

# 应用竞争性荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒DNA

刘蓉, 李明远, 张发强, 夏增亮, 闫乃红, 王玲, 卢亦路, 夏庆杰, 陈清英, 卢军, 夏军

刘蓉, 李明远, 四川大学华西基础医学与法医学院微生物学教研室 四川省成都市 610041

张发强, 夏增亮, 闫乃红, 王玲, 卢亦路, 夏庆杰, 四川大学华西分子遗传实验室 四川省成都市 610041

陈清英, 卢军, 夏军, 重庆市涪陵区生殖健康保健中心 重庆市 40800

国家自然科学基金资助课题, No. 39880025

通讯作者: 夏庆杰, 610041, 四川省成都市高新区科园四路1号, 四川大学华西医院分子遗传实验室. xiaqj2005@126.com

电话: 028-81812855 传真: 028-85164005

收稿日期: 2007-01-15 接受日期: 2007-02-08

## Detection of hepatitis B virus DNA by competitive fluorescence quantitative polymerase chain reaction

Rong Liu, Ming-Yuan Li, Fa-Qiang Zhang, Zeng-Liang Xia, Nai-Hong Yan, Ling Wang, Yi-Lu Lu, Qing-Jie Xia, Qing-Ying Chen, Jun Lu, Jun Xia

Rong Liu, Ming-Yuan Li, Department of Microbiology, West China College of Basic Medical Science and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Fa-Qiang Zhang, Zeng-Liang Xia, Nai-Hong Yan, Ling Wang, Yi-Lu Lu, Qing-Jie Xia, Laboratory of Molecular Genetics, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Qing-Ying Chen, Jun Lu, Jun Xia, Reproductive Health Care Center of Fuling District, Chongqing 40800, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39880025

Correspondence to: Qing-Jie Xia, Laboratory of Molecular Genetics, West China Hospital of Sichuan University, 1 Keyuan Fourth Road, High-Tech Development Zone, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. xiaqj2005@126.com

Received: 2007-01-15 Accepted: 2007-02-08

## Abstract

**AIM:** To set up a competitive fluorescence quantitative polymerase chain reaction (CFQ-PCR) for decreasing the false negative ratio in HBV DNA detection.

**METHODS:** According to HBV adr subtype gene, a pair of HBV-specific primer as well as a specific TaqMan probe was synthesized. Based on the above primer sequences, a constructed inner control DNA and an inner TaqMan probe was constructed. Right amount of inner control DNA was added into the HBV FQ-PCR system

for co-amplification with the target HBV DNAs.

**RESULTS:** In a 30-μL CFQ-PCR system, about 20 copies of inner control DNA produced a stable amplification curve. Electrophoresis showed co-amplification products bands as about 100 to 500 copies of inner control DNA were used. In 8 of 210 (4.3%) cases with HBsAg positive in serum, both the inner control DNA and HBV DNA were not amplified, while in 2 of 60 (3.3%) samples with HBsAg negative in serum, the inner control DNA was not amplified. But after purification, all the above cases that failed in amplification succeeded in the inner DNA amplification, of which 7 HBsAg-positive cases succeeded in HBV DNA amplification.

**CONCLUSION:** CFQ-PCR has a big advantage in telling out the false negative result in the HBV DNA PCR assay.

**Key Words:** Hepatitis B virus; Competitive fluorescence quantitative polymerase chain reaction; False negative

Liu R, Li MY, Zhang FQ, Xia ZL, Yan NH, Wang L, Lu YL, Xia QJ, Chen QY, Lu J, Xia J. Detection of hepatitis B virus DNA by competitive fluorescence quantitative polymerase chain reaction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1421-1424

## 摘要

**目的:** 建立竞争性荧光定量聚合酶链反应(CFQ-PCR), 并探讨CFQ-PCR在乙型肝炎病毒(HBV)临床检测中的意义。

**方法:** 根据HBV病毒adr亚型基因组序列合成一对HBV特异的引物, 和一条特异的TaqMan探针; 根据上述引物序列, 采用分子克隆技术制备内对照DNA; 再根据内对照序列合成一条内对照DNA特异的与上述TaqMan探针不同标记的TaqMan探针; 将适量的内对照DNA加入到PCR反应体系中, 使其与HBV靶序列共扩增。

**结果:** 在30 μL CFQ-PCR反应体系中, 加入约20拷贝内对照DNA能够稳定地获得共扩增曲线; 经琼脂糖凝胶电泳分析, 加入约100-500拷

## ■背景资料

建立一种能够精确定量分析, 同时又解决好假阳性问题和假阴性问题, 提高检测的准确性和精确度是当前HBV临床基因检测研究的热点和重点。实时荧光定量PCR能克服常规PCR不能定量的缺点, 也使PCR检测的假阳性问题基本解决, 而竞争PCR使假阴性问题也得到部分解决。

### ■创新盘点

建立了乙型肝炎病毒DNA检测的竞争性荧光定量聚合酶链反应,既能够精确定量分析乙型肝炎病毒DNA拷贝数,同时又解决好假阳性问题和假阴性问题,并在实际临床检测中发挥了预期的效果是本研究的特色。

贝内对照DNA能够有效地获得共扩增产物条带信号;在210个临床HBsAg阳性血清标本的CFQ-PCR扩增中识别出8个未能有效扩增的标本,60份HBsAg阴性血清标本中识别出2个内对照未能有效扩增的标本,后经DNA纯化处理,上述全部标本的内对照均获得阳性扩增结果,其中有7个HBsAg阳性血清标本获得HBV DNA扩增阳性结果。

**结论:** CFQ-PCR能够有效地提示临床标本HBV DNA体外扩增时由于扩增失败导致的假阴性,适合临床推广应用。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 竞争性荧光定量聚合酶链反应; 假阴性

刘蓉, 李明远, 张发强, 夏增亮, 闫乃红, 王玲, 卢亦路, 夏庆杰, 陈清英, 卢军, 夏军. 应用竞争性荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒DNA. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1421-1424 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1421.asp>

## 0 引言

聚合酶链反应(PCR)技术已被广泛用于核酸分析,但普通PCR还存在下面一些缺点:(1)只能给出定性结果,无法给出临床需要的定量结果;(2)由于采用电泳检测PCR扩增产物,易引起PCR产物的交叉污染,增加了假阳性结果的可能性,同时增加了操作的工作程序和时间;(3)采用的染色剂溴乙锭是致癌物,可能危害操作人员及污染环境。而实时荧光定量PCR方法(fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR),由于采用荧光技术和闭管检测,以及能够精确定量待测靶序列的起始拷贝数,克服了前述常规PCR方法的主要缺点,并且随着基因扩增实验室及实验操作的规范化以及检测试剂质量的不断提高,使PCR检测的假阳性问题、定量问题及时效性问题已经基本解决,从而使由于病毒变异、标本质量不一或试剂的使用不当造成的假阴性问题成为提高临床HBV DNA检测准确性所要解决的最重要问题<sup>[1-3]</sup>。为此,我们建立了竞争性荧光定量聚合酶链反应(competitive fluorescence quantitative polymerase chain reaction, CFQ-PCR),并初步验证了其在临床检测HBV血清时指示扩增时产生的假阴性的有效性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 210份HBsAg阳性临床血清和60份HBsAg阴性血清。所用辛酸钠为国产分析纯,PCR试剂购自大连宝生物公司,荧光定量PCR仪

表 1 各种稀释度的内对照DNA的PCR扩增的Ct值

| Ct值 | 内参照DNA拷贝数       |                 |                 |                 |      |      | 阴性对照 |
|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|------|------|
|     | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> | 20   | 5    |      |
| 1   | 24.5            | 28.0            | 31.0            | 35.0            | 37.0 | 39.5 | -    |
| 2   | 24.0            | 28.0            | 31.5            | 35.0            | 36.5 | 39.0 | -    |
| 3   | 24.0            | 27.5            | 31.5            | 35.5            | 37.5 | -    | -    |
| 4   | 24.0            | 28.0            | 31.0            | 35.5            | 37.0 | 40.0 | -    |
| 5   | 24.5            | 28.0            | 31.5            | 35.0            | 37.0 | 38.5 | -    |
| 6   | 24.5            | 27.5            | 32.0            | 35.0            | 37.5 | 39.0 | -    |
| 平均数 | 24.2            | 27.8            | 31.4            | 35.2            | 37.1 | 39.2 |      |

为上海枫岭生物科技有限公司FTC2000型。

**1.2 方法** (1)样本处理. 辛酸钠法: 90 mmol/L辛酸钠水溶液50  $\mu$ L, 加入血清50  $\mu$ L, 充分混匀, 99 $^{\circ}$ C 15 min, 13 000 g离心15 min, 取上清用于扩增;(2)引物. 扩增靶DNA为前C与C区的保守区, 上游引物为P1: 5'-CTACCAAGGTATGTTGCCGTTTGT-3', 下游引物P2: 5'-GTACAGACTTGGCCCCAATAC-3', 产物322 bp, TaqMan探针PR: 5'-FAM-GTTCGTAGGGCTTTCCCCAC-TAMRA-3'; 内对照TaqMan探针: 5'-TEX-CTCCTACCGAGCCTCACGAC-TAMRA-3', 由上海生工生物工程公司合成;(3)制备内对照DNA. 人工合成两条5'端分别与P1、P2相同, 3'端互补的寡核苷酸, 其序列分别为PI1: 5'-CTACCAAGGTATGTTGCCGTTTGTATTGGACTCCTACCGAGCCTCACGAC-3'; PI2: 5'-GAAAGCCCTACGAACCACTGAA ATGTCGTGAGGCTCGGTAGGA-3', 于50  $\mu$ L PCR反应液中[终浓度为250  $\mu$ mol/L dNTP, 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 g/L明胶, 两引物各0.3  $\mu$ mol/L, 1 U Taq酶(PROMEGA公司)]通过PCR(在PE9600上94 $^{\circ}$ C变性2 min后, 94 $^{\circ}$ C 30 s、50 $^{\circ}$ C 60 s、72 $^{\circ}$ C 60 s循环5次, 72 $^{\circ}$ C 5 min)聚合二聚体, 产物序列为5'-CTACCAAGGTATGTTGCCGTTTGTATTGGACTCCTACCGAGCCTCACGACATTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTC-3', 长度75 bp。溴乙锭30 g/L琼脂糖凝胶电泳观察结果并与相对分子质量标准对照回收75 bp条带, 克隆, 大量制备, 紫外分光光度计测定其DNA浓度, 将DNA含量换算成拷贝/ $\mu$ L, 并用TE缓冲液进行稀释成5 $\times$ 10<sup>4</sup>拷贝/ $\mu$ L, 5 $\times$ 10<sup>3</sup>拷贝/ $\mu$ L, 5 $\times$ 10<sup>2</sup>拷贝/ $\mu$ L, 50拷贝/ $\mu$ L, 10拷贝/ $\mu$ L, 2.5拷贝/ $\mu$ L等6个浓度梯度;(4)内对照DNA的PCR扩增及扩增体系灵敏度测

表 2 CFQ-PCR对HBV DNA的检测结果与ELISA检测结果的比较

| 标本        | n   | 内对照阳性数(%)  | HBV阳性数(%)  | CFQ-PCR检测内对照和HBV同时阴性 |                 |           |
|-----------|-----|------------|------------|----------------------|-----------------|-----------|
|           |     |            |            | n(%)                 | DNA重提后CFQ-PCR结果 |           |
|           |     |            |            |                      | HBV阳性数(%)       | 内对照阳性数(%) |
| HBsAg阳性   | 210 | 199 (94.8) | 202 (96.2) | 8 (3.8)              | 7 (87.5)        | 8 (100)   |
| HBsAg阴性对照 | 60  | 58 (96.7)  | 0 (0)      | 2 (3.3)              | 0 (0)           | 2 (100)   |
| 合计        | 270 | 257 (95.2) | 202 (74.8) | 10 (3.7)             | 7 (87.5)        | 10 (100)  |

## ■应用要点

所报道的CFQ-PCR, 能够为乙肝诊断与治疗效果评价和用药指导的临床工作提供更精确可靠的检测结果, 具有较好的推广应用前景。

试. 分别取上述各个稀释度的内对照DNA 2  $\mu$ L, 加入28  $\mu$ L PCR反应液, 各成分的终浓度分别为250  $\mu$ mol/L dNTP, 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 g/L明胶, P1、P2各0.3  $\mu$ mol/L, 1 U Taq酶(PROMEGA公司). 在FTC2000上94℃变性2 min后, 94℃ 20 s、58℃ 30 s、60℃ 60 s, 于60℃时收集荧光, 循环40次, 72℃ 5 min. 观察分析扩增曲线, 读出每一扩增的Ct值。

HBV及内对照的扩增方法: 2  $\mu$ L样本裂解上清液, 2  $\mu$ L内对照(5 $\times$ 10拷贝/ $\mu$ L), 加入16  $\mu$ L PCR反应液, 各成分的终浓度为: 内对照5拷贝/ $\mu$ L, 其余成分同1.5, 于FTC2000(上海枫岭公司)上94℃变性2 min后, 94℃ 20 s、58℃ 30 s、60℃ 60 s循环45次, 最后72℃ 5 min. 溴乙锭琼脂糖凝胶电泳观察结果。

## 2 结果

2.1 在PCR反应体系内只加入不同量的内对照而不加HBV DNA时, 6次重复实验结果显示能够获得稳定的阳性扩增结果的最小内对照拷贝数约为20拷贝(表1)。

2.2 在HBV-PCR扩增体系中加入内对照能够获得共扩增结果, 加入100拷贝内对照对HBV特异性扩增强度无显著影响。

2.3 在60例临床HBsAg阴性血清的CFQ-PCR检测中, 有58例获得了内对照扩增阳性结果, 而HBV全部为阴性; 在210例临床HBsAg阳性血清的CFQ-PCR检测中, 有199例内对照扩增阳性, 202例HBV扩增阳性; 其中有3例HBV扩增阳性而内对照扩增阴性, 且他们HBV扩增的Ct值均小于16; 共有8例内对照和HBV扩增同时阴性。经过对这10例内对照和HBV扩增同时阴性的标本(HBsAg阴性血清2例, HBsAg阳性血清8例)重新提取纯化血清中DNA, 和重新进行CFQ-PCR检测, 则有7例获得HBV扩增阳性, 同时内对照全部为阳性。

## 3 讨论

PCR技术在正常情况下具有极高的灵敏度. 在其应用于临床标本的基因检测的初期, 由于实验室不规范和操作人员技术缺陷等条件的限制, 很容易出现因PCR产物的污染或标本的交叉污染导致的假阳性, 因而人们对PCR检测的假阳性问题非常重视, 并通过建立标准PCR实验室使空气单向流动和操作人员规范的技术培训等进行了有效的控制. FQ-PCR方法的出现更是由于采用完全闭管检测, 不需PCR后处理, 极大的避免了交叉污染和假阳性, 并能够获得精确的定量结果, 对临床诊断和治疗具有了更大的意义. 然而PCR结果假阴性的问题一直未引起人们足够的重视. 部分被检测的临床标本由于含有Taq DNA聚合酶抑制剂或PCR试剂在存放和运输过程活性降低以及DNA扩增仪故障和扩增程序有误等, 都可引起假阴性结果, 但常规PCR和FQ-PCR无法对每一扩增管逐一指示上述环节是否正确. 因为PCR一般是用来做排除性检验, 即若获得PCR结果阴性即认为标本中不含有该种病原体的DNA, 因此, 一旦出现假阴性结果往往导致较严重后果. 最近我们建立了竞争PCR(C-PCR)<sup>[4]</sup>, 能够逐个检测并指示是否出现了可疑的假阴性结果, 但不能很好的定量靶DNA的拷贝数, 以及存在PCR产物后处理时造成污染的可能性, 因而也不能很好的满足临床检测的需要. 本研究建立的竞争性荧光定量聚合酶链反应结合了C-PCR和FQ-PCR的优点, 既解决了检测过程中产生的检测结果的假阴性指示问题, 又能够有效避免PCR产物污染造成的假阳性结果, 还能够定量待测靶DNA的拷贝数, 为临床工作提供更精确可靠的检测结果, 具有较好的推广应用前景。

## 4 参考文献

- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity



## ■同行评价

本文应用竞争性荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒DNA,方法先进,结果可靠,具有实用性。

- of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7276-7280
- 2 黄呈辉. HBV DNA定量检测及临床应用的研究进展. 国外医学·流行病学·传染病学分册 1996; 23: 154-157
- 3 张复春, 吴婉芬, 董惠卿, 蔡晓莉, 魏绍静, 洗超. 定量

聚合酶链反应检测血清中HBV DNA及其临床应用. 中华传染病杂志 1997; 15: 24-27

4 王玲, 杨朋, 李双庆, 许淑惠, 曹桂群, 张发强, 张美霞, 陈清英, 夏庆杰, 刘凯, 唐方, 张远征. 应用竞争聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒DNA. 四川大学学报(医学版) 2004; 35: 858-859

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

## 2007 中西医结合肝胆胰疾病难点与热点论坛

**本刊讯** 由中国中西医结合学会普通外科专业委员会、天津市南开医院主办, 山东省中西医结合学会、青岛市南区人民医院承办, 中国中西医结合临床外科杂志社、世界华人消化杂志协办的2007中西医结合肝胆胰疾病难点与热点论坛定于2007-07-06/08在青岛市召开. 参加会议者可获得国家级 I 类继续教育学分.

## 1 专题讲座

黎沾良(解放军304医院): 外科抗生素的应用; 崔乃强(天津市南开医院): 胆道再次手术的处理方式; 任建安(南京军区总医院): 外科危重病的治疗进展; 大柳治正(日本近畿大学): 外科营养研究新进展; 李强(天津医科大学附属肿瘤医院): 肝癌外科治疗现状; 刘彤(天津医科大学总医院): 胃癌根治术中医药在小肠移植中的应用价值; 刘续宝(四川大学华西医学院): 胰腺癌和慢性胰腺炎的关系; 夏庆(四川大学华西医学院): 重症急性胰腺炎中西医结合临床指南(2007); 齐清会(大连医科大学附属医院): MODS胃肠运动功能障碍和中西医结合治疗; 傅强(天津市南开医院): 通里攻下法对腹部外科MODS的治疗; 马骏(天津医科大学): 科研统计在临床医学中的应用.

## 2 征文内容

(1)肝脏外科: 肝癌的外科治疗、肝内胆管结石的肝切除; (2)胰腺外科: 重症急性胰腺炎、胰腺癌的治疗; (3)胆道外科: 胆石成因研究、胆道再手术经验及中西医结合治疗、医源性胆道损伤及预防、胆道内引流术、十二指肠镜、胆道镜在胆胰外科的应用; (4)微创外科: 微创技术在肝胆胰外科应用.

## 3 征文要求

全文要求4000字以内, 并附600字摘要. 报送会议的文章必须是未公开发表过(包括会议及杂志). 投稿时请附软盘, 用Word软件输入, 注明作者姓名、单位、邮编并加盖公章(或附介绍信). 投稿地址: 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院科研科 沈啸洪, 王洁, 陈玮(收); 邮编: 300100; 或发邮件至nkyykyk@126.com. 截稿日期: 2007-06-10.