

乙型肝炎病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

何紫琪, 李从荣[△], 童永清

(武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

摘要:目的 建立一种采用 Lightcycler 系统进行 HBV DNA 实时荧光定量 PCR 的方法, 并探讨其临床应用价值。方法 针对 HBV 基因组 S 区设计一对扩增引物, 并通过预实验严格优化反应体系的组成和条件; 将 T 载体与 HBV RT 区扩增后纯化的产物进行连接反应, 然后转染大肠杆菌(DH5 α), 经蓝、白斑筛选后挑取阳性菌落, 提取质粒, 制备外标准品。结果 用于制成外标准品的质粒经 1:10 的缓冲液倍比稀释, 制作标准曲线, 线性方程为: $Y = -3.344X + 37$ ($r^2 = 0.9999$); 通过检测已知浓度并经倍比稀释的 HBV DNA, 表明其最低检测限为 5×10^2 IU/mL; 拷贝数介于 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^8$ IU/mL 之间的 HBV DNA 浓度与 Ct 值具有良好的线性关系。结论 外标法实时荧光定量 PCR 是一种定量相对准确、灵敏度高、特异性强、操作相对简便的方法; 该方法可用于乙型肝炎患者病情监测, 有效指导临床用药; 联合该法与血清标志物检测, 可更准确评价 HBV 感染者病情。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 聚合酶链反应; 质粒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)04-0464-03

Establishment of fluorescence quantitative polymerase chain reaction assay for HBV DNA detection

He Ziqi, Li Congrong[△], Tong Yongqing

(Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

Abstract: Objective To establish a high sensitive and reproductive real-time PCR assay for quantification of HBV DNA using the LightCycler System. **Methods** A pair of primers were designed targeting S area in HBV genome, and the reaction condition and component of the amplification system have been strictly optimized by pre-experiments. A ligation reaction was made between vector T and the amplification and purification PCR product of HBV reverse transcriptase, then the competent E. coli (DH5 α) were transfected by the ligation product. The positive recombinant-clone could be optioned through blue-white selection. Then the plasmids were extracted and made into external standard substance. **Results** Standard curve was manufactured using serial dilutions of HBV genomic DNA of known concentrations, and the liner equation and correlation coefficient was $Y = -3.344X + 37$ and 0.9999 respectively. It turned out that the lower limit of detection was 5×10^2 IU/mL with a good linear correlation ranging in $5 \times 10^2 - 5 \times 10^8$ IU/mL. **Conclusion** External standard real-time PCR is a method that is relatively accurate in quantitative analysis, highly sensitive, specific and convenient in handling.

Key words: hepatitis B virus; polymerase chain reaction; plasmid

HBV 属于嗜肝 DNA 病毒科的双链 DNA 病毒, 它可引起急、慢性肝炎。据世界卫生组织统计, 全球约有 20 亿人感染 HBV, 且有 3.5 亿人处于持续感染的状态, 每年全球因肝细胞癌或肝衰竭死亡的患者约有 100 万人^[1]。因此, HBV 感染的治疗一直是临床上占据重要地位的议题。由于患者血清中的 HBV 载量与疗效存在相关性, 因此治疗前后患者血清中 HBV 载量的变化往往能反映药物对患者的疗效, 并可作为患者的临床症状缓解与否的主要指标之一^[2-3]。本研究拟采用 lightcycler1.2 实时荧光定量 PCR 系统建立 HBV DNA 实时荧光定量检测的方法, 并探讨其临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 临床血浆标本来源 收集本院感染科和消化内科住院及门诊 HBV 感染患者(诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南》^[4])的血浆标本 200 例(男性 114 例, 女性 86 例), 患者年龄 14~79 岁, 平均(48 \pm 5.86)岁。

1.2 引物设计 一对 HBV RT 区的扩增引物, 扩增片段长约 989 bp, P1: 5'-TTC CCC CAC TGT TTG GCT TT-3', P2: 5'-

CTC AAG GTC GGT CGT TGA CA-3'; 一对 HBV S 区特异引物, 扩增区片段长约 122 bp, P3: 5'-GGG TCA CCA TAT TCT TGG GAA C-3', P4: 5'-CCT GAG CCT GAG GGC TCC AC-3'。该引物通过软件 Primer Premier 5.0 设计, 由美国 Invitrogen 公司合成。

1.3 仪器与试剂 普通 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司), 恒温摇床(江苏汉康有限公司), 细菌培养箱(上海 CANY 公司), 离心机(美国 thermo 公司), lightcycler1.2 实时荧光定量 PCR 扩增仪(美国 Roche 公司)。体液游离 DNA 提取试剂盒(上海 Lifefeng 公司), 凝胶回收试剂盒(美国 Axygen 公司), T 载体(大连 Takara 公司), LB 培养基(IPTG、X-gal、氨苄青霉素), 质粒 DNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司), SYBR Green I 荧光染料(大连 Takara 公司)。

1.4 方法

1.4.1 HBV DNA 的提取 严格按照 DNA 提取试剂盒说明书操作。

1.4.2 标准品的构建 取一例经测序法验证 RT 区无突变的

HBV 患者血浆标本,提取病毒 DNA,扩增该标本的 RT 区,纯化扩增产物,并将其与 PUCm-T 载体连接,以连接产物转化 DH5 α 大肠杆菌菌株,在含 X-gal、IPTG、氨苄的 LB 平板上筛选白色转化子菌落,摇菌后用质粒提取试剂盒提取质粒 DNA (经 PCR 验证为目的 DNA 片段)。用已知确定浓度的 HBV DNA 标准品校准其含量,并配成标准品。

1.4.3 实时荧光定量 PCR 检测 体系组成:2 SYBR Premix 10 μ L,引物(0.2 μ mol/L)1 μ L,模板 2 μ L,ddH $_2$ O 7 μ L,总体积 20 μ L。按照上述体系在毛细反应管中加入反应液,经瞬时离心后,置 Lightcycler1.2 扩增仪中进行扩增。扩增条件为:37 $^{\circ}$ C 3 min;92 $^{\circ}$ C 1 min;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。每次延伸结束时检测 F1 通道的荧光强度。

1.4.4 标准曲线的制作 用 Eluent 稀释液将校准的质粒(5.04 \times 10 7 IU/mL)10 倍梯度稀释 4 份,即样品浓度依次为 5.04 \times 10 7 IU/mL,5.04 \times 10 6 IU/mL,5.04 \times 10 5 IU/mL,5.04 \times 10 4 IU/mL,设置反应程序后作标准曲线。实时荧光定量 PCR 反应程序结束后制作熔解曲线程序为 95 $^{\circ}$ C,0 s,20 $^{\circ}$ C/s;65 $^{\circ}$ C,15 s,20 $^{\circ}$ C/s;95 $^{\circ}$ C,0 s,0.1 $^{\circ}$ C/s。根据标准曲线,利用待测标本的 Ct 值求出相应的 HBV DNA 含量,Ct>35 判定为阴性。

1.4.5 质量控制 为保证结果的准确性,每次测量均设置空白对照管。

2 结 果

2.1 方法学评价

2.1.1 标准曲线 采用已知确定浓度的质粒 DNA 经倍比稀释后,制作标准曲线。曲线方程为:Y=-3.344X+37,其中 X 表示标准品拷贝数的对数值,Y 表示测得的 Ct 值,r=0.999 9。

2.1.2 特异性 通过熔解曲线看出,HBV 质粒标准品扩增仅出现特异性的单峰,说明引物特异性良好,熔解温度为 84.58 $^{\circ}$ C。

2.1.3 重复性 取 4 份 HBV DNA 含量不同的血浆标本连续 7 d 分别作定量扩增,Ct 值变异均不显著,变异系数分别为 2.06%、1.29%、2.42%、3.54%。

2.1.4 灵敏度 取经商品化试剂盒校准的 HBV 阳性血清标本(5.04 \times 10 7 IU/mL),用 HBV 阴性血清对其作 1:10 倍连续稀释,采用构建的试剂盒进行检测,Ct>35 判定为阴性,结果显示,该试剂盒最低检出限为 5.00 \times 10 2 IU/mL。

2.1.5 线性范围 用已知确定浓度的阳性校准品(5.00 \times 10 10 IU/mL)校正重组 HBV 质粒,然后用 TE 缓冲液依次进行 1:10 的连续稀释,以拷贝数的对数作横坐标,以循环数 Ct 值作纵坐标,进行线性回归。结果显示,在 5.00 \times 10 2 ~5.00 \times 10 8 IU/mL 之间具有良好的相关性(线性范围的方程为 Y=-2.776X+34.31,r 2 =1.00),此范围就是其线性范围。

2.2 临床应用评价

2.2.1 外周血中 HBV DNA 含量与 HBV 血清标记物的关系 对 200 例“两对半”结果为“大三阳”(HBsAg+、HBeAg+、HBeAb+)和“小三阳”(HBsAg+、HBeAb+、HBeAb+)的本院住院及门诊乙型肝炎患者外周血 HBV DNA 进行实时荧光定量 PCR 检测,结果见表 1。

2.2.2 在乙型肝炎治疗监测中的应用 选择 1 例临床诊断为

“慢性病毒性乙型肝炎”的住院患者进行跟踪调查,入院时其 HBV DNA 含量高达 1.02 \times 10 4 IU/mL,口服贺普丁片剂治疗后显著下降,3 个月后降至 5.00 \times 10 2 IU/mL 以下。

表 1 HBV DNA 含量与 HBV 血清标记物的关系

组别	n	阳性例数(n)	阳性率(%)	拷贝数对数
“大三阳”	61	59	99.97	5.52 1.57
“小三阳”	139	55	39.57	3.94 0.87

3 讨 论

实时荧光定量 PCR 技术相较于传统的定性检测是一项飞跃,它使准确地定量检测核酸浓度成为可能,而且无需 PCR 后续的凝胶电泳等繁琐步骤^[5-6]。

近年来,国内外研究中提出了许多 HBV DNA 定量的方法,Combas amplicor 检测系统是基于 HBV 靶 DNA PCR 扩增后的一项显色测 OD 值的技术,该方法具有较好的重复性,而不足之处在于其线性范围较窄^[7],若病毒滴度超过线性范围则无法准确定量。支链 DNA(bDNA)技术是一种信号扩增技术,它不依赖 PCR,该技术因不存在 PCR 扩增中指数级的扩增过程,因此稳定性和重复性均较高,但研究证实该技术的线性范围也不广,随着标本中 HBV DNA 浓度的增加超过阈值后,定量检测的准确性下降^[8]。现在使用最广泛的 PCR 定量方法是 SYBR Green I 染料法和 Taqman 探针法^[9]。相对 Taqman 探针,染料的成本较低,但由于它能于任何双链 DNA 结合,因此特异性不如探针技术,但经熔解曲线分析、优化反应体系可解决此问题^[10]。此时,SYBR Green I 染料技术即凭借着它灵敏度高、操作方便、不易交叉污染等优势在临床上的应用日益广泛^[11]。

本实验成功建立了 HBV DNA SYBR Green I 实时荧光定量的方法,结果显示:整个体系的扩增效率较高,达到 99.09%;荧光信号与扩增循环数的线性关系非常好,r 2 高达 0.999 9;方法的敏感性较高,检测下限可达 5 \times 10 2 IU/mL,与德国 QIAGEN 公司的成品试剂盒达到一致水平^[12];重复性好,变异系数小;特异性强,通过熔解曲线的分析,仅存在单一的特异性熔解峰;线性范围广,处于 5.00 \times 10 2 ~5.00 \times 10 8 IU/mL 之间的标本可准确检出;反应全程仅需 45 min,较赵清等^[13]研究方法中所用到的 85 min 还要缩短 40 min,适合于在短时间内作批量检测。

目前临床上对慢性 HBV 携带者的治疗措施包括免疫调节、抗纤维化、抗病毒等,抗病毒是从根本上抑制病毒对肝细胞损伤的方法,除传统的干扰素之外,核苷类似物是近年来使用最广泛的抗病毒药物^[14]。但由于 HBV 变异性强,同种核苷类似物的长期盲目服用会引起病毒耐药性的产生,这必将导致患者病情反复甚至恶化。因此,对使用抗病毒药物治疗的乙型肝炎患者进行 HBV DNA 水平监测就显得尤为重要,定量结果可提示是否需要调整药物剂量、更换药物或联合用药。HBV 抗原抗体(HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBeAb)5 项血清学标志物是临床上常用来判断患者 HBV 感染情况或疗效的指标,但是它们不能有效的判断病毒数量、复制及传染程度,传统的观点认为,HBeAg 阴转是慢性乙型肝炎好转稳定的标志,但定量的结果却表明 HBeAg 阴转并不代表传染性减弱。本

研究结果就显示：“小三阳”组中 HBV DNA 的阳性检出率仍高达 39.57%，表明许多“小三阳”患者体内 HBV 复制水平较高，仍具备较强的传染性，究其原因，可能与 HBV 易于突变引起的 e 抗原表达停止有关^[15]。因此，联合定量与血清标志物结果能够更准确地评价乙型肝炎患者的病情。

乙型肝炎病毒 DNA 是最直接反映 HBV 存在的指标，它也能可靠地反映病毒的复制状况和传染性强弱，对其动态监测的结果可提示治疗效果的好坏、是否产生耐药性，进而指导临床合理使用抗病毒药物。在我国这样一个 HBV 感染高发的国家，采用实时荧光定量 PCR 进行 HBV DNA 的检测对于 HBV 的感染和治疗监测有不可替代的作用。

参考文献

[1] Memon MR, Shaikh AA, Soomro AA, et al. Frequency of hepatitis B and C in patients undergoing elective surgery[J]. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2010, 22(2):167-170.

[2] Shi M, Zhang Y, Zhu YH, et al. Comparison of real-time polymerase chain reaction with the COBAS Amplicor test for quantitation of hepatitis B virus DNA in serum samples[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(3):479-483.

[3] 曹亦军. HBV-DNA 荧光定量 PCR 检测的临床意义[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2005, 26(11):1279-1280.

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

[5] Cabezas-Fernandez M, Cabeza-Barrera M. Introduction of an automated system for the diagnosis and quantification of hepatitis B and hepatitis C viruses[J]. Open Virol J, 2012, 6(1):122-134.

[6] 李金明. 聚合酶链反应临床应用的优越性和局限性[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(3):225-227.

[7] Payungporn S, Tangkijvanich P, Jantaradsamee P, et al. Simulta-

neous quantitation and genotyping of hepatitis B virus by real-time PCR and melting curve analysis[J]. J Virol Methods, 2004, 120(2):131-140.

[8] Henry LC, Nancy WL, Tracy CL, et al. Comparison of three different sensitive assays for hepatitis B virus DNA in monitoring of responses to antiviral therapy[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(9):3205-3208.

[9] Hui CK, Bowden S, Zhang HY, et al. Comparison of real-time PCR assays for monitoring serum hepatitis B virus DNA levels during antiviral therapy[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8):2983-2987.

[10] Sum SS, Wong DK, Yuen JC, et al. Comparison of the COBAS TaqMan HBV test with the COBAS Amplicor monitor test for measurement of hepatitis B virus DNA in serum[J]. J Med Virol, 2005, 77(4):486-490.

[11] 王宇萍, 蒋建东. Real-time PCR 检测 HBV DNA 的方法学[J]. 临床医学与护理学, 2010, 8(29):93-95.

[12] 李美忠, 王敏, 乐晓华, 等. 四种 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂比较及其结果分析[J]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2008, 2(1):7-12.

[13] 赵清, 许颂霄, 袁军, 等. 一种快速检测 HBV 基因的荧光定量 PCR 法的建立[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(4):244-246.

[14] Gish R, Jia JD, Locarnini S, et al. Selection of chronic hepatitis B therapy with high barrier to resistance[J]. Lancet Infect Dis, 2012, 12(4):341-353.

[15] Maylin S, Boyd A, Martinot-Peignoux M, et al. Quantification of hepatitis B e antigen between Elecsys HBeAg and Architect HBeAg assays among patients infected with hepatitis B virus[J]. J Clin Virol, 2013, 56(4):306-311.

(收稿日期:2013-11-05)

(上接第 463 页)

和 F 亚型, 分型结论就有待全基因组测序证实。env 区域分为 gp41 与 gp120 两部分, 本研究进一步提取出从 Genbank 中找出 104 条 HIV-1M 组全基因序列的 gp41 与 gp120 区域, 通过 MEGA5.0 进行比对, 建 NJ 系统进化树之后发现 gp120 区域未能把 J 亚型与 A1 亚型分开; GP41 区域未能把 K 亚型与 H 和 F 亚型分开, J 亚型未能与 A 亚型分开。宋丹等^[2]应用逆转录及套式 PCR 方法扩增 HIV-1 gp41 基因并进行测序, 然后应用 MEGA3.1 软件构建系统进化树进行分型。如果分型存在 K、H、F、J 和 A 亚型, 分型结论就有待全基因组测序证实。

本研究从生物信息学的角度应用 NJ 方法进行大样本序列建树分析, 比较了 HIV 病毒结构基因 gag、env、pol、gp41、gp120 区域的基因分型结果, 发现 pol 区没能把 D 亚型和 B 亚型分开; gag 区未把 K 亚型和 F 亚型分开; env 区能对 HIV-1M 组正确分型。而 env 的亚区域 gp41 和 gp120 也不能对 HIV-1M 组正确分型。env 为 HIV-1M 组正确分型的推荐区域, 如果使用其他区域进行分型, 部分亚型仍需要全基因组测序证实。

参考文献

[1] 何浩岚, 何金洋, 蔡卫平, 等. HIV-1 亚型分子流行病学研究进展

[J]. 传染病信息, 2010, 23(6):369-371.

[2] 宋丹, 孙国清, 张艳敏, 等. 郑州市男同性恋中 HIV-1 gp41 基因亚型分析[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(8):728-731.

[3] 宋丹, 孙国清, 张艳敏, 等. 河南郑州市男男同性恋 HIV-1 感染者 gag 区基因亚型分析[J]. 病毒学报, 2012, 28(04):345-350.

[4] 叶景荣, 郭蕾, 白立石, 等. 北京市性传播 HIV-1 感染者流行毒株 gag 基因序列测定和亚型分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(2):136-139.

[5] 杨坤, 鲍作义, 李韩平, 等. 河南省 HIV-1 流行毒株 pol 基因的分型与系统发生分析[J]. 中国艾滋病性病, 2005, 11(3):165-167.

[6] 聂滨, 唐昌伟, 逯心敏, 等. 用生物信息学方法确定 HIV-1M 组基因分型的最佳区域[J]. 四川医学, 2011, 32(2):159-160.

[7] 聂滨, 唐昌伟, 逯心敏, 等. 用 ENV 区确定 HIV-1M 组基因分型最佳建树方法[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(2):134-138.

(收稿日期:2013-11-03)