

· 论 著 ·

TaqMan-MGB 探针对 HCV 基因的检测及分型研究

林秀蓉, 陈巧绘, 林 海

【摘要】 目的 建立快速准确检测丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)常见基因分型方法,为丙型肝炎临床诊断和治疗提供依据。**方法** 对 40 例 HCV-RNA 阳性血清标本,通过逆转录为 cDNA 后,进行 TaqMan-MGB 探针检测、分型。**结果** HCV-RNA 阳性血清 40 例,共检出 39 例,其中 1b 型 29 例,占 74.36%, 2a 型 5 例占 12.82%, 3b 型 6 例占 13.38%。**结论** 所测患者的基因型以 1b 为主,3b 次之,2a 相对较低;TaqMan-MGB 探针分型的符合率达 97.5%。

【关键词】 丙型肝炎病毒; TaqMan-MGB 探针; 基因分型

【中图分类号】 R349.6 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2012)01-0020-03

Study on rapid detecting and genotyping of HCV gene by TaqMan-MGB probes

LIN Xiu-rong, CHEN Qiao-hui, LIN Hai. Out-patient Department, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian 350025, China

【Abstract】 Objective To establish an assay for fast and accurate genotyping HCV with TaqMan-MGB probes and to support the clinical diagnosis and treatment. **Methods** Forty serum samples of HCV-RNA positive were collected. The cDNA was transcribed and genotyped with TaqMan-MGB probes. **Results** HCV-RNA positive were detected in 39 out of 40 specimens. Of which, 29 samples were genotyped as 1b (74.36%), 5 samples were 2a (12.82%), and 6 samples were 3b (13.38%). **Conclusion** The type of 1b was the mainly genotype, 3b and 2a types were listed next in the detected specimens. This genotyping methods can genotype the HCV gene successfully.

【Key words】 hepatitis C virus; TaqMan-MGB probe; genotype

慢性丙型肝炎 10 年内约有 20% 发展成肝硬化,而肝硬化患者每年约 3% 发展为肝细胞癌,因此丙型肝炎的快速分型与诊断是临床科学治疗的前提和基础^[1]。丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)属黄热病毒科,为单股正链 RNA 病毒,约 9600 个核苷酸,具有高度多态性和变异性,根据基因序列的同源性可分为不同的型和亚型^[2]。Simmonds 提出并根据 HCV 的 5'-NCR 区序列的差异,建立了 HCV 基因组序列的分型方法,将 HCV 分为 6 种基因型和 30 几种亚型^[3]。在此分型方法的基础上,目前已报道的基因型有 11 个,亚型超过 70 种。我国主要以基因型 1b 为主,2a 次之,3b 在华南和西南地区流行,6a 主要流行于港澳地区^[4-5]。本研究针对国内检测较多的 3 种基因型分别设计 TaqMan-MGB 探针,将 RNA 逆转录为 cDNA 后,再利用探针进行分型,现将结果报告如下。

1 材料与方法

作者简介: 林秀蓉(1971-),女,福建福州人,本科,主管护师,从事门诊护理及管理工作

作者单位: 350025 福建福州,南京军区福州总医院门诊部

1.1 材料 2010 年 8 月至 12 月收集来自福建某医院 HCV-RNA 阳性血清 40 例,其中男 24 例,女 16 例,年龄 15~65 岁,静脉采血 4 ml 于 30 min 内分离血清, -20℃ 冻存备用。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 主要仪器 ABI 公司 7500 型 realtime-PCR 仪, TGL-16G 低温高速离心机, 新加坡 ESCO 4A-4A1 生物安全柜。

1.2.2 主要试剂 HCV-RNA 定量试剂盒购于南京冯阳生物技术公司, SuperScript™ III 第一链合成试剂盒、RT-PCR 试剂盒购于 Invitrogen 公司, 探针及反应预混液购于上海基康公司。

1.2.3 探针及引物序列 对从美国国立生物技术信息中心(NCBI)下载的 HCV 基因序进行比较和筛选,用 Express 2.0 设计基因探针(表 1)。

1.3 方法 针对三型常见的丙型肝炎基因型,分别设计 TaqMan 探针,在探针的 5' 分别标记 FAM (FAM-1b, FAM-3b)、VIC (VIC-2a), 3' 标记淬灭基因 TAMARA 和 MGB 基因。检测时每一个样品分两管进行,第一管加入 FAM-1b 和 VIC-2a,第二管加入 FAM-3b 和 VIC-2a,将 VIC 设置为绿色, FAM-1b

设置为红色,FAM-3b 设置为棕色,扩增结束后,根据读取的扩增曲线快速分型(图 1)。

表 1 试验所涉及的引物及 MGB 探针
(探针 1-3 分别对应于 1b、2a 和 3b 基因)

引物名称	序列(5'→3')
Sense-primer	TTAGCCATGCGCTTAGT
Anti-sense-primer	CACTCGCAAGCACCTA
1. Probe-1b	CCCCGCGAGACTGC-MGB
2. Probe-2a	GGGAAGTACTGGGT-MGB
3. Probe-3b	AATCGCCGGGATGAC-MGB

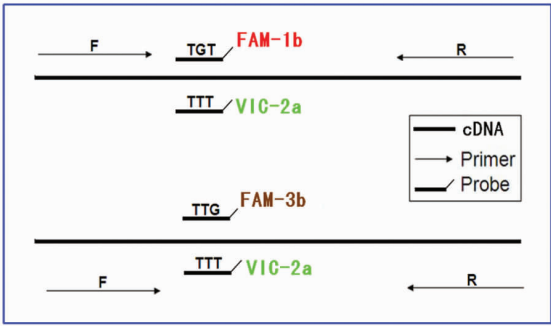


图 1 TaqMan-MGB 探针检测 HCV 基因示意图

检测 1b 和 3b 的等位基因的探针在 5' 标记 FAM 发光基团,检测 2a 基因的探针在 5' 标记 VIC 发光基团

1.3.1 总 RNA 的提取 将 200 μl 血液样本放入离心管,在离心管中加入 800 μl Trizol,室温混匀,放置 5 min;加入 200 μl 氯仿剧烈振荡 15 s,室温放置 2 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min(离心半径 8 cm,下同)离心 15 min;仔细吸取上层水相到另一离心管中,加入 500 μl 异丙醇,轻轻混匀后室温静置 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min 离心 10 min,弃上清;加入 75% 乙醇 1 ml,充分洗涤沉淀;4 $^{\circ}\text{C}$ 7500 r/min 离心 5 min,弃上

清,洁净工作台上吹风至沉淀干燥;将沉淀溶于 10 μl DEPC 处理的水中,立即进入 cDNA 第一链的合成。

1.3.2 cDNA 第一链合成 反应体积 20 μl ,其中 10 mM dNTP 1 μl ,10 pmol 引物 Oligo(dT)1 μl ,总 RNA 2 μl ,RNA 酶抑制剂 1 μl (40 U/ μl),SuperScriptTM III 0.5 μl (200 U/ μl),按以下条件进行反转录反应:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,迅速置于冰浴中 2 min;42 $^{\circ}\text{C}$,90 min,70 $^{\circ}\text{C}$,15 min,37 $^{\circ}\text{C}$ 加入 RNAaseH(2 U/ μl) 1 μl ,孵育 20 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.3 反应体系设计及检测 为了既节约又能检测目的序列,我们设计了双管法来检测 HCV 基因,探针 Prob1、Prob2 和引物 F 及 R 组成一组,用来检测 1b 和 2a;探针 Prob2 和探针 Prob3 及引物 F、R 组成一组,用来检测 2a 和 3b。反应在 Stedp one real-time PCR 仪中进行,反应设置为:50 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 始变性 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s,40 个循环,每一次循环结束检测荧光,全部反应结束后检测荧光判读基因分型。

2 结果

利用荧光定量 PCR TaqMan-MGB 扩增建立的检测方案,对 40 个样本进行了检测。根据扩增曲线,可以方便快速地检测出大部分样本的基因型(图 2),共有 39 个样品被检出,检出率 97.5%。其中,1b 型 29 例,占 74.36%;2a 型 5 例,占 12.82%;3b 型 6 例,占 13.38%。

3 讨论

HCV 是一种经血液传播引起的慢性肝脏疾病的 RNA 病毒,其核酸是单股线性,正链 RNA 长约 9.4 kbp。由于病毒缺乏 RNA 复制酶亦缺乏校正

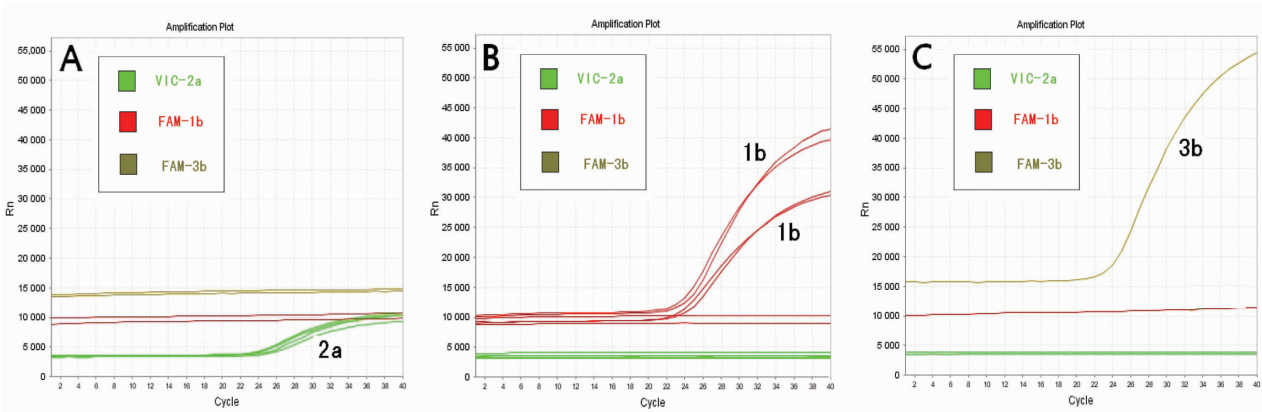


图 2 扩增结果

A:HCV-2a;B:HCV-1b;C:HCV-3b

功能,复制时易引起基因突变,因此 HCV 病毒呈现高度异质性,不同地区、不同人群甚至不同个体分离到的病毒株基因组均不同。根据基因序列差异,目前 HCV 主要被划分为 6 个基因型,不同基因型的分布有地区差异。

我国大陆地区 HCV 基因型主要为 1 型,其次为 2 型,香港地区还有 6 型,其分布呈南北差异,南方以 1 型为主,北方 2 型逐渐增多^[7]。郝飞等^[6]报道,我国大陆地区 1b 型占 80%,与本研究结果大致相当。但是近年由于人口流动增加,HCV 的地域分布也有所变化,福建为沿海地区,对外交流多,人口流动快,人群中 HCV 基因型呈现动态变化,而不同的基因型对治疗的反应性不同。对丙型肝炎患者进行快速准确的分型是医治的前提和基础,准确的分型方法有助于提高丙型肝炎的医治水平^[8]。

丙型肝炎的诊断,除症状体征及肝功能检查以外,主要是靠血清病毒学的实验室检测,而抗-HCV 阳性是临床诊断的重要依据,根据丙型肝炎的基因分型,较具有说服力和实用价值。基因分型的方法很多,有测序法、酶切分型等^[9-10],TaqMan 法是近年来应用较多的一种基因分型方法,其优点是检测的特异性较高,但是也有不足之处,比如专用试剂合成价格比较高、需要专业的公司合成等^[11]。本研究使用的 TaqMan-MGB 探针基因分型方法,探针设计合理,灵敏度和特异性均较高,值得推广。

【参考文献】

- [1] Degon F, Natural history of hepatitis C virus infection[J]. Nephrol Dial Transplant, 1996, 11 (suppl 4): 16-18.
- [2] 路福兴, 藏 隼. 丙型肝炎流行病学[J]. 国外医学:病毒学分册, 1998, 5(4): 109-111.
- [3] Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, et al. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 6547-6549.
- [4] 王丽娜. 丙型肝炎病毒核心抗原检测对临床诊断的价值[J]. 中国医药指南, 2010, 10(8): 66-67.
- [5] 朱丰村, 奚经巧. HCV 检测技术的研究进展[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(2): 162-165.
- [6] 郝 飞, 宇宙耀. 丙型肝炎基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 40.
- [7] 陈淑芬, 于秋丽, 赵玉良. 丙型肝炎病毒基因分型检测方法的研究[J]. 中华医学研究杂志, 2004, 4(5): 423-425.
- [8] 姚仁南, 张建辉, 陈复兴, 等. 丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂的初步应用[J]. 东南国防医药, 2008, 10(3): 168-169.
- [9] 黄永建, 刘剑荣, 夏洪娇, 等. 102 例丙型肝炎病毒基因分型结果分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(19): 2101-2103.
- [10] 吴立平, 刘玉萍, 王乃昌, 等. 山西省不同人群丙型肝炎病毒的基因分型研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(4): 364-366.
- [11] 黄前川, 曹军皓, 丁进亚. PCR-反向点杂交检测武汉地区丙型肝炎病毒的基因分型[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(13): 2674-2676.

(收稿日期: 2011-07-18; 修回日期: 2011-09-19)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

《东南国防医药》征订启事

《东南国防医药》杂志是南京军区联勤部卫生部主管、南京军区医学科学技术委员会主办的综合性医学学术期刊(双月刊)。是中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、全军优秀期刊,被中国学术期刊综合评价数据库、中国万方数据-数字化期刊群、中文生物医学期刊文献数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊(光盘版)、中华首席医学网等收录。

常设栏目有专家论坛、论著、综述·讲座、临床经验、护理园地、医院管理、部队卫生、短篇·个案等。对各类基金资助课题论文以及申报军区 and 地方科技进步奖、医疗成果奖的论文优先选登。本刊单月 20 日出版。国内统一刊号: CN 32-1713/R, 国际标准刊号: ISSN 1672-271X。铜版纸彩色印刷, 大 16 开本, 96 页, 每期定价 10.00 元, 全年 60.00 元。欢迎广大作者与读者积极订阅。

编辑部地址: 南京市明故宫路 6 号《东南国防医药》编辑部 邮编: 210016

电话: 0501-868555、868556(军) 025-80868555、80868556(地)

E-mail: dngfyy@163.com