

• 基础实验研究论著 •

反义核酸抑制 PCR 荧光检测乙型肝炎病毒 S 基因 145 位密码子变异株及其临床应用^{*}

谭 超^{1,2}, 向希映¹, 韩 莉², 神谢静²

(1. 三峡大学第一临床医学院·宜昌市中心人民医院检验科, 湖北宜昌 443003;
2. 三峡大学医学院, 湖北宜昌 443002)

摘 要:目的 建立一种反义核酸抑制 PCR 荧光检测方法, 对临床标本乙型肝炎病毒(HBV)S 基因 G145R/A 变异株进行检测。方法 依据 HBV S 基因 587 和 588 位核苷酸变异设计 PCR DNA 扩增引物, 并增加一条反义野生型引物。使其遇到野生型(不含 G145R/A 基因变异)核苷酸序列时不能扩增, PCR 扩增被抑制, 而遇到突变型核苷酸序列时能扩增, 并以荧光显示 G145R/A 突变。结果 使用突变型 DNA 引物进行 PCR DNA 扩增, 对质粒 DNA 和 HBV 临床标本进行检测, 检出 G145R/A 突变标本 12 份, 对此 12 份标本采用 ELISA 法检测 HBsAg 和 HBsAb, 结果均为阳性。结论 该方法简便、准确, 可用于临床筛查 G145R/A 变异株检测。

关键词:肝炎病毒, 乙型; 点突变; 聚合酶链反应; 反义核酸
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 12. 004 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)12-1417-03

Detection of G145R/A mutation of hepatitis B virus S gene by inhibition PCR fluorimetry of antisense nucleotide and its clinical application^{*}

Tan Chao^{1,2}, Xiang Xiying¹, Han Li², Shen Xiejing²

(1. Department of Clinical Laboratory, The First Clinical Medical College of Three Gorges University/Yichang Central People's Hospital, Yichang, Hubei 443003, China; 2. Medical Science College of China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

Abstract: **Objective** To construct an inhibition polymerase chain reaction(PCR) fluorimetry of antisense nucleotide for the detection of G145R/A mutation of hepatitis B virus(HBV) S gene and to investigate its clinical application. **Methods** The PCR primers were designed based on the sequence of mutation of 587 and 588 sites in HBV S gene and the wild antisense nucleotide sequence of HBV S gene. The PCR amplification of wild type sequence could be restrained, but that of mutant type could not be restrained. **Results** DNA in plasmid samples and clinical samples with HBV were amplified by using mutant primers. 12 samples, confirmed to be with G145R/A mutation by PCR, were further to be positive with HBsAg and HBsAb by detection of ELISA. **Conclusion** The PCR method, described here, could be proved to be convenient and accurate for the detection of clinical samples.

Key words: hepatitis B virus; point mutation; polymerase chain reaction; antisense nucleotide

乙型肝炎病毒(HBV)S 基因位于核苷酸(nt)第 155~833 位, 编码含 226 个氨基酸的外膜蛋白, 即 HBsAg, 它是引起机体产生保护性抗体的主要成分。HBsAg 具有优势共同抗原表位“a”抗原决定簇, 位于高度保守的第 124~147 位氨基酸的亲水区, 并与第 124、127、139 和 147 位之间的双硫键形成双环结构维持 HBsAg 的抗原性^[1-2], HBV S 基因变异最常见的抗原决定簇变异, 是第 145 位氨基酸由甘氨酸(R)变成了精氨酸(A), 形成具有感染性但不被抗体识别的免疫逃逸变异株^[3]。S 基因变异多集中在“a”抗原决定簇, 其中最常见的是 G145R 变异^[4-5]。

1 材料与方法

1.1 材料 取 HBV 标本 185 份, 用广州达安基因公司的 HBV 荧光定量检测试剂盒检测 DNA 阳性, 分别用本研究设计的 HBV S 基因 PCR 扩增引物进行检测。

1.2 仪器与试剂 ABI 7300 实时荧光定量基因扩增仪(美国 ABI 公司); 加样器(德国 Eppendorf 公司); DNA 聚合酶等试剂、引物和荧光探针均由大连宝生物工程公司提供与合成; 克隆株由上海闪晶生物技术有限公司制备。

1.3 方法

1.3.1 使用 DNA MAN 软件, 依据 G145R/A 核苷酸序列位置 and 同源性核苷酸序列位置, 进行 HBV DNA 引物和荧光探针(TaqMan)设计, 见表 1。

表 1 HBV S 基因 G145R/A DNA 引物和荧光探针(TaqMan)DNA 序列

序号	引物名称	DNA 序列
1	HBV S1 野生 R	5'-TGC TGT ACA AAA CCT TCG GAC G-3'
2	HBV S2 野生 A	5'-TGC TGT ACA AAA CCT TCG GAC GG-3'
3	HBV S3 突变 R	5'-TGC TGT ACA AAA CCT TCG GAC A-3'
4	HBV S4 突变 A	5'-TGC TGT ACA AAA CCT TCG GAC GC-3'
5	HBV S5 野生反义	5'-CCG TCC GAA GGT TTT GTA CAG CA-3'
6	HBV S6 突变反义	5'-GTG TCC GAA GGT TTT GTA CAG CA-3'
7	HBV S7(下游)	5'-TAC CAC ATC ATC CAT ATA ACT-3'
8	HBV S8	5'-TGC TGT ACA AAA CCT TCG GAC-3'
9	荧光探针	FAM-5'-TCT CCT GGC TCA GTT TAC TAG-3'-TAMARA

^{*} 基金项目: 三峡大学第一临床医学院·宜昌市中心人民医院科研发展基金资助项目(KFJ2011036)。

1.3.2 克隆株建立 野生型克隆株 DNA 引物:5'-GTT TGC TGT ACA AAA CCT TCG GAC GG-3'和 5'-CAA TAC CAC ATC ATC CAT ATA ACT-3'。突变型克隆株 DNA 引物:5'-GTT TGC TGT ACA AAA CCT TCG GAC AC-3'和 5'-CAA TAC CAC ATC ATC CAT ATA ACT-3'以临床 HBV 标本进行 PCR 扩增,分别用上述两对引物扩增的 PCR 产物建立克隆株。

1.3.3 DNA 提取 用质粒 DNA 提取试剂盒,分别从野生型克隆菌株和突变型克隆菌株中提取野生型和突变型质粒 DNA。

表 2 反义核酸抑制 PCR 荧光检测 G145R/A 基因突变设计

序号	质粒 DNA	加入引物	测试目的
1	野生型	HBV S1+HBV S2+HBV S7	HBV S 基因 DNA
2	野生型	HBV S1+HBV S2+HBV7+HBV S5	反义抑制野生型质粒 PCR 扩增
3	突变型	HBV S3+HBV S4+HBV7	HBV S 基因 DNA
4	突变型	HBV S3+HBV S4+HBV7+HBV S6	反义抑制型突变质粒 PCR 扩增
5	突变型	HBV S3+HBV S7+HBV S5	测试质粒 G145R 突变
6	突变型	HBV S4+HBV S7+HBV S5	测试质粒 G145A 突变

1.3.5 反义核酸抑制 PCR 荧光检测 G145R/A 基因突变灵敏度 使用灭菌小牛血清将突变型质粒 DNA 稀释到 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 copy/mL,引物浓度 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$,PCR 反应液中加入量设计见表 3。将以上稀释质粒 DNA 靶基因以表 3 中设计的引物加入量进行 PCR 荧光检测,根据检测结果,确定检测灵敏度比较高的 HBV S5 引物加入量。

表 3 引物加入量设计

序号	质粒 DNA	引物加入量	HBV S5 加入量(μL)
1	突变型	HBV S3,HBV S7 各 $1\text{ }\mu\text{L}$	3.0
2	突变型	HBV S3,HBV S7 各 $1\text{ }\mu\text{L}$	2.5
3	突变型	HBV S3,HBV S7 各 $1\text{ }\mu\text{L}$	2.0
4	突变型	HBV S4,HBV S7 各 $1\text{ }\mu\text{L}$	3.0
5	突变型	HBV S4,HBV S7 各 $1\text{ }\mu\text{L}$	2.5
6	突变型	HBV S4,HBV S7 各 $1\text{ }\mu\text{L}$	2.0

表 4 反义核酸抑制 PCR 荧光检测 G145R/A 基因突变的结果

序号	质粒 DNA	加入引物	阳(阴)性/Ct 值	结果
1	野生型	HBV S1+HBV S2+HBV S7	阳性/23	HBV S 野生型基因 DNA 测试阳性
2	野生型	HBV S1+HBV S2+HBV S7+HBV S5	阴性/32	野生型质粒 PCR 扩增抑制
3	突变型	HBV S3+HBV S4+HBV S7	阳性/24	HBV S 突变型基因 DNA 测试阳性
4	突变型	HBV S3+HBV S4+HBV S7+HBV S6	阴性/33	G145R/A 突变质粒 PCR 扩增抑制
5	突变型	HBV S3+HBV S7+ HBV S5	阳性/23	测试质粒 G145R 突变
6	突变型	HBV S4+HBV S7+ HBV S5	阳性/25	测试质粒 G145A 突变

2.2 反义核酸抑制 PCR 荧光检测 G145R/A 基因突变灵敏度 反义核酸引物 HBV S5 加入量以 $2.0\text{ }\mu\text{L}$,即分别为 HBV S3、HBV S4、HBV S7 的 2 倍量为最佳。

1.3.4 反义核酸抑制 PCR 荧光检测 G145R/A 基因突变 将野生型和突变型克隆菌株提取的野生型和突变型质粒 DNA,使用灭菌小牛血清稀释到 1×10^6 copy/mL 分别以下述引物扩增,荧光探针显示结果见表 2。PCR 反应液 $30\text{ }\mu\text{L}$,其中引物 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$,除 HBV S5 和 HBV S6 引物加 $2.5\text{ }\mu\text{L}$ 外,其他引物加 $1\text{ }\mu\text{L}$,荧光探针($10\text{ }\mu\text{mol/L}$)加 $0.6\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件: $37\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 5 min 尿嘧啶糖苷酶(UNG)酶解反应; $94\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 3 min 预变性; $93\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 50 s , $55\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 60 s ,10 个循环; $94\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 50 s , $55\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 90 s ,30 个循环; $33\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 180 s 。

1.3.6 临床标本检测 取 185 份 HBV DNA 阳性血清标本,将待测血清 $40\text{ }\mu\text{L}$ 加入 DNA 提取液 $40\text{ }\mu\text{L}$ 混匀, $100\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 10 min , $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,提取标本 DNA,取 $2\text{ }\mu\text{L}$ 标本 DNA 提取液加入 $28\text{ }\mu\text{L}$ PCR 反应液,反应条件为 $94\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 3 min 预变性;然后 $93\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 50 s , $55\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 60 s ,循环 10 次; $94\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 50 s , $55\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 90 s ,循环 30 次; $33\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 180 s 。检测 G145R/A 基因突变阳性标本 12 份,用 ELISA 法检测 HBsAg、HBsAb,按照试剂说明书进行,试剂由上海科华生物工程公司生产。结果判定均严格按照试剂说明书进行。

1.3.7 临床检测 G145R/A 基因突变标本的核酸序列测定 选择 G145R/A 基因突变检测阳性和阴性标本,提取 HBV DNA,用测序引物 HBV S8 和下游公用引物 HBV S7 进行 PCR 扩增,将 PCR 扩增产物送上海闪晶生物工程公司作核酸序列测定,比较 G145R/A 基因突变位置和碱基突变情况。

2 结 果

2.1 反义核酸抑制 PCR 荧光检测 G145R/A 基因突变 见表 4。

2.3 临床标本检测结果 185 份 HBV DNA 阳性血清标本中,检测到 G145R/A 基因突变阳性标本 12 份,结果见表 5。用 ELISA 法检测 12 份标本的 HBsAg、HBsAb,结果全为

阳性。

2.4 临床检测 G145R/A 基因突变标本的核酸序列测定 结果显示 nt587 的鸟嘌呤被腺嘌呤取代, nt588 的鸟嘌呤被胞嘧啶取代。

表 5 临床标本检测结果

序号	基因突变	HBV DNA 载量(copy/mL)
1	G145R	2.0×10 ⁸
2	G145R	4.0×10 ⁷
3	G145R	5.0×10 ⁷
4	G145A、G145R	6.0×10 ⁶
5	G145A、G145R	3.0×10 ⁶
6	G145A	5.0×10 ⁶
7	G145A	2.0×10 ⁸
8	G145A	1.2×10 ⁸
9	G145A	3.0×10 ⁸
10	G145A	2.0×10 ⁸
11	G145A	5.0×10 ⁶
12	G145A	8.0×10 ⁵

3 讨 论

目前有研究发现 HBsAg 的“a”抗原决定簇个别氨基酸序列的变异及两外侧端氨基酸变异单独或联合出现, 均导致 HBsAg 与 HBsAb 共存^[6-7]。本研究结果显示, 12 份 HBsAg 与 HBsAb 双阳性患者均于“a”抗原决定簇内第 126 位氨基酸及外侧第 165 位氨基酸产生变异, 这与文献^[8]一致。其原因可能是 S 区, 特别是“a”抗原决定簇氨基酸发生变异, 导致“a”抗原决定簇构象变化, 引起免疫逃逸, 产生的抗体不能保护机体免受感染, 因而造成 HBsAg 与 HBsAb 同时存在^[9-10]。近年来研究结果表明, HBV 的 S 基因发生突变可导致 HBsAg 免疫测定的灵敏度降低, 有时甚至漏检。

检测 HBV 的 S 区基因突变的常用方法是核苷酸序列测定和限制性内切酶法, 这些方法需要昂贵的仪器, 操作复杂, 敏感性低, 无法定量, 不适合于普及应用。为了提高乙型肝炎疫苗有效率, 控制 HBV 免疫逃逸株的流行, 制定更科学、合理的乙型肝炎防治方法, 研究一种敏感性和特异性高、操作简便、结果快速稳定、重复性好的检测 S 区基因突变的方法, 是发展的必然趋势, 而且在临床治疗上具有重要的意义。

本文检测方法的工作原理是: 在设计 PCR DNA 扩增引物序列时, 增加一条反义野生型引物。当遇到野生型(不含 G145R/A 基因变异)核苷酸序列时不能扩增, PCR 扩增被抑制, 使荧光探针中的荧光基团不能解离, 而不发射荧光。而当遇到突变型核苷酸序列时便能扩增, PCR 未受抑制, 荧光基团因酶解分离而发荧光, 以荧光显示 G145R/A 是否存在突变。表 4 的 PCR 荧光检测结果显示, 对野生型质粒, 加入 3 倍量反义野生型引物 HBV S5 时, 用野生型两对引物 HBV S1+HBV S7、HBV S2+HBV S7 PCR 荧光检测结果为阴性, PCR 扩增被抑制, 突变型 HBV S3+HBV S7、HBV S4+HBV S7 PCR 荧光检测结果为阳性, PCR 扩增未被抑制, 分别检出 G145R 突

变和 G145A 突变; 而对突变型质粒, 加入 3 倍量反义突变型引物 HBV S6 时, 用突变型两对引物 HBV S3+HBV S7、HBV S4+HBV S7 PCR 荧光检测结果为阴性, PCR 扩增被抑制。临床标本检测结果说明, HBV S 基因存在 nt587 和 nt588 两处突变, 经 ELISA 法检测为 HBsAg 和 HBsAb 双阳性, 说明由于 G145R 和 G145A 变异, 导致“a”抗原决定簇结构改变, 产生免疫逃逸的 HBV S 基因变异株, 从而出现 HBsAg 和 HBsAb 共存的现象^[11-12]。

利用反义野生型引物不参与 PCR 扩增, 反而抑制野生型(不含 G145R/A 基因变异)核苷酸序列扩增, 只允许突变型核苷酸序列扩增的原理, 以荧光显示 G145R/A 突变。本方法避免了假阳性的产生, 而且有较高的灵敏度。由于检测 HBV 的 S 区基因突变常用的方法需要昂贵的仪器, 操作复杂, 敏感性低, 不适合于普及应用。这种检测方法在临床上的应用具有重要的意义。

参考文献

[1] 赵海平, 申元英. 乙型肝炎病毒基因变异与免疫逃逸的研究进展[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2007, 34(5): 336-338.

[2] Abushady EAE, Gameel MMA, Klena JD, et al. HBV vaccine efficacy and detection and genotyping of vaccinee asymptomatic breakthrough HBV infection in Egypt[J]. World J Hepatol, 2011, 3(6): 147-156.

[3] Klompas M, Haney G, Church D, et al. Automated identification of acute hepatitis B using electronic medical record data to facilitate public health surveillance[J]. PLoS One, 2008, 3(7): 2610-2626.

[4] Ueda Y, Marusawa H, Egawa H, et al. Activation of HBV with escape mutations from hepatitis B surface antibody after living donor liver transplantation[J]. Antivir Ther, 2011, 16(4): 479-487.

[5] 李晖, 方冬, 黄平, 等. 广东省乙型肝炎病毒 S 基因变异与乙型肝炎疫苗免疫失败关系探讨[J]. 中国计划免疫, 2007, 13(1): 15-18.

[6] 王蕾, 宁小晓. HBsAg⁺/HBsAb⁺乙型肝炎患者 S 区基因克隆及碱基序列分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(16): 1794-1796.

[7] 徐兆珍, 关伟, 张淑静, 等. 对乙型肝炎病毒表面抗原及抗体同时存在的模式分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 131-132.

[8] 黄利华, 童福易, 蒋跃明. HBsAg、抗 HBs 共存与 HBV 基因型及基因变异的关系[J]. 传染病信息, 2004, 17(3): 109-111.

[9] Zhang JM, Xu Y, Wang XY, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(9): 1161-1169.

[10] Allain JP, Candotti D. Diagnostic algorithm for HBV safe transfusion[J]. Blood Transfus, 2009, 7(3): 174-182.

[11] Tian X, Zhao C, Zhu H, et al. Hepatitis B virus (HBV) surface antigen interacts with and promotes cyclophilin a secretion: possible link to pathogenesis of HBV infection[J]. J Virol, 2010, 84(7): 3373-3381.

[12] El Chaar M, Candotti D, Crowther RA, et al. Impact of hepatitis B virus surface protein mutations on the diagnosis of occult hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2010, 52(5): 1600-1610.