技术方法

文章编号:1000-5404(2007)21-2102-02

构象敏感凝胶电泳用于检测乙型肝炎病毒P区核苷类似物耐药准种的初步研究

刘 霖,汤影子,王宇明,王小红,周吉军,李俊刚 (第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 建立经济、实用、准确的乙型肝炎病毒准种分析方法。**方法** 采用"PCR-克隆-测序"的方法,对2例血清样本的各60个克隆测序,χ^2检验分析所研究克隆毒株的数量对准种组成反映准确性的影响;用建立的构象敏感凝胶电泳(CSGE)法区分克隆目的片段,比对CSGE结果与测序结果的一致性。**结果** 对于优势准种比例的反映检测15个克隆以上($\chi^2=2.700$, $P=0.100>0.05$)、对劣势株的检出检测30个以上则与检测60个克隆无统计学差异($\chi^2=2.411$, $P>0.05$);比较8个样本共270个克隆的CSGE及测序结果,两者表现出良好的对应性(准确率达98.9%)。**结论** 用"PCR-克隆-CSGE-测序"的方法视不同需求检测15或30个克隆可准确反映1份血清样本中HBV准种的组成和分布。

高变异病毒的准种(quasispecies)研究目前受研究方法的限制,仍主要采用"PCR-克隆-测序"的方法。但究竟多少个克隆能准确反映病毒种群整体的准种组成和分布目前仍不清楚。另外,构象敏感凝胶电泳(conformation sensitive gel eletrophoresis, CSGE)是常用的核酸区分方法,但其精确性尚未进行较大样本的测序验证。同时,CSGE检测对于特定的目的片段需要专一的驱动子进行CSGE检测。核苷类似物耐药是目前困扰临床抗乙型肝炎病毒(HBV)治疗的难题,目前尚少见针对所有已知核苷类似物耐药位点的CSGE方法报道。本研究对2份慢性乙型肝炎患者血清样本的各60个克隆进行测序和序列分析,另对8份慢性乙型肝炎血清样本进行准种分析,比对CSGE和测序结果,验证CSGE的可靠性。

1 材料与方法

1.1 血清样本

10份血清样本分别来自2例慢性乙型肝炎患者(表1)。

1.2 目的片段的PCR扩增和克隆

采用巢式PCR,Primer Premier 5.0软件自行设计引物,引物由上海生工生物技术公司合成。外侧引物Prt-Outer-1(533~553 nt):5′-CCTGCTCAAGGAACCTCTATG-3′,Prt-Outer-2(1 197~1 177 nt):5′-GGTTGCGTCAGCAAACACTTG-3′;内侧引物Prt-Inner-1(599~617 nt):5′-TGTATTCCCATCCCATCAT-3′,Prt-Inner-2(992~970 nt):5′-TGACATACTTTCCAATCAATCAATAGG-3′。目的片段包括Prt区的B、C、D、E 4个区域(394 bp),涵盖了目前已知的所有HBV核苷类抗病毒药物耐药突变位点(表2)。采用日本宝生物公司的*Ex Taq*酶。扩增产物纯化回收后连接T载体,转化感受态细菌,对每个血清样本随机挑取80个白色菌落作为模板进行内侧PCR扩增,选取60个PCR阳性菌落测序;用于鉴定CSGE与测序符合度的样本挑取40个白色菌落扩增。

表1 血清样本资料

血清样本	药物治疗时间(周)	HBV DNA (log10 拷贝/ml)	ALT (IU/L)
1-1	LAM/0	9.235	106
1-2	LAM/60	4.316	42
2-1	LAM/0	9.342	282
2-2	LAM/24	5.614	64
2-3	LAM/48	5.712	30
2-4	LAM/72	8.314	148
2-5	LAM/96	8.428	528
2-6	ETV/12	6.484	39
2-7	ETV/24	6.605	40
2-8	ETV/48	5.281	75

LAM:拉米夫定;ETV:恩替卡韦

表2 已知的全部HBV核苷类抗病毒药物耐药突变位点

药物	I169T	V173L	L180M	A181V	T184A/G	S202I/G	M204I	M204V	N236T	M250V
LAM		△	△				△	△		
ADV				△					△	
ETV	△	△	△		△	△	△	△		△
L-dt							△			

LAM:拉米夫定;ADV:阿德福韦;ETV:恩替卡韦;L-dt:特比夫定

1.3 CSGE检测

参照Ganguly等[1]和兰林等[2]建立并优化的方法。随机选取1个克隆的内侧PCR产物作驱动子,进而筛选出能良好区分各个克隆的驱动子,再用筛选出的驱动子对各个克隆进行检测。

1.4 序列分析

前两份标本各选取60个PCR阳性的克隆,另8份标本则选取所有作了CSGE筛检的共270个克隆送上海生工生物工程有限公司测序,测序仪ABI 3730。测序结果进行生物信息学分析。

1.5 统计学分析

采用SPSS 11.5统计软件行χ^2检验。

基金项目:第三军医大学西南医院临床研究专项基金(SWH2005A013)
Supported by the Clinical Innovation Funds of Southwest Hospital of Third Military Medical University (SWH2005A013)

作者简介:刘 霖(1979-),男,重庆市人,博士研究生,医师,助教,主要从事HBV病毒变异(准种)与宿主免疫及临床抗病毒治疗方面的研究。电话:(023)68754475-8047
通讯作者:王小红,电话:(023)68754142,E-mail:wangxhke@126.com
王宇明,电话:(023)68754141,E-mail:wym417@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2007-03-28;修回日期:2007-04-25

2　结果

2.1　目的片段的克隆

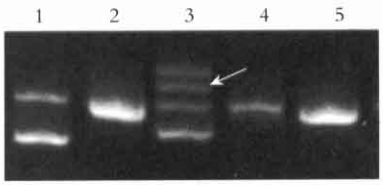
每个 LB 平板上获得 200～2 000 个转化克隆，其中 70% 以上为白色菌落。每份标本随机挑选 40 或 80 个克隆行 PCR 扩增，80% 以上含有插入片段。选取 PCR 扩增阳性克隆用于测序或 CSGE 检测。

2.2　反映 HBV 准种整体的最小克隆数

优势准种是指在准种群体中所占比例最大的克隆毒株，相对优势准种有次优势准种，所占比例很小的为劣势准种。为了将每个样本需研究的克隆数量减至最少同时又不影响对准种整体的反映情况，从 60 个阳性克隆的测序结果中随机选出 10、15、20……55 个克隆序列分为 10 组，比较各组与整体（60 个克隆）之间对于优势株反映和劣势株检出的差异。发现对于优势株的反映，只需检测 15 个克隆以上即与整体无统计学差异（$\chi^2_{10}=4.587$，$P_{10}=0.032$；$\chi^2_{15}=2.700$，$P_{15}=0.100$）；而对于劣势株的检出，则需检测 30 个克隆以上（$\chi^2_{25}=4.225$，$P_{25}=0.040$；$\chi^2_{30}=2.411$，$P_{30}=0.120$）。

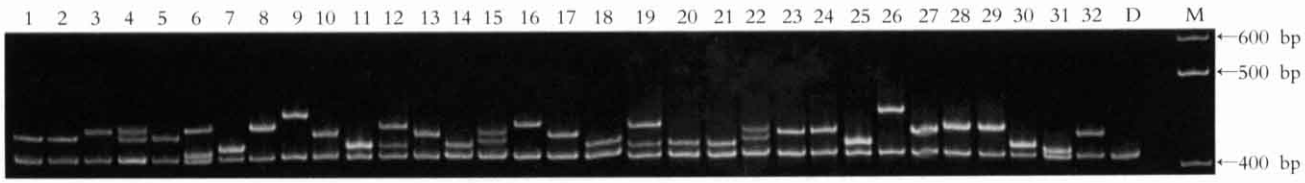
2.3　克隆片段的 CSGE 分析

CSGE 检测需要敏感的驱动子，而驱动子是片段特异的，即 1 个驱动子只能驱动 1 个特异的 DNA 片段，而理想的驱动子能够在和目的片段杂交后在 CSGE 电泳胶中一般产生 2～4 条可被清晰区分的条带，无条带模糊（fuzzy）等现象。通过反复筛选，得到了比较理想的驱动子（图 1）。用筛选出的驱动子与血清样本 2～7 的 32 个克隆的 PCR 扩增产物杂交后得到优化后的 CSGE 图谱，见图 2。继而对 8 例血清标本的共 270 个克隆进行 CSGE 检测，并全部测序，发现 CSGE 检测与测序结果的对应性达到 98.9%。



↓（条带 3）：筛选出的比较理想的构象敏感凝胶电泳（CSGE）驱动子。1、2、4、5：是不适合作驱动子的克隆目的片段

图 1　构象敏感凝胶电泳理想驱动子的筛选



1～32：32 个克隆的 CSGE 图谱；D：驱动子，驱动子自身经变性复性后在 CSGE 胶上电泳图谱为单一条带；M：标准，由于 CSGE 采用变性 PAGE 胶，因此普通双链 DNA 分子量标准仅有相对指示作用

图 2　优化后的 CSGE 图谱

3　讨论

对抗病毒药物的选择标准及治疗中药物的调整，目前缺乏直接可靠的病毒学依据。HBV 准种群体在抗病毒治疗过程中组成和分布发生着动态变化，从而导致 HBV 准种群作为一个整体其药物敏感性和抗性发生演变，反过来影响抗病毒治疗效果[3,4]。故对 HBV 准种组成进行定期检测，使其成为抗 HBV 治疗的“药敏试验”有重要意义。

目前一般每个血清样本克隆测序数量为 20～60 个。本研究表明，仅需检测 15 个克隆即可准确反映 HBV 准种群体中优势株的比例，而要准确反映劣势株在 HBV 准种群体中的比例则需检测至少 30 个克隆。CSGE 检测的敏感性取决于对驱动子的筛选，我们筛选出的驱动子与目的片段杂交后可得到 2～4 条清晰的电泳条带，无明显的条带模糊（fuzzy）现象。本研究建立的检测 HBV Prt 区全部已知核苷类似物耐药突变的 CSGE 方法可区分两个不同克隆目的片段间小至 1 bp 的碱基差异，因此可仅对 CSGE 条带不同的克隆进行测序，大大降低了成本。CSGE 较传统的单链构象多态性（SSCP）或异源双链分析（HDA）方法提高了检测精度，此二者的结合法 SSCP/HDA[5] 理论上有更高的检测精度，但操作要求稍高。新方法如毛细管电泳双链泳动分析及基于实时定量 PCR 的变异检测技术等需要昂贵设备的支持，同时亦不完善，不推荐为普通实验室的首选方法。

关键词：肝炎病毒，乙型；准种；构象敏感凝胶电泳；方法学
中图法分类号：R446.11　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Ganguly A, Rock M J, Prockop D J. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(21): 10325－10329.

[2] 兰　林，王宇明. 构象敏感凝胶电泳快速检测 HBV 准种序列异质性的方法[J]. 世界华人消化杂志，2002，10(4)：411－414.

[3] Pallier C, Castera L, Soulier A, *et al*. Dynamics of hepatitis B virus resistance to lamivudine[J]. J Virol, 2006, 80(2): 643－653.

[4] Yim H J, Hussain M, Liu Y, *et al*. Evolution of multi-drug resistant hepatitis B virus during sequential therapy[J]. Hepatology, 2006, 44(3): 703－712.

[5] Wang Y M, Ray S C, Laeyendecker O, *et al*. Assessment of hepatitis C virus sequence complexity by electrophoretic mobilities of both single-and double-stranded DNAs[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(10): 2982－2989.

（编辑　龙　亮）