

基因芯片技术检测拉美夫定相关的 HBV 变异

徐宜英**, 任莉莉

(深圳市人民医院临床医学研究中心 深圳 518020)

Detection of HBV Mutation Associated with Lamivudine By Gene Chips

XU Yi-ying, REN Li-li

(Clinical Research Center, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China)

Abstract: In order to study the feasibility of gene chips technology in the detection of HBV mutation associated with lamivudine, we detected the mutation of HBV in peripheral blood of 30 patients treated with lamivudine for at least half a year by gene chips. The result was compared with that from direct sequencing. Both results are highly coincident. The rate reaches 100% while detecting single strain of virus infection, and 85% in multi-strains virus infection. Gene chip technology is quite valuable and practical in future clinic.

Key words: Gene chip; Lamivudine; Gene mutation

关键词: 基因芯片 拉美夫定 基因突变

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0410-03

拉美夫定 (Lamivudine) 是新一代核苷类似物, 能够迅速降低慢性乙型肝炎病人的血清 HBV DNA 水平, 但是 Lamivudine 治疗 12 个月后, 14%~39% 的患者都会出现抗药性^[1-3], 病情会有反复, 用药不再有效。已有的研究表明, 通过检测患者血液中的病毒突变情况, 轮流使用干扰素, Lamivudine, Fanciclovir 丙种球蛋白等, 可以得到很好的治疗效果^[4]。本研究中, 我们采用拉美夫定耐药位点基因芯片, 对 44 例慢性乙型肝炎病人进行了 HBV 突变检测, 并应用传统的 DNA 测序的方法进行验证, 结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

44 例慢性乙型肝炎患者血清标本, 其中男性 24 例, 年龄 42 ± 2.67 岁, 女性 20 例, 年龄 38 ± 4.671 岁, 诊断标准均符合 1995 年北京市第五次全国传染病和寄生虫病会议修订的标准^[5]。入选者均有半年以上的 HBsAg 和 HBeAg 双阳性史, 服用拉美夫定 100mg/d, 其中 30 例为服用拉米夫定 6 个月以上

患者, 其中 12 例为治疗 6-9 个月患者, 8 例为治疗 9-12 个月患者, 10 例为治疗 12-18 个月患者。另有 14 例服用一般性保肝、降酶药物。采血 3mL, 收集血清。-20℃冰箱保存。

拉美夫定耐药基因芯片及配套杂交试剂盒由深圳益生堂生物有限公司提供。

1.2 基因芯片检测

1.2.1 HBV DNA 的提取采用常规酚氯仿抽提法

1.2.2 荧光标记应用 Cy5 标记的 dCTP, 标记 PCR 引物, 扩增含拉美夫定相关性 HBV 变异位点的核苷酸片断。PCR 反应体系为: PCR 反应混合物为 17.5μL, Taq 酶 0.3μL, UNG 酶 0.3μL, 模板为 5μL。PCR 反应条件为: 37℃ 10min; 94℃ 10min; 之后 94℃ 30s, 55℃ 20s, 72℃ 20s, 循环 40 次; 72℃ 延伸 5min。凝胶电泳检测 PCR 结果。

1.2.3 芯片杂交: 取 9μL 阳性 PCR 产物, 加预热的杂交液 9μL, 混匀后置 95℃ 变性 5min, 立即置于冰上。取 18μL 滴加在芯片的点样区, 盖上盖玻片, 防止气泡产生。放入湿润的杂交舱, 52℃ 杂交 40min。

1.2.4 洗脱: 按试剂盒说明配制洗脱液 1、2, 置于

45℃水浴。杂交后的芯片置洗脱液 1 中 15 min, 取出后甩去液滴, 置于洗脱液 2 中 10min。取出芯片, 晾干。

1.2.5 扫描分析: 将晾干之玻片用 GenePix4000B 扫描仪扫描, PMT 与激光强度设置分别设定为 600 与 10, 激发波长为 532nm; 扫描图像用扫描仪自带的图像分析软件或 Imagene 等专用图像分析软件对扫描结果进行定量分析, “乙型肝炎病毒 DNA 与拉美夫定耐药基因芯片检测试剂盒结果分析” 软件进行结果报告。

1.2.6 HBV DNA P 基因扩增: 采用半巢式扩增, 扩增及测序引物由上海生工生物有限公司合成, 引物核酸序列如下: 正向引物 P4: 5'-AAGGTATG-TTGCCCGTTTGTCCCTC-3', 反向引物 P7: 5'-CCA ATTACATATCCCATGAAGTTAAGG-3', 反向引物 P10: 5'-CAAGATGTTGTACA-GACTAGG-3'。首次扩增时采用 P4、P7 为引物, 扩增片段为 438 bp。PCR 反应体积为 30μL, 含 20mmol/L 的 Tris(pH8.3), 50 mmol/L 的 KCl, 2 mmol/L 的 MgCl₂, 18mmol/L 的 NaCl, 0.2 mmol/L 的 ddNTP, 0.01% 的明胶, 正义和反义引物各 10pmol, 1 单位的 Taq 酶和 2μL 的 DNA 模板。PCR 程序如下: 94℃预变性 5min; 94℃变性 30s, 68℃反应 30s, 循环 25 次, 最后延伸 5min。第二次扩增时采用 P4、P10 为引物, 扩增片段为 335bp。除引物外, PCR 反应体系同第一次扩增。

1.2.7 HBV 序列测定: 收集 100-120μL PCR 产物, 由上海生工生物有限公司进行测序检测。

2 结果与讨论

2.1 44 例 HBV 患者临床指征

将 30 例经拉美夫定治疗及未经治疗的 14 例 HBV 患者按治疗时间分为四组, 从检测结果来看, 30 份拉美夫定治疗样品中, 两例 HBV 检测阴性, 其余 28 例患者 84 位点中共计 25 个位点发生拉美夫定耐药突变。而 14 例未经拉美夫定治疗的患者血清 HBV 只有 2 位点发生突变。在治疗病例组中, 随着服用拉美夫定时间的延长, 耐药突变的发生率及一个个体内的病毒突变位点均显著增高, 两者呈平行上升趋势(表 1)。同文献报道结果相符^[5]。

2.2 HBV 耐拉美夫定突变芯片杂交结果显示

30 份拉美夫定治疗样品中, 两例 HBV 检测阴性, 25 位点发生拉美夫定耐药突变。14 例未经拉美夫定治疗的患者血清 HBV 均为阳性, 2 位点发生突变。将阳性血样 DNA 直接测序, 25 个芯片突变; 芯片法检测未发现突变的样品亦未能检出

表 1 44 例患者临床症状比较

Table 1 Clinical features of 44 HBV patients during the treatments

Features	Group A(12)	Group B(8)	Group C(10)	Group D(14)
Age(year)	43±5.34	37.54±4.17	38.67±2.35	40.45±4.12
Treatment period	6M	12M	18M	0M
Chronic HBV history	6.72±3.21	8.16±4.20	7.14±2.12	6.55±5.76
ALT(IU/L)	160.38±96.24	28.49±10.21	77.38±11.24	145.56±8.96
HBV DNA(copies/mL)	1.37E7±2.64E7	6.69E6±4.34E6	1.87E7±0.89E7	4.46E7±2.34E7
Sex male	6	4	6	8
Female	6	4	4	6
ELISA markers HBeAg(+)	12	8	10	14
HBeAb(+)	12	8	10	14
Mutation rate	5.55%	25%	56.66%	4.76%

检测发现耐药突变的位点, 测序法亦能检出耐耐药突变; 拉美夫定耐药基因芯片检测试剂盒检测结果与直接测序结果具有很高的符合率。在检测单一病毒株感染时, 两者符合率达到 100%; 检测混合病毒株感染时, 两者符合率在 85% 以上; 具体结果见表 2、3、4。同时, 拉美夫定耐药基因芯片检测试剂盒操作简单方便, 在一个工作日内可以得到 100 个左右样品的相关信息; 乙型肝炎病毒 DNA 及拉美夫定耐药基因芯片检测试剂盒除可检测常见突变外, 还具有检测罕见突变的能力^[6]。

表 2 芯片检测 27 例血样 HBV DNA P 基因 528 位密码子及测序验证结果

Table 2 Results of 528 site of HBV DNA by both chip and direct-sequencing

Site	Results by chips		Results by sequencing		Coincident rate
	Type	Samples	Type	Samples	
528	ttg wild type	12	ttg	12	100%
	ctg wild type	8	ctg	5	
	atg mutation type	7	atg	7	
	ctg,atg mix type	1	ctg,atg	1	100%
	ttg,atg mix type	1	ttg	1	85.7%
Total		27		27	95.2%

表 3 芯片检测 27 例血样 HBV DNA P 基因 552 位密码子及测序验证结果

Table 3 Results of 552 site of HBV DNA by both chip and direct-sequencing

Site	Results by chips		Results by sequencing		Coincident rate
	type	samples	type	samples	
552	atg wild type	12	atg	2	100%
	att mutation type	5	att	18	
	gtg mutation type	1	gtg	1	
	atc mutation type	2	atc	2	60.0%
	ata mutation type	1	ata	1	
	gtg,atg mix type	3	gtg,atg	2	
	att,atg mix type	3	att,atg	1	
gtg,att mix type	1	gtg,att	1	100%	
Total		27		27	90%

表 4 芯片检测 27 例血样 HBV DNA P 基因 555 位密码子及测序验证结果

Table 4 Results of 555 site of HBV DNA by both chip and direct-sequencing

Site	Results by chips		Results by sequencing		Coincident rate
	Type	Samples	Type	Samples	
555 位	gtg wild type	6	gtg	6	100%
	atg wild type	6	atg	1	
	att mutation type	1	att	6	
	ttg wild type	3	ttg	3	
	gtg,atg mix type	1	gtg,atg	11	
Total		27		27	100%

参考文献

- [1] Dienstag J L, Schiff E R, Wright T L, *et al.* Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States [J]. *N Engl*, 1999, 341: 1256-1263.
- [2] Lai C L, Chien R N, Leung N W, *et al.* A one-year trial of Lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group [J]. *N Engl*. 2001,339:61-68.
- [3] Liaw Y F, Leung N W, Chang T T, *et al.* Effects of extended Lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119: 172-180.
- [4] Jarvis B, Faulds D. Lamivudine, a review of its therapeutic potential in chronic hepatitis B [J]. *Drugs*, 1999, 58: 101-141.
- [5] Schalm S W, Heathcote J, Cianciara J, *et al.* Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomised trial [J]. *Gut*, 46:562-568.
- [6] Michael Hogmann, Doing immunoLogy on a chip [J]. *Science*. 2001, 290 (5489): 82.