

◦ 技术方法 ◦

一种同时检测丙型与庚型肝炎病毒的逆转录—巢式聚合酶链反应方法

谭文杰 夏宁邵 丛郁 陈刚 苗季 伊瑶 詹美云

【摘要】 目的 庚型肝炎病毒(HGV)与丙型肝炎病毒(HCV)同属黄病毒科,且传播途径相似,重叠感染率高,本研究旨在建立一种同时检测 HGV 与 HCV 感染的方法。方法 根据 HCV 与 HGV 的基因序列分别选取 5' - UTR(HCV)与 NS3(HGV)的两套引物,在同一管内进行逆转录—巢式聚合酶链反应,并初步应用于 153 例标本。结果 该方法能同时检出 HGV 与 HCV 感染,扩增片段大小与设计相符。结论 该方法简便特异,适用于临床检测。

【关键词】 丙型肝炎病毒 庚型肝炎病毒 聚合酶链反应

Identification of hepatitis C or/and G virus RNA in one tube by reverse transcription nested polymerase chain reaction Tan Wenjie, Xia Ningshao, Cong Yu, et al. Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052

Abstract Hepatitis C and G viruses belong to the flaviviridae family. They have similar modes of transmission. The dual infection of HGV and HCV were reported. A simultaneous detection for HCV or/and HGV was established by reverse transcription nested polymerase chain reaction(RT-nested PCR). The primers were derived from the 5' non-coding region of HCV and NS3 region of HGV, and the length of the PCR product was between 170bp and 300bp. RT-nested PCR can be finished in one test tube and HGV and/or HCV can be detected simultaneously in one RT-nest PCR. 153 samples were detected by his method. Our results showed that the established assay is useful for screening and identification of HCV or/and HGV RNA. This method is simple and specific practicable.

Key words Hepatitis C virus Hepatitis G virus Polymerase chain reaction

1996年后,美国的 Simons 与 Linnen 等人相继报道了一种新的黄病毒样因子(GBV-C/HGV)可能与肝炎相关^[1,2]。我们也在国内报道了这种病毒(称之为庚型肝炎病毒)在丙型肝炎与非甲~戊型肝炎病人中存在,并建立了相应检测方法^[3,4]。大量的文献报道表明庚型肝炎病毒不仅与丙型肝炎病毒同属黄病毒科,结构上十分相似(尽管其氨基酸同源性仅为26%),而且其发生的高危因素很一致,重叠感染率高^[5,6],提示发展一种能同时检测这两种病毒感染的诊断方法具有重要意义。为此,我们通过分析 HCV 与 HGV 的结构,设立了两对特异性引物,建立了一种同时检测 HCV 与 HGV 感染的逆转录—巢式聚合酶链反应方法(RT—

PCR)。

1 材料和方法

1.1 标本来源 153 例标本,60 例来自北京,48 例来自河南,29 例来自湖南,16 例来自厦门,其中有 94 例非甲~戊型肝炎病人,44 例丙型肝炎病人,7 例职业献血员,7 例肝癌病人及 1 例慢性丁型肝炎病人,丙型肝炎病毒感染经 EIA 与 RT-PCR 方法证实。

1.2 引物设计 分别选取 HCV 的 5' - UTR^[7] 区与

本课题受国家九五课题(96-906A-03-08)资助

作者单位: 100052 北京 中国预防医学科学院病毒学研究所(谭文杰 丛郁 陈刚 苗季 伊瑶 詹美云); 厦门大学(夏宁邵)

1997年9月17日收稿 1998年3月24日修回

HGV 的 NS3 区^[4]合成了 7 条引物(上海生工公司), 其引物序列如下(临用前稀释至 10^4 g/ l)。HCVF1: GTGTGAGGAAGTACTGTCTTC; HCVR1: GGTGCACG-GTCTACGAGACCT; HCVF2: CAGAAAGCGTCTAGCCATGGC; HCVR2: CCCTCTCAGGCAG TACCACAA; HGVF: RTYCCYTTT TATGGGCATGG; HGV R1: CGAAGTTTCTGTGTACCC; HGV R2: AGGTCNC-CRTCYYTTGATGAT; (R= A/ G; Y= C/ T; N= A/ G/ C/ T)

1.3 病毒核酸的提取 采用改良异硫氰酸胍一步法或二氧化硅吸附法^[8], 取 50~100 μ l 血清提取 RNA, 最后沉淀干燥于 0.5ml 的 Eppendorf 管中。

1.4 逆转录巢式聚合酶链反应检测

1.4.1 甲反应混合物的配制 按 1ml 体积计算(50 人份), 取 100 μ l 10 \times PCR 缓冲液(来自 Promega)加 20 μ l 10mmol/L dNTPs, 加 HCVF1, R1 及 HGVF, R1(逆转录及第 1 次 PCR)引物各 5 μ l 补水至 1ml。

1.4.2 乙反应混合物的配制 除了引物改为 HCVF2, R2 HGVF, R2 外, 其余皆同甲反应混合物。本实验中 AMV 与 Taq 酶皆为 Promega 公司产品。

1.4.3 cDNA 合成与第 1 次 PCR 将提取的 RNA 溶于 19 μ l 甲反应混合物, 覆盖液体石蜡, 70 $^{\circ}$ C 3 分钟后置 42 $^{\circ}$ C 水浴, 加入酶混合物(AMV 2U, RNasin 10U, Taq 酶 1U) 1μ l, 孵育 30 分钟后置 95 $^{\circ}$ C 2 分钟开始循环, 循环条件为 95 $^{\circ}$ C 15 秒; 55 $^{\circ}$ C 30 秒; 72 $^{\circ}$ C 30 秒, 30 个循环。

1.4.4 巢式 PCR 取第 1 次 PCR 产物 0.5 μ l 加入到 19.5 μ l 乙反应混合物中, 并加入 0.2 μ l Taq 酶, 即可进入第 2 次 PCR, 扩增条件同第 1 次 PCR。

1.4.5 PCR 产物的电泳分析 第 1 次或第 2 次 PCR 结束后, 取 10 μ l 样品, 在 1.5%~2% 的琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下观察结果并照相。

2 结果

应用我们建立的逆转录-巢式聚合酶链反应方法扩增 HGV 和 HCV 基因片段, 皆可得到特异大小相符的条带, 其中第 1 次 PCR 后 HCV 扩增带为 295bp, HGV 为 223dbp; 第 2 次 PCR 后 HCV 扩增带为 230bp, HGV 为 176bp。不仅能检出单独感染, 对 HGV 与 HCV 重叠感染亦可检出(图 1)。有 3 份血清第 1 次 PCR 后无明显扩增带, 但通过巢式 PCR 后则可扩增出特异大小的带, 说明巢式 PCR 能提高检出率。

经检测 153 份标本可知, 94 例非甲-戊型

肝炎中共检出 15 例 HGV 阳性; 44 例丙型肝炎病人中检出 4 例 HGV 阳性; 7 例献血员中, 4 例 HCV 阳性, 3 例 HGV 阳性, 其中 2 例属 HGV 与 HCV 重叠感染; 重叠感染 HCV 与 HGV 的 6 份标本中, 有 4 份存在多次输血史(即 1, 2, 4, 5)。

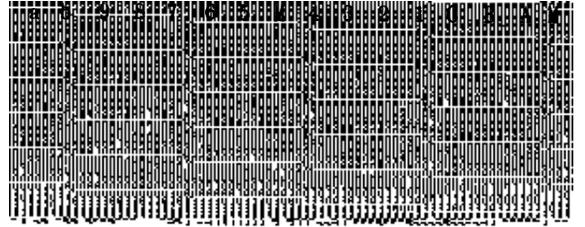


图 1 PCR 电泳检测结果

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products for detection of HCV or/and HGV RNA

M 为 ϕ x174/HaeIII 分子量标准; A, B, C, 1, 2, 3, 4, 8, 9 号为第一次 PCR 产物; 5, 6, 7 号为第二次 PCR 产物; a 和 b 为阴性血清标本对照

M: ϕ x174/HaeIII marker. A, B, C, 1, 2, 3, 4, 8, 9: First PCR products. 5, 6, 7: Nested PCR products; (a PCR). (a b): Negative sample control

3 讨论

我们对部分片段进行序列分析^[4], 证实了扩增片段的特异性。对于 HGV 阳性标本, 我们同时采用了 5'-UTR 区、NS5a 区的引物(BM 公司)进行了验证。为提高 RT-PCR 反应的成功性与检出率, 我们采用以下措施: ①选用的片段在 170-300bp 之间, HGV 与 HCV 的扩增片段相差 30~60bp 左右, 这样两者的扩增效率既不存在较大差异, 而且也易于区分。②考虑到 HGV NS3 区的变异, 我们在原有引物和序列分析结果的基础上, 引物中引进了一些简并碱基^[3,4]。③为简化操作, 减少污染来源, 事先将各反应成分混合, 且 RT-PCR 在一管中完成。④我们采用的 HCV 5'-UTR 区引物与 HGV NS3 区引物皆是经大量检测比较后优化的检出率高的引物, 而且通过巢式 PCR 后进一步提高了灵敏度。

此外, 我们建立的方法既可检测 HCV 或

HGV 的单独感染,又可检测两者的重叠感染,这是由于反应体积较小,引物与酶相对丰余,又采用了 nest-PCR,故同时检测与分别检测 HCV 和 HGV 在扩增效率与特异性上并无明显差异(图 1 所示扩增条带强度相近)。同时由于是在同一管中进行,反应体积为 20 μ l,不仅简便快速节省,而且可以比较重叠感染中 HCV 与 HGV 的 RNA 水平,因而不失为一种临床筛选血源,研究 HCV 与 HGV 重叠感染的简易可靠手段。应用这种方法对我国一些地区的标本进行检测结果表明, HGV 与 HCV 重叠感染率为 6/48(12.5%)左右,其中有多次输血史者重叠感染率较高(4/6 例),提示 HGV 可能与 HCV 的传播途径相似。

参 考 文 献

1 Simons J N, Leary T P, Dawson G J, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature*

Medicine 1995, 1; 564-569.
 2 Linnen J, Wages J, Zhang-Keck Z Y, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus; a transfusion-transmissible agent. *Science*, 1996, 271(5428): 505-508.
 3 王海林, 夏宁邵, 谭文杰等. 从我国肝炎患者中检出 GBV-C 型肝炎病毒 RNA. *病毒学报*, 1996; 12; 183-185.
 4 谭文杰, 夏宁邵, 王海林, 等. 我国庚型肝炎病毒 NS3 区部分基因的克隆与序列分析. *高技术通讯*, 1996, 6; 34-37.
 5 Sabins S, Ricardo L G, Thomas D, et al. Identification of GBV-C/hepatitis G RNA in chronic hepatitis C patients. *J Med Virol*, 1996, 50; 71-74.
 6 George J D, Georgs G S, Tami J P M, et al. Prevalence studies of GB virus C infection using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol*, 1996, 50; 97-103.
 7 夏宁邵, 王海林, 毕胜利, 等. 中国株丙型肝炎病毒(HCV)感染猿猴后 5' UTR-C 区基因组的 cDNA 序列分析. *病毒学报*, 1996, 12; 111-117.
 8 Boom R, Sol C J A, Salimans M M M, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acid. *J Clin Microbiol*, 1990, 28; 495.

用间接免疫荧光法检测河北省健康人血清中人类 6 型疱疹病毒 IgG 抗体

王璐 崔灵芝 付秋萍 李春卿

人类 6 型疱疹病毒(HHV-6)是近年分离到的对 T 淋巴细胞具有高度亲嗜性的 DNA 病毒,已确认是幼儿急疹的病原,并与艾滋病,淋巴瘤等多种疾病有关,因此颇受重视。为了解 HHV-6 在河北省的流行情况,特对其部分健康人群进行了 HHV-6 感染状况调查。实验所用抗原和感染细胞由美国国立卫生研究院(NIH)提供。二次抗体用中国军事医学科学院生产的 FITC 标记的羊抗人 IgG。间接免疫荧光法(IFA)按常规操作。血清效价 \geq 1:10 为阳性。研究发现河北省健康人血清中 HHV-6 IgG 抗体阳性率为 55.3%,几何平均滴度(GMT)为 9.95,不同年龄性别人群血清抗体阳性率和 GMT 差异无显著性意义, P 值均大于 0.05; 男女间差异也无显著性意义。与国内外其它地区研究结果相比,如美国为 60%~70%,日本 95%,吉布提 71%,印度 76%,俄国 71.7%,意大利 63.64%,泰国 71.7%,巴西 5.4%~14.9%,该省人群的抗体阳性率居中等水平,低于中国广州(69.3%)和延边(75.3%),提示 HHV-6 感染在河北省人群中并不少见,在中国的其它地区也可能早已流行过,从而在健康人群中导致较高的抗体阳性率。有研究认为 HHV-6 的主要靶细胞与人免疫缺陷病毒 1 型一样均为 CD4⁺细胞。在体外试验中,HHV-6 能加速感染 HIV-1 的 CD4 细胞死亡,由此推断 HHV-6 有可能参与艾滋病病毒的致病过程或是共同致病的一个辅助因子。目前 HIV 感染者在我国逐渐增加,若合并 HHV-6 感染会加速病情恶化,严重危害人类健康,故值得进一步研究。

本课题受美国中华医学基金会基金资助

作者单位: 110031 沈阳医学院流行病教研室(王璐 崔灵芝 付秋萍), 辽宁省计划生育委员会科技处(李春卿)

1996 年 8 月 1 日收稿 1997 年 8 月 6 日修回