维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)06-0601-05

HBV cccDNA 荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用

单幼兰,王 箭,尹一兵

(重庆医科大学检验系,重庆 400016)

【摘 要】目的:评估一个新设计的 HBV cccDNA 荧光定量 PCR 检测方法。方法:以肝穿组织为检测标本,采用 Lightcycle™ 探针,通过一对特殊引物,使 HBVcccDNA 可以扩增而病毒基因组不能扩增;同时利用一种依赖于 ATP 的特异性 DNase 提高反应的特异性,以此实现对 cccDNA 的检测。结果:成功建立了 HBV cccDNA 荧光定量 PCR 的检测方法,线性范围为 2.5×10^{1}~2.69×10^{9} 拷贝 /ml。对 5 个病例的肝穿样本进行分析,其中 3 例为乙肝感染患者,并均接受抗病毒治疗达 1 年,另 2 例为乙肝阴性患者。检测结果如下:1)2 例乙肝阴性患者的肝组织检测结果 cccDNA 及 tDNA 皆为阴性。2)接受拉米夫定治疗 1 年的病人 tDNA 为 7.10×10^{3} 拷贝 /ml,cccDNA 为 2.64×10^{3} 拷贝 /ml;接受恩替卡韦治疗 1 年的病人 tDNA 为 1.00×10^{5} 拷贝 /ml,cccDNA 为 4.04×10^{3} 拷贝 /ml;第 3 例病人接受拉米夫定治疗前 tDNA 为 6.62×10^{3} 拷贝 /ml,cccDNA 为 3.03×10^{2} 拷贝 /ml,拉米夫定治疗 1 年后 tDNA 为 5.19×10^{3} 拷贝 /ml,cccDNA 为 1.51×10^{2} 拷贝 /ml。结论:本研究结果显示,所建立的 HBVcccDNA 荧光定量 PCR 方法具有良好的线性范围,灵敏度、特异性及准确性均达到预期目标,而且检测所需样本量少,只需约 1mg 肝穿组织。可作为临床监测抗病毒治疗效果的有效手段和开展 HBV 复制调控研究的重要工具。

【关键词】乙型肝炎病毒;荧光定量;PCR;检测方法

【中国图书分类法分类号】R373.2+1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-10-13

Establishment and application of a fluorescent quantitative pcr method for cccDNA of HBV

SHAN Youlan, et al

(*Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluated a new fluorescent quantitative PCR method for HBV cccDNA. *Methods*: The specimens were obtained by hepatic puncturation. We designed a pair of specific primers to amplify not HBV genome but cccDNA as a method to detect it, using the ATP dependent Dnase to increase the specificity greatly. *Results*: We have established a new fluorescent quantitative PCR method for HBV cccDNA successfully, the linear range is from $2.5\times10^{1}$to 2.69×10^{9}copies per milliliter. The three of five patients were shown HBV positive and the other two were negative using the new method to analyze hepatic puncturation specimens. The HBV positive patients have all received one year long anti-virus therapy. 1) the two HBV negative patients were both cccDNA negative and tDNA negative. 2) the patient who has received one year long Lamivudine therapy had a DNA concentration of 7.10×10^{3}copies tDNA per milliliter serum and 2.64×10^{3}copies cccDNA per milliliter serum. The patient who has received one year long entecavir therapy had a DNA concentration of 1.0×10^{5}copies tDNA per milliliter serum and 4.04×10^{3}copies cccDNA per milliliter serum in his blood. tDNA concentration in the third patient was 6.62×10^{3}copies per milliliter serum, 3.3×10^{2}copies cccDNA per milliliter serum before anti-virus therapy, but after one year long Lamivudine therapy, the tDNA and cccDNA concentration reduced to 5.19×10^{3}copies and 1.51×10^{2}copies per milliliter serum respectively. *Conclusion*: This study shown that the fluorescent quantitative PCR had a good linear range, high sensitivity, specificity and accuracy, so it needs less specimen, for example 100 milligram hepatic puncturation specimen is enough. Although further study is needed, the fluorescent quantitative PCR will definitely become an efficient tool for anti-virus therapeutic effect monitoring because of its high sensitivity, specificity, efficiency and accuracy.

【Key Words】HBV; Fluorescentquantitative; PCR; Detective method

乙肝病毒感染影响了全球约三亿五千万人口,而且绝大多数为慢性感染,其中约 5%最终发展成肝硬化或肝癌,每年约有一百万人死于 HBV 感染引起的各种终末期肝病[1]。目前认为,HBV 复制经由一个特殊的中间体形式介导,即共价闭合环状双链 DNA(Covalently closed circularDNA, cccDNA)。

作者介绍:单幼兰(1963-),女,主管技师,硕士研究生,主要研究方向:临床检验。

维普资讯 http://www.cqvip.com

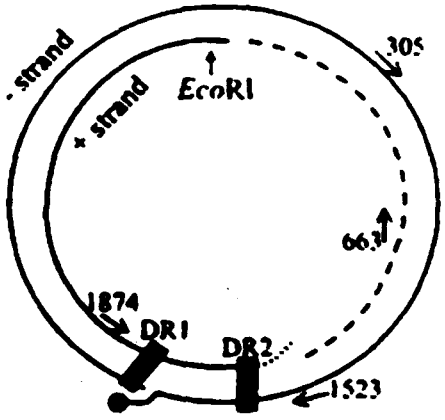


图 1 乙肝病毒基因结构

cccDNA 库的存在被认为是乙肝抗病毒治疗过程中产生药物耐受和停药反跳的重要原因。大量研究表明,HBV 慢性感染患者肝细胞内的 cccDNA 水平是决定抗病毒治疗效果的一个重要参数。发展一种快速、灵敏、高效的检测肝细胞内 HBVcccDNA 的实验方法,已成为临床药物试验研究及病理诊断的迫切需要。

近期的诸多研究表明,利用实时定量 PCR 技术能够检测并定量病毒颗粒中的 HBV DNA,但绝大多数的实验设计仅限于检测病人外周血中存在的 RC DNA,只有极少检测肝组织提取物中 HBV 复制中间体的报道[2-8]。

本研究旨在建立一种检测肝穿组织中低复制水平的 HBVcccDNA 的荧光定量 PCR 方法。其特点是使用一对跨越负链缺口区的特殊引物,将 cccDNA 与其它复制模板区分开来。照此设计,在扩增中,以 RCDNA 为模板的 DNA 合成将自动停止在每一条模板缺口处的 5' 末端,而 cccDNA 因没有缺口,合成不会停止。然而由于部分延伸产物存在互补区域,通过互相杂交可形成假阳性,因此通过采用一种依赖于 ATP 的脱氧核糖核酸内切酶处理可以消除此假阳性现象,同时,RCDNA 由于包含一个对上述脱氧核糖核酸酶敏感的单链区域,采用该酶消化后的 PCR 扩增,其阳性信号理论上只应产生于 HBVcccDNA[9,10]。这一处理极大地降低了产生假阳性的机率,并且提高了 HBVcccDNA 定量的准确性和特异性。

1 材料与方法

1.1 病例及临床样本

两例乙肝阴性肝穿组织样本来自 2005 年 1 月于重庆医科大学附属第二医院接受手术的患者。3 例慢性乙肝肝穿组织样本来自 2003 年 8 月 ~2004 年 8 月于重庆医科大学附属二院传染科临床药理基地参加"恩替卡韦与拉米夫定对照用于治疗中国成人慢性乙肝安全性和抗病毒活性的Ⅲ期临床试验"的自愿者。特异性实验中对照血清标本采自重庆医科大学附属第二医院传染科临床实验室,标本经 HBV DNA 荧光定量 PCR 检测为阳性(拷贝数均大于 10^7)。

1.2 实验材料

1.2.1 主要试剂

①质粒和菌株:重组质粒 pCDNA-HBV1.3,带有 HBV 完整基因组,由美国芝加哥大学分子肿瘤中心何通川博士惠赠。宿主菌 DH5 由重庆医科大学病毒性肝炎研究所提供。

②荧光探针:由何通川博士委托美国 PROLIGO 公司合成。序列如下:

(1)cccDNA 探针

HBV_1562(上游探针或供体探针)

5' -TTCTCATCTGCCGGACCGTG_fluorescein-3'

HBV_1584 (下游探针或受体探针)

5' -LC_Red640_CACTTCGCTTCACCTCTGCACGT_phosphote-3'

(2)tDNA 探针

HBV_377(上游探针或供体探针)

5'-GGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCA_florescein-3'

HBV_403(下游探针或受体探针)

5'-LC_Red640_TTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCC_phosphote-3'

③引物:由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。使用 MEGALGN 程序比较乙肝病毒 A~F 6 种基因型的同源性,于保守序列区段,使用 Oligo 软件 Version5.0 设计引物。序列如下:

(1)cccDNA 引物

HBV_1523(上游引物)5'-GGGGCGCACCTCTCTTTA-3'

HBV_1874(下游引物)5'-AGGCACAGCTTGGAGGC-3'

(2)tDNA 引物

HBV_305(上游引物)5'-GCCAAAATTCGCAGTCC-3'

HBV_663(下游引物)5'-AAACTGAGCCAGGAGAAA-3'

④ Plasmid_safeTM ATP_dependent DNase 购自 EPICENTRE 公司。

⑤肝穿组织 DNA 提取试剂盒 购自 QIAGEN 公司。

⑥酶纯化试剂盒 购自 QIAGEN 公司。

1.3 实验方法

①肝组织中 DNA 的提取 按照试剂盒说明书操作。

②酶处理及纯化 按照试剂盒说明书操作。

③荧光定量 PCR 在独立密闭的毛细管中,用两种引物和探针扩增每一个样品。经过反复优化扩增条件,得到扩增

维普资讯 http://www.cqvip.com

循环条件如下：1.预变性 95℃ 5min，2.变 性 95℃25s，退火 54℃30s，延伸 72℃ 25s，共 40 个循环 。扩增反应液配方为：引物 1(25μmol/l)1.2μl，引物 2(25μmol/l)0.4μl，探针 1 (5μmol/l)0.4μl，探针 2 (5μmol/l)0.4μl，Taq(2.5U) 0.5μl，$MgCl_2$(25mmol/l)1.0μl，10×PCR 缓冲液 2.0μl，dNTP (2.5m mol/l)2.0μl，H_2O5.5μl，模板 5.0μl。数据在退火期的"single"模式获得，选择 F_2/F_1 通道，以"fit point"描点法分析荧光曲线，样本的荧光信号高于基线被认为是阳性。

2 结 果

2.1 方法学研究

2.1.1 引物设计

目前已知，HBV 共分 A~H 8 种基因型。采用 MEGALGN 软件分析发现，A~F 6 种基因型中分别存在两个高度保守的区段，可用于引物和探针的设计[9]。其中 305/663 区引物可扩增几乎所有的 HBV 复制中间体，用于 HBV 总 DNA 检测；1523/1874 区引物，由于横跨 HBV 的缺口区，理论上只能扩增不含缺口的 cccDNA 而无法扩增含缺口的 RcDNA 等复制中间体。

2.1.2 模板制备

①HBVcccDNA 标准模板制备

pCDNA-HBV1.3 为含 HBV 完整基因组的重组质粒，大小为 9.4ku，由于提取质粒主要以共价闭合环状双链 DNA 形式存在，其中 HBV 基因组类似于肝组织中 HBVcccDNA，因此，pCDNA-HBV1.3 可作为方法学研究中替代 HBVcccDNA 的标准模板。

②血清/肝组织中 HBVDNA 制备

分别采用 Roche 公司和 Qiagen 公司产品提取血清/肝组织中 HBVDNA。与传统的酚/氯仿方法比较，无论是回收率或重复性均有明显改善。其肝组织用量减少至 1mg，提取时间由 7h 减少至 3h 以内，同时兼顾了大规模筛查及荧光定量 PCR 对样本的要求。

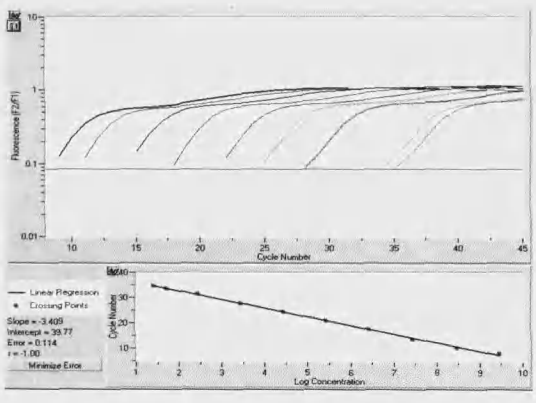


图 2 cccDNA 引物扩增的标准曲线



From M to 10 reprent marker，2.69×10^9copies/ml，2.69×10^8copies/ml，2.69×10^7copies/ml，2.69×10^6copies/ml，2.69×10^5copies/ml，2.69×10^4copies/ml，2.69×10^3copies/ml，2.69×10^2copies/ml，5×10^1copies/ml，2.5×10^1copies /ml，respectively

图 3 cccDNA 标准曲线扩增产物电泳图谱

2.1.3 荧光定量 PCR 方法的建立及标准曲线的绘制

以梯度稀释的质粒 pCDNA-HBV1.3 为起始模板，分别用 cccDNA 引物/探针和 tDNA 引物/探针进行荧光定量 PCR 扩增，通过优化反应体系，得到线性范围为 2.5×10^1~2.69×10^9 拷贝/ml。采用 cccDNA 引物、探针扩增建立的标准曲线(见图 2)。图 2 为扩增曲线图，下图为标准曲线回归图，回归曲线相关系数 r=-1.00。采用 tDNA 引物、探针扩增建立的标准曲线与 cccDNA 引物、探针扩增建立的标准曲线基本相同，本文不再赘列。

2.1.4 检测灵敏度

在标准曲线制作过程中，通过测定 Ct 值可直接反应检测的灵敏度。在荧光定量 PCR 方法中，模板的起始拷贝数越低，Ct 值越大。当 Ct 值大于 38 时，定量结果被认为是不确切的。由图 3 可见，低至 2.5×10^1 拷贝/ml 的样本经 40 次循环扩增后，琼脂糖凝胶电泳中仍可见明显的扩增条带。即检测限为 2.5×10^1 拷贝/ml。

2.1.5 检测特异性

①以四份 HBVDNA 阳性血清标本中提取的 DNA 为实验对象，编号分别为 364，365，366，367。采用常规荧光定量 PCR 检测其 RCDNA 含量，定量结果分别为：1.36×10^8 (拷贝/ml)，4.24×10^8 (拷贝/ml)，2.86×10^8(拷贝/ml)，2.09×10^8(拷贝/ml)。

②采用 Plasmid_safeTM ATP_dependent DNase 处理上述样品，然后以 cccDNA 引物进行扩增，与未处理组比较，处理组全部未扩增，与预期结果相符，

维普资讯 http://www.cqvip.com

表明血清中不存在 cccDNA；未处理组虽有少量扩增，但 Ct 值较高，与 10^2 质粒扩增的 Ct 值相当，估计为非特异性扩增所致的假阳性，此类扩增经酶处理后消失，也进一步证实上述推理的可靠性(结果未详列)。

③采用 tDNA 引物对上述样品进行扩增时，未处理组 Ct 值与 10^7 质粒扩增的 Ct 值相当，酶处理组全部未扩增，表明血清中 HBVRCDNA 对酶处理极为敏感。

④为进一步验证酶处理对于提高 HBVcccDNA 检出特异性的作用，在上述样品中加入 2.69×10^2 拷贝/ml 的质粒 DNA(cccDNA)后再进行酶处理，结果表明，当采用 cccDNA 引物进行扩增时，处理组与未处理组 Ct 值基本相当，说明 ATP_dependent DNase 只选择性降解 RCDNA，而对 cccDNA 没有作用；对照组(2.69×10^2 拷贝/ml 的质粒)酶处理前后 Ct 值变化不明显也进一步支持上述结论(结果未详列)。

上述结果还进一步提示，若 RCDNA 与 cccDNA 同时存在，即使 cccDNA/RCDNA 比例约为 1:100000 时，采用 ATP_dependent DNase 酶处理，也能有效排除 RCDNA 等的干扰，准确、灵敏、特异地检出 cccDNA。

2.2 病例研究

在建立了分析方法的标准曲线、分析了方法的灵敏度与特异性之后，开始对 5 个病例的肝组织样本进行 HBVcccDNA 及 tDNA 检测。

拉米夫定(Lamivudine，LAM)为一口服核苷类药物，全称 2',3'-双脱氧-3-硫胞嘧啶核苷。LAM 抑制 HBV 复制的作用机理，系药物在细胞内经磷酸化后，与脱氧胞嘧啶核苷(dCTP)竞争，进入合成中的 DNA 链，使其不能继续延伸而终止复制。这一反应不仅存在于合成负股 HBVDNA 的逆转录过程中，同样也可在合成正股 HBVDNA 的转录过程中实现。恩替卡韦的作用机理与 LAM 类似。本研究共检测了 3 例 HBV 阳性肝穿样本的 HBVcccDNA。在抗病毒治疗 1 年后其 HBVcccDNA 分别为：20601，2.6×10^3 拷贝/ml；20278，4.0×10^3 拷贝/ml；20100 治前，3.0×10^2 拷贝/ml，治后 1.5×10^2 拷贝/ml。病例 20601 与 20100 抗病毒治疗 1 年后，血清 HBVDNA 降至检测限以下，但肝组织内 HBVcccDNA 不受影响。病例 20100 治疗前后的 HBVcccDNA 含量没有明显变化，其在血清 HBV DNA 降至低于检测限后继续服药半年，停药 2 个月后出现反跳，血清 HBVDNA 升至 1.5×10^8；病例 20278 治疗 52 周后血清 HBVDNA 为 4.4×10^3 拷贝/ml，继续服用恩替卡韦 12 周，血清 HBVDNA 仍为 1.0×10^4 拷贝/ml。由此可见，抗病毒治疗过程中的药物耐受及停药反跳现象确与肝细胞内 HBVcccDNA 的存在息息相关。

3 讨 论

如前所述，本研究旨在建立一种肝组织内 HBVcccDNA 的定量检测方法。cccDNA 为 HBV 复制的起始分子，也是 HBV 赖以生存的关键分子。检测其表达水平，无论对抗病毒疗效的评价，还是对病毒复制规律的认识，无疑都至关重要。但长期以来，由于受以下因素的制约，HBVcccDNA 检测进展缓慢。首先 cccDNA 主要存在于肝细胞中，标本取材困难，加上含量甚微，普通检测方法难以奏效，既往主要采用 Southern 杂交进行检测，肝组织标本用量较大且操作复杂，无法作为临床药物监测的工具；其次，HBV 在复制过程中，存在众多的复制中间体，包括 cccDNA、RCDNA、ssDNA、dsDNA 等，常规 PCR 方法很难从中选择性扩增 cccDNA。

针对上述存在的问题，我们从以下两方面提出可能的解决措施。其一，采用近年发展起来的基于杂交探针的荧光定量 PCR 方法解决检测灵敏度问题；其二，采用特异性引物设计和核酸酶处理提高 cccDNA 检出的特异性。

通过本项目研究，我们成功建立了一种高效特异、简便易行的检测乙肝患者肝组织内 HBVcccDNA 的定量分析方法，尤其适用于临床大规模评价抗病毒疗效研究。

迄今为止，见于资料报道的 HBVcccDNA 实时荧光定量检测方法分别由 He et al[10](2002 年)和 Jnu-Bin et al(2003 年)建立[11]。两者均采用 Taqman 技术，线性范围分别为 1×10^2~1×10^7 拷贝/ml；5×10^1~5×10^5 拷贝/ml。PCR 反应体系的总体积分别为 20μl 及 50μl，检测所需的肝组织量，He，et al 未报道，Jnu-Bin，et al.为 10mg。与使用 LighcyclerTM 探针的本研究所建立的方法相比，检测下限低 2~4 倍，检测上限低约 200~5000 倍。而且本研究的扩增反应体积为 20μl，检测所需肝组织量仅为 1mg。

本研究尤为重要的是采用了特殊的酶切技术。这一技术的应用，彻底解决了由于部分延伸产物互相杂交而产生假阳性的问题。从所进行的特异性验

维普资讯 http://www.cqvip.com

证实验中我们看到:血清样本未酶切时有非特异性扩增存在,Ct 值与质粒 10^2 拷贝/ml 接近,酶切后,即使模板为 10^8 拷贝/ml,定量亦为阴性;当用质粒作为模板时,其灵敏度水平在酶切前后差异不大,这提示 cccDNA 不受酶切影响,而 RCDNA 被特异地除去;当 10^2 拷贝/ml 质粒与 10^8 拷贝/ml 血清样本混合在一起时,可以看到:未酶切时得到的扩增 Ct 值与单独的血清样本基本相同,而酶切后得到的结果则为质粒扩增 Ct 值。这一实验结果清楚地证明运用我们所建立的酶切技术及 PCR 定量扩增条件可以高效地将 RcDNA 与 cccDNA 区分开来。为了更好地评价实验的分析特异性,我们取一组四个血清样本进行酶切前后对照实验,正如所期望的那样,四个高拷贝数的阳性血清样本未酶切时用 cccDNA 引物、探针扩增有假阳性存在,其 Ct 值与质粒 10^2 拷贝/ml 接近,而酶切后四例样本均为阴性。由于方法具有的高灵敏度,使得病例研究中的肝穿组织需要量小到 1mg,这是目前为止最小的肝穿组织检测量。由于肝穿组织较为难于得到,本方法为临床肝穿组织 HBVcccDNA 检测提供了更现实的可行性。

综上所述,本研究建立了一种高灵敏度、高特异性、快速、简便、可靠的检测肝穿组织中 HBVcccDNA 的荧光定量 PCR 方法,此方法对于监测抗乙肝病毒药物疗效、指导临床用药以及探讨乙肝病毒复制调控规律均具有十分重要的作用。

参 考 文 献

[1] Seeger C,Mason WS.Hepatitis B virus biology[J].Microbiol. Mol. Biol.Rev,2000; 64: 51-68.

[2] Brechtbuehl K,Whalley SA,Dusheiko GM, et al. A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus [J].J Virol Meth,2001;93: 105-113.

[3] Chen RW,Piiparinen H, Seppnen M,et al. Real-time PCR for detection and quantification of hepatitis B virus DNA[J]. J Med Virol,2001;65:250-256.

[4] Ho SK,Yam WC, Leung ET,et al. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using fluorescent hybridization probes[J].J Med Microbiol,2003;52:397-402.

[5] Kohmoto M,Enomoto M, Yano Y,et al.Detection of serum hepatitis B virus DNA by real-time quantitative polymerase chain reaction(TaqMan PCR)during lamivudine treatment:comparison with three other assays[J].Hepatol Res,2003;26:125-133.

[6] Pas SD,Niesters HG. Detection of HBV DNA using real time analysis[J].J Clin Virol,2002;25:93-94.

[7] Schaefer S,Glebe D,Wend UC,et al.Universal primers for real-time amplification of DNA from all known Orthohepadnavirus species[J].J Clin Microbiol,2003;27:30-37.

[8] Zanella I,Rossini A, Domenighini D,et al. Quantitative analysis of hepatitis B virus DNA by real-time amplification[J].Eur J Clin Microbiol Infect Dis,2002;21:22-26

[9] Wu CH,Ouyang EC,Walton C,et al. Hepatitis B virus infection of transplanted human hepatocytes causes a biochemical and histological hepatitis in immunocompetent rats[J].World J Gastroenterol,2003;9:978-983.

[10] Norder J,Ebert JW,Fields HA,et al.Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus[J].Virology,1996;218;214-223.

[11] Jun-Bin S,Zhi C,Wei-Qin N,et al.A quantitative method to detect HBV cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction[J].J Virol Meth,2003;112:45-52.

(上接第 596 页)

参 考 文 献

[1] 廖二元,伍贤平,黄 干,等.用三次回归模型建立女性多骨骼部位骨密度参考数据库及其应用评价[J].中华内分泌代谢杂志,2003;19:282-286.

[2] Phillipov G,Phillips PJ.Skel,et al.site bone mineral density heterogeneity in women and men[J].Osteoporos Int,2001;12:362-365.

[3] 陈建庭,谭小云,金大地,等.广州地区 1403 例成年女性骨密度测定分析[J].中国骨质疏松杂志,2003;9(3):262-265.

[4] 刘忠厚.骨质疏松研究与防治[M].北京:化学工业出版社,1994. 183-188.

[5] 张兴雨, 秦 沛. 腰椎和髋部骨密度测定在骨质疏松诊断上的相关性分析[J].中国临床康复,2005;9(3):198-199.

[6] Li Ninghua,Ou Pirhong,Zhu Hanmin,et al.Prevalence rate of osteoporosis in the mid-aged and elderly in the selected parts of China[J].Chinese medical Journal,2002;115(5):773-775.

[7] Moreira Kulak CA,Schssheim DH,McMahon DJ,et a1.Osteoporosis and low bone mass in premenopausal and perimenopausal women[J].Endocr Pract,2000;6(4):336-337.

[8] 唐 海,任素梅,罗先正.老年人髋部及腰椎测量点对骨质疏松诊断的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2002;8(4):333-334.