

技术方法

DOI: 10.11699/cyxh20130917

检测乙肝病毒 preS 基因常见突变位点的反向斑点杂交技术的建立

胥 彪¹, 杨致邦²

(1. 重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学基础医学院实验教学中心病原生物学与免疫学实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:利用反向斑点杂交(reverse dot blot, RDB)技术建立用于检测乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV) preS 基因常见突变位点的方法。**方法:**根据 HBV preS 基因变异中的第 35、39、48、155、165 位氨基酸突变, 分别设计寡核苷酸探针, 利用 RDB 技术对 38 例 HBV 患者突变位点进行检测, 并与测序结果进行比较。**结果:**与测序结果符合率达 100%。**结论:**RDB 技术可一次性筛查多个不同位点的突变, 方便快捷, 费用低, 对于临床进行 HBV preS 基因突变检测, 判断 HBV 感染患者的疗效及预后有一定意义。

【关键词】乙肝病毒; preS 基因; 突变位点; 反向斑点杂交技术

【中国图书分类法分类号】R512.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-02-24

Reverse dot blot assay in the detection of mutation sites of hepatitis B virus preS gene

XU Biao¹, YANG Zhibang²

(1. Department of Laboratory, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Laboratory of Pathobiology and Immunology, Experimental Teaching Center, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish a method to detect mutation sites of hepatitis B virus (HBV) preS gene by reverse dot blot (RDB). **Methods:** Oligonucleotide probes were designed according to the codon mutations at the 35th, 39th, 48th, 155th and 165th sites, respectively. Mutated sites from 38 patients with HBV were detected by RDB and were compared with the sequencing results. **Results:** Coincidence between RDB detection results and DNA sequencing was 100%. **Conclusions:** Detection of the preS gene mutation by RDB is a cost-effective, rapid and reliable method, which is of significance in clinical testing for HBV preS mutations and determining the efficacy of HBV infection and prognosis of patients.

【Key words】 hepatitis B virus; preS gene; mutation sites; reverse dot blot

乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)的 preS 基因表达与病毒的成熟、分泌及感染性有关, 其变异在疾病进程中的作用越来越受到重视^[1]。本实验根据反向斑点杂交法(reverse dot blot, RDB)的原理, 将 PCR 技术与反向杂交技术结合, 针对 preS 区常见的变异模式中突变的位点和性质, 设计 5' 端标记生物素的 preS 区 PCR 引物及多条寡核苷酸探针, 实现对多个突变位点的同时检测, 为 HBV preS 基因变异提供了一种较为快速实用的检测方法。

作者简介: 胥 彪, Email: xubiao1969@sina.com,

研究方向: 乙肝病毒的致病机制。

基金项目: 国家临床重点专科建设资金资助项目(编号: 财社 2010 [305]号)。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2009 年 3 月至 11 月重庆医科大学附属第一医院门诊和住院病人中, 确诊为 HBV 感染的患者 38 例(诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南 2005》), 年龄 18~73 岁, 男性 25 例, 女性 13 例, 其中无症状携带者(asymptomatic carrier, ASC) 13 例、慢性乙肝(chronic hepatitis B, CHB)患者 19 例, 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者 6 例, 抽取所有感染者静脉血, 枸橼酸钠抗凝, 分离血浆, -70 °C 冻存备用。

1.2 HBV preS 区基因扩增及序列分析

PCR 扩增 HBV preS 区全基因片段, 引物序列见表 1, 反应体系为 50 μl, 反应条件为 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环后, 72 °C 延伸

10 min。扩增产物送上海 invitrogen 公司直接测序。

表 1 HBV preS 区基因扩增引物序列
Tab.1 Primers of HBV preS gene for PCR

引物名称	引物序列(5'-3')	碱基位置	扩增子大小(bp)
preS-f3	AAACTACACGCGCGCTCA	2 788~2 807	630
preS-r3	CTGTAACACGAGCAGGGCTC	183~202	

1.3 RDB 所用探针的合成

根据文献报道的 preS 区中的 T 细胞识别位点^[2-3], 分别设计该范围内的 P35、P39、P48、P155、P165 共 5 条寡核苷酸探针(表 2), 5' 端标记氨基, 应用于 RDB 检测 HBV preS 区相应的 5 个基因突变位点。

表 2 RDB 所用探针
Tab.2 Probs used in RDB

探针名称	极性	序列(5'-3'), 5' 端标记氨基	碱基位置
P35	+	CTGCATTCAAAGCCAA	2 942~2 957
P39	+	GCCAACTCAGAAAATCC	2 953~2 969
P48	+	TCAACCCGCACAAGGA	2 981~2 996
P155	+	CCTGCTCAGAATACTGC	89~105
P165	+	CAATCTTATCGAGGACT	120~136

1.4 膜条的制备

1.4.1 膜条的活化 将尼龙膜剪成长条状置于玻璃皿中, 将 10% 的 EDC 溶液倒入其中, 充分淹没膜条 30 min, 取出用蒸馏水冲洗 3 次, 铺在滤纸上晾干。

1.4.2 探针的准备 先用超纯水将探针稀释成 100 pmol/μl, 再用 0.5 mol/L 的碳酸氢钠溶液(pH 8.4)稀释探针至 15 pmol/μl 备用。

1.4.3 点膜 每条探针吸取 2 μl 均匀地点在膜条上, 室温放置 15 min, 将膜条浸泡于 0.1 N 的氢氧化钠中摇动 5 min, 取出膜条用蒸馏水冲洗 3 次, 铺在滤纸上晾干。

1.5 RDB 的温度选择

用 ASC-1 和 CHB-13 标本的扩增产物分别与表 2 中的 5 条探针杂交, 这些探针中有的与产物 DNA 完全匹配, 有的与产物 DNA 差异 1 个碱基, 有的差异 2 个或 2 个以上的碱基, 杂交分别在 39 ℃、42 ℃、45 ℃下进行。

1.6 杂交检测

用已固定有探针的膜条浸入盛有 2 × 标准柠檬酸盐(standard saline citrate, SCC)液的胶袋中, 42 ℃预杂交 10 min, 将 PCR 扩增产物于 95 ℃水浴中变性 10 min, 冰浴 2 min 以上后立即加入胶袋 42 ℃(39 ℃、45 ℃)水浴中振摇 30 min, 以完成杂交; 然后将膜条用 0.5 × SSC 液洗涤 3 次后, 转入链酶抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶结合物溶液中, 室温振摇 15 min, 膜条再经 2 × SSC 液洗涤 3 次后, 用显色液显色。

1.7 统计学处理

采用 CS10.1 和 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析。生化指标谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)与病毒学指标(HBV DNA)的分析采用两独立样本 *t* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧); 采

用 χ^2 检验两两比较 3 组 HBV preS 基因变异的差异, 检验水准 $\alpha'=0.05/3=0.017$, 即 $P \leq 0.017$ 为差异有统计学意义。采用 DNAssist Version 1.02 进行核苷酸序列和氨基酸序列分析。

2 结果

2.1 preS 区基因核苷酸及氨基酸(aa)序列比较

将 38 例患者的 PCR 产物直接测序结果用 DNAssist Version 1.02 进行核苷酸序列和氨基酸序列分析, 见表 3。选取有代表性的 6 例进行序列比对: ASC-1 为 ASC 组 1 号患者; CHB-11、CHB-13、CHB-18 分别为 CHB 组 11、13、18 号患者; HCC-2、HCC-6 分别为 HCC 组 1、6 号患者。

2.2 RDB 的温度选择

ASC-1 扩增产物与探针 P35、P39、P48、P155、P165 分别有 3、3、2、4、2 个碱基错配; CHB-13 扩增产物与探针 P35、P39、P155、P165 完全匹配, 与探针 P48 有 1 个碱基错配。不同温度杂交情况如图 1。

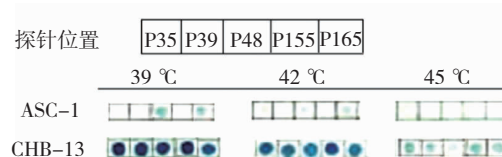


图 1 HBV preS 基因不同温度杂交图

Fig.1 Hybridization temperature profiles of HBV preS gene signals by RDB

在 39 ℃、42 ℃时, 所有完全匹配的和只有 1 个碱基错配的探针均可与扩增产物(CHB-1)相结合并显色明显, 2 个碱基错配的探针也可与扩增产物(ASC-1)相结合, 但显色较弱; 在 45 ℃杂交时, 2 个或 2 个以上碱基错配的探针均不能显色。这一结果表明, 通过调节杂交温度, RDB 能够调整到对 1 个碱基错配不敏感, 以便能区分 1 个碱基变异与 2 个或 2 个以上碱基突变的差异。由于杂交温度越高, 检测的特异性增加, 背景干净, 但灵敏度降低; 反之特异性降低, 灵敏度增加。因此, 认为 42 ℃为 RDB 的最适杂交温度。

2.3 RDB 对患者 HBV preS 基因突变的检测

对编号 CHB-11、CHB-13、CHB-18、HCC-2、HCC-6、ASC-1 患者标本分别用 RDB 检测 HBV preS 基因突变, 结果如图 2。

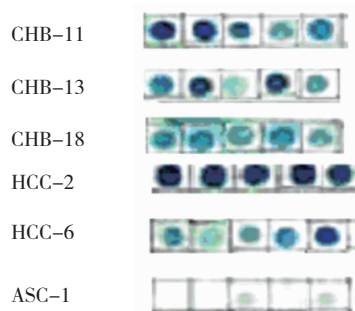


图 2 RDB 对患者 HBV preS 基因突变的检测结果

Fig.2 Detecting results of mutation of HBV preS gene in patients' plasma by RDB

2.4 RDB 检测不同患者 preS 区基因变异频率

用 χ^2 检验比较各基因突变的阳性率在各疾病组之间的差异;编码第 35、39、48 位氨基酸的密码子突变(即 P35、P39、P48 探针检测的核苷酸变异)在 ASC、CHB、HCC3 个组的发生频率无显著性差异;但编码第 155 位氨基酸的密码子突变(即 P155 探针检测的核苷酸变异)在 ASC 与 CHB 组间的发生频率差异有统计学意义($\chi^2=9.845, P=0.002$), ASC 与 HCC 组间、HCC 与 CHB 组间的发生频率差异无统计学意义;编码第 165 氨

基酸的密码子突变(即 P165 探针检测的核苷酸变异)在 ASC 与 CHB 组间的发生频率差异有统计学意义($\chi^2=6.910, P=0.011$), ASC 与 HCC 组间、HCC 与 CHB 组间的发生频率差异无统计学意义(表 3)。

2.5 与测序结果的比较

用 RDB 检测 38 例患者 preS 基因的第 35、39、48、155、165 氨基酸位点发生突变,与测序结果的符合率为 100%,突变方式见表 4。

表 3 不同临床分组中 preS 区基因变异频率的比较

Tab.3 Frequencies of mutation of HBV preS gene in different clinical groups

比较指标	ASC (n=13)	CHB (n=19)	HCC (n=6)	t 值 χ^2 值	P 值
男/女(男,%)	7/6 (53.85)	13/6 (68.42)	5/1 (83.33)		
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	32.77 $\pm$ 14.28	45.32 $\pm$ 14.25	37.33 $\pm$ 16.12		
生化指标					
ALT (IU/L, $\bar{x} \pm s$)	29.38 $\pm$ 8.26	218.26 $\pm$ 260.70	63.00 $\pm$ 22.25	3.500	0.041
AST (IU/L, $\bar{x} \pm s$)	29.77 $\pm$ 6.73	144.79 $\pm$ 145.31	90.67 $\pm$ 77.80	3.720	0.034
病毒学指标					
Log [(HBV DNA), $\bar{x} \pm s$]	4.57 $\pm$ 0.92	6.38 $\pm$ 1.03	5.69 $\pm$ 0.70	9.602	0.004
HBeAg 阳性 (%)	5 (38.46)	12 (63.16)	2 (33.33)	0.476	0.621
preS 基因突变指标					
P35 阳性 (%)	4 (30.77)	9 (47.37)	2 (33.33)	1.953	0.470
P39 阳性 (%)	3 (23.08)	8 (42.11)	2 (33.33)	2.368	0.343
P48 阳性 (%)	3 (23.08)	5 (26.32)	2 (33.33)	0.652	0.517
P155 阳性 (%)	1 (7.69)	12 (63.16)	2 (33.33)	9.845	0.002
P165 阳性 (%)	1 (7.69)	10 (52.63)	2 (33.33)	6.910	0.011

表 4 HBV preS 区核苷酸及氨基酸变异位点分析

Tab.4 Mutation sites of nucleotide and amino acid sequence of HBV preS

编码氨基酸位点	核苷酸突变	相应氨基酸变异	功 能
第 10 位	C 27 A	谷氨酰胺→赖氨酸	病毒成熟、分泌以及感染
第 35 位	G 103 A G 104 A	甘氨酸→赖氨酸	T 细胞结合位点,病毒成熟、分泌及感染
第 39 位	A 115 G C 117 A	天冬酰胺→谷氨酸	T 细胞结合位点,病毒成熟、分泌及感染
第 48 位	A 142 C	天冬酰胺→组氨酸	T 细胞结合位点,病毒成熟、分泌及感染
	A 142 T	天冬酰胺→酪氨酸	—
第 51 位	C 151 A	组氨酸→天冬酰胺	病毒成熟、分泌及感染
第 54 位	C 161 A G 162 C	丙氨酸→天冬氨酸	病毒成熟、分泌及感染
第 57 位	T 169 C C 170 A	谷氨酰胺→赖氨酸	病毒成熟、分泌及感染
第 73 位	G 217 A	甘氨酸→丝氨酸	病毒成熟、分泌及感染
第 89 位	C 265 T	脯氨酸→丝氨酸	—
第 91 位	G 271 A	丙氨酸→苏氨酸	—
第 108 位	A 322 T	异亮氨酸→亮氨酸	—
第 130 位	G 388 A	丙氨酸→苏氨酸	B 细胞结合位点
第 132 位	T 395 A	亮氨酸→谷氨酰胺	B 细胞结合位点
第 138 位	G 413 C	甘氨酸→丙氨酸	—
第 141 位	T 421 C	苯丙氨酸→亮氨酸	—
第 155 位	C 464 A	脯氨酸→谷氨酰胺	T 细胞结合位点
第 165 位	C 495 A	苯丙氨酸→亮氨酸	T 细胞结合位点

注:—,无功能

3 讨 论

HBV 基因组为双链环状 DNA,长约 3 200 bp,有 4 个开放读码框:preS/S 区、前 C/C 区、X 区和 P 区。preS 基因位于 S 基因上游,由 preS1 及 preS2 组成,共有 174 个密码子,preS1 基因(357 bp 或 324 bp,基因型不同而有差异)编码 119 个氨基酸或 108 个氨基酸,位于 2 848~3 205 位核苷酸;preS2 基因(165 bp)编码 55 个氨基酸,位于 3 206~3 215 及 1~155 位核苷酸。preS 基因表达与病毒的成熟、分泌及感染性有关^[1]。因此,本实验设计的 PCR 扩增片段(2 788~2 022 核苷酸,630 bp)即包含了整个 preS 基因;根据 GenBank 收录的 HBV preS 基因序列和文献报道^[4-8],结合对本地区患者血浆标本中 HBV preS 基因序列分析,按照单碱基差异不会影响杂交实验结果的原则,本文选取了位于 T 细胞识别位点的基因突变作为靶基因进行检测,设计了 5 条位于 T 细胞识别位点的寡核苷酸探针,对 38 例患者 HBV preS 基因中相应的 5 个突变位点进行了 RDB 检测,突变位点的检测结果与直接测序比较,符合率 100%。结果显示,在选择 5 个识别位点的基因突变中,编码第 155 位与 165 位氨基酸的密码子突变的发生频率,在 ASC 与 CHB 组间的差异具有统计学意义,此类型突变是否与 HBV 感染的预后方向及治疗的方案选择有关,需扩大受试对象,结合临床资料进一步研究。

目前测序作为考核其他检测方法的金标准,已越来越多地直接应用于基因突变分析,但限于对仪器和操作人员的要求,还未广泛应用于临床。临床常用的单链构象多态性分析,其主要优点是具有简单及较高的敏感性,适合大样本的基因突变的筛选工作,但不能确定突变的准确位点;限制性片段长度多态分析虽能确定突变的位点,但一次实验检测的位点数少,效率低且有时在突变位点处找不到合适的酶切位点。RDB 最早应用于血液病和 β -地中海贫血的研究中,因其具有以下优势现在也广泛用于病原体基因突变和基因分型的检测:①将多条探针固定在同一膜上,一次性筛查多个不同的位点;②膜条制备时间较短,并能大量预先制备,于 4℃ 保存待用(至少可存放半年);经过 1 次 PCR 扩增和 1 次反向杂交就可以完成对标本的检测,若采用快速导流型杂交仪,则整个杂交过程会更简便快速,提高了效率;③非放射性标记引物,避免同位素的半衰

期所带来的引物保存期短的问题,并使操作更安全;④具有 PCR 的高灵敏度和探针杂交的高特异性。

在 RDB 检测中,最重要的影响因素是杂交温度,随着温度升高,杂交信号会逐渐减弱甚至消失,出现假阴性,而随着温度降低假阳性率随之增高。本课题研究发现,通过调整杂交温度,可以使得探针位置的 1 个碱基差异不会影响杂交结果,这使得建立 1 种能忽略 1 个碱基差异的方法成为可能,这不仅可以减少探针数量,降低成本,还可以为那些有众多未知突变的病毒株提供准确检测的可能。但是,有两个问题需要在后续研究中加以解决:①哪种突变模式(包括位点、性质、所致构型变化等)与临床预后、疗效真正密切相关,这还需更多的临床和实验室资料予以论证;②杂交结果判断的客观性和准确性。另外,此法不能应用于缺失突变的检测。总之,在受限于实验条件而不能进行直接测序的情况下,RDB 不失为一种实用的突变筛选和临床检测方法。

参 考 文 献

- [1] Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution[J]. *Virus Res*, 2007, 127(2): 164-176.
- [2] Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, et al. Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain[J]. *J Virol*, 1999, 73(3): 2052-2057.
- [3] Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, et al. Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity[J]. *J Virol*, 1998, 72(7): 5573-5578.
- [4] Gerner P, Schäfer H M, Prange R, et al. Functional analysis of a rare HBV deletion mutant in chronically infected children[J]. *Pediatr Res*, 2003, 53(6): 891-897.
- [5] Chen C H, Hung C H, Lee C M, et al. Pre-S deletion and complex mutations of Hepatitis B virus related to advanced liver disease in HBeAg-negative patients[J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(5): 1466-1474.
- [6] Sugauchi F, Ohno T, Orito E, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the development of preS deletions and advanced liver disease [J]. *J Med Virol*, 2003, 70(4): 537-544.
- [7] Pollicino T, Zanetti A R, Cacciola I, et al. Pre-S2 defective hepatitis B virus infections in patients with fulminant hepatitis[J]. *Hepatology*, 1997, 26(2): 495-499.
- [8] Bock C T, Tillmann H L, Manns M P, et al. The pre-S region determines the intracellular localization and appearance of hepatitis B virus [J]. *Hepatology*, 1999, 30(2): 517-525.

(责任编辑:关蕴良)