维普资讯 http://www.cqvip.com

65-70

第8卷第1期
1993年3月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.8 No.1
Mar.1993

Nested double PCR法对献血者血浆中HCV-RNA的检出

——兼评作为献血筛选试验的Anti-HCV抗体检查*

(11)

余俊平

(武汉市中心血站，武汉430030)

森铁男　深田谦二

(日本国福冈县赤十字血液中心，日本，818)

R446.119
R446.5

提　要

本文报道了在位于5'端非编码区的引物的诱导下用Nested double PCR技术检测献血者血浆中HCV-RNA的方法。我们发现Nested double PCR敏感性及特异性均优于单次PCR。anti-HCV（C100-3）阳性血浆样品中只有35.2%（19/54）能同时被证实为PCR阳性。由于anti-HCV（C100-3）假阳性率太高，作为献血筛选试验检测方法不能令人满意，而本文报导的Nestel double PCR方法可以弥补anti-HCV试验的不足。

关键词：HCV-RNA　献血者　HCV基因　anti-HCV抗体（C100-3）　Nested double PCR

自1989年[1]首次丙型肝炎病毒（Hepatitis C-type virus, HCV）cDNA克隆成功以来，一些抗丙型肝炎病毒抗体(Auti-HCV antibody)检测试剂相继面世，并广泛用于临床诊断、献血者筛选等方面。然而，与甲型肝炎及乙型肝炎血清学诊断系统不同的是，丙型肝炎诊断系统缺少相应的丙型肝炎病毒关联抗原的血清学检测方法。由于病毒关联抗原的有无直接和被检者感染与否有关，因此建立灵敏、简易、快速的丙型肝炎病毒关联抗原的检测方法成了丙型肝炎诊断的当务之急。近年出现的多聚酶链反应（Polymeraase Chain reaction, PCR,[2][3]是一项应用广泛的新的分子生物学技术，将其用于检测特定病毒基因的存在具有快速、灵敏、准确等优点。Nested double多聚酶链反应（Nested double PCR）是这一方法的改进，其特点是特异性更强，灵敏度更高。本文采用的Nested double PCR技术，并将两对引物选在最近才弄清楚的位于HCV基因组Core区前的5'端非编码区，检测用Ortho公司anti-HCV（100-3）试剂检测判为阳性的54份血浆样品中是否含有相应的丙型肝炎病毒基因（HCV-genome），并以此对anti-

本文于1992年6月5日收到，6月23日修回。

*本文为作者1991年在日本进修期间完成。

维普资讯 http://www.cqvip.com

HCV 试验作为献血筛选试验进行评论。

材 料 与 方 法

1. 标本来源 标本来源于日本国福冈县赤十字血液中心，采用 Ortho 公司 anti-HCV（C 100-3）试剂检查判为阳性的新鲜血浆，连续收集10天，共54份标本。收集后标本分装两份迅速置于－40℃冰箱直至 PCR 技术进行前。抗体检查方法按 Orth 公司[4]提供的步骤进行，系由福冈血液中心检查二课森铁男先生完成。

2. RNA提取及cDNA制备 参照文献报导的方法提取血浆 RNA 并制备cDNA. PEG-8000, DEPE, DTT, dNTP, RNase 抑制物（RNase inhibitor）, MMLV 逆转录酶均为 Takara Biochemiicals 产品，glycogen 为 Boehringer Mannheiuc 公司产品、为确保 RNA 不被降解，RNA 制备好后立即逆转录成 cDNA，逆转录所用引物为下文所述的 HCp-2。制备好的 cDNA 保存于－20℃冰箱。

3. Nested double PCR HCV 的基因按图1所示的方法进行扩增。所用两对引物均处于 HCV 基因组 Core 区前的 5' 非编码区，由 Takara Biochencicals 公司合成。第一次扩增所用引物是：

HCp-1（5'-CTGTGAGGAACTACTGTCTT（28-47）

HCp-2（5'-AACACTACGCGGCTAGCAGT）（248-229）

反应液总体积是25μl，含10mmol/L, Tris-HCl, pH8.3, 50mmol/L KCl, 15mmol/L MgCl2, 0.01% gelatin（明胶：片山化学），四种dNTP 各250μmol/L，引物各 40ng，0.725U Taq DNA Polymerase（Perkin-Elmer Cetus），2.5μl cDNA 溶液，反应液覆以2滴矿物油，反应于500μl Eppendorf 管中进行。温度程序是：变性 94℃，1min（第一轮5分钟）；退火 60℃，1min；延伸72℃1min（最后一轮 5 min）。共37轮。第二次扩增所用引物为：

HCp-3（5'-TTCACGCAGAAAGCGTCTAG）（46-65）

HCp-5（5'-GTTGATCCAAGAAAGGACCC（190-171）

反应总体积是25μl，取第一次扩增产物2.5μl 作为第二次 PCR 的模板 DNA，反应液组成及反应温度程序同一次 PCR，共27轮。操作用 Perlein-Elmer cetur DNA thermal cycler 自动进行。图1。

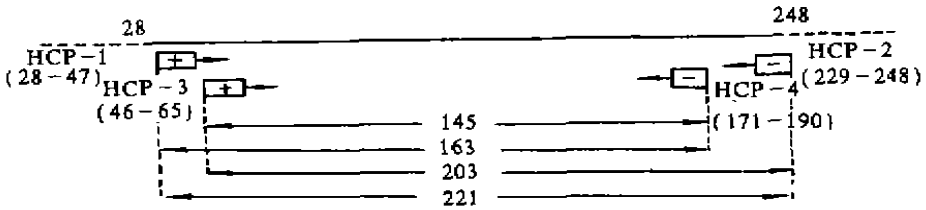

图1 Nested double POR 法扩增 HCV-cDNA 5'端非编码区。
第一次 PCR 以 HCP-1 和 HCP-2 为引物。
第二次 PCR 以 HCP-3 和 HCp-4 为引物
图中所示距离以碱基对计算。

Fig 1. The amplification of HCV-cDNA 5'-terminal non-coding region by the nested double PCR method.
The first PCR carried out witb primers HCp-1 and HCp-2.
The second PCR carried out witb primer HCp-3and HCp-4.
The distances in the figure are measured by bp.

维普资讯 http://www.cqvip.com

4. Size Marker 的制备　质粒 PUC18 及限制内切酶 Hpa Ⅱ 均为 Takara Biochemicals 公司产品，按产品说明书制备 Size marker，制备好后置 4 ℃冰箱保存备用。

5. PCR 产物的分析　5μl PCR 产物与 2.5μl Loading butter 一起在 10% 的聚丙烯凝胶上按常规法进行电泳，电泳缓冲液是 TBS'（pH8.0），电泳完毕后进行溴化乙锭染色及紫外灯下观察照像。

结　果

1. 丙型肝炎病毒 RNA 的检出：

部分标本一次 PCR 扩增及 Nested double PCR 扩增产物电泳图像见图 2，编号 S 是 Size marker，左边是一次 PCR 扩增产物，右边是 Nested double PCR 扩增产物。一次扩增产物电泳图背景很深，未见明显的目的带（221bp），Nested double PCR 扩增产物电泳图背景清晰，目的带处（145bp）可见明显的电泳带。未见电泳带的标本不含 HCV-RNA，判为阴性。

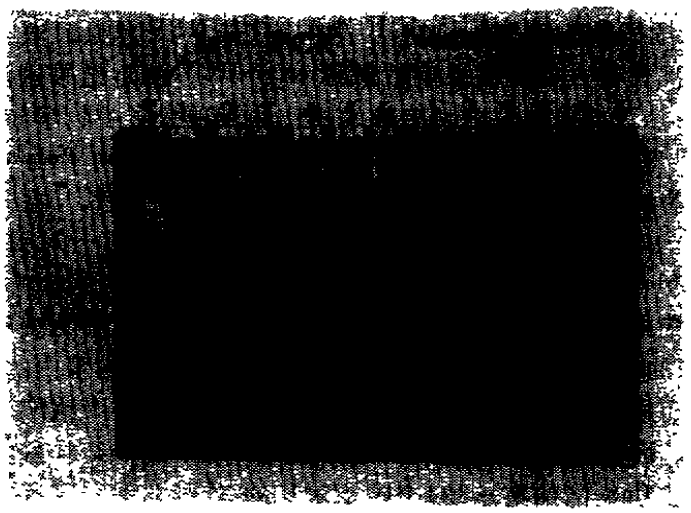

图 2　PCR 产物的 PAGE 电泳图像，S 为 Size marker，1—6 为血浆 RNA 来源的 cDNA。左边为第一次 PCR 产物，右边为以第一次 PCR 产物为模板 DNA 的 Nested double PCR 产物。

Fig 2. PAGE of PCR products. S: size marker; 1—6: cDNA produced from plasma RNA; Left: the 1st PCR products. Right: The nested double PCR products using the 1st PCR products as template DNA

2. Anti-HCV 抗体测定与 PCR 结果比较

54份 anti-HCV 阳性标本按 ELISA 消光值大小分成三个组：①消光值大于2.000；②消光值大于1.000小于2.000；③消光值小于1.000大于Cut off值。比较结果见表 1；

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 *Anti-HCV* 抗体血清学测定与PCR结果比较

Tab 1. Comparation of anti-HCV antibody serological assay and the result of PCR

Anti-HCV ELISA O.D.值 Anti-HCV ELISA O.D.Value	血浆标本数 No. of plasma samples	PCR 阳性数 No. of PCR positive	PCR 阳性率 Percentage of PCR positive
O.D.>2.000	12	14	63.6%
1.000<O.D.<2.000	15	4	26.7%
O.D.<1000	17	1	5.9%
总 计 Total	54	19	35.2%

讨 论

虽然anti-HCV抗体血清学方法已初步建立，但作为病毒活性、感染性标志的HCV关联抗原的血清学检测方法却迟迟未能建立。这可能是因为与其它血液传播性疾病相比，HCV在血液中含量极微（约10^3—10^6CIC/ml，只是HBV感染时浓度的1～10万分之一）[6]。这一状况使得人们无法准确地解释anti-HCV测定结果进而准确地诊断丙型肝炎。多聚酶链反应是可与限制性内切酶技术相比的一项分子生物学技术，该法采用处于欲扩增的目的DNA序列两端的特定引物，利用耐热多聚酶Taq Polymerase对该目的DNA序列进行扩增。Nested double PCR是PCR技术的一种改进，在普通的第一次PCR之后，选择另外一对处于第一次PCR产物DNA序列内侧的另一对引物进行第二次PCR。采用Nested double PCR方法不需使用放射性同位素即可清楚地观察到扩增的DNA序列，而且可以改变由于非特异性扩增引起的电泳背景模糊，使之变得清楚明瞭。PCR技术用于HCV基因的检测[7][8]，过去多把选物选在编码非结构蛋白的基因区，由于该区易发生变异[9]，而成功的PCR要求引物与目的DNA序列，严格配对，所以易出现假阴性结果。1990年，冈本（Okamato）等[10]报道了HCV编码结构蛋白的全部基因组核苷酸序列，并报导了Core区前有－324个碱基对长的5′端非编码区存在。此非编码区即使在显示明显变异的HCV各株之间亦有很好的同一性。本文所用的二对引物HCp-1、HCp-2及HCp-3、HCp-4处于该区，已有报导[11]此二对引物优于其它引物。研究结果显示，在此二对引物的诱导下，能成功地检测出血液中RNA的存在，Nested double PCR的灵敏性及特异性明显优于以Hcp-1、HCp-2、为引物的一次PCR。在目前缺乏相应的血清学检测手段的情况下，Nested double PCR法可作为检测HCV基因存在与否的一种方法，对anti-HCV抗体试验作进一步的确认，这对提高anti-HCV试剂在临床诊断中的准确性无疑起到补充和校正作用。

另一方面，作者收集的54份被检测为anti-HCV（C100—3）阳性的血浆样品中，只有19份被检查为PCR阳性，阳性率仅为35.2%。PCR结果与ELISA消光值之间有一定的关系，但没有绝对关系。即使ELISA消光值大于2.000，亦有36.4%的标本为PCR阴性；消光值小于1.000时亦有5.9%为PCR阳性。看来为提高anti-HCV试验的

维普资讯 http://www.cqvip.com

特异性，减少假阳性结果而单纯提高anti-HCV（C100-3）抗体的Cut off值并不能解决问题。

就输血机构来说，一方面，引入anti-HCV试验作为献血筛选试验，使判定丙型肝炎病毒携带者有了一个较明确的指标，大大优于以前单靠一些辅助指标(如ALP、anti-HBc等）进行间接推测，对于降低由于输血引起的输血后丙型肝炎（Posttransfusion hepatitis C）的发病率无疑是一有力的措施。但是由于该试验假阳性率高(64.8%），该试剂的引入势必使大量血液中并不存在丙型肝炎病毒因而也就没有传播丙型肝炎危险的anti-HCV阳性献血者视为不合格，失去了大量宝贵的献血队伍。此外，作为对献血者健康管理的一项服务措施，已有国家（日本）将献血化验的结果，不合格原因等内容通知给献血者本人，这时大部分所谓anti-HCV阳性结果只会给本是健康献血者心理上、精神上带来不必要的负担。总之，单就其特异性来说，anti-HCV（C100-3）试验是不能令人满意的。而Nested double PCR技术检测血浆中HCV基因具备敏感度高，特异性强、操作容易等优点，值得推广，以弥补anti-HCV试验之不足。

参考文献

〔1〕 Choo QL et al., 1989, *Science*, **244**: 359.

〔2〕 Mullis KB et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant, Biol.* **51**: 263.

〔3〕 Saiki RK et al., 1986, *Nature* (London)**324**: 163.

〔4〕 Kuo G. et al., 1989, *Science*, **244**: 362.

〔5〕 Garson J.A. et al., 1990, *Lancet*, **335**: 1419.

〔6〕 柳昌幸等，1991日本临床，**49**(2)：292。

〔7〕 Weiner AJ et al, 1990, *Lancet*, **335**: 1.

〔8〕 Kaneko S et al, 1990, *Lancet*, **335**: 976.

〔9〕 加藤宣之等，1991，日本临床，**49**(2)：286。

〔10〕 H. Okamoto et al, 1990, *Japan J. Exp. Med.* **60**: 167.

〔11〕 H. Okamioto et al, 1990, *Japan J.Exp.Med.* **60**: 215.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Detection of HCV-RNA in Plasmas of Blood Donors by Nested Double Polymerase Chain Reaction Method——And the Evaluation of Anti-HCV Antibody Test as a Blood Donation Screening Assay

Yu Junping

(*Wuhan Blood Transfusion Center, Wuhan* 430030)

Tetsuo Mori et al

(*Japanese Red Cross Fukuoka Blood Center, Japan* 818)

In this paper we reported the detection of HCV-RNA in plasma of blood donors by nested double polymerase chain reaction method using two pairs of primers located in the 5'-terminal non-coding region. We found that nested double PCR method is much better than single PCR method both in sensitivity and specificity. And we also found that only 35.2% (19/54) of anti-HCV (C100-3) positive plasma samples can be confirmed to be also PCR positve. We concluded that because the false positve rate of anti-HCV ELISA is too high to be satisfactory in today's blood transfusion practice, and nested double PCR method is useful in compensating the disadvantages of anti-HCV test.

Key words: HCV Blood donors HCV-genome Anti-HCV antibody (C100-3) Nested double PCR