

乙肝病毒基因分型检测芯片的构建及初步应用

赵文瑾, 何群, 赵雨杰[△]

(中国医科大学基础医学院生物芯片中心, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的: 构建乙肝病毒(HBV)常见基因型的分型芯片, 并应用分型芯片调查 HBV 基因型分布。方法: 应用生物信息学软件针对乙肝病毒 4 种常见基因型的特征区域和保守区域分别设计分型探针和通用探针, 在优化条件下通过重复杂交及分型测序检验芯片的重复性与可靠性后应用于临床, 对 150 例不同类型的乙肝患者进行 HBV 基因分型。结果: 分型探针和通用探针检测重现率分别为 94.7% 及 100%, 反馈的测序结果与芯片分型结果完全一致; 经芯片分型发现辽宁省 HBV 基因型分别为 C 型占 68.7%, B 型占 22.7%, B、C 混合型占 8.7%, 未发现 A、D 型。结论: 基因芯片技术为乙肝病毒基因分型提供了快速准确的检测方法, 辽宁地区 HBV 基因型分布以 B、C 两型为主, C 型占主要优势。

[关键词] 基因芯片; 乙肝病毒; 基因分型

[中图分类号] 512.6 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)04-0395-03

Construction and clinical application of hepatitis B virus genotyping microarray

ZHAO Wen-jin, HE Qun, ZHAO Yu-jie[△]

(Biochip Center, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a DNA microarray for quick detection and identification of hepatitis B virus (HBV) genotypes, and to study the distribution of HBV genotypes of patients with hepatitis in Liaoning Province by using this microarray. **Methods:** The genotyping probes and universal probes were designed based on the specific and conserved regions of HBV genome, respectively. The reproducibility and reliability of the microarray were tested by repeated hybridization and sequencing, and the genotypes of HBV DNA extracted from serum samples of 150 patients with hepatitis B were detected by using this microarray. **Results:** The reproducibility rates of genotyping probe and universal probe were 94.6% and 100%, respectively, and the sequence analysis was consistent with the result of microarray assay. The percentages of genotypes C, B, and BC were 68.6%, 22.6%, and 8.6%, respectively. **Conclusion:** This DNA microarray can be used for quick HBV genotyping. The HBV genotypes in the patients with hepatitis in Liaoning Province are mainly genotypes B and C, and genotype C is predominant.

[Key words] microarray; hepatitis B virus; genotype

乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种高变异病毒, 目前根据其基因组核苷酸序列差异已将 HBV 基因型分为 A~H 型。近年的研究发现其基因分型与病毒的热点突变、疾病活动度、抗病毒药物疗效及疾病预后等都有一定相关性^[1,2], 因此建立简便、有效的基因分型方法具有重要的临床价值。由于 E~H 型全世界罕见, 故本研究针对常见的 A~D 基因型自行构建基因分型芯片并应用于临床, 初步调查辽宁地区 HBV 基因型的分布。

1 材料与方法

1.1 临床标本 150 例 HBV 阳性血清均来自中国医科大学附属盛京医院传染科住院患者, 所有患者均排除甲、丙、丁、戊型肝炎病毒感染, 诊断均符合

2000 年西安修订的病毒性肝炎诊断标准。血清标本采集后 -70℃ 保存备用。10 例正常人血清取自中国医科大学附属第一医院血库。

1.2 试剂及仪器 PCR 试剂盒(华美生物工程公司), 探针缓冲液(碳酸钠 0.1 mol/L, pH=9.0), 杂交缓冲液(5 × SSC、0.1% SDS、5 × Denhart 液, 鲑鱼精 DNA), Biometra PCR 扩增仪(德国); MicroGrid II 芯片点样仪(BioRobotics Lid); GeneTACTMLSIVXINP 芯片扫描仪(Genomic Solutions, Inc)。

1.3 引物与探针 PCR 引物由上海博亚生物工程公司合成, P2 引物 5' 端进行 Cy5 荧光标记。寡核苷酸探针由上海博亚生物工程公司合成, 探针 5' 端进行氨基修饰。

1.4 方法

1.4.1 引物与探针设计: 在 NCBI 网站的 GenBank 上查找 HBV 数据库中 HBV 病毒各基因型的全基因组序列, 用 Omega 软件对各基因型全序列进行对比分析, 找出各基因型特征序列丰富的区域, 应用

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30470451)

[作者简介] 赵文瑾(1975-)女, 硕士。

[△]Corresponding Author's E-mail: yujiezha@mail.cmu.edu.cn

Premier 5.0 软件对该区中的保守区域设计一对通用引物及通用探针,再依据各型特征序列设计一批分型探针,尽量使各探针 Tm 值一致,以便利于杂交,最后应用 NCBI 上的 BLAST 软件对探针序列进行比较分析,排除该批探针与其他病毒细菌的同源性。

1.4.2 模板制备:采用裂解法提取 HBV DNA,取 200 μl 血清标本沸水煮 10 min,迅速冷却,13 000 r/min 离心 15 min,取上清作为模板。

1.4.3 PCR 扩增:扩增体系含 DNA 模板 0.8 μl, 10 × Buffer 2 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μl, dNTP (1.5 mmol/L) 2 μl, TagDNA 聚合酶 1.2 U, 引物 P1 (1 μmol) 2 μl, P2 (10 μmol) 2 μl (两引物浓度为 1 : 10), 终体积 20 μl。反应条件为 94 °C 预热 5 min ; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 复性 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min。取扩增产物 3 μl 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,观察结果。

1.4.4 芯片制备 寡核苷酸探针用探针缓冲液稀释至 50 μmol/L, 普通盖玻片经氨基硅烷及戊二醛处理后,用点样仪将探针点于其上(每个探针点 2 个),用引物 P1 序列(与带荧光标记的扩增优势链互补)配成同等浓度作为阳性对照探针,以同等浓度探针缓冲液作为空白对照,以同等浓度无关探针作为阴性对照,探针矩阵格式见图 1。

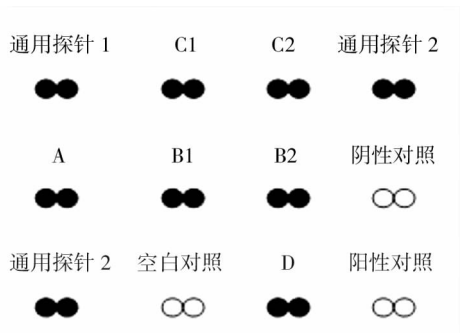


图 1 芯片上探针矩阵图

Fig.1 Position of probes on the microarray

1.4.5 杂交:取 PCR 产物 4 μl 与杂交液 1 : 1 混匀,滴加于芯片上,盖上硅烷化盖片,靠虹吸作用铺满芯片,置入湿盒内 60 °C 杂交 2 h。

1.4.6 洗涤与检测:取出杂交芯片,冲去盖片,用 1 × SSC+0.1% SDS 室温荡洗 3 min,再用 0.1 × SSC 室温荡洗 3 min, ddH₂O 冲净,吹干后使用激光共聚焦扫描仪检测。扫描条件:激发波长 675 nm,增益 57.1,背景为 0,根据各型探针平均信号强度确定 HBV 分型结果。

1.4.7 杂交反应的重复性与可靠性:按上述操作方

法对 150 例阳性血清进行基因分型,每例重复杂交 4 次,比较杂交结果。随机选取 15 例,送往上海生物工程公司测序。应用 NCBI 上的 Genotyping 软件对测序结果分型,比较测序分型结果与杂交分型结果的一致性。另取 10 例正常人血清进行 PCR 扩增,其 PCR 产物与 HBV 基因分型芯片杂交作为阴性对照,观察实验结果。

2 结果

2.1 引物与探针设计结果

用 Blastn 软件将各探针序列与整个核酸库进行序列比较,发现列出的匹配程度最高的前 250 条结果均为乙肝病毒,查询每个乙肝病毒序列的具体内容,发现与通用探针匹配的 250 个乙肝病毒序列包含了所有基因型,与各分型探针所匹配的乙肝病毒其基因型也与各自探针的基因型相对应。

2.2 PCR 扩增结果

电泳结果显示产物条带清晰,片断大小与标准分子量对照均为 510 碱基,与理论设计一致。正常人血清 PCR 产物为阴性。

2.3 杂交结果

除空白对照与阴性对照外,通用探针、阳性对照和相应的分型探针均有阳性亮点。150 例样品中,142 例 4 次分型结果完全重复,另外 8 例有时 B、C 探针均亮,有时仅 C 探针或 B 探针亮,总重复率 94.7%。通用探针 1、2 与阳性对照重复率 100%。在已测序的 15 例样品中,经过 NCBI 的 Genotyping 软件分析,3 例 B 型,10 例 C 型,与其芯片分型结果完全一致。另外 2 例芯片检测为混合型,软件分型 1 例为 B 型,1 例为 C 型。正常人血清 PCR 产物为阴性,且与芯片杂交无探针荧光信号(图 2)。

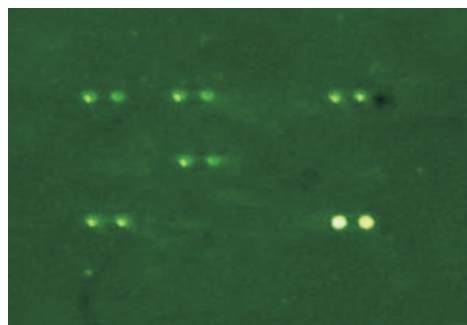


图 2 混合型样品芯片分型(B1、C1 探针同时亮)

Fig.2 Genotyping result of a BC hybrid

2.4 临床分型结果

150 例芯片分型结果为 C 型 103 例, B 型 34

表1 HBV引物与探针序列
Tab.1 Designed sequence of the primers and probes

探针	序列
引物 P1	5'-GTGCCATTTGTTTCAGTGG-3'
引物 P2	5'-GCG TCA GCA AAC ACT TGGC-3'
A 探针	5'- CAGCATCGTGAGGCCCTTTATACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTCTG-3'
B1 探针	5'-CATTTAAACCCTCAGAAAACAAAAAGATGGGGATATTCCCTTAA-3'
B2 探针	5'-CATTTGAACCCTCAGAAAACAAAAAGATGGGGCTACTCCCTTAA-3'
C1 探针	5'-CATTTGAACCCTAATAAAAACCAAACGTTGGGGCTACTCCCTTAA-3'
C2 探针	5'-CATTTAAACCCTAATAAAAACAAAAAGATGGGGCTATTCCCTTAA-3'
D 探针	5'- CAGCATCTTGAGTCCCTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTTG-3'
通用探针 1	5'-GGGCTTCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGAT-3'
通用探针 2	5'-TGG TCGTAGGGC TTTCC-3'

例,B、C混合型 13 例,比例分别为 68.7%,22.7%和 8.7%。未发现 A、D 型。

3 讨论

乙肝病毒 A~D 基因型是 1988 年由 OKAMO-TO 等^[3]人根据不同基因型之间差异 >8%,相同基因型之间同源性 >92%进行划分的,之后又陆续发现了 E-H 型,但极为罕见^[3-5]。传统的测序方法是鉴定基因型的金标准,但操作繁琐,价格昂贵。近年发展起来的基因芯片技术为 HBV 分型检测提供了一个较好的解决办法。本分型芯片的研制关键在于探针的筛选,由于 HBV 各基因型的特征序列大多重叠,例如 B、C 两型差异较大的区域可能是 A、B 两型或 C、D 两型差异极小的区域,因此有必要对 HBV 所有基因型的全基因组序列进行对比,从中找出合适的探针。通过 Omega 软件分析,在各基因型特征序列丰富且差异位点交叉重叠较少的区域内设计了 A、B、C、D 4 种分型探针,并针对各基因型相对保守序列,设计了 2 个通用探针,保证所有基因型的 HBV 序列至少能和其中一条通用探针匹配。由于同型 HBV 之间也存在序列差异,故对亚洲常见的 B、C 两型分别设计了 2 个分型探针,尽量涵盖变异位点,其杂交结果可通过信号强度的差异来综合判定是何种亚型。另外,芯片上要同时进行多个探针的杂交反应,所以设计各探针 Tm 值基本一致,避免了因杂交条件不同引起的信号差异。HBV 探针设计的另一关键环节是保证探针不能与其他病毒细菌有同源性,经过与整个核酸库进行序列比较后,验证了该批探针仅针对乙肝病毒,有极高的特异性。经过上述分析,证实探针可信度较好。

芯片检测的重复性和可靠性非常重要,在重复实验中,单纯型病例其相同的 PCR 扩增产物其 4 次杂交结果基本相同,偶有信号强度略有差异,但分型一致,重复性很好。混合型病例可能由于某一基因型占弱势,从而导致两种分型探针偶尔不同时亮,这也是软件分型只能测出一种基因型的原因。已反馈的测序结果经分型检测,单纯型病例与芯片分型结果完全一致,且作为阴性对照的正常人血清与芯片杂交结果无探针荧光信号显示,验证了芯片的可靠性。

本研究构建的基因分型芯片初步应用于临床所得到的 HBV 基因型分布结果与国内先前报道数据也比较符合^[6]。

参考文献

- [1] SUGAUCHI F, CHUTAPUTTI A, ORITO E, et al. Hepatitis B virus genotypes and clinical manifestation among hepatitis B carriers in Thailand [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17(6):671-676.
- [2] KAO JH, LIU CJ, CHEN DS, et al. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance [J]. *Hepatol*, 2002, 36(2): 303-304.
- [3] NORDER H, COUROUCE AM, MAGNIUS LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotype [J]. *Virology*, 1994, 198(2): 489-503.
- [4] STUYVER L, GENDT S, GEYT C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness [J]. *Gen Virol*, 2000, 81(pt1):67-74.
- [5] Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83 (pt8):2059-2073.
- [6] 范金水, 庄辉, 李远贵, 等. 乙肝病毒基因型在我国部分地区的分布及特点 [J]. *中华流行病学杂志*, 2001, 22(3): 48-351.

[收稿日期] 2006-12-25