技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)06-0829-04

荧光定量 PCR 法分析乙肝病毒基因型及载量

刘 琦[1],曾爱中[1],秦 波[1],赵 耀[2],胡接力[3],黄爱龙[3]

(1. 重庆医科大学附属第一医院感染科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所,重庆 400014;
3. 重庆医科大学教育部感染性疾病分子生物学重点实验室、病毒性肝炎研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:了解重庆地区乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus,HBV)基因型的分布情况并进行精确定量分析。方法:采用荧光分型定量聚合酶链反应法(Real-time genotyping and quantitative PCR,GQ-PCR)对收集的血清标本进行 HBV 基因分型并定量。结果:152 株血清标本成功分型 148 株(97.37%),其中 B 基因型 109 例(男 88 例、女 21 例)[定量值范围 4~12 $\log_{10}$copies/ml、均值和标准差(7.94±1.44) $\log_{10}$copies/ml]、C 基因型 10 例(男 6 例、女 4 例)[定量值范围 5~10 $\log_{10}$copies/ml、均值和标准差(8.12±1.64) $\log_{10}$copies/ml]、基因 B+C 混合型 29 例(男 24 例、女 5 例)[定量值范围 4~10 $\log_{10}$copies/ml、均值和标准差(7.45±1.59) $\log_{10}$copies/ml]。检出率分别为 73.65%(男 74.58%、女 70.00%)、6.76%(男 5.08%、女 13.30%)、19.59%(男 20.34%、女 16.70%)。结论:重庆地区 HBV 优势基因型以 B 型和 B+C 混合型为主,与前几年相比较,C 型有下降趋势。基因型的分布与性别无关($P>0.05$)。HBV 载量在 B、C 型及 B+C 混合型三者之间无统计学差异($P>0.05$)。荧光分型定量 PCR(GQ-PCR)法灵敏度和特异性高,能够同时准确的对临床标本进行 HBV 基因分型及定量检测,并有望替代传统的基因分型方法。

【关键词】乙型肝炎病毒; HBV 基因型;荧光定量 PCR

【中国图书分类法分类号】R512.62 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-3-17

Analysis of genotype and quantification of hepatitis B virus by real-time PCR assay

LIU Qi[1], ZENG Ai-zhong[1], QIN Bo[1], ZHAO Yao[2], HU Jie-li[3], HUANG Ai-long[3]

(1. Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 2. Pediatric Research Institute, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; 3. Institute for Viral Hepatitis, Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To make precise quantitation and distribution analysis of hepatitis B virus (HBV) genotypes in Chongqing. *Methods*: Real-time genotyping and quantitative PCR (GQ-PCR) was used to genotype and quantitate the HBV strains. *Results*: A total of 148(97.37%)out of the 152 strains were successfully genotyped. Among them, 109 patients (88 males and 21 females) had genotype B with quantity ranging from 4~12 $\log_{10}$copies/ml, and mean and standard deviation of (7.94±1.44) $\log_{10}$copies/ml, 10 patients (6 males and 4 females) had genotype C with quantity ranging from 5~10 $\log_{10}$copies/ml, and mean and standard deviation of (8.12±1.64) $\log_{10}$copies/ml, 29 patients (24 males and 5 females) had mixtures of genotype B and C with quantity ranging from 4~10 $\log_{10}$copies/ml, and mean and standard deviation of (7.45±1.59) $\log_{10}$copies/ml. The detecting rates of genotype B, genotype C, and genotype B and C were 73.65%(74.58% in males, 70.00% in females), 6.76%(5.08% in males, 13.30% in females), and 19.59% (20.34% in males, 16.70% in females), respectively. *Conclusion*: Genotype B is the most dominant type for HBV strains, followed by mixed genotype B and C infection. Genotype C decreased compared with the previous years. There is no relationship between the gender and HBV genotypes. No significant difference was found between HBV genotype and HBV DNA level. GQ-PCR has a higher sensitivity and specificity for precise simultaneous genotyping and quantifing HBV clinical samples and can replace the traditional genotyping assays.

【Key words】hepatitis B virus; HBV genotype; real-time PCR assay

作者介绍:刘 琦(1983-),男,硕士,
研究方向:慢性乙型病毒型肝炎耐药机制。

通信作者:曾爱中,男,副教授,Email:aizhong9@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30972587)。

据统计全球约 20 亿人曾感染过 HBV，其中 3.5 亿人为慢性 HBV 感染者，每年约有 100 万人死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化和肝癌。乙肝病毒（Hepatitis B virus, HBV）基因变异率较高，根据 HBV 核酸序列异质性，已发现 A~H 8个基因型。最近有报道[1,2]新发现两个 HBV 基因型 I 型和 J 型。由于不同基因型 HBV 对肝病有不同的预后[3,4]，近年来国内外对 HBV 基因型的关注越来越多，出现了各种新的基因分型方法，目前 HBV 基因分型方法有：(1)基因测序分型法；(2)聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分型法；(3)PCR 微板核酸杂交酶联免疫分型法；(4)基因型特异性表位单克隆抗体酶联免疫分型法；(5)线型探针分析法；(6)型特异引物聚合酶链反应法，各种方法均有特点，但都不能同时对 HBV 分型及定量，我们根据重庆地区仅见 B、C 型及 B+C 混合型的报道，选取了可以在一个反应中同时检测 B、C 型，并且对 B+C 混合型灵敏度和特异性更高的荧光分型定量 PCR（GQ-PCR）法[5]检测重庆地区 HBV 基因型，了解其分布情况及其绝对数量。

1　材料与方法

1.1　标本来源

收集 2010 年 3 月-2011 年 2 月在重庆医科大学附属第一医院感染科住院部送检的慢性乙肝肝病患者空腹血清，共计 152 份，其中男性 121 例，女性 31 例，年龄 21~90 岁，平均年龄为(47.82 ± 14.35)岁。患者均排除甲、丙、丁、戊型肝炎病毒感染及其它导致肝脏病变的疾病，诊断均符合 2000 年修订的《病毒性肝炎防治方案》[6]。检测 HBV 基因型的血清标本于-80℃冰箱存放，集中检测。

1.2　主要仪器及试剂

Chromo 4™ Real-time PCR Detector (BIO-RAD Laboratories，美国)，Eppendof 高速台式离心机(德国)，漩涡混合仪，iQ™ Mutilplex Powermix 液(BIO-RAD Laboratories 美国)，B、C 基因型引物、TaqMan 探针购自上海英俊生物有限公司。

1.3　方法

1.3.1　血清标本 HBV DNA 提取　使用 TIANamp Virus DNA/RNA Kit(购自天根生化科技北京有限公司)从 200 μl 患者血清中提取 HBV DNA，按试剂盒说明书进行操作。提取的 HBV DNA 溶于 100 μl 洗脱液中-20℃保存至使用。

1.3.2　标准品及标准曲线的制备　提取 2 份 HBV 患者血清样本 HBV DNA 经由直接测序与 NCBI 公布的标准 B、C 序列比对后，证实分别为 B 型和 C 型基因，将其全长基因组构建到真核载体 pCDNA3.1 中，经过转化感受态细胞 JM109，中量提取重组质粒 DNA 及测序验证等步骤获得标准品[5]，经紫外分光光度计测定所提质粒 DNA，经换算 B、C 型标准品初始浓度分别为：2.95×10^9 copies/ml，3.85×10^9 copies/ml。所得 B、C 型质粒标准品分别 10 倍递减梯度稀释成 10^8~10^4 copies/ml 范围内 5 个不同浓度，用于生成标准曲线。

1.3.3　荧光分型定量聚合酶链反应法（Real-time genotyping and quantitative PCR，GR-PCR）法分型及定量　B、C 型特异引物及 B、C 特异型探针（TaqMan）设计参见文献[5]，见表 1。引物和探针由上海英骏生物有限公司合成。GQ-PCR 反应液体系 10 μl：1 μl DNA 模板，5 μl iQ™ Mutilplex Powermix 液（BIO-RAD Laboratories 美国），B、C 型探针各 0.3 μmol/L，B、C 型特异引物各 5 μmol/L。反应条件：95℃ 3 min；95℃ 15 s，62℃ 45 s，共 40 个循环。

1.3.4　DNA 标本检测　每批次检测均设立阴性对照、空白对照及标准品（10^8~10^4 copies/ml），每份 DNA 标本及标准品均采取 3 管平行检测，取平均值。

1.4　统计学分析

所有数据采用 SPSS11.5 软件包分析，计数资料数据均采用 χ^2 检验，计量资料数据用 $\bar{x}\pm s$ 描述，采用方差分析检验，若有差别，两两比较采用 *SNK-q* 检验，检验水准为 $\alpha=0.05$。

2　结　果

2.1　标准曲线与标本曲线生成

10 倍梯度稀释后的质粒标准品经扩增后，根据浓度的大小分别产生了 5 个不同的点，经分析软件处理自动生成标准曲线（相关性 $r^2=0.98$）（灵敏度：10^2 copies/ml）见图 1；提取的 DNA 标本经扩增后曲线见图 2~7。

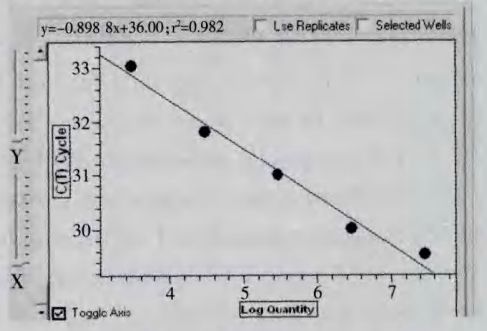


图 1　标准曲线（10 倍梯度稀释的 5 个不同浓度的标准品扩增后所得标准曲线）

2.2　标本结果判断

B 型探针以 HEX 荧光染料标记，C 型探针以 FAM 荧光染料标记，检测时在 1 个反应中分别同时检测 HEX 通道和 FAM 通道的荧光情况，通过选择荧光染料框切换HEX和FAM

表 1　GQ-PCR 引物和探针序列

引物和探针	序列 5'→3'	碱基位置(nt)	探针标记 5'→3'
HBV-B F	AGACTCGTGGTGGACTTC	250-267	
B 基因型探针	TCGCAGTCCCAAATCTCCA	311-329	HEX-BHQ-1
HBV-B R	ACAAGAAGATGAGGCATAGC	418-437	
HBC-C F	CTTGTTGGTTCTTCTGGACTAC	430-451	
C 基因型探针	CCTCTACTTCCAGGAACATCAAC	476-498	FAM-BHQ-1
HBV-C R	AGGATGATGGGATGGGAATAC	600-620	

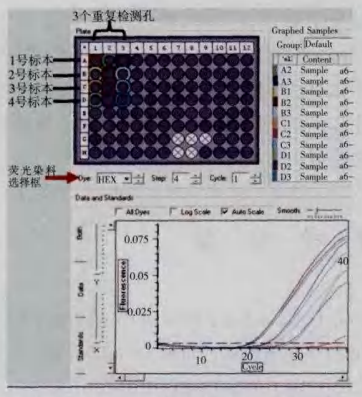


图 2　1、2、3、4 号标本在 HEX 通道下的荧光信号

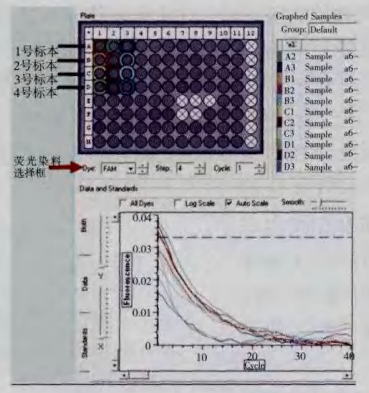


图 3　1、2、3、4 号标本在 FAM 通道下无荧光信号

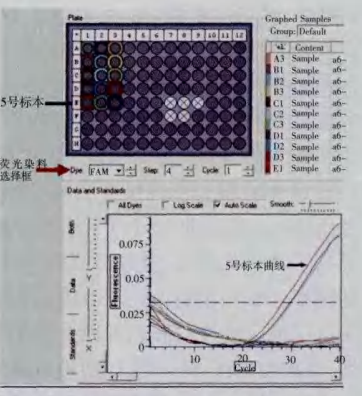


图 4　5 号标本在 FAM 通道下的荧光信号

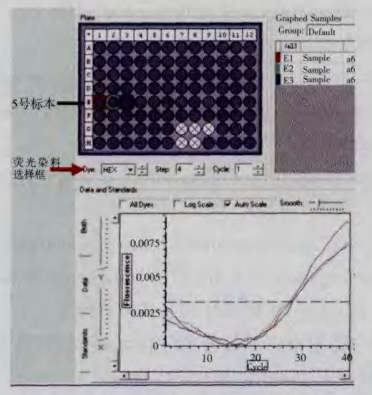


图 5　5 号标本 HEX 通道下的荧光信号

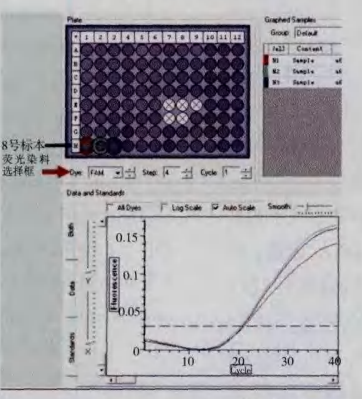


图 6　8 号标本在 FAM 通道下的荧光信号

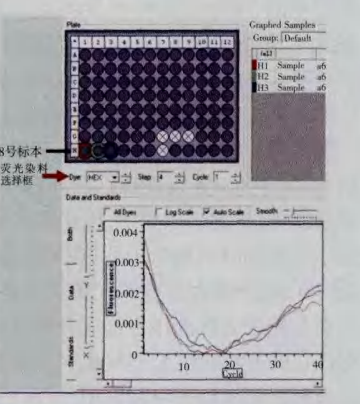


图 7　8 号标本在 HEX 通道下无荧光信号

通道，在 HEX 下出现的荧光信号为 B 型，在 FAM 下出现的荧光信号为 C 型，2 个通道都有荧光信号则为 B+C 混合型。1、2、3、4 号标本只在 HEX 通道有荧光信号，而在 FAM 通道无荧光信号，表明 4 个标本均为 B 型（如图 2、3）；而 5 号标本品在两个通道都有信号，说明为 B+C 混合型（如图 4、5）；8 号标本只在 FAM 通道有荧光信号，而在 HEX 通道无荧光信号，表明 8 号标本为 C 型（如图 6、7）。

2.3　DNA 标本分型结果

本组实验中 152 例标本成功分型 148 例（97.37%），HBV 各基因型及其感染者性别分布见表 2。148 例慢性乙型肝炎患者 HBV 基因分型结果：基因 B 型 109 例（男 88 例、女 21 例）、基因 C 型 10 例（男 6 例、女 4 例）、基因 B+C 混合型 29 例（男 24 例、女 5 例）。B 型、C 型、B+C 混合型检出率分别为 73.65%（男 74.58%，女 70.00%）、6.76%（男 5.08%，女 13.30%）、19.59%（男 20.34%，女 16.70%）。基因 B 型 HBV 检出率最高，同其他基因型比较差异有统计学意义（$P<0.05$），B+C 混合型次之，C 型检测率最低。3 组基因型分布在性别间差异无统计学意义（$\chi^2=2.64$，$P>0.05$）。

表 2　HBV 各基因型分布及在不同性别检出率 n(%)

性别	n	B型	C型	B+C混合型
男	118	88（74.58）	6（5.08）	24（20.34）
女	30	21（70.00）	4（13.30）	5（16.70）
合计	148	109（73.65）	10（6.76）	29（19.59）

2.4　DNA 标本定量结果

所测样本曲线由分析软件记录显示在标准曲线上，得出数值：B 基因型定量值范围 4~12 $\log_{10}$copies/ml、均值和标准差（7.94±1.44）$\log_{10}$copies/ml，C 基因型定量值范围 5~10 $\log_{10}$copies/ml、均值和标准差（8.12±1.64）$\log_{10}$copies/ml，基因 B+C 混合型定量值范围 4~10 $\log_{10}$copies/ml、均值和标准差（7.45±1.59）$\log_{10}$copies/ml，见表 3。3 组数据经单因素方差分析结果显示各基因型之间病毒载量无相关性（$F=2.17$，$P>0.05$）。

表 3　基因型与 HBV DNA 水平关系

		B型	C型	B+C混合型
HBV-DNA	定量值范围	4~12	5~10	4~10
	均值及标准差	7.94 ± 1.44	8.12 ± 1.64	7.45 ± 1.59

注：HBV-DNA 采用（$\log_{10}$copies/ml）单位

3　讨　论

由于 HBV 逆转录酶缺乏 3'→5' 外切核酸酶活性，HBV 复制过程中基因变异率较高，因此在长期突变和重组的过程中，HBV 会在不同的地区形成相对稳定的野毒株，表现出来的就是基因型的地域差异。根据 HBV 核酸序列异质性，目前分为 A~H8 个基因型。最近在东南亚地区和日本又发现了不同于以往核酸序列的新基因型：I 型和 J 型[1,2]。据报道我国主要是以 B、C 型为主[7]，少数地区可见 A、D、F 型[8]，重庆地区仅见 B、C 型、B+C 混合型及少量 D 型的报道[9,10]，未见其他型分布。越来越多的研究证据显示肝病的转归，病情的进展等都与 HBV 基因型相关。Lin 等[11]认为慢性 HBV 基因 C、D 型感染者比 A、B 型感染者更晚出现血清转化，并发生更严重的

疾病进展，预后也更差。A、B 型较 C、D 型对干扰素抗病毒治疗有更好的应答。Kao 等[12]认为 B 基因型 HBV 感染可能与年轻患者的肝癌发生有关。而 Yin 等报道[13] B+C 混合基因型在病毒载量和肝病进展方面较 B 型和 C 型更重。为了研究重庆地区目前基因型的分布，我们采用了可以同时检测 B 型、C 型并且对 B+C 混合型灵敏度和特异性更高的 GQ-PCR 法对患者血清乙肝病毒进行检测。结果发现，基因型 B 型检出率显著高于其它基因型，其差异具有统计学意义（$P<0.05$），HBV 各基因型分布与性别无关（$P>0.05$），结果与文献[5,10]报道一致。表明重庆地区慢性乙肝患者以 B 基因型为主，B 型为优势基因型，其次为 B+C 混合型，C 型检出最少。

本组数据中 B+C 混合型检测率低于 B 型，但显著高于 C 型（$P<0.05$）。我们发现 B+C 混合型的检出率跟以往的研究结果有所不同，用此方法检出 B+C 混合型比率高于其他文献的报道[10]。考虑可能有以下几个方面的原因：第一、目前 HBV 基因分型的方法有多种，但都有各自的优缺点。直接测序法是目前对基因分型的金标准，但对混合型敏感性低，只有当某一型在混合型中所占比例大于 20%才能被检出。型特异引物法和 INNO-LiPA 线性探针法都有一定的敏感性检测到混合型基因，但检测步骤繁琐，检测成本高。而 GQ-PCR 法的优点是不仅可同时对血清中的 HBV 基因分型及 DNA 定量，并且对 B+C 混合基因型检测较传统方法敏感性和精确性高[5]，可鉴别某些用直接测序不能区分的混合型 HBV 感染。我们考虑以往的方法对混合型检出欠敏感的情况下，有可能将部分混合基因型误检为单基因型，从而增加了单基因型在疾病中的比例。第二、由于 HBV 的高复制活性以及高变异性，经过几年的突变和重组，HBV 种群发生了转变。或者由于抗病毒治疗出现了临床变迁，使优势种群由以前的 B 型、C 型变为 B 型、B+C 混合种群。第三、HBV 在体内是以准种的形式存在，我国大部分地区是以 B、C 型为主要基因型，但南北分布有地域差异[7]，北方以 C 型为优势基因，东部和中部主要是 B 型基因，而在南部（云南、广东等）B、C 型比例接近。流行病学分析表明在人口的流动和交叉感染后，可能导致混合型感染比例的增加。

本实验不仅能分析 HBV 基因型，而且能对其绝对值进行定量，灵敏度可达到每毫升 100 个拷贝[5]，明显优于目前临床所采用的方法（其灵敏度为 1 000 个拷贝/ml）。我们研究结果显示：HBV DNA 水平在 HBV 基因型中的分布没有统计学差异，与文献[9]报道一致。说明 HBV 基因 B、C 型在感染者体内复制能力无差别。由于混合感染所致患者体内基因型种类增加，HBV 混合型可能对抗病毒药的应答不佳，并且还可能出现耐药的病毒株，从而造成抗病毒治疗的失败。有报道[14] HBV 混合型感染对干扰素治疗应答更差，而目前此类对混合基因型的抗病毒治疗研究还较少，因此建立一套对混合基因型敏感的监测手段尤为重要。

GQ-PCR 法具有很高的灵敏度和准确度，并通过与直接测序法和临床定量方法相比较而得到验证[5]。GQ-PCR 法不仅可以大幅提高 B+C 混合型的检出，还能对混合型中各型分别定量，极大的方便了对病情的发展和抗病毒治疗的监测，尤其适合对混合基因型中各比例的消减情况的观察。

本研究的不足之处是不能鉴别其他基因型及 B、C 亚型，目前 B 基因型已被分出 9 个亚型，C 型也被分出 6 个亚型[15]。有报道[16]称，Bj 亚型是肝病病情严重的独立预测因素之一，前 C 区或者核心启动子区的变异也是导致病情加重的因素，因此我们准备进一步对 B、C 型进行亚型分类，并测序分析有无前 C 区和启动子区的变异。

参 考 文 献

[1] Olinger C M, Jutavijittum P, Hubschen J M, et al. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(11): 1777-1780.

[2] Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patientand provisionally assigned to new genotype[J]. J Virol, 2009, 83(20): 10538-10547.

[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] Chu C J, Lok A S. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes [J]. Hepatology, 2002, 35(5): 1274-1276.

[5] Zhao Y, Zhang X Y, Guo J J, et al. Simultaneous genotyping and quantification of hepatitis B virus for genotypes B and C by real-time PCR assay[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(10): 3690-3697.

[6] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会·肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324-329.

[7] Wang Z, Huang Y, Wen S, et al. Hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in China[J]. Hepatol Res, 2007, 37(s1): 36-41.

[8] 董 梅, 张跃新. 乙型肝炎病毒基因型分布及临床意义[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(1): 56-57.

[9] 谭文婷, 邓国宏, 王宇明, 等. 重庆地区乙肝病毒基因型分布及其临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(24): 2321-2323.

[10] 曾爱中, 黄爱龙, 郭进军, 等. 型特异引物 PCR 法分析 238 株乙肝病毒基因型[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(1): 53-56.

[11] Lin C L, Kao J H. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2011, 26 (s1): 123-130.

[12] Kao J H, Chen P J, Lai M Y, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 2000, 118(3): 554-559.

[13] Yin J H, Zhang H W, Li C Z, et al. Role of hepatitis B virus genotype mixture, subgenotypes C2 and B2 on hepatocellular carcinoma: compared with chronic hepatitis B and asymptomatic carrier state in the same area[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(9): 1685-1691.

[14] Hannoun C, Krogsgaard K, Horalp, et al. Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon[J]. J Infect Dis, 2002, 186 (6): 752-759.

[15] Thedia M D, Muljono D H, Nurainy N, et al. Ethnogeographical structure of hepatitis B virus genotype distribution in Indonesia and discovery of a new subgenotype, B9[J]. Arch Virol, 2011, 12. [Epub ahead of print].

[16] Ozasa A, Tanka Y, Orito E, et al. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection[J]. Hepatalogy, 2006, 44(2): 326-334.

（责任编辑：冉明会）