

干血斑样本用于 HIV-1 基因序列测定和亚型分析的研究

张麒 潘品良 邓红 王临虹 蒋岩

【摘要】 目的 将干血斑样本用于 HIV-1 基因序列测定和亚型分析。方法 采集 20 例静脉吸毒 HIV-1 感染者的 EDTA 抗凝静脉全血 2 ml, 80 μ l 制备干血斑样本。QIAamp Blood Mini 试剂盒, 10% Chelex[®]100 树脂分别提取全血和干血斑中细胞 DNA。HIV-1 *env* 基因 Gp41 区 2 对外侧和内侧引物, 按照巢式 PCR 方法, 扩增 Gp41 区, PCR 产物用内侧正反向引物测序。MEGA 3.0 等软件完成序列比对及亚型分析。结果 18 对符合要求的干血斑和全血样本进入研究。16 对经序列分析归为中国流行的 BC 重组亚型, 样本间的基因平均离散率为 5.79%, 与中国流行的 BC 重组亚型的基因离散率为 4.91%, 与 C 亚型代表序列基因离散率为 8.89%, 与其他几个国际亚型代表株的基因离散率在 15%~20% 之间。另 2 对样本分别归属于泰国 B' 亚型和欧美 B 亚型。结论 干血斑样本与全血样本 HIV-1 DNA PCR 产物亚型分析一致, 氨基酸序列比对同义和非同义替换比例、位置和类型基本一致, 其易采集, 便于运输, 保存条件和生物危险性低, 费用低廉的优点适合作为实验条件较差的偏远地区 HIV-1 分子流行病学研究的一种样本采集手段。

【关键词】 艾滋病病毒; 亚型分析; 干血斑

Study on the use of dried blood spot in sequencing and subtyping HIV-1 DNA genome ZHANG Qi*, PAN Pin-liang, DENG Hong, WANG Lin-hong, JIANG Yan. *National Center for Woman and Children Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China
Corresponding author: JIANG Yan, Email: jiangyan03@263.net

【Abstract】 **Objective** To use dried blood spot (DBS) in studying the sequence and subtype analysis of HIV-1 genome. **Methods** 2 ml whole blood containing EDTA anticoagulant from 20 HIV-1 infected patients were collected, then 80 μ l blood was used to prepare DBS. QIAamp Blood Mini kit and 10% Chelex[®]100 resin extracted DNA genome from whole blood and DBS as well as nested PCR amplified specifically HIV-1 Gp41 region from the two kinds of DNA extraction. Software MEGA 3.0 was used to study the sequence and subtype of the PCR products. **Results** Eligible 18 paired samples were analysed to show that 16 of them belonged to C54A, 97CNGX-7F, 98CN006 subtypes. The other two samples might belong to B. CN. . RL42 and B. US. 90WEAU160. **Conclusion** Data showed that there were parallel results between the whole blood and DBS samples including subtype analysis, position of mutation and types of amino acid sequencing. Since DBS itself facilitated the collection, transportation and storage, it could be used as a measure to collect blood sample in resource limited area and to develop molecular epidemiologic research as well as early diagnosis on infant exposed to HIV.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Subtype analysis; Dried blood spot

由于艾滋病病毒的高突变率、高重组率、高复制率等特点, 故其基因组能快速变异, 产生大量变异株, 从而顺利逃脱宿主的免疫压力, 致使 HIV 感染者/艾滋病患者 (HIV/AIDS) 总数日趋增多。通过对

HIV-1 基因片段或全长特异性扩增、测序及种系分析, 可将其变异株做基因分型, 这对于 HIV-1 监测、诊断、疫苗和药物治疗等发现具有重要的指导意义。目前, 在我国主要应用感染者的血浆或抗凝全血样本, 通过从上述样本中提取和扩增血浆 HIV RNA 或 PBMC 中前病毒 DNA 进行基因分型分析。但是, 采集全血样本需要专用的抗凝采血管、采血针, 采血人员需要通过严格的培训, 而且, 对全血和血浆样本的保存、运输也需要专用的设备和条件。此外,

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划课题 (2004BA719A03)

作者单位: 100013 北京, 中国疾病预防控制中心妇幼保健中心 (张麒、王临虹); 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心 (潘品良、蒋岩); 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心 (邓红)

通讯作者: 蒋岩, Email: jiangyan03@263.net

对于婴幼儿 HIV 感染的早期诊断和基因型分析,由于婴幼儿的生理特点,使采集全血样本变得异常困难。干血斑(DBS)样本具有易采集、体积小、保存条件低、无生物危险性、便于运输,可邮寄等优点,仅需要末梢血 50~100 μl 直接滴在滤纸片上,自然干燥后,常温短暂保存,如果需要长期保存可保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,其内 DNA 成分可稳定保存 5 年以上。干血斑样本主要应用于法医学鉴定领域,在 HIV-1 感染的诊断和基因分型中的应用国内鲜有报道,为此,我们做了将干血斑样本用于 HIV-1 感染者的病毒基因序列测定和分型分析的研究,并将其对应全血样本基因序列测定和基因型分析结果相比较。结果报告如下。

材料与方 法

1. 血样本:2005 年 4 月采集 20 例新疆维吾尔自治区 HIV-1 感染者 EDTA 抗凝静脉全血 2 ml。1.5 ml 的微量离心管分装 1 ml 全血, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于提取 DNA;另将相应 80 μl 全血滴于直径为 1.5 cm 的滤纸片(S&S[®]903 #)印圈中,制备干血斑样本,室温条件下,自然干燥 4 h 后室温或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,避免潮湿或曝晒。全血样本冷链运输,滤纸片干血斑样本双层包装邮寄至中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心国家艾滋病参比实验室。

2. 核酸样本制备:①全血(WB)样本:使用德国 Qiagen 公司的 QIAamp Blood Mini 试剂盒从全血中提取细胞 DNA,提取过程按照试剂盒提供操作程序完成,为提高 DNA 浓度,最后用 100 μl TE 缓冲液洗脱。②DBS 样本:打孔器从 DBS 印圈中心部分取下 3 片直径 3 mm 的 DBS,转移入 1.5 ml 离心管中,每个样本用后,酒精棉球擦拭和烧灼打孔器头部,防止交叉污染;1 ml 去离子水洗脱 DBS 中所含的血红素,直至洗脱液呈无色;加入 10% Chelex[®]100 树脂液 200 μl 提取细胞基因组总 DNA。③核酸样本的质与量测定:提取的 DNA 核酸用紫外分光光度仪测定核酸浓度及纯度,200 μl 全血可提取 DNA 浓度为大约 20~40 ng/ μl ,也可用 5 μl 核酸样本 1% 琼脂糖凝胶电泳粗略估计核酸浓度。Chelex[®]100 树脂从 DBS 中提取的核酸样本为粗提物,纯度 $A_{260}/A_{280} \approx 1.0$,浓度约 13~40 ng/ μl 。为排除 PCR 抑制剂成分的存在,应用人类所有细胞均含有的 β -actin 基因作为内参,如果此基因片段(350 bp)可扩增出特异产物,说明提取液中不含有 PCR 抑制成分,

DNA 浓度在 PCR 允许范围。

3. 基因扩增:两种样本提取的细胞 DNA 采用相同的 HIV env 区的引物,反应体系和条件扩增 HIV-1 env 基因 Gp41 区。按照巢式 PCR 方法,取 10 μl 核酸模板,反应体系采用 50 μl ,外侧引物序列为:Gp40F1: 5'-TCTTAGGAGCAGCAGGAAGCAC TATGGG-3', Gp41R1: 5'-AACGACAAAGGTGAG TATCCCTGCCTAA-3',内侧引物序列为:Gp46F2: 5'-ACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAACAGCA-3', Gp47R2: 5'-TTAAACCTATCAAGCCTCCTA CTATCATTA-3',第一轮反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 取第一轮反应产物 5 μl 进行第二轮扩增,反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

4. 测序及序列分析:对阳性 PCR 产物应用第二轮正反向引物 Gp46F2 和 Gp47R2 直接测序。测得的序列用 Chromas, CEpress 软件进行编辑、校对,最终序列为正反向引物测序结果重叠校正后确定, ClustalX 软件将 DBS 和 WB 样本序列分别与 HIV-1 A-O 国际亚型和部分代表株共享序列进行排列比对分析。MEGA 3.0 软件完成序列分型,翻译成氨基酸序列,并制作系统树及一组序列间离散率分析。亚型分析使用的各个亚型参考序列来自美国 Los Alamos National Laboratory(<http://hiv-web.lanl.gov>)。

结 果

1. 核酸序列基因离散率分析:2 份 DBS 样本制备不合格,共有 18 对 DBS 和 WB 样本 PCR 产物可进行核苷酸序列分析。将 DBS 和 WB 样本核苷酸序列分别与 HIV-1 A-O 国际亚型代表株核苷酸序列进行比较,用 Distance 程序计算相互间基因离散率,显示 DBS 与 WB 样本分型效果一致,18 对样本可分为 3 种亚型,16 对样本与我国流行的 B/C 重组亚型(C54A, 97CNGX-7F, 98CN006)归为一组,1 对样本与欧美 B 亚型(B. US. 90WEAU160)归为一组,1 对样本与泰国 B' 亚型毒株云南代表株(B. CN. _ . RL42)归为一组(图 1)。

16 个 DBS 样本间的基因平均离散率为 5.79%,与国际几个代表株的离散率分别为:中国流行 BC 重组亚型(C54A, 97CNGX-7F, 98CN006 等) 4.91%,属泰国 B' 亚型的毒株云南代表株

(B. CN. _ .RL42)间为18.09%，欧美 B 亚型代表株 (B. US. 90WEAU160)间为19.28%，A 亚型(U455) 17.73%，C 亚型(96BW0502)8.89%，D 亚型(ELI, NDK) 18.8%，F 亚型(MP255) 19.6%，G 亚型(DRCBL)18.2%，H 亚型(VI991)15.09%，表明 16 个 DBS 样本为我国流行的 BC 重组亚型株。DBS5 样本与泰国 B' 亚型毒株云南代表株 (B. CN. _ .RL42)间基因离散率为5.81%，与中国流行 BC 重组亚型21.8%，欧美 B 亚型代表株12.15%，AB 重组亚型代表株为9.97%，表明该样本属于泰国 B' 亚型毒株云南代表株。DBS8 样本与欧美 B 亚型 10.93%，与泰国 B' 亚型毒株云南代表株13.87%，与中国流行 BC 重组亚型22.1%，表明该样本接近欧美 B 亚型株。

16 个 WB 样本间基因平均离散率为5.59%，与我国流行 BC 重组亚型株的基因离散率为4.67%，归为此型病毒株。WB8 样本也归为欧美 B 亚型，基因离散率7.89%，WB5 样本同样也与泰国 B' 亚型毒株云南代表株接近，基因离散率4.95%。

2. DBS 和 WB 样本新疆 HIV-1 流行株系统树分析: 利用 MEGA 3.0 软件进一步系统树分析显示, 两种样本系统树一致, 16 对样本与中国 BC 重组流行株聚集在一起, 远离欧美 B 亚型和泰国 B' 亚型, 及其他 HIV-1 亚型。WB5 和 DBS5 样本与泰国 B' 毒

株云南代表株接近, WB8 和 DBS8 样本与欧美 B 亚型靠近而远离中国 BC 重组流行株和泰国 B' 亚型。

3. DBS 和 WB 样本氨基酸序列比较: 选取 6 对归入 BC 重组亚型的 DBS 和 WB 样本, 400 bp 长度的核酸序列翻译成的氨基酸序列, 比较两种样本核苷酸基因突变导致的氨基酸变化。由图 2 同一感染者的两种样本氨基酸序列中发生氨基酸同义或非同义替换的位点和类型基本一致。

讨 论

本研究结果显示 DBS 和 WB 样本用于 HIV-1 基因序列和亚型分析时结果平行, DBS 样本核苷酸序列虽然不能完全匹配相应 WB 样本, 但个别基因位点的突变多为无意义突变, 并不影响基因序列分析, 两种样本氨基酸序列比较结果显示, 氨基酸同义和非同义替换比例、位置和类型基本相同。同一感染者两种样本核苷酸和氨基酸序列不能完全匹配。为此笔者认为, 首先 HIV 感染者体内的病毒以同源性很高的不均一的各种病毒株共同寄生于同一机体所构成的准种(quasispecies)形式存在。“准种”中的毒株在绝大多数位点的核苷酸相同, 序列图中将显示为一个清晰的单峰, 而在具有不同核苷酸的位点上, 则出现“双峰”或“多峰”。不同的引物测序“双峰”或“多峰”出现的位点不同, 判读的核苷酸也不同, HIV

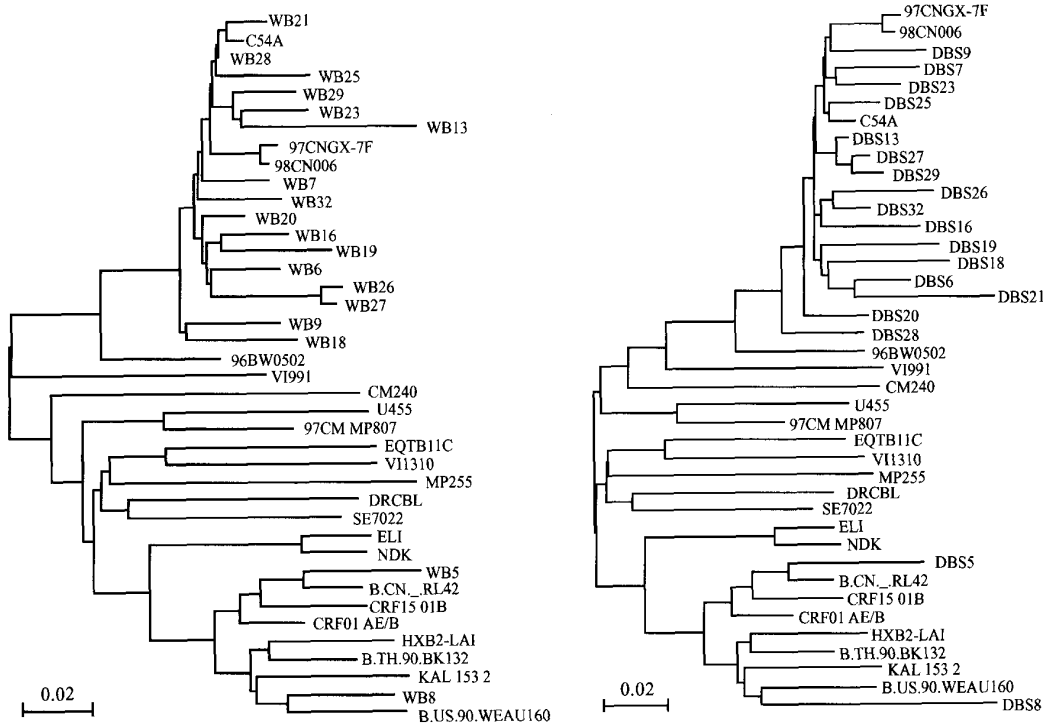


图1 WB 和 DBS 样本与 HIV-1 国际代表毒株进化树比较

参 考 文 献

1 关琪,邢辉,黄海龙,等. 人免疫缺陷病毒 I 型基因序列分析中的质量控制研究. 中华检验医学杂志, 2005, 28: 322-324.

2 Simmonds P, Balfe P, Peutherer JF, et al. Human Immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy number. J Virol, 1990, 64: 864-872.

3 Jung A, Maier R, Vartanian JP, et al. Multiply infected spleen cells in HIV patients. Nature, 2002, 418: 144.

4 王斌,鲁晓晴,路永波,等. 干血斑滤纸片中人免疫缺陷病毒 1 型

前病毒基因的检测. 中华实验和临床病毒学杂志, 1998, 12: 281-284.

5 Killeen AA. Molecular analysis of congenital adrenal hyperplasia in a newborn screening program. Mol Diag, 2001, 6: 189-191.

6 Brambilla D, Jennings, Aldrovandi, et al. Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: measurement, precision, and RNA stability. J Clin Microbiol, 2003, 41: 1888-1893.

(收稿日期: 2005-12-22)

(本文编辑: 张林东)

· 疾病控制 ·

中国八省市各级医疗机构确诊急性乙型肝炎实验室检测能力调查

卢永 崔富强 王晓军 龚晓红 董红军 胡苑笙 陈园生 梁晓峰

医疗机构的乙型肝炎(乙肝)诊断能力是影响乙肝报告发病率的重要因素, 我们在全中国范围开展此次调查, 以初步了解我国各级医疗机构急性乙肝实验室诊断能力。采用典型抽样在北京、吉林、浙江、山东、河南、广东、四川、甘肃 8 省/市抽取 95 家省、地、县、乡级医疗机构作为调查对象(各级比例为 1:2:3.7:3.3), 采取问卷和现场观察方法调查乙肝实验室人员配备、检测频度、设备配置、检测项目、检测试剂等情况。调查诊断急性乙肝的标准: 乙肝两对半、ALT、抗-HBc IgM, 同时检测抗-HAV IgM 与甲肝鉴别诊断。

结果与分析: 各级医疗机构中专职从事乙肝检测的平均检验人员数为 3.6 人, 占到了所有检验科人员的 25.0%。开展乙肝两对半、ALT、抗-HBc IgM、抗-HAV IgM 检测的医疗机构分别占 96.8%、89.5%、29.5%、47.4% (表 1), 前 3 项均开展的占 28.4%, 4 项均开展的占 27.4%, 且在各级中构成的差异有统计学意义($\chi^2 = 22.60, P < 0.001$), 其中乡级仅占 3.1%, 少于其他各

级($\chi^2 = 14.27, P < 0.001$)。分别有 60.0% 和 21.1% 的医疗机构每天都开展两对半及抗-HBc IgM 检测, 每家机构平均每月检测乙肝两对半 760 例, 抗-HBc IgM 732 例。检测中最常使用 ELISA 试验, 试剂来源广泛, 厂家众多, 其中两对半试剂厂家有 23 家。配备开展 ELISA 试验所需酶标仪、移液器、孵育箱的医疗机构分别占到 56.8%、91.6%、93.7%, 3 种设备均有的医疗机构占 52.6%, 在省、地、县中分别占 100%、89.5%、62.9%, 乡级仅有 6.3%。近年来全国乙肝报告发病率逐年上升。医疗机构是报告乙肝病例的主体, 调查发现, 我国各级医疗机构诊断乙肝的能力尚不足, 仅有 27.4% 的机构能开展足够的检测项目, 52.6% 的机构配备了开展 ELISA 试验所需设备, 基层尤其是乡级的诊断能力低下。另外, 种类繁多的检测试剂需要有关部门长期、动态地做出系统评价。建议加强对医疗机构, 尤其是基层医疗机构乙肝实验室的培训和督导, 规范其检测方法, 加强对乙肝检测试剂市场的评价和指导。

表 1 8 省市各级医疗机构开展乙肝相关检测项目情况

检测项目	占同级医疗机构 (%)				各级医疗机构	χ^2 值	P 值
	省级	地级	县级	乡级			
乙肝两对半①	100.0(9/9)	94.7(18/19)	100.0(35/35)	93.8(30/32)	96.8(92/95)	2.71	0.438
ALT②	100.0(9/9)	94.7(18/19)	91.4(32/35)	81.3(26/32)	89.5(85/95)	4.01	0.255
抗-HBc IgM③	66.7(6/9)	52.6(10/19)	25.7(9/35)	9.4(3/32)	29.5(28/95)	17.35	<0.001
抗-HAV IgM④	88.9(8/9)	78.9(15/19)	51.4(18/35)	12.5(4/32)	47.4(45/95)	29.66	<0.001
①+②	100.0(9/9)	94.7(18/19)	91.4(32/35)	75.0(24/32)	87.4(83/95)	7.19	0.066
①+②+③	66.7(6/9)	52.6(10/19)	25.7(9/35)	6.3(2/32)	28.4(27/95)	19.80	<0.001
①+②+③+④	66.7(6/9)	52.6(10/19)	25.7(9/35)	3.1(1/32)	27.4(26/95)	22.60	<0.001

注: χ^2 检验开展相应检测项目的医疗机构在各级中的构成有无差别, 即对 2~5 列比较; 括号外数据为百分比, 括号内数据分子为检测单位数、分母为调查单位数

作者单位 100050 北京, 中国疾病预防控制中心免疫规划中心(卢永、崔富强、王晓军、胡苑笙、陈园生、梁晓峰); 北京市疾病预防控制中心(龚晓红); 浙江省宁波市疾病预防控制中心(董红军)

(收稿日期: 2006-04-13)

(本文编辑: 尹廉)