

## 乙型肝炎病毒全基因组 PCR 扩增产物的直接测序

陈伟烈 蔡晓莉 魏绍静 杨湛 唐小平

**【摘要】 目的** 建立乙型肝炎病毒全基因组 PCR 扩增产物直接测序的方法并对序列进行分析。**方法** PCR 法扩增乙型肝炎病毒全长基因,PCR 扩增产物纯化后直接进行 DNA 序列测定;将已测定序列的 PCR 扩增产物用上述方法进行再测序以评价该方法的保真性;应用进化树分析及对齐比较等方法分析 HBV 基因型和 YMDD 变异情况。**结果** 20 例标本中有 18 例扩增阳性并得到全长基因组序列;保真性分析表明,本法引起的人为核苷酸突变率约为 1‰;序列分析表明,18 例标本中有 10 例为基因型 B、8 例为基因型 C;2 例出现耐拉米夫定的 YMDD 变异,均为基因型 C。**结论** 乙型肝炎病毒全基因组 PCR 扩增产物直接测序,方法简便,可满足临床和科研的需要。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒;PCR 产物;测序

**Direct sequencing of PCR amplification products of Hepatitis B virus complete genome** CHEN Wei-lie, CAI Xiao-li, WEI Shao-jing, YANG Zhan, TANG Xiao-ping. Institute of Infectious Diseases, the 8th People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: CHEN Wei-lie, Email: c-wl@tom.com

**【Abstract】 Objective** To establish a method for direct sequencing the PCR amplification products of complete genome of hepatitis B virus and analyse the sequences. **Methods** The complete genome of HBV were amplified by PCR. PCR products were sequenced directly. PCR products were resequenced to evaluate the fidelity of the method. The genotype and YMDD mutation of HBV were determined by phylogenetic analysis and alignment. **Results** Eighteen complete genome of HBV were amplified by PCR from 20 samples and the genome were sequenced; the fidelity analysis showed that artificial mutation rate of the method was 1‰. In 18 samples which HBV complete genome were amplified, 10 cases were genotype B, 8 cases were genotype C, 2 cases were YMDD mutation and both were genotype C. **Conclusions** The PCR amplification products of HBV complete genome can be

基金项目:广州市卫生局重点课题(2004Z008)

作者单位:510060 广州市,广东省广州市第八人民医院传染病研究所

通讯作者:陈伟烈, Email: c-wl@tom.com

sequenced directly, this method is simple and convenient which can be used in sequence analysis of HBV complete genome on a large application.

【Key words】 Hepatitis B virus; PCR products; Sequencing

乙型肝炎病毒是最小的人类 DNA 病毒,其基因组全长仅为 3200 个碱基,以部分环状双链存在。其中负链为完整的环链,包括四个相互重叠的读框:前-C/C 基因、P 基因、S 基因和 X 基因。目前,乙型肝炎病毒全基因组测序的方法主要有全基因组克隆测序和多区段扩增拼接测序等,本文拟对乙型肝炎病毒全基因组 PCR 扩增产物直接进行测序,省去克隆和多区段扩增等繁琐操作,为 HBV 分子流行病学以及 HBV 变异等方面的研究提供简便、经济的手段。

## 材料与方法

### 一、主要材料

1. 血清:收集 20 例本院门诊或住院乙型肝炎患者血清,血清 HBV DNA 滴度  $10^5 \sim 10^9$  拷贝/ml,血清保存于  $-70^\circ\text{C}$  冰箱备用。

2. 主要试剂:乙型肝炎病毒全基因组 PCR 扩增引物设计参照文献 1,测序引物使用 Primer Premier 5.0 软件设计,序列见表 1,由上海生物工程有限公司合成;HBV 全长基因组 PCR 扩增和测序策略见图 1。DNA 提取试剂盒(QIAamp Blood Mini Kit, Qiagen, 德国), LA Taq 酶(TaKaRa, 大连),凝胶回收试剂盒(E. Z. N. A Gel Extraction Kit, 美国 Omega Bio-Tek 公司),测序试剂盒(BigDye Terminator Sequencing Kit V3.1, ABI, 美国)。

表 1 PCR 和测序引物

引物	序列(5'→3')	位点(nt)
P1(+)	TGGTGGCTCCAGTTCAGG	61~78
P2(-)	TTGGTAACAGCGGCATAAA	806~788
P3(+)	CCTCAGTCCGTTTCTCTTGG	651~670
P4(-)	GATCCAGTTGGCAGCACA	1404~1387
P5(+)	TGCCAAGTGTGTTGCTGACG	1174~1192
P8(-)	AAGGAGTTTGCCATTTCAGG	2538~2520
P9(+)	GAAGAACTCCCTCGCCTCG	2373~2391
P10(-)	TTCCTGACTGCCGATTGG	3154~3137
P11(+)	GGGAACAAGATCTACAGCATG	2830~2850
P12(-)	GAGAGAAGTCCACCACGAGTC	271~251
PBV1(+)	CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTTCACCTCTGCCTAATCA	1821~1841
PBV2(-)	CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGG	1823~1806

注:PBV1 和 PBV2 为 HBV 全长基因 PCR 扩增引物,余为正反方向测序引物;AAGCTT 为 Hind III 酶切位点。

3. 主要仪器:3100-Avant 型遗传分析仪、2700 型 PCR 仪(ABI, 美国);凝胶成像及分析系统(VL 公司, 法国);GeneQuant pro RNA/DNA 定量分析仪(安玛西

亚,瑞典);快速真空浓缩仪(Eppendorf,德国)。

## 二、方法

1. HBV 全基因的 PCR 扩增:德国 Qiagen 公司的 QIAamp Blood Mini Kit 抽提血清中 HBV DNA;PCR 反应体系 50  $\mu$ l, 包含以下成分:10  $\times$  LA PCR Buffer 5  $\mu$ l、LA Taq(5 U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l、dNTP Mix(10 mmol/L) 2  $\mu$ l、引物 PBV1 和 PBV2 (25  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ l、模板 DNA 5  $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 33.5  $\mu$ l;PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 50 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 4 min, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 与 Marker 对照判断无误后, 切下特异性扩增带, 用美国 O-MEGA 公司的 Gel Extraction Kit 试剂盒回收产物。产物回收后测定 DNA 的纯度和浓度。

2. 序列测定和分析: 用表 1 所列测序引物作为正、负链测序引物, 以提纯的 PCR 产物为模板, 用美国 ABI 公司 BDT V3.1 荧光标记末端终止循环测序试剂盒, 在 ABI 公司 2700 型 PCR 仪上进行测序反应, 反应产物经纯化后用 ABI 公司 3100-Avant 型 DNA 序列分析仪测定序列。序列数据使用 ABI 公司的 Sequencing Analysing 5.0 软件进行分析; 用 DNAStar 软件包进行序列的拼接、比对, 进化分析应用 ClustalX 软件。

3. 保真性分析: 将已测定全长基因组序列的两份标本重新用上述方法进行再测序, 比较序列间的差异, 分析方法本身引起的序列突变率。

## 结 果

### 一、HBV 全基因扩增结果

20 例患者中有 18 例均扩增出 3.2 kb 左右大小的 DNA 片段, 与预期相吻合(图 2)。

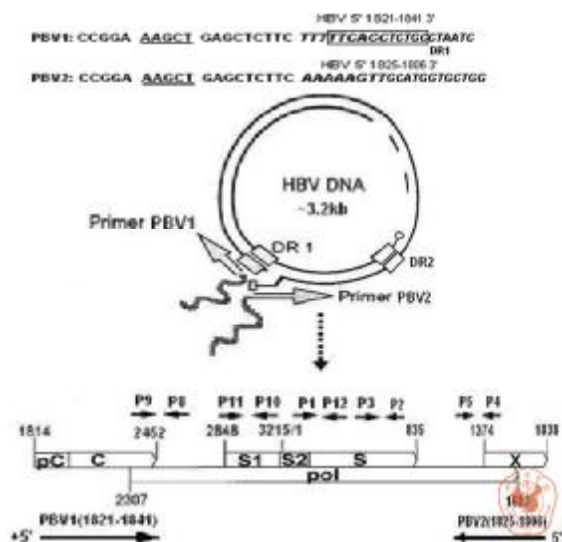


图 1 HBV 全长基因组 PCR 扩增和测序策略

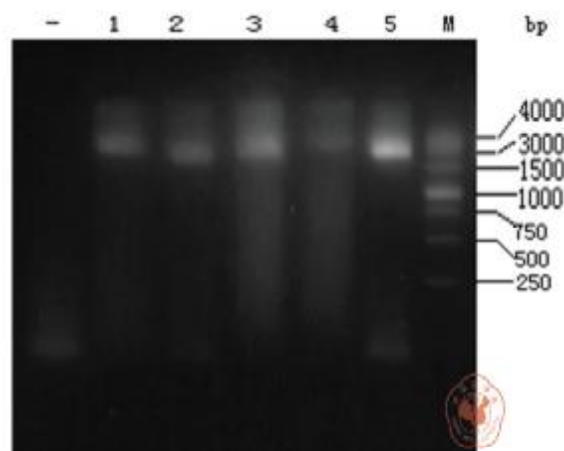


图2 HBV 全基因组 PCR 扩增部分产物电泳图

## 二、测序结果的分析

1. HBV 基因组系统学分析: 所测 18 株 HBV 全基因序列与 GenBank 中各基因型 HBV 参考株全基因序列系统进化树分析表明, 18 株 HBV 中有 10 株为基因型 B (DQ448619 ~ DQ448628)、8 株为基因型 C (GZ-LWC、GZ-XF、DQ246215、GZ-LQY、GZ-CHF、GZ-HJ、GZ-CRY、GZ-DYZ), 见图 3。

2. P 基因 YMDD 基序分析: DQ246215 和 GZ-DYZ 两株 HBV 发生 YMDD 变异, 其中 DQ246215 发生 YIDD 变异、GZ-DYZ 发生 YVDD 变异, 均为基因型 C。

3. 保真性分析: 已测定全长基因组序列的两份标本的再测序结果与原序列进行比较, 统计发生核苷酸突变的情况, 结果表明, 本法引起的人为核苷酸突变率约为 1‰。这种突变仅存在核苷酸替换, 无插入、缺失突变。

## 讨 论

目前乙型肝炎病毒全基因组测序的方法主要有全基因组克隆测序和多区段扩增拼接测序等, 操作繁琐。本文建立了乙型肝炎病毒全基因组 PCR 扩增产物直接测序的方法, 为 HBV 分子流行病学以及 HBV 变异等方面的研究提供简便、准确、经济的手段。

HBV 基因组为双链开环分子, 两链长短不一, 长链(L)完整, 为负链, 长度恒定, 约 3200 个核苷酸。短链(S)为正链, 长度可变, 约为长链长度的 50% ~ 100%, 链的延伸按 5' → 3' 顺序进行。在不同分子中短链 3'-端的位置是可变的, 而短链和长链的 5'-端位置固定点为黏性末端, 通过 250 ~ 300 个核苷酸碱基配对, 以维持 DNA 分子的环状结构。在黏性末端两侧, 两链 5'-端各有一个由 11 个 bp 组成的直接重复序列 (Direct repeat DR) 5'-TTCACCTCTGC-3', 该 DR 位于第 1824 个核苷酸者称 DR1, 位于第 1590 个核苷酸者称 DR2, 在病毒复制中起作用。

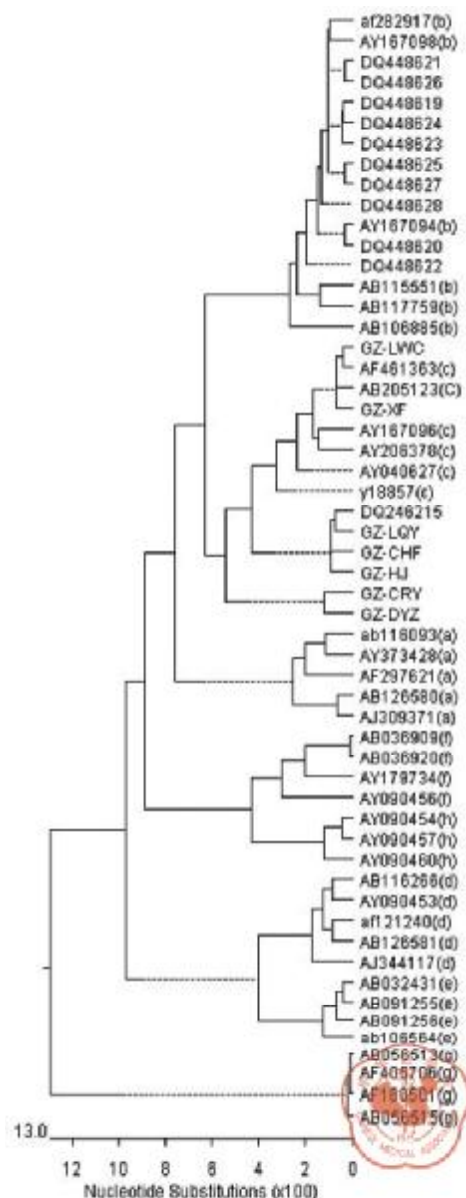


图3 所测标本全基因序列与各基因型  
HBV 参考株全基因序列的系统进化分析

HBV 这种不完整的双链结构使得对其全长基因组的 PCR 扩增比较困难。本文采用 Gunther 的方法<sup>[1]</sup>, 在 HBV 负链开环缺口处设计了一对引物, 成功扩增出了 HBV 全长基因组分子。常规 PCR 扩增的目的片段多不超过 1 kb, 而且一般的 Taq 酶不具有 3'→5' 外切酶活性, 故不能有效精确地扩增长目的片段; 有些耐热 DNA 聚合酶虽具有 3'→5' 外切酶活性, 保真性比较高, 但它们的扩增效率比较低, 不适用于病毒滴度低的临床标本。本实验选用具有高保真性能的 TaKaRa LA Taq™ DNA 聚合酶, 该酶具有 3'→5' 外切酶活性, 能纠正错误掺入的核苷酸, 其保真性能是常规使用的 Taq 酶的 5 倍以上, 而扩增效率又与之相当。有文



献报道本文所用方法可将含有  $10^2$  个拷贝分子的质粒模板有效的进行扩增<sup>[2]</sup>,说明此法的敏感性高。在 DNA 测序试剂盒方面,本实验选用美国 ABI 公司的 Big-Dye Terminator v 3.1 试剂盒,该试剂盒是 DNA 测序的标准试剂盒,适用于所有类型 DNA 模板的测序(包括 PCR 产物测序),对于长片段测序更具优势。本法的保真性分析表明:核苷酸突变率约为 1‰,且这种突变仅存在核苷酸替换,无插入、缺失等现象,说明利用本法进行 HBV 全长基因测序的准确性高、重复性好。同时 PCR 实验设置对照,从方法学上保证了基因序列的可靠性。

HBV 在宿主体内长期存在时多数表现为一异质性群体,故以此为模板扩增出的 PCR 产物也应为一异质性分子群体<sup>[3]</sup>。利用 HBV 全长基因 PCR 扩增产物直接测序,反映的是宿主体内优势病毒株的序列,不能代表整个病毒感染株的序列情况。而将 PCR 产物克隆入载体进行测序的方法,反映的是某单一病毒株的序列,也不能代表整个病毒感染株的序列情况。至于 PCR 扩增产物直接测序与克隆测序结果之间的差异性,本文没有进行。

到目前为止,确定的 HBV 基因型已有 A~H 8 个。此外,还发现了 A/D, B/C, Ba 和 Bj 等不同重组体。基因型有一定的地域分布,亚洲东部以 B、C 流行为主<sup>[4]</sup>,我国南方 B 型占优势、北方 C 型为主<sup>[5,6]</sup>,本实验结果显示广东地区 B 型比例(10/18)较高,而 C 型比例(8/18)较低,说明各地的优势基因型存在较明显的差异,与报道一致。

## 参 考 文 献

- 1 Gunther S, Li BC, Miska S, et al. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol*, 1995, 69: 5437-5444.
- 2 郭进军, 黄爱龙, 赵中夫, 等. 全长乙型肝炎病毒基因组的扩增及序列分析. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11: 592-594.
- 3 Liu CJ, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B virus variants in patients receiving lamivudine treatment with breakthrough hepatitis evaluated by serial viral loads and full-length viral sequences. *Hepatology*, 2001, 34: 583-589.
- 4 Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus-large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis*, 1997, 17: 1285-1293.
- 5 范金水, 庄辉, 李远贵, 等. 我国 8 城市 HBsAg 阳性和阴性乙型肝炎患者的病毒血清型和基因型分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1998, 18: 88-91.
- 6 Ding X, Mizokami M, Yao G, et al. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology*, 2001, 44: 43-47.
- 7 刘映霞, 胡国龄, 谭德明. 湖南省乙肝病病毒基因型分布及临床意义. *湖南医科大学学报*, 2002, 27: 29-31.
- 8 陈伟烈, 蔡晓莉, 魏绍静, 等. 基因芯片技术在乙肝病病毒基因型及 YMDD 变异检测中的应用. *中国实验诊断学*, 2007, 11: 207-212.
- 9 樊和斌, 郭亚兵, 杨洁, 等. 慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型及其临床意义. *第一军医大学学报*, 2005, 25: 229-230.

(收稿日期: 2008-06-21)

(本文编辑: 王丹静)

陈伟烈, 蔡晓莉, 魏绍静, 等. 乙型肝炎病毒全基因组 PCR 扩增产物的直接测序[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2009, 3(1): 20-25.