

技术方法

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.12.019

高通量测序检测拉米夫定抗乙肝病毒治疗的耐药突变

滕士阶¹, 周彦¹, 王文军¹, 郭晓霞², 冯岗², 孙同运²

(连云港市第二人民医院 1. 检验科; 2. 消化科, 连云港 222023)

【摘要】目的:建立一种高通量、快速检测拉米夫定耐药突变的新方法,指导临床抗病毒治疗药物的选择。方法:选取 150 例慢性乙型肝炎患者血清标本为研究对象,乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV) DNA 定量结果均阳性(拷贝数 $\geq 10^3$ copies/ml),设计针对聚合酶 P 区的扩增引物,经 PCR 扩增及磁珠分离,制备焦磷酸测序单链模板,并在 PyroMark ID 遗传分析系统上进行焦磷酸测序,检测拉米夫定耐药突变位点。结果:PCR 扩增得到 HBV P 区产物,焦磷酸测序检测突变频率具有极高的灵敏性、特异性、稳定性的高通量的特征且与拉米夫定用药时间存在相关性。用药时间越长,突变率越高,易出现耐药。结论:新型、高通量焦磷酸测序法用于拉米夫定耐药突变检测,能满足临床批量用药检测及治疗方案设计的需要。

【关键词】焦磷酸测序;乙型肝炎病毒;拉米夫定;耐药

【中国图书分类法分类号】K826.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-01-09

Determination of Lamivudine-resistant mutation against hepatitis B virus via high-throughput sequencing

TENG Shijie¹, ZHOU Yan¹, WANG Wenjun¹, GUO Xiaoxia², FENG Gang², SUN Tongyun², ZHANG Zhexiong¹
(1. Department of Laboratory; 2. Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Lianyungang)

【Abstract】Objective: To establish a high-throughput method which can rapidly detect Lamivudine-resistant mutation against hepatitis B virus (HBV) to guide clinical medication. Methods: Serum samples of 150 patients with chronic hepatitis B (CHB), whose quantitative HBV DNA results were positive (copy number $\geq 10^3$), were determined by pyrosequencing for detecting Lamivudine-resistant mutational site via PyroMark ID genetic analysis systems. In order to prepare single-stranded template of pyrosequencing, samples were amplified by nested PCR and were separated by magnetic bead and amplification primer of the polymerase in P region was designed. Results: HBV P region products were attained by amplified PCR and mutation frequencies of pyrosequencing were characterized by high sensitivity, specificity, stability and were in correlation with Lamivudine-treatment time. With the increase of Lamivudine treatment time, mutation frequencies and drug resistance were increased. Conclusions: High-throughput pyrosequencing may meet the needs of clinical drug testing and design of treatment protocols, which can detect Lamivudine-resistant mutation of HBV in patients treated with Lamivudine.

【Key words】pyrosequencing; hepatitis B virus; Lamivudine; resistance

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染是我国常见的慢性传染性疾病,其不仅可以引起急性肝炎和慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B, CHB),还可进一步发展成为肝硬化、原发性肝癌和终末期肝功能衰竭,所以早期抗病毒治疗是临床医师进行 CHB 治疗的关键。抗病毒药物——核苷类药物拉米夫定的规范使用是国际公认的最有效的治疗方案之一,但拉米夫定治疗过程中易诱导的基因突变,产生耐药性,直接导致该治疗策略的失败或疗效的

显著下降,甚至进一步出现和加重肝脏的活动性病变。因此,方便、快速、准确的检测 HBV 相关耐药位点变异发生情况,适时选择药物和改变治疗方案,已经成为重点和关键。被称为检测基因突变金标准的 DNA 测序法,费时、费力且费用相对较高。而直接测序法对低含量的病毒及混合突变型病毒缺乏灵敏性,对野生、突变混合型 and 不同突变型混合存在的病毒,大多仅检测到优势株^[1,2]。因此,开发一种准确、快速、操作方便和价格低廉的 HBV 拉米夫定耐药点突变监测方法变得尤为重要且具有重要的临床指导意义。

作者介绍:滕士阶(1972-),男,副主任技师,
研究方向:临床免疫学。

通信作者:周彦,女,教授, Email:13511560466@163.com。

1 材料与方法

1.1 检测位点

目前国内外临床公认,且美国食品和药品管理局(Food and drug administration,FDA)批准用于治疗 HBV 的核苷(酸)类似物拉米夫定耐药突变相关位点(表 1)。

表 1 HBV 的核苷(酸)类似物拉米夫定耐药突变相关位点

Tab.1 Related sites of drug resistance mutations of HBV nucleoside (acid) analogue Lamivudine

位点	氨基酸名称	碱基位点	野生型碱基序列	突变型碱基序列
rtV173L	缬氨酸-亮氨酸	646-648	GTG	TTG、CTG
rtV180M	亮氨酸-甲硫氨酸	667-669	TTG、CTG	ATG
rtM204V/I	甲硫氨酸-异亮氨酸/缬氨酸	739-741	ATG	ATT、GTG

1.2 方法

1.2.1 研究对象 选择 2008 年 4 月至 2011 年 12 月连云港市第二人民医院 CHB 患者标本 150 例,诊断符合 2000 年西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》中的诊断标准,血清标本储存于-70℃待测。

1.2.2 血清 HBV-DNA 的抽提 血清标本复溶后,取 50 μl,加入 50 μl 浓缩液,离心半径 5 cm,13 000 r/min 离心 10 min,弃去上清;往沉淀中加入 50 μl 裂解液,煮沸 10 min;离心半径 5 cm,13 000 r/min 离心 10 min,上清作为 PCR 模板用于检测。

1.2.3 仪器及设备 定性 PCR 扩增仪(朗科 M96G);焦磷酸测序仪(瑞典 Biotage 公司 PyroMark™ ID 遗传分析系统);瑞典 Pyrosequencing AB 公司的 PyroMark™ ID 遗传分析系统;进行各突变位点的突变分析,用仪器自带的 PSQ™96 evaluation AQ software 程序统计突变频率。

1.2.4 引物设计和合成 以 HBV 全序列(GenBank 序列号:AF100309)为参照,针对 P 区的位点,参考引物设计原则,运用仪器配套的软件 Assay Design SW 在目的区域两端保守区域设计 PCR 引物及测序引物(表 2),P 区片段 PCR 扩增条件如下:50 μl 反应体系中 10×TaqGold Buffer 5 μl,10 mmol/L dNTPs 2 μl,25 mmol/L MgCl₂ 5 μl,两外侧引物 HBVP-OUTF 和 HBVP-OUTR 各 0.5 μl,TaqGold 聚合酶(5 U/μl)0.3 μl,加超纯水至 50 μl 总体积,标本先经 94℃变性 5 min,然后 30 个循环(94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 30 s),再经 72℃延长 10 min。第 2 次 PCR 取第 1 次 PCR 产物 2 μl 作为模板,引物换为两内侧引物 HBVP-INF 和 HBVP-INR,PCR 温度条件同第 1 次 PCR,40 个循环扩增,每一 HBV 血清标本平行跑 3 管。

1.2.5 检查 PCR 产物扩增效果 取 10 μl PCR 扩增产物,用 1.5%琼脂糖凝胶电泳 15 min,在凝胶成像仪中检查扩增效果。

1.2.6 PCR 产物的焦磷酸测序 用瑞典 Pyrosequencing AB 公司的 PyroMark™ ID 遗传分析系统进行各突

变位点的突变分析。用仪器自带的 PSQ™96 evaluation AQ software 程序统计突变频率。

表 2 HBV 的核苷(酸)类似物拉米夫定耐药 P 区引物设计

Tab.2 P region primer design of HBV nucleoside (acid)

analogue Lamivudine		
位点	引物	序列
P 区	HBVP-OUTF	AGGTATGTTG;CCCGTTTGTCTC
	HBVP-OUTR	GGCCTTCTAAGTTGCGAG
	HBVP-INF	CACYTGATATCCCATCCCATC
	B-HBVP-INR	B-AATTCITTTGAC;ATACTTTCTTTTCGCAA
	S1	CCTGGGCTTTTCGCAA
	S2	GCCTCAGTCCCTTCTC
	S4	CCCACTGTGTGGCTT

1.3 高通量焦磷酸检测 HBV 拉米夫定耐药突变的敏感性

将血清标本按照 HBV-DNA 定量值分别为 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³ 拷贝/ml 和 <5×10² 拷贝/ml 的分组,分别进行病毒核酸提取,PCR 扩增,并进行序列测定。记录能作出 P 区、突变检测所需要的最少模板量。

1.4 高通量焦磷酸检测 HBV 拉米夫定耐药突变的特异性

150 份检测标本用焦磷酸测序技术进行突变检测,用基因芯片方法同期进行测序记录结果,分析其符合程度。

1.5 高通量焦磷酸测序法批量拉米夫定耐药突变检测的平行性

分析为了验证本试验方法的可靠性,分别选用了 DNA 定量不同但已知拉米夫定耐药标本 50 例和空白对照血清 30 例,进行批量化检测时的重复性实验,以观察临床批量拉米夫定耐药突变检测的平行性分析的可靠性。

1.6 HBV 拉米夫定耐药突变与临床用药时间相关性

为将高通量焦磷酸检测 HBV 拉米夫定耐药突变检测进一步将其应用于临床,选择了拉米夫定长期治疗的血清标本、未经拉米夫定治疗血清标本和拉米夫定治疗刚好 6 个月的血清标本分别进行了高通量焦磷酸测序,分析其相关性。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行卡方检验。检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 高通量焦磷酸检测 HBV 拉米夫定耐药突变

在 150 份检测标本中(其 HBV-DNA 定量值为 >10³ 拷贝/ml),100 份均正在接受拉米夫定治疗,50 份未接受过拉米夫定治疗或曾经接受过拉米夫定治疗好转患者。其中 rtV180M 突变 42 例,rtM204V/I 突变 62 例,另有 4 例 rtV173L 突变。接受过拉米夫定长期治疗突变率为 100%,另有 8 例突变,通过查找病例档案,发现为接受过拉米夫定治疗好转的患者或改用其他药物治疗患者。未接受过拉米夫定治疗患者标本,高通量焦磷酸检测率 0%。检测出突变的不同类型见表 3。

表 3 高通量焦磷酸检测 HBV 拉米夫定耐药突变

Tab.3 Drug resistance mutations of HBV Lamivudine detected by high throughput pyrosequencing

突变点	野生型	变异型	混合型	合计
180位点	25	12	5	42
204位点	28	32	2	62
173位点	3	1	0	4
合计	56	45	7	108

2.2 高通量焦磷酸检测 HBV 拉米夫定耐药突变的敏感性

结果显示,可满足精确序列测定所需最少血清病毒含量为 10^3 拷贝/ml,低于该含量时信号强度低,分辨率差,无法得出可靠结果。

2.3 高通量焦磷酸检测 HBV 拉米夫定耐药突变的特异性

与基因芯片法检测结果全部符合,符合率为 100%。

2.4 高通量焦磷酸测序法批量拉米夫定耐药突变检测的平行性

结果显示:在 30 次的重复检测实验中,血清突变标本的突变检出率和可重复性均为 100%(30/30),而 30 例次的空白对照血清标本中,均未检出突变。血清标本有极高的检出率及可重复性。

2.5 HBV 拉米夫定耐药突变与临床用药时间相关性

未经治疗和用药仅半年的患者血清标本未检测出拉米夫定耐药突变点,而大于 7 个月检测率高达 100%,具体位点突变率见表 4。

表 4 HBV 拉米夫定耐药突变与临床用药时间相关性

Tab.4 Correlation between clinical treatment time and drug resistance mutations of HBV Lamivudine

经拉米夫定 治疗时间	标本 例数	180位点突变率 (%)	204位点突变率 (%)
未经治疗	20	0	0
0~6 个月	22	0	0
7 个月	108	38.89*	57.41*

注:*,与前 2 项相比, $P<0.05$

3 讨 论

HBV 耐药初期,突变的 DNA 水平可能较低,因此临床上需要能检测低水平突变病毒的准确、灵敏的方法,早期指导临床调整用药及治疗方案。

焦磷酸测序技术是近几年发明的一种实时 DNA 序列分析技术^[3,4],是一种基于合成的非电泳测序技术,可计算变异株比例,在变异株比例较低时即可检出耐药变异,可作为患者耐药监测中一种早期发现耐药变异的方法^[5]。该技术的特点是不需要进行电泳,片段也不需要荧光标记,操作极为简便。PyroMark™ ID 遗传分析系统^[6]是一个理想的遗传分

析技术平台,它既可进行 DNA 序列分析,又可进行基因序列分析的 单核苷酸多态性检测及等位基因频率测定,序列分析简单,具有自动化、高通量、高准确性等特点,而且比传统的方法如单链构象多态性、限制性内切酶片段长度多态性、双脱氧测序等更省时、省力和省钱,是疾病相关基因突变分析的一个强有力的工具。

基于焦磷酸测序技术的这一方法的建立,焦磷酸测序系统自带的频率分析模块^[7],PCR 后可在 2 h 内完成 96 份测试标本的自动化分析,在测序完成后,即自动完成 96 个标本相关位点突变频率计算,可轻松导出测序报告。准确统计突变频率,具有更高的通量、更准确的结果及快速简便的操作,一次性检出多个突变位点及自动化临床标本检测,与相关文献报道一致。

拉米夫定耐药的主要原因为 HBV P 区突变。根据其特点本研究采用巢式 PCR,结果更准确,纯度更高。在高通量焦磷酸检测 HBV 拉米夫定耐药突变中不仅可以检测出野生型和变异型,混合型也可检测出,此外还检测出 173 位点突变 4 例。血清标本当病毒含量在 10^3 拷贝/ml 以上时,突变检出率是 100%,特异性较高,重复率为 100%。相关研究表明^[8,9]:拉米夫定用药 6~8 个月以上会出现耐药病毒株。以此为 HBV 拉米夫定耐药突变与临床用药时间相关性分组点,分析不同用药时间基因突变率变化,用于检测标本量少,因此不排除有小于 6 个月用量,而有相关耐药基因出现点突变。焦磷酸测序技术,在基因图谱的基础上为临床拉米夫定用药时间提供辅助手段。

综上所述,焦磷酸测序技术应用于筛选研究病毒基因的突变有高通量、自动化程度高和结果准确特点,该方法可检测出拉米夫定耐药突变相关位点 173、180、204 位点的突变,且同时检测 96 例标本重复性好,能够满足临床上大规模检测需要,为早期指导临床用药和改变治疗方案提供有力工具,对于控制疾病的进程和促进临床治疗非常有意义。

参 考 文 献

- [1] Liu K Z, Hou W, Zumbika E, et al. Clinical features of chronic hepatitis B patients with YMDD mutation after lamivudine therapy [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2005, 6(12):1182-1187.
- [2] 范 峰, 鲁艳芹. 实时定量 PCR 检测乙型肝炎病毒拉米夫定耐药突变及其与临床指标的相关性 [J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 9

技术方法

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.12.020

灰色模型在肺癌死亡率预测中的应用

周春磊¹, 周敏²

(1. 重庆市疾病预防控制中心消毒与媒介生物控制所, 重庆 400042; 2. 自贡市疾病预防控制中心疾控科, 自贡 643000)

【摘要】目的: 运用灰色模型(Grey model, GM)预测自贡市肺癌死亡率, 探索数据波动较大的情况下, 适用的 GM 预测方法。方法: 根据自贡市 1985–2009 年肺结核发病率数据分别建立常规灰色模型[Conventional GM(1, 1)], 动态灰色模型[Dynamic GM(1, 1)]和新陈代谢灰色模型[Metabolizing GM(1, 1)], 选择合适肺癌死亡率的预测模型并进行外推预测。结果: 检验性预测中, 常规 GM(1, 1)预测精度为 2 级, 动态 GM(1, 1)和新陈代谢 GM(1, 1)预测精度为 1 级, 预测值相对误差依次为 26.00%、5.07% 和 4.06%。采用新陈代谢 GM(1, 1)对自贡市肺癌死亡率进行外推预测, 2011–2014 年自贡市肺癌死亡率分别为 81.31/10 万、95.88/10 万、113.06/10 万、133.32/10 万。结论: 针对自贡市肺癌死亡率数据波动的情况, 采用新陈代谢 GM(1, 1)进行预测是比较适用的方法。

【关键词】灰色模型(1, 1); 灰色模型 GM(1, 1); 新陈代谢灰色模型(1, 1); 肺癌; 预测

【中国图书分类法分类号】R181.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2011–12–15

Application of grey model in forecasting incidences of lung cancer

ZHOU Chunlei¹, ZHOU Min²

(1. Department of Media Biological Control and Disinfection, Chongqing Center for Disease Control and Prevention; 2. Department of Disease Control, Zigong Center for Disease Control and Prevention)

【Abstract】Objective: To apply the grey model (GM) in predicting the incidences of lung cancer in Zigong city and to explore the applicable predictive method with fluctuant data. Methods: The conventional GM(1, 1), dynamic GM(1, 1) and metabolic GM(1, 1) were established respectively based on the incidences of lung cancer in Zigong city from 1985–2009. The most applicable mortality forecasting model was applied to do the predication. Results: The results of the prediction showed that the predictive precision of the

作者介绍: 周春磊(1986–), 男,
研究方向: 传染病控制。

(21): 806–808.

Fan F, Lu Y Q. Determination of Lamivudine-resistant mutation of hepatitis B virus by realtime quantitative PCR and analysis of relationship between mutation and clinical indexes[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2008, 9(21): 806–808.

[3] Shendure J, Mitra R D, Varma C, et al. Advanced sequencing technologies: methods and goals[J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(5): 335–344.

[4] 徐保红, 李秀娟, 杨芳, 等. PCR-焦磷酸测序法快速鉴定副溶血性弧菌[J]. 预防医学情报杂志, 2011, 27(1): 78–80.

Xu B H, Li X J, Yang F, et al. Detection of Vibrio parahaemolyticus by PCR and Pyrosequencing[J]. Journal of Preventive Medicine Information, 2011, 27(1): 78–80.

[5] 郑金梅, 赵龙凤, 杨松, 等. 焦磷酸测序法在 HBV 阿德福韦酯耐药检测中的应用[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(10): 1199–1204.

Zheng J M, Zhao L F, Yang S, et al. Application of pyrosequencing in detection of HBV resistance to adefovir dipivoxil[J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2010, 35(10): 1199–1204.

[6] 倪红兵. 焦磷酸测序技术及其应用进展[J]. 国外医学·临床生物

化学与检验学分册, 2005, 26(9): 600–602.

Ni H B. Progress in pyrosequencing and its application[J]. Foreign Medical Sciences. Section of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine, 2005, 26(9): 600–602.

[7] 虞闰六, 任绪义, 王敏. 乙肝病毒常见耐药位点突变高通量检测方法的建立与应用[J]. 实用检验医师杂志, 2010, 9(2): 137–142.

Yu R L, Ren X Y, Wang M. Establishment and application of a high-throughput method for detection of HBV drug resistant situs mutation[J]. Chinese Journal of Laboratory Pathologist, 2010, 9(2): 137–142.

[8] Punia P, Cane P, Teo C G, et al. Quantitation of hepatitis B lamivudine resistant mutants by realtime amplification refractory mutation system PCR[J]. J Hepatol, 2004, 40(6): 986–992.

[9] Yang Z J, Tu M Z, Liu J, et al. Comparison of amplicon sequencing, pyrosequencing and realtime PCR for detection of YMDD mutants in patients with chronic hepatitis B[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(44): 7192–7196.

(责任编辑: 关蕴良)