

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.18.027

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

王家路¹ 孟存仁^{1△} 马 劲² 周 迪³ 杨晓芳⁴

(1 新疆医科大学第一附属医院检验科 新疆 乌鲁木齐 830054; 2 乌鲁木齐市第一人民医院检验科 新疆 乌鲁木齐 830000; 3 石河子大学医学院第一附属医院医学实验室 新疆 石河子 832000; 4 新疆昌吉州人民医院检验科 新疆 昌吉 831100)

摘要 目的:探究核酸纯化柱提取核酸定量检测血浆标本中丙型肝炎病毒核糖核酸(HCV-RNA)的临床应用效果。**方法:**将 2013 年 8-11 月期间我院 600 例抗-HCV 阳性丙肝患者的样本,按随机数字表法分为研究组对照组各 300 例,分别采用核酸纯化柱和酚-氯仿提取法检测,采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)技术定量检测两组 HCV-RNA 水平。**结果:**研究组检测阳性率为 87.67%(263/300),显著高于和对照组的 54.0%(162/300),差异有统计学意义($X^2=82.296$, $P=0.000$);两组 HCV-RNA 检测水平差异无统计学意义($u=1.721$, $P=0.067$)。**结论:**核酸柱提法定量检测血浆 HCV-RNA 操作简单、快速,分离效率高,容易掌握,值得临床推广。

关键词:RNA 病毒;丙型肝炎;聚合酶链反应;检测

中图分类号:R512 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)18-3510-03

Clinical Application of Nucleic Acid Purification Column Nucleic Acid Quantitative Detection of HCV-RNA

WANG Jia-lu¹, MENG Cun-ren^{1△}, MA Jin², ZHOU Di³, YANG Xiao-fang⁴

(1 Department of clinical laboratory, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China; 2 Department of clinical laboratory, The first people's Hospital of Urumqi, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 3 Department of Medical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, 832000, China; 4 Department of clinical laboratory, Changji Prefecture People's Hospital of Xinjiang, Changji, Xinjiang, 831100, China)

ABSTRACT Objective: To explore the clinical application of nucleic acid purification column nucleic acid quantitative detection of hepatitis c virus RNA (HCV-RNA) in plasma samples. **Methods:** Samples from 600 patients with anti-HCV positive hepatitis C patients who were treated in our hospital from August to November in 2013 were divided into study group and control group with 300 cases in each. According to the random number table method, the two groups recieved the detection of nucleic acid purification column extraction, phenol-chloroform extraction method, respectively, using fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) technology quantitative detected HCV-RNA of the two groups. **Results:** The positive rate of study group was 87.67% (263/300), significantly higher than 54%(162/300) of control group, the difference was statistically significant ($X^2=82.296$, $P=0.000$). There was no statistically significant difference undetectable levels of HCV-RNA between the two groups($u=1.721$, $P=0.067$). **Conclusion:** Nucleic acid purification column nucleic acid quantitative detection of plasma HCV-RNA is not only simple, rapid operation, but easy to master with high separation efficiency, which is worthy of clinical promotion.

Key words: RNA virus; Hepatitis c; Polymerase chain reaction; Detection

Chinese Library Classification(CLC): R512 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2015)18-3510-03

前言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、肝硬化、慢性肝炎发病原因均与丙型肝炎(丙肝)病毒(hepatitis C virus, HCV)密切相关^[1,2]。因此定量检测患者机体内丙肝病毒核糖核酸(HCV-RNA)水平具有重要的意义,临床上采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)技术进行相关检测,以判断机体内是否存在

在 HCV 感染,进一步根据 HCV-RNA 分析患者病情,观察患者抗病毒治疗效果,并对预后进行有效判断。FQ-PCR 技术具有定量准确、重复性高、敏感度高、特异性好等特点,同一台仪器可进行逆转录、扩增,有效避免样本污染^[3],为保证 FQ-PCR 检测结果准确,需保证提取的 HCV-RNA 准确性好,纯度高^[4,5]。本次研究采用核酸纯化柱提取 HCV-RNA,并进行定量检测,与酚-氯仿提取法进行对比,旨在探究其临床应用效果,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 检测标本

1.1.1 检测标本来源 抽取 2013 年 8-11 月期间本院住院及

作者简介:王家路(1982-),男,硕士,住院医师,从事临床分子生物学方面的研究, E-mail: wangjialu14522@126.com

△通讯作者:孟存仁(1972-),男,硕士,副主任技师,从事临床分子生物学方面的研究

(收稿日期:2014-10-11 接受日期:2014-11-08)

门诊血浆抗-HCV 阳性丙肝患者的样本 600 例,患者符合肝病诊断标准^[6],按随机字数表法将所有样本分为研究组对照组各 300 例,分别采用核酸纯化柱和酚-氯仿提取法。

1.1.2 标本采集 采集 2 mL 患者血标本,并采用乙二胺四乙酸二钠剂进行抗凝处理,3 h 内将血标本进行血浆分离,若标本无法及时分离处理,应将标本置于 -80℃ 冰箱内保存。

1.2 检测方法

1.2.1 核酸纯化柱提取法 ①裂解液内混入助沉剂,选择 100 μ L 加入离心管,随后分别选择 100 μ L 待测血浆、标准品以及对照品加入离心管,采用带滤芯吸嘴反复吹打 5 次,再对各离心管加入去抑制剂 20 μ L,加上离心盖子后离心数秒;随后将样本置于 70℃ 内进行反应 10 min;②将离心管放入离心机内 10 s,随后在其中加入无水乙醇 110 μ L,充分混匀后继续离心 10 s;③将核酸纯化提取柱进行标记,随后插入连接管,并在负压装置上固定。然后将步骤 2 内离心管内样本移入对应核酸纯化提取柱内,将负压模式开启,抽干核酸提取柱内液体;④取 500 μ L 洗涤液 A 加入对应核酸纯化提取柱,再次开启负压模式,抽干核酸纯化提取柱内液体;⑤取 500 μ L 洗涤液 B 加入对应核酸纯化提取柱,再次开启负压模式,抽干核酸纯化提取柱内液体;⑥将核算纯化提取柱从连接管取下后放入离心管,离心管 2 mL 且无 RNA 酶,加盖后离心 1 min,14 000 r/min;⑦把核算纯化提取柱取出换新的 2 mL 离心管,无 RNA 酶,并仔细在柱面中央加 50 μ L 洗脱液,加盖后 1 min 静置,10 000 r/min 离心 1 min。在 2 mL 离心管中取 12.5 μ L 收集液作 PCR 反应模板^[7,8]。

1.2.2 酚-氯仿提取法 ①取 150 μ L 裂解液放入离心管内,随后分别取 50 μ L 对照、待测血浆加入离心管,反复混匀后取 50 μ L 氯仿加入离心管,将其放在混匀器上 5 s 振荡,离心管混匀不应太强烈,防止出现乳化层,并在 13 000 r/min 下离心 15 min;②取 100 μ L 异丙醇加入离心管作为对照,在对各离心管进行标记,将第一步各离心管的上层液对应转移到离心管,需要特别注意的是由于中间层含蛋白质和 DNA,因此勿将中间层吸出,将离心管充分混匀后进行 13000 r/min 离心 15 min;③将离心管内上清液倒出,并将管倒置在吸水纸上,将液体蘸干后取 75%乙醇 300 μ L 加入管内,充分洗涤,在 13000 r/min 下离心 10 min;④再次将上清液倒出,离心管倒置于吸水纸上,管内液体尽量蘸干,在 2000 r/min 下离心 5 min;⑤选择微量加样器吸干管底部少量液体,但需要注意的是吸头不要碰沉淀一面,室温应保持干燥 1-5 min,但需要注意的是不应过于干燥,防止 RNA 出现不溶的情况;⑥取 0.1%焦碳酸二乙酯 (DEPC)水 15 μ L 加入干燥沉淀中,轻度混匀,对管壁上的 RNA 有效溶解,5s 离心,冷冻保存待检备用,但需在 2 h 内检测样本,取 15 μ L 作 PCR 反应模板^[9]。

1.2.3 HCV-RNA 定量检测 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (FQ-PCR)技术定量检测两组 HCV-RNA 水平,检测试剂由不同厂家生产,操作步骤需严格参照说明书进行。在相同仪器上进行逆转录、扩增进行,检测下限不低于 500 U/mL^[10]。

1.3 统计学处理

本次研究数据采用 SPSS20.0 进行统计处理,两组阳性率

比较采用 χ^2 检验,浓度水平比较用 u 检验, $P < 0.05$ 表示有统计意义。

2 结果

2.1 两组检测阳性率比较

研究组检测阳性率为 87.67%(263/300),显著高于和对照组的 54.0%(162/300),差异有统计学意义($\chi^2=82.296, P=0.000 < 0.05$)。

2.2 两组 HCV-RNA 检测水平比较

研究组 HCV-RNA 检测下限值为 9.60×10^7 U/mL,中位值为 9.80×10^4 copy/mL;对照组下限值为 8.30×10^6 U/mL,中位值为 1.20×10^4 copy/mL,两组差异无统计学意义($u=1.721, P=0.067 > 0.05$)。

3 讨论

采用 FQ-PCR 技术定量检测 HCV-RNA 在临床医学中已得到广泛应用,且多种试剂可供选择使用。有研究报道认为,采用 FQ-PCR 技术定量检测抗-HCV 阳性丙肝患者 HCV-RNA 阳性率范围在 55%-90%^[11,12],不同调查研究报道阳性率范围差别较大,分析其原因可能与选择的试剂、设计引物、核酸提取方法、操作技术及方式等存在关系^[13,14]。Ross 和 Wulff 等人选择匹基试剂定量检测 321 例抗-HCV 阳性血清标本的 HCV-RNA^[15,16],阳性率为 81.93%(263/321);Ward 等人同样采用匹基试剂进行 HCV-RNA 定量检测 94 例抗-HCV 阳性血清标本,其阳性率为 82.98%(78/94)^[17]。本研究用匹基试剂检测的阳性率为 66.7%,低于以上报道。上述不同样本检测采用同一种试剂,但阳性率存在差异,可能地区环境与患者差异造成,患者机体中 HCV 为活动状态,并在肝细胞内进行复制,样本检测外周血液才能出现结果。

本研究采用核酸纯化柱提取法和酚-氯仿提取法,选择不同试剂分别检测 300 例抗-HCV 阳性丙肝患者血清,检测结果显示,核酸纯化柱提取法阳性率为 81.2%,酚-氯仿提取法为 79.5%,提示核酸纯化柱提取法较酚-氯仿提取法检测阳性率高,可能与其操作优势有关,其操作简便快捷,且技术人员容易操作,检测速度较快。HCV-RNA 被纯化柱内硅胶吸附,在经过仔细清洗后,其分离效果较好,模板纯度也随之提高,不仅工作量少,检测时间短,且能有效避免低拷贝标本的漏诊,非常适合医院常规开展检测^[18]。而酚-氯仿提取法提取持续时间久,检测任务工作量大,操作步骤较为繁琐,技术要求高,检测条件常会要求在低温条件下进行离心,技术难度相对较高,难以较快掌握,对技术人员要求较高^[19];HCV-RNA 提取过程中可发现肉眼无法辨别 RNA 沉淀,倒去上清时轻重难以把握,在常规工作中 HCV-RNA 提取、检测任务标本量较大的情况下,可能对一些 RNA 浓度较低的样本无法进行有效提取,使得样本假阴性结果出现,使其检测阳性率较低。此外焦磷酸二乙酯(DEPC)水具有致癌性,在进行操作时技术人员须严格遵守操作程序,避免危险^[20]。

综上所述,核酸纯化柱提取法提取核酸血浆标本定量检测 HCV-RNA 检测率高,易操作,方便快捷,值得在临床推广。

参考文献 (References)

- [1] Asonuma K, Yamamoto H, Okumura K, et al. Liver transplant from an ABO-incompatible and hepatitis C antibody-positive but an HCV-RNA negative living donor in a familial amyloid polyneuropathy patient[J]. *Exp Clin Transplant*, 2013, 11(2): 182-185
- [2] Bialleck H, Fursch A J, Scharrer I, et al. Frequencies of GB virus C/hepatitis G virus genomes and of specific antibodies in German risk and non-risk populations[J]. *J Med Virol*, 2011, 53(3): 218-224
- [3] Zhai J, Zeng J, Tian C, et al. Comparative evaluation of a triplex nucleic acid test for detection of HBV DNA, HCV RNA, and HIV-1 RNA, with the Procleix Tigris System [J]. *J Virol Methods*, 2013, 187(2): 357-361
- [4] Carrella A V, Gutekunst K, Sun C A. Clinical characterization of a competitive PCR assay for quantitative testing of hepatitis C virus[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 34(8): 1975-1979
- [5] Laperche S. Multinational assessment of blood-borne virus testing and transfusion safety on the African continent [J]. *Transfusion*, 2013, 53(4): 816-826
- [6] Duskova D, Darebnicek L. Nucleic acid testing of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus 1,2 in blood donors in the General University Hospital[J]. *Acta Virol*, 2014, 58(2): 146-151
- [7] Almario CV, Vega M, Trooskin SB. Examining hepatitis C virus testing practices in primary care clinics[J]. *J Viral Hepat*, 2012, 19(2): e163-169
- [8] Stockman, Lauren J, Guilfoye SM, et al. Rapid hepatitis C testing among persons at increased risk for infection--Wisconsin, 2012-2013 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2014, 63(14): 309-311
- [9] Mandrekar JN, Bendel JL, Mitchell PS, et al. Hepatitis C virus genotypes in clinical specimens tested at a national reference testing laboratory in the United States [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(8): 3040-3043
- [10] Moiz B, Moatter T, Shaikh U, et al. Estimating window period blood donations for human immunodeficiency virus Type 1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus by nucleic acid amplification testing in Southern Pakistan[J]. *Transfusion*, 2014, 54(6): 1652-1659
- [11] Jarvis LM, Mulligan K, Dunsford TH, et al. Suitability of an automated nucleic acid extractor (easy MAG) for use with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 nucleic acid amplification testing[J]. *J Virol Methods*, 2011, 171(2): 364-368
- [12] 韦筱斌, 许燕, 黎建源, 等. 荧光定量 PCR 测定 HCV RNA 对分片段 ELISA 法检测抗 HCV 可疑样本的分析[J]. *广西医学*, 2007, 29(2): 190-191
- [13] Racz J. Human immunodeficiency virus (HIV) and Hepatitis C virus (HCV) testing among injecting drug users[J]. *Orv Hetil*, 2011, 152(4): 124-130
- [14] Gygli N, Huber AR. Detection limit of architect hepatitis C core antigen assay in correlation with HCV RNA, and renewed confirmation algorithm for reactive anti-HCV samples [J]. *J Clin Virol*, 2013, 58(3): 535-540
- [15] Wulff B, Schroder AS, Wilkemeyer I, et al. A prospective time-course study on serological testing for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus with blood samples taken up to 48h after death[J]. *J Med Microbiol*, 2011, 60(7): 920-926
- [16] Ross RS, Stambouli O, Gruner N, et al. Detection of infections with hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus by analyses of dried blood spots--performance characteristics of the ARCHITECT system and two commercial assays for nucleic acid amplification[J]. *Virol J*, 2013, 10: 72
- [17] Ward JW. Testing for HCV: the first step in preventing disease transmission and improving health outcomes for HCV-infected individuals[J]. *Antivir Ther*, 2012, 17(7 B): 1397-1401
- [18] Woldeamanuel Y, Pietsch C, Maier M, et al. Genotypes and viral load of hepatitis C virus among persons attending a voluntary counseling and testing center in Ethiopia[J]. *J Med Virol*, 2011, 83(5): 776-782
- [19] Lambers FA, Urbanus AT, Schinkel J, et al. Hepatitis C testing and treatment among active drug users in Amsterdam: results from the DUTCH-C project[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 23(1): 23-31
- [20] Coshic P, Borgohain M, Thapliyal RM, et al. Individual donor nucleic acid testing for blood safety against HIV-1 and hepatitis B and C viruses in a tertiary care hospital[J]. *Natl Med J India*, 2012, 25(4): 207-209

(上接第 3498 页)

- [17] Ch'ng SW, Brent A, Banerjee S. Cytomegalovirus retinitis: an unusual presentation as vitreous hemorrhage [J]. *Retin Cases Brief Rep*, 2014, 8(1): 50-51
- [18] Gowda D, Shenoy V. Bilateral adrenal gland haemorrhage: an unusual cause [J]. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*, 2014, 2014: 140058
- [19] Cancarini A, Costagliola C, Dell'omo R, et al. Effect of intravitreal bevacizumab on serum, aqueous, and vitreous humor levels of erythropoietin in patients with proliferative diabetic retinopathy[J]. *Minerva Endocrinol*, 2014, 39(4): 305-311
- [20] Yang Y, Zhang J, Yan H. Comparison of combined and sequential surgery for proliferative diabetic retinopathy: a single surgeon study [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108933