

实时荧光定量 PCR 检测血清中 HCV-RNA

张淑云, 刘 伟, 谷鸿喜, 杜 博, 常曼丽

张淑云, 刘伟, 杜博, 常曼丽, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心 黑龙江省哈尔滨市 150086
谷鸿喜, 哈尔滨医科大学微生物学教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086
项目负责人: 张淑云, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路 247 号, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心. dongguangu@0451.com
电话: 0451-86605743
收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-03-16

摘要

目的: 通过实时荧光定量PCR(FQ-PCR)与逆转录PCR(RT-PCR)两种方法检测血清HCV-RNA的结果比较, 评价FQ-PCR法的临床应用价值.

方法: 样本为经ELISA法筛选抗HCV阳性血清401份, 其中221份采用实时荧光定量PCR法检测, 180份采用RT-PCR法检测.

结果: FQ-PCR法检测HCV-RNA, 阳性率($\geq 10^2$ 拷贝/mL) 68.3% (151/221), 定量范围在 10^2 - 10^7 拷贝/mL 之间, 但 $\leq 10^6$ 拷贝/mL 占 98.1%(148/151); RT-PCR法检测阳性率为 30%(54/180).

结论: FQ-PCR 检测 HCV-RNA 较 RT-PCR 是一种省时、简便、敏感、特异和防污染的体外基因扩增与定量检测方法, 其结果对临床诊断和疗效观察有重要的指导意义.

张淑云, 刘伟, 谷鸿喜, 杜博, 常曼丽. 实时荧光定量 PCR 检测血清中 HCV-RNA. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1464-1465
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1464.asp>

0 引言

实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)技术是近几年发展起来的一种核酸定量检测技术. FQ-PCR 以其快速简便、定量和防污染等优点很快被临床应用^[1], 但其检测结果的临床应用价值尚需进一步认识. 为了探讨其在检测丙型肝炎病毒核酸(HCV-RNA)中的意义, 我们对180例采用逆转录 PCR(RT-PCR)和221例采用 FQ-PCR 进行 HCV-RNA 检测的结果进行了分析和比较, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 1999-12/2003-05 来我院门诊就诊, 并经 ELISA 法筛选抗-HCV 阳性患者的血清 401 份; RT-PCR 法是使用北京人民医院肝病研究所提供的 HCV RNA 检测试剂盒和美国 PE 公司基因扩增仪(PE480); FQ-PCR 是采用深圳匹基生物工程股份有限公司 HCV RNA 荧光定量检测试剂盒(一步法)和罗氏公司荧光定量 PCR 仪.
1.2 方法 按就诊时间分两组, 前 180 份标本采用了

RT-PCR 法检测, 后 221 份采用的是 FQ-PCR 法检测. 实验操作和结果分析均严格按照说明书进行.

统计学处理 采用 SPSS10.0 系统分析软件进行数据处理, 两组率的比较采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果 RT-PCR 扩增产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 于 180 bp 处出现特异性核酸条带为 HCV RNA 阳性(图 1).

2.2 FQ-PCR 结果

2.2.1 FQ-PCR 阳性标准曲线 HCV 定量阳性标准品(HCV-RNA 质粒)经 FQ-PCR 测定, 以起始浓度的对数值为横坐标, 以 PCR 扩增的循环域值(CT)为纵坐标, 可以得到一条直线型标准曲线(图 2), 相关系数 $r = -0.998$, 斜率为 -3.558.

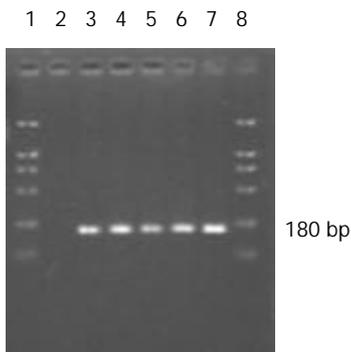


图1 RT-PCR 扩增 HCV RNA 电泳. 1, 8 为 MpUC19DNA/Msp 相对分子质量标准; 2 为阴性对照; 3, 4, 5, 6 为阳性标本.

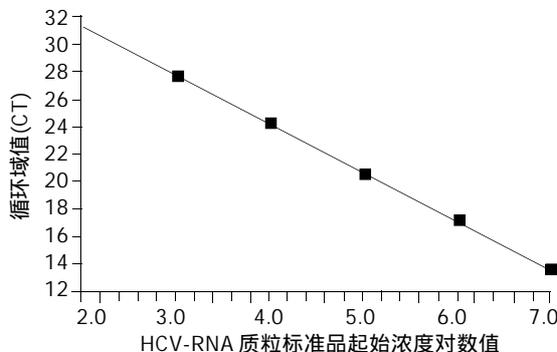


图2 HCV-RNA 的 FQ-PCR 定量标准曲线.

2.2.2 HCV-RNA 的定量及其范围 FQ-PCR 法检测 221 份血清, HCV-RNA $\geq 10^2$ 拷贝/mL 占 68.3%(151/221), 定量范围在 10^2 - 10^7 拷贝/mL 之间; 阳性分布主要在 10^6 拷贝/mL 及其以下, 占 98.1%(148/151)(表 1).

2.2.3 FQ-PCR 与 RT-PCR 结果比较 FQ-PCR 法检测

血清中 HCV-RNA 阳性率为 68.3%，而常规 RT-PCR 法阳性率为 30%，二者差异显著($\chi^2=58.3$, $P < 0.01$, 表 2); FQ-PCR 法操作时间(3-4 h)短于 RT-PCR 法(5-6 h)。

表 1 FQ-PCR 法检测 221 份血清中 HCV-RNA 的含量分布

HCV-RNA 的含量	n	百分率(%)
$<10^2$	70	31.7
10^2 -	21	9.5
10^3 -	37	16.7
10^4 -	26	11.8
10^5 -	40	18.1
10^6 -	24	10.8
10^7 -	3	1.4
合计	221	100

表 2 两种不同方法检测血清中 HCV-RNA 结果比较

方法	n	阳性份数	阳性率(%)
FQ-PCR	221	151	68.3
RT-PCR	180	54	30

$\chi^2=58.3$, $P < 0.01$.

3 讨论

目前抗 HCV 仍然是临床诊断 HCV 感染的主要手段,但存在多方面的局限性^[2-3]。常规 RT-PCR 及其他许多 PCR 法虽能反映体内病毒存在,也提高了 HCV 检测的灵敏度和特异性,但不能准确定量及动态观察病毒水平的变化,并有 PCR 产物污染的可能^[4-6]。

FQ-PCR 技术是在 PCR 过程中引入了特异性荧光探针杂交和光学检测技术,不仅提高了 PCR 扩增的特异性和检测的灵敏度,而且通过荧光共振能量转移(FRET)原理、循环阈值(CT 值)的设定和 CT-浓度标准曲线,实现了 PCR 起始模板的准确定量和在线监测 PCR 全过程。

本研究用 FQ-PCR 法检测了血清中 HCV-RNA 的含量,定量可低至 10^2 和高达 10^7 拷贝/mL,阳性率 68.3%,显著高于 RT-PCR 法(30%),与文献[7-8]报道基本一致,反映了该方法可定量和敏感的特点。测定的 HCV-RNA 水平 98.1% 在 10^6 拷贝/mL 或以下,与乙肝病毒(HBV)在体内的高含量(10^6 - 10^8 拷贝/mL)相比相对较低^[9],进一

步证实了文献报道的 HCV 在体内的复制水平相对较低的特点^[10-11]。

本检测和程刚 et al^[3]的报道均显示 FQ-PCR 法检测 HCV-RNA 的定量范围较宽, HCV-RNA: 10^2 - 10^7 拷贝/mL,因而在用药前后及用药过程中采集多份标本进行检测,即动态观察 HCV-RNA 水平的变化,可以很好地反映药物的疗效。

另外,在 FQ-PCR 操作中,只需一次加样即可完成 HCV-RNA 的逆转录、扩增和定量,一次检测只需 3-4 h,与 RT-PCR 相比,具有方便、省时、快捷,有效解决 PCR 污染问题和自动化程度高等特点。

总之, FQ-PCR 法检测 HCV-RNA 较 RT-PCR 法敏感,且能定量,能动态观察 HCV-RNA 水平的变化,可为了解丙型肝炎病毒体内复制情况及诊断、选择治疗方案和评估药物疗效等提供较可靠的依据。但 FQ-PCR 法也存在所需仪器昂贵、检测费用高等缺点,有待进一步改进。

4 参考文献

- 1 卢圣栋. 生物技术与疾病诊断 - 兼论人类基因治疗. 第 1 版. 北京: 化学工业出版社, 2002:88-98
- 2 赵继义, 刘雪梅, 郭薇媛, 高磊, 钟照华, 谷鸿喜. RT 套式 PCR 检测血浆 HCV RNA 及与抗 HCV 检测的比较. 微生物学杂志 2001;21:37-38
- 3 程刚, 何蕴韶, 周新宇, 李虎. 丙型肝炎病毒(HCV)荧光 PCR(F-PCR)试剂盒的研制及与免疫学方法的比较. 中国免疫学杂志 2002;18:464-468
- 4 宋燕斌, 崔晓红, 潘卫, 王锦红, 戚中田. RT-PCR 检测 HCV RNA 假阳性结果分析. 第二军医大学学报 1996;17:391-392
- 5 汤伟, 杜绍财, 陶其敏, 朱凌. 抗污染 RT-PCR 检测 HCV RNA 的研究. 新消化病学杂志 1997;5:638-639
- 6 杨才生, 卢桥生. 血清 HCV RNA 定量检测方法的研究进展. 国外医学病毒学分册 1998;5:57-59
- 7 李伯安, 马洪滨, 薛净, 乔小红, 程云. 定量聚合酶链反应在检测丙型肝炎病毒感染血清中的应用. 中华传染病杂志 1998;16:35-36
- 8 潘宁, 张建琼, 李丽, 单祥年. 应用荧光定量 PCR 检测血清中 HCV RNA. 东南大学学报(医学版) 2003;22:16-18
- 9 张淑云, 杜博, 刘伟, 范业君, 谷鸿喜. 实时荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 临床意义的研究. 中华临床医药 2002;3:9-11
- 10 Mayerat C, Burgisser P, Lavanchy D, Mantegani A, Frei PC. Comparison of a competitive combined reverse transcription-PCR assay with a branched-DNA assay for hepatitis C virus RNA quantitation. *J Clin Microbiol* 1996;34:2702-2706
- 11 Gerken G, Rothaar T, Rumi MG, Soffredini R, Trippler M, Blunk MJ, Butcher A, Soviero S, Colucci G. Performance of the COBAS AMPLYCOR HCV MONITOR test, version 2.0, an automated reverse transcription-PCR quantitative system for hepatitis C virus load determination. *J Clin Microbiol* 2000;38: 2210-2214