

• 临床检验研究论著 •

荧光定量分型 PCR 法在 HBV-DNA 检测中的应用

邓红丽,李志波,张红玉,李鲜花

(湖南省浏阳市人民医院,湖南浏阳 410300)

摘要:目的 探讨荧光定量分型 PCR 法在乙型肝炎病毒(HBV)-DNA 检测中的作用,为 HBV 基因的分型提供参考。方法 对 120 份 HBV-DNA 阳性样本分别采用荧光定量分型 PCR 法和直接测序法检测,比较两种方法的检测效果。结果 120 份样本均被荧光定量分型 PCR 法和直接测序法成功分型,荧光定量分型 PCR 检出 29(24.17%)例混合感染样本,直接测序法检出 7(5.83%)例,前者检出率高于后者($\chi^2=15.817, P=0.000$);两种方法的一致性较好(Kappa 值为 81.67%);检测结果不一致的样本经 TA 克隆后,证实与荧光定量分型 PCR 法的检测结果一致。结论 荧光定量分型 PCR 法是一种简便、快速高效的 HBV 基因分型法,对基因型混合感染样本的检出率高于直接测序法,且正确率高。

关键词:乙型肝炎病毒; 聚合酶链反应; 直接测序法; 基因型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.07.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)07-0833-02

Application of fluorescence quantitative PCR method for detection of HBV-DNA

Deng Hongli, Li Zhibo, Zhang Hongyu, Li Xianhua

(The People's Hospital of Liuyang, Liuyang, Hunan 410300, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of fluorescent quantitative PCR method for detection of HBV-DNA, and to provide the reference for the HBV genotyping. **Methods** 120 HBV-DNA positive samples were detected by fluorescence quantitative PCR typing method and direct sequencing respectively, and the results of two methods were compared. **Results** 120 samples were successfully typed with fluorescent quantitative PCR method and direct sequencing method, 29 (24.17%) samples with mixed genotypes were detected by fluorescence quantitative PCR method, 7 (5.83%) cases with mixed genotypes were detected by direct sequencing method, the detection rate of the former was higher than that of the latter ($\chi^2=15.817, P=0.000$). The consistency of two methods was better (Kappa = 81.67%). **Conclusion** Fluorescence quantitative PCR method is a simple, rapid and efficient HBV genotyping method, detection rate for the mixed genotypes of samples is higher than that of direct sequencing, and the accuracy is high.

Key words: hepatitis B virus; polymerase chain reaction; direct sequencing method; genotype

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)可引起慢性、急性肝炎,甚至肝癌,对人体健康危害非常大^[1]。根据 HBV 全基因组序列差异大于或等于 8%,或者 S 基因序列大于或等于 4%,临床上通常将 HBV 分为 A~H 型,共 8 个基因型^[2]。我国主要分布的基因型有:B 型、C 型,以及 B、C 混合型。因此,对 HBV 感染进行正确分型,对于指导诊断和治疗有重要意义。HBV-DNA 是 HBV 感染最直接,灵敏性最高的指标。本院以 120 份 HBV-DNA 阳性样本为研究对象,探讨荧光定量分型 PCR 在 HBV-DNA 检测中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 9 月至 2013 年 9 月本院感染科住院部收治的乙肝患者作为研究对象。纳入标准:(1)符合 2000 年病毒性肝炎防治方案的诊断标准^[1];(2)HBV 表面抗原(HBsAg)均为阳性;(3)获得患者知情同意。排除标准:(1)孕产妇、哺乳期妇女;(2)合并有心、肝、肾功能障碍者;(3)合并有其他可能影响实验结果的疾病。符合纳入排除标准的共 120 例,其中男性 69 例,女性 51 例;年龄 23~78 岁,平均(47.6±12.8)岁;病程 0.5~5 年,平均(1.2±0.4)年。

1.2 仪器与试剂 仪器:CFX96TM 实时定量 PCR 仪、凝胶成像仪为美国 Bio-Rad 公司产品。ABI 3100 Genetic Analyzer 为美国 ABI 公司产品。试剂:PCR 试剂由中山大学达安基因股份有限公司提供,试剂盒 DNA Marker 为日本 TaKaRa 公司产品。

1.3 方法 空腹采血,离心后用煮沸裂解法从血清中提取

HBV-DNA,于 -20 ℃ 的环境下保存待检。荧光定量分型 PCR 基因分型:PCR 反应总体积大约为 20 μ L,其中包括 2 μ L DNA 模板,10 μ L 反应混合液,另外还有 3 种不同分型的探针和引物,包括 2 μ L(0.3 μ mol/L)B 型探针、2 μ L(0.3 μ mol/L)C 型探针以及 2 μ L(0.5 μ mol/L)B、C 型引物。然后由 CFX96TTPCR 扩增仪进行扩增检测,并采用 CFX Manager TM1.1 软件进行数据分析^[4]。直接测序基因分型:将 S 基因区域进行扩增,扩增的条件为 94 ℃ 预变性 5 min,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s。接着采用双脱氧链末端终止法对测序片段进行扩增纯化变性,并对序列进行分析,统计数据^[3]。最后用 NCBI 工具进行基因分型,比如双峰则被认为是 B、C 型混合感染。TA 克隆:对两种检测方法检测结果不一致时进行 TA 克隆,挑取大约 20~40 个阳性克隆之后,对单菌落测序检测其基因型。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件录入并进行统计学分析。一致性计算采用一致性计算公式,定性资料的描述采用 χ^2 检验和秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法的基因分型结果 共对 120 例样本进行检测,且均被荧光定量分型 PCR 法和直接测序法成功分型;两种方法检测结果显示基因中只存在 3 种类型的基因型,分别为 B 型、C 型以及 B、C 型混合感染,B 型在这些基因型中所占的比例最大。荧光定量分型 PCR 检出 29 例(24.17%)混合感染样本,直接测序法检出 7(5.83%)例,荧光定量分型 PCR 法检出

率高于直接检测法($\chi^2=15.817, P=0.000$)。见表 1。

表 1 两种方法基因分型的结果比较[n(%)]

检测方法	B 型	C 型	B、C 型混合感染
荧光定量分型 PCR 法	81(67.50)	10(8.33)	29(24.17)*
直接测序法	95(79.17)	18(15.00)	7(5.83)

*: $P<0.05$, 与直接测序法比较。

2.2 两种检测方法基因分型结果一致性检验 两种检测方法对 120 例样本成功分型, 对两种方法的一致性进行检测, 得 Kappa 值系数为 81.67%, 大于 75%, 说明一致性较好。见表 2。

表 2 两种检测方法基因分型结果一致性检验(n)

直接测序法	荧光定量分型 PCR			合计
	B 型	C 型	B、C 型混合感染	
B 型	81	0	14	95
C 型	0	10	8	18
B、C 型混合感染	0	0	7	7
合计	81	10	29	120

2.3 TA 克隆基因分型结果 经过两种方法检测得到总共 22 份检测结果不一致的样本, 从其中随机选出由荧光定量分型 PCR 法检测为混合感染, 而直接测序法检测为单一型感染的 10 份样本进行 TA 克隆, 分别挑选出 50 个克隆后测序检测基因型, 结果发现 10 份样本均存在 B 型和 C 型基因, 说明样本为混合感染, 与荧光定量分型 PCR 法的检测结果相同。

3 讨 论

HBV 是一种与 DNA 有关的病毒, 它是引起人类急、慢性肝炎的 DNA 病毒, 也被称为丹氏颗粒^[5]。临床上通常将 HBV 根据其全基因组序列差异或者 S 基因序列分为 8 个基因分型^[6]。这 8 个基因分型主要是由长期病毒突变以及宿主的筛选累积形成的, 因此它不仅反映出病毒种系发生关系以及核算变异程度, 而且与感染者的临床表现、抗病毒疗效以及预后情况息息相关^[7]。

HBV-DNA 是 HBV 感染最为直接、特异和敏感的指标, HBV-DNA 阳性则表示 HBV 复制且有传染性^[8]。HBV-DNA 定量检查是检查 HBV 在人体血液中的含量, 这对于指导医务工作者了解患者的病情发展状况, 并采取更好的治疗方式有重要意义。

研究显示我国分布的主要基因型是 B 型、C 型, 以及 B、C 型混合感染。对于基因型检测方法主要包括序列分析法、PCR 分型法、聚合酶反应法、杂交法以及酶联免疫法^[9]。以往临床上通常将序列分析法作为 HBV 基因分型的金标准, 但该方法的操作过程复杂, 且耗时、耗力^[10-12]。荧光定量分型 PCR 法作为一种新兴的方法被用于临床, 为了研究荧光定量分型 PCR 法在 HBV-DNA 阳性检测中的应用, 本院展了本次研究。本次研究中作者选用的探针为 TaqMan, 该探针是一种寡核苷酸探针, 其 5' 末端连有荧光基团, 3' 末端连有淬灭基团。探针配对靶序列时, 荧光接近淬灭基团就会被淬灭; 而延伸反应中, 聚合酶 5' 端外切酶活性切断探针, 致使荧光、淬灭两基团分离, 荧光可发射。随着扩增循环数的不断增加, 荧光基团的释放量也就得到了不断积累。

本研究发现, 两种方法检测结果显示基因中只存在 3 种类型的基因型, 分别为 B 型、C 型, 以及 B、C 型混合感染, B 型基

因在这些基因型中所占的比例最大。荧光定量分型 PCR 检出了 29 例 (24.17%) 混合感染样本, 直接测序法检出 7 例 (5.83%), 荧光定量分型 PCR 法检出率高于直接检测法($\chi^2=15.817, P=0.000$)。两种方法进行一致性检测, 得 Kappa 值为 81.67%, 大于 75%, 说明一致性较好。两种方法检测得到总共 22 份检测结果不一致的样本, 从其中随机选出由荧光定量分型 PCR 法检测为混合感染, 而直接测序法检测为单一型感染的 10 份样本进行 TA 克隆, 分别挑选出 50 个克隆后测序检测基因型, 结果发现 10 份样本均存在 B 型和 C 型基因, 说明样本为混合感染, 与荧光定量分型 PCR 法的检测结果相同。从本次研究结果中可以看出, 荧光定量分型 PCR 法是一种以特异性探针法为主的检测方法, 尤其对于混合感染的检测敏感度较高。而且该方法操作简便、特异度高, 且降低了检测过程中的污染的可能性, 使整个检测的速度得到提升。

综上所述, 荧光定量分型 PCR 法是一种简便、快速、高效的 HBV 基因分型法, 对基因型混合感染样本的检出率高于直接测序法, 且正确率高, 适合针对我国分布的主要 HBV 基因型进行分型检测, 值得在临床上推广应用。

参考文献

[1] 中华医学会传染病与寄生虫病学会、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.

[2] 陈占国, 周武, 王忠永, 等. 实时荧光定量 PCR 检测血 HBV-DNA 的疑难结果分析及其对策[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(3): 217-221.

[3] 张秀瑜, 赵耀, 张文露, 等. 荧光定量分型 PCR、多重 PCR 和测序检测 HBV 基因型的方法学比较[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2010, 30(12): 1154-1157.

[4] 郭洪晨. 荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 假阴性原因分析[J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(13): 3131-3132.

[5] 腾惠琴, 张盛杰, 王秀虹, 等. 乙肝病毒对核苷(酸)类似物产生耐药突变与耐药后处理之研究进展[J]. 中西医结合肝病杂志, 2010, 20(2): 126.

[6] Lee HW, Kim HJ, Hong SP, et al. Simultaneous emergence of entecavir resistance mutations in a nucleoside-naïve chronic hepatitis B patient[J]. Intervirology, 2012, 55(5): 380-384.

[7] Witjes CD, Ijzermans JN, van der Eijk AA, et al. Quantitative HBV DNA and AST are strong predictors for survival after HCC detection in chronic HBV patients[J]. Neth J Med, 2011, 69(11): 508-513.

[8] 张秀瑜, 赵耀, 张文露, 等. 荧光定量分型 PCR 检测重庆地区乙型肝炎病毒感染者 HBV 基因型分布特征[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(1): 91-94.

[9] Mota A, Guedes F, Areias J, et al. Epidemiological and genotypic profile of hepatitis B virus infection in Northern Portugal[J]. Rev Sande Publian, 2010, 44(6): 1087-1093.

[10] 胡金华, 程书权, 唐振祥, 等. 不同基因型 HBV 感染的慢性乙型肝炎患者临床与病理改变研究[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(4): 355-357.

[11] 陈永琴, 金文君, 戴梦璐. 慢性乙型肝炎患者 IFN- γ 、IL-10 和 CD19+ 水平检测与病毒载量的关系[J]. 检验医学, 2013, 28(4): 336-338.

[12] 刘媛, 赵洁, 龙璐, 等. HCV 慢性感染及自发清除对血清微量元素含量的影响及其与血清清蛋白和 HCV 病毒载量的关联研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2013, 7(12): 922-926.