文章编号:1000-5404(2012)21-2231-02

技术方法

乙型肝炎病毒基因分型与 *Taq*Man-MGB 荧光探针方法改进

郑卫东, 袁仕伟 (442000 湖北 十堰,湖北医药学院附属人民医院检验部)

[**摘要**] **目的** 改进对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV) S 基因 *Taq*Man-MGB 型特异性荧光探针设计,建立一种快速、准确的实时 PCR 检测乙型肝炎病毒基因型方法。**方法** 根据 HBV 基因型 A ~ H 的全序列,在 S 基因区设计引物和型特异性 *Taq*Man-MGB 探针,建立实时 PCR 检测 HBV 基因型方法,并检测 88 例慢性乙型肝炎(CHB)患者的 HBV 基因型,同时对扩增的 PCR 产物,进行核苷酸序列测定,应用统计学方法对二者进行比对。**结果** CHB 血清样本中 HBV 以基因型 B 和 C 为主,基因型 A、B、C、B + C、D 样本比例分别为 2.3%、45.5%、35.2%、12.5%、2.3%,未检测出其他基因型,S 基因测序结果与本分型法完全一致。**结论** 应用改进 *Taq*Man-MGB 探针建立的实时荧光 PCR HBV 基因分型法和目前 PCR 扩增后测序、限制性内切酶酶切后电泳或核酸杂交相比,更能简便、灵敏、快速、准确地鉴定 HBV 基因型。

[**关键词**] 乙型肝炎病毒;基因型;聚合酶链反应;*Taq*Man-MGB 探针
[**中图法分类号**] R446.5 [**文献标志码**] B

HBV 在复制过程中由于缺乏校对酶的作用容易发生核苷酸配对错误,以致基因突变频繁发生,产生不同的 HBV 基因型。目前根据 HBV 核苷酸全序列异质性≥8%或 S 基因序列核苷酸异质性≥4%,将 HBV 分为 A ~ H 共 8 个基因型(A ~ H)。HBV 基因型存在典型的地域分布差异。我国 HBV 基因型主要为 B 和 C 型,也存在少量的 A 和 D 型,以及 A * B、B * C 等基因型的混合感染[1]。目前的 HBV 基因分型主要是全基因或 S 基因序列分析;聚合酶链反应,再使用电泳进行限制性片段长度多态性分析;以及使用特异性引物 PCR,再用 HBV 基因型特异性探针核酸杂交等方法[2-3],这些方法需在 PCR 扩增后测序、限制性内切酶酶切后电泳或核酸杂交,在临床检验应用中存在准确性和操作繁琐问题。为了避免这些问题,我们对 *Taq*Man-MGB 探针设计作了改进,并以此建立的实时荧光 PCR 检测 HBV 基因型方法,对 CHB 患者血清样本中的 HBV 基因型进行了临床分析。

1 材料与方法

1.1 HBV 基因型 A ~ H PCR 引物和荧光探针序列设计和合成

查 GeneBank,获得 HBV 基因型 A ~ H 完全核苷酸序列,GeneBank 编号分别为:A-AP007263、AB602818.1、AB644287.1、AB554023.1、AP007262.1、AB166850.1、AB516393.1。依据 HBV 核苷酸序列确定 S 基因核苷酸序列范围: 1 ~ 840,并应用 DNMAN 软件,输入 HBV 基因型 A ~ H 的 S 基因核苷酸序列,比较序列的同源性,根据比较结果,选择核苷酸序列 1 ~ 250。为了使 *Taq*Man-MGB 型探针序列与相应靶基因序列更完全互补,对非本型核苷酸序列有 2 ~ 4 碱基不互补,提高 *Taq*Man-MGB 型荧光探针特异性,在核苷酸序列两个区间设计和合成 HBV 基因型 A ~ H PCR 引物和 *Taq*Man-MGB 荧光探针,见表 1。

表 1 HBV 基因型 A ~ H 的 PCR 引物和 *Taq*Man-MGB 荧光探针序列

序号	名称	PCR 引物	PCR 引物和荧光探针序列
1	HBV-S1	公用上游	5′-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3′
2	HBV-S2	公用下游	5′-AATTGAGAGAAGTCCACCAC-3′
3	T-A	基因型 A 荧光探针	5′-FAM-ATATTGCCTCTCAC-MGB -3′
4	T-B	基因型 B 荧光探针	5′-FAM-AGAATACTGTCTCTG-MGB -3′
5	T-C	基因型 C 荧光探针	5′-FAM-TACTGCCTCTCCTA-MGB -3′
6	T-D	基因型 D 荧光探针	5′-FAM-CACTGCCTCTCCCT-MGB -3′
7	T-E	基因型 E 荧光探针	5′-FAM-TACTGCCTCACTCA- MGB -3′
8	T-G	基因型 G 荧光探针	5′-FAM-ACTATTGCCTCTCAC-MGB-3′
9	HBV-S3	公用上游	5′-GTTTGTCCTCTAATTCCAGGA-3′
10	HBV-S4	公用下游	5′-CATCATCTTGGGCTTTCGGAA-3′
11	T-F	基因型 F 荧光探针	5′-FAM-ATGCAAAACCTGCACA-MGB-3′
12	T-H	基因型 H 荧光探针	5′-FAM-GGTGCAGGTTGCAG-MGB-3′

1.2 检测方法

应用公用上下游 PCR 引物 HBV-S1 和 HBV-S2 和 A、B、C、D、E、G-型荧光探针,对同一份血清样本 PCR 扩增,并分型。因在这一对引物扩增产物的核苷酸序列对于基因型 F 和 H 相同,所以需用另一对公用上下游 PCR 引物 HBV-S3 和 HBV-S4 和 F、H-型荧光探针进行基因型 F 和 H 扩增和分型。每一型特异性荧光探针序列为 nt14 - 17 长,对本基因型序列完全互补,对其他基因型有 2 - 4 碱基不互补,因此仅对本基因型能测出阳性有效 CT 值,对其他基因型只能是阴性 CT 值,从而判定相关基因型。

PCR 循环条件按以下设置:94 ℃ 3 min 预变性,然后 93 ℃ 20 s,60 ℃ 20 s 循环 10 次,93 ℃ 20 s,60 ℃ 30 s 循环 30 次。

1.3 材料来源

DNA 聚合酶等试剂,由大连宝生物公司提供与合成。引物和探针,委托上海基康生物技术有限公司合成。

1.4 临床血清样本检测

选取 2010 年 8 月至 2011 年 12 月本院肝病科住院患者确诊的 CHB 病例血清样本 88 份,患者年龄 35 ~ 75 岁, 男性 51

[**通信作者**] 袁仕伟,E-mail:ysw615@163.com

例,女性37例,平均48岁,CHB的诊断符合2005年版《慢性乙型肝炎防治指南》的诊断标准[4]。血清标本HBV-DNA定量均阳性,并排除其他病毒感染。取血清样本加2倍HBV DNA提取液,提取HBV DNA,对同一份血清样本首先用公用上下游PCR引物HBV-S1和HBV-S2和A、B、C、D、E、G-型荧光探针,以显示有效阳性CT值分型,如果所有检测CT值都为阴性,则可能为F或H基因型,再用第二公用下上游PCR引物HBV-S3和HBV-S4和F、H、型荧光探针进行基因型F和H分型。

1.5 核苷酸序列测定

选取已测88份血清样本,首先以第一公用上下游PCR引物HBV-S1和HBV-S2扩增,扩增的PCR产物,进行核苷酸序列测定,对照A、B、C、D、E、G有关S基因型核苷酸序列检查,判定血清样本中HBV基因型,对都不符合的血清样本,用第二公用下上游PCR引物HBV-S3和HBV-S4扩增,扩增的PCR产物,进行核苷酸序列测定,对照F和H有关S基因型核苷酸序列检查,判定血清样本中HBV基因型。

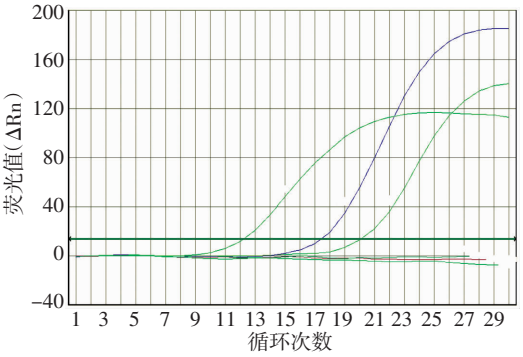
1.6 统计学分析

样本核苷酸序列测定结果与本方法检测结果,经SPSS 13.0软件处理,用χ^2值测验差异性。

2 结果

2.1 临床血清样本分型检测

临床血清样本分型检测的PCR扩增曲线如图1所示,对A031样本,分别应用PCR引物HBV-S1和HBV-S2和各型荧光探针进行PCR扩增,分型检测结果B与C混合型,图1显示荧光探针有良好的型特异性。



1:B型;2:C型;3:C型;4:D型;5:E型;6:G型

图1 血清样本分型检测的PCR扩增曲线

88份血清样本共检测出阳性86份,未检测出阳性2份,检测结果:CHB病例的HBV基因型A、B、C、B+C、D、E、F、G、H的例数分别为:2、40、31、11、2、0、0、0、0。可以看出,CHB病例的HBV基因型以B和C为主、其中基因型B>C,基因型A、B、C、B+C、D样本构成比分别为2.3%、45.5%、35.2%、12.5%、2.3%。用第二公用下上游PCR引物和F、H、型荧光探针进行基因型F和H分型,亦未检测出阳性CT值,可能血清样本的HBV浓度很低,以至检出结果为阴性。

2.2 核苷酸序列测定

对88份血清样本PCR扩增产物,进行核苷酸序列测定,对照A、B、C、D、E、F、G、H有关S基因型核苷酸序列比对,判定血清样本中HBV基因型,结果基因型A、B、C、B+C、D、E、F、G、H的例数分别为:2、39、30、12、2、0、0、0、0。核苷酸序列测定结果与应用*Taq*Man-MGB探针的实时荧光定量PCR方法检测结果一致($P>0.05$)。

3 讨论

*Taq*Man-MGB探针在3′端增加了MGB分子,这种物质能够提高探针的退火温度(Tm值),文献[5]报道,只要有一个碱基不匹配,就没有信号。但在我们试验中发现1个碱基的差别,其特异性还不足够达到HBV主要基因型分型的要求,但在HBV同一靶基因序列内,对A~H基因型,非本型核苷酸序列有2~4碱基不互补是不可能做到的,为了做到这一点在核苷酸序列两个区间设计和合成HBV基因型A~H PCR引物和*Taq*Man-MGB荧光探针,分两组测定HBV基因型,另外我们对每一型特异性荧光探针序列控制在nt17以内,且有2~4碱基不互补,所以足够完成对HBV基因型的分型。

牟一坤等[3]按INNO-LiPA HBV分型试剂盒说明书,采用线性探针分析法,应用巢式扩增产物、2.0%琼脂糖凝胶电泳、杂交与试剂盒提供的标准条带对比,对不同临床类型慢性乙肝患者乙肝病毒基因型检测,得到基因分型结果。我们建立的*Taq*Man-MGB探针荧光PCR方法与国内目前采用HBV基因型鉴别方法比较更简便、灵敏、快速。

基因型研究对疗效监测、病毒突发和复发的观察、抗病毒疗效的差异等的病情评估以及在临床调整药物治疗方案提供依据,有重要价值[1-2,6],因此建立一种简便、灵敏、快速地鉴别HBV基因型的荧光定量PCR联合*Taq*Man-MGB探针的检测方法,同样有重要意义。

参考文献:

[1] 杨军, 秦波. 乙肝病毒基因型的研究进展[J]. 西南国防医药, 2011, 21(3): 338-340.

[2] 吴赟, 孙余婕. 乙型肝炎病毒基因型的国内研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 703-704.

[3] 牟一坤, 顾琳, 曾淑珍. 不同临床类型慢性乙肝患者乙肝病毒基因型检测[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(1): 46-49.

[4] 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(12): 881-891.

[5] 梅玲玲, 朱敏, 张俊彦, 等. 志贺菌*Taq*Man-MGB探针实时荧光聚合酶链反应快速检测方法的应用研究[J]. 疾病监测, 2009, 24(12): 910-914.

[6] Sumi H, Yokosuka O, Seki N, *et al*. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease[J]. Hepatology, 2003, 37(1): 19-26.

(**收稿**:2012-06-04;**修回**:2012-07-24)

(编辑 邓强庭)