

49-53

15955(9)

第11卷第1期

中国病毒学

Vol. 11 No. 1

1996年3月

VIROLOGICA SINICA

Mar. 1996

PCR-ELISA 在检测血清中丙型肝炎病毒上的应用

朱剑锋 陈波 杨蓓蓓 陈常庆

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

R512.630.4

A

提要 建立了一个替代目前使用的套式 PCR 的血清中丙型肝炎病毒 RNA 检测的新方法。该方法只需经过一次 PCR 扩增, 即可通过对掺入标记物的 PCR 产物的 ELISA 检测得到与套式 PCR 相同的结果。与套式 PCR 相比, 该方法具有耗时少, 易操作, 较少产生假阳性等特点。

关键词 丙型肝炎病毒, RT-PCR, 套式 PCR

感染; 聚合酶链反应; ELISA;

丙型肝炎病毒(HCV)是近几年才发现的一种单链正股 RNA 病毒^[1]。它是许多急性和慢性非甲非乙(NANB)肝病的病因^[2]。丙型肝炎病毒感染的诊断主要通过抗 HCV 抗体的检测和 HCV RNA 的 RT-PCR 检测。

由于后者比前者有更高的灵敏度, 且能检测患者的病毒血症, 因此已成为急性和慢性 HCV 感染的诊断标准^[3-5]。而且 PCR 方法对输血引起的丙型肝炎的预防将起重要作用。HCV 的基因组约 10kb, 其 5'端非翻译区(UTR)的 324~341 个核苷酸具有高度保守性^[6], 一般均利用这段区域来设计 PCR 扩增引物或杂交探针。

由于血清中 HCV 含量较少以及病毒 RNA 分离过程中的损失^[7], 经过逆转录和一次 PCR 扩增, 其产物在琼脂糖电泳上很难检测到, 因此目前一般使用套式 PCR(两次 PCR)结合电泳观察^[8], 或者一次 PCR 结合液相杂交^[9]的方法。两次 PCR 增加操作步骤, 而且将 PCR 产物重新扩增, 易引起不同样品间第一次 PCR 产物的污染, 造成假阳性^[10], 而一次 PCR 结合液相杂交, 时间较长且杂交技术比较麻烦。上述两种方法都不利于应用到临床处理大量标本。运用我们实验室已经建立的微孔板检测 PCR 产物的方法, 我们尝试直接检测只经过一次 PCR 扩增的 HCV 标本, 与两次 PCR 结合电泳的结果比较, 发现两者灵敏度相同, 并且一次 PCR 结束后只需 1.5 h 即可得到结果, 并且操作与常规 ELISA 相同, 避免了电泳和杂交的步骤, 易于实现自动化。

材料和方法

1 **血清标本** 由上海市传染病医院提供。用上海长征试剂公司试剂盒检测为抗 HCV-Ab(+)阳性血清和抗 HCV-Ab(-)阴性血清。-20℃冻存。

2 **试剂** Taq 酶为复华公司产品, 逆转录酶为 GIBCO BRL 产品, DIG DNA 检测试剂盒是 Boehringer Mannheim 产品。Rnasin 是华美公司产品, 其余试剂均为分析纯。

3 引物

引物 1, 2, 3, 4, 是在 ABI-381A 型 DNA 自动合成仪上合成的, 亚磷酰胺单体和保护的脱氧核苷-CPG 柱均为 ABI 公司产品, 合成的引物经浓氨水处理从 CPG 树脂上切落下来并且脱去全部保护基后, 用 20% 聚

本文于 1995 年 6 月 5 日收到, 8 月 13 日修回

丙烯酸脲尿素凝胶电泳纯化得到产物,其中引物2在5'末端进行了生物素标记,引物设计是参照文献^[12],引物1是5'-CTGTGAGGAACTACTGCTTT3',引物2是5'-AACACTACTCGGCTAGCAGT3',扩增产物长度是221bp,位于引物1,2内侧的引物3(5'-TTCACGCAGAAAGCGTCTAG3'),引物4(5'-GTTGATCCAA-GAAAGGACCC3'),扩增产物长度是145bp。

4 RNA提取

RNA的提取是参照异硫脲酸胍方法^[13]并稍加改动。

5 反转录和PCR扩增

将处理200 μ l血清得到的RNA沉淀溶于含12U RNasin和5 pmol引物2的10 μ l DEPC-H₂O。水浴5 min后,冰浴5 min,补加反应试剂至25 μ l(50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3) 75 mmol/L KCl, 10 mmol/L DTT, 3 mmol/L MgCl₂ dNTP各0.5 mmol/L, 200单位M-MLV逆转录酶, 24 U RNasin), 37℃反应1小时,加55 μ l DEPC-H₂O 95℃ 10分钟,再冰浴5分钟,离心后吸取40 μ l反转录产物(相当于100 μ l血清)用于第一次PCR扩增,反应体积50 μ l(dATP, dGTP, dCTP各200 μ mol/L, dTTP 100 μ mol/L, dig-11-dUTP 2 μ mol/L, Taq酶缓冲液,引物1,2各1 μ mol/L, TaqE酶2单位)PCR循环参数为94℃ 30秒→50℃ 30秒→72℃ 45秒, 30个循环最后72℃延长10分钟,得到长度为221 bp的扩增产物。如做套式PCR,将第一次PCR产物5 μ l加入已配好的PCR反应液,体积为50 μ l(1×Taq酶缓冲液, dNTP各200 μ mol/L, P3, P4各1 μ mol/L, Taq酶2单位)PCR循环参数为94℃ 30秒→55℃ 30秒→72℃ 45秒, 30个循环,最后72℃延长10分钟,得到位于第一次PCR产物内侧的145bp的扩增产物。

6 PCR产物的检测

6.1 电泳方法,将两次PCR后的产物用1.5%琼脂糖电泳,然后EB染色,置紫外灯下观测PCR扩增产物条带。HCV RNA阳性标本应看到145bp的条带。

6.2 ELISA方法

6.2.1 Streptavidin 包被的96孔板的制备,每孔加入100 μ l含1 ng/ μ l Streptavidin的PBS(10 mmol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH7.5, 0.15 mol/L NaCl)4℃过夜,随后每个孔用洗液(100 μ l PBS + 0.1% (v/v) Tween20)洗3次,每次3分钟,洗好后微孔板可在4℃保存2个月。

将反应好的20 μ l一次PCR产物加入80 μ l PBS + 0.5% (w/v)封闭试剂(Boehringer Mannheim)然后加到Streptavidin包被的孔中,25℃摇床0.5小时,然后将孔内液体倒掉,加入100 μ l碱性磷酸酶联抗dig抗体(Boehringer Mannheim), 25℃摇床0.5小时将孔内液体倒掉,用洗液洗两次。

6.2.2 信号的发生

100 μ l底物液(4mg/ml PNPP, 0.75mol/L 2-氨基-乙甲基丙醛, pH10.3)加入微孔中,避光保存一定时间,用1mol/L NaOH 50 μ l终止后,用酶标仪读数OD 405nm。

结 果

将抗体检测呈阳性的10种血清(编号1-10),抗体检测呈阴性的10种血清(编号11-20),同时用PCR-ELISA法及套式PCR结合电泳法进行检测,得到如下结果:

1 PCR-ELISA法结果 10种阳性血清经检测全部为HCV-RNA阳性;10种阴性血清中有3种(13, 15, 18)检测出HCV-RNA阳性,其余均为阴性,见表1。

试剂空白是指从RNA提取开始,用灭菌双蒸水代替血清所做的对照。后面所有处理,反应步骤均与血清样品相同。

表 1 PCR-ELISA 法检测结果*
Table 1 The result of PCR-ELISA.

阳性样品编号 Positive sample	OD _{405nm}	阴性样品编号 Negative sample	OD _{405nm}
1	0.698	11	0.083
2	0.632	12	0.077
3	0.640	13	0.308
4	0.566	14	0.113
5	0.375	15	0.465
6	0.344	16	0.101
7	0.423	17	0.153
8	0.379	18	0.353
9	0.422	19	0.092
10	0.383	20	0.110
试剂空白 *OD _{405nm}		0.022	
Reagent control OD _{405nm}			

(加入底物液后 30 分钟终止)

(stop at 30 min after adding substrate)

2 套式 PCR 结合电泳检测结果 图 1 为部分结果,10 种阳性血清经电泳均检测出 145bp 的条带,10 种阴性血清中有 3 种(13、15、18)检测出 145bp 的条带,其余 7 种未扩增出条带。



图 1 套式 PCR 的琼脂糖电泳结果,预期 PCR 扩增片段大小为 145bp,1-试剂空白
2-PGEX-7Z1(+)Hae III Markers. 3-7:抗体阳性血清 1-5 号,8-10、13、15、18 号抗体阴性血清。

Fig 1 Electrophoresis of nested PCR products, expected length of PCR products is 145bp. Line 1: reagent control. Line 2: PGEX-7Z1(+) Hae III Markers. Line 3-7: anti-HCV antibody positive sample No. 1-5. Line 8-10: anti-HCV antibody negative sample No. 13, 15, 18.

由 1, 2 可知, PCR-ELISA 法结果与套式 PCR 结合电泳的结果完全相符。

讨 论

PCR-ELISA 方法与传统的 Nested PCR 结合电泳等方法相比, 具有操作简单、快速、便于实现自动化等优点。微孔板法的缺陷在于对 PCR 产物的大小不清楚, 专一性不如 Southern blot, 因此对于易引起非特性扩增的靶序列不太适用。这一缺陷可通过优化 PCR 条件, 谨慎操作, 设置阴性对照得以弥补^[10]。由于该方法大大简化了操作, 易于掌握, 易于处理大量标本, 其推广应用的潜力还是很大, 特别在 HCV 感染率较高的地区, 该方法可用于对献血员进行 HCV 普查, 从而有效防止输血后感染。

参 考 文 献

- 1 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989;244:359~362
- 2 Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, *et al.* Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med*, 1989;321:1494~1500
- 3 Houghton M, Weiner A, Han G, *et al.* Molecular biology of the hepatitis C virus implication for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*, 1991;14:381~388
- 4 Hu K-Q, Yu C-H, Vierling JM, *et al.* Comparison of HCV cDNA polymerase chain reaction(PCR) using primers from the 5'-non-coding and nonstructural regions of the HCV genome(Ab stract) *Hepatology*, 1995;14:207A
- 5 Bukh j, Purcell RH, Miller KH. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus with the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992;89:187~191
- 6 George G, Schlauder, Isa K, Mushabwa. Detection of hepatitis C and E virus by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 1994;47:243~253
- 7 Robert E. Farrell, JR. *RNA Methodologies; a laboratory guide for isolation and characterization* San Diego:Academic Press, 1993.
- 8 Karen Cristiano, Adrian M. Di Bisceglie, Jay H. Hoofnagle, *et al.* Hepatitis C Viral RNA in Serum of Patients with chronic Non-a, Non-b Hepatitis;Detection by the Polymerase chain Reaction using Multiple Primer sets. *Hepatology*, 1991;14:51~55
- 9 David R. GRETCH, Jeffery J Wilson, Robert L. Carithers, *et al.* Detection of Hepatitis C Virus RNA: Comparison of one-stage Polymerase chain Reaction(PCR) with Nested-set PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31:289~291
- 10 猎万明. PCR 技术操作和应用指南. 人民军医出版社. 1993:336
- 11 Nafees Ahmad, Gilbert M. Schiff, Batuge M. Baroudy. Detection of viremia by a one step polymerase chain reaction method in hepatitis C virus infection. *Virus Research*, 1993;30:303~315
- 12 Ke-Qia Hu, Chang-Hong Yu, John M Vierling. One-step RNA polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus RNA. *Hepatology*. 1993;18:270~274
- 13 Chomczynski, P and Ssacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. biochem* 1987;162:156~9.

The Application of PCR-ELISA Method for Detecting Hepatitis C Virus in Serum

Zhu Jianfeng Chen Bo Yang Beilei Chen Changqing

(*Shanghai Center of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233*)

We have applied a new method which may replace the nested PCR nowadays used to detect hepatitis C virus in serum. The method is based on a PCR in which one of the primer is biotinylated and digoxigenin-11-dUTP is incorporated during elongation. Thus, only one PCR is needed and the product can be detected by an "ELISA"-like format based on 96-wells microtiter plates. The results of the new method are the same as that of the nested PCR. Moreover, the new method has the advantages of easy handling, shorter assay time, and less false positive results.

Key words Hepatitis C virus, RT-PCR, ELISA, Nested PCR