

• 检验技术与方法 •

基于芯片点样技术的 RT-PCR 平台建立及其在 HCV、HIV-1 快速检测中的应用*

聂 滨, 鲁卫平, 雷开健, 逯心敏

(宜宾市第二人民医院检验科, 四川宜宾 644000)

摘 要:目的 建立基于芯片点样技术的荧光定量 PCR(RT-PCR)平台并将其用于 HIV-1 和 HCV RNA 载量的检测。方法 选择 HIV-1 和 HCV 的保守区域设计引物, 制备基因芯片管, 建立 RT-PCR 测定 HIV-1 和 HCV 的反应体系, 利用溶解曲线区分病毒种类。对该方法的灵敏度和特异度进行评价, 并用临床标本验证其检测性能。结果 该方法的特异度较好, 其检测 HCV、HIV-1 的最低检测限为 1×10^3 copy/mL, 对 RNA 载量为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ copy/mL 的临床标本能准确检测。结论 该方法为检测 HCV、HIV-1 提供了新思路。

关键词: HCV; HIV; 聚合酶链反应; 基因芯片

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.22.039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)22-3092-03

Establishment of chip technology-based real-time PCR platform and its application in rapid detection of HCV and HIV-1*

Nie Bin, Lu Weiping, Lei Kaijian, Lu Xinmin

(Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan 644000, China)

Abstract: Objective To establish the chip technology-based real-time PCR (RT-PCR) platform and to apply it in the viral loads detection of HIV-1 and HCV. **Methods** Based on the primers designed to aim at the conserved regions of HIV-1 and HCV, The gene chip tube was prepared, and the RT-PCR reaction system was established for the simultaneous determination of viral loads. And the melting curves were used to distinguish viral species. The sensitivity and specificity of the method were estimated, and performance of the method was verified by using clinical samples. **Results** The specificity of the method was good. The lowest detectable limit of the detection method of HCV and HIV-1 was 1×10^3 copy/mL. The clinical samples with viral loads around $1 \times 10^3 - 1 \times 10^6$ copy/mL could be detected accurately. **Conclusion** The method provides a new idea for the detection of HCV and HIV-1.

Key words: HCV; HIV; polymerase chain reaction; gene chip

HCV 是引起慢性肝炎的主要因素之一, 50% 以上的慢性肝炎是由 HCV 感染引起的^[1]。《中国艾滋病防治联合评估报告(2007 年)》指出, 到 2007 年底, 我国现存艾滋病病毒感染者和患者约 70 万人, 全人群感染率约为 0.05%, 新感染率约占 10%。宜宾的形势更严峻^[2]。为了更好地预防和控制这些疾病, 寻找 1 种快速、准确的诊断方法显得尤为重要。本研究旨在建立 1 种基于芯片点样技术的荧光定量 PCR(RT-PCR)平台, 并将其应用于 HIV-1 和 HCV 的检测, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), SYBR Green PCR Master Mix (TOYOBO), 阴、阳性质控标本来自于用深圳达安生物工程有限公司开发的 HIV-1、HCV 核酸扩增荧光定量检测试剂确认后的临床标本。

1.2 主要仪器 ABI 3900 台式高通量 DNA 合成仪, 科大创新 HC-3018R 高速冷冻离心机, ABI 9700 PCR 仪, ABI 7500 全自动荧光定量 PCR 仪, 生物芯片点样仪, UV Stratalinker 紫外交联仪。

1.3 方法

1.3.1 引物获得 HIV-1、HCV 序列可以从美国的基因库 (GenBank)、基因组序列数据库 (GSDB)、欧洲的分子生物学实验室 (EMBL) 和日本的 DNA 数据库 (DDBJ) 中获得。根据这些序列的保守区域, 用引物设计软件 OLIGO6.0 设计寡核苷

酸引物, 由 Takara 公司合成。序列比对采用 Clustalx 比对软件。引物序列分别为 (5'~3'): HIV-1-F-I, 5'-TGC TAT GTC AGT TCC CCT TGG TTC TCT-3'; HIV-1-R, 5'-AGT TGG AGG ACA TCA AGC AGC CAT GCA AAT-3'; HCV-1-F-I, 5'-GTC TAG CCA TGG CGT TAG TAT GAG-3'; HCV-1-R, 5'-ACC CTA TCA GGC AGT ACC ACA AG-3'。

1.3.2 基因芯片管制备 应用基因芯片的点样技术把每对引物中的 1 条 5'端固定在荧光定量 PCR 管上^[3], 购自美国 CEL 公司该 PCR 管是经过醛基化修饰的反应管, 这种固化了多条引物具有基因芯片高通量功能的荧光定量 PCR 管简称基因芯片管。制备基因芯片管的具体步骤: 将需要固化的引物溶于 $3 \times$ 枸橼酸钠缓冲液 (SSC) 中, 其终浓度为 50 pmol/ μ L。使用点样仪进行点样。点样结束后, 用紫外交联仪交联 2 min, 放置过夜。为了封闭芯片管上未与引物结合的醛基, 并洗去未与芯片管结合的引物, 按照下列程序对芯片管进行处理: 将芯片管放入新鲜配制的 0.1 mol/L NaBH₄ 5 min; 0.2% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 洗涤 1 次, 随后再用蒸馏水洗 2 次, 每次 1 min。处理好的芯片管在干燥的环境中, 避光保存, 备用。

1.3.3 RT-PCR 按 SuperScript III Reverse Transcriptase 试剂说明进行逆转录操作。反应体系 (总体积 20 μ L): 10 mmol/L dNTP 2 μ L, RNA 酶抑制剂 0.5 μ L, 随机引物 1 μ L, $5 \times$ buffer 4 μ L, SuperScript III Reverse Transcriptase 试

* 基金项目: 宜宾市科技局项目 (200903006)。 作者简介: 聂滨, 男, 副主任检验技师, 主要从事 HIV 分型诊断研究。

剂 0.5 μ L,总 RNA 1.0 μ g 12 μ L。混匀后 42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min,85 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 灭活逆转录酶。按 SYBR Green PCR Master Mix 试剂说明进行 PCR 操作。在已设计好的 PCR 管中配置以下溶液:cDNA 5.0 μ L,下游引物 1 μ L(HIV-1 下游引物浓度为 0.4 μ mol/L,HCV 下游引物浓度为 0.2 μ mol/L),2 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L,H₂O 4 μ L,总体积 20 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 15 s,94 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,78 $^{\circ}$ C 3 s,共 45 个循环。最后增加熔解曲线步骤。在 RT-PCR 反应完毕后,PCR 仪上的探针起跳则为阳性样本,或者扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,有单一、清晰条带的也为阳性样本。

1.3.4 基因芯片管特异性检测 采用 NCBI 的 BLAST 对引物序列进行同源性比较,结果显示基因芯片管所用引物的种属特异性;对产物进行 2% 琼脂糖电泳确定条带位置;提取已确诊的 HBV 阳性标本 10 例,HCV、HIV 阳性标本各 1 例按 1.3.3 介绍的方法进行测试。

1.3.5 基因芯片管灵敏度检测 将 HIV-1、HCV 标准模板 1 $\times$ 10⁵ copy/mL cDNA 使用阴性血清进行梯度稀释作为模板,每个浓度检测 5 次,按 1.3.3 介绍的方法进行测试。

1.3.6 基因芯片管检测混合标本 将 5 例 HIV-1 阳性标本与 5 例 HCV 阳性标本两两混合后,形成 5 份达到相应浓度的标本,按 1.3.3 介绍的方法进行测试,并用 HIV-1、HCV RT-PCR 检测试剂进行确认。

1.3.7 基因芯片管检测临床标本 已用 HIV-1、HCV RT-PCR 检测试剂确诊的 HIV-1 和 HCV 阳性标本各 5 例和 6 例阴性标本,按 1:1 混合后形成 13 个检测标本,再按检测程序进行检测。

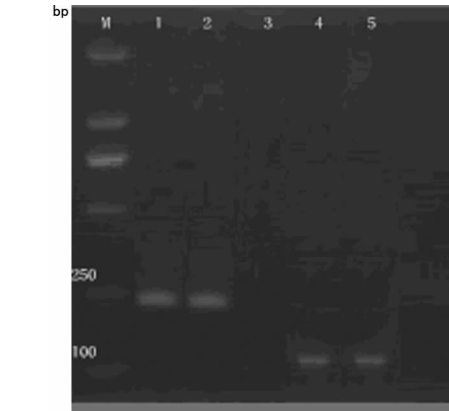
2 结 果

2.1 基因芯片管的灵敏度和重复性 HCV RNA 载量分别为 1 $\times$ 10⁵、1 $\times$ 10⁴、1 $\times$ 10³、1 $\times$ 10²、10 copy/mL 的阳性标本,分别采用基因芯片管 RT-PCR 重复检测 5 次,结果 1 $\times$ 10⁵、1 $\times$ 10⁴、1 $\times$ 10³ copy/mL 的标本均得到 5 次阳性结果,1 $\times$ 10² copy/mL 的标本得到 4 次阳性结果,1 $\times$ 10³ copy/mL 的标本只得到 1 次阳性结果。HIV-1 RNA 载量分别为 1 $\times$ 10⁵、1 $\times$ 10⁴、1 $\times$ 10³、1 $\times$ 10² copy/mL 的阳性标本,分别采用基因芯片管 RT-PCR 重复检测 5 次,除了 1 $\times$ 10² copy/mL 的标本只获得 2 次阳性结果外,其余标本均获得 5 次阳性结果。将 HCV RNA 载量分别为 1 $\times$ 10⁵、1 $\times$ 10⁴、1 $\times$ 10³、1 $\times$ 10²、10 copy/mL 的阳性标本分别与 HIV-1 RNA 载量分别为 1 $\times$ 10⁵、1 $\times$ 10⁴、1 $\times$ 10³、1 $\times$ 10²、10 copy/mL 的阳性标本按照 1:1 的比例制备 5 种稀释度的混合阳性标本,每份混合阳性标本分别采用基因芯片管 RT-PCT 重复检测 5 次,结果 1 $\times$ 10² copy/mL HCV 与 1 $\times$ 10² copy/mL HIV-1 混合标本获得 2 次阳性结果,10 copy/mL HCV 与 10 copy/mL HIV-1 混合标本获得 1 次阳性结果,其余混合标本均获得 5 次阳性结果。该体系检测 HCV、HIV-1 在 1 $\times$ 10³ copy/mL 及其以上浓度重复性好,能准确检测的最低浓度为 1 $\times$ 10³ copy/mL。HCV、HIV-1 阳性标本及其混合阳性标本的梯度反应曲线及溶解曲线图,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 基因芯片管的特异度 所有扩增产物用 2% 琼脂电泳确定条带位置。HCV 和 HIV-1 的 PCR 产物电泳图,见图 1。HBV 阳性标本 PCR 产物电泳图,见图 2。HBV 对 HCV 和 HIV-1 的检测无干扰,该检测系统特异度良好。

2.3 临床标本验证情况 用 HIV-1、HCV 阳性标本各 5 例和 6 例阴性标本,按 1:1 混合后形成 13 份检测标本后进行验证,其验证情况见表 1,RNA 载量范围在 1 $\times$ 10³~1 $\times$ 10⁶ cop-

y/mL 的临床标本能准确检测。



M:DNA 标记物;1~2:HCV 阳性标本;3:阴性对照;4~5:HIV-1 阳性标本。

图 1 HCV、HIV-1 PCR 产物电泳图



M:DNA 标记物;1:阴性对照;2~11:HBV 阳性标本;12:HIV-1 阳性对照;13:HCV 阳性对照。

图 2 HBV 阳性标本 PCR 产物电泳图

表 1 临床标本验证情况

标本 编号	HCV RNA (copy/mL)	HIV-1 RNA (copy/mL)	标本混合 比例(v/v)	混合样本 HCV 结果	混合样本 HIV-1 结果
1	3.2 $\times$ 10 ⁶	3.7 $\times$ 10 ⁵	1:1	+	+
2	1.5 $\times$ 10 ⁵	2.1 $\times$ 10 ⁵	1:1	+	+
3	2.9 $\times$ 10 ⁴	7.8 $\times$ 10 ³	1:1	+	+
4	4.7 $\times$ 10 ³	/	1:1	+	-
5	1.1 $\times$ 10 ³	/	1:1	+	-
6	/	8.9 $\times$ 10 ⁴	1:1	-	+
7	/	1.1 $\times$ 10 ⁵	1:1	-	+
8	/	/	1:1	-	-
9	/	/	1:1	-	-
10	/	/	1:1	-	-
11	/	/	1:1	-	-
12	/	/	1:1	-	-
13	/	/	1:1	-	-

/:阴性标本。

3 讨 论

血液传播是感染 HCV 和 HIV 的主要途径之一。“窗口期”一直困扰着输血感染检测,PCR 能检出 95% 以上窗口期标本,但需要分别建立不同的扩增体系、扩增方法和扩增条件,大大增加了工作量。此外扩增后还需用电泳方法分析,费时、费力且无法对扩增反应进行实时检测。为解决以上传统 PCR 的缺点,一些研究者尝试了采用多重 RT-PCR、基因芯片技术进行检验。

Paryan 等^[4]采用多重 RT-PCR 对 HCV 和 HIV 进行了检测。多重 RT-PCR 具有灵敏度和特异度高、能实现多重反应、自动化程度高、无污染、能实时检测等特点,(下转第 3096 页)

本研究采用的探针不是 UroVysion 探针,而且其不能同时在同一细胞中显示 4 种遗传学改变,因此具有一定局限性。虽然本研究采用的探针组合能够筛选出膀胱尿路上皮肿瘤中出现最频繁的染色体异常,但其是否是诊断膀胱尿路上皮肿瘤最适合的探针组合,还有待进一步研究。本研究所得结果与 UroVysion 探针相似,证明其有可能成为在中国人群中检测膀胱尿路上皮肿瘤发病率的有效手段。本研究未涉及 FISH 检查在膀胱尿路上皮肿瘤术后和分期的诊断,尤其是姑息性治疗后随访中的作用问题,需要在以后的进一步研究中加以研究。

综上所述,利用 FISH 技术检测 3、7、17 号染色体和 p16 基因染色体数目畸变来诊断膀胱尿路上皮肿瘤的灵敏度明显优于细胞学检查,但 2 种方法的特异度差异不显著。p16 缺失作为膀胱尿路上皮肿瘤发生过程中最早的染色体改变,对临床诊断有着重要的作用。能明显提高膀胱尿路上皮肿瘤的筛查率是 FISH 技术的一大优点,该技术有望成为筛查膀胱尿路上皮肿瘤的一种新的无创性检查方法。

参考文献

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.
[2] Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. Bladder cancer in 2010: how far have we come? [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(4): 244-272.
[3] Hajdinjak T. UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing[J]. Urol Oncol, 2008, 26(6): 646-651.
[4] Cianciulli AM, Leonardo C, Guadagni F, et al. Genetic instability in superficial bladder cancer and adjacent mucosa: an interphase

cytogenetic study[J]. Hum Pathol, 2003, 34(3): 214-221.
[5] Schmidbauer J, Witjes F, Schmeller N, et al. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy[J]. J Urol, 2004, 171(1): 135-138.
[6] Halling KC. Vysis UroVysion for the detection of urothelial carcinoma[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2003, 3(4): 507-519.
[7] van Rhijn BWG, Van der Poel HG, van Der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review[J]. Eur Urol, 2005, 47(6): 736-748.
[8] Friedrich MG, Toma MI, Hellstern A, et al. Comparison of multi-target fluorescence in situ hybridization in urine with other noninvasive tests for detecting bladder cancer[J]. BJU Int, 2003, 92(9): 911-914.
[9] Jones JS. DNA-based molecular cytology for bladder cancer surveillance[J]. J Urol, 2006, 67(3): 35-45.
[10] Kwak KW, Kim SH, Lee HM. The utility of fluorescence in situ hybridization for detection of bladder urothelial carcinoma in routine clinical practice[J]. J Korean Med Sci, 2009, 24(6): 1139-1144.
[11] Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma[J]. J Urol, 2000, 164(5): 1768-1775.
[12] Skacel M, Fahmy M, Brainard J A, et al. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology[J]. J Urol, 2003, 169(6): 2101-2105.

(收稿日期: 2014-03-18)

(上接第 3093 页)

但因几对引物同时在一个体系里反应,容易出现交叉反应,出现非特异扩增,从而不容易寻找到能高通量的反应体系,而且检测时需要多种荧光探针,所以它的推广受到限制。Takizawa 等^[5]采用基因芯片技术对 HCV 和 HIV 进行了检测。基因芯片技术作为一种高通量的检测新技术,可以同时检测数以万计的生物分子^[6]。但目前通用的多种基因芯片技术,都存在着检测技术复杂、条件和设备要求高等问题,限制了该技术在临床检测中的应用。

本研究应用基因芯片的点样技术把每对引物中的 1 条 5' 端固化在 RT-PCR 反应管上^[3],然后在管内进行 RT-PCR 检测,利用荧光强度确定是否存在 HIV-1 或 HCV 并确定病毒载量,利用溶解曲线不同区分病毒种类。达到了多重 RT-PCR 和基因芯片技术同时检测 HCV、HIV-1 的优点,同时又避免了它们的缺点。灵敏度试验说明该体系在 1×10^3 copy/mL 及以上 RNA 载量时检测 HCV、HIV-1 的重复性好,能准确检测的最低载量为 1×10^3 copy/mL。在特异性试验中,对阴性标本和阳性标本 PCR 产物的电泳验证说明该系统特异性好。在临床标本验证实验中, RNA 载量范围在 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ copy/mL 的临床标本能准确检测,与其他厂家 PCR 结果吻合率达 100%。本研究建立的 RT-PCR 平台能对 HCV、HIV-1 RNA 载量达到 1×10^3 copy/mL 的临床标本进行准确检测。

在特异性试验中,对引物序列进行同源性比较,结果显示所用引物均具有种属特异性,并有电泳图作支撑,但如果能用多种病毒标准品进行验证则说服力会更强。建立的 RT-PCR 平台只是同时针对 HCV、HIV-1 的检测,还达不到血站血液筛查同时检测 HCV、HIV-1、HBV 和梅毒螺旋体的要求,要让这个技术转化成产品还有一段距离,但这种方法为同时快速检测

多种病毒带来了全新思路。

综上所述,本研究建立的基于芯片点样技术的 RT-PCR 平台灵敏度、特异度基本满足临床试验要求,为同时快速检测 HCV、HIV-1 提供了新的方法,也为同时检测多种病毒提供了新的思路。

参考文献

[1] Cheng KC, Gupta S, Wang HW, et al. Current drug discovery strategies for treatment of hepatitis C virus infection[J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63(7): 883-892.
[2] 聂滨,王元素,逯心敏,等. 输血前患者血液传染指标检查结果分析[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(10): 796.
[3] Rubina AY, Pan'kov SV, Dementieva EI, et al. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production[J]. Anal Biochem, 2004, 325(1): 92-106.
[4] Paryan M, Mohammadi-Yeganeh S, Mirab SS, et al. Design and development of a multiplex real-time PCR assay for detection of HIV-1 and HCV using molecular beacons[J]. Indian J Microbiol, 2012, 52(3): 456-463.
[5] Takizawa K, Nakashima T, Mizukami TA, et al. Degenerate polymerase chain reaction strategy with DNA microarray for detection of multiple and various subtypes of virus during blood screening [J]. Transfusion, 2013, 53(10 Pt 2): 2545-2555.
[6] 段梦,李志军,黄恒柳,等. SNP 基因芯片方法的建立及在 MTHFR 多态性检测中的初步应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(24): 3322-3323.

(收稿日期: 2014-03-26)