

巢氏 PCR 扩增低拷贝 HBV 全基因组方法的建立及应用*

张 孟^a, 李 倩^b, 周华君^b, 孙长贵^b, 成 军^b, 戴玉柱^b

(中国人民解放军第一一七医院 a. 财经中心; b. 检验科, 杭州 310013)

摘要:目的 建立一种用于低拷贝乙型肝炎病毒(HBV)不同基因型全基因组扩增的巢式聚合酶链式反应(nested PCR)方法及应用评价。方法 通过设计和改良一组对 HBV 各基因型(A,B,C,D,E,F,G) DNA 均具有较高扩增效率的通用巢式简并引物,采用两步法分六段(I a, I b, II a, II b, III, IV)扩增低拷贝 HBV 基因组,比较不同反应条件对于 PCR 扩增产物的影响(退火温度,引物浓度),建立一种适合于低拷贝 HBV 全基因组扩增的方法;同时采用该方法对 57 份低浓度 HBsAg 乙肝感染者(HBsAg<10IU/ml)的全基因组进行扩增、测序、拼接并进行评价。结果 该方法的灵敏度可达 25IU/ml,重复性好,对 57 份低浓度 HBsAg 乙肝感染者进行扩增,其中全基因组扩增 49 例(86.0%),各片段(I a, I b, II a, II b, III, IV)扩增分别为:53 例(93.0%),52 例(91.2%),54 例(94.7%),54 例(94.7%),55 例(96.5%)和 49 例(86.0%),说明该方法适用于慢性低浓度 HBsAg 乙肝感染者 HBV DNA 全基因扩增。结论 该文为慢性低浓度 HBsAg 乙肝感染者的全基因系列分析提供了高灵敏度、高特异度的方法,可在低浓度 HBsAg 感染者流行病学调查中发挥重要作用,同时为巢氏 PCR 扩增反应体系的优化提供了参考。

关键词:乙型肝炎病毒;低拷贝;全基因;巢式聚合酶链式反应

中图分类号:R512.62;Q503 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)03-044-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.03.013

Establishment and Application of Nested PCR Amplification Method for the Whole Genome of HBV with the Low Copy

ZHANG Meng^a, LI Qian^b, ZHOU Hua-jun^b, SUN Chang-gui^b, CHENG Jun^b, DAI Yu-zhu^b

(a. Financial Services Center; b. Department of Clinical Laboratory, the 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310013, China)

Abstract: **Objective** To establish and evaluate a nested polymerase chain reaction (nested PCR) method for the whole genome amplification of hepatitis B virus (HBV) with low copy in the different genotypes. **Methods** By designing and improving a set of universal nested degenerate primers with high amplification efficiency for all HBV genotypes (A, B, C, D, E, F, G), and the low copy HBV genome was divided into six segments (I a, I b, II a, II b, III, IV) which were amplified by the two step method. The effects of different reaction conditions of the PCR amplification products (annealing temperature, primer concentration) were compared. A method suitable for the whole genome amplification of low copy HBV was established, and amplified, sequenced, spliced and evaluated of the whole genome of 57 hepatitis B infected persons with low-level HBsAg (HBsAg<10 IU/ml) was completed by this method. **Results** The sensitivity of the method was 25IU/ml and reproducible, and 57 cases of hepatitis B infection with low-level HBsAg were amplified, in which total gene amplification was 49 (86%) cases. Each segment (I a, I b, II a, II b, III, IV) was 53 cases (93%), 52 cases (91.2%), 54 cases (94.7%), 54 cases (94.7%), 55 cases (96.5%) and 49 cases (86.0%), respectively. This method was suitable for the amplification of HBV DNA of chronic hepatitis B infection with low-level HBsAg. **Conclusion** This study provides a highly sensitive and highly specific method for the analysis of the whole gene sequence of chronic hepatitis B infection with low-level HBsAg. It can play an important role in the epidemiological investigation of HBV infection with low-level HBsAg, and provides a reference for the optimization of the nesting PCR amplification reaction system.

Keywords: hepatitis B virus; low copy; complete genome; nested polymerase chain reaction

低浓度 HBsAg 乙肝感染者是以 HBsAg 含量 $\leq 5\mu\text{g/L}$ 定义的^[1]。而低浓度 HBsAg 乙肝感染人群在感染性疾病诊断中已越来越引起流行病学专家及临床实验室的重视^[2,3]。在流行病学方面,

慢性低浓度 HBsAg 乙肝感染者在普通人群和慢性 HBV 感染人群中的分布、基因型以及宿主的免疫功能与高浓度 HBsAg 人群之间存在着差异。在我国,慢性低浓度 HBsAg 乙肝感染者(未经治

* 基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY15H200001)。

作者简介:张 孟(1965—),女,本科,副主任技师,主要从事临床免疫学检验诊断研究, E-mail: zhangml17@sina.cn。

通讯作者:戴玉柱(1985—),男,硕士,副主任技师,主要从事临床免疫学检验诊断研究, E-mail: dyz5895@qq.com。

疗或药物干预)占HBsAg阳性人群的6.9%~23.2%,该人群主要呈现携带者状态,且低浓度HBsAg人群存在HBVDNA复制远低于高浓度HBsAg人群的现象^[1,4],因此运用常规PCR法较难完成对HBV病毒全基因的扩增。

乙型肝炎病毒(HBV)属嗜肝DNA病毒科,基因长度约3.2 kb,为部分双链环状DNA病毒,其基因组中包含两个缺口,负链包括基因组的全长,正链则因基因型的差异而不同。由于缺口的存在,PCR扩增HBV全基因相对困难,在低拷贝的样本中更为明显,1995年Gunther等^[5]设计的负链末端缺口区引物,避免了基因扩增时跨缺口处的延伸。本文利用在常规PCR基础上建立的巢式PCR(nested PCR)技术,采用两对PCR引物,进行两轮PCR扩增,实现对低拷贝目的片段高效、特异性的扩增,且重点介绍利用简并引物与缺口区引物相结合的巢氏PCR法,对低拷贝HBV DNA全基因扩增方法的建立以及反应条件的优化。

1 材料与方法

1.1 研究对象 分别收集10例HBV DNA高浓度样本用于方法学验证与实验的优化,并收集我院2016~2017年低浓度HBsAg(<10 IU/ml)标本57例。男性28例,女性29例,年龄15~82岁,中位年龄42岁。以无菌5 ml促凝管收集静脉血3~5 ml,室温静置2 h后于11 000×g离心5 min,吸取上层血清至无菌1.5 ml离心管中。血清样本-80℃冻存,避免反复冻融。

1.2 试剂与仪器 病毒的核酸提取试剂与核酸提

取仪,购自天隆生物科技有限公司,实时荧光定量PCR试剂盒购自艾康生物有限公司,PCR反应体系中Taq酶,dNTP,PCR缓冲液,质粒载体(pMDTM19-T),DNA Marker购自日本TaKaRa公司,琼脂糖购自西班牙,S1000梯度扩增仪、电泳仪购自美国伯乐公司,凝胶成像系统购自上海天能有限公司。

1.3 方法

1.3.1 核酸的提取与质粒标准品定量标准:血清HBV DNA提取:收集病人血清于1.5 ml离心管中,取血清500 μl加50 μl蛋白酶K消化(浓缩5倍),其余步骤均按试剂说明书要求操作(天隆科技),采用磁珠法纯化核酸;提取核酸终体积为100 μl,分装5管各20 μl,将分装好的核酸于-80℃冻存,每次使用取出一支,尽量减少反复冻融。质粒构建:首先合成各基因标准品片段,将其连接至质粒载体(pMDTM19-T)上,转化大肠埃希菌DH5α后进行培养。选择阳性克隆株经PCR和测序鉴定后提取质粒DNA,利用核酸检测仪测量质粒DNA的浓度,确定DNA的拷贝数作为标准品定量母液($10^8 \sim 10^9$ IU/ml)。将标准品定量母液稀释至 10^4 IU/ml,置-80℃保存。

1.3.2 引物设计:根据HBV全基因不同亚型的比较及HBV病毒核酸的特性设计通用引物,另外结合文献报道^[5,6],进行了相应改进,并进行BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)序列比对验证引物特异性,具体序列见表1,引物由上海生物工程有限公司提供。

表1 巢氏PCR分段扩增HBV基因组所用引物

Fragments	Primer set and names	Sequence (5'-3')	Position(nt)	Typical amplificationsize(bp)
I a	251f* [#]	GACTYGTGGTGGACTTCTC	251~269	940
	1190r [#]	TCAGCAAAYACTYGGCA	1190~1174	
I b	595f [#]	CAC HTG TAT TCC CAT CCC A	595~613	1 231
	P4* [#]	AAAAAGTTGCATGGTGCTGG	1825~1808	
II a	2300f* [#]	CCACMWAATGCCCTATC	2300~2317	1 131
	215r [#]	AGRAAMACMCCGCTGT	215~200	
II b	2819f [#]	ACCWTATWCYTGGGAACAA	2819~2837	1 032
	617r [#]	GAYGAYGGGATGGGAATACA	617~598	
	654r*	GSCCMBCCCATAGG	652~637	
III	1859f*	ACTNTTCAAGCCTCCRAGCTG	1859~1879	959
	1877f [#]	CTGTGCCTTGGRGCTT	1877~1894	
	2835r* [#]	GTTCCCAVGWATAWGGTGAYCC	2835~2814	
IV	P3* [#]	TTTTTCACCTCTGCCTAATCA	1823~1843	509
	2331r [#]	GGAAGYGTGAYARGATAGGGGCATT	2331~2306	
	2396r*	GTCKGCGAGGYGAGGGAGTT	2396~2377	

注:表中“*”代表PCR反应第一轮外引物,而“#”表示PCR反应第二轮内引物。引物序列参照标准株(NC_003977)。

1.3.3 PCR 扩增条件优化:文献[6]已将部分 PCR 扩增的条件进行了优化和明确,本文在此文献基础之上引入了一对缺口引物(表1中P3,P4),因此文章的优化和评价主要集中在 I b 和 IV 段。

1.3.3.1 退火温度优化:使用8个不同的退火温度(50~65℃)巢式 PCR 扩增 HBV 全基因,首先选出第1轮退火温度后,再以此退火温度下扩增的产物来筛选第2轮扩增的退火温度。第1轮 PCR 反应总体积为 25 μ l,反应体系为:选取乙肝质粒标准品(经实时荧光定量 PCR 检测 10^4 IU/ml)3 μ l, HBV DNA 第一轮外侧引物浓度为 0.2 μ mol/L, Mg^{2+} 浓度为 3 mmol/L, dNTP 浓度为 0.2 mmol/L, Taq 酶 20 U/ml;反应条件为:95℃预变性 3 min, 95℃变性 30 s, 8个退火温度分别 30 s, 72℃延伸 1 min, 共循环 35 次,最后 72℃再延伸 2 min。取第1轮扩增产物 3 μ l,再用内侧引物进行第2轮 PCR 扩增,使用8个不同退火温度(50~65℃)退火,其他反应条件同第1轮。使用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测巢式 PCR 产物。观察不同退火温度组合对巢式 PCR 非特异性扩增的影响。

1.3.3.2 引物浓度优化:在已确定好的退火温度下,选择阳性与阴性样本,第1轮 PCR 分别使用 2 对外侧引物浓度 0.2 μ mol/L,其他反应条件不变。

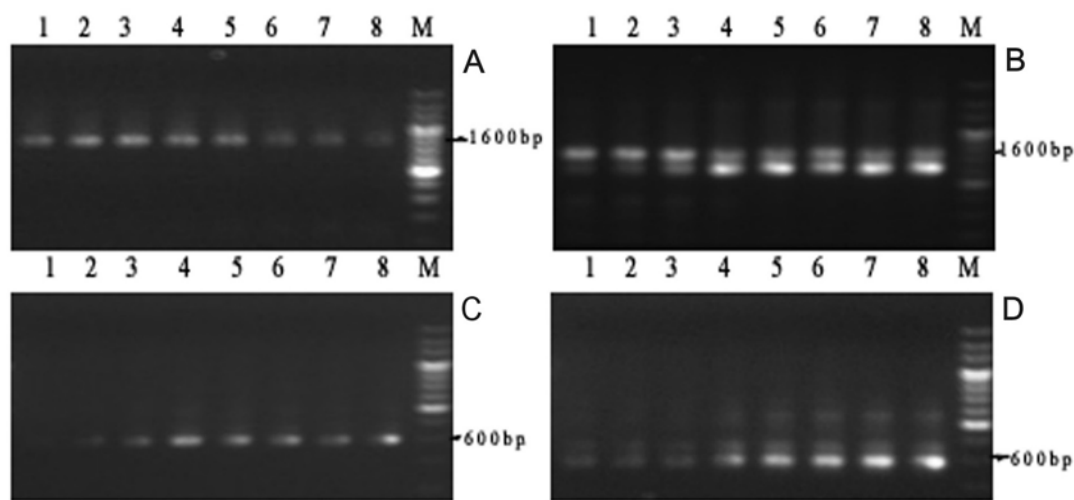
而后取第1轮扩增产物分别进行产物稀释(1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32),吸取稀释后产物 3 μ l,再用浓度为 0.2 μ mol/L 的内侧引物在确定的退火温度下进行第2轮 PCR 扩增并按照不同的稀释比例增加扩增循环数(1,2,3,4,5),其他反应体系与条件不变。使用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测巢式 PCR 产物。观察不同引物浓度组合对巢式 PCR 非特异性扩增的影响。

1.3.4 灵敏度分析:使用质粒标准品(1 600 IU/ml)以 2 倍比例进行稀释,分别使用 I b, IV 段引物(改良后)与文献[5,6]报道引物(改良前,1797r: CCAATTTMTGCTACAGCCTC; 1584f: ACT-TCGMBTCACCTCTGCACGT)进行扩增,使用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测巢式 PCR 产物。观察这两段 PCR 扩增反应的灵敏度。

1.3.5 重复性分析:分别使用不同浓度的质粒标准品(10^2 IU/ml, 10^3 IU/ml, 10^4 IU/ml),进行 I b, IV 段引物扩增,每个浓度扩增 3 次,使用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测巢式 PCR 产物,观察 PCR 扩增产物结果重复性。

2 结果

2.1 退火温度优化 电泳结果见图1。I b, IV 段在第1轮和第2轮 PCR 的退火温度均为 59.5℃。



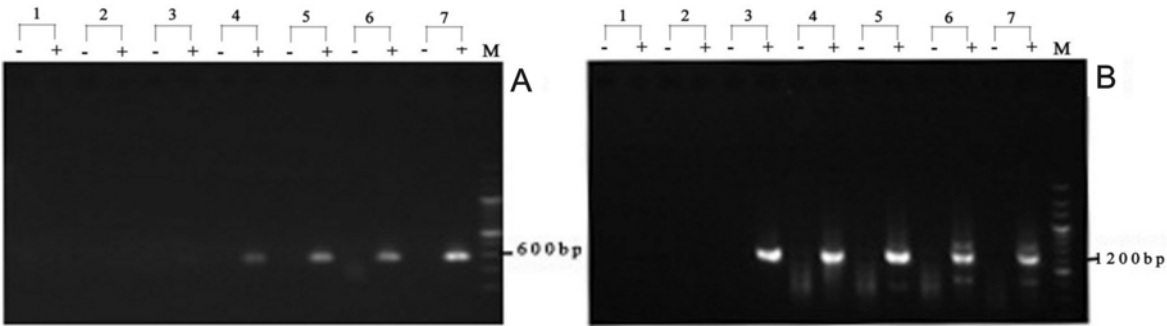
注:A,B分别表示 I b 第1,2轮扩增产物;C,D分别表示 IV 第1,2轮扩增产物;1~8分别是不同退火温度(65℃, 64.1℃, 62.5℃, 59.5℃, 55.9℃, 53℃, 51℃, 50℃);M为电泳 Marker。

图1 两对引物退火温度琼脂糖电泳图

2.2 引物浓度优化 不同引物浓度的组合,见图2。I b, IV 段反应体系的最适引物浓度为: I b 段外侧引物 0.025 μ mol/L, 内侧引物 0.2 μ mol/L, 条带单一,且非特异性扩增下降,阴性中弥散背景消失;当 IV 段外侧引物浓度 0.05~0.4 μ mol/L 之间,内侧引物浓度为 0.2 μ mol/L,扩增产物目的条

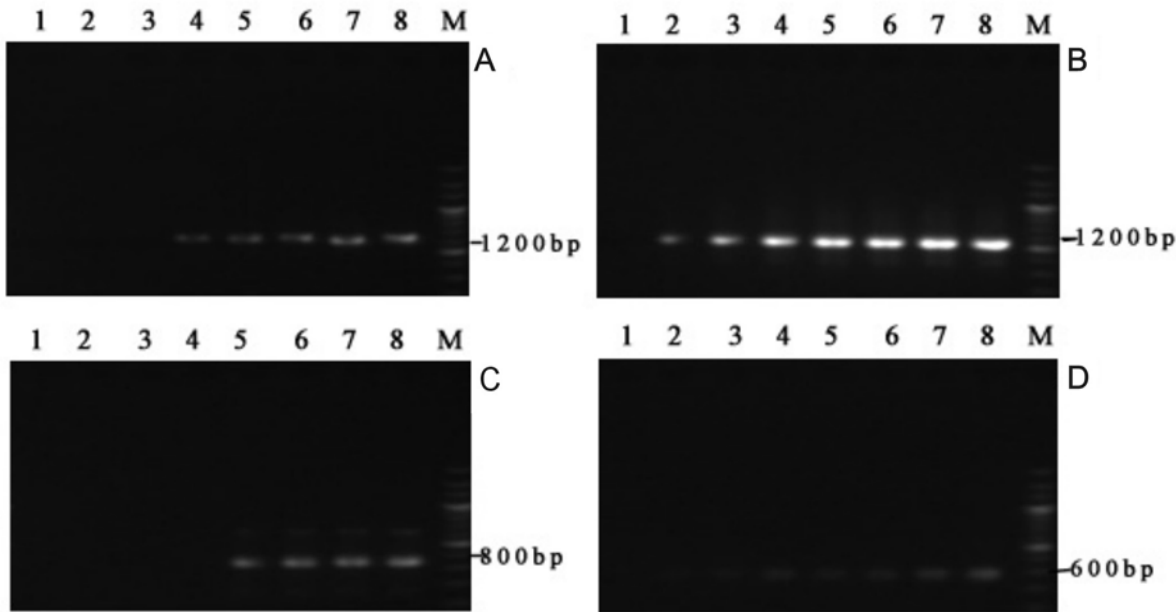
带单一,且扩增产物亮度一致。当外侧引物浓度 < 0.05 μ mol/L 时,扩增效率明显下降。

2.3 灵敏度分析 见图3。I b, IV 两段缺口区引物扩增灵敏度优于跨缺口引物,其灵敏度分别为 25 IU/ml, 50~100 IU/ml。



注:A,B图分别为Ⅳ,Ⅰb段扩增产物图,1~7 分别代表不同引物浓度(0.006 25,0.012 5,0.025,0.05,0.1,0.2,0.4 $\mu\text{mol/L}$)。

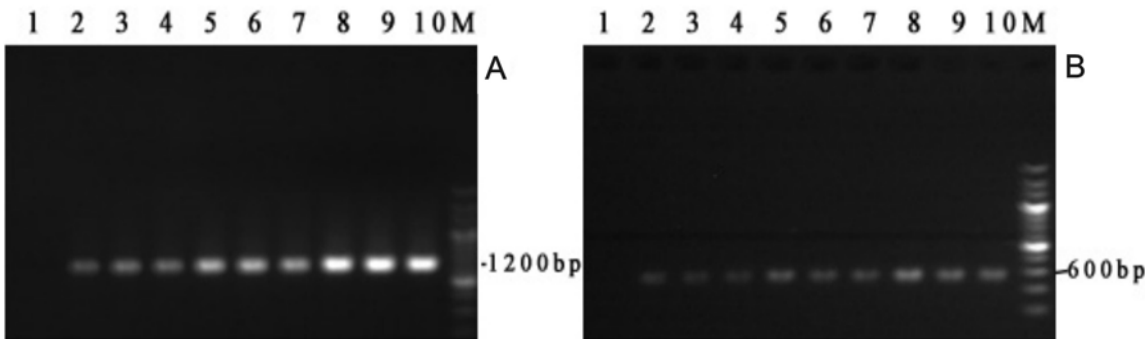
图 2 引物浓度分析图



注:A,B 分别为Ⅰb段原引物与改进后引物扩增产物图;C,D段为Ⅳ段原引物与改进后引物扩增产物图。1 为阴性对照,2~8 依次为 25,50,100,200,400,800,1 600 IU/ml。

图 3 灵敏度分析图

2.4 重复性分析 分别使用不同浓度的质粒标准 单一,清晰稳定,大小一致,重复性好。
及血清样品,进行多次扩增,结果见图 4,产物条带



注:A,B 分别为Ⅰb,Ⅳ段;1 为阴性对照;2~4 为 100 IU/ml,5~7 为 10^3 IU/ml,8~10 为 10^4 IU/ml。

图 4 重复性分析图

2.5 测序验证 测序结果见图 5。各碱基的测序 验证可知,与已知 HBV DNA 序列具有较高的同
峰形单一,没有出现结合干扰,进一步说明该方法的 源性($>98\%$),进一步说明测序结果有较好的准确
的可行性,且各段测序后的拼接序列,均通过 Blast 性。

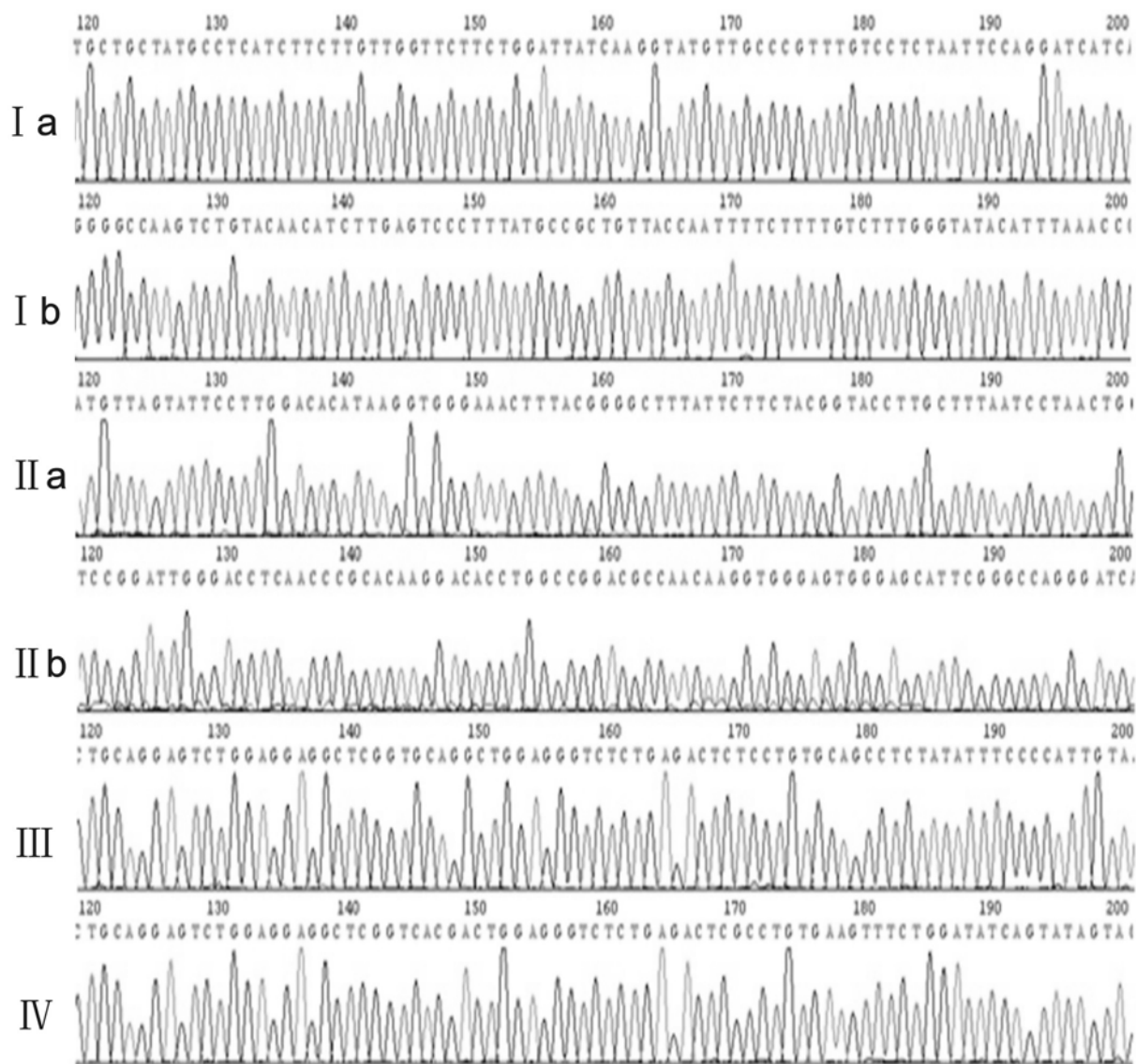


图5 各目的片段测序结果截图

2.6 低浓度 HBsAg 感染者样本检测 慢性低浓度 HBsAg 乙肝感染者样本 135 例,其中化学发光法定量检测 HBsAg<10IU/ml 的 57 例,其中全基因扩增 49 例(86.0%),各片段(Ia, Ib, IIa, IIb, III, IV)扩增分别为:53 例(93.0%),52 例(91.2%),54 例(94.7%),54 例(94.7%),55 例(96.5%),49 例(86.0%)。

3 讨论 乙型肝炎是我国最为常见的病毒性肝炎,因此研究乙型肝炎全基因的扩增方法有很多,但因为乙型肝炎病毒的基因组含有缺口,所以在扩增时很容易出现非特异的扩增,我们研究的低浓度 HBsAg 乙肝感染者,多数以较低的病毒复制为主,以至于这部分人群的全基因扩增更为困难。而巢氏 PCR 的运用解决了低拷贝样本的扩增问题,但对于引物的要求则更高。由于外侧、内侧引物间容易出现非特异性的结合,所以选择合适的引物至关重要^[7,8]。

低拷贝样本提高扩增目的产物的量及纯度,受到多重因素的影响,其中包括引物(浓度和特异性)、酶(扩增效率、保真性、浓度)、 Mg^{2+} 浓度、退火(温度和时间)、模板(浓度、纯度和完整性)、延伸(温度和时间)等因素的影响。如何对低拷贝样本进行高效扩增需要多个因素综合考虑^[9,11],但我们也应当分主次,以及先后,在巢氏 PCR 中选择合适的酶以后,首先应当对引物的特异性、退火温度、浓度进行筛选,只有如此才能保证后续扩增的顺利进行。

由 Gunther 等^[5]设计的负链末端缺口区引物,避免了 PCR 在缺口区的延伸,提高了扩增效率,降低了非特异扩增,但该方法在扩增低拷贝样本时,由于扩增的产物长度过长,容易出现错配以及扩增不出的情况,为此只能降低目的片段的长度。另外乙型肝炎病毒有多个基因型,病毒的保守性差,为引物设计的通用性带来了难度^[12],为此 Chook

等^[6]设计简并引物扩增 HBV 全基因,缩短了产物扩增的长度,同时各目的片段间重叠区域大,有利于比对扩增中的错配;缺点是没有考虑到引物扩增过程中的非特异性污染(引物浓度对于扩增产物的影响),以及乙肝病毒核酸的特点(病毒基因组含有缺口),本文着重弥补了这两个方面的不足,并对引物的性能及方法学可行性进行了验证。

目前,市场上多数扩增商品试剂盒已经把基本扩增的条件标注清楚,可是我们在使用过程中,巢氏 PCR 的引物浓度必须进行筛选,其中图 2,我们可以看出,当使用第Ⅳ段引物扩增时,引物在常用浓度范围(0.2~0.4 $\mu\text{mol/L}$)内,甚至更低时对扩增的产物均无明显影响($>0.025 \mu\text{mol/L}$)。而Ⅰb段扩增时,当外侧引物 $>0.025 \mu\text{mol/L}$ 时,样本扩增产物出现非特异性条带或弥散,阴性对照中同样出现弥散,分析原因为外侧引物浓度过高,以至于第1轮反应结束,仍剩余过多的引物,过多的外引物与内引物形成非特异性的桥接,致使产物电泳图背景加深,当引物为 0.025 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增产物单一并且无非特异扩增。

灵敏度分析(图3)的结果可以看出,HBV 全基因缺口区对于 HBV 扩增的影响,尤其是Ⅳ段,之前报道的引物是进行跨缺口延伸,图3中看出原引物扩增的目的片段存在拖尾及非特异性的条带,这说明产物在跨缺口扩增时发生了非特异性扩增,而更换后的引物,目的条带清晰、单一、无拖尾或弥散。在临床慢性低浓度 HBsAg 乙肝感染者中使用该套巢氏引物,大大提高了全基因扩增率,为这部分人群的全基因研究奠定了基础。

综上所述,本文建立和改良的巢氏 PCR 法具有较高的灵敏度和特异度,适用于慢性乙型肝炎低浓度 HBsAg 感染者全基因分析,且适用于 HBV DNA 低拷贝全基因扩增。

参考文献:

- [1] 成军,孙长贵,陈瑜.慢性HBV感染者低浓度HBsAg持续存在的临床特点及分子流行病学研究进展[J].现代检验医学杂志,2010,25(2):1-5.
Cheng J, Sun CG, Chen Y. Progress in clinical characteristics and molecular epidemiology of chronic HBV infection with sustained low-level HBsAg[J]. J Mod Lab Med, 2010, 25(2): 1-5.
- [2] Liu C, Chen T, Lin J, et al. Evaluation of the performance of four methods for detection of hepatitis B surface antigen and their application for testing 116 455 specimens[J]. J Virol Methods, 2014, 196(21): 174-178.
- [3] Jia W, Qi X, Ji YY, et al. Low serum hepatitis B surface antigen level predicts compensated cirrhosis caused by chronic hepatitis B in HBeAg positive patients in east china[J]. Hepat Mon, 2015, 15(8): e29183.
- [4] 成军,孙长贵,陈瑜,等.慢性HBV感染者低浓度HBsAg相关分子调查研究[J].中华检验医学杂志,2009,32(10):1128-1132.
Cheng J, Sun CG, Chen Y, et al. Molecular analysis on chronic hepatitis B patients with low-level HBsAg[J]. Chin J Lab Med, 2009, 32(10): 1128-1132.
- [5] Gunther S, Li BC, 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.
- [6] Chook JB, Teo WL, Ngeow YF, et al. Universal primers for detection and sequencing of hepatitis B virus genomes across genotypes A to G[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(6): 1831-1835.
- [7] Porter-Jordan K, Rosenberg EI, Keiser JF, et al. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA[J]. J Med Virol, 1990, 30(2): 85-91.
- [8] 何紫琪,李从荣,尹路.乙型肝炎病毒逆转录酶基因突变的临床意义[J].现代检验医学杂志,2016,31(4):83-86.
He ZQ, Li CR, Yin L. Clinical significance of reverse transcriptase gene mutations in the hepatitis B virus[J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(4): 83-86.
- [9] Lopez MM, Llop P, Olmos A, et al. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses[J]. Curr Issues Mol Biol, 2009, 11(1): 13-45.
- [10] Stadhouders R, Pas SD, Anber J, et al. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay[J]. J Mol Diagn, 2010, 12(1): 109-117.
- [11] 郭燕,蔡斌,段勇,等.HBsAb阳性隐匿性乙型肝炎病毒感染者HBV PreS-S区基因突变研究[J].现代检验医学杂志,2017,32(4):16-20.
Guo Y, Cai B, Duan Y, et al. Study on PreS-S gene mutation of HBV in occult hepatitis B virus infected persons with positive HBsAb[J]. J Mod Lab Med, 2017, 32(4): 16-20.
- [12] Datta S, Ghosh A, Dasgupta D, et al. Novel point and combo-mutations in the genome of hepatitis B virus-genotype D: characterization and impact on liver disease progression to hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110012.

收稿日期:2018-03-08

修回日期:2018-04-12