

## 实时荧光定量检测 HCV RNA 含量的临床意义

张冬雷, 施健, 崔之础, 王惠民, 鞠少卿, 李立人, 倪红兵, 苏建友

张冬雷, 施健, 崔之础, 南通大学附属医院酶学研究室 江苏省南通市 226001

王惠民, 鞠少卿, 倪红兵, 苏建友, 南通大学附属医院检验医学中心 江苏省南通市 226001

李立人, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001

张冬雷, 男, 1976-01-21 生, 江苏省南通市人, 汉族, 分子生物学专业硕士研究生, 讲师, 主要从事病毒和肿瘤免疫学研究。

项目负责人: 崔之础, 226001, 江苏省南通市西寺路 20 号, 南通大学附属医院酶学研究室. zdonglei@yahoo.com.cn

电话: 0513-5052483 传真: 0513-5052102

收稿日期: 2004-11-01 接受日期: 2004-11-12

### Clinical significance of HCV RNA loads quantified by real-time fluorescence quantitative reverse transcription-PCR

Dong-Lei Zhang, Jian Shi, Zhi-Chu Cui, Hui-Min Wang, Shao-Qing Ju, Li-Ren Li, Hong-Bing Ni, Jian-You Su

Dong-Lei Zhang, Jian Shi, Zhi-Chu Cui, Enzymological Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Hui-Min Wang, Shao-Qing Ju, Hong-Bing Ni, Jian-You Su, Center of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Li-Ren Li, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhi-Chu Cui, Enzymological Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. zdonglei@yahoo.com.cn

Received: 2004-11-01 Accepted: 2004-11-12

### Abstract

**AIM:** To establish real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RFQ-RT-PCR) for quantification of HCV RNA, and to explore the relationship between HCV RNA loads and disease progress.

**METHODS:** A total of 80 patients with anti-HCV positive were studied, including 39 with chronic hepatitis, 23 with liver cirrhosis and 18 with hepatocellular carcinoma. Forty samples from blood donors were used as normal controls. The specific primers and hybridization probes were designed in 5' untranslated region of HCV genome, and the corresponding gene fragment was cloned into pGEM-T vector to gain the RNA standards *in vitro*. According to the curve created based on RNA standards, serum HCV RNA was quantified by RFQ-RT-PCR, and was also qualified by nested RT-PCR simultaneously.

**RESULTS:** The detected range of HCV RNA by RFQ-RT-

PCR was from  $10^{12}$  to  $10^4$  copies/L, and the coefficient of variation values for both intra-experimental and inter-experimental reproducibility ranged from 1.68%, 6.40% to 5.97%, 10.58%, respectively. The mean loads of HCV RNA in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients were significantly higher than those in chronic hepatitis patients ( $7.75 \pm 0.29$ ,  $7.86 \pm 0.32$  vs  $4.67 \pm 0.41$ ,  $P < 0.05$ ), and there was also a positive correlation between HCV RNA loads and ALT level ( $r = 0.89$ ,  $t = 8.29$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** RFQ-RT-PCR assay has good sensitivity and specificity in detection of HCV RNA loads, and HCV RNA loads may be associated with the progress and severity of disease state.

**Key Words:** HCV RNA loads; Real-time fluorescence quantitative reverse transcription-PCR

Zhang DL, Shi J, Cui ZC, Wang HM, Ju SQ, Li LR, Ni HB, Su JY. Clinical significance of HCV RNA loads quantified by real-time fluorescence quantitative reverse transcription-PCR. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(1):39-43

### 摘要

**目的:** 建立实时荧光定量RT-PCR(RFQ-RT-PCR)检测HCV RNA含量的方法, 初步探讨HCV RNA含量变化与病情的相关性。

**方法:** HCV 抗体阳性样本 80 例, 包括慢性肝炎(CH) 39 例, 肝硬化(LC) 23 例, 肝癌(HCC) 18 例, 献血员样本 40 例为正常对照。在 HCV 基因组 5' 非编码区(5' UTR)设计特异性引物和一对杂交探针, 构建相应基因片段载体, 体外转录 RNA 作为标准品, 根据其建立的标准曲线对血清 HCV RNA 进行定量, 同时用传统的套式 RT-PCR 进行定性分析。

**结果:** 本法检测 HCV RNA 含量的线性范围为  $10^{12}$ – $10^4$  copies/L, 批内和批间重复性测定的  $v$  分别为 1.68–5.97% 和 6.40–10.58%。在 HCV 抗体阳性患者中, 肝硬化和肝癌患者的 HCV RNA 含量显著高于慢性肝炎患者 ( $7.75 \pm 0.29$ ,  $7.86 \pm 0.32$  vs  $4.67 \pm 0.41$ ,  $P < 0.05$ ), 而且 HCV RNA 含量与 ALT 水平呈正相关 ( $r = 0.89$ ,  $t = 8.29$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** RFQ-RT-PCR 检测 HCV RNA 含量具有较好的灵敏度和特异性, 其含量与丙型肝炎患者的病情变化及严重程度有一定相关性。

**关键词:** HCV RNA 含量;实时荧光定量检测

张冬雷, 施健, 崔之础, 王惠民, 鞠少卿, 李立人, 倪红兵, 苏建友. 实时荧光定量检测 HCV RNA 含量的临床意义. 世界华人消化杂志, 2005;13(1):39-43  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/39.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)属黄病毒家族的正链RNA病毒,是引起输血后肝炎的主要病原之一,常呈无症状的持续感染,约60%的感染者会演变成肝硬化和肝癌,而且与肝脏脂肪变、糖代谢紊乱有关<sup>[1-17]</sup>. HCV 抗体检测已不能用来作为评价疾病预后和判断抗病毒治疗效果的指标,而病毒含量能真实反映其在体内的复制情况,高滴度病毒含量患者对治疗的反应不敏感,而且疗程也较长<sup>[18-19]</sup>,因此对血清中 HCV RNA 进行定量就显得十分重要,将有助于判断疾病预后,选择治疗方案及监测治疗效果等. 我们利用荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)原理,在 HCV 基因组 5' 非编码区(5' UTR)区设计特异的引物和一对杂交探针,建立了实时荧光定量(real-time fluorescence quantitative RT-PCR, RFQ-RT-PCR)方法,并分析了 80 例临床样本 HCV RNA 含量如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院传染科和南通市传染病医院住院 ELISA 测得 HCV 抗体阳性样本 80 例,包括慢性肝炎(chronic hepatitis, CH)39 例,肝硬化(liver cirrhosis, LC)23 例,肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)18 例. 正常对照为我院输血科献血员样本 40 例. 血清于抽血后 1 h 内分离,分装置 -70℃ 保存. pGEM-T 载体、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ (*E. Coli* DH5 $\alpha$ )、Trizol 购自 Invitrogen 公司,胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒为上海华舜生物工程公司产品, IPTG, X-gal, AMV, dNTPs, pfu DNA 聚合酶购自 Promega 公司,体外转录试剂盒、毛细管由 Roche 公司提供, Onmascript 逆转录试剂盒为 QIAGEN 公司产品. 根据 HCV 全序列<sup>[20]</sup>(注册号 AB114136),应用 Beacon Designer 2.1 软件,设计如下引物和探针,并由上海生工生物工程公司合成. HCV-S:5' -AACTACTGTCTTCACGCAGAAAGC-3' (nt52-nt75); HCV-AS:5' CCCTATCAGGCAGTACCACAAG-3' (nt300-nt279); HCV-P1:5' GCAGCCTCCAGGACCCCC-Fluorescein-3' (nt106-nt124); HCV-P2:5' -LC Red 640-CCCGGAGAGCCATAGTGGTCTG-3' (nt127-nt149).

**1.2 方法** Trizol 法(按说明书操作)提取血清 HCV RNA,核酸蛋白紫外分析仪(Eppendorf 公司)检测 RNA

的质量和浓度,并进行逆转录反应,体系含(1 $\times$ RT Buffer, 0.5 mmol/L dNTPs, 1  $\mu$ mol/L oligo-dT 引物, RNase 抑制剂 10 U, RT 酶 4 U), 37℃ 1 h, 65℃ 15 min 灭活逆转录酶, cDNA 置 -20℃ 保存. 取上述 cDNA 2  $\mu$ L, 用引物 HCV S 和 HCV AS, 于 PE9600 进行 PCR 扩增目的片段. 经胶回收的 PCR 电泳产物 3  $\mu$ L (约 20 ng) 与 pGEM-T 载体 4℃ 连接 12-16 h. 连接产物转化感受态 *E. Coli* DH5 $\alpha$ , 涂布于含 X-gal 和 IPTG 并具 Amp 抗性的 15 g/L 琼脂皿上, 37℃ 倒置培养 12-16 h, 经蓝白斑筛选, *EcoR* I 酶切初步鉴定, 阳性克隆进行测序分析(由上海博亚公司完成). 将筛选出的阳性菌株进一步扩增, 抽提质粒, *Sac* I 酶切使质粒线性化, T7 RNA 聚合酶体外转录 cRNA(按试剂盒说明书操作), 37℃ 2 h, DNase I 消化 15 min, 0.2 mol/L EDTA 终止反应, 纯化后用核酸蛋白紫外分析仪准确定量(连续测定 5 次, 每次重复 4 管, 取均值), 并进行 10 倍系列稀释, 分装做为 HCV RNA 定量标准品 -20℃ 保存. 套式 PCR 定性检测临床样本 HCV RNA 方法参见文献[21]. 临床样本血清 HCV RNA 含量测定:血清 100  $\mu$ L, Trizol 法提取 HCV RNA. 将 RNA 模板 2  $\mu$ L 加入 RT-PCR 反应液(含 1 $\times$ PCR Buffer, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTPs, HCV 上下游引物各 0.2  $\mu$ mol/L, HCV-P1、HCV-P2 荧光探针各 0.1  $\mu$ mol/L, 0.5 g/L BSA, AMV 10 U, pfu DNA 聚合酶 1 U) 18  $\mu$ L, 混匀后加入 Roche 专用毛细管中, 并设空白管、阴性对照和 HCV RNA 6 个标准品对照(浓度分别为 10<sup>11</sup>、10<sup>10</sup>、10<sup>9</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>6</sup> copies/L). 各反应管于 Roche 荧光定量检测仪(Lightcycler)进行 RT-PCR 扩增:42℃ 25 min, 93℃ 预变性 2 min, 然后 93℃ 5 s, 60℃ 10 s, 72℃ 10 s, 温度转换率为 20℃/s, 共 45 个循环. 根据 HCV RNA 标准品建立的标准曲线, 由软件自动计算出待测样本中 HCV RNA 的准确含量.

**统计学处理** 应用 STATA 7.0 统计分析软件对样本数据进行 *t* 检验, 并变异系数(*v*), 所得结果表示为均数  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD), 显著性差异的概率设为 *P* < 0.05.

## 2 结果

**2.1 RFQ-RT-PCR 的建立** 以 RNA 标准品为模板, HCV S、HCV AS 为引物, 经 Lightcycler 扩增应得 249 bp 长的目的片段, 经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示扩增出的目的片段大小与预期值相符合(图 1). 经胶回收的 PCR 电泳产物与 pGEM-T 载体连接后, 转化感受态 *E. Coli* DH5 $\alpha$ , 获得重组质粒, *EcoR* I 酶切初

步鉴定(图2), 并经测序证实与NCBI的基因序列完全一致. 将HCV RNA标准品10倍系列稀释, 用建立的荧光定量PCR测定, 结果(图3)显示本法的线性范围为 $10^{12}$ – $10^4$ copies/L, 具有较好的检测灵敏度. 标准曲线显示Ct(threshold cycle)值和模板起始浓度的log值之间具有较好的线性关系(slope = 3.52,  $r = 1.00$ ). 将系列稀释的HCV RNA标准品, 用荧光定量PCR重复测定10次, 每次每个稀释度重复3管, 结果(表1)显示本法的批内和批间重复性均较好,  $v$ 分别为1.68–5.97%和6.40–10.58%.

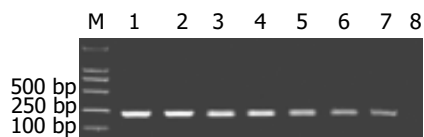


图1 电泳检测PCR扩增产物. M: DL2000 marker; 1–7:  $10^{12}$ – $10^6$ copies/L; 8: Negative control.

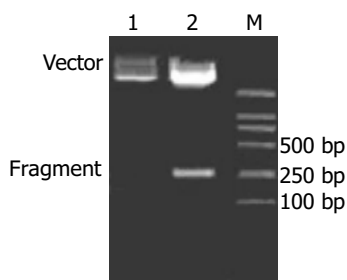


图2 重组质粒酶切鉴定. M: DL2000 marker; 1: Recombinant vector; 2: Recombinant vector/inserted fragment.

表1 RFQ-RT-PCR的批内和批间重复性测定

RNA Standard (copies/L)	Intraexperimental Variability			Interexperimental Variability		
	$\chi^2$ (log)	SD	$v$ (%)	$\chi^2$ (log)	SD	$v$ (%)
$10^{11}$	8.21	0.39	4.75	8.14	0.61	7.49
$10^{10}$	7.03	0.18	2.56	7.11	0.57	8.02
$10^9$	5.95	0.10	1.68	6.09	0.39	6.40
$10^8$	4.98	0.09	1.81	5.17	0.42	8.12
$10^7$	4.12	0.15	3.64	4.23	0.38	8.98
$10^6$	3.18	0.19	5.97	2.93	0.31	10.58

表2 临床样本检测结果(mean±SD)

分组	$n$	Nested RT-PCR		RFQ-RT-PCR	
		Positive $n$ (%)	Positive $n$ (%)	Mean HCV RNA load(Log)	
CH	39	38(97.4)	37(94.9)	4.67±0.41	
LC	23	22(95.7)	21(91.3)	7.75±0.29 <sup>a</sup>	
HCC	18	18(100)	18(100)	7.86±0.32 <sup>a</sup>	

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs CH.

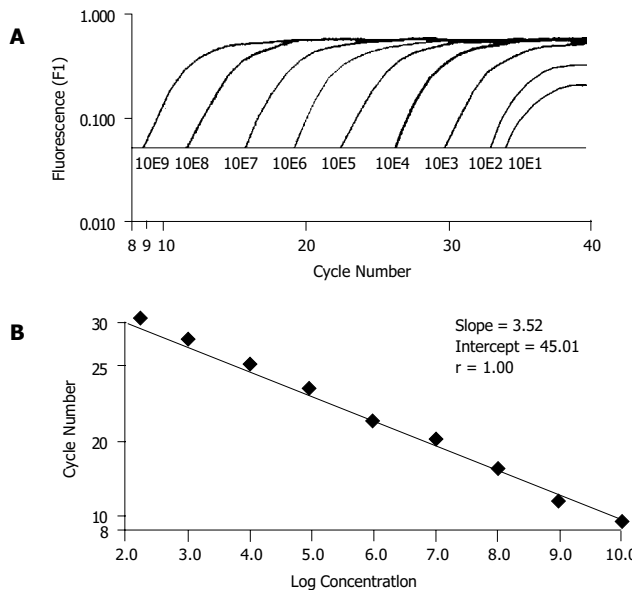


图3 RFQ-RT-PCR灵敏度测定. A: The detection limit of RFQ-RT-PCR was  $10^4$  copies/L; B: The linear relation between cycle and log concentration of HCV RNA was showed by standard curve ( $r = 1.00$ ).

2.2 临床样本检测 用套式PCR和荧光定量PCR检测, 献血员40例样本结果均为阴性, HCV抗体阳性LC和HCC患者HCV RNA含量均显著高于CH( $P < 0.05$ , 表2), 提示HCV RNA含量可能与病情严重程度有一定关联. 对20例患者进行了随访, 分别于住院日(0 d)和住院后5 d, 15 d, 30 d, 60 d, 90 d检测肝功能(以ALT为主要观察指标)和HCV RNA含量, 结果提示, HCV RNA含量与病情(ALT水平)呈正相关( $r = 0.89$ ,  $t = 8.29$ ,  $P < 0.05$ , 图4).

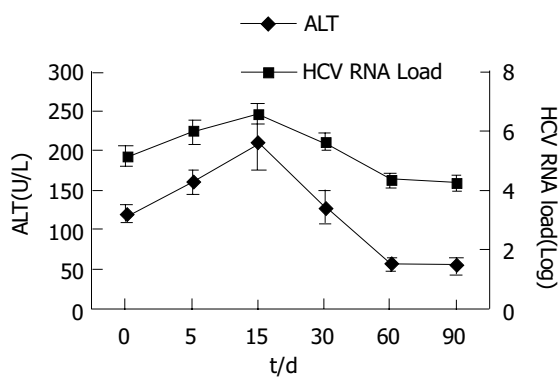


图4 HCV RNA 含量与 ALT 相关性。

### 3 讨论

HCV 是输血后非甲非乙型肝炎的主要病原, 85% 感染者病情趋于慢性化, 有一部分演变成肝硬化甚至肝癌<sup>[1-12]</sup>, 是严重威胁人民健康的传染病之一。目前, HCV 抗体检测已成功应用于临床, 并在发现慢性 HCV 感染者方面发挥了巨大作用, 但在 HCV 急性感染后, 出现血清转换前的窗口期, 抗体检测可能是阴性, 而且直接检测 HCV 抗原的免疫测定目前还没有。HCV 的两个主要病毒标志 - HCV 基因型和病毒含量有助于对疾病预后和抗病毒药物的疗效观察<sup>[22-23]</sup>。因此, 对 HCV 进行定量, 有助于真实了解体内病毒复制情况, 对临床诊断, 判断预后, 合理用药都有巨大指导意义。基于分枝 DNA (bDNA) 技术建立起来的 HCV 定量方法, 因其具有较好的准确性和重复性, 而被临床广泛采用, 但其敏感性较低<sup>[24-25]</sup>。RT-PCR 法检测 HCV RNA 技术操作繁琐耗时; 产物必须经电泳或杂交 (southern, ELISA) 检测, 容易引起交叉污染而出现假阳性; PCR 产物量易受到反应体系中其他成分浓度的影响, 定量不准确, 重复性较差<sup>[26-30]</sup>。我们根据荧光共振能量转移 (FRET) 基本原理, 结合 PCR 技术高灵敏的优点, 在 HCV 高度保守的 5' UTR 区设计了一对杂交探针, 建立了实时定量检测 HCV RNA 含量的方法, 与 Taqman 定量方法相比灵敏度相当, 特异性更好, 避免了 HCV 基因型不同对定量检测结果的影响<sup>[31]</sup>。将 PCR 的敏感性与探针杂交的特异性相结合, 在很大程度上改变了传统 PCR 的缺陷, 降低了反应时间, 简化了操作步骤; 闭管检测不需 PCR 后处理, 避免了由于样本间的交叉污染引起的假阳性和环境污染; 实时检测技术可连续不断地检测 PCR 过程中荧光信号的变化, 避免了传统 PCR 的“平台期效应”; 使用的 RNA 标准品与模板 RNA 一起进行 RT-PCR, 消除了逆转录反应对定量结果的影响, 而且对模板的定量不通过终产物, 而由 Ct 值计算出, 准确性和灵敏度均有提高。对 80 例临床样本和 40 例献血员样本的检测结果显示, 本法与套式定性 PCR

阳性率相当, 适合临床应用; 初步研究结果还提示 HCV RNA 含量可能与丙型肝炎患者的病情变化及严重程度有一定相关性, 这将有助于临床判断 HCV 感染病情和疾病预后、选择治疗方案及监测抗病毒治疗效果等, 为进一步探讨 HCV RNA 含量与临床表现、生化改变及组织病理关系的研究奠定了基础。

### 4 参考文献

- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26 (Suppl 1):62S-65S
- Colombo M. The role of hepatitis C virus in hepatocellular carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:337-344
- Moriguchi H, Uemura T, Kobayashi M, Chung RT, Sato C. Management strategies using pharmacogenomics in patients with severe HCV-1b infection: a decision analysis. *Hepatology* 2002;36:177-185
- Younossi ZM, Singer ME, McHutchison JG, Shermock KM. Cost effectiveness of interferon alpha2b combined with ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1999;30:1318-1324
- Kowala-Piaskowska A, Figlerowicz M, Mozer-Lisewska I, Mazur-Melewska K, Pawelek T, Sluzewski W. Vertical transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatol Res* 2004;30: 137-140
- Zeuzem S, Heathcote EJ, Shiffman ML, Wright TL, Bain VG, Sherman M, Feinman SV, Fried MW, Rasenack J, Sarrazin C, Jensen DM, Lin A, Hoffman JH, Sedarati F. Twelve weeks of follow-up is sufficient for the determination of sustained virologic response in patients treated with interferon alpha for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2003;39:106-111
- Neumann UP, Berg T, Bahra M, Seehofer D, Langrehr JM, Neuhaus R, Radke C, Neuhaus P. Fibrosis progression after liver transplantation in patients with recurrent hepatitis C. *J Hepatol* 2004;41:830-836
- Kasuno K, Ono T, Matsumori A, Nogaki F, Kusano H, Watanabe H, Yodoi J, Muso E. Hepatitis C virus-associated tubulointerstitial injury. *Am J Kidney Dis* 2003;41:767-775
- 陈嵩, 王宇明. 丙型肝炎病毒包膜区变异与感染慢性化关系的初步研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2002;16:219-222
- Hui CK, Belaye T, Montegrando K, Wright TL. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003;38:511-517
- Fang CT, Tobler LH, Haesche C, Busch MP, Phelps B, Lepar G. Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor. *Transfusion* 2003;43:541-544
- Sunagawa H, Takayama H, Yamashiro T, Sasaki H, Sashida Y, Matsuura K, Kayou M. Hepatocellular carcinoma in a patient with primary biliary cirrhosis and seronegativity for markers of hepatitis B virus and hepatitis C virus: report of a case. *Surg Today* 2003;33:219-223
- 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:999-1003
- 李莉, 成军, 李梵, 王建军, 张健, 吴勤, 韩萍, 陈国凤, 纪冬, 李克. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的临床与病理学特点. *世界华人消化杂志* 2002;10:1009-1013
- 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:125-128
- McCaughan GW, George J. Fibrosis progression in chronic hepatitis C virus infection. *Gut* 2004;53:318-321
- Ryder SD, Irving WL, Jones DA, Neal KR, Underwood JC. Trent hepatitis C study group. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut* 2004;53:451-455
- Walsh KM, Good T, Cameron S, Thorburn D, McCrudden EA, Mills PR, Morris AJ. Viral kinetics can predict early response to alpha-interferon in chronic hepatitis C. *Liver* 1998;18:191-195

- 19 Wiley TE, Briedi L, Lam N, Layden TJ. Early HCV RNA values after interferon predict response. *Dig Dis Sci* 1998;43:2169-2172
- 20 Date T, Kato T, Miyamoto M, Zhao Z, Yasui K, Mizokami M, Wakita T. Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J Biol Chem* 2004;279:22371-22376
- 21 杜绍财, 魏来, 陶其敏, 冯百芳, 朱凌, 刘金祥. 丙型肝炎病毒RNA非结构区套式聚合酶链反应. *中华医学检验杂志* 1996;19:354-357
- 22 Mondelli MU, Silini E. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol* 1999;31(Suppl 1):65-70
- 23 Hoofnagle JH. Management of hepatitis C: current and future perspectives. *J Hepatol* 1999;31(Suppl 1):264-268
- 24 Ichijo T, Matsumoto A, Kobayashi M, Furihata K, Tanaka E. Quantitative measurement of HCV RNA in the serum: a comparison of three assays based on different principles. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:500-506
- 25 Hofgartner WT, Kant JA, Weck KE. Hepatitis C virus quantitation: optimization of strategies for detecting low-level viremia. *J Clin Microbiol* 2000;38:888-891
- 26 Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW, Bonino F, Saracco G, Lee C, Rosenblatt J, Choo QL, Houghton M. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990;335:1-3
- 27 Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* 1996;334:1685-1690
- 28 Roggendorf M, Lu M, Meisel H, Riffelmann M, Schreiber E, Viazov S. Rational use of diagnostic tools in hepatitis C. *J Hepatol* 1996;24(2 Suppl):26-34
- 29 Olmedo E, Costa J, Lopez-Labrador FX, Fornis X, Ampurdanes S, Maluenda MD, Guilera M, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Jimenez de Anta MT. Comparative study of a modified competitive RT-PCR and Amplicor HCV monitor assays for quantitation of hepatitis C virus RNA in serum. *J Med Virol* 1999;58:35-43
- 30 Mayerat C, Burgisser P, Lavanchy D, Mantegani A, Frei PC. Comparison of a competitive combined reverse transcription-PCR assay with a branched-DNA assay for hepatitis C virus RNA quantitation. *J Clin Microbiol* 1996;34:2702-2706
- 31 Martell M, Gomez J, Esteban JI, Sauleda S, Quer J, Cabot B, Esteban R, Guardia J. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 1999;37:327-332

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

### 欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物, 可作为理工科研究生的教学用书或自学教材, 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍, 介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求. 从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则 - 准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity), 分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写, 举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 结合实例举证, 从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达, 较为详尽地总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。

本书论述缜密、案例丰富. 为方便读者进一步追溯和研读相关资料, 书中按章节形式标引了参考文献约 220 篇(次)。

编著: 任胜利, 理学博士, 《自然科学进展》责任编辑, 1998 年以来先后在 Science, Nature, Scientometrics, Learned Publishing, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文 30 余篇. 出版: 科学出版社. 定价: 28 元 + 2 元(邮费). 邮购地址: 100085, 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室, 北京市海淀区双清路 83 号. 联系人: 刘俐, 程宇. 联系电话: 010-62327204; 传真: 010-62326921. 开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行 开户名: 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社, 帐号: 0200010009200062483. (国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)