

• 临床检验研究论著 •

改良固相吸附法在 HCV RNA 实时荧光定量检测中的应用

张宝华¹, 王 红², 倪二茹^{1△}

(1. 南京军区福州总医院第二住院部检验科, 福建福州 350003;

2. 北京总参管理保障部北极寺门诊部, 北京 100191)

摘要:目的 通过对固相吸附法的改良,探讨采用固相吸附法提取血清中丙型肝炎病毒 RNA 在实时荧光定量检测中的应用。方法 首先对 HCV RNA 的提取方法进行改良,对固相载体纳米二氧化硅颗粒表面进行硅醇基化以提高其核酸吸附能力;同时对病毒裂解液进行优化,获得异硫氰酸胍(GuSCN)的最佳浓度用于 HCV RNA 的提取;最后使用改良方法提取的 HCV RNA 进行实时荧光定量 PCR 实验,并绘制其标准曲线,计算出线性方程,同时检测该提取方法下实时荧光定量 PCR 对血清样本中 HCV RNA 的最低检测限并对其检测重复性进行验证。结果 纳米二氧化硅颗粒硅醇基化后其吸附核酸的能力显著提高;病毒裂解液中 GuSCN 的最佳浓度为 4.23 mol/L。使用改良方法提取血清样本中的 HCV RNA 用于实时荧光定量 PCR,获得标准曲线和线性方程,其线性相关系数(R^2)达到 0.999,检测的线性范围为 2.52~5.52 IU/mL,或者 102.52~105.52 病原体数/毫升。该方法的检测限达到(2.52±0.50)IU/mL,且其检测重复性良好。结论 改良后的固相吸附法可以大大降低实时荧光定量 PCR 的最低检测限,提高了 HCV 的阳性检测率。该方法操作简单,成本低,可以广泛应用于临床中 HCV 的检测和其他病毒的核酸检测。

关键词: 纳米二氧化硅; 固相吸附; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.05.023

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)05-0562-03

Application of modified solid-phase adsorption method in real-time fluorescence quantification of HCV RNA

Zhang Baohua¹, Wang Hong², Ni Erru^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Second Inpatient Department, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou, Fujian 350003, China; 2. Beijishi Outpatient Department, Management of Security of Beijing General Staff, Beijing 100191, China)

Abstract: Objective To explore the application of adopting the solid phase adsorption method to extract serum hepatitis C virus (HCV) RNA in the real-time fluorescence quantification PCR (RT-qPCR) by the improvement of solid phase adsorption method. **Methods** Firstly, the surface of silica nano-particles was modified with Si-OH for increasing their adsorption ability with HCV RNA. Then the concentration of guanidinium thiocyanate (GuSCN) in the viral lysate was optimized. Thirdly, the HCV RNA of standard serum samples was extracted using the modified solid-phase adsorption method and then performed in the RT-qPCR. Its standard curve was drawn and the linear equation was calculated. At the same time, the lowest detection limit of RT-qPCR for detecting HCV RNA in serum sample was measured and the detection repeatability was verified. **Results** The adsorption ability of silica nano-particles for HCV RNA in serum samples was remarkably improved after surface modification with Si-OH. The optimal GuSCN concentration in viral lysates was 4.23 mol/L. Using the modified method to extract HCV RNA in serum samples was applied in RT-qPCR, the standard curve and the linear equation were obtained, the linear correlation coefficient (R^2) reached to 0.999 and the detected linear range was (2.52–5.52) IU/mL or 102.52–105.52 pathogen number/mL. The detection limit of HCV RNA in serum samples was (2.52±0.50) IU/mL with good detection repeatability. **Conclusion** The modified solid-phase adsorption method can greatly decrease the lowest detection limit of RT-qPCR and increase the positive detection rate of HCV. This method is simple to operate, has low cost and can be widely applied in the HCV detection and the nucleic acid detection of other viruses in clinic.

Key words: silica nano-particles; solid-phase adsorption; polymerase chain reaction

丙型肝炎病毒(HCV)是单股正链 RNA 病毒,全球约有 1.7 亿人感染 HCV^[1],60% 的感染者会演变成肝硬化和肝癌^[2-5]。对血清 HCV RNA 的检测是目前惟一直接揭示 HCV 存在的方法^[6-8],因此快速、准确地检测 HCV RNA 对 HCV 的早期诊断、治疗与预后观察以及对控制丙型肝炎的传播显得至关重要^[9-13]。与传统方法对比,荧光定量 PCR 法能准确反映患者体内 HCV 的病毒载量,且检测的灵敏度和特异度高,能有效缩短 HCV 检测的“窗口期”。本文拟通过纳米二氧化硅颗粒的表面修饰和病毒液裂解液的优化,建立一种简单高效的纳米二氧化硅颗粒固相吸附提取 RNA 的方法应用于实时荧

光定量检测 HCV。

1 材料与方法

1.1 试剂 纳米二氧化硅颗粒购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,HCV RNA 荧光定量 PCR 试剂盒购于厦门英科新创生物公司,Genelight 9800 自动荧光定量 PCR 仪为厦门安普利生物工程公司产品、丙型肝炎核酸(HCV RNA)液体系统标准物质 GBW(E) 090118 由卫生部临床检验中心提供。

1.2 方法

1.2.1 纳米二氧化硅颗粒的表面修饰 对购买的纳米二氧化

硅颗粒采用调节 pH 催化 TEOS 水解的条件,对其进行表面修饰,使颗粒表面硅醇基化,以提高颗粒对核酸的吸附率。其步骤如下:10 g 纳米二氧化硅颗粒用 300 mL 溶液(10%醋酸:3%盐酸)浸泡 24 h,每 2 h 混悬 1 次,去除层悬浮液。沉淀用 300 mL 10%醋酸洗涤 3 次。之后用 500 mL 双重蒸馏水再洗涤 3 次。将纳米二氧化硅沉淀置于真空干燥箱干燥 10 h。往干燥后的纳米二氧化硅颗粒中加入体积比为 4:1 的乙醇双重蒸馏水溶液 200 mL,浓氨水溶液 5 mL、TEOS 2 mL、1 mol/L NaOH 溶液 1 mL,25 °C 水浴摇床(50 r/min)2 h 后离心。沉淀加入 10%醋酸洗涤 3 次、双重蒸馏水洗涤 3 次,真空干燥箱干燥充分后用双重蒸馏水悬浮备用。

1.2.2 病毒裂解液的优化 取 5 个 10 mL 烧杯,分别加入 500 mmol/L Trizma HCl 0.92 mL,500 mmol/L EDTA2Na 0.40 mL,25% TritonX-100 0.50 mL 于容量瓶中,分别称取 4.136、4.727、4.998、5.589、6.180 g 的异硫氰酸胍放到 10 mL 烧杯中,加入约 4 mL 双重蒸馏水,用磁力搅拌器搅拌使之溶解,分别将溶液小心移入到 5 个 10 mL 容量瓶中,再用双重蒸馏水洗涤烧杯 3 遍,每次约 1 mL,将洗涤液合并到容量瓶中,最后加入吸附颗粒 7 μL 至上述的 10 mL 容量瓶中,最后用双重蒸馏水定容到 10 mL,使 GuSCN 浓度分别为 3.50、4.00、4.23、4.50、5.00 mol/L。混匀后分别移到 10 mL 烧杯中,按 1 毫升/支分装到 1.5 mL 离心管中,封盖,贴上标签,-20 °C 保存备用。取阳性质控品,即临床上确诊为丙型肝炎患者的血清标本 10 份;低值质控品,即临床上确诊为丙型肝炎患者的血清标本(其病毒载荷量超过 108 IU/mL),用临床阴性血清 10 倍梯度稀释 8 个梯度获得的质控品 8 份;阴性质控品,即临床症状易与丙型肝炎混淆且临床确诊为非丙型肝炎患者的血清标本 10 份。用上述不同质控品分别加入含不同 GuSCN 浓度的裂解液 100 μL 提取 RNA 并进行实时荧光定量 PCR 检测,以上样品重复检测 3 次,以验证病毒裂解液中 GuSCN 的最佳浓度。

1.2.3 标准曲线的制备 利用卫生部临床检验中心提供的丙型肝炎核酸(HCV RNA)液体系统标准物质 GBW(E) 090118(其浓度为 6.52 IU/mL,相当于 106.52 病原体数/毫升)作为起始浓度,用阴性血清对其进行梯度稀释,制备 6 种不同 HCV RNA 浓度的标准品,标记为 1#、2#、3#、4#、5#、6#,其浓度依次为 0、(1.52±0.50)、(2.52±0.50)、(3.52±0.50)、(4.52±0.50)、(5.52±0.50)IU/mL。在 PCR 反应管中加入优化的病毒裂解液 100 μL,然后加入上述 6 个浓度的标准品血清样本各 50 μL,混悬,室温静置 10 min;10 000 g 离心 25 s,去上清;加入 150 μL 洗涤液,混悬,10 000 g 离心 25 s,去上清;加入 150 μL 洗涤液进行二次洗涤,混悬,10 000 g 离心 25 s,去上清备用。取上述提取的沉淀物用 PCR 反应缓冲液(含 RNA 通用液,dNTPs,上游引物,下游引物,HCV 探针等)50 μL 混悬,取 45 μL 加入 PCR 反应管中振荡混匀,短暂离心后,置入 genelight 9800 PCR 分析系统内进行扩增。循环条件设置为 48 °C 30 min,95 °C 2 min;进入以下循环:95 °C 15 s,58 °C 50 s,5 个循环,95 °C 15 s,58 °C 50 s(30 s 后读荧光),40 循环。荧光素设定为 F1(FAM),F2(HEX);荧光信号收集设在 58 °C。判定结果依据循环阈值(Ct)来确定。对标准品的病原体数目取其 log 值作为横坐标,其对应的 Ct 值作为纵坐标,利用 genelight 9800 配套软件绘制标准曲线和线性方程。

1.2.4 方法的检测限 对上述 6 个浓度的标准品用改良纳米二氧化硅固相吸附法进行 RNA 提取,并按上述方法和步骤进行荧光定量扩增。对每 1 个标准品重复测定 10 次并计算其

CV 值, $CV = \frac{\text{定量方差值}}{\text{定量平均值}} \times 100\%$,选取 $CV \leq 5\%$ 为可接受界值的

最低浓度水平作为最低检测限。

1.2.5 方法的重复性 取上述制备的 3# 标准品(2.52±0.50)IU/mL 40 份,采用同一批纳米二氧化硅固相吸附试剂进行 RNA 提取和同一批核酸定量检测试剂进行核酸扩增。40 份 3# 标准品由 2 位操作者完成,每人 20 份。

2 结果

2.1 二氧化硅颗粒的表面修饰 取修饰前后的纳米二氧化硅提取同一份血清样本的 HCV RNA,并进行核酸电泳,其结果如图 1 所示,硅醇基化后的二氧化硅与未修饰的相比较,其提取核酸能力加强,说明修饰后二氧化硅对核酸的吸附水平提高了。



泳道 M: DNA 标记物;泳道 1:修饰后的纳米二氧化硅提取的 HCV RNA;泳道 2:未修饰的纳米二氧化硅提取的 HCV RNA。

图 1 修饰前后纳米二氧化硅提取 HCV RNA 能力的比较

2.2 病毒裂解液的优化 为了优化病毒裂解液中 GuSCN 的浓度,取 10 份阳性质控品,8 份低值质控品和 10 份特异性阴性质控品分别用含不同浓度的 GuSCN 进行 HCV RNA 的提取和实时荧光定量 PCR,每个样本重复检测 3 次。统计所有样本的检出个数,其结果如图 2 所示(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。当 GuSCN 浓度为 3.50 mol/L 和 5.00 mol/L 时,阳性质控品和低值质控品检出率均未达到 100%,阴性质控品均检出阴性。而当 GuSCN 浓度为 4.00 mol/L 和 4.50 mol/L 时,阳性质控品均检出阳性,阴性质控品均检出阴性,说明在 GuSCN 这 2 个浓度的条件下,该方法的敏感度和特异度较好;然而,该条件下仍有部分低值质控品为检出阳性。因此,取 4.00~4.50 mol/L 的 1 个浓度值 4.23 mol/L 进行试验,结果发现,当 GuSCN 浓度为 4.23 mol/L 时,阳性质控品均检出阳性,阴性质控品均检出阴性,低值质控品也都检出阳性。所以病毒裂解液中 GuSCN 的最优浓度为 4.23 mol/L。

2.3 方法的标准曲线 将 5 个不同浓度的 HCV RNA 标准品进行 RNA 提取和 RT-qPCR,获得其反应曲线的 Ct 值,并且每个标准品重复检测 3 次,计算其 Ct 平均值,以 Ct 平均值作横坐标,其对应浓度的 Log 值作纵坐标,得到此次反应的标准曲线,并且通过仪器自带的软件(安普利 genelight 9800)计算得到对应的直线方程和线性相关系数 R^2 ,如图 3B 所示(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。据此,根据样品检测的 Ct 值,可以计算出样品中所含的 HCV RNA 的拷贝数,实现定量检测的目的。基于图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)的结果,该方法的线性范围定为 2.52~5.52 IU/mL,即 102.52~105.52 病原体数/毫升。

2.4 方法的检测限 用阴性血清对 GBW(E) 090118 号标准

品(6.52±0.50)IU/mL 进行 10 倍梯度的稀释,并对每个浓度梯度进行重复检测 10 次,结果中选取 CV≤5% 为最低检测限。从图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)也可知,在(1.52±0.50)IU/mL(2# 标准品)的浓度时,荧光曲线 10 次重复都除于分散状态,当浓度达到(2.52±0.50)IU/mL(3# 标准品)时,曲线较为聚集。每个标准品的实际检测结果所示当标准品的浓度值为(1.52±0.50)IU/mL 时,其 CV 值为 34.17%,大于 5%,不能作为该方法的检测限。而当标准品浓度达到(2.52±0.50)IU/mL 时,其 CV 值为 0.41%,小于 5%。随着标准品浓度的增加,其检测的 CV 值减低,均低于 5%。由上可知该方法的检测限在(2.52±0.50)IU/mL。

2.5 方法的重复性 取 3# 标准品由两个不同的操作者分别进行 20 次重复检测,结果如图 5 所示(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。图 5 显示 3# 标准品的 40 次重复检测的曲线密集,即对于血清样本中 HCV RNA 在(2.52±0.50)IU/mL 水平上,即可被检测出 HCV 阳性,且检测结果稳定,即使由不同的操作者完成,其结果变化不大。每位操作者 20 次重复试验后的 CV 值,分别为 0.91% 和 0.73%。以上结果说明该方法在血清样本 HCV RNA 含量为(2.52±0.50)IU/mL 浓度下 HCV 的检出率为 100%,且不同操作者进行的重复检测,其 CV 值均小于 5%,表明该方法具有良好的重复性。

3 讨论

HCV 是继 HBV 后又一重要的传染性肝炎病毒,但与 HBV 不同的是,其病毒核酸为 RNA,因此不同的 HCV 病毒株其核酸具有显著的异源性和高度可变性。这也使 HCV 疫苗的研制和应用难度变大^[14]。因此,对临床上可疑 HCV 感染的血清进行 HCV RNA 的检测,是阻断 HCV 传播的重要手段。而通过对血清样本的 HCV RNA 提取后进行实时荧光定量 PCR 的检测是目前临床上诊断 HCV 感染的高效准确的方法。

由于环境中 RNA 酶的广泛存在性,通过 Trizol-氯仿、异硫氰酸胍法等方法提取 HCV RNA,其操作过程繁琐,步骤繁多,因此提取的 RNA 接触 RNA 酶的概率大大增加,这直接导致 RNA 的提取效率降低。在提取 HCV RNA 的方法上,本文采用的固相吸附法则是利用具有选择性吸附核酸,而不吸附蛋白质、脂类及糖类物质的纳米二氧化硅颗粒作为固相载体,直接从血清样本中吸附 HCV RNA,通过洗涤离心除去血清中的其他杂质,所吸附的 HCV RNA 无需进一步洗脱即可连同纳米二氧化硅颗粒用于实时荧光定量 PCR 检测。这样的 HCV RNA 提取方法实现了步骤简单快速,有效地避免了操作步骤繁多引起的环境中 RNA 酶降解 RNA 产物的缺陷。同时,本文使用的纳米二氧化硅颗粒表面经硅醇基化修饰后,其吸附 RNA 的能力得到提高,使得 RNA 的提取率、纯度和稳定性均良好,保证了检测的重复性。

在 HCV RNA 提取的过程中,对病毒裂解液中的关键成分 GuSCN 的最佳浓度进行筛选,发现当 GuSCN 的浓度在 4.23 mol/L 时,可以使提取后的 HCV RNA 在随后的实时荧光定量 PCR 检测中对阳性质控品和低值质控品的多次重复检测达到 100% 的检出率;而对阴性质控品检测为 100% 阴性。

经改良和优化后的固相吸附法提取血清样本中 HCV RNA 进行实时荧光定量 PCR,其病原体数目的 Log 值与 Ct

值呈线性相关,线性方程为 $Y = 38.597 - 3.274X$ 。其相关系数 R^2 达到 0.999,线性范围在 2.52~5.52 IU/mL,或者 102.52~105.52 病原体数/毫升。该方法对血清样本的最低检测浓度为(2.52±0.50)IU/mL,且在该低值浓度的多次重复检测,其阳性检出率为 100%,且 CV 值小于 5%,说明检测结果稳定,重复性良好。而人感染 HCV 后其血清中 HCV 病毒的含量从检测不出到 108 拷贝数/毫升(即 8.00 IU/mL),这说明该方法可以很好地应用于临床上人感染 HCV 的检测。因此,使用改良后的固相吸附法提取血清样本中的 HCV RNA 可以使得实时荧光定量 PCR 检测的阳性检出率提高,可以有效地减少假阴性的结果。

参考文献

- [1] Butt AA. Hepatitis C virus infection; the new global epidemic[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2005, 3(2): 241-249.
- [2] Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(17): 2436-2441.
- [3] Averhoff FM, Glass N, Holtzman D. Global burden of hepatitis C: considerations for healthcare providers in the United States[J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 55(Suppl 1): S10-15.
- [4] Louie KS, St Laurent S, Forssen UM, et al. The high comorbidity burden of the hepatitis C virus infected population in the United States[J]. *BMC Infect Dis*, 2012, 12(1): 86.
- [5] Ly KN, Xing J, Klevens RM, et al. The increasing burden of mortality from viral hepatitis in the United States between 1999 and 2007[J]. *Ann Intern Med*, 2012, 156(4): 271-278.
- [6] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR [J]. *Genome Res*, 1996, 6(10): 986-994.
- [7] Kawai S, Yokosuka O, Kanda T, et al. Quantification of hepatitis C virus by TaqMan PCR: comparison with HCV Amplificor Monitor assay[J]. *J Med Virol*, 1999, 58(2): 121-126.
- [8] Rodriguez-Medina JR, Carrasquillo EA, Sarriera JE, et al. Hepatitis C viral RNA amplification by the polymerase chain reaction allows detection of false positive HCV ELISAs among patients with non-A, non-B hepatitis[J]. *P R Health Sci J*, 1993, 12(1): 35-38.
- [9] Brojer E, Letowska M, Gronowska A, et al. HCV RNA testing for early diagnosis of hepatitis C in blood donors—new challenge for transfusion medicine and hepatology [J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2004, 17(100): 321-325.
- [10] Moller JM, Krarup HB. Diagnosis of acute hepatitis C: anti-HCV or HCV-RNA[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2003, 38(5): 556-558.
- [11] Wen XZ, Chen ZH, Wei YZ, et al. Evolution of viral RNA in a Chinese patient to interferon/ribavirin therapy for hepatitis C[J]. *Chin J Cancer Res*, 2012, 24(4): 353-360.
- [12] McWilliam Leitch EC, McLauchlan J. Determining the cellular diversity of hepatitis C virus quasispecies by single-cell viral sequencing[J]. *J Virol*, 2013, 87(23): 12648-12655.
- [13] Villa E, Melegari M, Ferretti I, et al. Presence of HCV RNA in serum of asymptomatic blood donors involved in post-transfusion hepatitis(PTH)[J]. *Arch Virol Suppl*, 1992, 4(1): 247-248.
- [14] Callendret B, Walker CM. Will there be a vaccine to protect against the hepatitis C virus? [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(6): 1384-1387.