

论著·临床研究

基于高通量测序下低拷贝乙型肝炎病毒检测方法的应用分析

赖伟兰, 谢丽明, 陈亚军

(韶关市妇幼保健计划生育服务中心检验与遗传中心, 广东韶关 512000)

摘要:目的 建立一种针对临床低拷贝乙型肝炎病毒(HBV)的检测方法。方法 选取 2017 年 1—10 月该院收治的乙型肝炎患者 30 例作为研究对象。采集患者血清样本进行 HBV 病毒基因组提取,通过 HBV DNA 定量检测试剂盒[聚合酶链反应(PCR)荧光探针法]对 HBV DNA 样本进行定量检测。选择 HBV $<4\times 10^3$ copy/mL 的病毒 DNA 6 例,分别进行全基因组一步法建库及巢式 PCR 扩增法建库。采用 Illumina Miseq 平台对构建好的文库进行测序。通过生物信息学方法对所得数据进行分析。结果 与 HBV B 型参考基因组比对,全基因组一步法建库匹配率很低,且数据产量低。巢式 PCR 扩增法建库匹配率达 75.61%,且样本覆盖率及测序深度较好。6 例低拷贝 HBV 样本共发现 29 个宿主内 iSNV,且存在 15 个低频突变。结论 巢式 PCR 扩增 HBV 全基因组建库进行高通量测序可用于低拷贝 HBV 的检测,且能发现低频突变。

关键词:肝炎病毒,乙型; 聚合酶链反应; 序列分析,DNA; 突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.23.023

中图法分类号:R512.6+2;R446.1

文章编号:1673-4130(2018)23-2937-04

文献标识码:A

Application of low-copy hepatitis B virus detection method based on high-throughput sequencing

LAI Weilan, XIE Liming, CHEN Yajun

(Center for Testing and Genetics, Shaoguan Maternal and Child Health Family Planning Service Center, Shaoguan, Guangdong 512000, China)

Abstract: **Objective** To establish a detection method for clinical low copy hepatitis B virus (HBV). **Methods** 30 patients with hepatitis B admitted to the hospital from January to October 2017 were selected as the subjects of study. Serum samples were collected for HBV genome extraction, and HBV DNA samples were quantitatively detected by the quantitative detection kit of HBV nucleic acid [polymerase chain reaction (PCR) fluorescent probe method]. 6 cases of viral nucleic acid with HBV $<4\times 10^3$ copy/mL were selected to construct whole-genome one-step library and nested PCR library respectively. Illumina Miseq platform was used to sequence the constructed library. The data were analyzed by bioinformatics. **Results** Compared with HBV B reference genome, the matching rate of one-step genome library construction was very low and the data output was low. The matching rate of nested PCR was 75.61%, and the sample coverage and sequencing depth were good. A total of 29 iSNVs were found in 6 low-copy HBV samples with 15 low-frequency mutations. **Conclusion** The whole genome library of HBV amplified by nested PCR and high throughput sequencing can be used to detect low-copy HBV and detect low-frequency mutations.

Key words: hepatitis B virus; polymerase chain reaction; sequence analysis, DNA; mutation

乙型肝炎病毒(HBV)是一种逆转录 DNA 病毒,可导致急、慢性肝炎,肝硬化,甚至肝癌^[1-2]。有研究表明,我国 HBV 感染人群达 90 余万,居病毒性疾病之首^[2-3]。因此,HBV 的早期诊断及准确性对患者治疗具有重要作用。目前,临床 HBV 的检测主要依赖于荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术及常规 Sanger 测序技术^[4-5]。然而,随着 HBV 微进化造成的突变,尤其是大量低频突变的出现,增大了传统检测技术的难度。此外,对低拷贝 HBV 降低了核酸 DNA 浓度,同样增加了常规检测的局限性,使一些潜在的 HBV

感染患者错过了最佳治疗时机^[6]。近年来,高通量测序技术飞速发展,其能对样品中数以万条 HBV 序列进行测序,实现病毒低频突变的检出^[7]。然而,血液中宿主核酸 DNA 偏大,增加了测序后对病毒数据分析的偏差,尤其是低拷贝 HBV 血液。本研究探索并建立了一种能实现低拷贝 HBV 的检测方法,旨在为未来临床中潜在 HBV 感染者的诊断提供技术支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 1—10 月本中心住院部收治的乙型肝炎患者 30 例作为研究对象,其中男

作者简介:赖伟兰,女,副主任技师,主要从事妇婴疾病检测方向的研究。

本文引用格式:赖伟兰,谢丽明,陈亚军. 基于高通量测序下低拷贝乙型肝炎病毒检测方法的应用分析[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(23):2937-2940.

14 例,女 16 例;年龄 22~57 岁,平均(43.5±12.7)岁。所有患者均经血液乙型肝炎五项检测及影像学检查确诊为 HBV 感染阳性。本研究已通过本院伦理委员会批准,且患者均签订知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 HBV 基因组提取 30 例 HBV 感染阳性患者均保留其静脉血 5 mL,分离血浆。采用病毒基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技北京有限公司),按说明书操作要求对患者 HBV DNA 进行提取后置于-80℃保存备用。

1.2.2 HBV 浓度测定及低拷贝 HBV 样本筛选 采用 HBV 实时荧光定量 PCR 测试试剂盒(PCR 荧光探针法,深圳市普瑞康生物技术有限公司),以提取 HBV DNA 为模板,按试剂盒说明书操作,进行 30 例 HBV 感染阳性患者血浆 HBV 拷贝数定量检测。ABI7500 荧光定量 PCR 仪扩增反应程序为 37℃ 5 min;94℃ 2 min;94℃ 20 s,55℃ 30 s,72℃ 10 s,40 个循环;25℃ 10 s。选择 FAM 为 HBV 扩增信号, VIC 为内标扩增信号;将 HBV 工作标准品设为“Standard”并输入说明书中的参数,待测样品和对照品设定为“Sample”。待程序结束后读取样品值、分析数据。根据临床 HBV 拷贝数范围,选择 HBV<4×10³ copy/mL 的病毒 DNA 6 例作为低拷贝 HBV 检测对象。

1.2.3 全基因组一步法对低拷贝 HBV 病毒建库 6 例 HBV 病毒均应用 DynaMag-2 Magnet 12321D 磁力架及 AMPure XP beads 磁珠(美国,Beckman Coulter 公司)对 HBV 病毒核酸进行磁珠吸附纯化。采用 Qubit dsDNA HS Assay Kit(美国,Invitrogen 公司)对纯化后 HBV 定量 DNA 样本浓度。按 Nextera XT DNA Library Preparation Kit 试剂盒(美国,Illumina 公司)说明书进行 HBV 病毒文库构建。构建后文库应用 Aligent2000 仪器(美国,Agilent Technologies 公司)对文库质量进行评估。

1.2.4 巢式 PCR 扩增法对低拷贝 HBV 病毒建库 由于 HBV 基因组的特殊结构,无法采用从头和尾直接设计引物进行 PCR 扩增。将 HBV 全长基因分为 A(nt1 825~0~702)片段和 B(nt503~1 823)片段。结合 GUNTHER 等^[8]设计的缺口区末端引物及孙树海等^[9]设计的巢式 PCR 引物,本研究设计了 HF1、HF2、HR1、HR2、P3 及 P4 6 条引物。其中引物 P3 (Reverse)5'-CTC GCT CGC CCA AAT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA-3'及 P4 (Reverse)5'-CTG GTT CGG CCC AAA AAG TTG CAT GGT GCT GG-3'为缺口区末端引物。HF1 (Forward)5'-GTC TGC GGC GTT TTA TC-3',HF2 (Forward)5'-TGC CCG TTT GTC CTC TA-3',HR1 (Forward)5'-ACA GTG GGG GAA AGC-3'及 HR2 (Forward)5'-AGA AAC GGR CTG AGG C-3'为针对 a 表位保守区设计

的通用引物。所有引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,将引物浓度稀释为 10 μmol/L,分装后-20℃保存。巢式 PCR 扩增为 A 和 B 片段分别进行 2 轮巢式扩增。其中 A 片段第 1 轮扩增以 P3 和 HR1 为引物,以 HBV DNA 为模板进行 PCR 扩增;A 片段第 2 轮扩增以 P3 和 HR2 为引物,以 A 片段的第 1 轮产物为模板进行 PCR 扩增。B 片段第 1 轮扩增以 HF1 和 P4 为引物,以 HBV DNA 为模板进行 PCR 扩增;B 片段第 2 轮扩增以 HF2 和 P4 为引物,以 B 片段的第 1 轮产物为模板进行 PCR 扩增。所有反应均采用 LA Taq 聚合酶(5 U/μL,日本,TaKaRa 公司)。AB 片段的第 1 轮扩增反应程序为 94℃预变性 4 min;94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 2.5 min,35 个循环;72℃延伸 5 min。AB 片段的第 2 轮扩增反应程序为 94℃预变性 4 min;94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 2 min,20 个循环;72℃延伸 5 min。每轮 PCR 扩增反应后均进行磁珠纯化。A、B 2 段 PCR 第 2 轮扩增产物经 Qubit dsDNA HS Assay Kit(美国,Invitrogen 公司)定量后等摩尔比例混合,再次进行浓度定量。使用 Nextera XT DNA 文库准备试剂盒,按说明书构建测序文库。

1.3 数据处理 6 例低拷贝 HBV 样本经 2 种方法构建文库后通过 Illumina MiSeq 测序平台进行高通量测序。测序后原始数据经错误率检查、接头处理等步骤后获得 clean reads,然后将 clean reads 进行合并后获得 Raw tags。通过 GATK 工具和 SAMTOOLS 软件,依据:(1)突变位点总 reads 覆盖度≥20;(2)比对质量 MQ≥30,对宿主内单核苷酸变异(iSNV)进行鉴定及过滤。

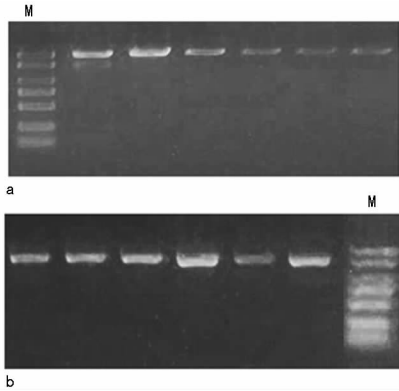
2 结果

2.1 入组患者 HBV 浓度 HBV 为 10³~10⁷ copy/mL,<4×10³ copy/mL 的病毒核酸 6 例,>4×10⁷ copy/mL 的病毒核酸 13 例。见表 1。

表 1 入组患者 HBV 浓度

样品编号	荧光定量 PCR (copy/mL)	样品编号	荧光定量 PCR (copy/mL)
1	3.83×10 ³	16	1.85×10 ⁶
2	2.46×10 ³	17	9.03×10 ⁷
3	5.42×10 ⁶	18	4.11×10 ⁷
4	8.35×10 ⁷	19	8.42×10 ⁵
5	2.08×10 ⁶	20	1.15×10 ⁷
6	5.22×10 ⁷	21	2.47×10 ³
7	8.31×10 ⁷	22	3.05×10 ⁷
8	7.42×10 ³	23	4.18×10 ⁶
9	5.95×10 ⁷	24	5.71×10 ⁷
10	1.37×10 ⁸	25	1.06×10 ³
11	2.59×10 ⁴	26	5.95×10 ⁷
12	1.38×10 ³	27	4.96×10 ⁷
13	3.15×10 ⁸	28	3.14×10 ³
14	2.45×10 ⁷	29	1.01×10 ⁸
15	9.69×10 ⁷	30	2.18×10 ⁷

2.2 巢式 PCR 扩增低拷贝 HBV 病毒基因组
HBV 基因组巢式 PCR 采用 LA Taq 聚合酶进行 2 段扩增。2 轮 PCR 扩增后 A 和 B 段 PCR 产物大小分别为 2 092、1 320 bp。见图 1。



注:a 代表 A 片段 6 个低拷贝 HBV 样本扩增电泳图;b 代表 B 片段 6 个低拷贝 HBV 样本扩增电泳图。M 代表分子量标记物,条带大小由上到下依次为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp

图 1 HBV 巢式 PCR 扩增电泳图

2.3 全基因组一步法对低拷贝 HBV 病毒建库的影响
因血浆中含有大量的宿主基因信息,将此数据信息剔除后,6 个样本的平均数据为 1.8 M,并没有数据匹配到病毒数据库中。表明由于宿主基因信息干扰,全基因组一步法建库不能用于低拷贝 HBV 病毒样本中。

2.4 巢式 PCR 扩增法对低拷贝 HBV 病毒建库的影响
6 个低拷贝 HBV 样本平均数据量为 5 496,与 HBV B 型参考基因组(AB981583)比较,平均匹配度为 75.61%,平均测序深度为 59.7。见表 2。

表 2 巢式 PCR 扩增法建库高通量测序结果				
样品编号	数据	匹配度(%)	深度	iSNV 数量
1	5118	77.13	58.7	6
2	4985	73.05	63.5	4
12	5095	68.91	61.4	10
21	5910	75.56	63.2	4
25	6022	77.35	57.9	3
28	5845	81.65	53.6	2

2.5 宿主内 iSNV 分析
6 个样本中共识别出 29 个 iSNV。见表 2。6 个样本所有 iSNV 中突变频率最低为 0.02,最高为 0.93,且存在 15 个突变频率<20% 的 iSNVs。

3 讨 论

HBV 是一种常见嗜肝性 DNA 病毒,也是一种逆转录病毒。人体在感染 HBV 病毒后受机体本身免疫情况及病毒特性不同,大多数 HBV 感染患者的临床表现也不同^[10-12]。

DNA 复制是导致 HBV 感染患者病情发展的关键因素,病毒被大量激活后潜在的 HBV 携带者会转

变为慢性 HBV 感染,甚至急性 HBV 感染^[13]。然而,临床诊断中部分 HBV 感染阳性患者所携带的 HBV 拷贝数低,传统 HBV 检测诊断方法,如荧光定量 PCR 技术及常规 Sanger 测序技术无法进行准确的检测^[4-5]。这些检测技术对全长基因组分析具有局限性,只能检测到宿主体内优势病毒株序列,大量低频突变不能被检出,不能真实反映病毒在体内的情况。本研对低拷贝的 HBV 病毒进行高通量测序,建立了一种未来临床中潜在 HBV 感染患者的诊断方法。

早前研究发现,HBV 基因组结构特异,基因组中存在 2 处缺口,且存在单链 DNA 结构,同时,还存在部分双链 DNA 结构^[14]。目前,HBV 全基因组扩增有 2 种方式。一种是基于缺口区引物进行的 HBV 全长基因组一步法扩增,另一种是基于巢式 PCR 的多片段多步法扩增。随着高通量测序技术的迅猛发展,其应用领域已深入到临床诊断中^[15],为分析 HBV 基因组全貌和致病机制的深入研究提供了可能性。

高通量测序技术依赖于文库的构建,文库构建方式通常有核酸直接建库及扩增子建库。本研究结果显示,低拷贝 HBV 基于巢式 PCR 扩增后的扩增子建库,无论从数据产量还是测序质量方面均优于 HBV 全基因组一步法建库。这是由于 HBV 病毒核酸提取时会携带大量宿主信息,这些信息在随着高通量测序的数据产生,并映射到人类基因组上。然而,在比对 HBV 基因组时测序产生的原始数据会过滤到除病毒基因组外的其他冗余信息,使大量宿主有效读段信息被过滤掉,从而导致匹配到 HBV 基因组上的信息很少,无法进行后续数据分析。巢式 PCR 扩增子建库大大排除了宿主信息的干扰,以 HBV DNA 为模板进行扩增,增加了 HBV 拷贝数,从而增加了测序的有效读数量。此外,本研究针对低拷贝 HBV 样本同样获得较好的数量产量、匹配度及覆盖度,该方法在方法学建立上已成功。

本研究通过对 iSNV 进行分析共发现 29 个 iSNV,且存在 15 个突变频率<20% 的 iSNVs。这些低频突变是传统检测方法无法检出的。有关低拷贝 HBV 突变的研究较少,但低拷贝病毒样本的低频突变在人类免疫缺陷病毒(HIV)中也存在。PROSPERI 等^[16]发现,<10³ copy/mL 的 HIV 样本基因组中存在较多的抗性突变。表明低拷贝 HBV 样本的检测在临床中应当被重视,低频突变可能与患者 HBV 潜在感染相关。

4 结 论

本研究基于巢式 PCR 扩增方法进行低拷贝 HBV 样本的全基因组扩增,并结合高通量测序技术,实现了低拷贝 HBV 低频突变的检测,为未来常规检测方式无法判断的潜在 HBV 感染患者的诊断提供了丰富的理论和技术支持。

参考文献

[1] 张蓉,史海霞. 标本因素对荧光定量荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(19):2775-2777.

[2] 陈红英,丁洁,游晶. 慢性乙型肝炎病毒感染者血清流行病学研究[J]. 中国全科医学, 2017, 20(8):939-942.

[3] 李元丰,思兰兰,翟芸,等. 全基因组关联研究发现 8p21. 3 区域的 INTS10 基因是一种新的抑制 HBV 感染的抗性基因[J]. 遗传, 2016, 38(7):674-675.

[4] 刘晓,欧国进,李玲,等. 一种适合中国地区 HBV 流行特征的荧光定量 PCR 检测方法的初探[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(4):368-371.

[5] 何紫琪,李从荣,童永清. 乙型肝炎病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(4):464-466.

[6] 赖新华,吕娜,彭艳辉. 实时荧光定量 PCR 对乙肝 DNA 检测的影响因素[J]. 中外医学研究, 2014, 21(5):63-64.

[7] 王伟,安小平,裴广倩,等. 不同样本前处理方法对高通量测序检测 HBV、HCV、TTV 结果的影响[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(2):236-240.

[8] GUNTHER S, LI B C, MISKA S, et al. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients[J]. J Virol, 1995, 69(9):5437-5444.

[9] 孙树梅,周浩,周彬. 焦磷酸测序与 PCR 产物直接测序在乙型肝炎病毒耐药基因检测中的敏感性比较[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(14):2991-2993.

[10] 杨新星,李东升,周继光,等. 乙型肝炎病毒感染不同阶段抗原肽特异性细胞毒性 T 淋巴细胞的初步研究[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(10):1496-1502.

[11] 孙春伟,吴玉卓,翟玉峰,等. HBV 感染患者中病毒携带与活动期机体树突细胞免疫功能变化[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(23):5346-5347.

[12] 史继静,张纪元,王福生. HBV 感染的免疫发病机制及抗病毒治疗策略[J]. 中国病毒病杂志, 2017, 7(3):161-166.

[13] 韩富秋,董海荣. 嘎勒登玛. 乙肝病毒大蛋白检测及其与 HBV-DNA 复制的相关性[J]. 包头医学院学报, 2017, 33(7):34-36.

[14] 闫涛,王慧芬,李克. HBV 基因组与变异[J]. 肝脏, 2010, 15(2):127-130.

[15] 吴丹,黄欢,孙丽洲. 高通量测序技术在遗传性疾病实验诊断中的应用[J/CD]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2016, 8(4):11-16.

[16] PROSPERI M C, MACKIE N, DI GIAMBENEDETTO S, et al. Detection of drug resistance mutations at low plasma HIV-1 RNA load in a European multicentre cohort study[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(8):1886-1896.

(收稿日期:2018-05-13 修回日期:2018-08-21)

(上接第 2936 页)

对老年骨科手术患者炎症相关因子与术后早期认知功能障碍的影响[J]. 岭南现代临床外科, 2016, 16(4):475-479.

[2] 罗琴,杨军. 硬膜外自控镇痛在老年骨科手术患者中的镇痛效果及对其术后应激的影响[J]. 海南医学院学报, 2014, 20(2):283-285, 288.

[3] 王延炳,陈震,康亚梅. 瑞芬太尼复合丙泊酚用于骨科手术中应用全静脉麻醉的临床效果[J]. 海峡药学, 2013, 25(5):65-66.

[4] 胡楚文,赵一凡,王飞,等. 右美托咪定预防骨科脊柱手术患者全麻后寒战的临床观察[J]. 临床麻醉学杂志, 2012, 28(1):34-36.

[5] 宋大勇. 氟比洛芬酯复合舒芬太尼用于骨科患者术后自控静脉镇痛[J]. 中外健康文摘, 2013, 10(25):14-15.

[6] 付玉杰. 瑞芬太尼复合丙泊酚在骨科手法复位中的麻醉处理[J]. 中国实用医药, 2012, 7(21):150-151.

[7] 陈容. 丙泊酚联合芬太尼用于无痛人流流产的麻醉效果观察[J]. 中国当代医药, 2012, 19(23):136-137.

[8] 袁芬. 瑞芬太尼复合丙泊酚对老年骨科手术患者炎症因子及术后认知功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(3):673-675.

[9] 张志杰,钟亚楠,古妙宁. 右美托咪啶对骨科止血带所致缺血-再灌注损伤的氧化应激和炎症因子的影响[J]. 中华创伤骨科杂志, 2014, 16(6):499-503.

[10] UPADHYAY K, BAVISHI A, THAKRAR S, et al. Synthesis and of 4-styrylcoumarin derivatives as inhibitors of TNF-alpha and IL-6 with anti-tubercular activity[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21(8):2547-2549.

[11] LUO W M, YU Q S, SALCEDO I, et al. Design, synthesis and biological assessment of novel N-substituted 3-(phthalimidin-2-yl)-2, 6-dioxopiperidines and 3-substituted 2, 6-dioxopiperidines for TNF- α inhibitory activity[J]. Bioorg Med Chem, 2011, 19(13):3965-3972.

[12] 鲁俊杰. 预防性使用抗菌药对骨科手术围手术期 SSI 的疗效分析及对 TNF- α 、IL-6、hs-CRP 水平的影响[J]. 中国合理用药探索, 2017, 14(6):13-16.

[13] LI L, SHI Q G, LIN F, et al. Cytokine IL-6 is required in Citrobacter rodentium infection-induced intestinal Th17 responses and promotes IL-22 expression in inflammatory bowel disease[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(3):831-836.

[14] 李文华,余玲玲,张雪霞,等. 骨科创口感染患者血清炎症指标变化研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2014(17):4322-4323, 4326.

[15] 马长华,袁林辉,李昌,等. 盐酸右美托咪啶对 OPCABG 高龄病人术后炎症反应及氧化应激反应的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(21):6005-6007.

[16] 吕培军,居奇吉. 骨科下肢手术止血带中采用右美托咪啶对减少不良反应的效果分析[J]. 浙江创伤外科, 2016, 21(5):979-980.

(收稿日期:2018-05-02 修回日期:2018-08-12)