

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.28.006

PCR 在 HBV 核酸定量检测中的应用 *

张佳瑞 巩 丽 朱少君 韩秀娟 姚 丽 王姝妹 张 伟[△] 李艳红[△]

(第四军医大学唐都医院病理科 第四军医大学唐都医院妇产科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探索一种简便定量分析系统,通过检测 HBV 携带者血清中的 HBV X 区 DNA、fRNA 和 trRNA 拷贝数,为提高隐匿性感染期低复制状态 HBV 检测效果提供可能。**方法:**从血清中提取 HBV DNA 和 RNA,对 Core 区、X 区 DNA 进行 PCR 扩增,使用半巢式 PCR 法对 fRNA、trRNA 在同一离心管中进行反转录并扩增,选取大小相近的质粒作为竞争模板对其进行定量。并对拉米夫定干预治疗 14 周前后的患者血清中 HBV XDNA、Core DNA、fRNA 和 trRNA 拷贝数进行检测与比较。所有检测结果均通过 southern 杂交进行验证。**结果:**建立了针对 DNA 的定量分析系统及针对 RNA 的 RT-PCR 定量分析系统,并且阐明了阿米夫定治疗前后 HBV DNA 和 X 区 RNA 结构和数量的变化。治疗前治疗后 DNA 和 RNA 的拷贝数均下降。Core DNA 下降显著,为 10^3 - 10^4 倍,而 XDNA 拷贝数下降 10^2 倍。而 fRNA 和 trRNA 仅有小幅下降,为 10 倍左右。**结论:**可以通过竞争性 PCR 方法对血清中 HBV DNA 和 RNA 进行定量检测,以期对 HBV 病毒的诊断提供更充足依据。

关键词:竞争性 PCR;拉米夫定;fRNA;trRNA

中图分类号:R512.6+2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)28-5424-03

Explore the Application of Quantitative PCR in the HBV Detect*

ZHANG Jia-rui, GONG Li, ZHU Shao-jun, HAN Xiu-juan, YAO Li, WANG Shu-mei, ZHANG Wei[△], LI Yan-hong[△]

(Department of Pathology, Department of Obstetrics and Gynecology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To build a feasible quantitative analysis system to improve the possibility of detection of the HBV at the occult infection according to the copy numbers of HBV XDNA, fRNA and trRNA in the serum. **Methods:** HBV DNA and RNA were extracted from serum samples. HBV Core DNA, X DNA were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and the heminested PCR were used in the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) system for fRNA and trRNA. They were marked by the plasmid sized around them as competitive templates. The copy numbers of HBV XDNA, Core DNA fRNA and trRNA in the serum treated by lamivudine for 14 weeks were compared with before. Results were verified by the southern hybridization. **Results:** The DNA quantitative system and RNA RT-PCR quantitative system were established. The exchange of the HBV DNA and RNA in number and structure were clarified. The copy number of DNA and RNA decreased after lamivudine treatment. Core DNA decreased dramatically by 10^3 - 10^4 times, and X DNA decreased 10^2 times. While fRNA and trRNA decreased around 10 times. **Conclusion:** HBV DNA and RNA can be detected by the competitive PCR and it is likely to be useful to the HBV virus examination.

Key words: Competitive PCR; Lamivudine; fRNA; trRNA

Chinese Library Classification: R512.6+2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)28-5424-03

前言

我国是乙肝的高发区,乙型肝炎病毒(HBV)感染率较高。HBV 的慢性感染是引发肝硬化和肝细胞肝癌的主要原因^[1],每年约有 60 万人死于肝硬化和肝细胞肝癌^[2]。因此,对乙型肝炎病毒进行科学诊断尤为重要。传统对 HBV 感染的常规诊断主要是通过血清中 HBV C 区 DNA 及其基因产物 HBsAg, HBcAg 及 HBeAg 检测进行诊断,对部分处于新生儿期,肝病终末期及存在病毒 C 区突变株患者出现的隐匿感染难以诊断^[3,4]。在 HBV 感染过程中,病毒转炉体终止于两个不同的 Poly(A)终止信号^[5,6]。全长的转录体(fRNA)和顿挫型转录体(tr RNA)分

别终止于 HBx 基因下游的 Poly (A) 终止信号(UAUAAA)和 HBx 基因内的终止信号(CAUAAA)。本研究旨在通过简便科学的检测方法对拉米夫定治疗前后乙型肝炎病毒携带者 HBV X DNA、fRNA、trRNA 进行定量检测,为提高在对隐匿性感染期低复制状态 HBV 的检测效果提供可能。

1 材料和方法

1.1 材料

血清标本来自西安第四军医大学唐都医院,天津医科大学肿瘤医院,陕西省肿瘤医院。高纯度核酸提取试剂盒、血清 DNA 提取试剂盒、核糖体 RNA、RT/PCR 试剂盒、地高辛探针

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30672013;81372226);陕西省科技统筹创新工程(2011KTCL03-11)

作者简介:张佳瑞(1987-),女,硕士,医师,主要研究方向:分子病理,E-mail:zhangjia Rui1987@hotmail.com

△ 通讯作者:张伟,E-mail:zhwlyh@fmmu.edu.cn;

李艳红,E-mail:lyhzhw@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-04-12 接受日期:2014-05-10)

标记及原位杂交试剂盒购自德国罗氏公司。竞争模板质粒由德国癌症研究中心回惠赠。

1.2 方法

1.2.1 血清收集及核酸提取 30 min 内 4℃ 3000 r/min 离心血清 5 min, 用于检测 fRNA、trRNA 核酸提取采用罗氏核酸提取试剂盒, 将其中的 Poly(A) 替换为 rRNA。HBV Core 及 HBV X DNA PCR 所用模板提取使用罗氏血清 DNA 提取试剂盒。200 μ L 血清提取后用 50 μ L 洗脱液洗脱。

1.2.2 fRNA 和 trRNA 使用 RT-PCR 第一轮循环使用单管 T-PCR 系统 (Titan One Tube T-PCR system), 严格按照说明书操作。trRNA 第一轮引物 1445+, 1683a-, 第二轮引物 1464+, 1683a-, 竞争模板 J166(16) (对应序列 1445-1656+71bp); fRNA 引物第一轮引物 1434+, 1806-, 第二轮引物 1454+, 1808-, 竞争模板 19L27 (对应序列 1689-1746, 有一 58bp 删除区间)。第一轮采用 50 μ L 循环体系, 按 Su^{17} 等建立的方法进行: 模板 RNA 5 μ L, 不同浓度竞争模板 1 μ L, 50℃ 反转录 20 min 后扩增 35 个循环。第二轮 PCR 反应体系 50 μ L, 引物各 0.5 μ L (浓度 0.1g/L), 模板 DNA 5 μ L, 循环条件同第一轮循环。扩增产物经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳显示, 待测模板 PCR 产物信号强度与某浓度竞争模板产物信号强度相同时, 判定其拷贝数相同。如果待测模板 PCR 产物信号强度强于最大浓度竞争模板产物信号或者弱于最小浓度竞争产物信号时, 对待测模板进行重新稀释, 使其在可测的浓度范围内。

1.2.3 X 区、Core 区 DNA 检测方法 HBV CoreDNA 引物 1732+, 2157-, 竞争模板 111/4 (位于 HBV 基因 1732-2157, 含有 86 bp 的缺失区间); HBV X 基因引物 1445+, 1574-, 竞争模板 166 (50) (位于 HBV 基因 1445-1808, 含有 31 bp 重复序列)。PCR 反应体系为 50 μ L, 其中含竞争模板 1 μ L, 退火温度为 58℃。检测结果通过 southern 杂交进行验证。

1.2.4 拉米夫定治疗病例的选择 选择 HBsAg, HBeAg, HBV DNA 均阳性的 HBV 感染患者进行拉米夫定 100 mg/天进行治疗。采集患者治疗前及治疗后 14 周的血清标本, 检测 HBV Core 区、X 区 DNA, 和 fRNA, trRNA 拷贝数的变化。

2 结果

2.1 HBV 感染患者 HBV fRNA 及 Core DNA 定量 PCR 样本及竞争模板电泳结果

如图 1A 示 HBV 感染患者血清中, HBV fRNA 基因 3' 末端定量 PCR 后的琼脂糖凝胶电泳和 southern 杂交结果。由于竞争模板 19L27 在扩增的目标区间内有一个 58bp 的删除区间, 因此其扩增产物较常规模板小 58 bp, 分别为 302 bp 和 360 bp。同位素标记的探针证实其为 HBV X 基因 fRNA 片段。图 1B 示 HBV 感染患者血清中, HBV Core DNA 3' 末端定量 PCR 后的琼脂糖凝胶电泳和 southern 杂交结果。竞争模板 J166(16) 比目的基因相比大 29 bp, 分别为 264 bp 和 235 bp。同位素标记的探针证实其为 HBV X 基因 trRNA 片段。

2.2 HBV 感染患者 HBV X DNA 定量 PCR 样本及竞争模板电泳结果

图 2A 示 HBV 感染患者血清中, HBV X 基因 1445-1574 区间定量 PCR 后的琼脂糖凝胶电泳和 southern 杂交结果。

HBV X DNA 的竞争模板 J166(50) 在与目的基因相同的序列内多出一个 31bp 的重复序列, 因此其扩增产物较常规模板大 31 bp, 分别为 160 bp 和 129 bp。同位素标记的探针证实其为 X 基因片段。图 2B 示 HBV 感染患者血清中, HBV Core 基因 1732-2157 区间定量 PCR 后的琼脂糖凝胶电泳和 southern 杂交结果。竞争模板 111/4 与目的基因相比缺少了 86 bp, 分别为 339 bp 和 425 bp。同位素标记的探针证实其为 Core 基因片段。

2.3 HBV 感染患者拉米夫定治疗前后 CoreDNA, XDNA, fRNA 及 trRNA 拷贝数的变化

通过拉米夫定治疗 14 周前后患者血清中 HBV CoreDNA, XDNA, fRNA 及 trRNA 拷贝数的对比 (图三) 可以看出。HBV CoreDNA 治疗后较治疗前下降了 10^3 - 10^4 倍, 而 XDNA 拷贝数仅下降 10^2 倍。fRNA 和 trRNA 仅有小幅下降, 都在 10 倍左右。

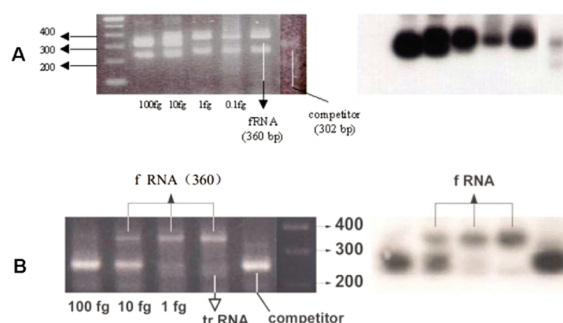


图 1 fRNA 和 trRNA 的定量检测结果

Fig.1 The quantitative detection of fRNA and trRNA

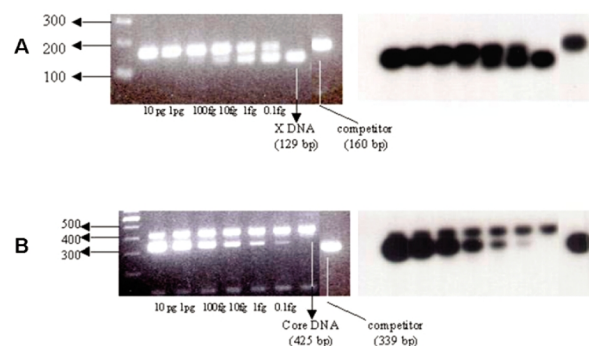


图 2 HBV XDNA 和 Core DNA 定量检测结果

Fig.2 The quantitative detection of HBV XDNA and CoreDNA

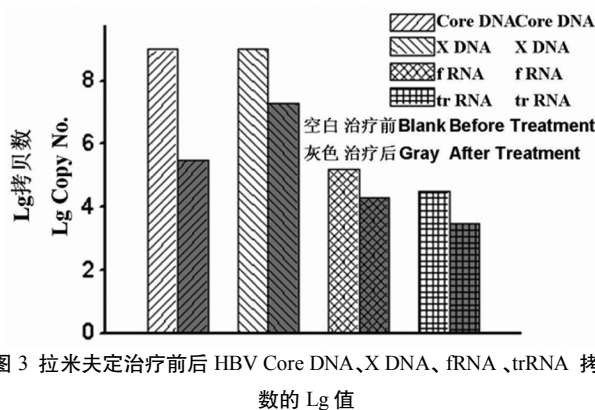


图 3 拉米夫定治疗前后 HBV Core DNA、X DNA、fRNA、trRNA 拷贝数的 Lg 值

Fig.3 Lg of the copy numbers of HBV Core DNA, X DNA, fRNA and trRNA after lamivudine treatment

3 讨论

感染的肝细胞核内可检测到一种不同形式的病毒 DNA 共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, ccc DNA), 其是乙肝病毒前基因组 RNA 转录的模板。以前基因组 RNA 为模板通过逆转录合成 HBV DNA 负链, 代表了 HBV DNA 的全部信息。HBV 病毒有 6 个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 即 PreS1/S2(S) 编码区、PreC(C) 编码区、P 基因、X 基因以及第 5 和第 6ORF。rRNA 与 tRNA 产生于 X 基因^[8]。只有当负链合成后, 前基因组降解后, 成熟的病毒核壳体才被释放和进一步加膜包装, 在患者的血液中检测到^[9,10]。所以, 根据以上理论, 不会有与复制相关的 HBV RNA 从肝细胞进入血液。但是, 肝细胞损伤的情况下, 可能导致以某种方式存在的 RNA 进入血液。

拉米夫定是一种通过干预 HBV 的复制周期来治疗慢性 HBV 感染的化学药物^[11]。使用拉米夫定对患者进行治疗 14 周后, HBV XDNA 和 HBV Core DNA 均有明显下降 (分别为 $10^{3.4}$ 倍和 10^2 倍), 这是由于 HBV XDNA 和 HBV Core DNA 均位于 HBV 负链 DNA, 其复制被拉米夫定所抑制^[12,13]。但是, HBV XDNA 与 HBV Core DNA 的下降存在明显的非一致性, XDNA 的拷贝数经 14 周治疗后下降 10^2 倍, 而 HBV CDNA 下降了 10^3 倍, 提示经拉米夫定治疗而破坏的大量的不完整 HBV DNA 含有 X 区而非 C 区。rRNA 和 tRNA 在治疗后的数量略微下降, 说明其是从游离的而不是从整合的 HBV DNA 转录的, 其略微下降可能是由于 DNA 受到抑制后 cccDNA 的合成、对前基因组转录造成的间接影响或者肝细胞的破坏程度有所改变。

从妊娠妇女的血液中可检测到完全相同的胎儿 RNA^[14]。Kock 等利用 HBV 感染体外生长的细胞, 并从培养液中检测到了与病毒颗粒相关的 HBV RNA^[15]。Schutz 等建立了用于区分 rRNA 和 tRNA 的 RT-PCR 系统^[16] (Schutz et al, 1996)。Breitkreutz 研究证实 rRNA 与病毒复制标志物 HbeAg 和 HBV DNA 的存在正相关, 而 tRNA 则与其不相关^[7]。(Breitkreutz, 2001) Su 等的研究证实了血清中 HBV RNA 存在并且使用常规 PCR 检测方法研究循环的 HBV RNA^[7] (Su, 2001)。本研究建立的竞争性 PCR 方法, 可对血清中 HBV RNA 进行定量检测。通过在 PCR 系统中加入不同量的竞争模板 DNA 或 cDNA, 比较电泳后凝胶上目的基因与竞争模板显像后信号强度, 从而对其定量, 对 HBV X DNA, HBV C DNA 及 rRNA、tRNA 进行快速科学的检测。由于拉米夫定既可以抑制 HBV 的反转录、抑制 DNA 依赖性 DNA 聚合酶的活性, 从而抑制负链和正链 DNA 的产生^[19,20], 同时还可以抑制病毒核壳体从受染肝细胞的释放^[21], 因此在检测病毒蛋白之外增加 HBV XDNA、rRNA、tRNA 的检测对于 HBV 感染的诊断具有重要的价值。尤其在 HBV 感染的隐匿期, 如新生儿期、肝病终末期及存在病毒 C 区突变株患者出现的隐匿感染难以诊断的情况下, 有可能通过对 HBV XDNA、rRNA、tRNA 检测或者与 HBV CoreDNA 的共同检测对 HBV 病毒各阶段的动力学进行更加全面的了解, 完善传统检测项目。

参考文献 (References)

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA

Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90

- [2] World Health Organization: Hepatitis B [Z]. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/, 2013
- [3] Breitkreutz R, Zhang W, Lee M, et al. Hepatitis B virus nucleic acids circulating in the blood: distinct patterns in HBs carriers with hepatocellular carcinoma[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 945: 195-206
- [4] Wang J S, Chen H, Zhu Q R. Transformation of hepatitis B serologic markers in babies born to hepatitis B surface antigen positive mothers [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(23): 3582-3585
- [5] Hilger C, Velhagen I, Zentgraf H, et al. Diversity of hepatitis B virus X gene-related transcripts in hepatocellular carcinoma: a novel polyadenylation site on viral DNA[J]. J Virol, 1991, 65(8): 4284-4291
- [6] Kairat A, Beerheide W, Zhou G, et al. Truncated hepatitis B virus RNA in human hepatocellular carcinoma: its representation in patients with advancing age[J]. Intervirology, 1999, 42(4): 228-237
- [7] Su Q, Wang S F, Chang T E, et al. Circulating hepatitis B virus nucleic acids in chronic infection: representation of differently polyadenylated viral transcripts during progression to nonreplicative stages[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(7): 2005-2015
- [8] Kairat A, Beerheide W, Zhou G, et al. Truncated hepatitis B virus RNA in human hepatocellular carcinoma: its representation in patients with advancing age[J]. Intervirology, 1999, 42(4): 228-237
- [9] Gerelsaikhan T, Tavis J E, Bruss V. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis[J]. J Virol, 1996, 70(7): 4269-4274
- [10] Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication—an update [J]. J Viral Hepat, 1996, 3(5): 217-226
- [11] Sokal E. Lamivudine for the treatment of chronic hepatitis B [J]. Expert Opin Pharmacother, 2002, 3(3): 329-339
- [12] Doong S L, Tsai C H, Schinazi R F, et al. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(19): 8495-8499
- [13] Sokal E. Lamivudine for the treatment of chronic hepatitis B [J]. Expert Opin Pharmacother, 2002, 3(3): 329-339
- [14] Poon L L, Leung T N, Lau T K, et al. Presence of fetal RNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2000, 46(11): 1832-1834
- [15] Kock J, Theilmann L, Galle P, et al. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus[J]. Hepatology, 1996, 23(3): 405-413
- [16] Schutz T, Kairat A, Schroder C H. DNA sequence requirements for the activation of a CATAAA polyadenylation signal within the hepatitis B virus X reading frame: rapid detection of truncated transcripts [J]. Virology, 1996, 223(2): 401-405
- [17] Breitkreutz R, Zhang W, Lee M, et al. Hepatitis B virus nucleic acids circulating in the blood: Distinct patterns in HBs carriers with hepatocellular carcinoma[Z]. Annals of the New York Academy of Science, 2001:195-206
- [18] Lai C L, Yuen M F. Profound suppression of hepatitis B virus replication with lamivudine[J]. J Med Virol, 2000, 61(3): 367-373
- [19] Coffin C S, Mulrooney-Cousins P M, Lee S S, et al. Profound suppression of chronic hepatitis C following superinfection with hepatitis B virus[J]. Liver Int, 2007, 27(5): 722-726
- [20] Gerelsaikhan T, Tavis J E, Bruss V. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis[J]. J Virol, 1996, 70(7): 4269-4274