

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000181

应用肽核酸反向杂交技术检测 HBV 阿德福韦耐药突变株

单雪峰, 谢素兰, 黄爱龙, 胡 源

(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)

【摘要】目的:建立一种肽核酸(peptide nucleic acid, PNA) 反向杂交技术, 用于检测乙肝病毒阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)常见耐药突变位点。**方法:**利用反向杂交技术, 设计出特异性的 PNA 探针, 与 PCR 扩增后带有生物素标记的样本进行杂交; 通过对探针浓度, 杂交温度和时间等条件的优化建立起最佳反应条件。应用该技术检测了临床 ADV 治疗慢性乙肝患者的 72 例血清样本, 与测序法比较了其检测的准确性。**结果:**(1)通过共价结合能够将 PNA 探针固定在尼龙膜上, 特异性检测 ADV 常见耐药突变位点。(2)与直接测序法相比, PNA 反向杂交技术检测准确性为 97.88%。**结论:**通过优化杂交反应, 建立起快速、灵敏的检测乙肝病毒 ADV 常见耐药突变位点的 PNA 反向杂交技术。

【关键词】肽核酸; 反向杂交; 乙型肝炎病毒; 阿德福韦酯

【中图分类号】R364.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-05

Application of peptide nucleic acid reverse hybridization technology in detecting adefovir-resistant mutations in hepatitis B virus

Shan Xuefeng, Xie Sulan, Huang Ailong, Hu Yuan

(Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To detect adefovir-resistant mutants of hepatitis B virus (HBV) using peptide nucleic acid (PNA) probes. **Methods:** Specific PNA probes were designed for genotypes B, C, D, which were then hybridized with biotinylated PCR products. Different hybridization factors such as probe concentration, hybridization temperature and time were investigated to establish the optimization conditions. Finally, 72 hepatitis B virus (HBV) clinical samples with adefovir dipivoxil treatment were investigated using PNA hybridization assay. Its usefulness was validated by comparing with sequencing data. **Results:** (1) PNA probes could be fixed on the membrane by cross link and used for reverse hybridization. (2) Complete concordance of PNA hybridization assays was 97.88% with direct sequencing. **Conclusion:** We develop an assay using PNA probes to detect adefovir-resistant mutants of HBV.

【Key words】peptide nucleic acid; reverse hybridization; hepatitis B virus; adefovir dipivoxil

乙型肝炎病毒是引起人类急慢性肝炎的重要病原体之一, 严重危害人们的健康。阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)是治疗慢性乙型肝炎的一种常用核苷类似物(nucleotide analogs, NAs)药物, 能够有效降低病毒载量、显著阻断慢性乙型肝炎患者发展为肝硬化和肝细胞癌等^[1]。但由于耐药突变

株的出现, 效果常常不能持久, 因此需要建立一种快速、灵敏、可靠并能特异性检测 ADV 耐药突变株的方法, 从而有助于更好地监测病毒耐药性的动态发生, 指导和改善临床医师的治疗, 这一点已达成普遍共识^[2]。

肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)是 1991 年由丹麦科学家 Nielsen 首次设计并合成的一种 DNA 类似物分子^[3], 属人工合成的第三代反义核酸。其特殊的理化性质和杂交特性以及在对基因调控方面的强大功能, 使得它在分子生物学研究、肿瘤和基因治疗等方面显示出巨大的应用潜力^[4-5]。

目前尚无 PNA 结合在固定基质尼龙膜用于监

作者简介: 单雪峰, Email: xfshan0325@163.com,

研究方向: 生物制药与生物医用材料。

通信作者: 胡 源, Email: tottyhy@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81101310); 教育部博士点新教师基金资助项目(编号: 20115503120001); 重庆市教委转化成果资助项目(编号: KJzh11201)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000181.html>

测 HBV 耐药突变的报道,本课题利用 PNA 的优势,建立起一种能够快速、灵敏的监测 ADV 常见耐药突变位点(A181V/T 和 N236T)的 PNA 反向杂交技术。

1 对象与方法

1.1 研究对象

从重庆医科大学附属第一医院感染科获得 72 例 ADV 单独治疗慢性乙型肝炎患者 1 年的血清样本,按照临床样本库的标准进行各项检测指标采集,保存于-80℃冰箱备用。

1.2 材料和试剂

大肠杆菌 DH5 α 由本实验室提供,带有 ADV 耐药突变的标准质粒 SUMO-RTWT, SUMO-MT1 (181T+236T), SUMO-MT2 (181V+236T) 由本实验室前期构建^[6],质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自德国 QIAGEN 公司,PCR 产物纯化试剂盒购自 Roche 公司,带负电的尼龙膜购自美国 PALL 公司,其余试剂为国产分析纯。

高保真 pfu DNA 聚合酶、Primer STAR 酶等购自大连宝生物有限公司,核酸外切酶 Exonuclease 购自 NEB 公司,生物素抗体-碱性磷酸酶(AP)购自美国 Promega 公司,固体 NBT 购自德国 Roche 公司,固体 BCIP 购自美国 AppliChem 公司。

1.3 引物与探针设计

从 NCBI 数据库中筛选 1 887 条 HBV DNA 序列用 Tree-view 软件进行基因型比对分析,构建 HBV 不同基因型的耐药图谱,在此基础上设计了扩增 HBV RT 区的通用引物 P1、P2,1 条通用探针和 5 条含有 ADV 耐药突变位点的特异性肽核酸探针。通用扩增引物 P1、P2 由美国 Invitrogen 公司合成,PNA 探针 N 端进行氨基化修饰,由韩国 PANAGENE 公司合成。

1.4 生物素标记的 HBV 目的片段扩增

以前期实验构建好的含有 ADV 耐药突变的标准质粒 SUMO-RTWT, SUMO-MT1 (181T+236T) 和 SUMO-MT2 (181V+236T) 为模板,通用引物 P1、P2 扩增出带有生物素标记的 HBV 目的片段。PCR 扩增条件:95℃ 4 min, 95℃ 30 s, 56℃ 40 s, 72℃ 50 s, 35 个循环。

1.5 PNA 反向杂交反应条件的优化

1.5.1 探针的固定 将带负电的尼龙膜用 0.1 mol/L 盐酸处理后,20% EDC 溶液活化。将 PNA 探针通过化学交联固定在膜上,膜条用 1×TBST(0.02 mol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 0.1% Tween, pH7.5)漂洗,然后用 0.1 mol/L NaOH 溶液漂洗,最后用去离子水漂洗 5 min, 4 次,风干待用。

1.5.2 杂交和显色 带生物素标记的 PCR 产物加入核酸外切酶,消化降解带磷酸基团的正链 DNA,从而得到带有生物素标记的负链 DNA 与固定在膜上的 PNA 探针于 50℃ 杂交 30 min,然后用 0.1 mol/L PBS+0.5 mol/L NaCl+0.1% SDS 于 50℃ 洗脱 30 min,然后加入生物素标记的碱性磷酸酶抗体,室温孵育 30 min,最后将膜浸入 NBT/BCIP 显色试剂,避光

显色 20 min 后,去离子水洗膜 5 次,终止反应,扫描后用 Quantity 软件分析光密度。

1.5.3 杂交条件的优化 分别进行探针浓度、杂交温度和抗体浓度等条件的优化,根据信号强度和特异性,选择最佳杂交条件。

表 1 扩增 HBV 含有 ADV 耐药突变的 PCR 引物和 PNA 探针

Tab.1 PCR primers and PNA probes for amplifying the HBV polymerase RT domain and ADV mutation sites

引物或探针	序列 (5'-3')	注释
引物:		
P1(570FP)	5'-TGTTGCTGTACAAAACCT-3'	5'端标记磷酸化
P2(1180RP)	5'-TCAGCAAACACTTGGCA-3'	5'端标记生物素
PNA 探针:		
通用探针	N-O-GAACCACTGAACAAATG-C	
A181	N-O-TCTTGGCTCAGTTTA-C	
181V	N-O-TCTTGGTTCAGTTTA-C	
181T	N-O-TCTCTTGACTCAGTTTA-C	
N236	N-O-ACATTTAAACCCTCACA-C	
236T	N-O-ACATTTAACCCCTCACA-C	

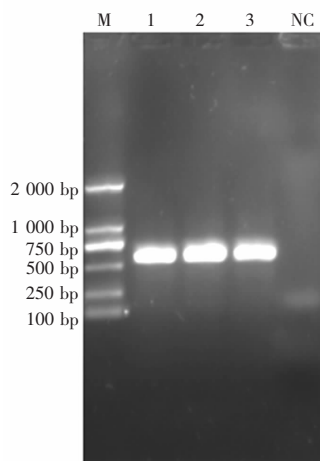
1.6 临床样本测序

为了验证 PNA 反向杂交技术检测 ADV 耐药突变位点的准确性,临床样本 PCR 扩增后通过直接测序法或构建到 pMD18-T 载体进行亚克隆测序。

2 结果

2.1 生物素标记的 HBV PCR 产物的扩增结果

用前期实验构建的含有 ADV 耐药突变位点的 3 个标准质粒用通用引物 P1、P2 扩增后,琼脂糖电泳在 610 bp 处右出现特异性条带,与预期片段大小一致(图 1)。



M. DNA marker; 1. SUMO-RTWT 扩增产物; 2. SUMO-MT1 扩增产物; 3. SUMO-MT2 扩增产物; NC. 阴性对照

图 1 目的片段 PCR 扩增

Fig.1 Target PCR products

2.2 杂交条件优化

将探针分别稀释成不同浓度杂交,结果(图 2)表明从 5 $\mu\text{mol/L}$ 开始,信号强度显著增加,随着探针浓度的增加,其信号强度不断增强,但在 40 $\mu\text{mol/L}$ 仅仅比 20 $\mu\text{mol/L}$ 信号强度增加 6.9%,表明 20 $\mu\text{mol/L}$ 为最佳的杂交探针浓度。

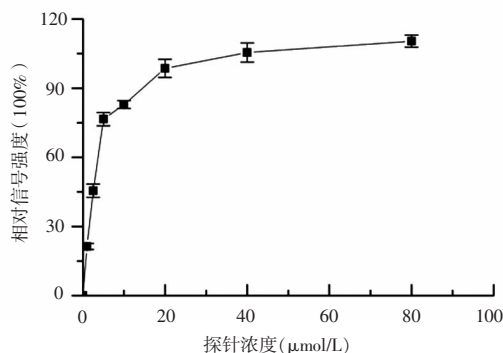
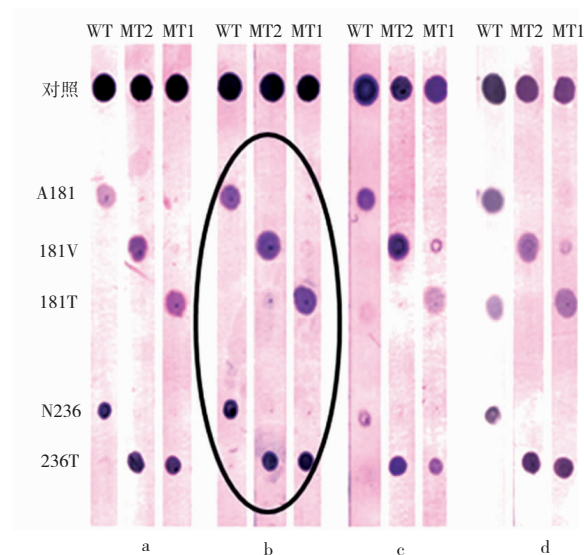


图 2 探针浓度优化

Fig.2 Optimization of probe concentration

在杂交温度的优化中,图 3 表明在 40 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 下存在着非特异性条带,而在 50 $^{\circ}\text{C}$ 以上无非特异性杂交,而 55 $^{\circ}\text{C}$ 杂交信号较弱,表明作为区分野生型和突变型时,50 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳杂交温度。



a. 55 $^{\circ}\text{C}$; b. 50 $^{\circ}\text{C}$; c. 45 $^{\circ}\text{C}$; d. 40 $^{\circ}\text{C}$

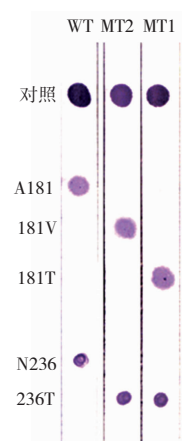
WT. 野生型 A181+N236; MT1. 181T+236T; MT2. 181V+236T

图 3 不同杂交温度优化

Fig.3 Optimization of hybridization temperature

2.3 检测方法的特异性

根据建立的最佳反应条件,采用标准质粒扩增后进行特异性检测,图 4 显示杂交背景清晰,与靶序列对应的探针位置处出现特异性斑点显色,没有交叉反应,表明该杂交体系可用于检测 ADV 耐药突变位点。



WT. 野生型 A181+N236; MT1. 181T+236T; MT2. 181V+236T

图 4 PNA 检测 ADV 标准耐药株

Fig.4 Optimized hybridization profiles for detecting ADV mutants with PNA

2.4 临床样本检测

72 份 ADV 单一疗法治的慢性乙肝患者血清样本中进行 PCR 扩增后,共有 71 例样本得到了阳性扩增,另有 1 例样本因为 PCR 未能扩增出阳性条带,说明该检测方法灵敏度为 98.61%(71/72)。进一步对这 71 份样本采用直接测序法与 PNA 反向杂交法检测结果进行比较,结果表明 PNA 反向杂交技术能够检测到样本中发生 181 位点突变为 5 例,236 位点突变为 7 例,而直接测序法样本中发生 181 位点突变为 3 例,236 位点突变为 6 例,即准确性为 97.88%(139/142),这 3 例不一致的位点通过亚克隆测序进行验证为混合型。

表 2 PNA 反向杂交技术与测序法的比较

Tab.2 Concordant results obtained from PNA hybridization assay and direct sequencing of 71 serum samples

耐药位点	PNA 反向杂交技术			直接测序		
	野生型	突变型	混合型	野生型	突变型	混合型
181	66	1	4	68	1	2
236	64	0	7	65	0	6
总计	130	1	11	133	1	8

3 讨论

检测 HBV 基因型耐药突变的方法较多,反向杂交法是一种成熟且运用广泛的分子检测方法^[7-8],具有简便、快速、灵敏和特异的特点,在检测基因突变、病原体及基因分型等领域都有很大的进展。但基于核酸的杂交技术存在着不足:核酸杂交形成的复合物很大程度上依赖于介质的离子强度,链间的斥力也会影响杂交的稳定性;核酸杂交对单碱基差

异的区分能力不够,使得其特异性不足,这些不足限制了基于核酸的反向杂交技术的大量使用。

PNA在杂交中具有明显的高度稳定性和对错配的分辨力使其在疾病基因诊断、点突变分析中作为杂交探针具有明显的优势,因此将 PNA 用于芯片探针来检测单碱基突变成为国内外目前的研究热点和重点^[9]。Choi 等^[10]研究发现在检测单碱基突变位点方面,PNA 芯片的检测信号强度是 DNA 芯片的 10 倍,而区分单碱基错配能力是 DNA 芯片的 2~37.3 倍。这些结果表明 PNA 芯片在检测疾病的分子分型或单碱基突变方面具有广阔的优势;韩国的 Park 课题组最近相继研究出检测人类乳头瘤病毒基因分型(human papillomavirus, HPV)和 HBV 耐药突变的 PNA 芯片^[11-12]。这些结果表明:PNA 作为探针来检测疾病的单碱基差异或进行病毒的分子分型具有更广泛的应用前景。

本研究利用 PNA 末端带有游离的氨基基团,首次通过化学交联的方法将 PNA 探针共价固定在带有负电的尼龙膜上,结合反向杂交技术可实现对样本的直接检测。由于中国大陆重要的基因型为 B、C 型和 D 型,因此本课题设计的 PNA 探针主要用于检测 B、C 型和 D 型的 ADV 常见耐药突变位点^[13],这样可简化结果的判读;同时通过核酸外切酶将双链 DNA 消化成单链 DNA 与探针杂交,可消除双链 DNA 引起的非特异性杂交,并通过对一系列反向杂交条件的优化建立起基于尼龙膜基质的 PNA 反向杂交技术,最后通过临床样本的评价表明 PNA 反向杂交技术能够检测 ADV 常见耐药位点,并且检测混合型的灵敏度高于直接测序法。

参 考 文 献

- [1] Dai CY, Chuang WL, Hsieh MY, et al. Adefovir dipivoxil treatment of lamivudine-resistant chronic hepatitis B[J]. *Antiviral Research*, 2007, 75(2): 146-151.
- [2] Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus(HBV)-infected patients during lamivudine therapy: evaluation of performance of INNO-LiPA HBV DR assay[J]. *Clin. Microbiol*, 2002, 40(10): 3729-3734.
- [3] Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, et al. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide[J]. *Science*, 1991, 254(5037): 1497-1500.
- [4] Uno T, Tabata H, Kawai T. Peptide-nucleic acid-modified ion-sensitive field-effect transistor-based biosensor for direct detection of DNA hybridization[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(1): 52-59.
- [5] Pellestor F, Paulasova P. The peptide nucleic acids, efficient tools for molecular diagnosis[J]. *Int J Molec Med*, 2004, 13(4): 521-525.
- [6] 谢素兰, 黄爱龙, 蔡雪飞, 等. 含阿德福韦酯耐药突变位点的 HBV 聚合酶逆转录酶区域的原核表达[J]. *生物制品学杂志*, 2011, 08(24): 893-897.
- [7] Niesters HG, Zoulim F, Pichoud C, et al. Validation of the INNO-LiPA HBV DR assay(version 2) in monitoring hepatitis B virus-infected patients receiving nucleoside analog treatment[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(3): 1283-1289.
- [8] Jardi R, Rodriguez-Frias F, Tabernero D, et al. Use of the novel INNO-LiPA line probe assay for detection of hepatitis B virus variants that confer resistance to entecavir therapy[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(2): 485-488.
- [9] Karkare S, Bhatnagar D. Promising nucleic acid analogs and mimics: Characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 71(5): 575-586.
- [10] Choi JJ, Jang M, Kim J, et al. Highly sensitive PNA array platform technology for single nucleotide mismatch discrimination[J]. *Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(2): 287-293.
- [11] Choi JJ, Kim C, Park H. Peptide nucleic acid-based array for detecting and genotyping human papillomaviruses[J]. *J. Clin Microbiol*, 2009, 47(6): 1785-1790.
- [12] Jang H, Kim J, Choi JJ, et al. Peptide nucleic acid array for detection of point mutations in hepatitis B virus associated with antiviral resistance[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(9): 3127-3131.
- [13] Villet S, Pichoud C, Billioud G, et al. Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure[J]. *J Hepatol*, 2008, 48(5): 747-755.

(责任编辑:冉明会)

欢迎订阅,敬请赐稿!