3'(512~494); ③C<sub>3</sub>; 5'-TTCAC GCAGA AAGCG TCTAG-3'(46~65); ④C<sub>4</sub>; 5'-GTTGA TC-CAA GAAAG GACCC-3'(190~171)。其中 C<sub>1</sub> 与 C<sub>2</sub> 为外引物,C<sub>3</sub> 与 C<sub>4</sub> 为内引物,产物大小为 145 bp。

### 1.3 热变性法处理

HCV RNA 模板直接扩增技术(以下用 HDD 简称)。

1.3.1 标本热变性 在 0.5ml 离心管中加裂解液 5ul,待检标本(血清、尿液等)50ul,95℃15min,11 000r/min 离心 5min。

1.3.2 逆转录反应 C<sub>1</sub> 与 C<sub>2</sub> 引物各 20pmol/L、2mmol/L dNTPs(4 种三磷酸去氧核糖核苷的混合物)1ul、1U/ul Rnasin(核

① 广东省科委青年基金项目

② 第一作者,32 岁,硕士,助理研究员

糖核酸抑制剂)、AMV(鸟成糖细胞白血病毒,一种逆转录酶, promega 产品)4U、5×AMV buffer 2μl,用去离子三蒸水稀至 5μl,再加裂解上清 5μl,反应体积 10μl,42℃ 15min。

1.3.3 第1次 PCR(PCR-1) PCR-1 反应液 20μl 中含 C<sub>1</sub> 与 C<sub>2</sub> 引物各 20pmol/L、2mmol/L dNTPs 3μl、Taq 酶(耐热 DNA 多聚酶;华美公司产品)0.75 U、10×Taq 酶 buffer 3μl,;加至逆转录反应管中,反应体积 30μl,上覆 30μl 石蜡油,在 T/C<sub>1</sub> 型 DNA 热循环仪(perkin elmer cetus)上 94℃3min 后,94℃50s、52℃50s、72℃80s,30 个循环,最后 72℃延长 6min。

1.3.4 第2次 PCR(PCR-2) PCR-2 反应液 20μl 中,引物为 C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 各 20pmol/L,其它成分同 PCR-1,加 PCR-1 扩增产物 10μl,反应体积 30μl,热循环温度,时间同 PCR-1。

1.3.5 产物的分析 将 PCR-2 扩增产物 10μl 在含 0.5μg/ml 溴化乙锭(EB)的 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳 1h,紫外灯上(236nm)观察结果,以同步电泳的 PBR322/ms PI DNA 分子量标准作参照,145 bp 处有荧光条带者判为 HCV RNA 阳性。

所有 PCR 使用的试管,一次性吸头经高压处理,三蒸水经 0.05% 二乙基焦碳酸盐(DEPC)放置过夜,开盖 30min 让 DEPC 挥发。移液器接头使用前用 0.5% 吐温清洗,擦干后使用。

#### 1.4 检测标本

本科门诊及住院病人血清。其中丙型肝炎 58 例、甲型肝炎 6 例、乙型肝炎 15 例、正常人 10 例。

#### 1.5 抗-HCV 检测试剂

含 HCV 结构与非结构区合成肽包被固相板,检测 HCV 感染后抗体,该试剂盒由上海“科华”试剂厂提供。

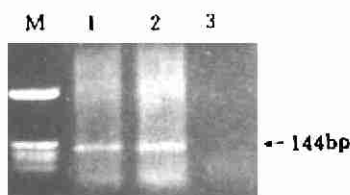
## 2 结果

### 2.1 裂解液浓度对 HDD 技术的影响

采用的 2-巯基乙醇(1.12g/ml,1mol/L =78g)经不同稀释度使用,以 0.5%(重量/体积)以下浓度效果较好,>1%浓度其后的逆转录-PCR 结果不理想。

### 2.2 产物 EB 染色结果

将 2 份 HCV RNA 阳性及 1 份阴性对照标本经 PCR 扩增后,取 PCR-2 产物 10μl 加凝胶载样液 3μl 在含 0.5μg/ml EB 的 2% 琼脂糖凝胶电泳,与同步电泳的 PBR322/msPI DNA 分子量标准进行比较,145 bp 处有荧光条带(紫外光透射)者为 HCV cDNA 阳性。见附图所示。



附图 PCR 产物 EB 染色结果

M, PBR322/ms PI DNA 分子量标准;1、2,为 HCV cDNA 阳性产物;3,阴性对照

### 2.3 重复性试验

将 HDD 法检出阳性的血标本 10 份,用同一方法重复 2 次,有 7 份 3 次均阳性,完全稳定占 70%,有 2 份 2 次阳性,有 1 份不能重复。

### 2.4 检出应用比较

与常规的“酸胍酚一步法”抽提 HCV RNA 方法比较,除抽提不同外,两种方法逆转录-PCR 的成分(包括引物、dNTPs、Taq 酶及 buffer 等均完全相同。检测 58 份抗-HCV 阳性丙型肝炎病人血清标本,HDD 法 32 例阳性,酸胍酚法 30 例阳性。而选择的抗-HAV-IgM 阳性的甲型肝炎血清标本 6 份、乙型肝炎患者 15 份、正常人 10 份用以上两种方法检测 HCV RNA 全部阴性。

### 2.5 HDD 法对尿液检测

对 54 例丙型肝炎病毒感染者(无 HBV、HDV、HAV、HEV 感染标志,抗-HCV 阳性、血清 HCV RNA 至少 1 次阳性)尿液经

1900r/min 离心 20min,吸上清 50 $\mu$ l 作标本,用 HDD 法可检出 9 份 HCV RNA 阳性。

### 3 讨论

HCV 系单股正链 RNA 病毒,由于其基因易变,在不同国家和地区已发现不少于 5 型 HCV 基因型<sup>[3,4]</sup>。由于 HCV 5' 末端非编码区变异较少,故普通选用该区设计引物检出率较高。

有关 PCR 技术扩增 HCV RNA,以 PCR 技术本身而言,其影响的环节,如,引物选择、PCR 反应液中成份比例、循环温度与时间等可以相对固定,而核酸模板的处理系 1 个关键因素之一。本研究采用热变性处理 HCV RNA 模板方法,源于最简的核酸抽提技术,该方法在 HBV DNA 技术中已广泛采用<sup>[6]</sup>。本文单用 2-巯基乙醇作为裂解剂一起热变性,实验发现当其浓度在 0.5% 左右时其检测效果可达到常规“酸胍酚一步法”的检出率,>1% 浓度时则扩增不出。虽然 HDD 法与常规法效果相似,但因其无须酚一氯仿抽提及乙醇沉淀,操作步骤少,有明显的实用价值。

HDD 法所以能用于 HCV RNA 模板处理,可能与以下因素有关:① 95 $^{\circ}$ C 高温下加上低浓度裂解液可使标本中大部分蛋白变性,经离心后部分 RNA 与蛋白分离而游离于上清中。另一方面,高温下标本中核酸酶完全灭活,可避免其对 RNA 的降解。② HCV 感染者外周血及分泌液(如汗液、唾液、精液等)中很少检出病毒抗原<sup>[5]</sup>。一般认为 HCV 在体内产生的蛋白,初时为一大分子蛋白,继之很快被分解为小分子蛋白,真正随核酸一起包装到外周血的蛋白有多少仍不清楚,HCV RNA 在外周血中是裸露抑或有包膜目前仍未定论。HDD 法用低浓度开壳剂(2-ME)加上热变性能游离出病毒核酸用于 PCR 检测,亦间接说明 HCV RNA 外周蛋白

可能不多。③ HDD 法之所以有较好的应用效果,与其操作步骤少有一定关系,核酸抽提的中间步骤越少,物理损伤及核酸酶分解的机会就越少,被扩增的模板量就越多,且 PCR 操作步骤越简单,越利于推广应用。

HDD 法不仅适应于血标本,对 54 例 HCV 感染者尿标本进行检测,有 9 例(18.4%)扩增出 HCV RNA 阳性条带(另文详述),因而该法亦适应于尿液标本 HCV RNA 的检测。

### 参 考 文 献

- 1 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal biochem*, 1987, 162 : 158
- 2 Okamoto H, Okada S, Xugiyama Y, et al. The 5'-terminal sequence of hepatitis C viral genome. *Jpn J Exp Med*, 1990, 60 : 167
- 3 Houghton M, Weiner A, Han J, et al. Molecular biology of the hepatitis C Viruses, implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*, 1991, 14(2) : 381
- 4 杜绍财,陶其敏,朱 凌,等. 丙型肝炎病毒基因 5'-末端非编码区酶切分型研究. *中华医学杂志*, 1993, 73(1) : 1
- 5 Choo QL, Kuo G, Amy J, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis B virus DNA in Patients with chronic hepatitis genome. *Science*, 1989, 244 : 359
- 6 Kaneko S, Miller R, Feinstone S, et al. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86 : 312

(1993-09-13 收稿 1993-11-16 修回)

## DIRECT AMPLIFICATION OF HCV RNA GENOME

Gao Zhiliang      Yao Jilu

(Department of Infectious Diseases, the Third Affiliated Hospital Sun Yat-Sen  
University of Medical Sciences Guangzhou, 510630)

0.5% 2-mercaptoethanol was added to samples of serum or urine, then the samples were heated at 95°C for 15min. After centrifugation for 5min, the supernate was directly used for reverse transcription of HCV RNA into cDNA. Then a nested PCR was performed using the Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler. Compared with acid guanidium thiocyanate phenol chloroform (AGPC) extraction, the present method had a similar positive detection rate for HCV RNA.

**Key words** hot-denature; hepatitis C virus; RNA; polymerase chain reaction

\*\*\*\*\*

· 新成果 ·

### 结膜、角膜与巩膜切除联合板层角巩膜移植 治疗蚕蚀性角膜溃疡的应用推广

课题负责 龚向明

(中山医科大学附属眼科医院, 广州, 510060)

蚕蚀性角膜溃疡是一种难治的眼病,且手术后易复发,课题组总结过去各学者的失败教训,创建了角结膜、巩膜切除联合板层角巩膜移植术新方法,使手术治愈率提高到97.3%,取得满意的疗效,同时,手术方法易于掌握,便于推广。该成果1987年获奖后,继续进行了大面积的推广,得到同行的承认和推广应用,已有山东、吉林、广东、广西、陕西和甘肃等省市医院及本单位应用此手术方法治疗病例达500多例,治愈率均在90%~100%,复发率很低,收到了显著效果,证明该方法是目前治疗蚕蚀性角膜溃疡最好的方法,具有很强的应用性和推广价值,该手术方法具有一定的独创性,1993年获卫生部推广奖三等奖。

(陈丽芳)