

结合 RT-PCR 体外扩增检测 HCV ssRNA 的研究*

胡俊, 董长垣**, 汪凡军, 陈晓, 郭淑芳, 张蔚英

(武汉大学医学院病毒研究所, 湖北武汉 430071)

The Study of Amplifying HCV ssRNA by RT-PCR Combined
With Transcription *in vitro*HU Jun, DONG Chang-yuan**, WANG Fan-jun, CHEN Xiao, GNO Shu-fang, ZHANG Wei-ying
(Lab of Molecular Virus & Cancer, Institute of Virology, Medical College, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: The purpose of this study is to establish a new method which HCV RNA can be used to detect sensitively and specifically through efficient single strand RNAs(ssRNAs) amplification. The sera from the chronic Hepatitis C patients were used as specimens. Single step reverse transcription-PCR (SRT-PCR) was performed prospectively, with a designed set of primers which defined the sequence unique to the 5' noncoding region of the HCV genome, a great deal of specific ssRNAs were synthesized in the presence of T₇-RNA polymerase and other appropriate conditions within five hours. Comparing with the nested-PCR, the quantity of the products in our method was nearly 20-fold higher and its specificity was verified by the electrophoresis on agarose gel and the dot hybridization with the probe.

Key words: Hepatitis C virus(HCV); RT-PCR; Transcription *in vitro*

摘要: 本研究旨在以HCV为平台, 在简化RT-PCR基础上, 结合体外转录, 建立一种特异、高效、简便的检测血清中HCV RNA的体外转录合成系统。本法扩增终产物为特定极性的ssRNA, 其特异性经凝胶电泳和斑点杂交确定; RNA定量分析结果显示本法核酸扩增效率高于巢式PCR近20倍。

关键词: 丙型肝炎病毒; 逆转录 PCR; 体外转录

中图分类号: R5126

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152-(2004)-03-0214-03

丙型肝炎病毒 (*Hepatitis C virus*, HCV) 感染所致的丙型肝炎 (Hepatitis C, HC) 是一类后果严重的输血传播疾病。大量的临床研究表明, HC 的预后较乙型肝炎具有更易于慢性化、重症化、恶化的特点, 并且全世界范围内 HCV 的感染率已接近 2%^[1], 因此发展针对 HCV 的特异性好、灵敏度高、价格合理的诊断试剂, 尽快从分子水平推进 HCV 的相关研究是一项迫切的任务。目前应用于 HCV 诊断的方法主要有两大类, 一是用免疫学方法检测患者血清中抗 HCV 的抗体或病毒抗原; 二是检测血清中的 HCV RNA, 包括基于逆转录-基因扩增技术 (RT-PCR) 的定量、定性方法和核酸分子杂交技术。根据 HCV 感染具有前窗期的临床特点, 分子水平检测在对其的早期诊断中显示较大优势^[2]。本

文报告的便是一种新的结合 RT-PCR 体外 ssRNA 扩增系统, 利用本系统, 可以在常规的实验室条件下高效、灵敏、简便的检出低滴度的 HCV RNA, 而且由于本系统最终合成大量单链 RNA, 从而也可为广泛的 RNA 研究提供一种新的有效的 ssRNA 体外合成系统。

1 材料与amp;方法

1.1 标本及来源

血清标本分别取自健康献血者、慢性丙型肝炎病毒 (HCV) 和 HAV、HBV、HEV、HGV、CMV、EBV 感染者。其中慢性丙肝感染判断依据是血清谷丙转氨酶 (ALT) 高于参考值范围上限 1.5 倍以上, 经第二代丙肝病毒 ELISA 试剂盒检测抗 HCV-IgG

收稿日期: 2003-11-18, 修回日期: 2004-01-07

* 基金项目: 湖北省科技厅重点项目 (12410135)

作者简介: 胡俊 (1977-) 女, 湖北武汉籍, 硕士研究生。

** 通讯作者: 董长垣 (1949-), 男, 教授, 博导。Corresponding author. Tel: 027-87331787, E-mail: dchangyuan@163.com

阳性,并经套式 PCR 确证,其余标本均经 PCR 试验证实为 RNA 或 DNA 阳性,以上标本分别由武汉大学医学院附属第一、第二医院,武汉市一医院检验科及武汉市中心血站提供,新鲜标本马上分离出血清, -80℃ 贮存。

1.2 引物与探针的设计

经过比较多株多型别的 HCV 基因组序列^[3-5],设计扩增引物及生物素标记探针序列如下:

P1: TGCACGGTCTACGAGACCTC

P2: ACTCCACCATAGATCACTCC

P3: TAATACGACTCACTATAGGGTCGCAAGCACCTATC
AGGC

P4: TGTGAGGAACTACTGTCTTC

Probe: Bio-GTGAGTACACCGGAATTAC

上述引物序列定义 HCV 5' NCR 中特异片段。其中 P3 5' 端 20bp 为 T₇RNA 聚合酶结合位点, 3' 端 20bp 为 HCV 特异序列。P1、P2 引物定义的序列长度为 315bp; P3、P4 定义的序列长度为 264bp。

1.3 RNA 的抽提与纯化

每 100μL 待检血清加入 0.8mL 组织细胞裂解液 (Trizol, Gibco BRL life technology, USA), 按说明书上操作步骤提取血清中 RNA; -20℃ 贮存备用。

1.4 分步 RT-PCR

取 5μL HCV 靶 RNA, 应用引物 P3, P4 分步执行逆转录及第一轮 PCR 扩增^[6]。

1.5 一步法 RT-PCR

取 5μL 的 HCV 靶 RNA 加入到 24μL 的反应体系 (0.5μmol/L 引物 P3; 0.5μmol/L 引物 P4; 20U Rnasin) 65℃ 水浴 10min, 冰上迅速冷却, 加入 21μL 混合物 (10×PCR 反应缓冲液; 1mmol/L dNTP; 5U AMV 逆转录酶; 1U Taq DNA 聚合酶), 瞬时离心后 42℃ 水浴 20min, 后经 95℃ 预变性 300s, 以 94℃ 30s, 52℃ 30s, 72℃ 45s, 行 35 次循环, 并在 72℃ 延伸 300s 完成扩增程序。

1.6 巢式 PCR

取设计的 2 对引物, 参照文献记载^[7]行巢式 PCR 扩增。

1.7 体外转录

20μL 的转录体系 (40mmol/L Tris-Ac pH8.0; 30mmol/L Mg (Ac)₂; 10mmol/L DTT; 100mmol/L Kglu; 0.5μmol/L 引物 P3; 0.5μmol/L 引物 P4; 1mmol/L rNTP, 20U RNasin, 40U T₇RNA 聚合酶, 9U AMV 反转录酶) 中加入 5μL RT-PCR 产物后, 反应管置于 42℃ 水浴 1.5h, 冰浴终止反应, 随后转录产物在 50mmol/L 柠檬酸钠; 10mmol/L MgCl₂

pH6.5; 2 mmol/L CaCl₂ 的溶液中以 25μg/μL 无 RNA 酶的 DNase I 于 37℃ 消化 1h, 冰浴终止反应。

1.8 电泳鉴定、紫外分光光度法定量转录产物

对 3 份 HCV 阳性标本取等量核酸扩增产物, 在含 0.5μg/mL EB 的 2% 非变性琼脂糖凝胶上行电泳, 紫外灯下观察结果; 同时分别以巢式 PCR 和本转录体系对抽提于 500μL 阳性血清的病毒核酸进行扩增, 用紫外分光光度法定量扩增终产物。

1.9 斑点杂交

3 例阳性, 1 例阴性血清样品经本系统扩增后, 取产物标记于硝酸纤维素膜上, 利用生物素标记的单链 DNA 探针, 按分子克隆^[8]行斑点杂交, 鉴定所得扩增产物的特异性。

2 结果

2.1 两种 RT-PCR 扩增效率相近

从同份血清中抽提的靶 RNA, 分别用简化一步 RT-PCR 法和常规两步 RT-PCR 法进行核酸的扩增, 产物经凝胶电泳分析, 揭示二者具有相近的扩增效率。

2.2 转录产物为预期大小的 RNA

3 例 HCV 阳性标本及健康献血者 (阴性对照) 的血清核酸抽提物, 经本转录合成体系扩增, 电泳后, 参照 RNA Markers 显示预期 265bp (264bp 的靶序列加 1bp 的转录启动子末端序列) 的 RNA 条带 (图 1)。

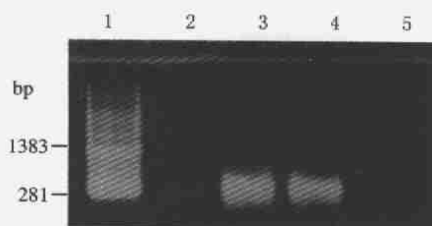


图 1 RNA 转录产物的检测

Fig.1 Electrophoresis of transcriptional products on agarose gel
1, RNA Markers (G3191, Promega, 0.28-6.58kb); 2/3/4, HCV positive samples; 5, Negative control.

2.3 转录产物 RNA 具有序列特异性

斑点杂交结果显示阳性标本均出现深蓝色斑点 (图 2), 为进一步确定此方法的病毒特异性诊断效果, 我们将临床上常引起肝炎症状的 HAV、HBV、HEV、HGV、CMV、EBV 标本与 HCV 标本同时按上述方法进行扩增, 行凝胶电泳, 结果显示除 HCV 阳性标本外, 其余均无可见扩增条带。

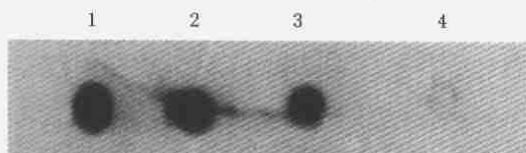


图 2 斑点杂交的结果

Fig.2 Results of the dot hybridization

1/2/3, Three HCV positive samples, 4, Negative control.

2.4 RT-PCR-体外转录系统的灵敏度

以紫外分光光度仪定量分析本系统转录终产物,结果显示 1.5h 内经本系统 4-5 个循环的转录扩增 HCV ssRNA 产物量最高可达 $1.8\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 而巢式 PCR 扩增所得 DNA 产物量仅 $0.1\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 扩增效率是巢式 PCR 的近 20 倍。可见本系统检测灵敏度远高于巢式 PCR。同时鉴于用 EB 染色法观察单链 RNA 的灵敏度较 dsDNA 要差得多,也可以说明本法 RNA 的合成效率相当高。

3 讨论

丙型肝炎病毒基因组为单分子正链 RNA。目前被普遍接受并得以广泛应用的 HCV RNA 核酸检测技术主要包括 RT-PCR、分支 DNA 检测和在逆转录基础上发展而来的荧光 PCR、Amplicor HCV Monitor 技术等等。其中最为引人注目的是 NASBA 法,由 Compton 等人于 1991 年提出^[9]。此理论主要建立在 AMV 逆转录酶、RNase H 和 T₇RNA 聚合酶在体外 42℃ 条件下均具有较高活性这一特点的基础上,模拟逆转录病毒的体内增殖过程,在单管同温的条件下对靶序列进行扩增,扩增终产物为 RNA。本研究的主要原理与 NASBA 方法相似,套用了 NASBA 循环相中的反应原理,扩增终产物也为 RNA。因 RNA 较易降解,所以本法对环境污染小。另外,由于 RT-巢式 PCR 作为目前仍公认检测 HCV RNA 的最可靠的方法之一,其检测灵敏度可达 10 copies 的 HCV RNA^[10],所以这里以其扩增结果作为对照。为尽量避免 RT-PCR 易于污染的问题,本研究将逆转录和 PCR 放在同一份反应体系中完成,统一缓冲体系中 Mg^{2+} 浓度为 1.5mmol/L ,采用 promega 公司的 AMV RTase,在剂量极低,逆转录时间缩短到 20min 的条件下,取得了较好的扩增效果。一方面证明了此 AMV RTase 相对于 Taq DNA 聚合酶可在较大 Mg^{2+} 浓度范围内表现高活性,同时也确使操作过程得以简化。在随后的体外转录过程中,为提高反应的灵敏度,本研究用不含 Cl 的缓冲液 Tris-Ac、 $\text{Mg}(\text{Ac})_2$ 、KGluc 替代转录缓冲液中的 Tris-Cl、 MgCl_2 、KCl,并增加 rNTP 浓度至 1mM。本研究最大的特点在于将

RT-PCR 与体外转录合成结合起来,在 PCR 方法高度特异性,敏感性的基础上,依靠特定 PCR 引物,结合改进的体外转录体系,通过增加一个恒定简单的 42℃ 孵育过程,既显著提高了 RT-PCR 检测灵敏度,又保证了产物的特异性,而且整个 RT-PCR-体外转录方法可在约 5h 内完成,所需仪器也均为实验室常规配置,有临床应用潜能;也正是因为 RT-PCR 的引入,仅使特异性的靶目标片段得以进入后继的转录体系,在一定程度上避免了后者因较低的退火温度 (42℃) 导致的非特异性扩增,保证了产物的纯度,使大量纯度较高终产物的合成成为可能;另外,便于保存的 DNA 中间产物的出现,令本反应合成程序较 NASBA 方法更易于调节,也为其进一步在基础研究中的应用创造了条件。

值得注意的是,本方法扩增得到的最终产物为大量负链 ssRNA,而且产物的极性是由 5' 端加 T₇ RNA 聚合酶结合位点的引物所决定。提示本 ssRNA 合成系统在诸多方面,如体外合成功能性 mRNA、体外合成反义 RNA、体外标记 ssRNA 探针、ssRNA 的直接测序、基因检测、以及近年问世的 RNA 干涉 (RNAi) 研究时所需的 siRNA 体外合成等,均具有相当应用潜能。

参考文献

- [1] Khuroo M S. Viral hepatitis in international travellers: risks and prevention[J]. *Inter J Antimicrobial Agents*, 2003, 21:143-152.
- [2] Van der pol C L, Cuypers H T, Reesink H W. Hepatitis C virus six years on[J]. *Lancet*. 1994, 344:1475-1479.
- [3] Choo Q L, Richman K H, Han J H, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, 88(6):2451-2455.
- [4] 毕胜利,白宪鹤,刘崇柏. 我国丙型肝炎河北株基因组的克隆及 cDNA 全序列的测定与分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*. 1992, 6: 425.
- [5] Gentili G, Pisani G, Saldanha J. High proficiency in detecting the six major hepatitis C virus genotypes of laboratories involved in testing plasma by nucleic acid amplification technology[J]. *Vox Sang*. 2003; 85(2):114-116.
- [6] Selda E. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy [J]. *J Clin Virol*. 2001, 21(3): 271-281.
- [7] Aslanzadeh J, Padilla B B, Shanley J D. Evaluation of PCR and nested PCR for laboratory diagnosis of hepatitis C virus infection[J]. *Molecular and Cellular Probes*. 1996 10: 173 - 178.
- [8] Sambrook J, Russell DW (黄培堂, 等译). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 第 3 版, 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification[J]. *Nature*. 1991, 350(6313):91-92.
- [10] Ratge D, Scheibhuber B, Landt O, et al. Two-round rapid-cycle RT-PCR in single closed capillaries increases the sensitivity of HCV RNA detection and avoids amplicon carry-over[J]. *J Clin Virol*. 2002, 24:161-172.