文章编号:1000-5404(2011)15-1641-02

短篇论著

特异性标签序列快速鉴定乙肝病毒B、C基因型的方法及应用

蔡 颖[1*],卫 国[2*],李学成[3],陈 铭[2],李 彦[2] (400020 重庆,解放军324医院:传染科[1],消化内科[3];400038 重庆,第三军医大学西南医院中心实验室[2])

[摘要] **目的** 建立一种乙肝病毒(hepatitis B virus,HBV)基因分型方法,并观察其临床应用效果。**方法** 利用HBV大S区的型间特异性位点密集序列,建立了一种直接多重PCR方法,并对重庆地区250例临床样本进行应用性观察。**结果** 使用该方法对重庆地区250例随机临床HBV阳性血清进行了检测,结果显示B基因型占73.6%(184/250),C基因型占16.4%(41/250),BC混合型占6.4%(16/250),总检出率为97%左右,与重庆周边地区HBV基因型的区域分布具有一致性。**结论** 该方法能够快捷而准确地鉴定乙肝病毒B、C基因型。

[关键词] 乙肝病毒;基因型;PCR诊断;特异性序列
[中图法分类号] R446.9 [文献标志码] A

乙肝病毒(hepatitis B virus,HBV)基因组序列累积数据显示全球HBV存在(A~H)8种基因型[1-2],中国地区主要为B、C两型或混合型[3]。对HBV进行分型,不仅有助于流行病学调查与病毒变异研究,也有助于治疗策略的选择及预后评估[4]。由于分型准确度是由各型特异性序列所决定的,在前期工作中,我们对HBV大S区域的各型间差异位点进行了全面分析,获得了型内保守、型间有别位点密集的标签序列可用于HBV分型[5-6];在此基础上,本研究利用特异性标签序列建立一种快速而准确的PCR方法来鉴定乙肝病毒B、C基因型,并应用于250例临床样本,明确分型效果,比较了重庆与周边地区的基因型分布特点。

1 材料与方法

1.1 样本采集

收集重庆地区HBV阳性的血清标本(荧光定量PCR临床分子诊断报告拷贝数≥10^3 copy/ml)共250例,另取10例健康人血清为阴性对照。均来源于西南医院体检门诊、肝胆外科、妇产科、感染科等多个科室,包括HBV携带者、慢性肝炎、肝硬化、肝癌患者。采用深圳匹基公司的沉淀煮沸裂解法,取血清100 μl/例,加入100 μl“DNA提取液Ⅰ”振荡混匀,13 000 r/min离心10 min,弃上清,加入25 μl“DNA提取液Ⅱ”,煮沸10 min,13 000 r/min离心10 min,模板于上清中备用。

1.2 引物

根据前期工作,从HBV基因组S区域型间差异标签序列中选取并组合鉴别引物(表1),由上海生工合成。用双蒸水稀释引物至浓度为5 μmol/L。

表1 HBV B、C型分型引物

基因型	参考序列ID	引物(5′→3′)及基因组位置
B	gb|AY217368.1	上游 CAACTGGCCGGACGCCAACA(2 997~3 016 nt)
		下游 GCCCTGACTCTGGGATCTTGA(25~45 nt)
C	Dbj|AB026811.1	上游 ATCACTGGCCAGAGGCAAATC(2 996~3 016 nt)
		下游 TATGGGTGAGGCAGTAGTCGGAA(93~115 nt)

[基金项目] 成都军区科研基金
*:同等贡献者
[通信作者] 李 彦,E-mail:liyan.com@gmail.com

1.3 建立乙肝病毒B、C基因分型体系

为了建立一种方便快捷的乙肝病毒B、C基因分型方法,把B型和C型特异性引物对混合于一个PCR反应体系中,根据扩增产物长度差异,显示对应的基因型。以前期工作为基础[5-6],我们选用的C型引物对含有13个型间特异位点,扩增产物理论长度为335 bp;B型引物对含有至少8个型间特异位点,扩增产物理论长度为264 bp。

采用直接PCR扩增法。反应体系:2×*Taq* Master Mix(含染液,天根公司)12 μl,模板2 μl,每条引物各2 μl,双蒸水补足到25 μl。根据3种不同引物对(B、C、BC混合型)进行分型效果对比。PCR扩增条件:95 ℃ 5 min;40个循环(94 ℃ 30 s,53 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s);72 ℃ 5 min。

电泳:采用3%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭20 mg/ml)按各道依次上样,50 bp DNA ladder 6 μl,扩增产物6 μl。0.5×TBE缓冲条件下电泳,电压:140 V 50 min。使用美国伯乐BIO-RAD GelDoc 2000凝胶成像系统观察照相分析。

2 结果

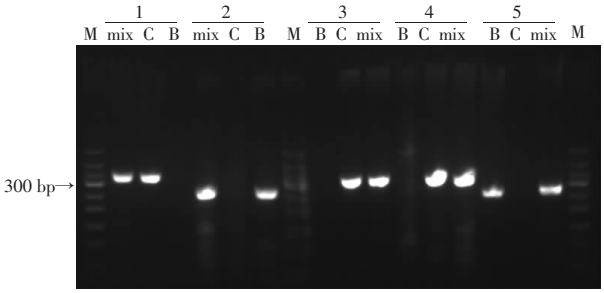
2.1 乙肝病毒B、C基因分型体系的成功建立

电泳结果发现:健康人血清样本无任何扩增带。图1显示5例HBV DNA样本检测结果,相关泳道扩增条带单一而清晰,第1、3、4样本扩增带于335 bp处,属C型,第2、5样本扩增带于264 bp处,属B型。值得注意的是,针对这些单基因型样本,B、C引物对之间无非特异性交叉扩增,说明达到了分型效果,而且混合引物扩增与其对应的单型引物对扩增比较,产物条带的大小与亮度都完全一致,提示2对引物混合在一个反应体系中,可以成功鉴定B、C基因型。

2.2 直接PCR鉴别法效率评估

采用已知拷贝数(10^2~10^8 copy/ml之间)的样本实施扩增,并对扩增条带进行定量。结果提示扩增量与拷贝数量成正相关。其中对于20例10^3 copy/ml数量级血清样本检出率为100%,而10^2 copy/ml数量级的检出率下降到30%以下,故该法灵敏度达到10^3 copy/ml。对于10^3、10^5、10^7 copy/ml 3个样本分别进行批内和批间重复,批内变异系数分别为0.003、

0.045、0.013;批间变异系数分别为0.070、0.002、0.033,提示该法稳定性好。



M: 50 bp DNA ladder;1~5:5例HBV DNA样本;mix:BC混合引物扩增;C:C型引物扩增;B:B型引物扩增

图1 直接PCR法对HBV基因分型电泳结果

2.3 250例阳性血清检测应用

结果显示B型184例,占73.6%;C型41例,占16.4%;BC混合型16例,占6.4%;未检出9例(3.2%)。由于未检出者中可能为其他型,不在本观察范围内,故该法的总检出率在97%左右,与设计基本一致,符合目标要求,达到分型效果。

3 讨论

由于HBV基因分型积极的现实意义,涌现了多种针对HBV的实验分型方法[7-9]。但多数难以推广,如测序法与芯片法,对设备与维护要求高,须软件支持;ELISA法时间长、技术繁琐、精度欠佳。所以,大多数实验室采用的方法仍然是PCR法。其中,PCR-RFLP法曾被认为灵敏度较高,能准确识别哪怕是一个特异性位点,但是酶切效率会影响结果,步骤也较复杂。Naito[9]的巢式多重PCR分型法多年来被广泛使用,但其不仅需要两轮扩增,而且设置多种条件,时间也较长,同时生物信息分析不难发现其B型引物只有1个特异位点,所以对退火温度要求比较苛刻,否则会造成非特异性扩增。再则,其他一些多重PCR方法,因引物序列的特异性不足而效果欠佳。

本研究是在我们前期大量HBV基因组数据基础上,运用生物信息技术分析HBV突变与进化规律,获取了HBV大S区型间特异性位点标签序列[5-6],以此设计引物,在一个反应体系内,通过一次普通PCR,就可特异性地鉴别乙肝病毒B、C基因型。用时短、分型效果好、检出率高、操作简便。此外对退火温度要求也比较宽松,我们也曾摸索过以55 ℃和51 ℃为退火温度的反应条件,均无杂带产生,说明引物序列的高特异性增强了方法的可靠性。此外,该法灵敏度主要是受电泳条带亮度影响,对于条件好的实验室,也可根据该方法中的引物序列为蓝本设计荧光探针,采用荧光定量PCR实现精确定量分型。

大量流行病学调查显示,中国北方地区HBV主要为C型,南方地区主要为B型。本研究对重庆地区250例随机HBV阳性血清的分型调查发现,该地区主要为B型,达73.6%,C型占16.4%,且存在较高比例的BC混合型。赵丽等[10]应用优化的反向斑点杂交法对重庆地区HBV分型,结果为B型72.4%,C型占20.6%,与本法分型效果基本一致。而重庆相邻地区的相关报道显示:湖北地区B型占73%以上,C型占22%[11];湖南地区B型占73.5%,C型占26.5%[12];成都地区B型达63%,C型达33%[13];贵州地区B型占64%,C型占33%[14]。从这些数据来看,重庆与周边地区HBV基因型的区域分布具有一致性。此外,重庆地区BC混合型偏多是否与人口流动性等因素有关,有待进一步研究。

参考文献:

[1] Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, *et al*. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes[J]. J Gen Virol, 1988, 69(Pt 10): 2575-2583.

[2] Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson B H, *et al*. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America [J]. J Gen Virol, 2002, 83(Pt 8): 2059-2073.

[3] Zeng G, Wang Z, Wen S, *et al*. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China[J]. J Viral Hepat, 2005, 12(6): 609-617.

[4] 司建华, 崔金环, 钟锐兴. 乙型肝炎病毒基因型的分布及临床意义[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(15): 2372-2373.

[5] Zhang D, Chen J, Deng L, *et al*. Evolutionary selection associated with the multi-function of overlapping genes in the hepatitis B virus [J]. Infect Genet Evol, 2010, 10(1): 84-88.

[6] 蔡颖, 李学成, 吴小梅, 等. 乙型肝炎病毒基因分型的标签序列研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(2): 101-104.

[7] 王虹, 万成松, 王省良, 等. 采用PCR微板核酸杂交-ELISA技术进行HBV DNA基因分型的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(2): 234-236.

[8] 戴晨阳, 朱理珉, 梁树人, 等. 乙型肝炎病毒S基因直接测序分型方法的建立及应用[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(2): 191.

[9] Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1): 362-364.

[10] 赵丽, 张文露, 胡源, 等. 反向斑点杂交法快速检测HBV基因型反应条件的优化和建立[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(12): 85-89.

[11] 雷延昌, 郝友华, 田拥军, 等. 湖北地区乙型肝炎病毒基因型分布与临床的相关性[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(2): 109-112.

[12] 刘映霞, 胡国龄, 谭德明. 湖南省乙肝病毒基因型分布及临床意义[J]. 湖南医科大学学报, 2002, 27(1): 29-31.

[13] 卢亦路, 王玲, 张发强, 等. 成都地区HBV基因型分布研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(6): 546-548.

[14] 丁静娟, 张权, 彭亮, 等. 贵州乙型肝炎病毒基因型分布及意义分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2006, 20(3): 241-243.

(**收稿**:2011-05-05;**修回**:2011-06-02)

(编辑 汪勤俭)