

反向斑点杂交技术检测 HBV YMDD 基序变异的应用和评价

张太松, 董瑞华, 李建芳, 林炳生, 雍万军, 胡守旺, 李明, 周新宇*
(中山大学达安基因诊断中心//卫生部医药生物工程科学技术研究中心, 广东 广州 510665)

摘要:【目的】采用反向斑点杂交技术对拉米夫定治疗后的慢性乙型肝炎患者血清中 HBV YMDD 基序变异进行检测, 并对其临床应用进行方法学评价。【方法】提取 242 例慢性乙型肝炎患者血清中 HBV DNA, 经聚合酶链反应后进行膜条杂交并同测序比较分析检测结果的一致性, 随后对该方法进行灵敏度和混合感染检测能力的评价。【结果】242 例样本检测结果有 236 例与测序结果相符, 反向斑点杂交检测结果同测序结果的符合率达 97.5%; 混合型感染 58 例, 占样品总数的 24%。反向斑点杂交技术检测 HBV YMDD 基序变异的灵敏度达 10^3 IU/mL, 在病毒混合感染群体中能检测出约占 10% 的突变型病毒株。【结论】反向斑点杂交技术检测 HBV YMDD 基序变异具有简单、准确、经济实用的特点, 具有很好的临床应用前景。

关键词: 乙型肝炎病毒(HBV); 突变; 耐药; 反向斑点杂交

中图分类号: R734.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)04-0428-05

Application and Evaluation of Reversed Dot Blot (RDB) Hybridization Assay for HBV YMDD Motif Mutants

ZHANG Tai-song, DONG Rui-hua, LI Jian-fang, LIN Bing-sheng, YONG Wan-Jun, HU Shou-wang,
LI Ming, ZHOU Xin-yu*

(Da'an Gene Diagnostic Center of SUN Yat-sen University//Research Center of Medical and Pharmaceutical Bioengineering
Ministry of Health, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To detect HBV YMDD motif mutants using RDB hybridization assay in lamivudine treated patients with chronic hepatitis B virus infection, as well as to evaluate the detection capability for clinical application. 【Method】 HBV DNA was extracted from serum for a total of 242 cases, after the PCR amplification, the hybridization was performed. By comparing the RDB assay results to sequence analysis, the concordant results were analyzed. The sensitivity and detection capability for mixed infection samples are also evaluated. 【Results】 There are 236 of concordant results for RDB assay and sequencing were obtained in a total of 242 cases, accounting for 97.5%. For all of the cases, there are 58 cases with coexisting mutant viruses in wild type viruses, accounting for 24%. The sensitivity of RDB hybridization assay for HBV YMDD motif mutants was 10^3 IU/mL, and approximately 10% mutant type strains can be detected from a mixed infection sample. 【Conclusion】 The RDB hybridization assay for HBV YMDD motif mutants is a simple, accurate, and economic method and it may be a promising tool for clinical application.

Key words: hepatitis B virus(HBV); mutant; drug resistance; reverse dot blot hybridization

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(4): 428-432]

目前抗乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的主要药物有干扰素和核苷类似物, 临床常用的核苷类似物药物能有效抑制 HBV DNA 的复制、

降低血液和肝脏中的病毒载量, 改善组织学病变, 但在长期治疗过程中产生的耐药现象日益严重, HBV 对核苷类似物耐药性的产生与 HBV P 基因

收稿日期: 2009-02-03

基金项目: 广州市科技局科技攻关重大项目(2007Z1-E4031)

作者简介: 张太松, 硕士; * 通讯作者: 周新宇, 高级工程师, E-mail: zhangts@daangene.com

变异有关,P 基因变异涉及到多个位点,其中以 HBV 逆转录酶(rt)C 区的 YMDD 基序的变异最为重要,常见的突变类型为 rtM204I/V ± rtL180M^[1]。因此,正确认识并处理好乙肝耐药问题已成为乙肝抗病毒治疗的关键,在乙肝治疗前和治疗中,简单、快速、准确地进行 HBV 耐药基因突变检测对治疗策略调整和疗效评价具有重要的意义。本文拟采用 PCR 结合反向斑点杂交技术对 HBV P 基因的 rt180 和 rt204 位点常见突变进行检测,并探讨该方法在临床应用方面的可能性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与仪器

收集 2005 年至 2007 年临床医院收集的慢性乙肝患者血清 242 例,均有拉米夫定治疗史(1~4 年不等)。主要试剂和仪器:乙肝病毒 YMDD 基序突变检测试剂盒由达安基因股份有限公司生产,乙肝荧光定量 PCR 试剂盒为达安基因公司产品。引物、探针合成均采用 ABI 3900 全自动 DNA Synthesizer,所用 PCR 扩增仪器为 ABI 2720 PCR 扩增仪,核酸杂交采用 DK-8D 型恒温水槽。

1.2 血清 HBV DNA 提取

将血清或血浆 50 μL 转移到 1.5 mL 离心管中,加 50 μL DNA 浓缩液混匀,离心 10 min,弃上清。加入 25 μL DNA 提取液,振荡至沉淀充分溶解。离心 30 s,100 °C 保温 10 min 后离心 5 min,取上清液 2 μL 做 PCR 反应。

1.3 PCR 反应

PCR 所用引物序列为上游 HBV5' TCCTGCTG CTATGCCTCAT3', 下游为 HBV3' GGGTTTAAAT GTATACCCAAAGA3'。50 μL 的 PCR 反应液含有 10 pmol 的上下游引物,50 mmol/L 的 KCl,10 mmol/L 的 Tris-HCl,3.5 mmol/L 的 MgCl₂,200 μmol/L 的 dNTPs,3 U 的 *taq* 酶。反应按 93 °C 变性 5 min,然后 93 °C 3 min;93 °C 30 s,54 °C 45 s,72 °C 30 s 共 45 个循环;最后 72 °C 保温 7 min。

1.4 电泳

PCR 产物进行体积分数 2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 反向斑点杂交检测

按照试剂盒说明书操作,溶液配制按照说明书提供的方法进行。取出预先点制的膜条,膜条上

有 5 条点突变检测探针(分别为 L180, M180, M204, I204, V204),一条 HBV 扩增控制探针(Amp.con, 阳性说明扩增的为 HBV)和一条显色控制探针(Conj.con, 阳性说明显色过程正常),其阵列见(图 1)。将杂交膜条放入 15 mL 离心管中,加入 10 mL 杂交液和待检测的 PCR 扩增产物 42 °C 杂交 1 h,杂交结束后加入 10 mL 洗涤液 42 °C 洗涤 10 min,随后加入结合液和显色液进行显色。

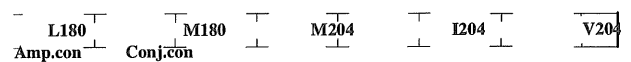


图 1 杂交膜条探针阵列示意图

Fig.1 Schematic illustration of the array for hybridization membrane immobilized probes

Amp.con indicate amplification control; Conj.con indicate conjugation control

1.6 结果判读

将杂交后的膜条进行扫描,扫描图片输入电脑,进行结果判读。

1.7 测序

所有测试样本进行 PCR 扩增,产物送上海英骏公司测序并和杂交结果进行比较。

1.8 混合感染检测

分别将野生型 HBV 血清(L180, M204)和 rtL180 M/rtM204I(L180, I204)及 rtL180 M/rtM204V(M180, V204)突变型的 HBV 血清稀释至 5 000 IU/mL,按照 1:9,2:8,3:7,4:6,5:5,6:4,7:3,8:2,9:1 的比例进行混合,抽提 DNA 进行 PCR 扩增(步骤同上),判断试剂盒的检测灵敏度和检测混合感染能力。

2 结 果

2.1 电泳结果

2% 的琼脂糖凝胶电泳结果显示扩增目的片段大小正确(430 bp),为单一的条带(图 2)。

2.2 样本检测结果

242 例样本检测结果中,与测序结果相符合的有 236 例,与测序结果存在分歧的有 6 例(表 1),若按照测序为金标准,试剂盒的准确性达到 97.5%。在所有样本中,共检测到 13 种类型的突变(图 3),其中混合感染有 58 例,占到所有样本的 24%。

本研究中,最常见的型别或突变形式为 L180/

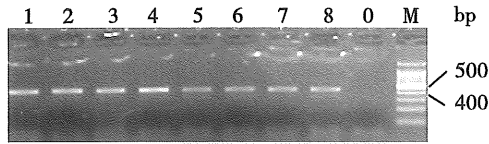


图 2 PCR 产物电泳图

Fig.2 The electrophoresis of the PCR products

Line 1~8: clinical samples; 0: negative control; M: 100 bp DNA marker; PCR products: 430 bp

Reverse dot blot hybridization assay results	Genotype
	L180/M204
	L180/I204
	M180/V204
	M180/I204
	L180/M204, V204
	L180/M204, I204
	M180/M204, V204
	L180, M180/I204
	L180, M180/V204
	L180, M180/I204, V204
	L180, M180/M204, I204
	L180, M180/M204, V204
	L180, M180/M204, I204, V204

图 3 13 种不同的突变或型别

Fig.3 13 different kinds of mutants or genotypes were observed in this study

M204; L180/I204; M180/I204; M180/V204; L180, M180/I204, V204(图 4)。此外,本研究对不符合的 6 例样本进行了克隆鉴定,有 4 例证实与杂交结果相符,有 2 例 RDB 检测显示为 L180/M204, I204, 克隆中筛选到了型别为 L180/M204 及 L180/I204 的克隆(No.2, No.3); 1 例 RDB 显示 L180, M180/M204, I204, 克隆筛选到型别为 L180/M204 和 M180/I204 的两种克隆(No.4); 1 例 RDB 检测为 L180/M204 的样本, 克隆中只筛选到 L180/M204 的克隆(No.5)。其余 2 例克隆证实与测序结果相符(No.1, No.6), 说明 RDB 检测可能存在一定的漏检或误检(表 1)。

2.3 试剂盒检测混合感染结果

组合 A 为 YMDD (L180/M204) 和 YIDD (L180/I204) 型别的组合按比例混合检测结果, 组合 B 为 YMDD (L180/M204) 和 YVDD (L180/V204) 型别的组合按比例混合检测结果, 两种突变型 HBV 病毒血清在混合血清中的比例达 10% 左右, 均能正确检出, 试剂盒灵敏度达 103 IU/mL 左右(图 5)。

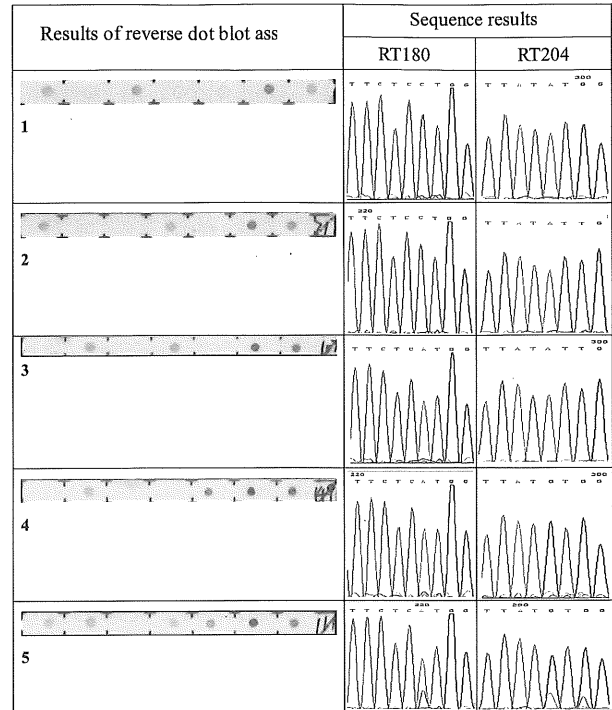


图 4 最常见型别或突变型标本的杂交结果和测序结果

Fig.4 RDB assay results and sequence analysis for the most common mutants

1: L180/M204(CTG/ATG); 2:L180/I204 (CTG/ATT); 3: M180/I204 (ATG/ATT); 4: M180/V204 (ATG/GTG); 5: L180, M180/I204, V204(CTG, ATG/GTG, ATT)

A	YMDD:YIDD
	YMDD
	9:1
	1:9
	YIDD
B	YMDD:YVDD
	YMDD
	9:1
	1:9
	YVDD

图 5 混合感染检测能力

Fig.5 Detection capacity of mixed infection for both wild type and mutant type

3 讨论

基因变异及其导致的药物靶位氨基酸的替代是产生病毒耐药的基础。rtL180M 突变往往在 rtM204I/V 突变的基础上出现, 是一种补偿性变异, 这两种突变联合出现可提高变异病毒株的复

表1 242例血清样本测序结果与杂交结果的比较

Table 1 Comparison of the results obtained by sequence analysis and RDB assay from 242 serum samples

Results	Sequence analysis		RDB assay		No. of samples
	Strain type(s)	Codons	Strain type(s)	Codons	
Concordant	wt	RT180/RT204		RT180/RT204	
	mt	L180/M204	wt	L180/M204	93
	mt	L180/I204	mt	L180/I204	42
	mt	M180/V204	mt	M180/V204	30
	wt + mt	M180/I204	mt	M180/I204	17
	wt + mt	L180/V204, M204	wt + mt	L180/V204, M204	1
	wt + mt	L180/I204, M204	wt + mt	L180/I204, M204	8
	wt + mt	M180/V204, M204	wt + mt	M180/V204, M204	4
	wt + mt	L180, M180/I204	Wt + mt	L180, M180/I204	8
	wt + mt	L180, M180/V204	wt + mt	L180, M180/V204	2
	wt + mt	L180, M180/I204, V204	wt + mt	L180, M180/I204, V204	21
	wt + mt	L180, M180/I204, M204	wt + mt	L180, M180/I204, M204	3
	wt + mt	L180, M180/V204, M204	wt + mt	L180, M180/V204, M204	5
			L180, M180/I204, V204, M204	wt + mt	L180, M180/I204, V204, M204
Discordant	mt				
No.1	wt + mt	L180/I204	wt + mt	L180, M180/I204	1
No.2	wt + mt	L180, M180/M204	wt + mt	L180/M204, I204	1
No.3	wt + mt	L180/M204	wt + mt	L180/M204, I204	1
No.4	wt + mt	L180, M180/I204	wt + mt	L180, M180/M204, I204	1
No.5	wt + mt	L180, M180/M204	wt	L180/M204	1
No.6		L180/M204, I204	wt	L180/M204	1

Wt: wild type(L180 and M204); mt: mutant type(M180 or I204 or V204)

制能力^[1]。本次研究中,30例单一感染的rtM204V变异同时有rtL180M变异,35例混合感染的rtM204V中仅有1例无rtL180M变异,说明HBV基因组发生rtM204V突变时多伴有rtL180M突变;在单一感染的59例rtM204I变异中,同时有rtL180M变异的有17例,占28.8%,提示在rtM204I变异中也常伴有rtL180M变异,也可能意味着这些病例的血清HBV准种池中变异株的复制能力更强。最近的研究显示,在rtM204I变异出现后,随后出现的rtL180M变异可能和ALT水平升高相关^[2]。不过由于病例较多,病人的随访程度不高,本研究未能有充足的临床资料来证实。

由于YMDD变异直接导致病毒对抗病毒药物的耐受性,因而HBV YMDD变异的检测引起了临床的高度重视^[3-4]。目前,在乙肝抗病毒治疗的过程中进行YMDD变异检测已常规用于临床。用于YMDD变异检测的方法学众多,如PCR-限制性片

段长度多态性分析法^[5]通过对突变特异性位点的碱基差异引入限制性内切酶,对扩增后的产物进行酶切电泳分析突变的有无,这种方法比较繁琐;变性梯度凝胶电泳检测法^[6]能根据电泳凝胶中条带的异常来判断是否出现突变,这种方法能有效区分是否发生突变,但需要制备标准的marker来进行对比,而且不能判断是哪种具体的突变;序列特异性引物PCR^[7]也是一种应用较广的突变检测技术,对引物的设计要求较高,对反应的体系和条件需要进行详尽的优化。目前国内外临床应用较广的是荧光PCR法^[8-9]和反向核酸分子杂交法。荧光PCR法检测YMDD变异方法较方便,但目前上市的荧光PCR法只局限在检测单个位点,对于多位点、多类型的突变检测存在方法学上的局限性。反向核酸杂交法对于检测多位点,多种类型的突变有着显著的优势。在欧美,尤其在欧洲应用最多的为比利时Innogenetics公司商业化产品INNO-LIPA HBV DR,最早的一代主要检测针对拉米夫

定和泛昔洛韦耐药相关的突变,新一代的 INNO-LIPA HBV DR v2 产品增加了阿德福韦耐药相关的突变位点,目前该试剂盒已经通过 CE 认证。

反向斑点杂交法也是一种反向核酸分子杂交技术,本次研究通过对 HBV pol 逆转录酶区 C 区 YMDD 基序、B 区 LLAQ 基序设计特异性检测探针并包被在固相基质上,通过 PCR 扩增后再进行反向杂交可同时检测 rtM204I、rtM204V、rtL180M 位点突变。结果显示,捕获探针在对已知序列的模板的检测中表现了很好的特异性和灵敏性,野生型和突变型探针在单碱基错配能力的检测上达到最优化,无非特异性杂交。为了验证 RDB 法检测结果的准确性,本研究对所有样本进行了测序,结果发现,RDB 法和测序法检测结果的一致性达 97.5%,具有很高的准确性。由于在 HBV 抗病毒治疗中,病毒准种池中的野生型和突变型病毒株比例会发生一个动态的变化过程,因此,相当一部分乙肝患者血清中的 HBV 处于一种野生型和突变型共存的混合状态,若早期能检测出较低比例的突变型 HBV 对临床用药和监测有着重要意义。本研究通过混合相同浓度、不同比例的野生型和突变型的血清样本作为待检模板,结果发现在病毒群体中,突变型的病毒占约 10% 以上的比例时,RDB 方法均能正确、有效检测,灵敏度达 10^3 IU/mL。而测序对病毒混合感染状态中突变株检测的灵敏度较低^[10],通常在变异株超过 HBV 准种池的 20% 时才能被发现,且对于病毒拷贝数为 10^4 IU/mL 以下的样本,回收纯化 PCR 产物用来作为测序的模板可能比较困难。当然,核酸测序分析被认为是基因组学中基因突变检测的金标准,能够检测出片断中的未知突变或其它位点新发生的突变;而 RDB 方法则只能检测已知的、常见突变,只有逐步增加捕获探针才能检测出越来越多新发现的突变位点,这也是 RDB 方法检测需进一步完善之处。因为这些检测手段在方法学上有着不同的特点,因而检测结果也会出现差异,本次研究中有 6 例样本的 RDB 检测结果同测序结果不一致可能与上述因素相关。

本次研究中采用的反向斑点杂交方法检测 HBV YMDD 基序的突变在实验过程中无需精密的昂贵仪器、简单适用、检测结果可靠,不失为一种简便而有效的方法,具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Suzane KO, Naoya K, Yasushi S, et al. The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(4):449-454.
- [2] Enomoto M, Tamori A, Kohmoto MT, et al. Mutational patterns of hepatitis B virus genome and clinical outcomes after emergence of drug-resistant variants during lamivudine therapy: analyses of the polymerase gene and full-length sequences [J]. *J Med Virol*, 2007, 79(11):1164-1170.
- [3] 张晓红,马会慧,崇雨田,等.慢性乙肝患者停用拉米夫定后出现肝功能衰竭的危险因素[J].*中山大学学报:医学科学版*,2005,26(03):329-332.
- [4] 袁耀钦,潘小划,何东华,等. PCR-反向斑点杂交法检测 HBV YMDD 基序混合感染[J].*热带医学杂志*, 2007, 7(11):1064-1067.
- [5] Jardi R, Buti M, Rodriguez-Frias F, et al. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants [J]. *J Virol Methods*, 1999, 83(1-2):181-187.
- [6] Bielawski KP, Al-soud WA, Stalke P, et al. Determination of lamivudine-resistant variants of hepatitis B virus by denaturing gradient gel electrophoresis: a novel approach to monitoring drug resistance [J]. *Med Sci Monit*, 2008, 14(5):CR281-285.
- [7] Lee CZ, Lee HS, Huang GT, et al. Detection of YMDD mutation using mutant-specific primers in chronic hepatitis B patients before and after lamivudine treatment [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(33): 5301-5305.
- [8] Shih YH, Yeh SH, Chen PJ, et al. Hepatitis B virus quantification and detection of YMDD mutants in a single reaction by real-time PCR and annealing curve analysis [J]. *Antivir Ther*, 2008, 13(4):469-480.
- [9] Yoshida S, Hige S, Yoshida M, et al. Quantification of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by type-specific TaqMan minor groove binder probe assay in patients with chronic hepatitis B [J]. *Ann Clin Biochem*, 2008, 45(Pt 1):59-64.
- [10] Heo J, Cho M, Kim HH, et al. Detection of YMDD motif mutants by oligonucleotide chips in lamivudine-untreated patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. *J Korean Med Sci*, 2004, 19(4):541-546.

(编辑 王晓鹰)