维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1993年第18卷第2期

(26) 164—167

乙型肝炎，聚合酶链反应，PCR，诊断

聚合酶链反应在乙型肝炎诊断中的应用及进展

肝炎研究所 熊良仕 综述 张定凤 审校

R512.620.4

中图分类号 R512.62；Q78

自Saiki等[1]1985年首次用体外酶放大法诊断镰刀型贫血病以来，聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction,PCR)很快用于分子生物学各个领域。它不仅用于基因分离、克隆和核酸序列分析，还用于突变体构建、基因表达调控研究，遗传病、传染病诊断及法医鉴定[2,3]。本文就PCR在乙型肝炎诊断中的应用及进展作一综述。

PCR原理及方法

简单地说，在模板DNA、四种脱氧核糖核苷酸及引物存在条件下，利用Taq DNA聚合酶，经变性、退火、延伸三个阶段，连续重复数十次将目的基因体外扩增。由于每次循环产生的DNA均能成为下次循环的模板，故产物成几何级数增加。三十次循环后，理论上扩增10^9倍，一般认为可达10^6~10^7倍[4,5]。用于乙型肝炎诊断主要优点在于：其一，短时间内将待测DNA或RNA迅速扩增数百万倍，提高检测灵敏度；其二，可迅速得到大量某一特定DNA片段，对于测序、核苷酸变异分析提供了极大方便[6]。目前改进方法有快速放大cDNA末端(RACE)、反向PCR、巢式PCR、重组PCR、不对称PCR、定量PCR[7]以及锚定PCR[8]等。

PCR在乙型肝炎中的应用及进展

1. 用于HBV DNA检测

(1) 血清HBV-DNA检测

Chemin[5]、Sumazaki[9]、Kaneko[10],[11]、Baker[12]等用PCR、斑点杂交两种方法同时检测HBsAg阳性患者血清HBV-DNA，结果如下表：

从表中可以看出：PCR检测HBeAg阳性组，HBV-DNA检出率均为100.0%，HBeAg阴性组检出率为80%左右；斑点杂交HBV-DNA检出率HBeAg阳性组为90.0%左右，HBeAg阴性组仅30%左右。表明PCR法检测血清HBV-DNA明显优于斑点杂交。

	HBsAg+HBeAg(+)组			HBsAg+HBeAg(-)组		
	例数	斑点杂交(%)	PCR(%)	例数	斑点杂交(%)	PCR(%)
Chemin等	14	14(100.0%)	14(100.0%)	11	2(18.2%)	10(90.9%)
Sumazaki等	6	0	6(100.0%)	8	0	3(37.5%)
Kaneklo等[10]	14	9(64.3%)	14(100.0%)	9	2(22.2%)	8(88.9%)
Kaneklo等[11]	16	15(93.8%)	16(100.0%)	25	10(40.0%)	16(64.0%)
Baker等	31	30(96.0%)	31(100.0%)	46	14(30.0%)	36(78.0%)

维普资讯 http://www.cqvip.com

最近，Liang等[12]报告采用抗-HBs单抗吸附/PCR扩增67例HBsAg阴性的特发性慢性肝病患者血清HBV-DNA。第一组，HBV血清学标志均阴性36例，第二组，血清抗-HBs、抗-HBc阳性31例。结果：第一组11例（30.0%），第二组10例（32.3%）检出低水平HBV DNA。推测常规方法不能检出的低水平HBV感染是特发性慢性肝病的重要病因。

（2）肝组织中HBV DNA检测

Lampertico等[14]用PCR检测15例肝组织标本中HBV-DNA存在情况。血清仅HBsAg阳性5例，抗-HBs、抗-HBc阳性1例，HBV血清学标志阴性8例，1例胎儿未能检测。结果6例血清学标志均阴性者肝组织中无一例检出HBV-DNA。认为PCR检测HBV感染是一个有效的诊断手段，将有助于肝炎病毒发病机理的研究。

最近，Shindo等[15]报告用PCR方法检测慢性乙肝、非甲非乙型肝炎肝组织中HBV-DNA。55份肝活检标本中，血清HBsAg、HBeAg阳性的慢性肝炎11份，慢性非甲非乙型肝炎44份（其中血清抗-HCV阳性33份）。结果11份血清HBsAg、HBeAg阳性的慢性肝炎肝组织中HBV DNA均阳性，25份冰冻非甲非乙型肝炎肝组织中HBV-DNA无一例阳性，21份石蜡包埋的非甲非乙型肝炎肝组织中亦无一例HBV-DNA阳性。

2. 用于HBV DNA变异研究

（1）嗜肝DNA病毒基因组自然突变率

Girones等[16]对体内复制的地松鼠肝炎病毒（GHBV）基因组自然突变率进行了研究。结果表明基因组核苷酸替代率≤2.0×10^{-4}/位点/年，比RNA病毒突变率高10—100倍，与逆转录病毒gag基因组突变率相同。

（2）HBV-DNA的Pre-C/C区基因突变

Brunetto等[17]报告用Pre-C/C区寡核苷酸引物对7例HBsAg阳性、HBeAg阴性肝炎患者血清进行PCR扩增，随后克隆入M_{13}噬菌体或采用不对称PCR、链终止法测序。结果发现6例放大的Pre-C DNA片段有三个突变位点均位于Pre-C/C区交界处，第1896位G→A突变产生一个终止密码，导致血清HBeAg缺乏。两种方法测序结果一样。据此推测，Pre-C突变是患者血清HBeAg阴性的原因，病毒基因组变异和严重肝病的关系也应引起注意。Fiordalisic等[18]对11例HBsAg、抗-HBe、抗-HBc及斑点杂交HBV-DNA均阳性患者血清进行PCR扩增、测序研究。结果发现Pre-C/C区有高度变异性，即使从同一例患者分离所得克隆亦有变异，80%有1—3个位点变异。第1836位T→C突变导致X基因终止密码消失，影响突变的X蛋白合成；第1896位G→A突变导致终止密码产生，阻止HBeAg合成及分泌。表明HBV含有逃逸宿主免疫高度变异的基因组。最近，Kasaka等[19]报告采用PCR、链终止法定序检测10例HBV重肝患者Pre-C变异情况。9例患者113个克隆Pre-C第83位核苷酸均有G→A突变，导致由色氨酸（TGG）转变为终止密码（TAG），阻止HBeAg合成与分泌；在另一例23个克隆中无一个有Pre-C突变；8例正常无肝衰的急性肝炎患者180个克隆对照组中无一例有Pre-C突变。表明Pre-C突变的变异株是暴发性肝炎。

最近，Carman等[20]报告用体外酶放大技术，链终止法定序对重肝与Pre-C变异关系进行了研究。18例HBV重型肝炎患者15例进行了定序。9例HBeAg阴性患者8例入院时血清检测即发现Pre-C区第1896位G→A突变；6例HBeAg阳性者未发现有Pre-C变异。含变异病毒株患者很快发展为肝性脑病，但生存率比无变异毒株或混合株高。认为当重型肝炎发生在慢性HBV感染由

维普资讯 http://www.cqvip.com

HBeAg向抗-HBe血清转化时，Pre-C变异可自发产生。

（3）S区基因突变

Yokosuka等[21]用S区的一对寡核苷酸引物对克隆的adr、adw亚型及从患者血清标本中提取的DNA进行PCR扩增，采用Sanger方法测序。结果发现：所分析的两个克隆都有d决定簇，即第122位密码子都是赖氨酸。第160位则不同：adr克隆株是精氨酸（AGA），adw克隆株是赖氨酸（AAA）。分析7例患者PCR产物在第122、160位密码子周围变异情况，发现5例是ads亚型，3例是adw亚型，第125、126、130、131、136、161和171位密码子发生变异，其中第126、131和161位变异引起氨基酸改变，重复两次得到同样结果。表明在放大过程中引起序列误差是非常稀少的。

（4）基因组缺失突变

Lampertico等[14]在用C区引物检测肝组织标本中HBV DNA时发现，22份样本中有2份其扩增片段比预想片段短30—40b_p，Southern杂交证实为HBV-DNA特异序列，换用S区引物扩增该样本又产生正常大小扩增片段。推测其与C区基因组缺失有关。

3．用于HBV-DNA复制状态的研究

Baginski等[22]采用RNA逆转录PCR对2例患者外用血单核细胞（PBMC）中HBV RNA存在状态进行了研究。两例患者均系抗-HBc阳性慢肝，病例一重叠感染HDV。结果发现两例患者PBMC胞核，胞质中均有HBV特异的mRNA POLY(A)序列，而没有斑点杂交或PCR所能检测到的HBV DNA序列。表明PBMC内存在HBV-DNA的转录，病例一的HBV-DNA阴性结果可能系由于HDV持续复制所致。

PCR检测中应注意的问题

由于PCR放大效能高，即使污染微量DNA分子，亦可出现假阳性，因此在操作过程中，以下问题值得注意。

1．实验室内最好安装紫外灯，不定期室内消毒。

2．所有缓冲液、滴头、离心管使用前均应消毒；滴头、离心管均一次性使用。

3．引物、dNTP、缓冲液应小量分装，在加样过程中样品、模板DNA最后加入。

4．操作前戴好手套，并经常更换，严格避免交叉感染。

5．每次试验中应设阳性、阴性对照，并做灵敏度检测。阳性结果必要时重复试验，阴性结果换用他区引物扩增或用重选PCR试验[23,24]。

展　望

PCR是生命科学方法上的又一次革命。它已广泛用于医学检测领域，如单疱病毒[25]、人类乳头瘤状病毒[26]、轮状病毒[27]、爱滋病病毒[28]、弓形体[29]及人类染色体基因检测[30]等，对遗传病、传染病的诊断以及发病机理的研究将发挥重要的作用。使用多个重迭引物，巢引物以及对扩增片段克隆、测序将有助于HBV的诊断、变异以及低水平复制机理的研究，利用PCR监测，也可用于随访抗病毒治疗疗效以及筛选有效抗病毒药物。

参考文献

[1] Saiki R.K.,et al.Science 1985;230:1350

[2] Schochetman G.,et al J Infect Dis 1988;156:1154

[3] Higuchi R.,et al Nature 1988;322:1543

[4] Malter J.S.,et al Hepatology 1991;13:188

[5] Chemin I.,et al.J Med Virol 1991;33:51

[6] Sambrook J.,et al.Molecular Cloning,

维普资讯 http://www.cqvip.com

2nd edition, New York, CSH Laboratory Presss 1989; 14.5
[7] Innis M.A., et al. PCR Protocols, Academic Presss, Inc., California 1990
[8] Loh E.Y., et al. Science 1989; 243: 217
[9] Sumazaki R., et al. J Med Virol 1989; 27: 304
[10] Kaneko S., et al. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 312
[11] Kaneko S., et al. Gastroenterology 1990; 99: 799
[12] Baker B.L., et al. Hepatology 13: 632
[13] Liang T.J., et al. Hepatology 1991; 13: 1044
[14] Lampertico P., et al: Am J Pathol 1990; 253
[15] Shindo M., et al. Hepatology 1991; 13: 167
[16] Girones R., et al. Virology 1989; 170: 595
[17] Brunetto M.R., et al. J Hepatology 1990; 10: 258
[18] Fiordalisi G., et. al. J Med Virol 1990; 31: 297
[19] Kosaka Y., et al. Gastroenterology 1991; 100: 1087
[20] Carman W.F., et. al. Hepatology 1991; 14: 219
[21] Yokosuka O., et. al. Gastroenterology 1991; 100: 175
[22] Baginski I., et al. J Infect Dis 1991; 163: 996
[23] Sambrook J., et al. Molecular Cloning, 2nd edition, New York, CSH Labratory Press. 14.14
[24] Gerken G., et al. Hepatology 1991; 13: 158
[25] Aurelius E., et al. The Lancet 1991, 337: 189
[26] Williamsom A.L., et al. J Med Virol 1991; 33: 165
[27] Eiden J.L., et al. J Clin Microbiol 1991; 29: 539
[28] Ou C.Y., et al. Science 1988, 238: 295.
[29] Weiss L.M., et al. J Infect Dis 1991; 163: 180
[30] Han J., et al. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88: 335

（收稿日期 1992-03-04）

简 讯

我校学报召开常务编委会

1993年3月12日下午，我校召开了一次学报常务编委会。会议由学报主编黄崇本教授主持。学报编辑室主任杜剑云教授向到会常委汇报了学报近年的工作情况。主管学报副校长邱宗荫教授到会。

会议主要议题是：为适应当前的发展形势进一步提高学报的质量；到会常务编委就这一问题进行了认真的讨论，并提出了一些好的建议。常委认为，学报质量主要体现在有高质量的学术论文，关键是如何调动我校科技人员积极性，鼓励多出科研成果，多写高质量的论文，投入学报。同时建议基层领导、各编委关心学报，宣传学报，把好论文质量关，鼓励作者将高质量的论文投入学报。有计划地参加各种大型学术会议，广泛组织稿件，也不失为拓宽稿源的一种好的办法。

邱副校长对学报工作很关心，指出学报是我校的一个重要窗口，近期要向我校各级领导宣传学报，使全校关心学报，积极向学报投稿。并表示要对我校办刊条件的完善等问题给予支持。

我校学报是向国内外公开发行的正式学术性刊物，在全国省内刊物评比中多次获奖，在国内具有一定影响，为把我校学报办得更好，为社会作出应有的贡献，希望全校师生都来关心学报。

学报编辑室

1993年3月22日