

DOI:10.16781/j.0258-879x.2021.10.1157

• 技术方法 •

## 自建两轮 PCR 法对低载量 HBV DNA S 区基因的扩增及实验条件优化

何成山, 蒋秀娣, 徐正, 马晨芸, 姚晓阳, 陆志成\*

上海中医药大学附属第七人民医院检验科, 上海 200137

**[摘要]** **目的** 探究低载量 HBV DNA S 区基因扩增的可行性并对实验条件进行优化, 为隐匿性 HBV 感染 (OBI) 患者 HBV DNA S 区基因突变检测提供依据。**方法** 采用传统巢式 PCR 和自建两轮 PCR 方法扩增 6 例低 HBV DNA 载量 (100~200 IU/mL) 和 22 例更低 HBV DNA 载量 (20~99 IU/mL) 的血清样本中 HBV DNA S 区基因, 并对引物序列、引物量、PCR 产物模板稀释倍数、退火温度、PCR 反应循环数、PCR 总反应体系等条件进行优化。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 切割目的条带凝胶进行克隆测序, 然后对克隆测序结果进行核酸序列 BLAST 比对确认。**结果** 设计 3 对巢式 PCR 引物 (P1~P3), 扩增产物理论上包含整个 HBV DNA S 区基因。经过 PCR 扩增条件优化后, 6 例低 HBV DNA 载量的血清样本中仅 2 例经巢式 PCR 扩增出 HBV DNA S 区基因特异性靶序列, 22 例更低 HBV DNA 载量样本无一例扩增成功。自建两轮 PCR 法设计了 P4~P15 共 12 对引物, 扩增产物理论上包含整个 HBV DNA S 区基因。经过 PCR 扩增条件优化并筛选出 P13 为最佳引物后, 6 例低 HBV DNA 载量的血清样本全部扩增出 HBV DNA S 区基因特异性靶序列; 15 例 (15/22, 68.18%) 更低 HBV DNA 载量的样本扩增出 HBV DNA S 区基因特异性靶序列, 经 PCR 产物克隆测序均证实为 HBV DNA S 区基因, 该 15 例样本中 HBV DNA 载量最低为 20.1 IU/mL。**结论** 基于引物 P13 自建的两轮 PCR 法更适用于低载量 HBV DNA S 区基因的扩增, 扩增效率和特异性均优于传统巢式 PCR; 扩增产物可进一步应用于 OBI 者 HBV DNA S 区基因序列突变分析。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒; HBV DNA S 区基因; 聚合酶链反应; 引物; 测序

**[中图分类号]** R 373.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2021)10-1157-07

### Amplification of low-load HBV DNA S-gene by self-built two-round PCR and optimization of experimental conditions

HE Cheng-shan, JIANG Xiu-di, XU Zheng, MA Chen-yun, YAO Xiao-yang, LU Zhi-cheng\*

Department of Clinical Laboratory, Shanghai Seventh People's Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200137, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the feasibility of low-load hepatitis B virus (HBV) DNA S-gene amplification and optimize the experimental conditions, so as to provide a basis for the detection of HBV DNA S-gene mutation in occult HBV infection (OBI) patients. **Methods** HBV DNA S-gene in serum samples of 6 cases with low-load HBV DNA (100-200 IU/mL) and 22 cases with lower-load HBV DNA (20-99 IU/mL) was amplified by traditional nested polymerase chain reaction (PCR) and self-built 2-round PCR. The experimental conditions, such as primer sequences, primer amount, the dilution ratio of PCR product templates, annealing temperature, the number of PCR reaction cycles, and PCR reaction system, were optimized. The PCR amplification product was observed by agarose gel electrophoresis, the target band gel was cut for cloning and sequencing, and then the cloned sequencing result was confirmed by BLAST comparison of nucleic acid sequence. **Results** Three pairs of primers (P1-P3) for nested PCR were designed, and the amplified products theoretically contained the whole HBV DNA S-gene. After optimization of PCR amplification conditions, only 2 of the 6 serum samples with low-load HBV DNA were amplified by nested PCR, and 22 samples with low-load HBV DNA were failed to amplify any fragments. Twelve pairs of primers (P4-P15) were designed for the self-built 2-round PCR, and the amplified products theoretically contained the whole HBV DNA S-gene. After PCR amplification conditions were optimized and P13 was selected as the best primer, all 6 serum samples with low-load HBV DNA and 15 (15/22, 68.18%) samples with lower-load HBV DNA were amplified successfully. The PCR products were confirmed as the HBV DNA S-gene specific target sequences by cloning and

**[收稿日期]** 2021-03-30 **[接受日期]** 2021-08-27

**[基金项目]** 浦东新区科技发展基金 (PKJ2018-Y20), 上海中医药大学附属第七人民医院人才培养计划 (XX2020-13)。Supported by Science and Technology Development Program of Pudong New District (PKJ2018-Y20) and Talent Training Program of Shanghai Seventh People's Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (XX2020-13)。

**[作者简介]** 何成山, 硕士, 技师。E-mail: xiaohechengshan@163.com

\*通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-58670561-6261, E-mail: xiaoluzhicheng@126.com

sequencing. Among the 15 samples, the minimum HBV DNA load was 20.1 IU/mL. **Conclusion** The self-built 2-round PCR based on the primer P13 is more suitable for the amplification of low-load HBV DNA S-gene. The amplification efficiency and specificity are much better than traditional nested PCR. The amplified products can be further applied to analyze HBV DNA S-gene mutation in OBI patients.

[ **Key words** ] hepatitis B virus; HBV DNA S-gene; polymerase chain reaction; primers; sequencing

[ Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(10): 1157-1163 ]

HBV感染已成为世界性的公共卫生问题,2021年WHO发布的数据显示全球慢性HBV感染者已超过2.96亿人,每年大约有82万人死于HBV感染导致的急慢性肝炎、肝硬化、肝细胞肝癌等疾病<sup>[1]</sup>。我国是乙型肝炎大国,2013年国家疾病预防控制中心发布的资料显示,2006年我国有近5亿人感染过HBV,有9300万例乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)携带者<sup>[2-3]</sup>,是世界上HBsAg携带人数最多的国家。值得注意的是,临床上存在一种特殊的HBV感染,即感染者血液中HBsAg阴性而肝脏或血液中HBV DNA阳性,通常HBV DNA载量 $<200$  IU/mL<sup>[4]</sup>,此现象称为隐匿性乙型肝炎病毒感染(occult hepatitis B virus infection, OBI)<sup>[5]</sup>。OBI患者血清中HBsAg用常规的商业化HBsAg试剂盒难以检出,这对临床HBV感染的预防、筛查、治疗和监测及输血安全性带来了巨大隐患<sup>[6]</sup>。OBI的机制尚未阐明,目前病毒基因组中S区基因突变被广泛认为是造成OBI现象的主要原因之一<sup>[7]</sup>。OBI患者临床样本中病毒载量低、HBV DNA S区基因片段长,导致PCR成功扩增出目的基因的难度大。探究扩增低载量HBV DNA S区基因的最佳PCR实验条件,对分析造成OBI现象S区基因的突变和氨基酸置换至关重要。本研究探索并自建了一种扩增低载量HBV DNA S区基因的两轮PCR法,并在扩增效率、特异性等方面与传统巢式PCR进行比较,现报告如下。

## 1 材料和方法

1.1 样本与试剂 收集2017年5月至2018年1月经我院检验科筛选获得的28例OBI患者的血清样本(HBsAg检测无反应性,HBV DNA阳性)。HBsAg采用化学发光免疫分析法(Architect i2000SR全自动免疫分析仪,美国雅培公司)定量检测;HBV DNA采用高灵

敏HBV DNA检测试剂盒(美国PerkinElmer公司)使用实时定量PCR仪(Lightcycler-480 II,瑞士罗氏公司)进行检测。高灵敏HBV DNA检测试剂盒的定量检测线性范围为 $2.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^9$  IU/mL,其最低检出限为10 IU/mL。HBV DNA载量 $>20$  IU/mL即为阳性。本研究通过我院医学伦理委员会审批(2018-IRBQYYS-020),因研究的血清样本为经临床检测后的废弃样本,且不涉及泄露患者的个人信息问题,故予以知情同意。

1.2 核酸模板制备 采用核酸磁珠分离提取试剂盒(美国PerkinElmer公司)提取血清DNA,采用微量紫外分光光度计(NanoDrop 1000,美国ThermoFisher Scientific公司)检测核酸浓度和纯度。

1.3 引物设计 从NCBI(National Center for Biotechnology Information)网站([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/))下载我国人群广泛流行的HBV基因型(B型和C型)序列,采用Primer 5软件设计巢式PCR引物和两轮PCR引物,引物序列见表1。巢式PCR引物设计了3对(P1~P3),扩增产物理论上包含整个HBV DNA S区基因。两轮PCR引物设计了3条正向引物、4条反向引物,共计组合12对引物(P4~P15),扩增产物理论上包含整个HBV DNA S区基因。所有引物均由上海华津生物科技有限公司合成。

1.4 巢式PCR扩增反应 第一轮反应:反应体系为20 ng DNA模板、10  $\mu$ L Taq DNA聚合酶预混合物(TaKaRa Taq Version 2.0 plus dye,包含dNTP)、2  $\mu$ L引物P1(本研究中所有引物浓度单位均为pmol/ $\mu$ L),补加DEPC水至20  $\mu$ L。反应条件为预变性98  $^{\circ}$ C 30 s;变性98  $^{\circ}$ C 10 s、退火55  $^{\circ}$ C 30 s和延伸72  $^{\circ}$ C 40 s,循环30次。

第二轮反应:第一轮PCR产物1  $\mu$ L,引物P2 1  $\mu$ L,其余条件与第一轮反应相同。

第三轮反应:第二轮PCR产物1  $\mu$ L(1:10稀释),引物P3 1  $\mu$ L,退火58  $^{\circ}$ C 30 s,其余条件与第一轮反应相同。

表 1 巢式 PCR 和自建两轮 PCR 的引物序列

Tab 1 Primer sequences for nested PCR and self-built 2-round PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Location	Target fragment length/bp
Nested PCR			
P1	Forward: CACCAAACCTCTGCAAGATCCC	16-36	1 075
	Reverse: GCCTGCTTAGATTGAATACATGC	1 068-1 090	
P2	Forward: CTA CTGCTCTCCCTTATCGTCA	101-123	761
	Reverse: CCCATCTCTTTGTTTTGTTAGGG	839-861	
P3	Forward: ACATGGAGAACATCACATCAGGA	155-177	654
	Reverse: TTGGTAACAGCGGTA AAAAAGG	788-808	
2-round PCR			
P4	Forward: TCATCCTCAGGCCATGCAGT	24-43	802
	Reverse: ACCCAAAGACAAAAGAAAATTGGT	802-825	
P5	Forward: TCATCCTCAGGCCATGCAGT	24-43	1 134
	Reverse: CGRGCAACGGGGTAAAGG	1 140-1 157	
P6	Forward: TCATCCTCAGGCCATGCAGT	24-43	1 172
	Reverse: TTGCRTCAGCAAACACTTGG	1 176-1 195	
P7	Forward: TCATCCTCAGGCCATGCAGT	24-43	1 258
	Reverse: GAGTTCCGCAGTATGGATCGG	1 261-1 281	
P8	Forward: CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC	56-85	770
	Reverse: ACCCAAAGACAAAAGAAAATTGGT	802-825	
P9	Forward: CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC	56-85	1 102
	Reverse: CGRGCAACGGGGTAAAGG	1 140-1 157	
P10	Forward: CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC	56-85	1 140
	Reverse: TTGCRTCAGCAAACACTTGG	1 176-1 195	
P11	Forward: CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC	56-85	1 226
	Reverse: GAGTTCCGCAGTATGGATCGG	1 261-1 281	
P12	Forward: CCTKCTCGTGTACAGGCCG	187-206	639
	Reverse: ACCCAAAGACAAAAGAAAATTGGT	802-825	
P13	Forward: CCTKCTCGTGTACAGGCCG	187-206	971
	Reverse: CGRGCAACGGGGTAAAGG	1 140-1 157	
P14	Forward: CCTKCTCGTGTACAGGCCG	187-206	1 009
	Reverse: TTGCRTCAGCAAACACTTGG	1 176-1 195	
P15	Forward: CCTKCTCGTGTACAGGCCG	187-206	1 095
	Reverse: GAGTTCCGCAGTATGGATCGG	1 261-1 281	

K and R are degenerate bases, where K is G/T and R is A/G. PCR: Polymerase chain reaction.

采用 PCR 扩增仪 (Veriti Thermal Cycler 梯度 PCR 仪, 美国 ABI 公司) 进行扩增, 然后对 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。将 DNA Marker 2000 (上海翊圣生物科技有限公司) 和 PCR 产物分别加入各泳道中 120 V 恒压电泳 30 min。待电泳结束后将胶块置于凝胶成像仪 (ImageQuant LAS4000, 美国 GE 公司) 上观察并记录实验结果。

1.5 自建两轮 PCR 扩增反应 第一轮反应: 反应体系为 20 ng DNA 模板、25  $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶预混合物、2  $\mu$ L 引物, 补加 DEPC 水至 50  $\mu$ L。反应条件为预变性 98  $^{\circ}$ C 30 s; 变性 98  $^{\circ}$ C 10 s、退火 55  $^{\circ}$ C 30 s 和延伸 72  $^{\circ}$ C 65 s, 循环 30 次。

第二轮反应: 第一轮 PCR 扩增产物 1  $\mu$ L (1 : 10 稀释), 引物 1  $\mu$ L, 退火 62  $^{\circ}$ C 30 s, 循环 25 次, 其余条件与第一轮反应相同。

两轮 PCR 扩增产物的电泳验证过程与上述巢式 PCR 扩增产物相同。

1.6 PCR 产物克隆测序 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后切割目的条带凝胶, 采用 DNA 胶回收试剂盒 [DiaSpin 柱式 PCR 产物纯化试剂盒, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 进行 PCR 产物纯化。采用 T 载体克隆试剂盒 (T-Vector pMD<sup>TM</sup> 18, 大连宝日医生物技术有限公司) 对纯化后的 PCR 产物 DNA 片段与 T 载体进行连接, 然后将连接物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞 (苏州新赛美科技生物公司), 并涂布至含氨苄青霉素的 LB 琼脂培养平板上, 倒置、过夜培养。次日, 挑选平板上单个菌落, 每个样本挑取 5 个单克隆菌落接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 置于 37  $^{\circ}$ C 摇床充分振荡培养。然后将单克隆菌液送至苏州金唯智生

物科技有限公司测序(测序仪型号为ABI3730,美国ABI公司)。利用NCBI网站(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对PCR扩增产物克隆测序结果进行核酸序列BLAST比对。

## 2 结果

**2.1 巢式PCR扩增结果** 先采用两轮巢式PCR引物(P1、P2)及反应体系,挑选经检测HBV DNA载量低的样本(100~200 IU/mL)和阳性对照(HBV DNA载量 $>1 \times 10^6$  IU/mL)验证巢式PCR引物的特异性和反应条件。结果如图1A所示,阳性对照经扩增出现清晰的目的条带,低病毒载量样本经两轮巢式PCR扩增产物较少,条带亮度较浅,需进行第三轮巢式PCR扩增。

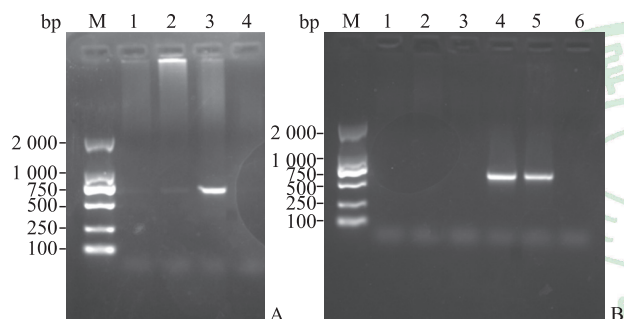


图1 6例HBV DNA载量较低血清样本的巢式PCR扩增效果

Fig 1 Amplification results of nested PCR in 6 serum samples with low-load HBV DNA

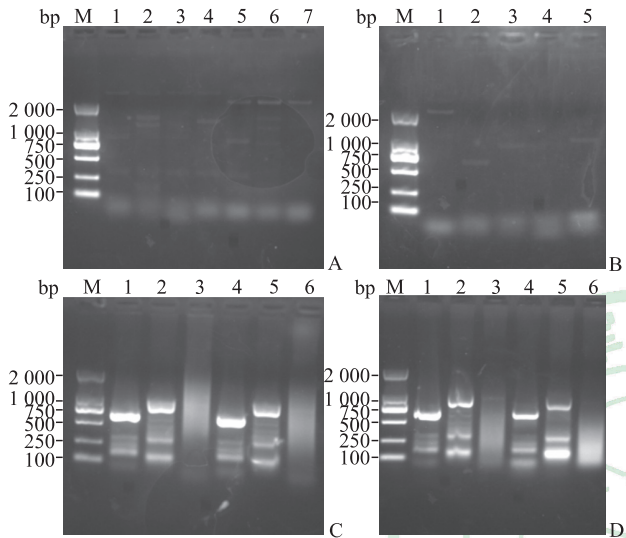
A: The agarose gel electrophoresis results for 2 rounds of nested PCR amplification. 1, 2: Low viral load samples; 3: Positive control; 4: Negative control. B: The agarose gel electrophoresis results for 3 rounds of nested PCR amplification. 1-6: Low viral load samples S1-S6. HBV: Hepatitis B virus; PCR: Polymerase chain reaction; M: DL2000 molecular weight marker.

6例低病毒DNA载量样本分别为S1(123 IU/mL)、S2(165 IU/mL)、S3(104 IU/mL)、S4(147 IU/mL)、S5(197 IU/mL)和S6(195 IU/mL),因两轮巢式PCR达不到本研究实验要求,故使用引物P1~P3按照上述三轮巢式PCR条件进行扩增,结果如图1B所示。在6例样本中仅有2例扩增出清晰的目的条带(S4和S5),另外4例样本均未出现任何特异性条带,扩增结果的重复性较差。应用这3对引物和优化的巢式PCR条件,对22例更低HBV DNA载量(20~99 IU/mL)的血清样本进行扩增,均未能扩增出HBV DNA S区基因。

**2.2 自建两轮PCR扩增结果** 针对国内主要HBV感染基因亚型的相对保守位点设计12对引物,选择上述巢式PCR重复多次目的条带均光亮且测序结果正确的S4样本(147 IU/mL)作为DNA模板。使用12对引物P4~P15对S4样本进行第一轮PCR扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳(图2A、2B)显示,引物P4、P5、P6、P7、P8和P9均存在大量的非特异性条带;引物P10和P11第一轮PCR产物条带的位置( $>2000$  bp)均为非特异性扩增;引物P14未出现特异性条带;引物P12、P13和P15(目的基因片段大小分别为639、971和1095 bp)经第一轮PCR,扩增产物条带分别位于700、1000和1100 bp左右,扩增片段与目的基因片段大小相似,但条带亮度较淡。切割引物P12、P13和P15目的片段条带胶回收DNA后进行测序分析,因DNA浓度过低无法正常测序。故使用第一轮PCR产物作为模板,分别再次使用相应的引物进行第二轮PCR扩增。引物P12和P13(目的基因片段大小为639和971 bp)扩增后,扩增产物电泳后出现多个亮度不同的条带,但分别在600、900 bp左右位置出现亮度很强的特异性条带,与目的基因条带位置相近(图2C、2D)。切割引物P12和P13第二轮PCR扩增产物(图2C中第1和第2泳道条带)胶回收DNA,进行PCR产物直接测序,测序结果经比对确认为HBV DNA S区基因。使用引物P15经第二轮PCR扩增后未出现任何特异性条带,呈弥散现象。对第一轮PCR扩增产物模板进行最适稀释度的选择,结果显示未稀释与1:10稀释扩增产生的特异性条带的亮度明显强于1:100稀释(图2C、2D)。对PCR总反应体系进行选择发现,50  $\mu$ L总反应体系扩增产生的条带亮度明显强于20  $\mu$ L反应体系(图2D)。

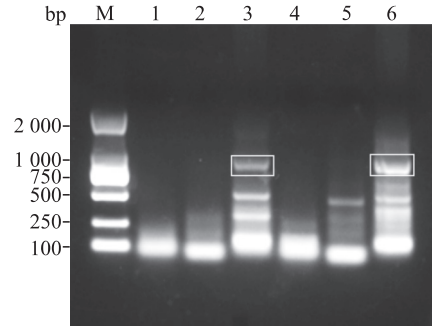
取S1(123 IU/mL)和S2(165 IU/mL)样本,分别使用引物P12、P13和P15进行两轮PCR扩增,进一步验证引物的特异性。两轮PCR扩增的反应体系及条件与上述相同,第二轮PCR扩增中模板为1:10稀释的第一轮扩增产物。使用引物P15和P12对S1和S2样本的两轮PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳证实均为非特异性扩增,并出现较多的引物二聚体(图3)。使用引物P13(目的基因片段大小为971 bp)进行两轮PCR扩增,电泳所示约在1000 bp的位置出现目的条带(图3),切割引物P13扩增产物(第3泳道和第6泳道)胶

回收后进行 DNA 测序, 因样本核酸浓度过低导致测序失败。进一步将第 3 和第 6 泳道条带胶回收后, 将 DNA 与 T 载体连接, 连接物转化至感受态细胞并挑选单克隆菌落进行克隆测序, 测序结果经 BLAST 比对证实为 HBV DNA S 区基因。引物 P13 对 3 例低病毒载量样本 (S1、S2、S4 样本) 的扩增均有较好的特异性, 因此选择 P13 作为最优引物进行后续血清样本 HBV DNA S 区基因扩增。



**图 2 自建两轮 PCR 扩增引物的选择和反应条件的优化**  
**Fig 2 Selection of primers and optimization of reaction conditions of self-built 2-round PCR amplification**

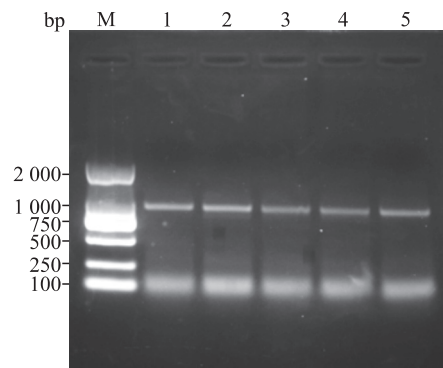
A: The agarose gel electrophoresis results of 1 round of PCR amplification products using primers P4-P10 for S4 samples. Lanes 1-7 are the results using primers P4-P10, respectively. B: The agarose gel electrophoresis results of 1 round of PCR amplification products using primers P11-P15 for S4 samples. Lanes 1-5 are the results using primers P11-P15, respectively. C: The agarose gel electrophoresis results of 2 rounds of PCR with different dilution of templates using primers P12, P13 and P15 for S4 samples. Lanes 1-3 are the results of 2 rounds of PCR amplification using primers P12, P13 and P15, respectively, and product templates from 1 round of PCR without dilution; lanes 4-6 are using primers P12, P13 and P15, respectively, and product templates from 1 round of PCR with 1 : 10 dilution. D: The agarose gel electrophoresis results of 2 rounds of PCR with different amplification system using primers P12, P13 and P15 for S4 samples. Lanes 1-3 are the results of 2 rounds of PCR amplification using primers P12, P13 and P15, respectively, and 1 : 100 dilution of 1 round of PCR product templates in 50  $\mu$ L amplification system; lanes 4-6 are the results of 2 rounds of PCR amplification using primers P12, P13 and P15, respectively, and 1 : 100 dilution of 1 round of PCR product templates in 20  $\mu$ L amplification system. PCR: Polymerase chain reaction; M: DL2000 molecular marker.



**图 3 选择引物 P12、P13 和 P15 的自建两轮 PCR 扩增结果**  
**Fig 3 Amplification results of self-built 2-round PCR using primers P12, P13 and P15**

Lanes 1-3 are the agarose gel electrophoresis results of 2 rounds of PCR using primers P15, P12 and P13 for S1 samples, respectively; lanes 4-6 are the agarose gel electrophoresis results of 2 rounds of PCR using primers P15, P12 and P13 for S2 samples, respectively. The boxes are the gel cut area for recovery. PCR: Polymerase chain reaction; M: DL2000 molecular weight marker.

确定两轮 PCR 使用 P13 引物及 50  $\mu$ L 总反应体系后, 随机挑选 5 例更低 HBV DNA 载量的 OBI 血清样本 A1 (22.8 IU/mL)、A2 (36.7 IU/mL)、A3 (53.5 IU/mL)、A4 (30.5 IU/mL) 和 A5 (28.6 IU/mL) 进行进一步的验证。结果如图 4 所示, 在约 1000 bp 的位置均出现目的特异性条带 (目的基因片段大小为 971 bp), 但条带亮度较弱, 故切割条带胶回收 PCR 扩增产物, 进行 PCR 产物克隆测序。测序结果经 BLAST 比对均为 HBV DNA S 区基因。



**图 4 5 例更低 HBV DNA 载量血清样本的自建两轮 PCR 扩增 HBV DNA S 基因的验证结果**  
**Fig 4 Validation results of self-built 2-round PCR amplification for HBV DNA S-gene from 5 serum samples with lower-load HBV DNA**

Lanes 1-5 are the agarose gel electrophoresis results of PCR products for samples A1-A5, respectively. HBV: Hepatitis B virus; PCR: Polymerase chain reaction; M: DL2000 molecular weight marker.

2.3 28例 OBI 血清样本 HBV DNA S 区基因两轮 PCR 扩增结果 采用自建两轮 PCR 法对 28 例 OBI 血清样本 HBV DNA S 区基因进行扩增,其中 6 例低 HBV DNA 载量的样本均成功扩增出特异性靶序列,扩增产物经克隆测序确认为 HBV DNA S 区基因。22 例更低 HBV DNA 载量的血清样本中有 15 例 (68.18%) 成功扩增出 HBV DNA S 区基因,且扩增出的目的基因条带清晰可见,经 PCR 产物克隆测序均证实为 HBV DNA S 区基因。15 例获得成功扩增 HBV DNA S 区基因的样本中有 8 例 HBV DNA 载量 < 30 IU/mL,最低为 20.1 IU/mL。

### 3 讨论

目前我国仍是 HBV 高感染国家,在实验诊断工作中经常会遇到少见的 HBV 血清学表现模式,如 HBsAg 和乙型肝炎表面抗体 (hepatitis B surface antibody, HBsAb) 同时存在、HBsAg 阴性但乙型肝炎 e 抗体 (hepatitis B e antibody, HBeAb) 阳性、HBsAg 阴性但 HBV DNA 阳性、仅乙型肝炎核心抗体强阳性等,甚至不同的诊断试剂检测 HBsAg 结果不一致。这些血清学诊断的少见模式往往与 HBV DNA S 区基因突变,尤其是“a”决定簇内点突变有关<sup>[8]</sup>。HBsAg 阴性而 HBV DNA 阳性此种 OBI 现象的存在对 HBV 感染血清学诊断指标的检测带来极大挑战,也对临床慢性乙型肝炎的预防和筛查、治疗及输血安全性等带来巨大隐患<sup>[6]</sup>。探究和分析造成 OBI 的原因是提高我国 HBV 感染血清学诊断试剂质量的重要环节,而 HBV DNA S 区基因测序是必备的研究手段。

由于 OBI 血清中 HBV DNA 载量很低,HBV DNA S 区基因片段的大小可达 680 bp,采用常规 PCR 技术很难扩增出能供进一步研究分析的 S 区全长基因片段。对从近万份血清样本中筛选获得的 28 份 OBI 血清样本进行 HBV DNA S 区基因测序分析,必须从血清样本中扩增出 S 区全长基因片段。本研究决定采用文献中广泛报道的巢式 PCR 法,这是目前 OBI 临床样本 HBV DNA S 区基因扩增的主流方法。综合文献和我国广泛流行的 HBV 基因型 B 型和 C 型序列,本研究设计了 3 对引物 P1~P3 用于巢式 PCR,并对模板最适浓度、PCR 总反应体系、引物总量、退火温度等实验条件进行优化。然而,6 例低 HBV DNA 载量的血清样本中

仅 2 例经巢式 PCR 扩增出 HBV DNA S 区基因特异性靶序列,22 例更低 HBV DNA 载量的血清样本也无一例扩增成功。分析认为巢式 PCR 失败的原因主要存在以下几个方面:(1) 因荧光定量 PCR 检测试剂盒的核酸提取工艺、引物设计存在差异,导致对 HBV DNA 载量的检测下限有所不同。本研究中采用高灵敏 HBV DNA 检测试剂盒,检测下限可至 10 IU/mL,灵敏度较高。因此,本研究获得的大部分 OBI 血清样本 HBV DNA 载量 < 50 IU/mL,相较大部分文献中 OBI 样本病毒载量更低,从而导致常规巢式 PCR 扩增失败。(2) 在设计巢式 PCR 引物时未能很好地考虑 HBV 基因的多种亚型,本研究中引物的设计主要针对 B 型和 C 型序列。

(3) 采用 20  $\mu$ L PCR 反应体系造成目的基因产物偏少。考虑到三轮巢式 PCR 需多次 PCR 扩增,还会对测序分析的真实性带来影响,故放弃。

针对以上研究出现的问题,本研究选择国内主要 HBV 基因亚型相对保守的位点重新设计引物,3 条正向引物、4 条反向引物,共组合成 12 对,包含 K、R 2 个简并碱基。考虑到 OBI 血清中 HBV DNA 浓度低,一轮 PCR 很难扩增出可满足测序或连接克隆载体的靶 DNA 片段所需的量。因此,将一轮 PCR 产物作为模板,使用相同的引物再次进行 PCR 扩增,以增加产物含量。将临床样本 S4 样本 (HBV DNA 载量 147 IU/mL) DNA 作为模板筛选这 12 对引物扩增的有效性,经过一轮 PCR 只有引物 P12、P13 和 P15 扩增出目的基因,但因目的基因扩增产物较少,无法满足测序和连接载体的要求。使用 P12、P13 和 P15 分别对各自一轮 PCR 扩增的产物再次扩增,两轮 PCR 扩增后,仅 P13 扩增出较为明显的特异性条带。继而,以 P13 为引物,对一轮 PCR 产物模板浓度、引物的量、退火温度、PCR 反应体系等进行了优化,从而确定最佳实验条件。以最佳实验条件对 22 例更低 HBV DNA 载量样本和 6 例低载量的样本进行 HBV DNA S 区基因扩增,6 例低载量的样本全部成功,22 例更低 HBV DNA 载量样本中 15 例扩增出 HBV DNA S 区基因,其中最低 HBV DNA 载量仅 20.1 IU/mL,且所有 PCR 产物均经过测序确认。为了分析 7 例更低 HBV DNA 载量血清样本未获得成功扩增的原因,对原始 7 例样本核酸模板采用高灵敏 HBV DNA 检测试剂盒进行复检,发现 7 例复测后均为阴性。我

们认为,这或许与前期实验中提取的核酸模板未进行分管保存,在后续实验中存在反复冻融现象引起裸露的DNA分子降解有关,也可能是假阳性。

综上所述,本实验自建的两轮PCR法更适用于低HBV DNA载量样本中HBV DNA S区基因的扩增,引物设计简便、有效,扩增效率和特异性均优于传统的巢式PCR。该方法为进一步研究OBI患者HBV DNA S区基因突变、正确解释HBsAg检测失败现象、深入探究HBsAg突变株与OBI的相关性奠定了良好的方法学基础。同时,多轮PCR方法的思路也可扩展于其他目的DNA低载量时的PCR扩增,为科学研究灵敏度高、特异性高的核酸检测试剂提供了理论依据。

#### [参考文献]

- [1] World Health Organization. Hepatitis B[EB/OL]. (2021-07-27) [2021-08-01]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.
- [2] ZHANG K, LIU Y, CHEN R, LI Q, XU Z, SI L, et al. Antigenicity reduction contributes mostly to poor detectability of HBsAg by hepatitis B virus (HBV) S-gene mutants isolated from individuals with occult HBV infection[J]. *J Med Virol*, 2018, 90: 263-270.
- [3] 疾病预防控制局.我国控制乙肝成效显著[EB/OL]. (2013-07-26) [2021-03-21]. <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3582/201307/518216575e544109b2caca07fca3b430.shtml>.
- [4] PAK K, ORDWAY S, TORRES D. Occult HBV infection: a case series at a military treatment facility[J/OL]. *Mil Med*, 2020, 185: e795-e798. DOI: 10.1093/milmed/usz379.
- [5] RAIMONDO G, LOCARNINI S, POLLICINO T, LEVRERO M, ZOULIM F, LOK A S; Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection[J]. *J Hepatol*, 2019, 71: 397-408.
- [6] ELTOM K, ALBEELY A, EL HUSSEIN ARM, ELKHIDIR I M, ENAN K. Occult hepatitis B virus infection in Sudan: a systematic review and meta-analysis[J]. *JGH Open*, 2020, 4: 800-807.
- [7] MAK L Y, WONG D K, POLLICINO T, RAIMONDO G, HOLLINGER F B, YUEN M F. Occult hepatitis B infection and hepatocellular carcinoma: epidemiology, virology, hepatocarcinogenesis and clinical significance[J]. *J Hepatol*, 2020, 73: 952-964.
- [8] ZHANG L, CHANG L, LAPERCHE S, JI H, ZHAO J, JIANG X, et al. Occult HBV infection in Chinese blood donors: role of N-glycosylation mutations and amino acid substitutions in S protein transmembrane domains[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8: 1337-1346.

[本文编辑] 杨亚红