

• 技术方法 •

一种简易基因水平鉴定 HBV 亚型的方法

曾 真¹ 李沛涛² 邬若楠² 曹 亚²

摘要 HBV S 基因 513bp 的 PCR 扩增产物, 用限制性内切酶 Msp I 和 BamH I 消化。adr 亚型基因片段, 用 Msp I 可将其切割成为两个分别为 320bp 和 193bp 的片段; ayw 亚型可被 Msp I 消化切割成为 326bp 和 187bp 的两个片段; ayw 的 HBV 扩增产物, 也可用限制性内切酶 BamH I 切割成 295bp 和 218bp 两条片段; adw 亚型 S 基因无 Msp I 的酶切位点, 不被切割; adw、adr 亚型 HBV 的 S 基因扩增产物无限制性内切酶 BamH I 的酶切位点, 不被切割。酶切后的产物用琼脂糖凝胶电泳, 电泳谱型与设计所预期的一致。各 HBV 亚型的 S 基因 RFLP 谱型在电泳中各异, 容易鉴别, 且酶切后的 DNA 片段清晰可见便于观察。该法为 HBV 基因分型和分子流行病学调查提供了一种新的可靠手段。

关键词 基因 乙型肝炎病毒

A Simplified Method for Detection of Genomic Subtypes of HBV S-gene Zeng Zhen, Li Pei-tao, Wu Ruo-nan, et al. Centre of Molecular Biology, Shenzhen People's Hospital, 518001

Abstract When the 513bp amplified fragments of HBV S-gene, known subtypes, were digested with Msp I and BamH I, the following phenomena appeared: adr subtypic 513bp was fragmented to 320bp and 193bp by Msp I; ayw subtype was digested and fragmented to 295bp and 218bp by BamH I; ayw could also be fragmented to become 326bp and 187bp digested by Msp I. However, adw subtype was not digested by Msp I and BamH I nor adr by BamH I. The experimental patterns in agarose gel electrophoresis were tallied with the expected patterns. Each HBV subtypes gave unique size of digestive fragments which was easy to observe and distinguish on a agarose gel. This study provided a new classification scheme for HBV-DNA and could be used for epidemiological investigation of HBV infection.

Key words Gene HBV

HBV 亚型分析的方法主要用间接血凝法和酶免疫法, 这些方法是依据 HBV 各亚型表面抗原的差异建立起来的蛋白质水平检测方法。限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP) 在遗传变异和基因定位以及功能研究中有重要作用, 但用于 HBV 的亚型鉴定尚未见报道。基于 HBV 各亚型间的 S 基因具有同源性差异, 这种差异是构成不同亚型表面抗原的分子基础, 可利用多聚酶链反应

(PCR) 和限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP), 寻求对 HBV 进行基因亚型分析。将可为 HBV 的分子流行病学分型提供新的手段。笔者用 PCR 扩增各亚型 HBV 的 S 基因, 选择限制性内切酶 Msp I 和 BamH I 对 HBV 各亚型 PCR 产物进行片段长度多态性分析, 以鉴定 HBV 的基因亚型, 结果较理想。报告如下。

材料与方法

一、材料:

1. 限制性内切酶—Msp I 和 BsmH I,

1 广东省深圳市人民医院分子生物中心 518001

2 湖南医科大学

由 promega 公司生产。

2. HBV 亚型鉴定药盒(间接血凝法)和 adr、ayw、adw 亚型标准血清由中国药品生物制品检定所王玉琴老师赠。

3. DIG-随机引物标记试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品。

二、方法:

1. 标本处理和 PCR 扩增:按照文献^[1]的方法,从血清中扩增 HBV-DNA S 基因。

2. 用限制性内切酶切割克隆的 HBV S 基因 PCR 扩增产物:取 adr、adw、ayw 亚型的 HBV-DNA 片段和血清 HBV-DNA 阳性的 PCR 扩增产物,在适宜的缓冲液中分别用 Msp I 15 μ 和 BamH I 14 μ , 37 $^{\circ}$ C 消化切割 2~4 小时,然后将切割后的产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色后在 UV 检测仪上观察结果。

3. Southern 印迹杂交:将上述电泳后凝胶变性中和后,按 Southern 经典印迹转移法将 DNA 转移至硝酸纤维膜上,真空 80 $^{\circ}$ C 干烤 2 小时,固定 DNA,再将该膜根据 DIG-随机引物标记试剂盒的说明,用 HBV-DNA 片段标记探针行 Southern 印迹杂交,经预杂交-杂交-洗膜-显色反应后观察结果。

4. 间接血凝法 HBV 亚型鉴定:48 例 HBV-DNA 阳性的血清用间接血凝法 HBV 亚型鉴定药盒检测,凝集滴度 >1:4 为阳性。

结 果

一、用 BamH I 对 513bp 的 adr、ayw 和 adw 亚型的 HBV S 基因进行酶切的结果:ayw 亚型可被 BamH I 消化切割成为两个片段,用 Φ X174Hae III 指示分子量,这两个片段的大小约为 300bp 和 200bp。adr 和 adw 亚型因为无 BamH I 的限制性内切酶的酶切位点而不被切割,仍保持一条完整的 513bp DNA 片段。

二、Msp I 对这三种 HBV 亚型消化切割显示:adr 亚型和 ayw 亚型可被 Msp I 消化

切割成为两个片段,用 Φ X174 Hae III 指示分子量显示,adr 亚型的两个片段大小为 320bp 和 193bp,ayw 亚型的两个片段大小为 326bp 和 187bp,adw 亚型无 Msp I 的酶切位点,故不被切割,仍保持完整的 513bp 的 DNA 片段,实验结果与设计预期结果一致(图 1、2)。

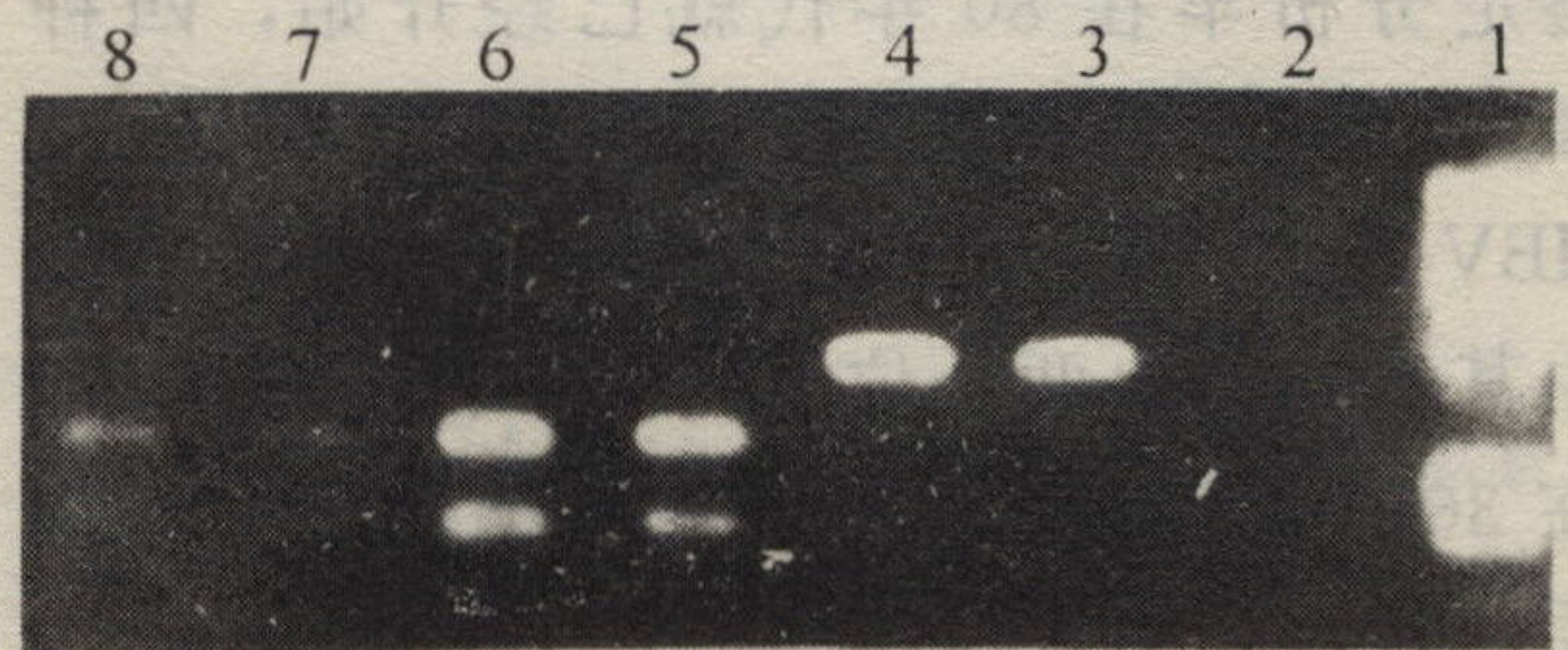


图 1 HBV adr、adw、ayw 亚型 Msp I 酶切结果
1 Φ X174Hae III DNA 分子量标志; 2 阴性酶切对照
3 HBV-DNA 对照; 4 adw 亚型;
5、6 ayw 亚型; 7、8 adr 亚型

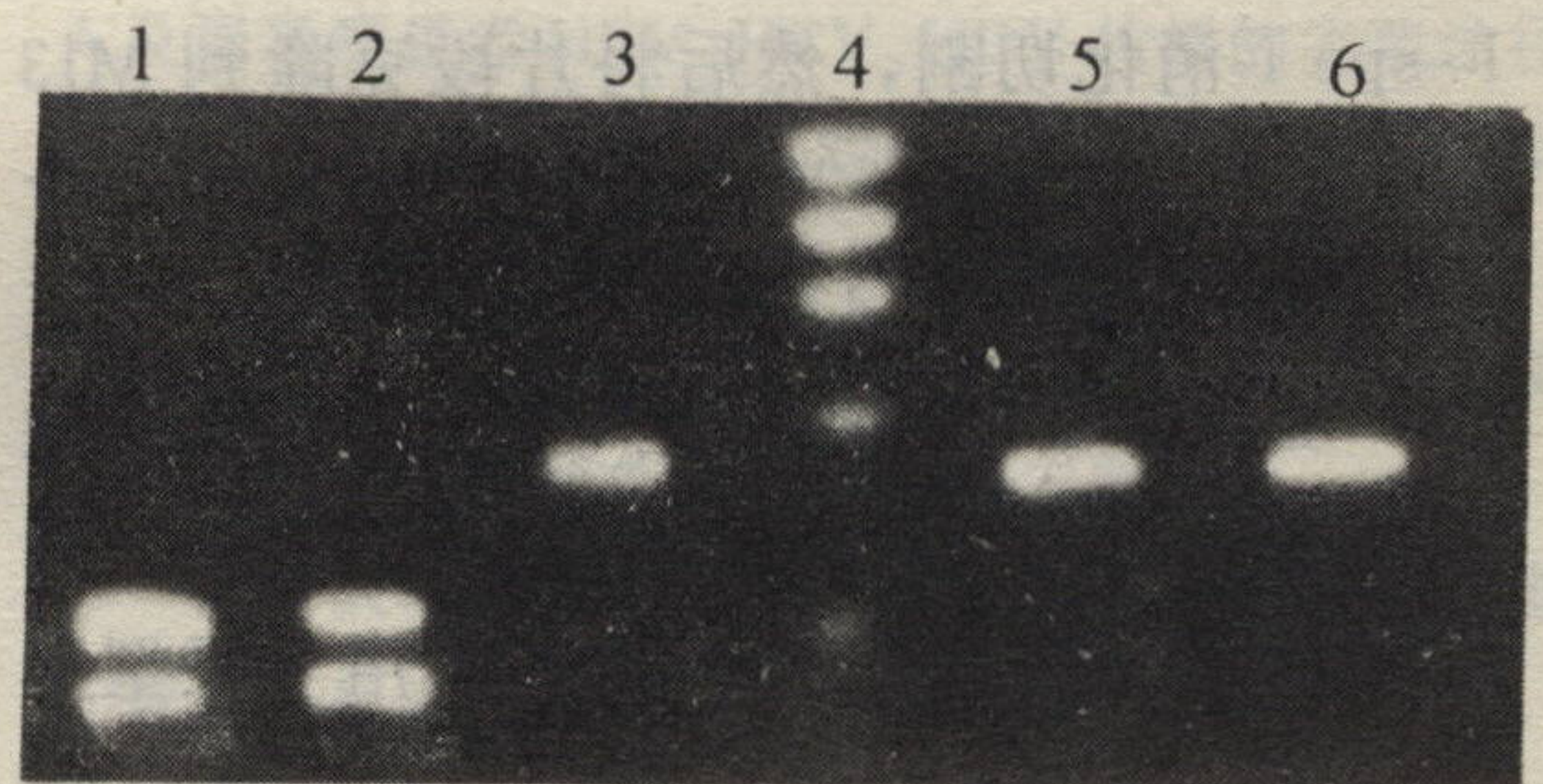


图 2 HBV adr、adw、ayw 亚型 BamHI 酶切结果
1、2 ayw 亚型; 3 adr 亚型
4 Φ X174Hae III DNA 分子量标志;
5 adw 亚型; 6 HBV-DNA

酶切后的片段经 EB 染色,2% 琼脂糖凝胶电泳,UV 检测仪上观察,各片段的区带清晰可见,容易鉴别。转膜后进行 Southern 印迹杂交,结果与 UV 检测结果一致。

三、48 例病人血清 HBV-DNA 阳性的扩增产物经 RFLP 分析结果:均为 adr 亚型,与间接血凝法鉴定结果一致。用 adr、ayw 和 adw 亚型标准血清的 HBV-DNA 扩增产物,经 RFLP 分析的结果也与间接血凝法鉴定一致。

讨 论

HBV 主要分四个亚型, 即 adr、adw、ayr、ayw, 目前亚型的检测方法是抗原水平的血清学检测方法, 常用的 ELISA 和 RIA 法, 灵敏度最高可达 200pg, 反向间接血凝法的灵敏度更低。因此抗原滴度较低的标本则难以进行亚型分析。基因水平的 HBV 亚型鉴定分析早在 80 年代就已经开始, 四种 HBV 亚型的基因克隆和序列分析揭示了 HBV 亚型的本质, 序列分析表明, HBV 亚型由其 S 基因上两个位点的两个核苷酸决定。在 365 位点上若为 A 则控制编码产生 d 抗原, 若为 G 则控制编码产生 y 抗原; 在 479 位点上的碱基为 A 或为 G 则控制编码产生 w 或 r 抗原。Okamoto 在 1987 年建议将此作为 HBV 亚型的鉴定标志^[2,3]。Yostumoto 等 1990 年首先应用 PCR 进行 HBV 的基因亚型分析, 他将 HBV S 基因的扩增产物用 Xba I-Spe I 消化切割, 然后将片段克隆到 M13 噬菌体上, 对 330-529 (200bp) 进行序列分析, 检测第 365 和 479 位点上的碱基, 鉴定 HBV 亚型^[4]。虽然他应用了 PCR 和限制性内切酶 Xba I 和 Spe I, 但他只是将这些酶作为基因克隆的手段, 并未将其用于亚型分析。HBV 亚型的 DNA 序列具有同源性差异, Ziemer 对 7 个 PLC/PRF/5 细胞中整合的 HBV-DNA 进行 RFLP 分析也证实, 各亚型的 RFLP 谱型不同^[5]。笔者研究根据 adr、adw、ayw 亚型 HBV S 基因核苷酸序列差异, 将其扩增产物用 Msp I 和 BamH I 进行酶切, 对 HBV S 基因亚型分析, 方法简便, 结果容易判断, 可作为 adr、ayw 和 adw 亚型的鉴定。

采用限制性内切酶 BamH I 和 Msp I 对这三种 HBV 亚型进行 RFLP 分析, 它们的酶切位点在各亚型之间是特异的, 而且用两种限制性内切酶便可进行 adr、adw、ayw 三种 HBV 亚型的鉴定。用限制性内切酶 Msp I, 可特异性识别亚型表面抗原决定基因位

点 365 上的碱基 G, 因此, 其 HBV 亚型鉴定结果与血清学方法一致, 这对研究 HBV 亚型的变异十分有利。本研究将 HBV S 基因的 PCR 扩增产物用限制性内切酶 BamH I、Msp I 进行 RFLP 谱型分析, 实验结果与设计结果一致。各 HBV 亚型 RFLP 的谱型不同, 有其特有谱型, 容易鉴别。由于采用的 PCR 检测灵敏度为 0.1fg 比酶免疫法高 10 倍, 极低含量的 HBV 标本便可有效的进行亚型分析。UV 检测仪上肉眼很容易识别, 多次重复结果稳定。Southern 印迹杂交结果与 UV 检测仪上检测结果一致, 说明方法具有良好的重复性、稳定性和特异性。这种方法比 PCR 扩增后再进行序列分析的鉴定 HBV 基因亚型方法更简便、省时且成本低。

因无 ayr 亚型的标准克隆片段, HBV 四种亚型中的 ayr 亚型笔者未进行研究。根据 HBV 基因序列, ayr 亚型有限制性内切酶 Hinf I 的酶切位点, 可特异性识别 479 位上的 G↓ATTCC 中的 G。可将 adr 和 ayr 亚型的 HBV S 基因切割成为 78bp 和 435bp 的两个片段, 由于 ayr 亚型无 Msp I 和 BamH I 的酶切位点, 因此可以与 adr 亚型鉴别。RFLP 分析 HBV 的 S 基因的 PCR 产物鉴定 HBV 亚型, 为进行 HBV 分子流行病学的分型和调查提供了新的简便、快速的分子生物学方法, 对于进一步研究 HBV 的遗传变异和其基因功能有十分重要的意义。

参 考 文 献

- 1 曾真, 李沛涛, 邬若楠, 等. 一种高灵敏度 PCR 法检测 HBV-DNA 实验条件的研究. 湖南医科大学学报, 1993, 3: 327.
- 2 Okamoto H, Imai M, Miyakawa Y, et al. Site-directed mutagenesis of hepatitis B surface antigen sequence at codon 160 from arginine to lysine for inversion of subtypic determinant from r to w. Biochem Biophys Res Commun, 1987, 148: 500.
- 3 Okamoto H, Imai M, Tsuda F, et al. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. J Virol,

1987, 61: 3030.

- 4 Yotsumoto S, Okamoto H, Tsuda F, et al. Subtyping hepatitis B virus DNA in free or integrated forms by amplification of the S-gene sequences by the polymerase chain reaction and single-track sequencing for adenine. J

Virology Methods, 1990, 28: 107.

- 5 Ziener M, Garcia P, Shaul Y, et al. Sequence of Hepatitis B virus DNA incorporated into the genome of a human hepatoma cell line. J Virol, 1985, 53: 885.

(收稿: 1996-04-11 修回: 1996-05-10)

输血、血透与 HBV、HCV、HDV 传播的关系

范伟 李金星

本研究采用 ELISA 法对 68 例输血、血透的尿毒症患者及输血的 108 例血液病患者进行乙肝五项指标, HCVAb、HDV-Ag、IgM 抗-HDV 的检测, 并以本院 540 名献血者为对照作对比分析, 现报告如下。

一、对象与方法: 检测对象为①输血、血透尿毒症患者 68 例(男 48 例、女 20 例), 年龄 22~76 岁, 输血 200~4000ml、血透 1~400 次; ②输血的血液病人 108 例(男 60 例, 女 48 例), 年龄 7~72 岁, 平均 35.5 岁; ③献血者 540 例(男 383 例, 女 157 例), 平均 34.5 岁, 献血 1~52 次。检测方法: ALT 采用速率法, 正常值 <0.52 ukat/L; 乙肝五项指标、HCVAb、HDV-Ag、IgM 抗-HDV 均采用 ELISA 法, 其试剂盒由厦门新创生物工程有限公司提供。

二、结果与讨论: ALT、HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb、HCVAb、HDV-Ag、IgM 抗-HDV 在献血者, 血液病及尿毒症患者血清中的检出率依次分别为: 0.2%、0.5%、10.9%、0.2.4%、3.7%、1.1%、9.4%、1.7%; 12.0%、14.8%、17.6%、6.5%、10.2%、20.3%、30.6%、7.4%、6.5%; 32.4%、30.9%、25.0%、14.7%、22.1%、

39.7%、50.0%、14.7%、19.1%。由此可以看出: 血液病患者的 ALT、乙肝五项指标、HCVAb、HDV-Ag、IgM-HDV 的检出率明显高于献血者 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而尿毒症患者的 ALT 及 HBV、HCV、HDV 标志物检出率又显著高于血液病及献血者 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 本研究还发现: HBV、HCV、HDV 标志物的阳性检出率与输血量、血透次数呈正相关, 由此提示: 多次输血, 反复血透是引起血液病人及尿毒症患者 HBV、HCV、HDV 传播的主要途径之一, 究其原因可能为: ①对献血者肝炎病毒检测项目不全; ②试剂盒灵敏度不一致, 使 HBsAg、HCVAb 漏检; ③血透机共用, 透析器及管道反复使用都可能是引起肝炎病毒传播的主要原因。

目前认为丙型肝炎是一种较乙型肝炎更为严重危害人类身体健康的主要传染病之一, 易于慢性化, 且与肝硬化、肝细胞癌密切相关, 本研究发现: 在 68 例输血、血透者中就有 50% 是 HCV 感染者, 其中 ALT 异常者占 55.9% (19/34), 由此提示: 抗-HCV (+) 是致肝功能异常的重要原因之一, 为确保受血者及血透者的安全, 建议: ①严格血液质量关, 增加对肝炎病毒的检测项目; ②透析者亦应定期复查肝炎病毒标志物, 阳性者应设专机治疗; ③尽量减少输血, 贫血者可用促红细胞生成素治疗。

(收稿: 1996-04-23 修回: 1996-05-10)

作者单位: 山东省济南军区总医院血液净化中心

250031