

研究报告

RT-PCR 检测庚型肝炎病毒的研究

王孝华 王健梅^[1] 林玉兵^[2] 陈禹保^[2] 孙钦喜^[3]

(湖南省临床检验中心, 长沙 410006)

庚型肝炎病毒是 Simmons 等于 1995 年证实的一种非 A-E 型肝炎病毒^[1]。随后在我国也证实有庚型肝炎病毒(HGV)存在^[2]。有资料表明, HGV 在美国供血员中的流行情况较 HCV 严重, 并且与供血员的 ALT 状况无关^[3]。为了有效地控制 HGV 的传染和 HGV 的早期诊断, 我们根据国内外发表的有关序列资料^[1, 4, 5]设计二对引物, 用于巢式 RT-PCR 检测 HGV RNA 的存在与否, 现将结果报告如下。

材料和方法

1. 非甲-戊型肝炎患者血清: 11 例来自长沙市传染病医院的肝炎患者血清, 经检测 A-E 型肝炎感染指标为阴性。HGV 阳性血清来自地坛医院。

2. HGV 引物: 利用分子生物学计算机软包辅助设计, 由中国科学院北京科海医疗生物工程公司 DNA 合成室合成, 引物序列分别为:

外引物: p₁ (Sense) 5 - CGCT - CAAGCCAGCCTAAGCA - 3

p₂ (antisense) 5 - CAAT - ACCTCTCACCGACGGG - 3

内引物: p₃ (Sense) 5 - GGA CTTCGG - GATAGCT - GAAAGCT 3
5 - GCGTCCACAC AGATGGCGCA 3

3. HGV RNA 检测:

(1) HGV RNA 提取: 取 100μl 血清溶于 400μl 科海医疗生物工程公司的 lysis I 中, 充分振荡后, 加 100μl 氯仿, 混匀, 1500rpm 离心 10 分钟, 小心吸取上层水相, 加 3 倍体积的冰冻无水乙醇, - 20 放置 40 分钟, 1500rpm 离心 10 分钟, 弃上清, 沉淀置室温晾干, 然后溶于 5μl 无 RNase 水中, 用于 RT-PCR 反应。

(2) 反转录及第一轮 PCR: 在上述 E_p 管中加 8u AMV, 10 u RNA 酶抑制剂, dNTPs, 外引物及反应缓冲液, 反应体积为 20μl, 于 42 水浴 40 分钟。然后再加 Iu Taq 酶, 离心数秒, 按以下参数 94 45 秒, 55 45 秒, 72 45 秒, 循环 35 次。

(3) 第二轮 PCR: 取第一轮扩增产物 2μl 加入含内引物、dNTPs、Taq 酶及 PCR 缓冲液的 E_p 管中, 按 94 45 秒, 55 45 秒, 72 45 秒, 循环 30 次。于 72 延伸 5 分钟。

(4) 扩增产物检测: 2% 的琼脂糖凝胶在 TBE 缓冲液中 100V 电泳 35 分钟, EB 染色紫外灯下观察结果(见图)

结果与讨论

1. RT-PCR 检测 HGV RNA 的特异性: 对 HBV、HCV 及 HGV 阳性血清分别用我们设计的引物进行 RT-PCR 检测, 只见 HGV 的阳性血清有一条清晰的 170bp 扩增带, HBV、HCV 阳性血清均未扩增出 170bp 带。说明本引

^[1]湖南师大生物系 ^[2]北京科海医疗生物工程公司 ^[3]山东潍坊人民医院

传播,可造成病毒的持续感染,在目前的报道中,这种感染可持续9年之久;而且在各种肝病人中均可检出HGV。因此,建立可靠、灵敏的检测方法,对于控制和预防HGV的传播显得格外重要。RT-PCR方法具有灵敏度高,且特异性强,对于HGV RNA的检测不失为一种好方法,可作为临床检测的有效手段。但在进行RT-PCR实验要注意操作的严谨性,既要避免假阴性,又要避免假阳性,每次实验要设阴性对照,以免造成误诊。

参考文献

- [1] Simmons J N. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995, 92: 3401
- [2] 周育森,王海涛等. 军事医学科学院刊: 1996, 20(2) 160.
- [3] 王佑春, A. Morris 等, 中华微生物及免疫学杂志, 1997, 17(1): 96
- [4] 汪兴太, 庄辉等. 中华微生物和免疫学杂志, 1996, 16(4): 263.
- [5] 周育森, 王海涛, 何玉先等. 微生物通报, 1997, 24(1): 27.
- [6] Leary T. P. et al. J. Med. Virol. 1996. 48: 60.

物设计是特异的可用于临床。

2. 临床标本的检测结果: 11例非甲-戊型肝炎病毒感染的肝炎患者血清, 经RT-PCR检测HGV RNA, 其中有一例为阳性; 其他为阴性, 阳性率为9.09%。

庚型肝炎病毒(HGV)是正链RNA病毒^[6]属黄病毒类。HGV与HCV病毒一样, 是经血

(上接第13页)

- [22] JUDITH A. O. MALLEY et. Molecular Pharmacology 15: 165-173(1978)
- [23] PAUL O. P. T'SO et. Molecular Pharmacology 12: 299-312(1975)
- [24] L. TAZAWA et. J. Mol. Biol. 70: 567-587(1972)

- [25] A. K. FIELD et. Max Tishler, June 5. 1004-1009 (1972)
- [26] FIELD. A. K. et: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 58: 1004 (1967)
- [27] JAMES J. GREENE and WILLIAM A. CARTER et al. Handbook of Experimental Pharmacology Volume Interferons and Their Applications.

Research Development of New Antitumor and Antivirus Material with Low Toxic Side Effect- Mismatched Double-Stranded RNAs

Nie Shijian Hu Dongqin Zhao Hong Luo Wei

(Beijing Research Institute for Nutritional Resources Fungus Engineering Laboratory)

Abstract Double-Stranded RNAs(dsRNA) are inducer of interferon, interleukin-6 and interleukin-2, which can augment human natural killer cell activity and potentiated Lymphokine-activated killer cell activity. But dsRNAs are so diverse as to include those which are considered beneficial such as their immunoadjuvant effects as well as those which are considered toxic such as their pyrogenic effects. Mismatched Double-Stranded RNAs are nontoxic analogues of dsRNAs, which can affect human immune response without side effects. PolyI: PolyC₁₂U is best compared with a lot of Mismatched Double-Stranded RNAs.

Key words Mismatched Double-Stranded RNA Antitumor Antivirus