119—124
维普资讯 http://www.cqvip.com

第9卷 第2期 中 国 病 毒 学 Vol. 9 No. 2
1994年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1994

血清 HCV RNA NS_5 基因的检测及其意义

郭林生 唐振亚 郝连杰
(同济医科大学同济医院临床免疫研究室,武汉 430030)
高田昭* 伊达孝保**
(日本金泽医科大学,*消化内科,**生化1,日本)

提要 利用源自 NS_5 和 5′-UTR 引物进行丙型肝炎病毒(HCV)RNA 基因片段的逆转录-套式多聚酶链反应(RT-nested PCR)检测。对 35 例随机选择的抗 HCV Ab(+)血清的检测结果表明,两种引物检测结果的敏感性无显著性差别。利用 NS_5 区引物扩增的片段可与 5 种不同型别的 HCV RNA 亚基因探针很好地结合和显色,说明 NS_5 基因可以利用于 HCV RNA 的基因分型。对 131 例抗 HCV Ab(+)血清进行了 NS_5 基因检测,检出率为 52.68%(69/131),其中,除 HCC 和 CRF 组检出率分别为 16.67%和 34.68%,其余各组均在 50～80%之间。献血组、献浆组和免疫球蛋白中 HCV RNA 的检出率分别为 66.61%,54.45%和 57.14%,说明应用未经筛查的血液及血制品中有很高的感染危险性。22 例抗 HCV Ab(−)NANBH 患者中有 8 例第 2 次 PCR 后确证为 HCV RNA(+),表明 1/3 与低水平的 HCV 感染有关。

关键词 HCV RNA NS_5 基因,抗丙型肝炎病毒抗体,逆转录-套式多聚酶链反应

在丙肝肝炎病毒(HCV)基因组中,3′-末端上游含有一约 1500 个核苷酸编码 RNA 依赖性 RNA 多聚酶的非结构基因,称为 NS_5 基因[1]。初步研究结果表明,该基因变异率较高,被认为是监测 HCV 基因组变异和基因分型最佳选择片段[2]。关于 NS_5 基因在 HCV 感染者血清中的存在状况、表达活性同病毒复制、病情变化以及抗体免疫应答之间的关系,尚有待进一步研究。本文报道 HCV 感染血清中 NS_5 基因的检测结果,并就其代表的意义进行了初步探讨。

材料与方法

1 血清标本 共 205 份。采自全国部分省市和地区各型肝病患者,接受血液透析治疗的慢性肾功能衰竭者,献血(浆)者和受血治疗的非肝病患者。还有部分为免疫球蛋白制剂。其中 22 份是临床诊断为非甲非乙型肝炎(NANBH)而抗 HCV-Ab(−)的血清标本。标本采集后,−20℃冻存待检。

2 抗 HCV 检测 所有血清标本均经上海科华实业生化公司的抗 HCV ELISA 试剂筛选,再采用美国 Chiron 公司第二代抗 HCV ELISA 试剂复查。操作及结果判断严格按照试剂说明进行,两种试剂检测结果均为阳性者判为抗 HCV Ab(+)。

3 逆转录-套式多聚酶链反应 本文用于 HCV RNA NS_5 基因扩增的引物序列见表 1。

* 本文于 1993 年 2 月 22 日收到,9 月 7 日修回。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 用于RT-nested PCR的引物序列

Table 1 The sequences of primers used in RT-nested PCR

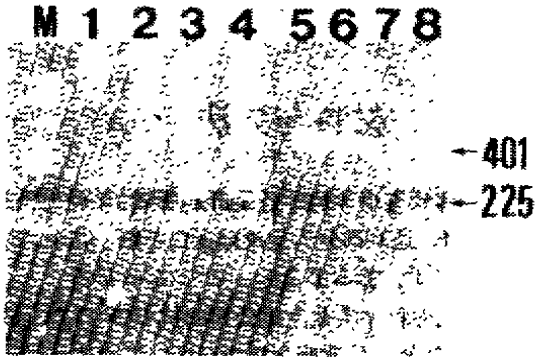
引物 Primer	序列(5'-3') Sequences	部位 Position	产物大小 Fragment
外 External			
sense	TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTCCTTGA	NS_5 区	401bp
Antisense	GGCCGAATTCCTGGTCATAGCCTCCGTGAA	NS_5 Region	
内 Internal			
Sense	TCCGGTTATTGCCCTTGTCGCGCCAGCGG	NS_5 区	225bp
Antisense	GGCAGAATACCTAGTCATGGCCTCTGTGAA	NS_5 Region	

3.1 cDNA合成 0.5ml血清采用PEG浓缩后，用异硫氰酸胍(AGPC)一步法[3]抽提血清中的RNA，其沉淀物溶于10μl DEPC处理的双蒸水中。取1μlRNA模板溶液加入到3.2μl逆转录混合液中(使终溶液中含Antisense引物10pmol/L，50mmol/L Tris-HCl，pH8.3，75mmol/L HCl，3mmol/L $MgCl_2$ 和10mmol/L DTT)。70℃热处理10分钟后，加入RNasin 40U和M-MLV逆转录酶60U，37℃作用45分钟至1小时，然后99℃变性5分钟，速冷后用作第一次PCR模板。

3.2 第一次PCR(1st PCR) 5μl cDNA加入到20μl PCR混合液中(10mmol/L Tris-HCl，pH8.3，50mmol/L KCl，2.5mmol/L $MgCl_2$，由外引物各10pmol/L，四种dNTP各200μmol/L，明胶0.01%，Taq DNA多聚酶1U，94℃1分钟→54℃ 1分钟→72℃1分钟，共50个循环。

3.3 第二次PCR(2nd PCR) 取第一次PCR产物1μl，加入24μlPCR混合液中(除外引物换成内引物，浓度不变之外，其它各种成分的含量同第一次PCR)，进行循环扩增，反应的温度条件和循环次数与1st PCR完全相同。

3.4 结果观察 两次PCR产物与等量样品处理液混合，在4%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离，电压为100V，时间40分钟。凝胶经溴化乙锭染色15分钟后在紫外检测仪下观察并摄像记录结果(见图)，有特异性条带者判为阳性。



图：PCR扩增产物在4%聚丙烯酰胺凝胶下的电泳结果

Fig. ：The Result of PCR amplified products electrophoresed with 4% PAGE

M：标准DNA分子量参照物，片段大小依次为

维普资讯 http://www.cqvip.com

The marker of standard DNA molecular weight, the fragments are 1057bp 770bp 612bp 495bp 392bp 297bp 210bp 162bp 79bp

1～4　为第二次 PCR 结果

1～4　Result of 2nd PCR

5～8　为第 1 次 PCR 结果

5～8　Result of 1st PCR

其中 1,2,7 为阴性，其余为阳性

The 1,2,7 are negative, the others positive.

1,7 为阳性对照　3,8 为阳性对照　2 为阳性病例

1,7　Negative control, 3,8　positive control, 2 negative case

4　为 NANBH，第二次 PCR 为弱阳性

4　Weak positive in 2nd PCR.

5,6　为二例 CAH，第一次 PCR 即阳性

5,6　Positive in 1st PCR

实验过程中设立严格的阴、阳性对照，并进行多次重复试验，确保实验结果的准确性。

4　RT-nested PCR 阳性产物杂交分型　利用 Dig 标记的 5 种特异性 HCV 亚基因探针，对 RT-nested PCR 阳性产物进行杂交分型，显色系统为 Dig 抗体-碱性磷酸酶复合系统，详细操作同文献报道。本实验在日本金泽医科大学完成，所有试剂及仪器由日方提供。

结　果

1　抗 HCV 检测结果

自 205 份血清标本中，检测出抗 HCV Ab 阳性标本 131 例（两种试剂检测结果均为阳性），检出率为 63.90%。

2　利用 NS_5 区引物进行 RT-nested PCR 的敏感性和特异性

同时采用来源于 NS_5 区和 5′-非编码区（5′-UTR）的双引物，对 35 例随机抽取的抗 HCV Ab（+）标本进行了 PCR 检测，结果见表 2。从表中我们可以看出，NS_5 引物的敏感性与 5′-UTR 引物的敏感性相当，并且 21 份 NS_5 基因阳性产物均能与相应的型特异性 HCV 亚基因探针杂交显色，说明本实验有良好的特异性。

表 2　采用 NS_5 和 5′-UTR 引物进行 PCR 结果比较

Table 2　Comparison of the results of PCR with primers from NS_5 and 5′-UTR respectively

		5′-UTR 引物 5′-UTR Primer		合计 Total
		+	−	
NS_5 引物 NS_5 Primer	+	21	0	21
	−	2	12	14
合计 Total		23	12	35

$P>0.05$

3　抗 HCV Ab(+)标本中 NS_5 基因的检出情况

131 例抗 HCV Ab(+)标本中，69 例可检出 NS_5 基因，总检出率为 52.68%。按照临床背景对此 131 例标本进行分组，各组 NS_5 基因检出情况见表 3。其中，除 HCC 和 CRF 组检出率分别为 16.67%和 34.38%外，其它各组的检出率均为 50～80%。献血员组、献浆员组和丙种球蛋白制剂组的 NS_5 基因检出率分别为 66.61%，54.45%和 57.14%，有活动性病变的各肝病组（如 HCC、CAH、LC、SH 组等），其第一次 PCR 的阳性率较其它各组为高（$P<0.05$），而 CPH 组主要是第二次 PCR 结果阳性。

维普资讯 http://www.cqvip.com

4 抗 HCV Ab(－) NANBH 血清标本中 NS_5 基因的检出情况

22 例经两种试剂检测结果均为阴性，而临床诊断为NANBH 的血清标本中，有 8 例经第二次 PCR 后结果为阳性，其中有 6 例为较弱阳性、2 例明显阳性，表明抗 HCV 阴性 NANBH 中仍有一部分病例与 HCV 感染有关。

表 3 抗 HVC Ab(＋)血清中 NS_5 基因的检出情况

Table 3 The Prevalence of NS_5 gene in anti-HCV Ab(＋) positive sera

组别 Group	抗 HCV Ab(＋)数 Anti-HCV Ab ＋	第一次 PCR 阳性数 Positive in 1st PCR	第二次 PCR 阳性数 Positive in 2nd PCR	总计检出率(%) Total positve rats
急性肝炎 Active hepatitis	13	5	3	61.54
慢迁肝 Chronic persistent Hepatitis	15	2	10	80.00
慢活肝 Chronic active Hepatitis	20	7	3	52.63
肝硬化 Liver cirrhosis	9	3	2	55.56
原发性肝癌 Liver carcinoma	6	1	0	16.67
慢性肾功能衰竭 Chronic renal Failure	32	2	9	34.38
献血者 Blood-donor，BD	6	0	4	66.67
献浆者 Plasma-donor，PD	11	1	5	54.45
免疫球蛋白 Immunoglobulin，IG	7	0	4	57.14
其它 Others	8	0	6	75.00
合计 Total	131	21	48	52.68

5 PCR 阳性产物杂交分型结果

69 例 NS_5 基因阳性产物与 5 种 Dig 标记的 HCV 亚基因分型探针进行杂交显色，结果见表 4，仅 2 例不显色，说明该产物特异性强，NS_5 基因能有效地用于 HCV 基因分型。

讨 论

血清中丙型肝炎病毒(HCV)含量极低，普通方法难以检出。抗 HCV 仅能说明是否有过 HCV 感染，而不能确切地反映患者的病毒血症，所以临床和科研工作中多采用 PCR 技术直接

维普资讯 http://www.cqvip.com

检测 HCV RNA。但 HCV 为一极易变异的正链 RNA 病毒，引物的选择，亦即扩增部位的选择，对于病毒的检出情况至关重要。一般来说，5′-UTR 的基因序列最为保守，多选择该部分作为 PCR 扩增片段，可以明显地提高 HCV RNA 的检出率[5]。我们随机选择了 35 份抗 HCV Ab(+)血清标本，同时利用来源于 5′-UTR 和 NS_5 区域的双引物进行 HCV RNA RT-nested PCR 检测，结果(表 2)显示两种引物的敏感性相当，表明本实验扩增的 NS_5 基因片段亦能较好地代表 HCV 感染状况。另外，利用 NS_5 区引物扩增的片段与设计的大小完全相同，与亚基因探针杂交显色取得较好效果，说明本实验有较强特异性。69 例 NS_5 基因阳性标本的 PCR 产物与 5 种来自 NS_5 区的 HCV 亚基因探针进行杂交显色效果较好，说明 NS_5 基因也可应用于 HCV 基因分型。

表 4　基因分型结果

Table 4　The Results of gentypings

基因型 Genotypes	例数 Cases
PT	3
K1	25
K2a	17
K2b	9
K3	6
混合型 Mix	7
不显色 Unknown	2
总计 Total	69

NS_5 基因是一位于 HCV 基因组大阅读框架(ORF)3′-末端上游的非结构基因，其产物与 RNA 聚合酶活性有关，并直接参与调控 HCV 复制，被认为是编码 RNA 依赖性 RNA 多聚酶的部位[1]。因此，检测该基因可以了解受染者的感染状况，判断其传染性。

自 131 例抗 HCV Ab 阳性标本中检出 NS_5 基因 69 例，检出率为 52.68%，较国外同类报道[6]稍低，这可能与实验对象的内部构成不同、血清标本的冻结保存等多种因素有关。22 例抗 HCV Ab(−) NANBH 标本中 NS_5 基因的检出率亦达 36.36%，说明这类病人中仍有一部分与 HCV 感染有关。根据上述 HCV Ab(+)和抗 HCV Ab(−)标本中 NS_5 基因的检测结果，表明抗 HCV 仅能部分地说明受检者有否 HCV 感染，不能代表病毒存在状况及受染者的传染性，单纯利用抗 HCV Ab 检测结果筛查献血(浆)员，判断 HCV 感染状况以及抗病毒治疗效果显然是不够的。

我们对 131 例抗 HCV Ab(+)标本按照临床背景进行分组，各组的 NS_5 基因的检出率不相一致。一般认为与 HCV 感染关系较为密切的原发性肝癌(HCC)和 HCV)感染率较高的慢性肾功能衰竭组(CRF)的 NS_5 基因检出率(分别为 16.67%和 34.38%)低于其它各组，原因尚不清楚，有待深入研究。对比两次 PCR 的结果发现，有活动性病变的各肝病组(如 HCC、CAH、SH 和 LC 组)，其第一次 PCR 的阳性率明显高于其它各组($P<0.05$)，而慢性迁延性肝炎和亚临床感染(如献血者、献浆者、免疫球蛋白制剂和抗 HCV Ab(−) NANBH 者)主要是第二次 PCR 阳性，提示慢性迁延性肝炎或亚临床感染者可能与低水平的循环 HCV 感染有关。

尤其值得注意的是，献血员、献浆员以及免疫球白制剂中 NS_5 基因的检出率分别达到 66.61%、54.45%、57.14%，说明血液及血液制品中存在严重的 HCV 污染现象，应谨慎使用这类制剂。免疫球蛋白制剂中检出 NS_5 基因，说明丙球感染亦可能是丙肝的一个感染危险因素，为生物制剂生产部门及应用者值得重视的新问题，其在流行病中的意义有待进一步研究。

参 考 文 献

1　M Houghton，A Weiner，J Han，*et al*. Molecular Biology of the Hepatitis C Viruses：Implication for Diagnosis，Development and Con-

维普资讯 http://www.cqvip.com

trol of Viral Diseases. Hepatology, 1991; 14(2): 381

2 H Okamoto, K Kurai, S Okada, *et al*. Full-Length Sequence of a Hepatitis C Virus Genome Having Poor Homology to Reported Isolates; Comparetive Study of Four Distinct Genotypes. Virol, 1992; 188: 331

3 P Chomczynski, N Sacchi. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Anal Biochem, 1987; 163: 156

4 N Enomoto, A Takada, T Nakao, *et al*. There are two major types of Hepatitis C Virus in Japan. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990; 170(3): 1021

5 J Bukh, R H Purcell, R H Miller. Importance of Primer Selection for the Detection of HCV RNA with the Polymerase Chain Reaction Assay. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 187.

6 N Takada, S Takase, N Enomoto, *et al*. Clinical Background of the Patients having Different Types of Hepatitis C Virus Genomes. J Hepatol, 1992; 14: 35.

Detection and Significance of HCV RNA NS_5 Gene

Guo Linsheng Tang Zhenya Hao Lianjie

(*Clinical Immunology Research Unit, Tongji Hospital, Wuhan* 430030)

Akira Takada Takayasu Date*

(*Division of Gastroenterology, Department of Medicine,*

* *Division of Biochemistry, Kanazawa Medical University, Japan*)

Primer selection is important for the detection of HCV RNA with RT-nested PCR method. Compared to primers from 5'-UTR gene, the primers from NS_5 gene had also high sensitivity and specifity in the detection of HCV RNA. Sixty-nine of 131 cases of anti-HCV Ab positive and 8 of 22 cases of anti-HCV Ab negative sera were found to be NS_5 gene positive, the positive rate were 52.68% and 36.36%, respectively. All anti-HCV Ab positive samples were divided into several groups, according to their clinical background. Prevalence of NS_5 gene in HCC and CRF groups were 16.67% and 31.38%, respectively, lower than that of other groups (50%—80%). Interestingly, the patients with active liver diseases (such as HCC, CAH, LC, SH) were positive in the 1st PCR, then the patients with persistent hepatitis and subclinical infection were positive in the 2nd PCR. The high prevalence of NS_5 gene in groups of BD, PD and IG warned us of screening BD strictly and using blood-products carefully.

Key words HCV RNA, NS_5 gene, RT-nested PCR, Anti-HCV Ab