

[3] Kal J, Borgya A, Gallusser A, et al. Development of a novel N-terminal 3/ProBNP (NT-ProBNP) assay with a low detection limit [J]. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1999, 17(4): 177-181.

[4] 郝彬. 脑钠肽在缺血性心力衰竭诊治过程中的应用[J]. 中国实用医药, 2008, 36(3): 166.

[5] 初贵富. 血浆 N-末端脑钠肽前体对急性呼吸困难病因的鉴别诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(4): 700-701.

[6] 覃向红. 慢性阻塞性肺疾病合并心力衰竭的临床特点及护理[J]. 中国医药导刊, 2009, 11(2): 301-302.

[7] 周雁花, 王月香. NT-proANP、NT-proBNP 的监测与心衰患者心

功能的相关性[J]. 中国卫生产业, 2012, 9(18): 88.

[8] 马锦洪, 姜庆波. NT-proBNP 在心力衰竭诊断中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(20): 2355-2356.

[9] 薛旗, 邵玉枝. NT-ProBNP 的临床检测与应用[J]. 中国实用医药, 2012, 7(13): 108-109.

[10] 袁劲松, 陈文. N-末端脑利钠肽原在心力衰竭中的临床应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1417-1419.

(收稿日期: 2012-06-19)

• 经验交流 •

乙肝病毒 DNA 与乙肝病毒标志物的相关性研究

叶儒军¹, 魏 威²

(1. 梁平县人民医院检验科, 重庆梁平 405200; 2. 南方医科大学生物技术学院, 广东广州 510515)

摘要:目的 探讨乙型肝炎病毒标志物的检测与其 DNA 的关系。方法 取乙肝患者与阴性对照组患者的血液, 提取血液总 RNA 后进行逆转录, 再用实时荧光定量 PCR 检测乙肝标志物, 如 HBsAg, HBeAg, PreS2。结果 定量 PCR 发现乙肝患者比对照组 HBsAg, HBeAg, PreS2 均上调。**结论** 可以用荧光定量 PCR 检测乙肝病毒标志物来鉴定乙肝患者。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; DNA; 聚合酶链反应

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 23. 060

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2012)23-2932-02

乙型病毒性肝炎, 简称乙肝, 是 1 种由乙型肝炎病毒 (HBV) 感染机体后所引起的疾病。HBV 主要存在于肝细胞内并损害肝细胞, 引起肝细胞炎症、坏死、纤维化。传统方法检测 HBV 都需要一定的时间, 选用分子生物学中的荧光定量 PCR 的方法来检测乙肝病毒标志物如 HBsAg, HBeAg, PreS2 的基因水平来鉴定乙肝患者, 这是 1 种快速而且准确的方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 取已知的乙肝患者 30 例的血液和阴性对照组 30 例血液, 随机配对成 30 组, 血液收集后均放在 -80 ℃ 冰箱。

1.2 血液总 RNA 抽提 取适量血液, 加入 1 mL Trizol 将细胞转移至 1.5 mL EP 室温放置 5 min, 使其充分裂解, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清转移至另一 EP 管, 弃沉淀。按 200 μ L 氯仿 (三氯甲烷)/mL Trizol 加入氯仿, 震荡混匀室温放置 15 min, 12 000 $\times$ g 离心 15 min, 吸取上层水相至另一 EP 管中, 按 0.5 mL 异丙醇/mL Trizol 加入异丙醇混匀, 12 000 $\times$ g 离心 10 min, 弃上清, RNA 沉于管底。加入 75% 乙醇, 4 ℃、8 000 $\times$ g 离心 5 min, 尽量弃上清, 室温晾干或真空干燥 5~10 min。加入 RNase free water 20 μ L, 取出 1 μ L 准备做电泳鉴定实验或测 OD 值定量 RNA 浓度。

1.3 逆转录 提取血液总 RNA 后, 测定 RNA 浓度, 并根据试剂盒说明书逆转录 RNA 为 cDNA, 程序设定为 85 ℃, 15 min, 37 ℃, 30 min。

1.4 荧光定量 PCR 检测 PreS2 基因 根据 PreS2 基因设计引物, HBsAg: 5'-TAC GCA TAG CTA CGA TC-3'; 5'-GCT ACG AAG GTC CGA TCA-3'; HBeAg: 5'-TCG TCA TTC GAT AGG CCG A-3'; 5'-TCG AGG TTC GAA CGT AG-3'; PreS2: 5'-GCA CCG TCT TGG CTC AGT AC-3'; 5'-TGG TGA TGA CCG GAG TGG A-3'; GAPDH: 5'-CCT GGA CAC CTG CTG ACA -3'; 5'-GAA TGA AGT ACG GAG CAG AG-3'。通过荧光定量 PCR 检测细胞样品中目的基因和内参基因的表达量, 根据 PCR 反应曲线得到各样品目的基因和内参基

因的 Ct 值 (域值循环数), 采用 $\Delta\Delta$ Ct 的方法进行相对定量, PCR 反应的条件: (30 s, 95 ℃; 5 s, 95 ℃; 31 s, 60 ℃), 反应为 40 个循环。

1.5 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件包进行统计学处理。统计方法为计量资料两组间比较采用配对 *t* 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 组内比较及治疗前后的比较用方差分析。

2 结 果

2.1 荧光定量 PCR 溶解曲线及扩增曲线分析 随机抽取样品, 通过溶解曲线图及扩增曲线分析, 以检测样品质量及确定合适的实验条件。结果显示, HBsAg, HBeAg, PreS2 和 GAPDH 溶解曲线均为单一峰二分之一溶解温度略有差异, 四种基因均无杂信号出现, 而且据扩增曲线得知目的基因都可以达到平台期见图 1 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 荧光定量 PCR 检测 HBsAg, HBeAg, PreS2 基因的表达 从分析结果可以看出, 乙肝患者血清中 HBsAg, HBeAg, PreS2 的 Ct 值均值分别为 25.57 $\pm$ 3.65, 27.74 $\pm$ 3.94 和 23.56 $\pm$ 3.54, 阴性对照组血清中的 HBsAg, HBeAg, PreS2 的 Ct 值分别为 30.46 $\pm$ 3.23, 32.14 $\pm$ 3.79 和 28.18 $\pm$ 3.37, 乙肝患者 HBsAg, HBeAg, PreS2 的 Δ Ct 值为 8.57, 9.74 和 7.56, 阴性对照组 Δ Ct 值为 13.46, 14.14 和 12.18 根据二者的平均 2- $\Delta\Delta$ Ct 值计算可知, 乙肝患者组血清中 HBsAg, HBeAg, PreS2 的平均含量比阴性对照组的高 29.65, 21.11 和 24.59 倍, 而且两者之间差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

乙型肝炎病毒简称 HBV^[1]。肝炎病毒基因组共有 4 个 ORF, 编码以下一些蛋白: Core 蛋白和 pre-core 蛋白, Pol 蛋白, X 蛋白, 以及 S 蛋白 (L, M, S)。Core 是核衣壳蛋白; Pre-core 可能与抑制宿主的免疫反应有关; X 蛋白对病毒复制是重要的, 还与肝癌的发生有关; S 蛋白是病毒的包膜蛋白, 与病毒进入细胞有关^[2-4]。目前, 已可从感染 HBV 患者血清中及感

染肝脏提纯的病毒核心中分离出环状双股 DNA,从而确定 HBV 属 DNA 病毒。目前,由于克隆化 DNA 完整核苷酸已经确定,现已证实 HBsAg 和 HBcAg 都是由 Dane 颗粒的 DNA 所编码,并且二类基因存在同一 DNA 分子上。有报道发现 HBV DNA 负链能编码全部已知的 HBV 蛋白质,而其正链开放读码区,不能编码病毒蛋白^[5]。HBVDNA 负链有 4 个开放区,分别称为 S、C、P 及 X,能编码全部已知的 HBV 蛋白质。S 区可分为 2 部分,S 基因和前 S 基因。S 基因能编码主要表面蛋白。S 基因之前是 1 个能编码 163 个氨基酸的前 S 基因,编码 PreS1 和 PreS2 蛋白。C 区基因包括前 C 基因和 C 基因,分别编码 HBeAg 和 HBcAg。P 区最长,约占基因组 75% 以上,编码病毒体 DNA 多聚酶。X 区可能编码有 154 个氨基酸的碱性多肽^[6-9]。

乙肝病毒在感染人体后,乙肝标志物变化有以下特点:(1)潜伏期乙肝病毒表面抗原阳性,或伴乙肝病毒脱氧核糖核酸聚合酶和乙肝病毒 e 抗原阳性;(2)急性期 HBsAg, HBeAg, 抗-HBc, HBV-DNAP, HBV-DNA, 前 S 蛋白均可阳件,乙肝病毒核心抗体 M 型免疫球蛋白高滴度,抗-HBc 滴度逐渐升高;(3)恢复期 HBsAg, HBeAg, HBcAg, HBV-DNAP, 前 S 蛋白等均转阴,抗-HBcIgM 滴度下降并消失,抗-HBc 持续高滴度,乙型肝炎表面抗体,滴度逐渐升高,抗-HBe 可显阳性。因此,动态观察乙肝标志物有助于急性乙型肝炎的诊断,临床、上应用以下两项标准或其中 1 项诊断急性乙型肝炎。HBsAg 滴度由阴性到阳性高滴度,再由高滴度到低滴度,消失后抗 HBs 阳转。急性期抗-HBcIgM 滴度高水平,耐抗-HBc 阴性或低水平,恢复期则相反^[10-12]。

用分子生物学的方法荧光定量 PCR 检测乙肝病毒标志物 HBsAg, HBeAg, PreS2 的表达研究,发现乙肝患者 HBsAg, HBeAg, PreS2 的基因表达明显高于阴性对照组,这给医学鉴定乙肝患者提供了生物学依据,是 1 种快速准确的鉴定乙肝患者的方法,给临床提供了更有力的依据。

参考文献

[1] Sofian M, Aghakhani A, Izadi N, et al. Lack of occult hepatitis B

• 经验交流 •

virus infection among blood donors with isolated hepatitis B core antibody living in an HBV low prevalence region of Iran[J]. Int J Infect Dis, 2010, 14(4): e308-310.

[2] Penna A, Laccabue D, Libri I, et al. Peginterferon- α does not improve early peripheral blood HBV specific T-cell responses in HBeAg-negative chronic hepatitis[J]. J Hepatol, 2012, 56(6): 1239-1246.

[3] Chen H, Li J, Wu Q, Niu XT, et al. Anti-HBV activities of *Strebilus asper* and constituents of its roots[J]. Fitoterapia, 2012, 83(4): 643-649.

[4] Beasley RP. Rocks along the road to the control of HBV and HCC [J]. Ann Epidemiol, 2009, 19(4): 231-234.

[5] Jiang SZ, Gao ZY, Li T, et al. T3098C and T53C mutations of HBV genotype C is associated with HBV infection progress[J]. Biomed Environ Sci, 2009, 22(6): 511-517.

[6] Liu H, Luan F, Ju Y, et al. In vitro transfection of the hepatitis B virus PreS2 gene into the human hepatocarcinoma cell line HepG2 induces upregulation of human telomerase reverse transcriptase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 355(2): 379-384.

[7] Hadiji-Abbes N, Borchani-Chabchoub I, Triki H, et al. Expression of HBsAg and preS2 S protein in different yeast based system; A comparative analysis[J]. Protein Expr Purif, 2009, 66(2): 131-137.

[8] 林森, 易荣. 实时荧光定量 PCR 对乙肝 DNA 检测的影响因素 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 32(1): 127-128.

[9] 谢国强, 邵耀明, 徐苗. 乙型肝炎病毒外膜大蛋白 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 31(2): 87-89.

[10] 陈书恩, 桑沛霞, 杜丽伟, 等. 乙型肝炎病毒大蛋白检测对乙型肝炎的诊断价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 30(7): 730-732.

[11] 韩刚, 陈琳, 吴月平. 荧光 PCR 法检测 HBV 感染者 HBV 基因型及其临床应用 [J]. 南通大学学报: 医学版, 2012, 32(1): 61-62.

[12] 刘明水, 韦嘉. IFN- λ s 与乙型肝炎及丙型肝炎抗病毒治疗的相关性 [J]. 医学综述, 2012, 18(3): 385-388.

(收稿日期: 2012-06-19)

乙型肝炎病毒血清标记物少见模式复检及分析

李光友¹, 苏贵灵², 高 朋¹, 冯 岚¹

(1. 安徽省芜湖市第二人民医院检验科, 安徽芜湖 241001;

2. 安徽省芜湖市第一人民医院儿科, 安徽芜湖 241001)

摘要:目的 通过对乙型肝炎病毒血清标记物少见模式复检, 观察结果的符合情况, 并结合转氨酶和 HBV-DNA 对乙型肝炎病毒血清标记物 (HBV-SM) 少见模式进行综合分析。方法 采用 ELISA 法测定 HBV-SM; 采用荧光定量聚合酶链反应 (FQ-PCR) 法检测 HBV-DNA 含量; 采用全自动生化分析仪检测转氨酶。结果 18 372 例样本初检, 发现 711 例共 13 种 HBV-SM 少见模式, 通过双孔平行复检, 检出 HBV-SM 少见模式为 388 例, 占总检测例数的 2.11% (388/18 372), 占初检少见模式例数的 54.57% (388/711)。HBV-SM 少见模式 HBV-DNA 总阳率为 32.81%; ALT 和 AST 总阳率分别为 10.00% 和 10.67%。结论 HBV-SM 少见模式应进行复检, 并结合转氨酶和 HBV-DNA 进行综合判断。

关键词: 肝炎, 乙型; 肝炎病毒, 乙型; 生物学标记; 血清

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.061

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2012)23-2933-03

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒 (HBV) 所引起的传染性疾病^[1]。乙型肝炎病毒血清标记物 (HBV-SM) 是乙型肝炎临床诊治、病情监测及疗效观察的重要依据。近几年来由于抗病毒

药物及乙肝疫苗的广泛使用等给检测结果的判断带来不便^[2-4]。因此, 研究者对出现的 HBV-SM 少见模式进行复检, 观察结果的符合情况, 并结合转氨酶和 HBV-DNA 进行综合