

• 论 著 •

1 种血清戊型肝炎病毒荧光定量 RT-PCR 快速检测方法的建立

荣义辉¹, 李永利², 游绍莉¹, 刘鸿凌¹, 万志宏¹, 朱 冰¹, 臧 红¹, 王海滨^{2△}

(中国人民解放军第三〇二医院: 1. 肝衰竭诊疗与研究中心;

2. 临床检验医学中心, 北京 100039)

摘要:目的 建立一种从血清样本中基于荧光定量 PCR 的快速检测戊型肝炎病毒的方法。方法 (1) 从 GeneBank 获得包含我国流行的 3 个基因型的 100 条戊型肝炎病毒序列。选择合适的序列设计合成荧光定量引物和 Taqman 探针。(2) 将引物从血清模板中 PCR 扩增片段在体外转录产物作为荧光定量 PCR 标准品, 同时引入了微量核酸裂解液。(3) 取 10 份临床戊肝阳性患者血清样品, 用建立的方法检测, 进一步验证该方法。结果 该检测技术可以有效检测 I 型和 IV 型戊型肝炎阳性患者的血清样本, 而对其他病毒传染病患者血清检测为阴性结果, 证实该 RT-PCR 检测技术的特异度较高、可靠性较好。对 10 份临床血清样品的验证检测进一步证实了该方法快速、便捷、灵敏且重复性好。结论 建立了一种适用于中国人群戊型肝炎病毒主要基因型检测的荧光定量 RT-PCR 检测技术。可满足戊型肝炎病毒临床早期快速诊断的需求。

关键词: 戊型肝炎病毒; 聚合酶链反应; TaqMan 荧光探针

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 05. 011

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)05-0601-03

Establishment of a real-time quantitative RT-PCR assay for rapid detection of hepatitis E virus in serum

Rong Yihui¹, Li Yongli², You Shaoli¹, Liu Hongling¹, Wan Zhihong¹,

Zhu Bing¹, Zang Hong¹, Wang Haibin^{2△}

(1. Liver Failure Diagnosis and Research Center; 2. The Center of Clinical Laboratory,

302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for the rapid detection of hepatitis E virus (HEV) from serum samples based on fluorescence quantitative PCR. **Methods** (1) One-hundred HEV sequences including our country popular three major genotypes were obtained from the GeneBank with the Vector NTI software. The proper sequence was selected to design and synthesize the primers of the fluorescence quantitation and the Taqman probe. (2) The amplification region PCR fragment was transcribed in vitro to synthesize cRNA standard, at the same time the trace serum virus lysate was introduced into a universal real-time TaqMan PCR assay. (3) 10 clinical serum samples were collected from the patients with clinical hepatitis E and detected by using the established method for further verifying this method. **Results** This detection technique could effectively detect the serum samples in the patients with genotype I and genotype IV hepatitis E positive, while the serum detection in the patients with other virus infectious diseases had the negative results, which verified that this RT-PCR detection technique had higher specificity and good reliability. The detection results from 10 clinical serum samples further verified that this method was rapid, convenient and sensitive with good repeatability. **Conclusion** A fluorescence quantitative RT-PCR detection technique suitable for detecting main genotypes of HEV in China population is established, which can meet the demand of early and rapid diagnosis for HEV.

Key words: hepatitis E virus; polymerase chain reaction; TaqMan fluorescence probe

戊型病毒性肝炎(戊肝)是由戊肝病毒(HEV)引起的自限性的非甲非乙型肝炎。HEV 主要经肠道传播, 患戊肝人群的病死率约 0.5%~1.5%, 孕妇和大于 60 岁人群中高达 20%^[1-2]。据世界卫生组织(WHO)在 2011 年估计, 全球每年新发戊肝约 3 400 万例, 其中死亡 30 万例^[3]。同时戊型肝炎病毒可感染多种动物甚至禽类, 在家人和猪之间也可相互传播, 是危害养猪业和人类健康的一种重要病原^[4]。目前全球发现了 HEV 有 4 个基因型, 对戊型肝炎感染采取的控制其流行措施主要是及早发现 HEV 感染, 随时随地监测流行区的 HEV 流行情况以发现 HEV 传染源和阻断 HEV 的区域传播。基于 HEV 流行病学的要求, 需要建立一种通用的、敏感度高、特异度强和快速方便的检测方法用于 HEV 的早期临床诊断^[5]。HEV 主要经污染的水源和环境粪-口传播, 敏感度和特异度高的 HEV 检测技术也有助于分子流行病学调查和 HEV

病毒溯源^[6]。在本研究中, 利用新型血清核酸裂解液及 Taq-Man 技术建立了 HEV 的荧光定量 RT-PCR 检测方法, 并验证了该方法对不同基因型样品和临床样品的检测能力。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司, DEPC 购自 Sigma 公司, 热启动 Taq 酶购自 TaKaRa 公司, RNase Inhibitor 购自 Promega 公司, M-MLV 逆转录酶为 Fermentas 公司产品, 质粒小提试剂盒购于上海生工公司, DNA 纯化试剂盒购于 Qiagen 公司, 体外 RNA 制备试剂盒购于 Promega 公司。其他生化试剂均为国产分析纯, 台式低温高速离心机(Thermo), 实时荧光定量 PCR 仪(上海宏石, SLAN)。

1.2 引物探针的设计和合成 从 GenBank 收录的 HEV 全序列分离株中获得 100 条人源的不同基因型病毒株的序列, 利用 Vector NTI 和 MEGA 4.0 基因分析软件对其进行比对和基因

进化树分析,选择序列中高度保守的 ORF2 区域序列作为荧光定量 RT-PCR 扩增片段的区域,利用 Primer 5.0 引物软件设计合成引物和 Taqman 探针,并由北京天一辉远生物公司合成。

1.3 血清样本留取 采集北京解放军三〇二医院采集 10 份戊型肝炎患者血清,并采用 IgG-ELISA 对采集样品进行检测为阳性。取 100 μ L 样本血清按照 Invitrogen TRIzol Reagent 说明书进行 RNA 提取,并溶于无 Rnase 的去离子水中,与剩余患者血清样本一起置于一 80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 体外转录及标准品的制备 对所提取的 RNA 按购自 Fermentas 公司反转录试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA,并利用特异性引物扩增约 350 bp 核苷酸片段,将 PCR 扩增片段回收后克隆于 PGEM-T Easy 载体中,转化 JM109 大肠杆菌感受态细胞。挑取菌落 PCR 鉴定为阳性的单克隆,用 4 mL 液体 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后,用上海生工公司的质粒小提试剂盒进行质粒的提取。质粒用 PvuII 内切酶(目的片段不含该位点)消化后制备平末端的 DNA 片段,用 Qiagen 公司的 DNA 纯化试剂盒进行酶切产物纯化回收,回收产物作为转录模板按照 Promega 公司的体外 RNA 制备试剂盒进行体外转录。转录产物经 NEB 公司的无 RNase 的 Dnase I 消化除去 DNA 模板后,75 $^{\circ}$ C 10 min 将 DNase I 灭活,测定转录产物 A260 吸收值并按公式计算 cRNA 浓度为 1.0×10^8 copies/10 μ L,保存于一 80 $^{\circ}$ C 备用。

1.5 HEV 荧光定量 RT-PCR 条件的优化和标准曲线的建立 以制备的 cRNA 为模板,对 PCR 反应体系中引物、TaqMan 探针、dNTP、Mg²⁺ 的浓度以及退火温度进行优化筛选,选择灵

敏度高,背景信号低,PCR 扩增荧光信号曲线呈 S 型的反应条件作为最适 PCR 反应条件。然后用灭菌双蒸水将纯化的 cRNA 标准品倍比稀释为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 copies/mL,采用优化的最适反应条件进行 PCR 反应,SLAN 荧光定量 PCR 仪自动绘制标准曲线。

1.6 HEV 荧光定量 RT-PCR 方法的稳定性和特异度检验 从样品间重复性和样品内重复性两个水平来评价建立的荧光定量 PCR 检测方法的稳定性。样品内重复性检验方法:选取同一份样本,设 10 个平行反应同时进行,检验其荧光定量 RT-PCR 反应 CT 值的变异系数。样品间重复性检验方法:选取 2 个不同稀释浓度的 cRNA 标准品,1 周内重复上样检测 5 次,检测其荧光定量 RT-PCR 反应 CT 值的变异系数。用建立的 HEV 荧光定量 PCR 方法对 HEV 阴性的 HBV、HCV 和 HIV 阳性患者血清样品进行检测,同时对基因 I 型和 IV 型 HEV 阳性血清样本检测,以验证建立方法的特异度。

2 结 果

2.1 引物和探针的设计 从 GenBank 中分析了 100 株具有代表意义的 HEV 基因组全序列,其中 基因 I 型 27 株,基因 III 型 50 株和基因 IV 型 23 株。结果发现在 HEV 基因组 6300~6500nt 等区域的序列相对保守。序列 GC 含量为 50%~60%,且不易形成二级结构,适合 PCR 扩增见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。所合成的引物 HEV-Up、HEV-Down 和探针 HEV-Probe(表 1)。合成的引物和探针与 GenBank 中的序列进行比对,证实引物和探针的高度特异度。

表 1 引物/探针名称、序列及核酸位置

引物/探针	序列*	核苷酸位置(bp)
HEV-Up	5'-CTT GCT GAT ACG CTT CTC GG-3'	nt 6274~6293
	5'-CTT GCT GAC ACT CTG CTT GG-3'	
HEV-Down	5'-GCT GCG CAT TCT CAA CAG ATG-3'	nt 6392~6412
	5'-GCT GAG CAT TCT CTA CAG ATG-3'	
	5'-GCT GAG CAT TCT CCA CAG ATG-3'	
HEV-Probe	FAM-CCG ACA GAA TTG ATT TCG TCG GC-TAMRA	nt 6296~6318

* :加粗为简并引物核苷酸。

2.2 HEV 荧光定量 RT-PCR 反应条件 一步法实时荧光 PCR 检测,取 0.2 mL PCR 扩增管加 3 μ L 微量核酸裂解液(含有 RNA 酶抑制剂和蛋白变性剂),然后加入 3 μ L 的待测 HEV 病毒血清,用移液器轻轻吹打 2~3 次,加 30 μ L 无菌石蜡油覆盖,放入 ABI2700PCR 扩增仪或者金属浴中于 95 $^{\circ}$ C,10 min,冰浴 2 min。然后直接加入 PCR 扩增混合物,直接进入实时荧光 PCR 扩增程序。PCR 管中加入 3 μ L 体外转录生成的 cRNA 作为标准品模板,多次重复性试验中发现,该检测方法最适反应总体积 30 μ L,其中模板 3 μ L;最适的引物浓度为 0.2 μ mol/L,探针浓度为 0.3 μ mol/L,Mg²⁺ 浓度为 3.5 mmol/L,1.25 U Taq DNA,200 U M-MLV 逆转录酶,30 U RNA 酶抑制剂;PCR 反应最适循环参数为 50 $^{\circ}$ C/5 min,94 $^{\circ}$ C/3 min;之后 94 $^{\circ}$ C/15 s,56 $^{\circ}$ C/15 s,72 $^{\circ}$ C/30 s,3 个预扩增循环;94 $^{\circ}$ C/15 s,60 $^{\circ}$ C/30 s;40 个循环。

2.3 标准曲线的建立 梯度稀释的 cRNA 标准品在扩增后呈现典型的 S 型扩增曲线。对荧光信号分析显示,在 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 copies/mL 范围内,7 个点具有线性关系,斜率为 -2.837,相关系数 r 值达 0.999 6,反应效率为 1.14,表明该标准品达到实验要求。以样本的拷贝数对数(X)为横轴,检测的循环数 CT 值为纵轴建立标准曲线,用于 HEV 的绝对定量。见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.4 特异度和重复性检测 用优化后的荧光定量 RT-PCR 对 HEV 阴性的 HBV、HCV、HIV 阳性患者血清进行检测,结果均为阴性,而对 I 型和 IV 型戊型肝炎阳性患者血清样品检测时,均有良好的扩增反应,验证了所建立检测技术与其他病毒无交叉反应。批内重复性实验结果表明,同一标本的 10 个平行反应管的 CT 值变异系数(CV)为 1.26%。批间重复性实验

结果表明,1 周内两个浓度的 cRNA 标准品的 CT 值的 CV 分别为 1.38% 和 1.63%。说明本研究建立的实时荧光 PCR 方法具有良好的稳定性和重复性。

2.5 临床戊型肝炎患者血清检测 从临床获得 10 份 HEV IgG ELISA 检测阳性的患者血清,用优化后的一步法荧光定量 RT-PCR 对其进行定量结果见表 2。

表 2 荧光定量 RT-PCR 对 10 例不同基因型的临床戊型肝炎患者血清检测结果

样本编号	定量结果(copies/mL)	CT 值	基因型
1	2.35×10 ³	30.50	I 型
2	1.56×10 ⁴	27.84	Ⅳ型
3	3.32×10 ⁵	24.21	I 型
4	1.44×10 ⁵	25.02	Ⅳ型
5	8.65×10 ²	32.10	I 型
6	5.03×10 ²	33.25	I 型
7	4.21×10 ⁶	21.64	Ⅳ型
8	3.31×10 ⁴	26.74	Ⅳ型
9	5.68×10 ³	29.36	I 型
10	2.15×10 ⁴	26.61	I 型

3 讨 论

戊型肝炎,既往称非甲非乙型肝炎,由 HEV 引起的一种自限性疾病。主要经粪-口途径传播,常见方式是通过污染水源和食物传播 也可通过日常生活接触传播 主要流行于亚洲非洲中美洲等发展中国家和地区^[6],在欧美等发达国家最近也发现有个例感染 HEV^[7]。抗-HEV IgM 是目前戊型肝炎急性感染的主要诊断目标之一^[8],HEV 发病后的第 2 周就可以在血清中检测到抗-HEV IgM,发病后第 6 周达到峰值,之后迅速下降,抗-HEV IgM 阳性持续的时间较短(约 3 个月),并且现有的抗-HEV IgM 诊断试剂常会有漏诊和误诊,类风湿因子等存在会影响患者血清抗-HEV IgM 的假阳性。因此抗-HEV IgM 诊断试剂还不能满足 HEV 感染患者的临床诊断和 HEV 的流行病学筛查与防治的需求。而 HEV 病原检测就变得十分重要,有报道在戊型肝炎发病 20 d 内,粪便中 HEVRNA 阳性占散发性戊型肝炎患者的 96.2%^[9],在戊型肝炎出现临床症状的 1~2 周内,70% 以上的戊型肝炎患者可检出 HEVRNA,随后 HEVRNA 阳性检出率迅速下降,但有极个别的戊型肝炎患者中 HEVRNA 在发病 114 d 后仍可以检出^[10],所以 HEVRNA 检测有利于戊型肝炎患者的早期诊断。常规 RT-PCR 灵敏度较低,套式 RT-PCR 方法操作繁琐且试验周期较长,而且 RNA 容易污染和降解。而实时荧光定量 RT-PCR 的扩增效果与套式 RT-PCR 效果相当,且操作简单,降低了污染和降解的概率。实时荧光定量 RT-PCR 更适用于 HEV 感染患者的早期诊断^[11-12]。

本研究采用自创微量核酸裂解液和 Taqman 技术建立了 HEV 病毒血清荧光 RT-PCR 快速检测技术。在对 100 例 HEV 全基因组序列分析中发现,虽然位于 HEV ORF2 的 N 末端与 ORF3 融合的序列保守性很高,但因 GC 水平较高,不

利于 PCR 的扩增,检测结果不是很好。而位于 ORF2 区内部的序列不仅相对保守,且 GC 水平也有利于 PCR 扩增,这与乔彩霞等^[13]设计的探针是相同的,但在引物设计中,主要以 I、Ⅱ型和Ⅳ型为主,主要应用了两对简并引物,没有乔彩霞等^[13]在文章中复杂,同时引入了“一管法”和一步法检测 HEVRNA,最大程度降低了实验步骤和污染的可能性。此外,通过体外转制备了荧光 RT-PCR 的阳性标准品,优化了一步法体系,验证了特异度和重复性。而对 I 型和Ⅳ型 HEV 阳性血清样品的检测结果也证实了该检测方法可有效应用于这两种基因型 HEV 的检测,对Ⅲ型 HEV 阳性血清的检测能力尚有待于进一步研究的证实。

参考文献

[1] Bachlein C, Grummer B. Hepatitis E—a new zoonotic disease in Germany[J]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2010, 123(5/6): 198-204.

[2] 吴婷, 江浪. 戊型病毒性肝炎研究进展[J]. 中国疫苗和免疫, 2009, 15(4): 375-378.

[3] World Health Organization. Viral hepatitis in the WHO south-east Asia region[M]. India: Regional Office for Southeast Asia, 2011.

[4] Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, et al. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus[J]. J Virol Methods, 2006, 131(1): 65-71.

[5] Ahn JM, Rayamajhi N, Gyun Kang S, et al. Comparison of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nested or commercial reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of hepatitis E virus particle in human serum[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2006, 56(3): 269-274.

[6] Enouf V, Dos Reis G, Guthmann JP, et al. Validation of single real-time TaqMan PCR assay for the detection and quantitation of four major genotypes of hepatitis E virus in clinical specimens[J]. J Med Virol, 2006, 78(8): 1076-1082.

[7] Rakesh A, Shahid J. Hepatitis E[J]. Hepatology, 2011, 54(1): 2218-2226.

[8] Kamar N, Bendall R, Legard-Abravanel F, et al. Hepatitis E[J]. Lancet, 2012, 379(9835): 2477-2488.

[9] Yu C, Engle RE, Bryan JP, et al. Detection of immunoglobulin M antibodies to hepatitis E virus by class capture enzyme immunoassay[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(4): 579-586.

[10] Bendall R, Ellis V, Ijaz S, et al. Serological response to hepatitis E virus genotype 3 infection: IgG quantitation, avidity, and IgM response[J]. J Med Virol, 2008, 80(1): 95-101.

[11] 赵晨燕, 李卓, 阎宝山, 等. 戊型肝炎病毒各生物标志物之间关系分析[J]. 中华微生物学免疫学杂志, 2008, 28(1): 6-9.

[12] 付红伟, 朱永红, 庄辉. 我国戊型肝炎流行病学研究进展[J]. 中国病毒学杂志, 2011, 20(1): 67-69.

[13] 乔彩霞, 张鹤晓, 赖平安, 等. 戊型肝炎病毒荧光定量 RT-PCR 快速检测技术的建立和初步应用[J]. 生物工程学报, 2008, 24(5): 892-897.