

· 临床论著 ·

# 庚型肝炎病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及其在男男同志人群中的应用

刘志英 徐萌 绳波 寇卜心 李甜 陈德喜 吴昊

**【摘要】 目的** 建立庚型肝炎病毒(GBV-C)的实时荧光定量 PCR 检测方法。**方法** 根据 GBV-C 5'-端非编码区序列设计引物及其相应的 TaqMan 探针,构建质粒标准品,建立绝对定量检测方法,分别对 99 份 HIV-1 阳性和 175 份 HIV-1 阴性男男同性恋者标本进行检测。**结果** 建立了绝对定量的参照质粒,标准曲线相关系数为 0.99。99 份 HIV-1 阳性标本中,34 份检测结果为阳性;175 份 HIV-1 阴性标本中,22 份为阳性结果,检测结果线性范围良好,且均与定性巢式 RT-PCR 检测结果一致。**结论** GBV-C 实时荧光定量 PCR 检测方法具有快速、特异性强和稳定性好等优点,为进一步研究 GBV-C 与 HIV-1 共感染对 HIV/AIDS 患者疾病进程的影响提供了一定的技术支持和平台。

**【关键词】** 庚型肝炎病毒;荧光定量聚合酶链反应;男男同志人群

**Establishment of real-time fluorescence quantitative PCR method and the application on GBV-C viral loads detection among MSM people** LIU Zhi-ying, XU Meng, SHENG Bo, KOU Bu-xin, LI Tian, CHEN De-xi, WU Hao. STD&HIV/AIDS Research Laboratory, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: WU Hao, Email: haow99@gmail.com

**【Abstract】 Objective** To develop the quantitative method of GB virus C (GBV-C) by one-step RT-PCR real-time fluorescent. **Methods** Primers were designed according to GBV-C 5'-UTR sequences and the corresponding TaqMan probe. The substrates for standard curve were generated by subcloning the amplicon in a plasmid which contain a 366 bp fragment of 5'-NCR gene of GBV-C. There were 99 plasmal samples with HIV-1 positive and 175 samples with HIV-1 negative from men who had sex with men (MSM) were detected by the established method, respectively. **Results** The absolute quantification of the reference plasmid was constructed and the standard curve correlation coefficient was 0.99. GBV-C specific fluorescent was detected positively among the 99 HIV-1 positive subjects, while 22 samples were positive among the 175 HIV-1 negative subjects. The real-time fluorescent quantitative results were coincident with the qualitative results by nested RT-PCR method. **Conclusions** The real-time fluorescence quantitative method of GB virus C were developed successfully with rapid, high specificity and good stability, which may provide some technical support and platform for the further study on the mechanism of GBV-C and HIV-1 co-infection to the disease progress of patients with HIV/AIDS.

**【Key words】** Hepatitis C virus; Real-time fluorescence quantitative reverse transcription-PCR; Men who have sex with men (MSM)

庚型肝炎病毒 (hepatitis G virus, HGV), 又称 GBV-C, 与 HCV 同属于黄病毒科, 两者核苷酸有

30% 的同源性<sup>[1]</sup>。GBV 一般不引起感染人群肝病或其他疾病, 感染数年后能自动清除。GBV-C 与 HIV 具有相似的感染途径, 大部分是经血液途径、性接触或者母婴传播。在高危人群中存在很高的重叠感染, 如 HIV 感染的人群中 GBV-C 感染率明显高于正常人群, 40% 的 HIV 感染者显示有活跃的 GBV 共感染, 46% 的 HIV 感染者有既往 GBV 感染 (抗-E2 阳性)<sup>[2]</sup>。近年研究显示, HIV 感染者合并感染 GBV-C 可以延缓 HIV 感染的病程, 显著降低 HIV 感染者的病死率<sup>[3-5]</sup>。同时, GBV-C 共感染 HIV-1 同样影响高

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.01.004

基金项目:北京市科委课题项目:男男性接触队列筛查工作模式及 HIV 急性期感染者管理体系研究 (No. D09050703590901); 国家自然科学基金国际 (地区) 合作交流项目 (No. 30910183); 北京市自然科学基金重点项目 (No. 7101005)

作者单位:100069 北京, 首都医科大学附属北京佑安医院性病艾滋病实验室

通讯作者:吴昊, Email: haow99@gmail.com

第一作者:刘志英、徐萌同为第一作者

效联合抗逆转录病毒治疗 (highly active antiretroviral therapy, HAART) 的疗效, 研究显示 GBV 感染 HIV 患者, 基线时 CD4 水平显著高于单一 HIV 感染者; 而病毒载量 (viral load, VL) 显著低于单一 HIV 感染者; HAART 治疗后, 共感染 GBV 者 CD4 增高程度显著高于单一 HIV 感染者, 且 VL 降低<sup>[6]</sup>。

本课题组对前期北京市科委支持的同性恋队列研究中显示, 正常同性恋人群中, GBV-C RNA 阳性率为 13%; 而在 HIV-1 感染者中, 阳性率高达 34%<sup>[7]</sup>。但 GBV-C 共感染 HIV-1 对 HIV 感染者的病毒学和免疫学的影响是通过何种机制发生的, 至今尚无定论。因此, 在对 GBV-C 进行定性检测的同时, 本研究针对 GBV-C 建立了针对 5'-NCR 区的荧光定量 PCR 方法, 为进一步研究 GBV-C 共感染对 HIV-1 感染者疾病进程的研究提供技术支持。

## 资料与方法

### 一、一般资料

研究对象来自北京市科委男男性接触队列, 其中包括 99 例 HIV-1 阳性感染者和 175 例 HIV-1 阴性同志人群, 18 例丙型肝炎病毒 (HCV) 阳性患者, 10 例 HBV 阳性患者, 血浆标本均保存于 -80℃ 冰箱。

### 二、荧光定量 RT-PCR 标准品的构建

1. 含 GBV-C 基因片段阳性质粒的构建: 根据 GenBank 中 GBV-C 核酸参考全序列, 设计针对 5'-NCR 的引物对: 外侧引物正向 HGVF1: 5'-GTGCAAGC-CCCAGAAACCGAC-3', 外侧引物反向 HGVR1: 5'-GGGGCGCAACAGTTTGTGAGG-3'; 内侧引物正向: HGVF2: 5'-ACTGGGTGCAAGCCCCAGAAACC-3', 内侧引物反向: HGVR2: 5'-CTGGTCTTGTCAACTCGCCG-3' (引物均由上海生工生物工程有限公司合成)。获取 5'-NCR 区 366 bp 基因产物片段, 将此 PCR 产物回收后与 pGEM-T Easy 载体进行连接, 转化大肠埃希菌 JM109, 涂布 Amp (+) 琼脂平板, 挑取阳性克隆进行 PCR 和酶切鉴定。将阳性克隆接种到 Amp (+) 的 LB 培养基 (含 Amp 100 mg/L) 中增殖, 37℃ 摇床过夜, 使用质粒小量提取试剂盒提取质粒。

2. 阳性标准品的梯度稀释: 定量标准品的制备, 将含有 GBV-C 5'-NCR 区的质粒用紫外分光光度计测定 260 nm 与 280 nm 波长下的吸光度 (A) 值, 确定质粒的纯度与浓度 ( $A_{260}/A_{280} > 1.8$ ), 然后按照以下公式转换成质粒的拷贝数: 拷贝数 = 质粒浓度  $\times 6.02 \times 10^{23} / (648 \times \text{质粒的总长度})$ 。重组质粒的总长度为 3247 bp, 标准品作 10 倍梯度稀释。得到  $4.6 \times 10^3 \sim 4.6 \times 10^{10}$  拷贝/ml 的 8 个浓度梯度, 以此为模板行实时定量 PCR 检测, 得到标准曲

线, 选取  $10^4 \sim 10^7$  拷贝/ml 浓度梯度作为标准曲线的定量标准。

3. 荧光定量 RT-PCR 引物、探针的设计与合成: 根据 HGV 5'-端非编码区保守序列设计引物: gbv-p1 (5'-AGCGCACGGTCCACAGGTGTT-3'), gbv-p2 (5'-GACATTGAAGGGCGACGTGGA-3'), gbv-probe (5'-FAM-CCCTACCGGTGGGAATAAGGGCCCGACTAMRA-3'), 引物、探针合成均由自 Invitrogen 公司完成。

### 三、GBV-C 感染者标本的定量检测

GBV-C RNA 提取、扩增: 病毒 RNA 提取使用 Qiagen 公司的试剂盒 QIA amp Viral RNA Mini Kit。GBV-C RNA 定量检测采用 One Step RNA PCR Kit (AMV) RT-PCR 法 (TaKaRa, 大连)。25  $\mu$ l 反应体系: 2.5  $\mu$ l RT-PCR buffer (TaKaRa, 大连), 400 nmol/L 的 gbv-p1, 400 nmol/L 的 gbv-p2 和 200 nmol/L 的 gbv-probe。用 ABI Prism 7900HT real-time PCR 仪 (Applied Biosystems) 进行扩增, 反应条件: 50℃ 30 min, 94℃ 2 min, 94℃ 10 s, 60℃ 1 min, 共 40 个循环, 得到各自的 Ct 值。应用 Sequence Detection Systems (SDS2.3) (Applied Biosystems) 软件进行数据分析。

## 结 果

### 一、标准曲线的建立

将质粒作为标准品进行 10 倍倍比稀释, 取 10 个浓度 ( $4.6 \times 10^1 \sim 4.6 \times 10^9$  拷贝/ $\mu$ l) 进行实时定量 PCR 检测。当标准品浓度在  $4.6 \times 10^3 \sim 4.6 \times 10^7$  拷贝/ $\mu$ l 范围时, 扩增曲线均呈 "S" 形, 且标准曲线相关性较好。故建立的 HGV 实时定量 PCR 检测系统的线性范围为  $4.6 \times 10^3 \sim 4.6 \times 10^7$  拷贝/ $\mu$ l。将此 5 个浓度梯度的质粒在 ABI Prism 7900HT 扩增仪上进行扩增, 得到标准曲线  $Y = -2.91X + 39.61$ , 测定值基本在一条直线上, 与相应的 Ct 值具有良好的相关性 (相关系数  $R^2 = 0.99$ ), 见图 1。

### 二、灵敏度和特异度检测

1. 灵敏度检测结果: 当标准品的浓度低至 46 拷贝/ml 时, 实时定量 PCR 检测结果不稳定, 而标准品的浓度为  $4.6 \times 10^2 \sim 4.6 \times 10^8$  拷贝/ml 时, 可得到稳定扩增曲线, 因此, 确定该方法的灵敏度为  $4.6 \times 10^2$  拷贝/ml。

2. 特异度检测结果: 实时荧光定量分析 18 例 HCV 感染者和 10 例 HBV 阳性患者标本反应孔无荧光信号出现, 而 GBV-C RNA 阳性标本则呈阳性反应, 表明该方法具有良好的特异性。

### 三、临床标本检测结果

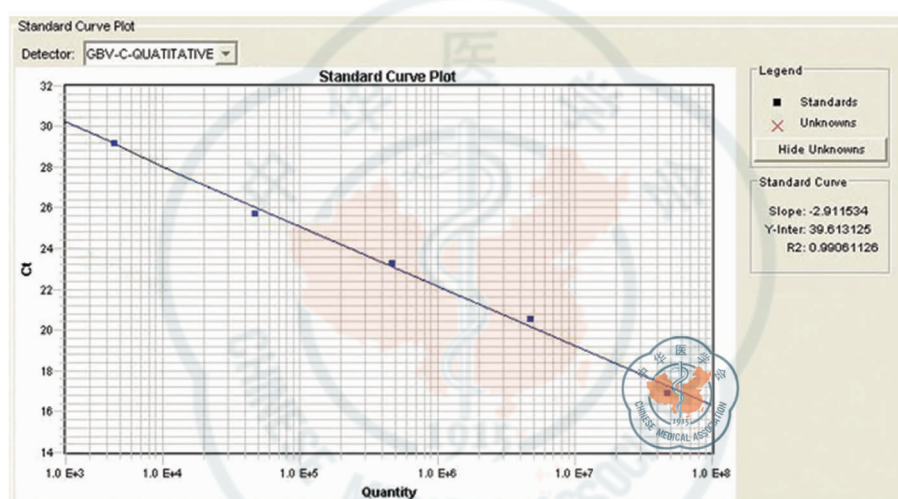
分别对 99 例 HIV-1 阳性同性恋人群和 175 例 HIV-1 阴性男男同性恋人群标本进行定量检测。99

例 HIV-1 感染者中有 34 例呈现特异性荧光反应,定量结果为  $1.62 \times 10^3 \sim 2.82 \times 10^6$  拷贝/ml,均在线性范围内,Ct 值为 17~26。175 份 HIV-1 阴性 MSM 人群标本中有 22 份标本出现 GBV-C 特异性荧光反应,病毒载量为  $2.1 \times 10^3 \sim 3 \times 10^7$  拷贝/ml,其余 153 份标本均无阳性扩增(Ct 值 > 35)。实时荧光定量检测结果与针对 GBV-C 5'-NCR 区域的巢式定性 RT-PCR 结果完全一致,见图 2。

## 讨 论

庚型肝炎病毒(GBV-C)为单股正链 RNA 病毒,呈全球范围分布,人体感染后无明显的肝功能损

害<sup>[1]</sup>。由于 GBV-C 本身并不引起人类肝脏疾病,因而,国内外对于 GBV-C 的研究热情较上世纪 90 年代初刚发现 GBV-C 时一度下降。直至国外一些研究小组发现 GBV-C 共感染 HIV-1 可以显著延缓 HIV-1 感染者的病程,人们对 GBV-C 与 HIV-1 共感染的研究又重新受到重视。研究焦点主要集中在 GBV-C 通过何种机制对 HIV/AIDS 患者的疾病进程产生影响。因 GBV-C 在体内的复制情况,其与 HIV-1 病毒载量、CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞以及高效联合抗逆转录病毒治疗(HAART)疗效等的相关性研究是近期 GBV-C 与 HIV-1 共感染中的研究热点。



注:相关系数  $R^2 = 0.99$

图1 质粒标准品  $4.6 \times 10^3 \sim 4.6 \times 10^7$  拷贝/ $\mu$ l 浓度梯度标准曲线

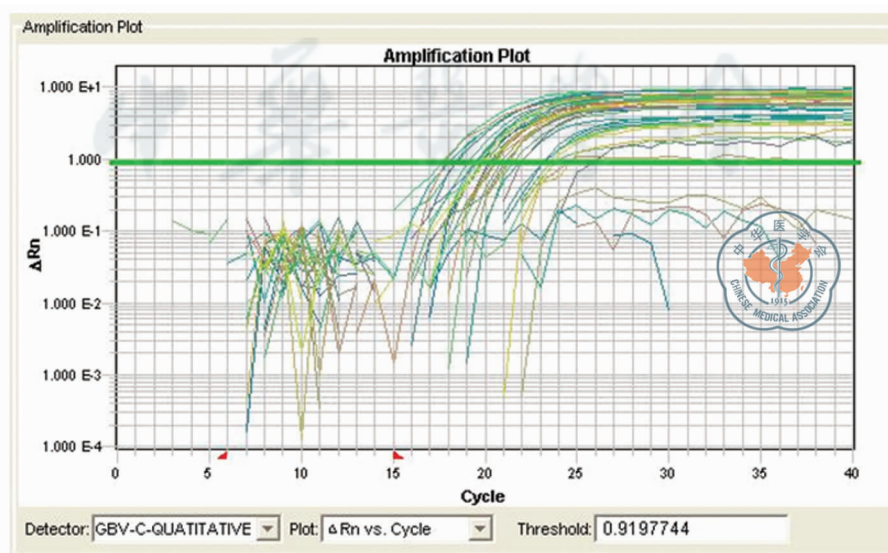


图2 临床标本 GBV-C 实时荧光定量分析检测结果的扩增曲线



GBV-C 的诊断主要依据核酸和抗体检测,GBV-C RNA 阳性意味着活跃的病毒复制及现症感染,而血清中抗-E2 的出现则意味着体内病毒的清除,公认的抗-E2 为保护性抗体<sup>[8]</sup>。已证实 GBV-C 主要分为 5 个亚型,我国流行的亚型主要有 2 型和 3 型,其中以 3 型占多数<sup>[9]</sup>。本研究选取 GBV-C 基因 2 型和 3 型均相对保守的 5'-NCR 区设计引物和荧光探针,定量测定的基因型涵盖范围更宽、更广。本课题组在前期对北京市男男同志人群的 GBV-C RNA 阳性率的研究中,已建立了成熟的基于巢式 RT-PCR 的定性检测方法,针对已确定为 GBV-C RNA 阳性的患者标本,实时荧光定量 RT-PCR 定量检测方法进行 GBV-C 病毒载量测定的结果表明,其与普通巢式 RT-PCR 的定性结果一致,同时具有操作简便,能避免样本间交叉污染的优点,做到了定性、定量兼优的检测功能。

本研究应用实时荧光定量 PCR 技术,实行单轮 PCR 完全闭管式操作,不仅能大大减少扩增产物污染的机会,而且较常规 RT-PCR 技术,敏感性、特异性与检测时间上都更具优势。本试验采用 TaqMan 探针法,依据 GBV-C 5'-端非编码区序列设计引物及其相应的 TaqMan 探针,HGV 5'-端非编码区相对保守,核苷酸序列相对稳定,同时扩增过程中分别加入空白、阴性对照以及一定浓度梯度的阳性对照,保证了试验的特异性和稳定性。采用本方法从核酸提取至完成检测,仅需 3~4 h。检测的线性范围达  $4.6 \times 10^3 \sim 4.6 \times 10^7$  拷贝/ml,满足了一定的检测要求。

但是,GBV-C 实时荧光定量 PCR 检测方法同时受一些因素的影响,诸如模板提取效率、逆转录效率甚至 PCR 扩增仪的性能等都将直接影响结果的准确性。因此,对操作人员需严格要求,加样量一定要准确且重复性好。目前,我国尚无成型的针对 GBV-

C 感染者血浆内病毒载量检测的商用试剂盒,因此,本研究建立的基于实时荧光定量 PCR 的 GBV-C 病毒载量检测方法,对进一步研究 GBV-C/HIV-1 共感染者体内两种病毒是如何相互影响、相互作用,具有重要意义。

## 参 考 文 献

- 1 Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*, 1996, 271 (26): 505-508.
- 2 Heringlake S, Ockenga J, Tillmann HL, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus infected patients? *J Infect Dis*, 1998, 177 (6): 1723-1726.
- 3 Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med*, 2001, 345 (10): 715-724.
- 4 Nunnari G, Nigro L, Palermo F, et al. Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. *Ann Intern Med*, 2003, 139 (1): 26-30.
- 5 Williams CF, Klinzman D, Yamashita TE, et al. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Engl J Med*, 2004, 350 (10): 981-990.
- 6 Rodriguez B, Woolley I, Lederman MM, et al. Effect of GB virus C coinfection on response to antiretroviral treatment in human immunodeficiency virus infected patients. *J Infect Dis*, 2003, 187 (3): 504-507.
- 7 Liu Z, Li L, Chen Z, et al. Prevalence of GB virus type C viraemia in MSM with or without HIV-1 infection in Beijing, China. *Epidemiol Infect*, 2012, 140 (12): 2199-2209.
- 8 Thomas DL, Vlahov D, Alter HJ, et al. Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection. *J Infect Dis*, 1998, 177 (3): 539-542.
- 9 骆嘉拉, 桂希恩, 庄柯. 艾滋患者群中 HCV HBV 及 HGV 的感染状况. *世界华人消化杂志*, 2003, 11 (11): 1835-1837.

(收稿日期: 2012-03-30)

(本文编辑: 孙荣华)

刘志英, 徐萌, 绳波, 等. 庚型肝炎病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及其在男男同志人群中的应用[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2013, 7 (1): 15-18.