

两种核酸提取方法检测血清丙型肝炎病毒核糖核酸的比较

柳明波,李锡燕(广西壮族自治区钦州市第一人民医院检验科 535000)

【摘要】 目的 比较两种不同核酸提取方法检测血清丙型肝炎病毒核糖核酸(HCV-RNA)对临床诊断的应用价值。**方法** 对 128 份 HCV 抗体阳性的患者血清,同时用两种实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)方法检测 HCV-RNA 并检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平,这两种方法分别是用二氧化硅微粒法提取 RNA 和纯化柱法提取 RNA。**结果** 128 份 HCV 抗体阳性的血清中二氧化硅微粒法 HCV-RNA 阳性率 41.41%,纯化柱法 HCV-RNA 阳性率 59.38%,纯化柱法优于二氧化硅微粒法,差异有统计学意义($\chi^2=8.27, P<0.05$)。49 份 HCV 抗体阳性的血清中 ALT 异常,且 ALT 浓度变化与纯化柱法 HCV-RNA 水平呈正相关性($r=0.95, P<0.05$)。**结论** 血清 HCV-RNA 检测对丙型肝炎诊断和病情监测均有重要的临床意义,采用纯化柱法提取 RNA 具有更优的临床价值。

【关键词】 丙型肝炎病毒; 核糖核酸; 聚合酶链反应
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.22.021 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)22-2982-02

Comparing of two methods of nucleic acid extraction for detecting hepatitis C virus RNA in serum LIU Ming-bo, LI Xi-yan (Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Qinzhou, Qinzhou Guangxi Zhuang Nationality Autonomous Region 535000, China)

【Abstract】 Objective To compare the value of two different methods of nucleic acid extraction for detecting serum hepatitis C RNA (HCV-RNA) on the clinical diagnosis. **Methods** Two methods of real-time fluorescence quantitative PCR were applied to detect HCV-RNA in 128 HCV antibody-positive patients, and the alanine transaminase (ALT) level was tested. These two methods were silica particles RNA extraction and RNA purified by column. **Results** In the 128 samples of HCV antibody-positive sera, HCV-RNA positive rate was 41.41% by silica particles RNA extraction, and the rate was 59.38% by using column purification RNA. Purification column method was better than silica particles, and there was significant difference in positive rate ($\chi^2=8.27, P<0.05$). In 49 samples of HCV antibody-positive sera, the ALT level was abnormal, and there was positive correlation between ALT level and HCV-RNA content detected by purification column ($r=0.95, P<0.05$). **Conclusion** Detecting HCV-RNA in serum could be useful for clinical diagnose and therapy effects monitoring, and purification column method is better.

【Key words】 hepatitis C virus; ribonucleic acid; polymerase chain reaction

尽管我国已采用第三代丙型肝炎病毒(HCV)抗体酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂,阳性检出率大大提高,但单纯应用抗-HCV 指标作为丙型肝炎诊断与疗效观察是有其弊端的^[1]。而 HCV-RNA 检测灵敏度高、特异性强具有早期诊断的意义,目前临床已经建立实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测血清 HCV-RNA 方法^[2]。本文对两种不同核酸提取方法定量检测血清 HCV-RNA 的结果进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 1~3 月本院抗-HCV 阳性患者 128 例。

1.2 方法

1.2.1 抗-HCV 检测 采用北京万泰生物药业有限公司生产的抗-HCV 诊断试剂盒进行初检,上海科华生物工程股份有限公司生产的抗-HCV 诊断试剂盒进行复检。

1.2.2 HCV-RNA 定量检测 采用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR),仪器为美国 AB7300 型荧光定量实时 PCR 仪。二氧化硅微粒法提取 RNA 使用中山大学达安基因股份有限公司提供的丙型肝炎病毒核酸扩增荧光检测试剂盒,纯化柱法提取 RNA 使用上海科华生物工程股份有限公司提供的丙型肝炎病毒核酸扩增荧光检测试剂盒。以 HCV-RNA 水平小于 500 copy/mL 作为检测阴性标本。

1.2.3 ALT 检测 日立 7600 型使用全自动生化分析仪检测,正常值小于 40 U/L。

1.3 统计学处理 用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计数资料率的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义;两变量关联性分析采用 Spearman 等级相关的假设检验。

2 结果

2.1 128 份 HCV 抗体阳性的患者血清中,应用二氧化硅微粒法提取 RNA 检测 HCV-RNA 阳性率 41.41%(53/128),应用纯化柱法提取 RNA 检测 HCV-RNA 阳性率 59.38%(76/128),差异有统计学意义($\chi^2=8.27, P<0.05$)。且纯化柱法阳性率高于二氧化硅微粒法。

表 1 ALT 浓度与二氧化硅微粒法 HCV-RNA 水平变化的关系

HCV-RNA 含量 (copy/mL)	<i>n</i>	ALT 均值 (U/L)	ALT 异常 例数(<i>n</i>)	ALT 异常率 (%)
10 ⁷	9	119	9	100.00
10 ⁶	10	121	9	90.00
10 ⁵	7	96	7	100.00
10 ⁴	7	81	6	85.71
500~10 ³	20	75	16	80.00
<500	75	43	2	2.67

2.2 ALT 浓度与两种方法检测 HCV-RNA 水平变化的关系，经相关性分析，ALT 浓度与二氧化硅微粒法 HCV-RNA 水平呈正相关($r=0.74, P<0.05$)，而 ALT 浓度与纯化柱法 HCV-RNA 水平亦呈正相关($r=0.95, P<0.05$)，且纯化柱法 ALT 浓度与 HCV-RNA 水平相关性更好，见表 1、2。

表 2 ALT 浓度与纯化柱法 HCV-RNA 水平变化的关系

HCV-RNA 含量 (copy/mL)	<i>n</i>	ALT 均值 (U/L)	ALT 异常 例数(<i>n</i>)	ALT 异常率 (%)
10 ⁷	17	139	17	100.00
10 ⁶	11	127	10	90.91
10 ⁵	8	96	6	75.00
10 ⁴	12	88	7	58.33
500~10 ³	28	62	8	28.57
<500	52	35	1	1.92

3 讨 论

目前用于 HCV 感染诊断的两项主要指标为抗-HCV 和 HCV-RNA，现多采用的第三代检测抗-HCV ELISA 试剂。试剂增加了 HCV 基因组 NS5 区表达的蛋白作为抗原，进一步提高了试剂的敏感性，但还存在“窗口期”漏检的问题，而 HCV-RNA 检测灵敏度高、特异性强，具有早期诊断的意义^[3-4]。尽管逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 HCV-RNA 具有早期、敏感和特异等特点，但该方法在技术和设备上要求较高，且费时，检出率较低^[5]。

本文采用的两种方法基本原理是先经逆转录酶作用，在特异性引物存在下，将 HCV-RNA 逆转录为单链的 cDNA，再以实时荧光定量 PCR 将 cDNA 扩增。两种方法不同点主要是 RNA 的提取方法不同。用于临床的 HCV-RNA 检测方法中除了本文应用的两种核酸提取方法外还有氯仿-异丙醇法、硫氰胍半字符热酚法、蛋白酶 K 消化法等^[6]。这些核酸提取方法都面临血清病毒浓度低、标本可能被反复冻融、受血细胞和环境 RNA 酶降解的风险。RNA 提取是 HCV-RNA 检测的关键步骤，因此选择高效率的 RNA 提取方法尤其重要^[7]。核酸纯化柱采用硅胶膜作为核酸的特异性吸附材料，可以用于各种材料的 DNA/RNA 的提取以及精制。具有操作简单、回收率高、性能稳定等特点，而对其他生物材料基本不吸附，可以最大程度地保障回收样品中的 DNA/RNA，同时去除其他杂质^[8]。二氧化硅微粒法同样以二氧化硅颗粒作为核酸的吸附材料，但由于其提取过程中分离方法不同，导致最后的效果有差别。核酸纯化柱法加入了 RNA 酶抑制剂，减少了 RNA 降解机会；应用含助沉剂的裂解液更有利于 HCV-RNA 沉淀吸附于离心柱上的硅基质膜，从而减少了 HCV-RNA 的丢失。逆转录与荧光定量 PCR 同在一闭管中进行减少了污染的可能性^[9]。

尽管已有研究报道核酸提取柱法优于氯仿-异丙醇法，但与同为硅类材料吸附的方法提取核酸方法比较少见报道。本实验表明核酸纯化柱法 HCV-RNA 阳性率高于二氧化硅微粒法，且与张言超等^[10]报道的核酸提取柱法阳性率 71.7%(66/92)基本一致。此外本实验研究了 ALT 浓度与 HCV-RNA 水平变化的关系，HCV-RNA 检测对丙型肝炎病情监测也有重要的意义^[11]。核酸纯化柱法 ALT 浓度与 HCV-RNA 水平的相关性要比二氧化硅微粒法更好，从另一个侧面反映核酸纯化柱法具有更好的灵敏度。从表 1、2 中发现，HCV-RNA 阴性病例

中有 ALT 浓度异常的情况，或 ALT 浓度正常病例 HCV-RNA 水平很高。这与丙型肝炎病毒感染的复杂性有关，感染 1~2 周内血清中可检测到 HCV-RNA，在感染自然恢复前，血清中 HCV-RNA 将达到 1 个高峰，但 HCV-RNA 达到峰值或重新出现前数天或数周内偶尔也可能检测不到。大多数向慢性转化的感染者中，HCV-RNA 水平降低速度逐渐减慢，最后趋于稳定，晚期肝病患者的 HCV-RNA 水平很低，甚至无法测出。

总之，为了进一步规范 HCV-RNA 检测，患者应在空腹条件下抽血，及早分离血清和进行检测，避免对标本反复冻融，PCR 整个过程应避免 RNA 酶对标本的降解和模板的污染。

参考文献

[1] 饶慧瑛,管文莉,任芙蓉,等. 丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒的诊断性能评价[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(10):1143-1147.

[2] Zayed RA, Rushdy E, Saleh DA. Detection of HCV RNA in the peripheral blood mononuclear cells of serum HCV RNA-negative Egyptian patients under interferon treatment[J]. Am J Med Sci, 2010, 340(6):435-438.

[3] 杨荣昌. 丙型肝炎病毒抗体两种检测方法的比较[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(3):263-264.

[4] Sarrazin C, Shiffman ML, Hadziyannis SJ, et al. Definition of rapid virologic response with a highly sensitive real-time PCR-based HCV RNA assay in peginterferon alfa-2a plus ribavirin response-guided therapy [J]. J Hepatol, 2010, 52(6):832-838.

[5] 姚根宏, 栾建凤, 朱培元, 等. 丙型肝炎病毒核酸扩增及微流芯片检测方法的建立[J]. 临床输血与检验, 2010, 12(4):289-291.

[6] Kamili S, Drobeniuc J, Araujo AC, et al. Laboratory diagnostics for hepatitis C virus infection[J]. Clin Infect Dis, 2012, 55(Suppl 1):S43-S48.

[7] Elkady A, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. Performance of two real-time RT-PCR assays for quantitation of hepatitis C virus RNA: evaluation on HCV genotypes 1-4 [J]. J Med Virol, 2010, 82(11):1878-1888.

[8] Terrault NA, Pawlotsky JM, McHutchison J, et al. Clinical utility of viral load measurements in individuals with chronic hepatitis C infection on antiviral therapy[J]. J Viral Hepat, 2005, 12(5):465-472.

[9] Miyagi Y, Nomura H, Yamashita N, et al. Estimation of two real-time RT-PCR assays for quantitation of hepatitis C virus RNA during PEG-IFN plus ribavirin therapy by HCV genotypes and IL28B genotype [J]. 2013, 19(1):63-69.

[10] 张言超, 陈明, 李强. 荧光定量 PCR 检测 HCV RNA 两种核酸提取法的比较[J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(5):582-583.

[11] 陈作芬, 曹永平. 丙肝患者治疗前后 HCV RNA 与抗-HCV 及丙氨酸氨基转移酶水平的分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(12):1175-1177.