

· 实验室研究 ·

乙型肝炎病毒 B 基因亚型(Ba, Bj)半巢式 PCR 检测方法的建立

王杰 高俊薇 李杰 庄辉 王佳 李雅娟 金晖

【摘要】 目的 建立一种灵敏特异且简便易行的乙型肝炎病毒(HBV)B 基因 Ba 和 Bj 亚型分型方法。方法 用 DNASStar 软件比较分析 GenBank 中登录的 B 基因型 HBV(HBV/B)和 C 基因型 HBV(HBV/C)的基因序列,分别设计出 HBV/B 型特异性引物 HB 及 Ba 和 Bj 基因亚型特异性引物 BA 和 BJ。第一轮 PCR 反应以 HBV/B 型特异性引物 HB 作为上游引物,以日本学者 Sugauchi 等设计的引物 HBAS-4V 作为下游引物(外引物);第二轮 PCR 反应同样以 HB 作为上游引物,亚型特异性引物 BA 和 BJ 作为下游引物(内引物),在同一个反应管中进行。根据 PCR 产物片段的大小判定 B 基因亚型。随机选取实验室内经型特异性引物 PCR 法鉴定为 HBV/B(56 份)及经 preS/S 区序列测定证实为 HBV/C(15 份)的 HBV 慢性感染者血清标本共 71 份,以研究设计的引物进行半巢式 PCR 反应,检测 Ba 和 Bj 基因亚型,并以载有 HBV Bj 亚型基因组的质粒作为 Bj 亚型的阳性对照。然后随机选取 15 份 B 型样本的第一轮 PCR 产物直接测序,利用 Blast 和 DNASStar 软件将测序结果与 GenBank 中登录的 Ba 及 Bj 亚型序列进行同源性分析,验证该半巢式 PCR 法的准确性。**结果** 56 份 HBV/B 血清标本经该半巢式 PCR 法检测,均为 Ba 亚型,随机选取的 15 份 B 型 PCR 产物直接测序,结果均为 Ba 亚型,与研究中应用的半巢式 PCR 方法检测结果一致。15 份 HBV/C 的血清标本检测结果均为阴性。**结论** 建立了 HBV Ba 和 Bj 亚型半巢式 PCR 法。该方法灵敏、特异、简便、易行,可用于临床和流行病学大样本检测。

【关键词】 乙型肝炎病毒; B 基因型; 半巢式聚合酶链反应

Establishment of a semi-nested PCR for identifying the sub-genotypes(Ba and Bj) of hepatitis B virus of genotype B WANG Jie, GAO Jun-wei, LI Jie, ZHUANG Hui, WANG Jia, LI Ya-juan, JIN Hui.

Department of Microbiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China

Corresponding author: ZHUANG Hui, Email: zhuangbmu@126.com; LI Jie, Email: jli69@263.net

【Abstract】 Objective To establish a sensitive, specific, simple and practicable method for identifying the two sub-genotypes (Ba and Bj) of genotype B isolates of hepatitis B virus (HBV) (HBV/B). **Methods** The entire nucleotide sequences of HBV/B and HBV/C were obtained from GenBank, compared and analyzed with DNASStar software. The specific primers for HBV/B (HB) and Ba (BA), Bj (BJ) were designed respectively. HB as HBV/B specific primer (sense) and HBAS-4V (designed by Japanese scientists Sugauchi et al) as a universal outer primer (antisense) were used in the first-round PCR. In the second-round PCR, HB was also used as sense primer while BA and BJ as inner primers (antisense) and they were added into a single tube for PCR reaction. The two sub-genotypes of HBV/B were identified according to the length of the PCR products. A total of 71 HBV DNA-positive serum samples were selected randomly from our laboratory, including 56 HBV/B samples identified by type-specified PCR method and 15 HBV/C samples identified by direct sequencing in preS and S Region (preS/S). All the 71 samples were detected with this semi-nested PCR method. A plasmid containing full length genomic DNA of HBV/Bj, was presented by Professor Kenji Abe as positive control of Bj. Then, the first-round PCR products of 15 HBV/B were randomly selected and sequenced directly, and their sequences were compared phylogenetically with the above known Ba and Bj sequences using Blast and DNASStar softwares to confirm the results of semi-nested PCR. **Results** 56 HBV/B samples were all identified as HBV/Ba by our semi-nested PCR method. 15 randomly selected PCR products were all sequenced as HBV/Ba. All of the 15 HBV/C samples were negative. **Conclusion** A simple, rapid, sensitive and specific method for identifying sub-genotypes Ba and Bj was established which might be used for large-scale clinical and epidemiological studies.

【Key words】 Hepatitis B virus; Sub-genotype; Semi-nested polymerase chain reaction

基金项目: 国家“十五”科技攻关课题资助项目(2004BA718B02)

作者单位: 100083 北京大学医学部病原生物学系

通讯作者: 庄辉, Email: zhuangbmu@126.com; 李杰, Email: jli69@263.net

近年来,对乙型肝炎病毒(HBV)基因亚型的研究逐步深入,如 A 基因型可进一步分为 A1(Aa)、A2(Ae)、A3(Ac) 3 个亚型^[1,2];B 基因型分为 B1(Bj)、B2(Ba)、B3、B4 和 B5 等 5 个亚型,其中 Ba 亚型与 C 型在 preC/C 区存在重组,而 Bj 亚型与 C 型间无重组发生;C 基因型可分为 C1、C2、C3 和 C4 亚型;D 基因型可分为 D1、D2、D3 和 D4 亚型;F 基因型分为 F1 和 F2 亚型等^[3-6]。对于 B 基因型的两个主要亚型 Ba 和 Bj 而言,Ba 亚型患者的 HBeAg 阳性率和核心启动子双位点突变(T1962/A1764)率显著高于 Bj 亚型,尤其在年龄大于 30 岁的 Ba 亚型和 Bj 亚型患者中 HBeAg 阳性率的差异更加明显,而且 Ba 亚型感染者发生肝细胞癌(HCC)的年龄显著低于 Bj 亚型感染者发生 HCC 的年龄^[7-9]。可见,HBV/B 亚型的划分可在一定程度上诠释感染同一型别 HBV/B 基因型患者临床表现的差异。

目前,诊断 HBV/B 基因亚型的方法主要有全基因分析、preC/C 区测序法、聚合酶链反应法(PCR)、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析法(PCR-RFLP)等。在大规模检测方面,PCR 具有简便快速的优点,而巢式 PCR 又能使检测的灵敏度和特异度进一步提高。本研究利用巢式 PCR 的这一特性,设计了一套检测 HBV Ba 和 Bj 亚型的半巢式 PCR 法,采用多个引物同时扩增,根据 PCR 产物的大小直接判定 Ba 和 Bj 基因亚型,该法简便快速,灵敏度和特异度较高,便于大样本检测。

材料与方 法

1. 样本:随机选取本室血清库中冻存的 HBV 慢性感染者血清标本 71 份,其中经型特异性引物 PCR 法鉴定为 HBV/B 感染者 56 份^[10],经 preS/S 区序列测定证实为 HBV/C 感染者 15 份,均为 HBV DNA 阳性。载有 HBV Bj 亚型基因组的质粒由日本传染病研究所 Kenji Abe 教授惠赠。

2. 试剂和仪器:核酸提取试剂盒购自 Promega 公司;dNTP 和 Taq DNA 聚合酶购自北京华大中生科技发展有限公司;琼脂糖(西班牙进口原装)购自上海华美生物工程公司;DNA 分子质量标志 ϕ X174-Hinc II digest 购自北京六合通技术发展有限公司;台式高速离心机为德国 Heraeus 公司 Biofuge 28R5;PCR 热循环仪和凝胶成像仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

3. 引物设计:用 DNASar 软件比较分析

GenBank 中登录的 41 份 HBV/B 基因序列的 preC/C 区,其中包括 35 份 Ba 亚型(12 例来自中国)和 6 份 Bj 亚型,找出 HBV/B 中 Ba 和 Bj 亚型特异的基因序列,根据这些特异的基因序列分别设计出 Ba 和 Bj 基因亚型的特异性引物 BA 和 BJ。同时,对 GenBank 中登录的 60 份(2 份来自中国)HBV/C 和上述 41 份 HBV/B 基因序列的 X 区进行分析比较,找出相对于 HBV/B 和 HBV/C 两种基因型的特异序列。根据这些特异序列设计出 HBV/B 的特异性引物 HB。引物 HB、HBAS-4V^[9]、BA 和 BJ 用于半巢式 PCR 扩增的内外引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成,序列见表 1。

表1 半巢式 PCR 法鉴定 HBV Ba 和 Bj 亚型所用引物序列

引物	序 列 (5'~3')
第一轮	
HB(正义链)	acc gtg aac gcc cac Mgg aa(nt 1617~1636)
HBAS-4V(反义链)	ata ggg gca ttt ggt ggt ct(nt 2316~2297)
第二轮	
HB(正义链)	acc gtg aac gcc cac Mgg aa(nt 1617~1636)
BA(反义链)	gtc tga Ktt tta Kgc cca tat taa c(nt 2195~2171)
BJ(反义链)	gta tct agg agR tct cgc acc(nt 1998~1978)

4. 方法:

(1)血清 HBV DNA 提取:将 50 μ l 待检血清加入到 60 μ l 裂解液中,混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,加入 30 μ l Tris 饱和酚和 30 μ l 氯仿:异戊醇(49:1)溶液,充分混匀后,14 000 r/min 离心 10 min,取上清,加入等体积异丙醇和 10 μ l 醋酸钠(NaAc)溶液(2 mol/L, pH 值 4.0),-20 $^{\circ}$ C 沉淀 2 h,14 000 r/min 离心 15 min,弃上清,加入 75% 预冷乙醇 500 μ l,14 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀于 50 $^{\circ}$ C 干燥后,溶于 20 μ l 灭菌双蒸水(DDW)中,-20 $^{\circ}$ C 保存备用,作为 PCR 反应的模板。

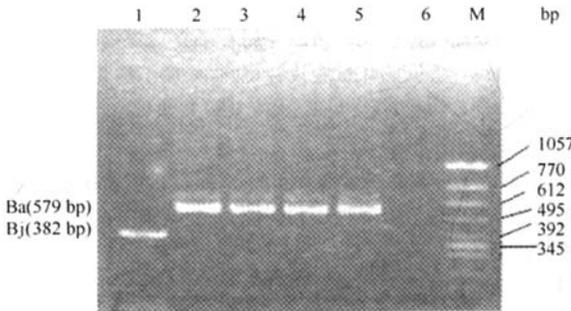
(2)半巢式 PCR:①第一轮 PCR:用 HB 和 HBAS-4V 分别作为上游引物和下游引物(外引物)进行第一轮 PCR 扩增,PCR 反应体系(20 μ l)如下:10 \times PCR 缓冲液 2 μ l, dNTP(10 mmol/L) 0.4 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μ l, HB (10 mmol/L) 0.75 μ l, HBAS-4V(10 mmol/L) 0.75 μ l, Taq DNA 聚合酶(1 \times 10⁶ U/L) 0.2 μ l, HBV DNA 模板 2 μ l, 灭菌 DDW 12.7 μ l, 按 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min, 扩增 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 7 min。②第二轮 PCR:同样用 HB 作为上游引物, BA 和 BJ 作为下游引物(内引物)进行第二轮扩增, 反应体系(20 μ l)如下:10 \times PCR 缓冲液 2 μ l, dNTP

(10 mmol/L) 0.4 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μ l, HB (10 mmol/L) 0.75 μ l, BA (10 mmol/L) 0.75 μ l, BJ (10 mmol/L) 0.75 μ l, Taq DNA 聚合酶 (1 \times 10⁶ U/L) 0.2 μ l, 第一轮 PCR 产物 1 μ l, 灭菌 DDW 12.95 μ l, 按 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 扩增 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存, 取 5 μ l 第二轮 PCR 产物在 100 V 电压下, 经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳 20 min 后, 在凝胶成像仪下观察条带的大小。

(3) PCR 产物直接测序法鉴定 Ba 和 Bj 亚型: ① PCR 产物直接测序: 从上述 56 份 HBV/B 慢性感染者血清标本中随机选取 15 份, 将第一轮 PCR 产物直接测序。PCR 产物纯化和测序由北京华中生物科技发展有限公司完成。② 基因序列测定法分型: 使用 Blast 和 DNASTar 软件将 15 份血清标本的测序结果与 GenBank 中已知的 HBV Ba 和 Bj 亚型序列进行序列比对和同源性分析, 以验证该法的准确性。

结 果

1. 半巢式 PCR 鉴定 Ba 和 Bj 亚型: 半巢式 PCR 扩增的 Ba 亚型片段为 579 bp, Bj 亚型片段为 382 bp, 49 份 HBV/B 和 7 份 B+C 混合型慢性感染者血清样本均被检测为 Ba 亚型(图 1)。



注: 1: Bj 亚型质粒; 2~5: HBV/B 阳性血清; 6: 阴性对照; M: DNA 分子质量标准

图1 半巢式 PCR 鉴定 Ba 和 Bj 亚型的琼脂糖凝胶电泳结果

2. B 基因型特异性: 半巢式 PCR 扩增的 15 份 HBV/C 慢性感染者的血清标本均为阴性。

3. PCR 产物直接测序分析 B 基因亚型: 从上述 56 份 HBV/B 慢性感染者血清标本中, 随机选取 15 份 HBV/B 的第一轮 PCR 产物直接测序。并使用 Blast 和 DNASTar 软件将 15 份血清标本的测序结果

与 GenBank 中已知的 HBV Ba 和 Bj 亚型序列进行序列比对和同源性分析, 结果与半巢式 PCR 检测 B 基因亚型的结果一致, 均为 Ba 亚型, 未发现其他亚型(图 2)。

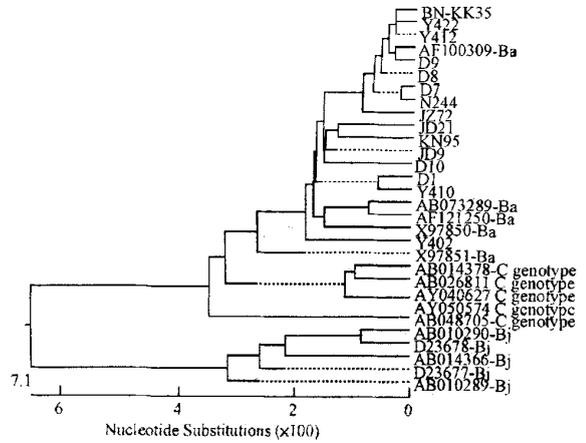


图2 15 份血清标本的测序结果与已知 HBV Ba 和 Bj 亚型序列的同源性分析

讨 论

目前, HBV/B 基因型已被分为 5 个亚型, 其中 Bj 主要在日本流行; Ba 主要在中国、越南等亚洲国家流行; B3 仅在印度尼西亚发现; B4 仅在越南发现; B5 最近在菲律宾发现^[6]。但主要为 Bj 和 Ba 2 个亚型。HBV Ba 与 Bj 亚型相比, 在 HBeAg 阳性率、病毒载量、ALT 水平、PreC 区的变异以及致病性等方面的差异均有统计学意义^[7-9], 因而对 HBV/B 基因亚型的检测具有重要的意义。

本研究中利用半巢式 PCR 检测 56 份 HBV/B 慢性感染者血清标本均为 Ba 亚型, 检出率为 100%, 并与测序结果一致, 说明该法具有较高的灵敏度和特异度。本文初步检测结果提示, 我国的 HBV/B 以 Ba 亚型为主。是否存在 Bj 亚型, 还有待收集更多慢性 B 基因型乙型肝炎患者的血清样本做进一步分析。目前 HBV/B 基因亚型检测技术尚有一些不足之处, 如核酸测序法尽管是金标准, 但价格昂贵, 且需要反复比较分析才能得出结论, 不适于进行大批量样本的检测; PCR-RFLP 法虽然检测成本相对较低, 但酶切分析步骤繁琐, 耗时较长, 而且可能存在酶切不完全等因素的干扰, 不利于结果的判定^[9]。本研究设计的半巢式 PCR 法简便易行, 初步研究提示, 该法具有较高的灵敏度和特异度; 相对于 PCR-RFLP 而言, 该法具有 B 型特异性, 能更好

地排除 HBV/B+C 混合型中 C 基因型的干扰,根据扩增片段的大小能对检测结果进行更准确地判定,避免了酶切的繁琐步骤及酶切不完全等因素的干扰。我们拟扩大样本量进一步检测该方法的灵敏度和特异度,使之可推广用于大规模的临床和流行病学调查。

参 考 文 献

[1] Kramvis A, Weitzmann L, Owiredo WK, et al. Analysis of the complete genome of subgroup A hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol*, 2002, 83(4):835-839.

[2] Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, et al. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol*, 2005, 86(7):2047-2056.

[3] Sugauchi F, Orito E, Ichida T, et al. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol*, 2002, 76(12): 5985-5992.

[4] Norder H, Courouce AM, Coursaget P, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*, 2004, 47(6): 289-309.

[5] Sugauchi F, Kumada H, Sakugawa H, et al. Two subtypes of genotype B (Ba and Bj) of hepatitis B virus in Japan. *Clin Infect Virol*, 2004, 38(9):1222-1228.

[6] Sakamoto T, Tanaka Y, Orito E, et al. Novel subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotypes B and C among chronic liver disease patients in the Philippines. *J Gen Virol*, 2006, 87(7):1873-1882.

[7] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2000, 118(3):554-559.

[8] Orito E, Ichida T, Sakugawa H, et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology*, 2001, 34(3):590-594.

[9] Sugauchi F, Orito E, Ichida T, et al. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology*, 2003, 124(4):925-932.

[10] Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbio*, 2001, 39(1):362-364.

(收稿日期:2007-10-11)

(本文编辑:张林东)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对统计学方法的要求

研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

资料的表达与描述:用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料,用 $M(Q_R)$ 表达呈偏态分布的定量资料,用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。

统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用直线回归分析;对具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

统计结果的解释和表达:当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时,应说对比组之间的差异具有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异;应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如: $t = 3.45, \chi^2 = 4.68, F = 6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P > 0.05, P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 三种表达方式即可满足需要,无须再细分为 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95% 可信区间。