

# NASBA 荧光分子信标技术定量检测丙型肝炎病毒<sup>\*</sup>

王 虹<sup>\*\*</sup> 陈金华 曾位森 刘 丹 杨艳妮 蒋 平 谢曙光

(广州蓝星生物科技开发有限公司 510515)

**摘要** 建立 NASBA 荧光分子信标探针检测技术,并对国家 HCV 标准品、人工构建 HCV RNA 野生株及 HCV 抗体阳性不同人群进行检测。实验结果:该方法检测 HCV 的灵敏度为  $10^3$  拷贝/ml 血清,阴性参比品的符合率为 100%;检测的线性范围为  $10^3$  拷贝  $\sim 10^9$  拷贝/ml 血清;精密性(CV 值)小于 6%,在 HCV 抗体阳性人群中 HCV RNA 的检出率在 45%  $\sim$  65% 之间。结论:该方法在 HCV RNA 临床定量检测中具有良好的灵敏度、特异性、重复性与实用性。

**关键词** NASBA 分子信标探针 丙型肝炎

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)呈世界范围流行, HCV RNA 定量检测对流行病学调查、指导临床治疗及疫苗的研制均有重要意义。但 RNA 病毒定量检测由于其逆转录效率的不确定性极大限制了其定量的准确性。NASBA (nucleic acid sequence —based amplification) 技术<sup>[1]</sup> 模拟 RNA 病毒体内复制过程进行扩增,并结合荧光分子信标探针检测其扩增产物定量检测 HCV RNA,现将实验结果报告如下:

## 1 材料和方法

### 1.1 标 本

患者血清采自第一军医大学附属珠江医院、广东省中医院、佛山市第一人民医院、广州铁路中心医院等,其中慢性丙肝 76 例,静脉吸毒者 19 例,献血员 15 例,共计 110 例 HCV 抗体阳性患者。其中

肝炎的诊断标准均符合 1995 年(北京)第五次全国传染病与寄生虫学术会议修订的病毒性肝炎诊断标准。

### 1.2 试剂和仪器

HCV NASBA 荧光分子信标检测试剂盒由广州蓝星公司研制。HCV RNA 标准血清购于中国药品生物制品检定所。异硫氰胍为 Sigma 公司产品, T7 RNA 聚合酶、Rnase H AMV 购自宝灵曼公司, 荧光染料 Fam、DABCYL 等均来自于 PE 公司。基因扩增仪为珠海黑马 8000 型, 荧光检测仪为上海棱光技术有限公司生产。

### 1.3 引物与探针的设计<sup>[2,3]</sup>

根据 Genbank 公布的 HCV 序列(序列号为 L02836),并参考 Okamoto 选择的 5' 非编码区和 C 区保守序列,采用 Primer 软件设计引物和荧光探针,其序列分别为(表 1):

表 1 HCV RNA 引物和分子信标探针序列

	Sequence5' —3'	Position
Promoter (T7)	AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G	
P1	T7-ATA TAC CCC ATG AGA TCG GCG	nt740 ~ 20
P2	GTC TCG TAG ACC GTG CAC CAT	nt312 ~ 332
荧光探针	CAT CCG CC CAC GGA CCC CCG GCG TAG CCA TG <sup>1)</sup>	nt654 ~ 674

1) 划线部分为分子信标的茎部

### 1.4 荧光探针的标记与纯化

在 DNA 合成仪上合成 5'-HS-Trityl-onr 寡核苷酸 3'-NH<sub>2</sub>, 将 DABCL 羟琥珀胺酯溶于二甲基酰胺(DMF)中,以 10:1 的比例加入到合成的寡核苷酸

收稿日期:2003-12-02

<sup>\*</sup> 广州市科技攻关计划项目(2002Z3-E4091)

<sup>\*\*</sup> 电子信箱:laxiwh@263.net

溶液搅拌 12h,12000r/min 离心 1min,将上清液混合物通过 sephadexG-25 凝胶柱以除去未反应的 DABCL;再上 C18 反相柱,纯化 DABCL-寡核苷酸。在含 DABCL-寡核苷酸溶液中加入 AgNO<sub>3</sub>,再加 DTT,振荡 5min 用以去除 Trityl 的保护基团。再 10000r/min 离心 2min,取上清液加入 5-碘乙酰胺基荧光素及 pH 9.0 0.2mol/L NaHCO<sub>3</sub> 内,37 保温 90 min,再上 HPLC 柱纯化。

1.5 HCV RNA 野生株标准品的构建

构建的野生株位于 BASBA 扩增区域内,将野生株克隆到 PGEM4 质粒并增殖;用 T7 RNA 聚合酶转录 HCV RNA,并用 DNase 除去质粒 DNA,用微量分光光度计测定其含量,并按 1/10 作极限稀释至 10<sup>2</sup> 拷贝/ml。

1.6 HCV RNA 提取

采用异硫氰胍法提取 RNA。取 20%异硫氰胍液 50μl 于 0.5ml 离心管内,加待测血清 50μl,混匀,100 煮沸 2min,10000r/min 离心 5min。取上层水相于 0.5ml 离心管内,苯酚氯仿按常规沉淀 RNA。

1.7 NASBA 恒温扩增

NASBA 扩增管中含 40mmol Tris-HCl, pH8.5、12mmol/L MgCl<sub>2</sub>、70mmol/L KCl、5mmol/L dNTP、0.2μmol/L P1、P2 及荧光分子信标探针,5μl 核酸提取模板,混匀后,65 5min,41 5min。然后加入 5μl 的三酶混合液(含 2μl 0.1g/L BSA,0.1U RNase H,40U T7 RNA 聚合酶,8U AMV)混匀 10000r/min 离心 5s,42 温育 120min。

1.8 NASBA 扩增后荧光检测<sup>[4]</sup>

将扩增管放入 94 5min,然后迅速冷却至 50,保温 10min 后降至 28,将扩增管收入荧光检测仪检测,读取并记录荧光值,荧光 FAM 激发波长 487nm,检测波长为 525nm。

1.9 结果评价

(1) 荧光值确定: Ax = 样本荧光值或各对照荧光值 - 空白对照荧光值。

(2) 实验有效性判别: 阴性对照值 Ax 小于 10 时按 10 计算; 阴性对照值 Ax 大于 20 则本次实验无效,应检查试剂、仪器、反应条件等方面的误差。

(3) 结果判定: 在实验有效的情况下样本 Ax 阴性对照 Ax ×2.1 判为阳性; 样本 Ax < 阴性对照 Ax ×2.1 判为阴性。

2 结 果

2.1 HCV RNA 野生株梯度稀释的荧光值和标准曲线

将 HCV RNA10<sup>1</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup> 拷贝/ml 作横坐标, 荧光值作纵坐标绘制标准曲线, 其相关系数 可达 0.991 (图 1)。

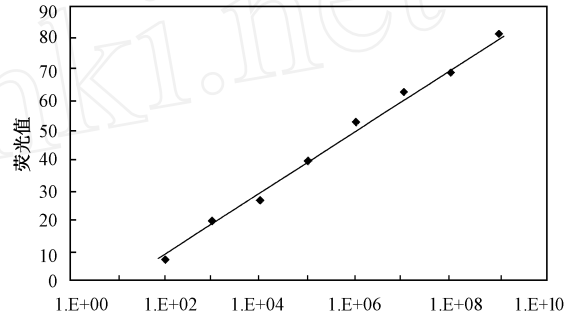


图 1 HCV RNA 浓度(拷贝/ml)

2.2 不同浓度国家 HCV RNA 标准血清检测结果

10 份 HCV 阳性参比品的符合率为 100%, 10 份 HCV RNA 阴性参比品的符合率为 100%。不同浓度阳性血清检测结果见表 2。

表 2 国家 HCV RNA 阳性血清检测结果(拷贝/ml)

	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>
荧光值	8.3	9.5	22.6	34.7	45.8	59.4	72.5	83.9	89.7

2.3 国家标准血清 10<sup>5</sup> 拷贝/ml 与 10<sup>8</sup> 拷贝/ml 的精密性(CV 值)实验结果

对国家标准品血清 10<sup>5</sup> 拷贝/ml 血清与 10<sup>8</sup> 拷贝/ml 血清各重复检测 10 次, 结果见表 3。10<sup>5</sup> 拷贝/ml 血清 CV 值为 5.2%, 10<sup>8</sup> 拷贝/ml 血清 CV 值为 4.9%。

表 3 10<sup>5</sup>、10<sup>8</sup> 拷贝/ml 血清精密性(CV)检测荧光值结果

荧光值 (n = 10)										
10 <sup>5</sup>	45.5	41.2	47.4	46.9	44.5	45.3	47.9	43.1	49.1	47.3
10 <sup>8</sup>	87.4	83.6	89.9	80.5	81.4	79.1	82.1	89.2	81.1	89.4

2.4 不同病例 HCV 抗体阳性与 HCV RNA 浓度之间关系(表 4)

表 4 HCV 抗体阳性与 HCV RNA 检测结果

	例数	HCV 抗体阳性	HCV RNA(拷贝/ml 血清) <sup>1)</sup>							
			<10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>
慢性丙肝病人	76	76	32		2	2	13	15	12	
静脉吸毒者	19	19	9		3	3	2	2		
献血员	15	15	8	2	1	2	2			

1) <10<sup>2</sup> 为血清 HCV RNA 阴性

### 3 讨 论

目前世界上广泛用于 HCV RNA 检测的核酸检测技术主要有 PCR 技术、bDNA 技术和 NASBA 技术。前者需将 HCV RNA 逆转录为 cDNA 后进行 PCR 扩增,而逆转录效率高低极大影响了 RNA 病毒定量的准确性。bDNA 技术由于灵敏度较低,其临床使用受到了较大限制。NASBA 技术是不需经过逆转录,在恒温情况下(42℃)直接扩增样本中的靶 RNA,无需特殊设备。我们的实验结果表明: HCV RNA 检测的敏感性可达到  $10^3$  拷贝/ml 血清。定量的线性范围达到  $10^3 \sim 10^9$  拷贝/ml 血清。检测的精密性(CV 值)均小于 6%,该试剂盒在性能上明显优于 RT-PCR 试剂<sup>[5]</sup>。目前国际上对 NASBA 扩增产物的检测绝大多数采用开放式的核酸杂交探针检测体系,如采用酶联显色或化学发光进行结果评价,这就存在操作较为复杂及扩增产物污染易产生假阳性及假阴性的缺点与不足。

荧光分子信标探针技术是根据核酸碱基配对原则和荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)现象设计的。当一个荧光(供体)分子的荧光光谱与另一个荧光(受体)分子的激发光谱相重叠时,供体分子的激发能诱发受体分子发出荧光,同时供体分子自身的荧光强度衰减,这种现象即是荧光 FRET。FRET 程度与供、受体分子的空间距离紧密相关,一般为 7~10nm 时即可发生 FRET;随着距离延长, FRET 呈  $10^6$  比例显著减弱。分子信标与特定核酸互补的寡核苷酸探针。分子信标长约 18~25nt,在空间结构上呈茎环结

构,其中环序列是与靶核酸互补的探针;茎长约 5~7nt,由与靶序列无关的互补序列构成;茎的一端连上一个荧光分子,另一端连上一个淬灭分子。当无靶序列存在时,分子信标呈茎环结构,茎部的荧光分子与淬灭分子非常接近(7~10nm),发生 FRET。荧光分子发出的荧光被淬灭分子吸收并以热能的形式散发,此时检测不到荧光信号;当有靶序列存在时,分子信标的环序列与靶序列特异性结合,形成的双链体比分子信标的茎环结构更稳定,荧光分子与淬灭分子分开,此时荧光分子发出的荧光不能被淬灭分子吸收,可检测到荧光。

我们将荧光分子信标探针技术充分地利用到对 NASBA 扩增产物的检测中,在封闭的反应管及时对扩增产物进行检测,操作极其方便,可以自动化操作。另外分子信标探针同样具有极高的特异性、灵敏度与良好的定量线性范围。因此它在 HCV RNA 病毒的定量检测中将具有广阔的市场前景。

### 参考文献

- [1] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 1991, 350(6313): 91~92
- [2] Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacon: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 303~308
- [3] Ha T. Single molecular fluorescence methods for the study of nucleic acid. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11: 287~292
- [4] 王虹,冯妙英,周东耀,等. 荧光分子信标探针检测拉米夫定耐药基因的试验与临床研究. *中国生物工程杂志*, 2003, 6: 90~93
- [5] Lunel F, Marrioti M, Cresta P, et al. Comparative study of conventional and novel strategies for the detection of hepatitis C virus RNA in serum: amplicor, branched-DNA, NASBA and in-house PCR. *J Virol Methods*, 1995, 54: 159~165

## HCV Quantity Detection with NASBA Fluorescent Molecular Beacon Technique

Wang Hong Chen Jinghua Zeng Weisen Liu Dan Yang Yanni Jiang Ping Xie Shuguang  
(Guangzhou Lanxi Biotechnology Developing Ltd Company, First Military Medical University Guangzhou 510515)

**Abstract** A NASBA fluorescent molecular beacon detection technique was established and was used in HCV quantity detection. The national HCV standard sample, wild type HCV RNA artifact and blood sera with HCV antibody positive from different people were detected respectively. Results: The HCV detection sensitivity in serum was  $10^3$  copies/ml using this technique; The consistency of negative control standard was 100%; The detective linear range was within  $10^3$  copies/ml to  $10^9$  copies/ml. The coefficient of variation (CV) was less than 6%. The positive rate of HCV RNA among HCV antibody positive people was within 45% to 65%. Conclusion: This RNA quantity technique is of good sensitivity, speciality, repetition and practicability in clinical HCV RNA quantity detection.

**Key words** NASBA Molecular beacon probe Hepatitis C virus (HCV)