

新型 TaqMan-MGB 探针实时荧光 定量 PCR 检测 HCV-RNA 方法学的建立^{*}

乔斌, 李艳, 汪明, 熊格 (武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

摘要:目的 建立一种快速、准确定量 HCV-RNA 的实时荧光定量 PCR 检测方法。方法 Clustal X 软件对 HCV 核酸序列进行比对分析, 在 HCV-RNA 的保守区域 5'UTR 设计引物和探针, 棋盘滴定法对实时荧光定量 PCR 体系进行性能优化, 制作假病毒颗粒作为定量标准品对新建方法进行性能评价, 并与临床常用 HCV-RNA 定量检测试剂盒进行比对分析, 探讨其应用价值。结果 建立 HCV 核酸定量高灵敏度方法, 该方法可以检测 1a, 1b, 2a, 3a, 3b, 6a, 6b 等多个 HCV 基因型, 检测 HCV-RNA 的灵敏度为 50 IU/ml, 精密度 CV<5%, 检测结果可溯源至卫生部临床检验中心丙型肝炎病毒核酸 (HCV-RNA) 血清标准物质 GBW09151a。新建方法与凯杰 HCV-RNA 荧光定量检测试剂盒同时检测 40 例临床样本, 阳性一致率为 100%, 阴性一致率为 56%; 自建方法检测阳性的 14 个样本中, 凯杰试剂 0 个阳性, 表明自建方法的检测灵敏度要高于凯杰试剂。结论 建立的 HCV 核酸定量新方法灵敏度高、特异性好、精密度高, 可应用于临床。

关键词: TaqMan-MGB 探针; 实时荧光定量 PCR; 丙型肝炎病毒核酸; 假病毒颗粒

中图分类号: Q503; R512.63 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)05-032-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.009

Development of a New TaqMan-MGB Probe-Based Real-Time qPCR Method for the Detection of HCV-RNA

QIAO Bin, LI Yan, WANG Ming, XIONG Ge (Department

of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: Objective Developing a rapid and accurate real-time qPCR method for the detection of HCV-RNA. **Methods** HCV nucleotide sequence was analysed in Clustal software and primers and probe were designed in the conserved region of 5'UTR. The reaction system optimization of real-time qPCR method was used chessboard titration, pseudoviral particles were used as quantitative standard to assess the performance. New methods was compared with clinical commonly used kit of HCV-RNA and discuss the application value. **Results** The sensitivity of new real-time qPCR method was 50 IU/ml, coefficient variation was less than 5%. The quantitative results of this method could be traceable to national standards of GBW09151a. 40 samples were determined by new methods and clinical commonly used kit of HCV-RNA, the positive concordance rate was 100%, the negative concordance rate was 56%. 14 samples were positive by new method, but negative by Qiagen kit, illustrating that the sensitivity of new method was superior to Qiagen kit. **Conclusion** New TaqMan-MGB probe-based real-time qPCR method is a specific, sensitive, simple, rapid and exactly used to detection of HCV-RNA.

Keywords: TaqMan-MGB probe; real-time qPCR; HCV-RNA; pseudoviral particles

目前全球大约有 1.85 亿人感染过 HCV, 每年因感染 HCV 死亡的人数达到 35 万人^[1]。我国是 HCV 感染流行的高发地区, 大约有 2 000 万人感染过 HCV^[2]。早期诊断 HCV 感染和制订个体化治疗方案对提高治疗效果、减轻患者负担至关重要。

HCV 感染主要通过检测 HCV 抗体、HCV 核心抗原和 HCV-RNA 进行诊断, 其中 HCV-RNA 检测尤为重要。低浓度 HCV-RNA 的检测, 不仅有助于 HCV 感染的早期诊断, 而且对治疗过程中的疗效监测、活动性丙型肝炎的判断均有重要意义^[3~5]。然而, 对于低浓度 HCV-RNA, 目前我国临床上常用的试剂盒并不能满足检测需求。因此, 建立一种高灵敏度核酸定量检测技术, 快速、准确

检测 HCV-RNA 至关重要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源: 2015 年 1 月~12 月于武汉大学人民医院检验科进行 HCV-RNA 核酸定量检测患者的 EDTA 抗凝血标本 5 ml。标本 1 600 g 离心 10 min, 取上层血浆于 EP 管中, -20℃ 保存备用。所有患者均签订实验知情同意书, 并经医院伦理委员会批准。

1.1.2 主要仪器及试剂: 凯杰 careHCV RT-PCR Assay V2 试剂盒, 凯杰 careHCV RT-PCR Assay V1 核酸提取试剂盒 (凯杰, 深圳); 凯杰 QIAcube 全自动核酸提取仪 (凯杰, 德国); 宝生物 One Step PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒 (Takara, 大连);

* 作者简介: 乔斌 (1988—), 男, 硕士研究生, 技师, 主要从事临床分子诊断, E-mail: qiaobin223@126.com。

通讯作者: 李艳, E-mail: liyan@whu.edu.cn。

ABI ViiA7 荧光定量 PCR 仪(ABI,美国);中山大学达安基因股份有限公司丙型肝炎病毒核酸血清标准物质 GBW(E)090494,GBW(E)090495,GBW(E)090496(达安,广州)。

1.2 方法

1.2.1 HCV RNA 提取:采用凯杰 QIAcube 全自动核酸提取仪联合凯杰 careHCV RT-PCR Assay V1 核酸提取试剂盒提取 HCV RNA。将 200 μ l 血浆分别加入到仪器配套的螺口管中,依次放置到各个标本孔中,按照仪器说明书配制试剂并放置到相应的位置,运行全自动核酸提取仪,即可得到 HCV RNA。

1.2.2 标准品的制备:选用丙型肝炎病毒基因组保守区域 5'端非编码区(5'UTR)序列作为靶基因制作假病毒颗粒来构建所需的标准品。假病毒颗粒的制作由山东维真生物科技有限公司制备并检测,简要操作步骤见图 1。



图 1 HCV 假病毒样颗粒制备流程

1.2.3 引物和探针设计:在 HCV Database 数据库 (<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/Tools/Outline.html>)中下载 367 条 HCV 不同基因型的参考序列,Clustal X(1.83)进行序列比对分析,HCV 5'UTR 区序列最为保守,种系变化程度及进化率都很低,碱基突变较少见,适宜作为 PCR 扩增的目标区域。将 5'UTR 区序列放入 Oligo8.0 引物设计软件中,设计引物和探针。并在 NCBI Primer-BLAST 网页中进行比对,确定最好的引物、探针组合。

1.2.4 新建方法条件优化:使用假病毒颗粒作为检测样本,通过棋盘滴定法对 HCV 荧光定量反应体系的酶量、镁离子浓度、引物探针浓度、dNTP 浓度、反应体积、反应 buffer 进行优化,使 PCR 扩增曲线达到最优;每次优化某一因素,都保持其他条件不变,通过一个因素的变化,对比扩增曲线的优劣,确定该因素的最佳条件。优化过程见图 2。

1.2.5 灵敏度和特异度试验:见图 3。使用达安

国家参考品进行梯度稀释并检测 20 次,将具有 95%以上阳性检出率的病毒水平作为灵敏度。特异度试验通过选取核酸序列具有同源性、易引起相同或相似的临床症状的 HBV-DNA,EB-DNA 和人类基因组核酸与阴、阳性质控品同时检测验证。

1.2.6 基因型覆盖试验:收集在武汉大学人民医院采用 Sanger 测序法进行 HCV 基因分型患者的标本,包含 1a 型 2 例,1b 型 5 例,2a 型 2 例,3a 型 2 例,3b 型 2 例,6a 型 2 例,6b 型 2 例,暂无 4 型、5 型和 7 型患者的标本,核酸浓度为 $2 \times 10^3 \sim 5 \times 10^7$ 。采用该方法检测不同基因型的标本,阳性符合率为 100%。

1.2.7 精密度试验:见图 4。相同条件下对高次方样本(5.0×10^6)和低次方样本(5.0×10^3)进行 20 次重复测定,计算所得结果的变异程度。精密度实验见图 4。

1.2.8 临床标本检测:凯杰 HCV-RNA 核酸定量试剂盒检测 40 个临床样本,自建方法检测同一批样本,结果进行比对分析。

2 结果

2.1 定量标准品 山东维真生物科技公司制备并检测合格的含有目标片段的假病毒样颗粒 1 ml,荧光定量 PCR 方法检测浓度为 5×10^{10} IU/ml。

2.2 引物和探针 引物、探针序列见表 1。

表 1 引物、探针序列

引物名称	引物序列	位置(nt)
前向引物(F)	5'-TAGCCACATCMRCTCCGTGTG-3'	75~96
反向引物(R)	5'-GTACCTGGTCATAGCYTCCGTRAA-3'	163~186
探针(P)	5'-6FAMCCACATAGCYTCCGTACCTGMGBNFQ-3'	117~137

注: * 引物位置参考 NCBI Reference Sequence:NC_004102.1。

2.3 条件优化 使用假病毒颗粒作为检测样本,通过棋盘滴定法对 HCV 荧光定量反应体系进行优化,最佳检测体系见表 2。

表 2 自建方法最佳反应体系

成分	体积(μ l)	浓度
2×One Step RT-PCR Buffer III (2×)	25	1×
TaKaRa Ex Taq HS(5 U/ μ l)	0.5	0.25U
PrimeScript RT Enzyme Mix II	1	200U
ROX Reference Dye II (50×)	1	0.5×
前向引物	1	0.2 μ mol/L
反向引物	1	0.2 μ mol/L
探针	0.5	0.1 μ mol/L
模板 RNA	20	
总体积	50	

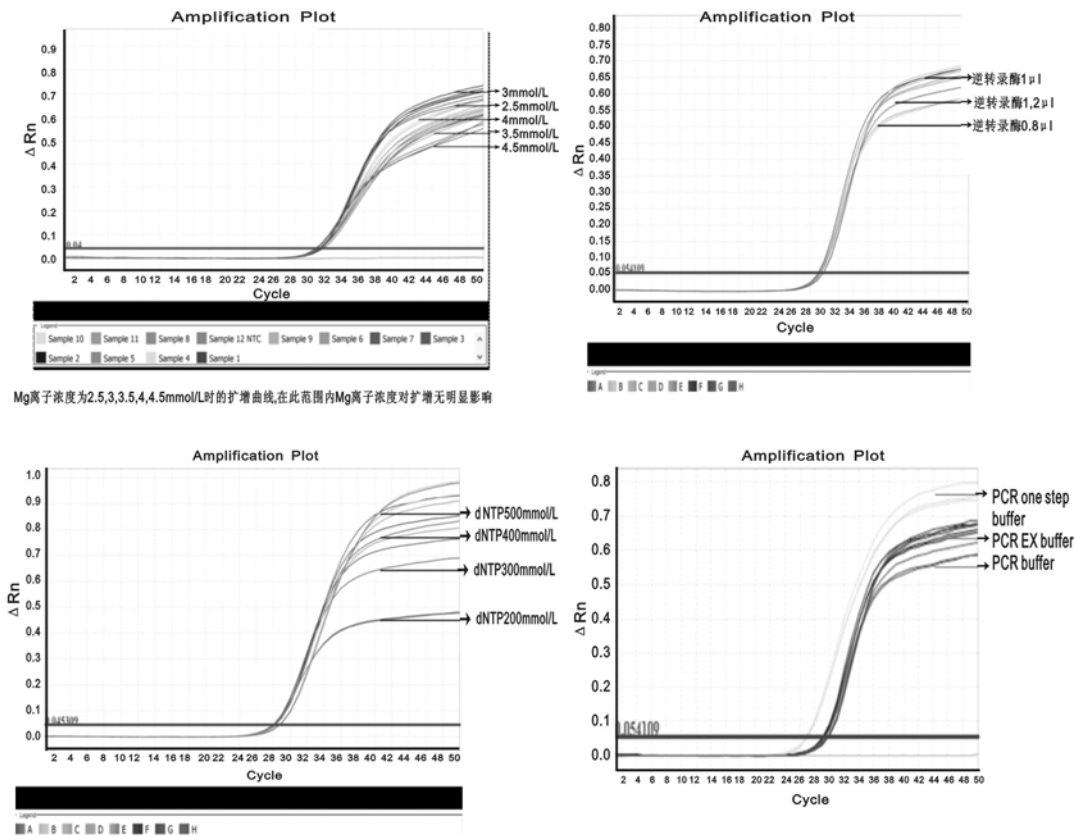


图2 自建方法条件优化

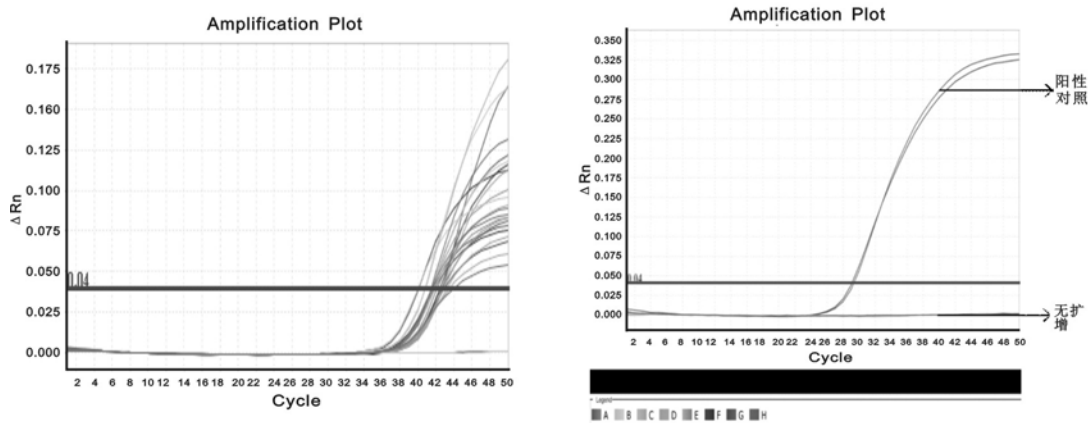


图3 灵敏度和特异度实验

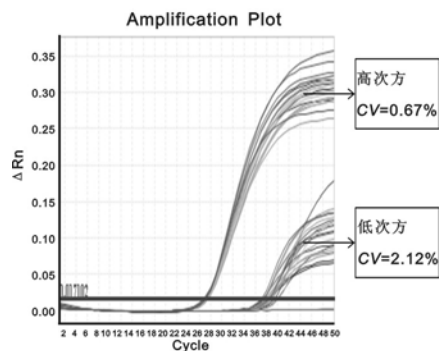


图4 精密度试验

2.4 灵敏度和特异度 使用优化好的 PCR 反应体系检测梯度稀释的达安国家参考品 20 次,检测灵敏度为 50 IU/ml。新建方法检测 HBV-DNA, EB-DNA 和人类基因组核酸等,均无扩增曲线,说明该方法特异度好。

2.5 精密度 新建方法重复检测高值标本和低值标本 20 次, CV 值分别为 0.67% 和 2.12%, 说明该方法精密度好。

2.6 临床标本检测 新建方法和凯杰 HCV-RNA 核酸定量试剂盒同时检测 40 个临床样本, 结果见表 3。

表3 自建方法与凯杰试剂比较

自建方法	凯杰试剂		合计
	阳性	阴性	
阳性	15	14	29
阴性	0	11	11
总计	15	25	40

注:阳性一致率:15/15×100%=100%;阴性一致率:11/25×100%=56%。

3 讨论 本研究建立了一种高灵敏度的 HCV RNA 定量检测方法。目前,国内 HCV-RNA 定量试剂盒大部分检测限仍为 500 IU/ml,对 HCV-RNA 浓度较低患者(丙型肝炎早期感染患者、治疗后复发患者)不能及时地诊断;同时由于检测灵敏度较低,不能有效监测 HCV-RNA 浓度的动态变化,从而不能准确判断慢性丙肝的治疗效果。

本研究通过查找文献,了解 HCV 基因组的基本情况,并对 367 条 HCV 参考序列进行比对分析,发现 HCV 5'端非编码区序列最为保守,适合作为荧光定量 PCR 扩增目的区域。然后,在此区域设计 PCR 的引物和探针。本实验设计的探针为 MGB 探针,MGB 可以显著增强探针与模板的结合能力,提高探针的 T_m 值,从而使探针的长度大大缩短,利于探针的设计。MGB 探针的淬灭基团不发射荧光,报告基团与淬灭基团的距离较短,结构上能够更有效地淬灭荧光,使反应的背景值更低,增加了反应的特异度,提高了扩增效率。

引物、酶、dNTP、模板和 Mg²⁺ 为 PCR 反应的五大要素。荧光定量 PCR 反应中探针的质量也至关重要。本实验通过改变 PCR 反应中的各个影响因素,对反应体系和反应程序进行优化,从而建立了一种快速、准确定量 HCV-RNA 的方法。通过制作假病毒颗粒作为标准品对该检测方法进行性能验证。目前临床上所用的 HCV-RNA 质控品、阳性对照和标准品,是存在于血清中的原病毒颗粒,或者体外转录的 RNA,或者是 cDNA,前者不但具有传染危险性,而且易为核糖核酸酶(RNase)所降解;体外转录 RNA 因不具有包膜结构,不能监测核酸的提取过程;而 cDNA 不是 RNA,不能反映逆转录过程对测定结果的影响。假病毒颗粒是包被有 HCV 核酸序列、有包膜的、无感染活性的颗粒,该颗粒由于包被有蛋白包膜,可以防止环境中 RNA 酶对 HCV-RNA 的降解,因此可以长期保存,同时与血液中的 HCV 颗粒具有类似的结构,可以同时监测 HCV 的提取和逆转录过程。因此,假病毒颗粒作为标准品定量 HCV-RNA,结果更为准确可靠。

本自建方法检测 HCV-RNA 的线性范围是 $5.0 \times 10^2 \sim 5.0 \times 10^{10}$ IU/ml,灵敏度为 50IU/ml,精密度 CV<5%,误差≤0.5 log,检测结果可溯源至卫生部临床检验中心丙型肝炎病毒核酸(HCV-RNA)血清标准物质 GBW09151a。该方法与凯杰 HCV 定量试剂盒同时检测一批病人样本,阳性一致率为 100%,阴性一致率为 56%,而自建方法阳性不一致的 14 个样本中,凯杰试剂 0 个阳性,表明自建方法的检测灵敏度要高于凯杰试剂。

随着直接抗病毒药物(DAA)的发展,慢性丙型肝炎治疗过程中的 HCV-RNA 浓度监测也发生了变化,对最低检测限和线性范围提出了新的要求^[6~8],因此,新的检测技术和检测结果的解释有待进一步研究。

参考文献:

- [1] World Health Organization Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection[M]. Geneva: World Health Organization, 2014(172):343-346.
- [2] Qin Q, Smith MK, Wang L, et al. Hepatitis C virus infection in China: An emerging public health issue [J]. Journal of Viral Hepatitis, 2015, 22(3):238-244.
- [3] American Association for the Study of Liver Diseases. Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C [OL]. <http://www.hcvguidelines.org>, 2014.
- [4] European Association for Study of Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of hepatitis C virus infection[J]. Journal of Hepatology, 2014, 60(2):392-420.
- [5] 李 娅, 张 赞, 皇 海, 等. HCV-RNA 与 HCV-Ab, HCV-cAg 相关性分析研究[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(5):120-122.
Li Y, Zhang Y, Huang H, et al. Correlation analysis of HCV-RNA, HCV-Ab and HCV-cAg [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(5):120-122.
- [6] Gallarda JL, Dragon E. Blood screening by nucleic acid amplification technology: Current issues, future challenges[J]. Molecular Diagnosis: A Journal Devoted to the Understanding of Human Disease Through the Clinical Application of Molecular Biology, 2000, 5(1):11-22.
- [7] Feeney ER, Chung RT. Antiviral treatment of hepatitis C[J]. BMJ, 2014(348):g3308.
- [8] Kohli A, Shaffer A, Sherman A, et al. Treatment of hepatitis c: A systematic review[J]. JAMA, 2014, 312(6):631-640.

收稿日期:2017-01-05

修回日期:2017-02-23