

两种核酸提取方法对丙型肝炎病毒 RNA 检测效果的比较及应用评价

范公忍, 陈天宝, 李 冰, 胡学玲, 曹建彪(北京军区总医院肝病治疗中心, 北京 100700)

【摘要】 目的 比较两种核酸提取方法对实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测丙型肝炎病毒(HCV) RNA 病毒载量的影响。**方法** 选择 89 例 2012 年 10 月至 2013 年 6 月在肝病中心住院的慢性丙型肝炎抗-HCV 阳性患者, 分别用磁珠法和 TRIZOL 法提取血清标本中 HCV RNA, 用 FQ-PCR 技术检测 HCV RNA, 并对结果进行对比分析, 统计学处理采用 χ^2 检验和 t 检验。**结果** 89 例抗 HCV 阳性标本中以磁珠法提取核酸进行 HCV RNA 定量检测的阳性率为 73.0%(65/89), 以 TRIZOL 法提取核酸进行 HCV RNA 定量检测的阳性率为 65.1%(58/89), 两法提取方法检测阳性率比较有统计学意义($\chi^2=3.76, P<0.05$)。两法所测浓度结果换算成对数值, 经 t 检验两者差异无统计学意义($t=0.32, P>0.05$)。**结论** 两种方法均可获得较高的回收率、有较高的敏感度和特异度, 磁珠法提取 HCV RNA 可用于 HCV 感染者的临床诊断和疗效观察。

【关键词】 丙型肝炎; 核酸提取; 荧光定量聚合酶链反应; 灵敏度

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.01.018 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)01-0048-03

Comparison of effects between two kinds of nucleic acid extraction method for detecting HCV RNA and their application evaluation FAN Gong-ren, CHEN Tian-bao, LI Bing, HU Xue-ling, CAO Jian-biao (Therapy Center for Liver Diseases, General Hospital of Beijing Military Region, Beijing, 100700, China)

【Abstract】 Objective To compare the influences of two kinds of nucleic acid extraction method for detecting hepatitis C virus(HCV) RNA viral load by the real-time fluorescent quantitative(FQ) PCR. **Methods** 89 inpatients with chronic hepatitis C(CHC) and anti-HCV positive in the Therapy Center for Liver Diseases of our hospital from October 2012 to June 2013 were selected and HCV RNA was extracted from the serum specimens by using the magnetic beads and Trizol methods. FQ-PCR was adopted for detecting serum HCV RNA. The detected results were performed the comparative analysis. The statistic processing adopted the χ^2 test and t test. **Results** The positive rate of serum HCV RNA extracted by the magnetic beads and Trizol methods were 73.0%(65/89) and 65.1%(58/89) respectively, and the difference between the two methods showed the statistical significance($\chi^2=3.76, P<0.05$). By converting the concentration results detected by these two methods into the log values, there was no statistically significant difference between the two methods($t=0.32, P>0.05$). **Conclusion** The two kinds of method can obtain the higher recovery rate with higher sensitivity and higher specificity. The magnetic beads method for extracting HCV RNA could be used in the clinical diagnosis and therapeutic observation in the HCV infected persons.

【Key words】 hepatitis, C; nucleic acid extraction; fluorescent quantitative PCR; sensitivity

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)引起的一种隐匿性、持续性、进展性疾病。在我国每年新发丙型肝炎病例约为 3.5 万例, 部分患者晚期可发展为肝硬化或肝癌^[1]。因此, 及早发现并给出有效的抗病毒治疗是丙型肝炎现症患者治疗的关键措施。血清 HCV RNA 实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测可以反映 HCV 感染者病毒复制情况, 对于 HCV 患者临床用药、疗效监测及预后判断均具有重要的意义^[2]。定量 PCR 检测结果的准确性与核酸的提取方法不同而有较大差别, 不同的核酸提取方法会直接影响 PCR 扩增效果和检测准确性^[3]。因此, 迫切需要一种快速、可靠的核酸提取方法以满足临床诊断与治疗的需求。本研究分别采用磁珠法和 TRIZOL 法提取 89 例抗-HCV 阳性的临床患者血清中 HCV RNA, FQ-PCR 法测定标本中 HCV RNA 载量, 比较两种提取方法检测结果的一致性、灵敏度和相关性, 观察其临床应用效果, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 10 月至 2013 年 6 月本院肝病中心住院诊断确诊为慢性丙型肝炎患者血清共 89 例, 其中男 33 例, 女 56 例, 年龄 25~78 岁, 中位年龄 42 岁。所有患者均符合中华医学会修订的《丙型肝炎防治指南》诊断标准^[4]。治疗前采用化学发光法检测抗 HCV 均阳性, 并排除甲、乙、丁、戊型肝炎病毒感染者。所有观察病例均清晨空腹抽取静脉血 3 mL, 离心后分离血清转移至无菌冻存管, -80℃ 冰箱保存, 统一检测。

1.2 试剂与仪器 磁珠法提取试剂由上海之江生物科技有限公司提供(批号 20121001); TRIZOL 法提取试剂由天根生化(北京)科技有限公司提供(批号 20130505); HCV RNA 定量试剂由上海之江生物科技有限公司提供(批号 20121001), 试剂盒最低检测限为 HCV RNA $\geq 5.00 \times 10^2$ copy/mL 为阳性; 质控品为卫生部临床检验中心提供的 HCV 定量标准品(批号

20061221);仪器为德国 Roche 诊断有限公司 LightcyclerTM 荧光定量 PCR 仪,使用美国 Beckman 公司 Microfgezzr 高速冷冻离心机和 Eppendorf 微量加样器。

1.3 实验方法

1.3.1 磁珠法提取 HCV RNA (1)磁珠与标本亲和:将 50 μ L 待检血清加入 150 μ L 样品结合液充分混匀后,漩涡振荡 10 s,使磁珠均匀分散至缓冲液中,完全裂解病毒外壳膜蛋白,并使裸露 RNA 与磁珠结合,静置 10 min。(2)分离磁珠:吸取分离液 300 μ L 于结合柱中,混匀,静置 3 min 后,13 000 $\times$ g 离心 40 s,弃去收集管废液。(3)洗涤磁珠:各取 200 μ L 洗涤液 A 和洗涤液 W 于样品管中,13 000 $\times$ g 离心 15 s 洗涤 1 次,弃去废液。(4)解离收集 RNA:将亲和柱放入 1.5 mL 无 RNase 离心管中加入 65 $^{\circ}$ C 预热洗脱液,静置 2 min 后,13 000 $\times$ g 离心 2 min,RNA 被洗脱于离心管中,混匀后取 5 μ L 作为 PCR 反应模板。

1.3.2 TRIZOL 法提取 HCV RNA 将 50 μ L 待检血清加入 150 μ L Trizol 溶液漩涡混匀,再加入 50 μ L 氯仿(-20 $^{\circ}$ C 预冷)震荡混匀后,13 000 $\times$ g 离心 10 min,吸取上清液于另一离心管中,加入与上清等量的异丙醇(-20 $^{\circ}$ C 预冷),混匀后室温下静置 10 min,然后 13 000 $\times$ g 离心 15 min,弃去上清液,加入 300 μ L 75%乙醇(-20 $^{\circ}$ C 预冷),混匀后,1 3000 $\times$ g 离心 10 min,吸干上清液,空气干燥 5 min,然后加入 20 μ L 无 RNA 酶水溶解混匀,取 5 μ L 作为 PCR 反应模板。

1.3.3 HCV RNA 定量试验 两种方法提取的核酸模板均采用上海之江生物科技有限公司提供的 HCV RNA 定量试剂进行平行检测,每次操作均设阴、阳对照及室内质控。PCR 扩增反应条件:反转录程序 42 $^{\circ}$ C 30 min,然后按照 94 $^{\circ}$ C 2 min,93 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环扩增,72 $^{\circ}$ C 5 min 延伸。扩增结束时,仪器根据标准曲线自动给出检测结果数值。

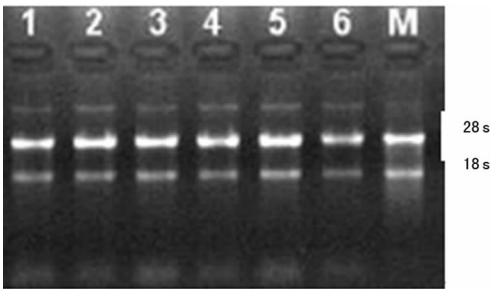
1.3.4 敏感度比较 将已知 HCV RNA 强阳性质控品(5.0 $\times$ 10⁷ copy/mL)血清 1 份,用 10%小牛血清按 10 倍梯度系列稀释,获得数个浓度的系列稀释血清,分别用上述两种方法提取稀释后标本中的总 HCV RNA,经 PCR 扩增后,根据检测到的最低值确定两种方法的敏感度和线性关系。

1.3.5 重复性比较 取上述中等载量的 HCV RNA 标本 1 份,分别用上述两种方法各提取 HCV RNA 5 次,进行荧光定量 PCR 检测,定量结果换算成对数值,计算两种方法的批内变异系数[CV(%)],比较两种方法提取标本测定结果的重复性。

1.4 统计学处理 用 SPSS17.0 统计软件和 Excel 软件对结果进行统计学分析,PCR 检测血清 HCV RNA 结果以 10 为底数转换成对数形式计算比较,组间比较采用配对 *t* 检验,率的比较采用 χ^2 检验;两种方法指标间相关性程度检测采用 Pearson 关联性分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种提取方法 HCV RNA 浓度和纯度比较 将磁珠法和 TRIZOL 法所制备的总 HCV RNA,加入 TE 缓冲液 50 μ L,用紫外分光光度仪测定浓度和纯度(A260/280 比值为 1.8~2.0)。取 5 μ L 提纯总 mRNA 标本将 0.8%甲醇固定后琼脂糖凝胶电泳鉴定,可见 28s 和 18s 两个亚基,与标准 mRNA 质控品对照电泳图位置一致(图 1)。结果证实磁珠法和 TRIZOL 法提纯的 RNA 模板纯度较好,在提取过程中未丢失、污染或降解。



注:1~3 泳道磁珠法;4~6 泳道 TRIZOL 法;M:质控品对照。
图 1 HCV RNA 纯度琼脂糖电泳图谱

2.2 临床标本结果比较 分别用两种核酸提取方法检测临床抗 HCV 阳性患者血清 89 例,其中磁珠法阳性率 73.0%(65/89),对数平均值(5.37 $\pm$ 1.62) copy/mL;TRIZOL 法阳性率 65.1%(58/89),对数平均值(5.15 $\pm$ 1.80) copy/mL。结果显示磁珠法提取核酸标本的检测结果高于 TRIZOL 法,差异有统计学意义($\chi^2=3.76$,*P*<0.05)。两法检测结果取对数值作图显示具有较好的相关性(*r*=0.925),见图 2。

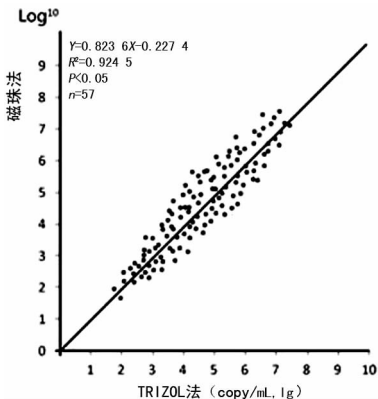


图 2 磁珠法与 TRIZOL 法检测 HCV RNA 结果比较

表 1 两种核酸提取方法检测 HCV RNA 的敏感度比较

方法	原浓度	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
磁珠法	7.14	6.10	5.27	4.12	3.80	3.15	2.78	2.52
TRIZOL 法	6.97	5.92	5.44	4.95	4.48	3.97	3.49	—

注:—表示低于最低检测限。

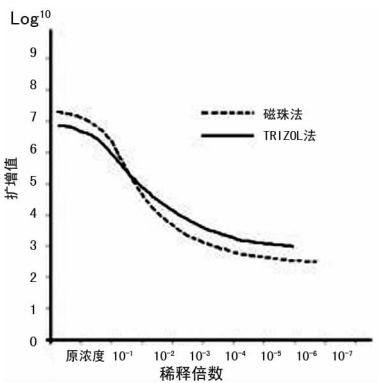


图 3 两种提取方法检测 HCV RNA 敏感度比较

2.3 敏感度比较 磁珠法最低检测限为 10⁻⁷ copy/mL,TRIZOL 法最低检测限为 10⁻⁶ copy/mL 水平,两者比较磁珠法敏感度略高于 TRIZOL 法,对于测定值在 10⁻⁴ 以下的低浓度 HCV RNA 标本,磁珠法提取核酸检测下线更灵敏;将两法所

测浓度结果换算成对数值,两种核酸提取方法检测结果的敏感度比较差异无统计学意义($t=0.32,P>0.05$)(图 3)。

2.4 重复性比较 用磁珠法提取核酸标本检测 HCV RNA 的结果优于 TRIZOL 法(表 2)。

表 2 两种核酸提取方法检测 HCV RNA 的重复性比较					
方法	<i>n</i>	均值($\bar{x}$)	标准差(<i>s</i>)	变异系数[CV(%)]	<i>P</i>
磁珠法	5	5.79	0.11	2.2	>0.05
TRIZOL 法	5	5.32	0.27	5.9	

3 讨 论

病毒核酸检测技术中核酸提取是最重要的环节之一,由于 HCV 为单股正链线状 RNA 病毒,其基因组具有高度的多态性和变异性,容易受到 RNA 酶的破坏而降解^[5]。因此,在提取过程中要严格防止 RNA 酶的污染。HCV RNA 扩增过程需要将 mRNA 反转录为 cDNA,其中转录酶活性及模板的得率多少均影响定量结果的准确度^[6-7]。目前由于国内 HCV 定量检测核酸提取纯化方法不标准,且参与扩增模板标本量少(5 μ L)及反应体系量不足(20~40 μ L);扩增过程中没有内标作参考,缺乏对假阴性结果的监控,导致各医疗单位检测结果无法参考比较^[8]。因此,选择质量好且符合自己试验要求,并与本实验室仪器相配备的试剂,对于保障试验结果的准确度非常重要。

本研究分别采用磁珠法和 TRIZOL 法提取 89 例抗-HCV 阳性患者血清中 HCV RNA,为保证试验结果的可比性,试验设计除核酸提取方法不同外,其余操作过程、模板上样量及扩增试剂均相同,并在同一扩增仪上同时检测。结果显示磁珠法核酸检测结果阳性率为 73.0%(65/89),TRIZOL 法阳性率为 65.1%(58/89)。结果表明这两种核酸提取方法均可以通过提纯获得较好的核酸模板,在相同的检测条件下,检测结果敏感度相近,都能满足临床需要,磁珠法检测结果略优于 TRIZOL 法。磁珠法是利用磁球颗粒活性基团在一定条件下可与核酸结合与解离的原理,尽可能地避免了提取过程中核酸的丢失,还能很好地去除标本中可能存在的干扰物质(如血红蛋白,胆红素及高血脂等因素)影响,使核酸模板得到较好的纯化^[9],尤其对临界值附近的低浓度 HCV 标本提取效果更好,磁珠法比 TRIZOL 法提取的标本检测限更低,敏感度更好;用磁珠法处理标本所得定量结果能更好地反映出标本之间的倍比稀释关系。TRIZOL 法操作步骤繁琐,需将液体多次转移、容易造成核酸的丢失,加之本研究应用的是国产 TRIZOL 试剂,可能与进口试剂之间也存在着差异。这可能是 TRIZOL 法提取的标本在扩增效率、敏感度和重复性等方面略低于磁珠法的原因。钟海军等^[10]曾报道比较了不同核酸提取 HCV RNA 的效果,结果显示磁珠法提取的核酸标本具有较好的扩增效率,线性关系和可重复性均高于常规的酚-氯仿提取法。本文检测结果进一步证实了磁珠法提取核酸纯度高、检测结果准确度好的优点,但还需要扩大标本量进行深入的研究。

干扰素(IFN- α)是目前临床抗 HCV 治疗的首选药物。随着治疗时间的延长,大部分患者血清中 HCV RNA 载量检测

报告“低于最低检测限”水平。但这部分患者并非真正意义上的病毒完全清除,而是由于病毒提取方法的缺陷或仪器检测灵敏度不够,不能检测出尚存的低载量 HCV RNA 所致^[11]。因此,必须重视低载量 HCV RNA 标本的提取与检测,保障临床检测结果报告的准确度,使肝细胞癌患者尽可能达到理想的治疗目标,为调整用药剂量及治疗时间,制订个体化的治疗方案提供指导^[12]。

本研究结果显示,磁珠法是一种操作简便、纯化效率高的提取方法,可应用于 HCV 感染者的临床诊断和疗效监测,尤其在 HCV RNA 载量处于低浓度水平时,该方法可将全部核酸标本参与到 PCR 反应过程中,最大限度地减少了核酸丢失,结果敏感度高、准确度好,对于检测慢性丙型肝炎患者血清中低载量 HCV RNA 水平比 TRIZOL 法具有更好的应用前景。

参考文献

[1] 陈园生,李黎,崔富强.中国丙型肝炎血清流行病学研究[J].中华流行病学杂志,2011,32(9):881-891.

[2] 杨瑞峰,魏来.丙型肝炎病毒感染的检测[J].临床肝胆病杂志,2011,27(1):1-7.

[3] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会.丙型肝炎防治指南[J].中华医学杂志,2004,84(9):775-779.

[4] Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update[J]. Hepatology, 2009, 49(4):1335-1374.

[5] 许敏,聂静敏,胡凤玉,等.两种实时荧光定量聚合酶链反应检测血清 HCV RNA 的比较[J].中华传染病杂志, 2011, 29(7):410-412.

[6] 裴兵,夏寿扬,吴辉,等.荧光定量 PCR 检测 HCV RNA 的测量不确定度评定及应用[J].现代检验医学杂志, 2011, 26(3):65-67.

[7] Lindenbach B, Rice C. Unraveling hepatitis C virus replication from genome to function [J]. Nature, 2005, 436 (7053):933-938.

[8] 李金明.乙型和丙型肝炎病毒感染检测试剂的标准化:问题与对策[J].中华检验医学杂志,2010,33(10):901-904.

[9] Homson BJ, Finch RG. Hepatitis C virus infection[J]. Clin Microbiol Infcet, 2005, 11(2):86-94.

[10] 钟海军,唐孝亮,曾刚毅.核酸纯化柱提取核酸定量检测丙型肝炎病毒 RNA 的临床应用[J].检验医学与临床, 2008, 5(13):783-784.

[11] 邢文革,郑怀竟.必须提高丙型肝炎病毒实验室检测结果的可信性[J].中华肝病杂志,2004,12(1):170-173.

[12] Chevaliez S, Pawlostsky JM. Hepatitis C virus serological and virological tests and clinical diagnosis of HCV realated liver disease [J]. Med Sci USA, 2006, 3(2):35-40.

(收稿日期:2014-03-16 修回日期:2014-08-02)