

## · 检验技术与方法 ·

## 乙型肝炎病毒逆转录酶区 PCR 产物测序方法的建立及应用\*

陆仁飞<sup>1</sup>, 吴月平<sup>1</sup>, 张宏萍<sup>2</sup>, 周敏<sup>2</sup>

(1. 南通市第三人民医院, 江苏南通 226001; 2. 南通市疾病预防控制中心, 江苏南通 226007)

**摘要:**目的 建立乙型肝炎病毒(HBV)逆转录酶区 PCR 产物测序方法, 检测 HBV 耐药突变位点及基因型。方法 采用了巢式 PCR 方法, 分别在 HBV 基因组逆转录(RT)区头尾设计内外两对引物, 扩增全长 RT 区 1 223 bp 序列。并用该方法对已经完成测序的 HBV B、C 基因型, 拉米夫定耐药株, 恩替卡韦耐药株全长重组质粒扩增 RT 区来验证方法的保真度; 用该方法从病毒载量  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$  copys/mL HBV 血清中扩增 RT 区来验证方法的灵敏度; 通过对 4 例临床标本的检测来验证方法的实用性。结果 建立了乙型肝炎病毒逆转录酶区 PCR 产物测序方法; 以已经完成测序的 HBV B、C 基因型, 拉米夫定耐药株, 恩替卡韦耐药株全长重组质粒为模板扩增 RT 区序列, 测序结果与已知序列确证无误, 有很好保真度; 能从病毒载量  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$  copys/mL HBV 血清中扩增到目标序列, 有很好的灵敏度; 能从临床患者血清中扩增 HBV RT 区并测序, 序列分析后能为临床提供 HBV 核苷(酸)类似物耐药位点突变及 HBV 基因型信息。结论 建立了一种具有很好保真度、灵敏度以及实用性的 HBV 逆转录酶区 PCR 产物测序方法。

**关键词:**乙型肝炎病毒; 逆转录酶区; PCR 产物测序

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.041

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)08-1032-02

### Establishment and application of a PCR product sequencing assay for amplifying reverse transcriptase gene region of hepatitis B virus\*

Lu Renfei<sup>1</sup>, Wu Yueping<sup>1</sup>, Zhang Hongping<sup>2</sup>, Zhou Min<sup>2</sup>

(1. Clinical Laboratory of Nantong Third People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226001, China;

2. Nantong Center for Disease Control and Prevention, Nantong, Jiangsu 226007, China)

**Abstract:** **Objective** To establish a PCR product sequencing assay for amplifying the reverse transcriptase region of hepatitis B virus(HBV) to investigate whether the resistant mutants exist or not and it's genotypes in the patient. **Methods** Three primers for nested PCR were designed for amplifying RT region of HBV. Four HBV recombinant plasmids containing B, C genotypes, lamivudine-resistant variant and entecavir resistant variant full-length HBV genomes plasmid were used respectively for determining the accuracy of this assay. Four sera samples which has known concentration of virus from  $1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$  copys/mL were used for determining the sensitivity of this assay. Four sera samples from chronic hepatitis B patients which were analyzed by this assay were used for the application of this assay. **Results** The successful establishment a PCR product sequencing assay for amplifying the reverse transcriptase region of HBV. The results of amplifying RT region sequencing were generally consistent with that of finished four HBV recombinant plasmids containing B, C genotypes, lamivudine-resistant variant and entecavir resistant variant full-length HBV genomes plasmid sequence. The sensitivity of the assay for samples were  $1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$  copys/mL, respectively. **Conclusion** A assay with well accurate, sensitivity and application for amplifying RT region of HBV is established.

**Key words:** hepatitis B virus; reverse transcriptase gene region; PCR product sequencing

近年来由于拉米夫定(LMV)、阿德福韦酯(ADV)、恩替卡韦(ETV)和替比夫定(LdT)等核苷(酸)类似物(NA)抗病毒药物在临床乙型肝炎治疗方面的广泛使用, 导致了乙型肝炎病毒(HBV)耐药问题的出现<sup>[1]</sup>。目前公认的核苷(酸)类似物变异位点发生在 HBV 聚合酶(P)区的逆转录酶(RT)区。拉米夫定的耐药株主要是 YMDD 基序的变异, RT 区 YMDD 基序 204 位点的甲硫氨酸(methionine)被缬氨酸(valine)或异亮氨酸(isoleucine)所替代(RTM204V/I); 阿德福韦耐药株主要发生在 RTN236T 和 RTA181V/T; 恩替卡韦具有较高的耐药基因屏障, 需要 3 个(或 3 个以上)位点同时突变才能产生耐药性, 包括 2 个拉米夫定耐药位点(L180M+M204V/I), 另外的突变位点还包括 T184G、S202I 和 M250V 中一个位点变异<sup>[2-4]</sup>。RT 区全长 1 032 bp, 正好重叠 S 基因的编码区, 通过对 S 基因的序列比对, 可以确定 HBV 的基因型, 因此通过对扩增的 RT 区分析可同时获得 HBV 的基因型信息。目前分析

RT 区耐药变异位点的方法有多种, 但测序法无疑是“金标准”<sup>[5-6]</sup>, 通过对测序序列的分析, 除了能检测出已知耐药突变位点, 同时能发现新的耐药相关突变位点。因此, 本研究拟建立扩增 RT 区, 测序并分析病毒基因型及是否出现耐药位点突变的方法, 并初步验证其在临床样本分析中的实用性。

#### 1 材料与方法

**1.1 材料** HBV B、C 基因型, 拉米夫定耐药株, 恩替卡韦耐药株全长重组质粒由本实验室构建保存。慢性乙型肝炎患者血清样本收集于 2012 年 12 月到 2013 年 3 月在本院门诊及住院治疗的患者, 临床诊断标准参照 2000 年 9 月(西安)全国会议修订的《病毒性肝炎防治方案》标准<sup>[7]</sup>。抽取患者血液, 分离血清于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。

**1.2 方法** 血清病毒核酸提取试剂盒购自硕世生物技术有限公司, DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司的 ExTaq 酶, PCR 扩增仪为 ABI-7500 PCR 仪, 凝胶成像系统为 SYN-GBOX。

\* 基金项目: 南通市卫生局资助项目(W201217)。 作者简介: 陆仁飞, 男, 主管检验师, 主要从事乙型肝炎病毒研究工作。

### 1.3 检测方法

**1.3.1 检测方法的建立** 采用了巢式 PCR 法,参考文献[8]方法设计引物,HBVRTF1:5'-TTA TTT ACA TAC TCT KTG GAA GGC-3',HBVRTR1:5'-CTA GGA GTT CCG CAG TAT GGA T-3',HBVRTF2:5'-GTG GCT CCA GTT CMG GAA CAG T-3',HBVRTR2:5'-CTA GGA GTT CCG CAG TAT GGA T-3',引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成部合成。扩增条件:第 1 轮反应,94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,50 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。第 2 轮反应,94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离、切胶回收后送上海英骏生物公司测序部测序。

**1.3.2 验证方法保真度** 以已经完成测序的 HBV B、C 基因型,拉米夫定耐药株,恩替卡韦耐药株全长重组质粒 0.2 μL 为模板,参照 1.3.3 建立的方法扩增质粒的 RT 区。测序后 DNASTAR 软件将序列与质粒已测序列比对,验证方法保真度。

**1.3.3 确定方法灵敏度** 以已知浓度 HBV 血清进行系列稀释,获得溶液终浓度为  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1.2 \times 10^5$ 、 $1.2 \times 10^4$ 、 $1.2 \times 10^3$  cypys/mL 的血清。严格按照血清病毒分离试剂盒说明书提取病毒 DNA,扩增条件及方法参照 1.3.2 步骤。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离以验证方法灵敏度。

**1.3.4 验证方法实用性** 慢性乙型肝炎患者血清 HBV RT 区扩增及测序。血清病毒分离试剂盒提取慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA,扩增条件及方法参照 1.3.2 步骤。测序后 DNASTAR 软件分析耐药突变位点,NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>)在线分析基因型。

## 2 结 果

**2.1 方法保真度的验证** HBV B、C 基因型,拉米夫定耐药株,恩替卡韦耐药株全长重组质粒均扩增出 1 223 bp 的条带见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”);PCR 产物测序序列与质粒已测序列比对证实:4 个 PCR 产物测序序列与质粒已测序列完全一致,见图 2~5(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

**2.2 方法灵敏度验证** 已知浓度为  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$  cypys/mL HBV 血清扩增 HBV RT 区后在 1 223 bp 位置出现明显条带,均能够达到 PCR 产物切胶回收送测序的浓度见图 6(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

**2.3 方法实用性验证** 对 4 例慢性乙型肝炎患者血清 HBV RT 区扩增及测序后,电泳时均能在 1 223 bp 位置出现明显条带见图 7(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),测序后 DNASTAR 软件分析检出 2 例出现耐药位点突变见图 8(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>)在线分析发现 3 例为 C 基因型,1 例为 B 基因型见图 9~10(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

## 3 讨 论

由于自身的免疫压力及药物的筛选作用,通常引起的 HBV 耐药突变是一种 HBV 基因的致畸或致死突变,使血清中病毒载量维持在低水平浓度<sup>[9]</sup>,本方法采用的巢式 PCR,可以大大提高检测的灵敏度,所采用的 ExTaq 酶也兼具保真性和扩增效率。作者能从病毒载量  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$  copy/mL HBV 血清中均能扩增到目标序列。

HBV 基因型分布有较明显的地域特征,A、D 型主要分布在欧洲和美国,B、C 型主要分布在东南亚和东亚,E 型在西非流行,F 型集中在中南美洲,而 G 型仅在个别国家有单个案例报道<sup>[10]</sup>。我国以 B、C 基因型为主,因此,本方法验证了 HBV B、C 基因型质粒的特异性<sup>[11]</sup>。

本研究采用的 PCR 产物直接测序法也有缺陷。病原体的核酸突变可造成体内同时存在基因序列有微小差别的种群,HBV 基因序列的异质性和准种特点是慢性 HBV 感染患者普遍存在的一种现象<sup>[12]</sup>,因此,在 PCR 扩增过程中的模板其实是一个有微小差别的基因序列组成的模板库,只是看哪个模板在数量上更占优势。目前常用的几种耐药位点检测方法要求耐药株达到的比例分别为:PCR 产物直接测序法大于 20%,INNO LiPA 线性杂交法大于 5%,实时荧光 PCR 法在 1%~5% 之间,超深焦磷酸测序法大于 1%。因此,作为补救措施,当测序峰图出现明显重叠峰时,可以将 HBV RT 区 PCR 扩增产物克隆后挑斑测序,每个样本需测定 10~20 个克隆,以获得正确的序列信息。

本方法通过扩增 HBV RT 区,可以同时给临床提供 HBV 耐药变异及 HBV 基因型信息,可收到一举两得的效果。

## 参考文献

- [1] Tangkijvanich P, Sa-Nguanmoo P, Avihingsanon A, et al. Characterization of hepatitis B virus mutations in untreated patients co-infected with HIV and HBV based on complete genome sequencing[J]. Med Virol, 2013, 85(1): 16-25.
- [2] Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouveia MS, et al. Phylogenetic analysis of complete genome sequences of hepatitis B virus from an Afro-Colombian community: presence of HBV F3/A1 recombinant strain[J]. Virol, 2012 9(3): 244-248.
- [3] 李志军, 苏智军, 林成祖, 等. 23 株 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者病毒的全基因组分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(8): 728-730.
- [4] Odgere IZ, Choi IK, Byun KS, et al. Complete genome sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus(HBV) isolated from Mongolian patients with chronic HBV infection[J]. Virus Genes, 2006, 33(3): 345-349
- [5] 吴若芬, 师志云, 贾伟, 等. 3 种 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂检测结果比较[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(2): 206-207
- [6] 吴光华, 丁惠国, 曾长青. 公共核酸数据库乙肝病毒全基因组序列概况和中国 HBV 参照序列的建立[J]. 自然科学进展, 2008, 18(2), 121-129.
- [7] 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.
- [8] 刘宝明, 李彤, 董建平, 等. A~D 基因型乙型肝炎病毒全长逆转录酶区 PCR 方法的建立及应用[J]. 肝脏, 2008, 13(5): 379-383.
- [9] 成军, 董菁, 洪源, 等. 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(8): 1083-1090.
- [10] 黄月华, 周彬, 王站会, 等. 中国乙肝病毒 B 基因亚型的分布[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007, 21(2): 111-113.
- [11] Kessler H, Stelzl E, Marth E, et al. Detection of mutations in the hepatitis B virus polymerase gene[J]. Clin Chem, 2003, 49(5): 989-992.
- [12] Ciancio A, Smedile A, Rizzetto M, et al. Identification of HBV DNA sequences that are predictive of response to lamivudine therapy[J]. Hepatology, 2004, 39(1): 64-73.