

反向线性探针杂交技术检测慢性乙型肝炎病毒拉米夫定耐药研究^①

赖国旗^{1,2}, 张文露¹, 胡源¹, 唐红¹, 张磊¹,
谢素兰¹, 潘玥², 魏立雯², 黄爱龙¹

1. 重庆医科大学 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016;
2. 重庆医科大学 实验动物中心, 重庆 400016

摘要: 目的: 建立起简单、快速、灵敏、准确的慢性乙型肝炎病毒拉米夫定耐药位点的反向线性探针(reverse line probe, RLP)检测方法. 方法: 根据 HBV 野生及耐药基因序列设计通用探针、3'、5'对称加有 poly-C 的特异性探针和 5'标记生物素的扩增引物. 将探针线性固定在硝酸纤维膜上, 使 HBV PCR 扩增产物与探针进行杂交. 通过优化杂交条件, 建立 RLP 检测方法. 利用该方法对重庆地区 86 个慢性乙肝病人进行检测, 同时与直接测序结果比较. 结果: 半巢式 PCR 可对 10^3 拷贝/ml 的血清样本进行有效特异扩增, 新建的 RLP 检测方法可对 PCR 扩增产物在 1 ng/ml 以上, 或血清样本中突变型 DNA 占野生型 DNA 比例为 5% 以上的均可有效检测, 86 例临床的检测灵敏度为 100%, 野生型和耐药型的检测准确性分别为 98.09%(103/105)、100%(43/43), 与直接测序法比, RLP 检测野生与耐药混合型准确性更好. 结论: 反向线性探针杂交检测方法检测 HBV 拉米夫定耐药位点方便、灵敏、准确, 是 HBV 拉米夫定治疗有效的监控工具, 该方法适合临床应用.

关键词: 反向线性探针杂交; 乙型肝炎病毒; 拉米夫定

中图分类号: Q819

文献标志码: A

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染引起的慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)以及相关的肝硬化(liver cirrhosis, LC)、肝细胞癌(hepatic cell cancer, HCC)和肝功能衰竭是全球范围内重要的医学和公共卫生问题^[1]. 干扰素 α (IFN α)和核苷(酸)类似物(nucleoside analogues, NA)是目前治疗 CHB 主要的两类抗病毒治疗药物. 其中, NA 口服方便、抑制 HBV DNA 复制的效果明显、长期使用安全性良好, 尤其是当免疫治疗失败时, NA 在 CHB 的抗病毒治疗中具有明显的优势, 受到广大临床医师和患者的重视. 但是, 长期使用 NA 抗病毒治疗的过程中, 耐药毒株的产生是一个突出的问题, 它不仅影响现有药物的治疗效果, 同时由于交叉耐药的存在, 可能影响后续治疗方案的选择和治疗作用的发挥, 最终将导致肝病恶化^[2]. 尤其是最常用的 NA——拉米夫定, 常出现 L180M 和 M204I/V 突变^[3]. 目前, 已有各种拉米夫定耐药突变的检测方法, 如实时荧光 PCR、限制性片段长度多态性、基因芯片、DNA 测序等^[4-5], 其中, DNA 测序是耐药检测的金标准, 但其对基因型混合耐药的检出率低. Innogenetics 公司生产的反向线性探针分析(INNO-LiPA)试剂盒在乙肝病毒耐药检测中得到应用^[6-9], INNO-LiPA 与其它检测方法比较, 在

① 收稿日期: 2011-07-12

基金项目: “863”课题(Grant No. 2008AA02Z424)和重庆市教委课题(Grant No. KJ100309).

作者简介: 赖国旗(1964-), 女, 重庆人, 副教授, 医学博士, 博士后, 主要从事感染性疾病分子生物学研究.

通信作者: 黄爱龙, 教授.

疾病进展处于高风险时具有明显优势. 但是, INNO-LiPA 检测试剂盒价格昂贵, 检测试剂条探针数量多, 结果判断复杂, 现仅限于实验研究, 短期内很难在临床推广使用. 因此, 建立快速、简便, 特异性好、灵敏度高的检测方法非常必要. 本研究是探讨反向线性探针(reverse line probe, RLP)检测拉米夫定耐药的新方法.

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 细菌与试剂

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 由本室保存, TaqDNA 聚合酶和 pMD18 T 载体、柱式液体样品总核酸抽提试剂盒购自 TaKaRa 公司, 生物素抗体-碱性磷酸酶(HRP) 酶联底物 NBT/BCIP 购自 Roche 公司, Real-time PCR 试剂盒购自 Fosun Diagnostics 公司, 硝酸纤维膜购自 GE 公司, 其余试剂为国产分析纯.

1.1.2 血清标本

86 份 HBV 阳性血清标本由重庆医科大学附属第二医院感染科提供.

1.1.3 仪器

S1000TM Thermal cycler PCR 仪购自 BIO-RAD 公司, 3100 测序仪购自 ABI 公司, 凝胶成像仪购自 BioRad 公司, XYZ3050F 划膜仪购自 BIODOT 基因有限公司, HL2000 分子杂交仪购自 UVP 公司, 恒温振荡培养箱购自江苏太仓科教仪器厂.

1.2 方 法

1.2.1 HBV 野生型和耐药型标准质粒构建

根据测序结果为 L180/M204、L180M/M204I、L180M/M204V 的病人血清进行 RT 区 PCR 扩增, 将扩增的 PCR 产物克隆在 pMD18 T 质粒载体上, 并通过测序筛选, 构建 HBV 野生型和拉米夫定耐药型标准质粒.

1.2.2 引物和探针

采用 Treeview 软件对 NCBI 中 891 条 HBV 全长序列进行比对分析, 根据序列保守区设计通用探针和巢式 PCR 扩增引物, 上游引物在 5' 端进行生物素修饰. 根据耐药位点的特异性设计(简并)探针(表 1), 由 Invitrogene 公司合成.

表 1 HBV PCR 引物及寡核苷酸探针

	PCR 引物序列
570FBP(外上游引物)	5'-Biotin-TGTTGCTGTACAAAACCT-3'
610FBP(内上游引物)	5'-Biotin-TGTATTCCCATCCCATCATC-3'
1180RBP(下游引物)	5'-TCAGCAAACACTTGGCA-3'
	Probes
CDR705(通用探针)	5'-ACAGTGGGGAAAGCCCT-3'
L180(180 野生探针)	5'-dC-TAAACTGAGCCA R* GAGA-dC-3'
L180M(180 耐药探针)	5'-dC-TAAACTGAGCCA T GAGA-dC-3'
M204(204 野生探针)	5'-dC-ATC ATC CAT ATA ACTGA-dC-3'
M204I(204 耐药探针)	5'-dC-ACATCATC D* AT ATA ACT-dC-3'
M204V(204 耐药探针)	5'-dC-ATC ATC CAC ATA ACTGA-dC-3'

* R=G/A, D=T/G/A.

1.2.3 HBV DNA 提取

按“柱式液体样品总核酸抽提试剂盒”提取 DNA. 200 μ L 血清样本中加入 200 μ L 2 \times 裂解缓冲液(0.02 mol/L Tris, HCl, 0.01 mol/L EDTA, 1% SDS)和 10 μ L 蛋白酶 KK(20 mg/mL), 40 $^{\circ}$ C 消化 1.5 h, 用酚和氯仿抽提后用无水乙醇沉淀 DNA, 75%乙醇洗涤后用 20 μ L 纯水溶解 DNA, 按“Real-time PCR 试剂盒”测定 HBV DNA 拷贝数.

1.2.4 HBV P 基因 DNA 扩增

反应体系总体积为 50 μL , 内外扩增引物序列见表 1. 外扩增反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 内扩增反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 46 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 取 5 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳.

1.2.5 RLP 杂交条件优化及特异性检测

1) 杂交膜的制备: 将生物素标记的 HBV PCR 扩增产物稀释 3 ng/ μL , 作为显色阳性对照, 将通用探针及寡核苷酸探针 (poly-5C、10C、15C 或 20C) 配制成为 20 $\mu\text{mol/L}$, 用划膜仪按显色对照、通用探针、L180、180M、M204、204I、204V 顺序线性喷洒于硝酸纤维膜上 (图 1), 膜片经紫外交联后, 120 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 30 min, 室温干燥保存.

2) 杂交条件优化: 将每条膜片浸泡在 2 mL 45 $^{\circ}\text{C}$ 预热的杂交液 (2 \times SSC, 0.1% SDS) 中, 加入 20 μL PCR 变性产物 (10 μL 标准质粒 PCR 产物、10 μL 变性液, 混合处理 10 min), 50 $^{\circ}\text{C}$ 、53 $^{\circ}\text{C}$ 或 56 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 30 min、60 min 或 90 min.

3) 洗膜和显色: 杂交完后, 用杂交液室温漂洗 2 次, 5 min/次, 洗脱液 (0.5 \times SSC, 0.1% SDS) 50 $^{\circ}\text{C}$ 洗脱 30 min, TBS 室温漂洗 5 min. 将膜片浸泡于 2 mL 生物素抗体碱性磷酸酶 AP 溶液 (含 TTBS 2 mL、BSA 0.1 g、AP 0.1 μL 、0.2 μL 或 0.4 μL) 中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 然后用 TBS 室温漂洗 5 min, 显色缓冲液 25 $^{\circ}\text{C}$ 洗膜 2 次, 每次 5 min. 最后将膜浸入 2 mL NBT/BCIP 显色液 (显色缓冲液 2 mL、NBT/BCIP 40 μL) 中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 30 min, 蒸馏水终止反应, 根据紫色线条出现的位置和顺序直接判断结果.

1.2.6 灵敏度检测

- 1) 用半巢式 PCR 扩增 10^3 copy/ml~ 10^8 copy/ml 标准质粒 DNA;
- 2) 用 RLP 检测方法检测 0.1, 1.0, 10 ng/mL 的标准质粒 PCR 产物;
- 3) 用 RLP 检测方法检测按 100 : 0.95 : 5.90 : 10.80 : 20.70 : 30 比例进行混合的野生型: 突变型质粒 PCR 产物.

1.2.7 临床样本耐药检测

用优化的 RLP 检测方法检测 86 例拉米夫定治疗后的慢性乙型肝炎病毒血清样本, 同时对这 86 例样本的 PCR 产物直接测序 (本实验室完成), 如 RLP 检测结果与测序结果有冲突, 则进行 T 载体克隆, 选择 30 个克隆, 再进行测序.

2 结果

2.1 HBV P 基因 DNA 扩增

以 HBV 标准质粒为模板进行内扩增, 野生型和突变型质粒在 570 bp 处可见阳性条带, 与预期片段大小一致 (图 2).

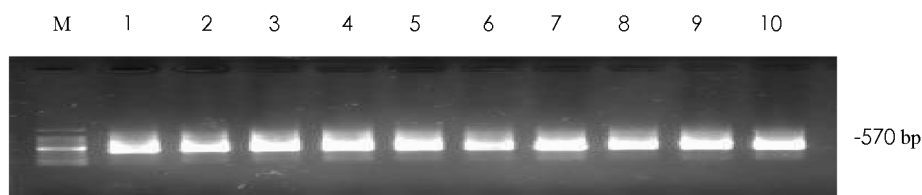


图 2 HBV P 基因 DNA 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

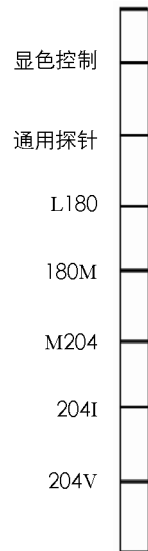
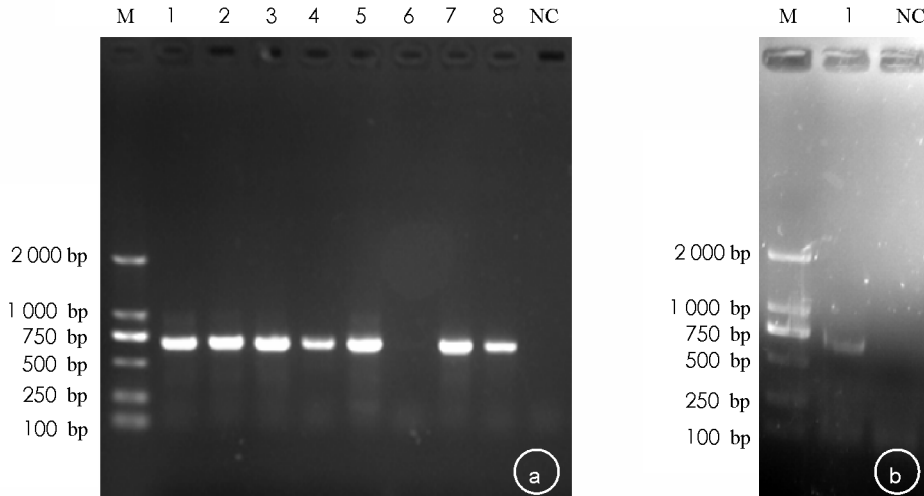


图 1 HBV 拉米夫定耐药检测试纸条示意图

2.2 血清样本 HBV 半巢式 PCR 扩增

HBV 阳性血清样本经过 PCR 外扩增和内扩增, 图 3a 为 8 例血清样本的外扩增结果, 其中 1~5, 7 和 8 号样本在 610 bp 处出现很亮的条带, 与预期片段大小一致; 6 号样本没有阳性条带, 荧光定量 PCR 测定表明这例病毒拷贝数为 10^3 拷贝/ml. 对 6 号样本进行内扩增后在 570 bp 出现条带, 与预期片段大小一致(图 3b). 结果表明通过半巢式 PCR 可对 10^3 拷贝/ml 的血清样本进行有效扩增, 并且特异性较好.



a. 外引物扩增结果 1~8: 样本扩增结果; NC: 阴性对照

b. 内引物扩增结果 1: 对应外扩增的 6 泳道(拷贝数为 10^3 copy/ml)

图 3 巢式 PCR 扩增不同拷贝数的临床样本

2.3 RLP 杂交优化及其检测特异性

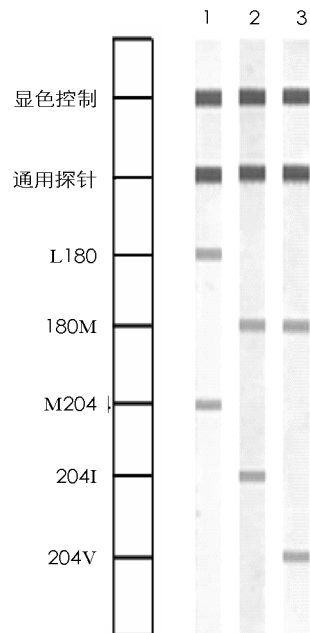
180 及 204 位点探针 3'、5' 端对称用不同 bp 的 dC 修饰(5C、10C、15C、20C), 在 3 个温度(50 °C、53 °C、56 °C)下杂交不同时间(0.5 h、1 h、1.5 h), 在 25 °C 条件下与不同的 AP 抗体浓度(1:15 000、1:10 000、1:5 000)结合, 结果发现探针 L180-20C, M204-5C, 204I-5C, 204V-5C、杂交温度为 56 °C、杂交时间 30 min、抗体浓度为 1:5000 信号强度最好, 且无非特异性条带出现(图 4).

2.4 RLP 杂交检测灵敏度

用半巢式 PCR 进行扩增不同拷贝数标准质粒, 当质粒为 10^3 拷贝/ml 时, 可见阳性条带(图 5a); 用 RLP 检测方法检测不同浓度标准质粒 PCR 产物, PCR 产物浓度为 1 ng/ml 时, 能被检出(图 5b); 用 RLP 杂交野生型与突变型 PCR 产物不同混合比例, 突变型占野生型比例为 5% 时, 均可被检出(图 5c).

2.5 临床样本检测

用建立的反向线性探针杂交法检测 86 例临床血清样本, 86 份临床样本中, 所有样本都得到有效扩增和检测, 其灵敏度为 100%, 用 RLP 检测结果与测序法进行比较, RLP 检出 L180 位点和 M204 位点共 103 个, 而测



1: 野生型 PCR 产物; 2: 180M/204I PCR 产物;

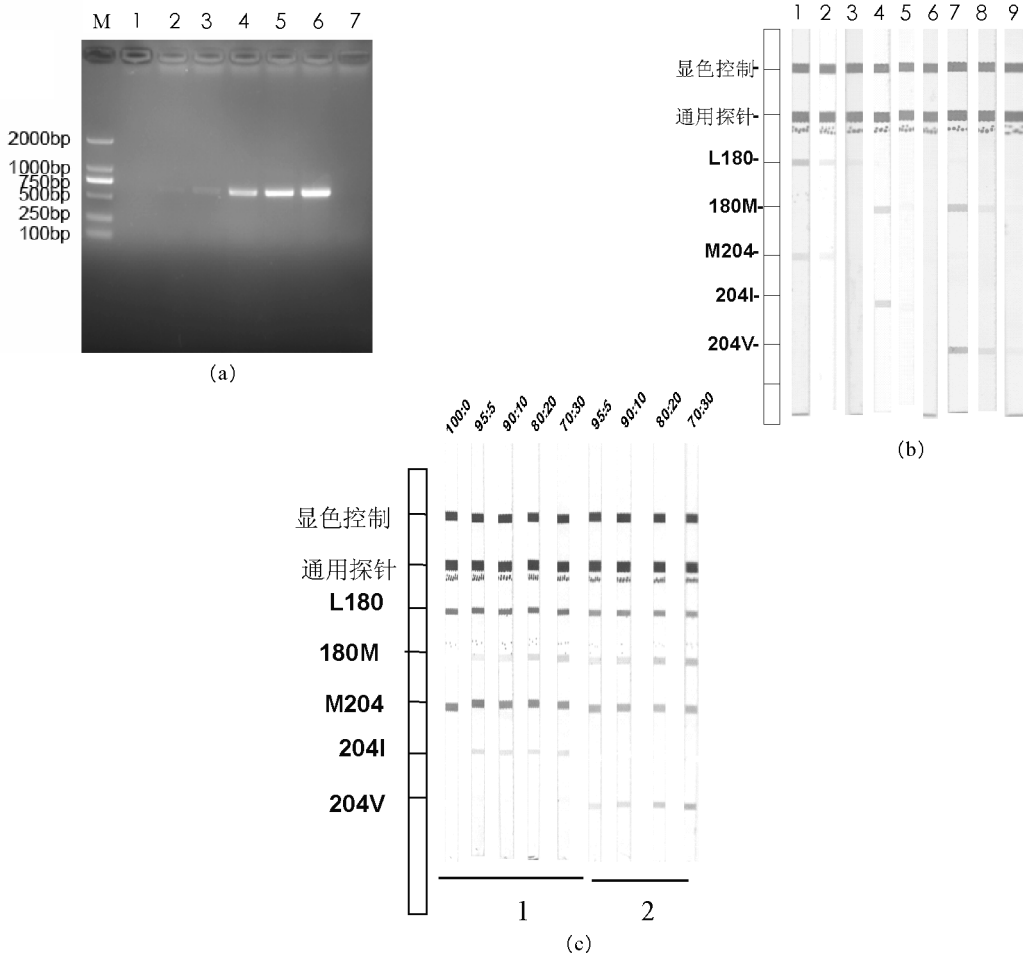
3: 180M/204V PCR 产物

L180-20C, M204-5C, 204I-5C,

204V-5C, 56 °C 30 min, 抗体浓度为 1:5 000

图 4 拉米夫定耐药线性杂交条件优化及特异性检测

序法检出 L180 位点和 M204 位点共 105 个, RLP 的对野生位点检测准确性为 98.09%(103/105). RLP 检出 180M 位点、204I 位点和 204V 位点共 43 个, 与测序法其检测结果一致, RLP 对耐药位点检测准确性为 100%. RLP 检出混合型(L180M、M204I/V)位点 4 个, 而测序法检出混合型 2 个, 对与测序法不同的两例血清进行 T 载体克隆, 再进行测序, 其结果与 RLP 检测结果一致(表 2).



a. 巢式 PCR 扩增不同拷贝数样本: 1~7 泳道为拷贝数分别为 10^3 copy/ml~ 10^8 copy/ml 的质粒;
 b. 不同浓度标准质粒 PCR 产物: 1~3 为野生型质粒 PCR 产物, 4~6 为 180M/204I 质粒 PCR 产物, 7~9 为 180M/204V 质粒 PCR 产物; 1、4、7: 10 ng/mL, 2、5、8: 1 ng/mL, 3、6、9: 0.1 ng/mL;
 c. 野生型与突变型不同比例杂交结果. 1: 野生型与 180M/204I 混合物; 2: 野生型与 180M/204V 混合物.

图 5 拉米夫定反向线性杂交灵敏度检测

表 2 反向线性探针检测临床样本结果

编码	反向线性杂交			测 序		
	野生型	突变型	混合型	野生型	突变型	混合型
180	56	17	2	58	17	0
204	47	26	2	47	26	2
Total	103	43	4	105	43	2

3 讨 论

目前, 全球有 3.5 亿人为慢性 HBV 携带者, 其中我国慢性 HBV 携带者近一亿人. HBV 感染不仅可导致急、慢性病毒性肝炎, 而且约 20%~30% 感染者因 HBV 相关疾病死亡. 我国每年用于 HBV 感染患者

的医疗和保健费用高达 1 000 亿人民币, HBV 感染是危害人民健康和造成国民经济损失最严重的疾病之一^[10-12].

拉米夫定是最早用于临床的主要核苷类似物, 其抗病毒作用是通过作用于 HBV 逆转录酶, 在细胞内磷酸化为三磷酸酯形式结合在病毒 DNA 链的 3'端. 拉米夫定用于治疗慢性乙肝患者相对其它核苷(酸)类似物更易产生耐药, 用药后第 1 年至第 4 年, 其耐药发生率分别是 14%, 38%, 49%和 66%^[13-14], 严重影响慢性乙肝患者的治疗.

反向线性探针杂交是先将已知探针分别点到硝酸纤维素膜或尼龙膜上, 与 5'端标记生物素引物的 PCR 扩增的产物杂交, 再经相应的显色反应就能显出杂交信号. PCR 是否有效扩增、探针固定方法、杂交温度、时间、抗体浓度等是影响检测方法灵敏度和特异性的重要因素.

本实验采用半巢式 PCR 可有效扩增 10^3 拷贝/ml 的 DNA. 在合成的寡核苷酸探针两端采用酶学的方法加上寡聚多胸腺嘧啶(dC)的尾, 采用紫外线照射铰链和高温烘烤相结合的方法增加了探针固定效率. 经过优化, 确定探针 L180-20C, M204-5C, 204I-5C, 204V-5C、杂交温度为 56 °C、杂交时间 30 min、抗体浓度为 1 : 5 000 信号强度最好, 且无非特异性条带出现.

同时, 在探针序列设计上采用了简并的方法, 与 INNO-LiPA 试剂盒相比, 既减少了探针的数量, 又保证了试剂条对同一位耐药点多种突变形式的检测, 检测结果简洁、直观. RLP 检测程序经过优化后, 无须预杂交, 其检测时间相对 INNO-LiPA 检测试剂盒更快, 检测仅需 2 h 左右.

通过对 86 例临床样本的 RLP 检测方法检测, 其灵敏度为 100%, RLP 检测结果与测序法进行比较, RLP 的对野生位点检测准确性为 98.09%, 对耐药位点检测准确性为 100%. RLP 检测灵敏高, 当 PCR 产物为 1 ng/ml, 或当突变型占野生型比例为 5%时, RLP 检测方法可有效检出. 根据克隆测序证实, RLP 对混合型耐药位点的检测比测序法更好.

总之, 本实验所建 RLP 杂交检测方法检测 HBV 拉米夫定耐药灵敏、准确、简洁、快速, 是 HBV 拉米夫定治疗有效的监控工具, 便于基层单位推广使用.

参考文献:

- [1] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Chronic Hepatitis B [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(2): 227-242.
- [2] LAI CL, DIENSTAG J, SCHIFF E, et al. Prevalence and Clinical Correlates of YMDD Variants During Lamivudine Therapy for Pa-tients with Chronic Hepatitis B [J]. *Clin Infect Dis*, 2003, 36: 687-696.
- [3] SHEPARD C W, SIMARD E P, FINELLI L, et al. Hepatitis B Virus Infection: Epidemiology and Vaccination [J]. *Epidemiol Rev*, 2006, 28: 112-125.
- [4] HUA R. Rapid Detection of the Hepatitis B Virus YMDD Mutant using TaqMan-minor Groove Binder Probes [J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 395(1-2): 151-4.
- [5] ALI M M. Comparative Evaluation of INNO-LiPA HBV Assay, Direct DNA Sequencing and Subtractive PCR-RFLP for Genotyping of Clinical HBV Isolates [J]. *Virolog J*. 7: 111.
- [6] LOK A S. Monitoring Drug Resistance in Chronic Hepatitis B Virus (HBV)-infected Patients During Lamivudine Therapy: Evaluation of Performance of INNO-LiPA HBV DR assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(10): 3729-34.
- [7] SHEPARD C W. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination [J]. *Epidemiol Rev*, 2006, 28: 112-25.
- [8] ARSLAN U, URAL O, FINDIK D. YMDD Motif Variants Detected by Lino-Lipa HBV DR Assay in Chronic Hepatitis B Patients During Lamivudine Therapy [J]. *Mikrobiyol Bul*, 2008, 42(3): 445-50.
- [9] ABERLE S W. Comparison of Sequence Analysis and the INNO-LiPA HBV DR Line Probe Assay for Detection of Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus Strains in Patients Under Various Clinical Conditions [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(5): 1972-4.

- [10] GANEM D, PRINCE AM. Hepatitis B Virus Infection—Natural History and Clinical Consequences [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(11): 1118—29.
- [11] LU FM, ZHUANG H. Management of Hepatitis B in China [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(1): 3—4.
- [12] LOK AS, LAI CL, LEUNG N. Long-term Safety of Lamivudine Treatment in Patients with Chronic Hepatitis B [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(6): 1714—22.
- [13] 姚光弼, 崔振宇, 姚集鲁, 等. 国产拉米夫定治疗 2200 例慢性乙型肝炎的 IV 期临床试验 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11(2): 103—108.
- [14] 姚光弼, 王宝恩, 崔振宇, 等. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎三年疗效观察 [J]. *中华内科杂志*, 2003, 42(6): 382—387.

Reverse Line Probe Hybridization Assay for Detection of Lamivudine-Resistant Chronic Hepatitis B Virus

LAI Guo-qi^{1,2}, ZHANG Wen-lu¹, HU Yuan¹,
TANG Hong¹, ZHANG Lei¹, XIE Su-lan¹,
PAN Yue², WEI Li-wen², HUANG Ai-long¹

1. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective: To establish a simple, rapid, sensitive and accurate reverse line probe (RLP) method for the detection of chronic HBV (hepatitis B virus) lamivudine-resistant locus. Methods: Based on the gene sequence of HBV wild-type and lamivudine-resistant drug, universal probe, specific probe of 3', 5' added poly-C and primers of 5' labeled biotin were designed. The specific probes were fixed on the nitrocellulose membrane linear; so as to make HBV PCR amplification products hybridize with the probes. By optimizing the hybridization conditions, a reverse line probe hybridization test method was established, which was then used to detect 86 chronic hepatitis B patients in Chongqing, and the results were compared with those of the direct sequencing method. Results: On the condition that HBV DNA in the serum had more than 103 copies/ml, it could be amplified effectively by semi-nested PCR. At the same time, when cDNA was more than 1ng/ml or the mutant proportion was more than 5% in wild-type of serum samples, lamivudine-resistant to chronic hepatitis B virus could be effectively detected by the new RLP hybridization method. The sensitivity in 86 clinic cases was 100% (86/86). The detection accuracy of the wild type and the drug resistant type was 98.09% (103/105), 100% (43/43), respectively. Conclusions: The reverse linear probe hybridization method to HBV lamivudine resistance is convenient, sensitive and accurate. It is an effective monitoring tool for HBV lamivudine therapy and suitable for clinical application.

Key words: reverse line probe hybridization; hepatitis B virus; lamivudine