

· 基础研究 ·

乙型肝炎病毒基因组 1896 位点变异株与野生株的定性检测*

郭龙华¹, 陈 茶², 万泽民², 何文军², 吴新忠², 周 强², 冯春颜¹, 吴文权¹

(1. 深圳市龙华人民医院检验科, 广东深圳 518109; 2. 广东省中医院检验科, 广州 510120)

摘要:目的 建立一种能同时检测乙型肝炎病毒(HBV)基因组 1896 位点变异株与野生株的定性方法。方法 设计 3 条特异性引物(组成 2 对引物), 提取血清中 HBV DNA 模板进行 PCR 扩增变异株与野生株, 取 PCR 产物在琼脂凝胶(含 EB)上电泳, 观察结果。结果 本次实验共检测 40 个标本, 有 11 个标本只检测到野生株, 8 个标本只检测到变异株, 其余 21 个标本都是变异株与野生株混合感染。结论 该方法是一种可行的能同时检测 HBV 基因组 1896 位点变异株与野生株的定性方法。

关键词:乙型肝炎病毒; 野生株; 变异株

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.03.027

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)03-0308-02

The qualitative detection of hepatitis B virus genome 1896 site variants and wild strains*

Guo Longhua¹, Chen Cha², Wan Zemin², He Wenjun², Wu Xinzhong², Zhou Qiang², Feng Chunyan¹, Wu Wenquan¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Longhua People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518109, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: Objective To establish the qualitative detection method of hepatitis B virus(HBV) genome 1896 site variants and wild strains. Methods 3 strips of specific primers(consisting of 2 pairs of primers) were designed. HBV DNA templates extracted from the serum samples were amplified by PCR using 2 pairs of primers against variant strains and wild strains, and then we observed PCR products by agar gel electrophoresis. Results The experiments detected 40 samples, wild strains were detected in 11 samples, variant strains were detected in 8 samples. Variant and wild strains of mixed infection were detected in the remaining 21 samples. Conclusion This is a feasible method to detect HBV genome 1896 site variant and wild strains of qualitative methods.

Key words: hepatitis B virus; wild strains; variant strains

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是不完全双链环状 DNA 病毒, HBV 复制过程中要经过逆转录, 由于逆转录酶缺乏有效的碱基校对功能, 故 HBV 基因组比一般 DNA 病毒易发生变异^[1-3]。HBV 前 C 区定位于乙肝病毒基因组 nt1814-1900, 前 C 区是 HBV 基因组的高变区, 前 C 区最常见的变异为 G1896A 点突变, 使第 28 位密码子 TGG→TAG(终止子), 翻译提前终止, 导致 HBeAg 阴转, 影响干扰素疗效^[4-5]。目前一些常用方法对前 C 区 1896 位点变异株与野生株的混合感染易漏检, 本文介绍的方法能同时定性检测前 C 区 1896 位点变异株与野生株, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清标本 来源于广东省中医院 2011 年 1 月至 2 月门诊和住院患者, 共收集 40 例 HBV DNA 含量高于 1×10^4 IU/mL 血清标本。

1.1.2 主要仪器 Roche 公司 LightCycler 型荧光定量 PCR 仪、法国 VL 公司 Bio-1 D 型凝胶成像仪、飞鸽牌 TGL-16B 台式高速离心机。

1.1.3 主要试剂 广州达安基因公司 HBV DNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒、蛋白酶 K(Merck 公司)、平衡酚(国产)、裂解液(自配)、Taq DNA 酶(MBI 公司)、dNTP(Promega 公司)、DNA Marker(TaKaRa 公司)。

1.1.4 引物设计与合成 参照 GenBank 中的 HBV 基因组序

列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计 3 条特异性引物: 正义引物 P1: 5'-GAC TCT CAG CAA TGT CAA CG-3'(nt 1669-1688); 反义引物 P2: 5'-CGG GTC AAT GTC CAT GCC CC-3'(nt 1915-1896); 反义引物 P3: 5'-CGG GTC AAT GTC CAT GCC CT-3'(nt 1915-1896)(针对突变株), 由上海英骏生物技术有限公司合成。设计 PCR 终产物 247 bp。

1.2 方法

1.2.1 标本选取 用广州达安基因公司 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂盒检测的 HBV DNA 含量高于 1×10^4 IU/mL 血清标本。HBV DNA 的提取方法参照文献[6]。

1.2.2 PCR 扩增 每个标本同时做 2 个扩增管, 一管加 P1、P2(5 μ mol/L)各 1 μ L, 另一管加 P1、P3(5 μ mol/L)各 1 μ L, 其余所加成分相同, 10 \times 缓冲液 2 μ L, dNTP(10 mmol/L) 0.4 μ L, Taq DNA 酶(1 U/ μ L) 0.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 0.4 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 12.7 μ L, 总体积 20 μ L, 95 $^{\circ}$ C 5 min。然后 94 $^{\circ}$ C 0.5 min, 58 $^{\circ}$ C 0.5 min, 72 $^{\circ}$ C 0.5 min 共循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.2.3 PCR 产物上电泳 取 PCR 产物在 1.2% 琼脂凝胶(含 EB)上电泳, 观察结果。

1.2.4 PCR 产物测序 用试剂盒分别回收和纯化各一管变异株、野生株 PCR 产物, 送上海英骏生物技术有限公司测序。

2 结 果

2.1 标本扩增结果 PCR 产物电泳结果见图 1。设计产物长

* 基金项目: 广东省科技计划项目(2009B030801289)。 作者简介: 郭龙华(1970~), 主任技师, 硕士, 主要从事临床生化检验和分子生物学检验的研究。

247 bp,电泳结果与预期一致。本次实验共检测 40 个标本,有 11 个标本只检测到野生株,8 个标本只检测到变异株,其余 21 个标本都是变异株与野生株混合感染。

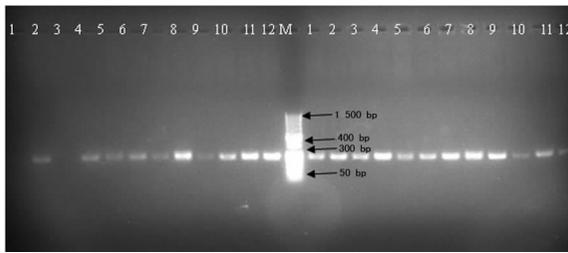


图 1 PCR 产物电泳结果
M:DNA 相对分子质量标准;左边 1~12:标本用引物 P1、P2 扩增野生株的结果;右边 1~12:与左边对应标本用引物 P1、P3 扩增变异株的结果。

图 1 PCR 产物电泳结果

2.2 PCR 产物测序结果

2.2.1 野生株 PCR 产物序列

GAC TCG CAG CAA TGT CAA CGA CCG ACC TTG AGG CAT ACT TCA AAG ACT GTT TGT TTA AGG ACT GGG AGG AGT TGG GGG AGG AGA TTA GGT TAA AGG TCT TTG TAC TGG GAG GCT GTA GGC ATA AAT TGG TCT GTT CAC CAG CAC CAT GCA ACT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CAT CTC ATG TTC ATG TCC TAC TGT TCA AGC CTC CAA GCT GTG CCT TGG GTG GCT TTG GGG CAT GGA CAT TGA CCC G,序列中粗体字 G 为野生株 1896 位点。

2.2.2 变异株 PCR 产物序列

GAC TCG CAG CAA TGT CAA CGA CCG ACC TTG AGG CAT ACT TCA AAG ACT GTT TGT TTA AGG ACT GGG AGG AGT TGG GGG AGG AGA TTA GGT TAA AGG TCT TTG TAC TGG GAG GCT GTA GGC ATA AAT TGG TCT GTT CAC CAG CAC CAT GCA ACT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CAT CTC ATG TTC ATG TCC TAC TGT TCA AGC CTC CAA GCT GTG CCT TGG GTG GCT TTA GGG CAT GGA CAT TGA CCC G,序列中粗体字 A 为变异株 1896 位点。

3 讨论

前 C 区是 HBV 基因组的高变区,前 C 区最常见的变异为 G1896A,使第 28 位密码子 TGG→TAG(终止子),翻译提前终止,导致 HBeAg 阴转。一方面血液中的 HBeAg 可以干扰或抑制 CTL 对肝细胞膜上的 HBcAg 的攻击,故 HBeAg 的减少可使 CTL 对肝细胞膜上的 HBcAg 攻击得更为强烈,从而引起严重的肝损害,导致重症肝炎。另一方面 HBeAg 阴转时,影响干扰素对 HBV 的疗效。

由于干扰素对乙型肝炎病毒患者抗病毒治疗疗程长、存在不良反应、患者花费大,因而治疗前需对患者进行评估。HBeAg 阴性患者,可用中药方剂抗病毒治疗^[7]。干扰素治疗对象主要是 HBeAg 阳性患者。在 HBV 感染者体内,常形成一个优势株为主的相关突变株病毒群,称为准种(quasispecies)^[8-9],即变异株与野生株的混合感染。在 HBeAg 阳性患者体内有些是 G1896A 点突变株和 G1896 野生株的混合感染,干扰素对 G1896 野生株有较好的疗效,而对 G1896A 点突变株疗效不好,对这类患者用干扰素治疗体内会出现 G1896A 点突变株成为优势感染株,达不到抗病毒治疗的效果,因而在干扰素治疗前对患者是否为 G1896A 点突变株和 G1896 野生

株的混合感染进行检测具有重要的临床意义。如果单纯是 G1896 野生株感染,可直接用干扰素治疗。如果是 G1896A 点突变株和 G1896 野生株的混合感染,可用中药方剂和干扰素进行中西医结合抗病毒治疗。在治疗用药中和用药后检测,有利于疗效和预后的判断。目前一些常用方法^[10-11]对前 C 区 1896 位点变异株与野生株的混合感染易漏检,本法能同时检测前 C 区 1896 位点变异株与野生株混合感染,PCR 产物测序也证实了本法的特异性,且简单易行,成本较低,具有一定的应用价值。

参考文献:

- [1] Ledesma MM, Galdame O, Bouzas B, et al. Characterization of the basal core promoter and precore regions in anti-HBe-positive inactive carriers of hepatitis B virus[J]. *Int J Infect Dis*, 2011, 15(5):e314-320.
- [2] Amini-Bavil-Olyae S, Herbers U, Luedde T, et al. Impact of hepatitis B e antigen-suppressing mutations on the replication efficiency of entecavir-resistant hepatitis B virus strains[J]. *J Viral Hepat*, 2011, 18(11):804-814.
- [3] Amini-Bavil-Olyae S, Vucur M, Luedde T, et al. Differential impact of immune escape mutations G145R and P120T on the replication of lamivudine-resistant hepatitis B virus e antigen-positive and -negative strains[J]. *J Virol*, 2010, 84(2):1026-1033.
- [4] 程中乐. 乙型肝炎病毒抵抗 α -干扰素治疗研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(21):2479-2481.
- [5] Lee D, Chung YH, Lee SH, et al. Effect of Response to Interferon- α Therapy on the Occurrence of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis B[J]. *Dig Dis*, 2012, 30(6):568-573.
- [6] 郭龙华, 董长垣, 高婧, 等. 一种从血清标本中快速提取 HBV DNA 方法的建立[J]. *武汉大学学报:医学版*, 2005, 26(3):344-346.
- [7] 杨宏志, 王拥泽, 戴敏, 等. 扶正祛邪和清热解毒方药治疗乙型肝炎病毒前 C 区基因变异的临床对照研究[J]. *中华实用中西医杂志*, 2003, 16(13):74-77.
- [8] Chen L, Zhang Q, Yu DM, et al. Early changes of hepatitis B virus quasispecies during lamivudine treatment and the correlation with antiviral efficacy[J]. *J Hepatol*, 2009, 50(5):898-905.
- [9] Baldick CJ, Eggers BJ, Fang J, et al. Hepatitis B virus quasispecies susceptibility to entecavir confirms the relationship between genotypic resistance and patient virologic response [J]. *J Hepatol*, 2008, 48(6):895-902.
- [10] 郭龙华, 董长垣, 黄宪章, 等. HBeAg 阴性血清中乙型肝炎病毒基本核心启动子和前 C 区变异研究[J]. *检验医学*, 2008, 23(4):333-337.
- [11] 邓少丽, 黄恒柳, 陈伟, 等. 乙型肝炎病毒耐药变异与基因型检测在临床上的应用[J]. *重庆医学*, 2008, 37(3):249-251.