

磁珠法测定痕量肝炎病毒的研究

舒孟军¹, 盛蓉生², 高峰^{1△} (1. 上海交通大学药学院, 上海 200240; 2. 卡南吉医药科技(上海) 有限责任公司, 上海 201203)

【摘要】 目的 寻求灵敏而简便的肝炎病毒临床检测新方法。**方法** 采用氧化硅包覆的磁珠同时提取肝炎病毒的 DNA 及 RNA, 结合荧光实时定量聚合酶链反应(PCR)检测乙型肝炎病毒(HBV)及丙型肝炎病毒(HCV)。**结果** 磁珠法可以同时提取 HBV-DNA 和 HCV RNA, 磁珠法提取 HBV-DNA 的效率高于离心柱法和煮沸法, 磁珠法提取 HCV RNA 的效率与离心柱法相近, 但提取效率都高于煮沸法。**结论** 将磁珠的富集分离与高灵敏度的检测手段相结合, 可显著提高检测的特异性和灵敏度, 且方法简便可自动化操作, 可以满足大批样品肝炎病毒筛选检测的要求, 适用于血液中心筛查及医院检测等领域。

【关键词】 氧化硅磁珠; 乙型肝炎病毒; 丙型肝炎病毒; RNA; DNA; 荧光实时定量 PCR

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.06.018 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)06-0677-03

Study on trace hepatitis virus detected by magnetic beads SHU Meng-jun¹, SHENG Rong-sheng², GAO Feng^{1△} (1. School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. Chanllenge MediTech (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

【Abstract】 Objective To find a new sensitive and simple clinical testing method to detect hepatitis virus. **Methods** The silica-coated magnetic beads were adopted to extract hepatitis virus DNA and RNA simultaneously, and combined with the real time PCR method for detecting hepatitis B virus and hepatitis C virus. **Results** The magnetic beads could extract hepatitis B virus(HBV) DNA and hepatitis C virus(HCV) RNA simultaneously. The extraction efficiency of HBV-DNA by the magnetic beads method was higher than that by the centrifuge method and the boiling method, which of HCV RNA was close to the centrifuge method, but higher than the boiling method. **Conclusion** To combine the magnetic beads enrichment and separation of low intensity of virus with the high sensitivity detection method can significantly improve the detection specificity and sensitivity. The method is simple and can be automated, which can meet the requirement of hepatitis virus screening detection in large number of samples, therefore, is suitable for the fields of blood center screening and hospital detection.

【Key words】 silica-coated magnetic beads; HBV; HCV; RNA; DNA; florescent real-time quantitative PCR

核酸检测广泛应用于临床实验室、食品工业、环境微生物监控等^[1]。传统的提取方法要采用有毒的化学试剂, 方法耗时, 操作步骤复杂, 难以高通量应用^[2-4]。煮沸法方便易用, 但对黄疸和溶血的抗干扰能力最差, 溶血对煮沸法有一定影响^[5]。临床医学应用要求发展一种高灵敏度的病毒检测方法, 随着纳米技术的不断发展, 磁性纳米粒子在生物医学和生物技术中得到了广泛的应用^[6-7], 磁珠作为载体可高效固定多种生物分子, 用于生物分子的分离提取^[8-9]。本研究采用卡南吉医药科技(上海)有限责任公司制备的氧化硅包覆磁珠, 建立了磁珠同时提取病毒 DNA 和 RNA 的方法, 采用聚合酶链反应(PCR)检测乙型肝炎病毒(HBV)及丙型肝炎病毒(HCV), 并对检测结果进行了分析比较。

1 材料与方

1.1 材料 通用的化学试剂及生化试剂购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; QIAamp MinElute Virus Spin Kit(简称 Qiagen kit, 下同)购自 Qiagen; 磁珠和缓冲液由卡南吉医药科技(上海)有限责任公司制备; HBV 核酸扩增(PCR)荧光定量检测试剂盒(简称 PG-HBV kit, 下同)和 HCV PCR 荧光检测试剂盒(简称 PG-HCV kit, 下同)购自深圳市匹基生物工程股份有限公司, 临床标本和 HBV 阳性血清由杭州友好临检提

供; 上海纬群公司的诊断用小牛血清; 博日半自动核酸纯化仪; Bio-Rad icycle 定量 PCR 仪。磁分离架由卡南吉医药科技(上海)有限责任公司制造。

1.2 方法

1.2.1 建立磁珠法分离提取样品中的 DNA 和 RNA 的方法

在离心管中加入 10 μ L 蛋白酶 K、100 μ L 样品、100 μ L 缓冲液 VL, 混匀后, 56 $^{\circ}$ C 温浴 10 min, 加入 500 μ L 缓冲液 VB、20 μ L 磁珠, 混匀后, 室温温浴 10 min 后, 样品中的 DNA 和 RNA 就吸附到磁珠上, 采用磁分离架分离磁珠, 分别采用 700 μ L 缓冲液 VW1 及 700 μ L 缓冲液 VW2, 洗涤磁珠两次, 除去杂质, 加入 50 μ L 洗脱缓冲液到离心管中, 置于室温温育 5 min, 使吸附在磁珠上的 DNA 和 RNA 完全洗脱下来, 将洗脱液转移到新的离心管中保存。

1.2.2 磁珠法分离提取细胞中基因组 DNA 和总 RNA HeLa 细胞生长达到 70% 汇合后, 胰酶消化, PBS 洗涤一次后得到 1×10^6 /mL 的细胞悬液, 取 100 μ L 按上面的方法提取 HeLa 细胞的核酸, 取少量提取的核酸溶液于 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色检测。

1.2.3 磁珠法与常规方法分离提取 DNA 效率的比较 将 PG-HBV kit 附带的强阳性样品进行 10 倍、100 倍、1 000 倍、10

△ 通讯作者, E-mail: gaofeng@sjtu.edu.cn.

000 倍、100 000 倍稀释样品(简称 D1、D2、D3、D4、D5),采用上面建立的磁珠法(简称 KNJ kit)、离心柱法(Qiagen kit)与煮沸法(PG-HBV kit)对稀释样品中的 DNA 进行分离、纯化,分别按照各试剂盒提供的说明书进行操作,分离纯化得到的 DNA 进行荧光定量 PCR 检测,PCR 反应体系采用 PG-HBV kit 荧光定量体系。

KNJ kit 和 PG-HBV kit,分别按照各试剂盒提供的操作说明书对 7 个 HBV 临床样品(简称 L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7)中的 DNA 分离、纯化,并进行荧光定量 PCR 检测,PCR 反应体系采用 PG-HBV kit 荧光定量体系。

1.2.4 磁珠法与常规方法分离提取 RNA 的比较 KNJ kit、Qiagen kit 和 PG-HCV kit 分别按照各试剂盒提供的操作说明书对 PG-HCV kit 附带的强阳性样品,进行 10 倍、100 倍、1 000 倍、10 000 倍、100 000 倍稀释样品 RNA 分离、纯化,进行荧光定量 RT-PCR 检测,PCR 反应体系采用 PG-HCV kit 荧光定量体系。

1.2.5 验证 KNJ kit 半自动核酸纯化仪上使用效果 从友好临检获得的 HBV 阳性血清(已检测浓度为 2.85×10^7 copy/mL),将 HBV 阳性血清用诊断用小牛血清稀释,得到 2.85×10^7 、 2.85×10^6 、 2.85×10^5 、 2.85×10^4 、 2.85×10^3 、 2.85×10^2 copy/mL。本次试验取用 2.85×10^4 、 2.85×10^3 、 2.85×10^2 copy/mL,按照卡南吉磁珠法提取病毒核酸方法,前半部分的磁珠吸附采用手工操作,后半部分采用磁分离架分离磁珠及洗涤的过程,在博日半自动核酸纯化仪上按操作程序进行自动分离洗涤,将提取产物 HBV-DNA,标准品,以及手工操作的提取产物做荧光定量 PCR。

2 结 果

2.1 从采用建立的磁珠提取方法(KNJ kit)从 HeLa 细胞提取基因组 DNA 和总 RNA,从琼脂糖凝胶电泳结果显示(图 1),提取的基因组 DNA 无明显拖带,总 RNA 三条带 28s,18s,5s。说明 KNJ kit 一次同时提取纯化了基因组 DNA 和总 RNA,分离、纯化的基因组 DNA 和总 RNA 结构完整。

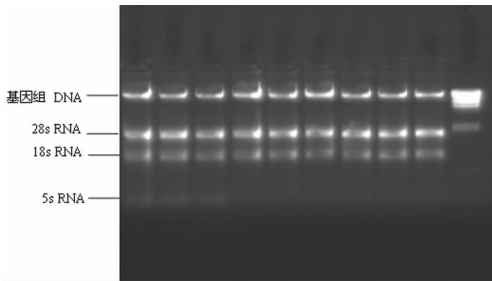


图 1 磁珠法提取的 Hela 细胞基因组 DNA 和总 RNA

2.2 KNJ kit 磁珠法提取 HBV-DNA,检出的 HBV 拷贝数明显多于离心柱法与 PG 煮沸法,说明 KNJ kit 磁珠法提取 HBV-DNA 的效率高于 Qiagen kit 离心柱法和 PG-HBV kit 煮沸法。结果见图 2。

2.3 为了考察磁珠法试剂盒对 HBV 临床样品的检出率,比较了 KNJ kit 和 PG-HBV kit 对 7 个 HBV 临床样品(L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7)进行荧光定量 PCR 检测,KNJ kit 和 PG-HBV kit 都检测出 HBV 阳性,同时看到 KNJ kit 提取 HBV-DNA 效率更高,结果见图 3。

2.4 为了考察磁珠法试剂盒对 HCV 的检出率,KNJ kit、Qiagen kit 和 PG-HCV kit 分别按照各试剂盒提供的操作说明书对稀释样品 RNA 分离、纯化,进行荧光定量 RT-PCR 检测,显

示 PG-HCV kit 煮沸法,只能检测到 10 倍、100 倍稀释的样品。KNJ kit、Qiagen kit 都能检测到 100 000 倍稀释的样品。KNJ kit 磁珠法与 Qiagen kit 离心柱法提取 HCV RNA 的效率接近,但提取效率都高于 PG-HCV kit 煮沸法。结果见图 4。

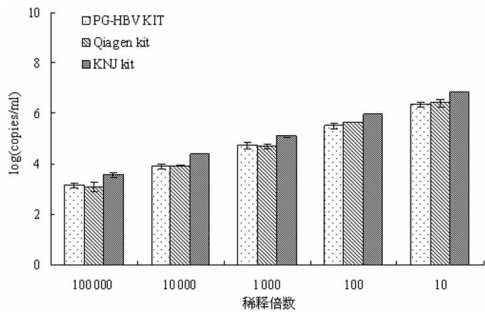


图 2 3 种方法提取强阳性标本 HBV-DNA 比较

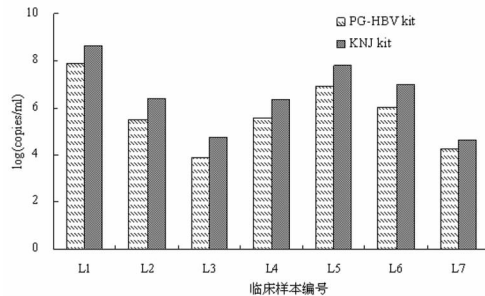


图 3 两种方法提取临床样品 HBV-DNA 比较

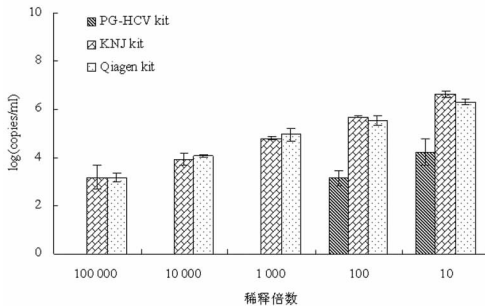


图 4 3 种方法提取强阳性标本 HCV RNA 比较

表 1 磁珠法手工操作提取与半自动操作提取 HBV 阳性血清,荧光定量 PCR 比较

标本浓度 (copy/mL)	KNJ kit 手工操作		KNJ kit 自动化操作	
	CT 值	计算浓度(copy/mL)	CT 值	计算浓度(copy/mL)
2.85×10^5	—	—	24.17	2.66×10^5
	—	—	24.78	4.11×10^5
2.85×10^4	26.84	6.20×10^4	28.15	2.45×10^4
	—	—	28.05	2.62×10^4
2.85×10^3	31.30	2.63×10^3	29.89	2.62×10^3
	—	—	31.30	7.16×10^3
2.85×10^2	34.31	3.12×10^2	37.48	33.10
	32.72	9.61×10^2	*	*

注:—表示未做该标本;*表示结果阴性。

2.5 为了评价磁珠法的自动化提取应用效果,友好临检获得的 HBV 阳性血清用诊断用小牛血清 10 倍浓度梯度稀释样品。比较了 KNJ kit 手工操作,KNJ kit 在博日半自动核酸纯

化仪操作。KNJ kit 在博日半自动核酸纯化仪操作检出 HBV 阳性血清稀释 2.85×10^4 、 2.85×10^3 copy/mL 标本。KNJ kit 在博日半自动核酸纯化仪上操作 HBV 阳性血清稀释 2.85×10^2 copy/mL 标本有 1 个未检出,KNJ kit 手动操作稳定检出 HBV 阳性血清稀释 2.85×10^2 copy/mL 标本。结果见表 1。

3 讨 论

HBV、HCV 等传染性疾病是困扰人类健康生活的一大危害,如何避免病毒的传染,早检测、早阻绝一直是寻求的对策。同时,献血中血液中心如何更好地利用健康血液,ELISA 方法的发展作出了很大的贡献,随着生物技术的提高,核酸法进入了血液筛查,高通量筛选,数据库的建立成为可能^[10]。能否检测到血液中携带的痕量肝炎病毒,是评价技术的一大进步。

功能性磁珠是由磁性材料(如 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 等)及其他基质(主要为高分子材料)构成的具有超顺磁性的复合材料。磁珠表面修饰硅基材料和其他高分子材料(-OH、-NH₂、-SH、-COOH 等),可以赋予磁珠不同的化学及生物活性,又可通过包埋、共聚、接枝等方法赋予其多种功能团^[4]。磁珠可以通过选择性地与靶物质结合,然后通过一个磁场装置,与磁珠结合的靶物质就会被磁场吸附滞留,从而与其他物质分离。

硅基材料修饰的磁珠在不同的盐浓度和 pH 条件下对核酸具有显著差异的亲合力来完成对核酸分离和纯化。磁珠法可以富集和吸附靶分子,并且可以快速地吸附和解离靶分子,表现出灵敏度高^[11]、快速和可重复性等优点。磁珠由于其在电磁场下的可操控性,在高通量筛选的平台中具有广泛的应用前景。

在血液或临床样品的 HBV 和 HCV 的荧光定量 PCR 的检测中,出现假阴性是一个重要的问题。从磁珠上洗脱的 DNA 和 RNA 可以满足 PCR 的高灵敏度^[11]。同时,磁珠法可以减少血液抗凝剂的影响及长时间的保存条件的影响^[2]。磁珠法可以从骨髓、凝血、培养的细胞中提取 DNA 和 RNA,具有很广的适用范围。

本文就磁珠法结合 PCR 方法在检测 HBV、HCV 等方面的应用作了评价。从以上数据可以看出,磁珠法试剂盒可以实现一次提取,同时检出 HBV、HCV,磁珠法提取 HBV-DNA 效率高于离心柱法和煮沸法^[5],磁珠法提取 HCV RNA 效率与离心柱法接近,但都明显高于煮沸法。KNJ kit 磁珠法博日半自动核酸纯化仪作了尝试,已经看到了较好的应用效果。半自动核酸纯化仪的程序设置可以作进一步的优化,以使两者更好地兼容。半自动核酸纯化仪的使用更容易得到推广。因此,磁

珠法可同时检测 HBV 及 HCV 具有很好的应用前景。

参考文献

[1] 阚春月,衣杰荣,王守法,等.免疫磁珠结合 RT-PCR 检测黄瓜绿斑驳花叶病毒[J].上海农业学报,2010,26(4):43-47.

[2] Yancy HF, Mohla A, Farrell DE, et al. Evaluation of a rapid PCR-based method for the detection of animal material[J]. J Food Prot, 2005, 68(12):2651-2655.

[3] Prodelalová J, Rittich B, Spanová A, et al. Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles [J]. J Chromatogr A, 2004, 1056(1-2):43-48.

[4] Idaghdour Y, Broderick D, Korrida A. Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards[J]. Conservation Genetics, 2003, 4(6):789-792.

[5] 李成德,黄晓佳,陈雄毅.不同核酸提取方法在 HBVDNA 荧光定量检测中的比较[J].国际检验医学杂志,2010,31(12):1361-1363.

[6] 胡亮,周家华,余泽前,等.纳米免疫磁珠联合 RT-nest PCR 法检测胰腺癌外周血微转移的敏感度及特异性[J].东南大学学报:医学版,2009,28(4):287-290.

[7] Chui LW, King R, Lu P, et al. Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis by polymerase chain reaction [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004, 48(1):39-45.

[8] 林建军,刘池波,郭仁勇.基于 WCX 纳米磁珠的血清蛋白指纹图谱模型在大肠癌诊断中的应用[J].中国病理生理杂志,2010,26(11):2086-2090.

[9] 孙大成,孙善永,姜曜恒,等.应用自动化工作站批量提取生物检材 DNA [J].法医学杂志,2011,27(1):54-55.

[10] 吕晓革,黄映雪,封宇,等.DNA 数据库建设中批量样品不同 DNA 提取方法的比较[J].中国法医学杂志,2008,23(3):187-189,插 5.

[11] 李成德,岑丽莲,陈金强,等.磁珠分离纯化技术在实时荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 中的应用[J].现代检验医学杂志,2011,26(3):68-71.

(收稿日期:2012-09-04 修回日期:2013-01-06)

(上接第 676 页)

trail of low-pressure carbon dioxide-elicited pneumoperitoneum versus abdominal wall lifting for laparoscopic cholecystectomy[J]. J Chin Med Assoc, 2007, 70(8):324-330.

[5] 韩传宝,周钦海,钱燕宁,等.比较悬吊式与气腹腔镜对妇科手术应激反应的影响及麻醉方式的干预作用[J].中国内镜杂志,2008,14(4):337-340.

[6] 许红兵,高春芳,秦明放.非气腹腔镜技术的临床应用[J].中国微创外科杂志,2005,5(4):276-277.

[7] 张晓波,阮景德,夏征,等.无气腹腔镜在老年人急性胆囊炎中的应用[J].中华老年医学杂志,2004,23(1):50.

[8] 王秋生,刘隆,冀涛,等.非气腹装置的研制与非气腹腔镜手术的临床应用 [J].中国微创外科杂志,2005,5(1):48-50.

[9] 陈琦,陶静茹,尤新民.胆囊切除术中 PHC 对血流动力学、肺内分流和氧合的影响[J].上海第二医科大学学报,2004,24(11):952-954.

(收稿日期:2012-08-02 修回日期:2013-01-05)