

用改良 RT-PCR 法扩增 HCV 基因

阎小君 徐德忠* 肖乐义* 苏成芝 吉昌华 陈友绩*

(第四军医大学生化教研室, 西安 710032)

关键词 丙型肝炎, HCV, PCR, 基因检测

丙型肝炎是全球性传染病, 多因输血或血液制品引起。研究表明, 人群中抗-HCV (丙肝病毒) 抗体阳性率为 1—5%, 但丙肝预后差, 约 50% 的急肝转慢, 20% 转为肝硬化和肝癌。迄今, HCV 的检测尚不完善, 主要有 ELISA 及 RT-PCR (反转录-聚合酶链反应) 两种方法, 前一种易出现假阳性和假阴性, 且试剂依赖进口; 后一种国内至今未见报道, 国外也是近两年才有研究报道, 但所采用的反转录法所需样品及试剂量多, 大体积三温点 PCR 所花的时间也多, 每次 PCR 每份样品需 2 天及数百元钱, 因而在国内无法广泛开展。

我们从日本得到 2 对互补于非编码区的引物, 采用微量样品反转录和小体积双温 PCR, 使成本降至国外 1/10—1/5, 耗时减少一半以上。RT-PCR 的反应条件及流程如下: 取血清 200 μ l 加入等体积的缓冲液 A (0.2 mol/L Tris-HCl, pH7.5, 25mmol/L EDTA, 0.3mol/L NaCl, 2% SDS, 200 μ g/ml 蛋白酶 K), 55℃ 保温 1h。然后用酚, 氯仿抽提, 异丙醇沉淀, 真空干燥, 溶于 10 μ l 双蒸水中。反转录体积为 20 μ l (内含 10 $\times$ PCR 缓冲液 2 μ l, 10 mmol/L dNTP 2 μ l, 50 mmol/L MgCl₂ 1 μ l, 10 $\times$ α -BSA 2 μ l, 负链引物 25 pmol, RNA 模板 10 μ l, RNA 酶抑制物 10 U, 反转录酶 8U), 37℃ 1h。PCR 反应在 20 μ l 体积中进行。在 0.5 ml 离心管内依次加入双蒸水 1 μ l, 5 $\times$ PCR 缓冲液 4 μ l, 10 $\times$ α -BSA 2 μ l, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ l, 正链引物 25 pmol, cDNA 10 μ l, 煮沸 5 min, 加 Taq DNA 聚合酶 0.5U。循环条件为: 94℃, 20s, 65℃, 40s, 共 40 个循环, 最后在 65℃ 保温 5min。取 10 μ l

反应液进行 1.7% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果。实验中, 同时做正常人血清及阳性对照血清。以证实 PCR 的可靠性。

结果表明 (见表 1 和图 1): 作者所采用的改良 RT-PCR 法能成功的检出 HCV 基因, 扩增片段的大小与预期结果一致。有意义的是, 该方法检出 HCV 率要高于 ELISA 法, 成本也能为病人所承受。这对于提高我国 HCV 的诊断水平, 促进 HCV 的基因克隆和表达有

表 1 RT-PCR 检测 HCV RNA 结果分析

样品来源	供血员 转氨酶 反复高	慢肝 乙肝指标阴性但有症状抗 HCV			急肝 非甲非 乙有输 血史	合计
		阳性	阴性	—		
样品数	5	2	2	2	5	16
RT-PCR 阳性数	1	2	1	1	3	8

正常人血清对照 (2 个) 实验结果均为阴性, HCV 阳性血清对照 (1 个) 实验结果为阳性。

现实意义。目前, 该扩增片段已被克隆, 正在进行序列分析。

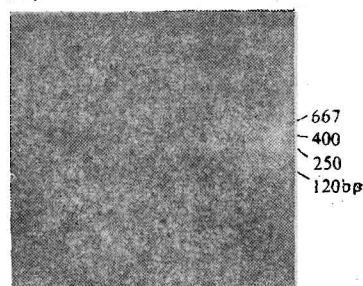


图 1 RT-PCR 扩增 HCV 基因的电泳图

右边为分子量标准, 其余为扩增样品

* 第四军医大学军队流行病学教研室。

收稿日期: 1991-11-05 修回日期: 1991-12-24