

微量全血快速检测乙肝病毒基因亚型

吴 旗 杨季清 尉庭华 唐 芳 曹春明

(武汉市儿童疾病研究所 武汉 430016)

摘要 选用特殊血液标本裂解液,可有效除去血液中对 Taq 酶有抑制作用的物质血卟啉,微量指尖全血标本即可满足检测需要,可取代血清检测 HBV 基因亚型。

关键词 乙型肝炎病毒, 基因, 亚型

分类号 Q93-332, R373. 2 **文献识别码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-03-0203-204

乙肝病毒基因分型技术的出现^[1,2,3],为乙肝更深层次的研究提供了基因水平的技术手段。由于血液中含有抑制 Taq 酶活性的物质血卟啉,血液的检测则需繁琐处理,因此以往的检测方法主要是采用血清作为检测标本。本研究采用特殊裂解液,能快速有效去除血液中血卟啉,检测与用血清检测结果无差异。报告如下。

1 材料和方法

1.1 乙肝病毒基因亚型检测试剂

试剂和方法学来源^[3]由莱博赛实验技术有限公司提供,该试剂盒已申请国家专利。

1.2 血液标本裂解液(Lysis I)

由莱博赛实验技术有限公司提供,该裂解液含有效破坏血卟啉的物质。

1998-03-18收稿, 1998-09-23修回

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.3 HBV-DNA阳性病例选择

选择用血清检测 HBV-DNA 为强阳性, 阳性和弱阳性的病人 56 例, 取其血清和指尖全血进行检测。

1.4 标本处理(均为双份平行)

血清标本: 按莱博赛实验技术有限公司提供试剂盒的操作说明处理。

指尖全血: 用莱博赛实验技术有限公司提供裂解液, 按操作说明处理, 同时用普通裂解液(含 0.45%NP-40和 0.45%Tween20)处理和生理盐水处理作对照。

1.5 不同指尖血量的检测

分别取 5, 10, 20, 40 μL 指尖血各 10 份, 用莱博赛实验技术有限公司提供的血液标本裂解液, 按操作说明处理。

1.6 HBV 基因亚型检测

按莱博赛实验技术有限公司提供试剂盒的操作说明, 进行 HBV 扩增酶切和鉴定亚型。

2 结果和讨论

2.1 不同量指尖血 HBV-DNA 扩增结果

不同指尖血量对扩增的影响研究显示(表 1), 5μL 指尖血只有 75%(6 / 8) 的阳性可被检出, 漏检率达 25%; 10μL 到 40μL 指尖血阳性检出率则可达到 100%, 与用血清检测结果一致。笔者认为在检测中以取 10μL 或 20μL 指尖血量为宜, 这样既保证检测的灵敏度, 又可有足够的标本便于复查备用。

表1 不同指尖血量HBV DNA扩增的结果

标本编号	血清检测	指尖全血量			
		5μL	10μL	20μL	40μL
1	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-
3	+	-	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+

2.2 56 例病人血清和指尖血标本 HBV 基因亚型的检测结果

使用指尖血作为检测标本采集方便, 病人

特别是婴幼儿病人易接受, 同时适宜大批量流行病学标本检测。但这一方法使用时关键是要消除血液中 Taq 酶抑制物血卟啉的作用。选择能有效清除血卟啉的裂解液(Lysis I), 指尖血已成功应用到 PCR 检测 HBV DNA, 本研究将这种裂解液应用于指尖血检测乙肝病毒基因亚型; 从表 2 中可见, 检测结果与血清法一致, 而指尖血用生理盐水处理则有 32.1% 的标本漏检, 普通裂解液(Lysis II) 的漏检率也达到 17.9%。普通裂解液处理指尖血漏检率较高的原因, 主要是普通裂解液消除血卟啉抑制作用较差, 由于 Taq 酶的作用受到抑制, 扩增时其效率已大为降低, 电泳时的产物片段荧光信号强度减弱许多, 加之酶消化切割后荧光信号进一步减弱, 使得本可以进行亚型分析的低病毒滴度标本不能检测, 因此在采集指尖微量全血分析乙肝基因亚型时, 必须选择理想的裂解液以促证检测结果的准确性和灵敏度。研究结果表明: 微量指尖血用该裂解液(Lysis I) 处理可以代替血清检测乙肝基因亚型, 而普通裂解液和生理盐水处理指尖血则不能取代血清检测。

表2 两种标本HBV基因亚型检测结果

亚型	血清检测	指尖微量血		
		生理盐水	裂解液I	普通裂解液
I	52	37	52	43
II	3	1	3	2
III	1	0	1	1
合计	56	38 p>0.05	56 p<0.05	46 p>0.05

致谢 本研究工作得到了北京美迪科生物技术有限公司陈禹保博士的协助, 特此致谢。

参 考 文 献

[1] Norder H, Hammas B, Magnius L O. Gastroenterology, 1991, 100: 175.

[2] Cheung L C, Shih J W K, Alter H J, et al. Application of PCR for HBV Subtyping. In: Hollinger F B, Lemon S M, Margo I H. Viral Hepatitis and Liver Disease. Williams Wilkins. 1990, 229-231.

[3] 曾 真, 李沛涛, 邹若楠等. 湖南医科大学学报. 1994, 19(6): 483~486.

[4] 林万明. PCR 技术操作和应用指南. 北京: 人民军医出版社. 1993, 448, 456.