

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2020.05.0564

• 技术方法 •

一种新的同时定量检测乙型肝炎病毒前基因组 RNA 和 DNA 的检测方法

徐博文, 李楠*

海军军医大学(第二军医大学)基础医学院免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室, 上海 200433

[摘要] **目的** 设计并建立一种新的能够同时测定核酸提取物中乙型肝炎病毒(HBV)前基因组RNA(pgRNA)和DNA的检测方法。**方法** 建立检测HBV pgRNA和DNA的探针法双重荧光定量PCR体系,通过DNA凝胶电泳、定量PCR等实验考察该检测体系的特异性和灵敏度,验证以该方法测定HepG2.2.15细胞及其培养上清中HBV pgRNA和DNA的可行性及准确度。**结果** 建立的探针法双重荧光定量PCR体系具有较好的特异性和灵敏度,测定不同稀释倍数的细胞培养上清时,在稀释倍数和测定结果间具有较好的相关性。但该方法更适用于测定细胞培养上清中的HBV pgRNA和DNA,而不适用于测定细胞样本。**结论** 本实验建立的方法能够避免核酸提取物中由于HBV DNA污染造成HBV RNA定量不准的问题,并且在一管PCR反应中同时实现了HBV pgRNA和DNA的双重检测,极大提高了检测效率,具有潜在的临床应用价值。

[关键词] 乙型肝炎病毒;慢性乙型病毒性肝炎;定量聚合酶链反应;双重聚合酶链反应;前基因组RNA;DNA;共价闭合环状DNA

[中图分类号] R 373.21**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2020)05-0564-06

A new method for simultaneous quantitative determination of hepatitis B virus pregenomic RNA and DNA

XU Bo-wen, LI Nan*

Institute of Immunology & National Key Laboratory of Medical Immunology, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To design and establish a new method for simultaneous determination of hepatitis B virus (HBV) pregenomic RNA (pgRNA) and DNA from nucleic acid extracts. **Methods** We established a duplex fluorescence quantitative PCR system to determine HBV pgRNA and DNA. DNA gel electrophoresis and quantitative PCR were used to test the specificity and sensitivity. We tested the feasibility and accuracy by determining the HBV pgRNA and DNA in HepG2.2.15 cells and the culture supernatants. **Results** The established duplex fluorescence quantitative PCR system has a good specificity and sensitivity. When it was used to determine cell culture supernatants with different dilution ratios, the dilution ratios and results were well correlated. However, this method was more suitable for the determination of HBV pgRNA and DNA in cell culture supernatants, rather than cell samples. **Conclusion** Our method can avoid inaccuracy of HBV RNA determination caused by HBV DNA contaminant in nucleic acid extracts, and realize simultaneous detection of HBV pgRNA and DNA in one PCR reaction, which greatly improves the determination efficiency and has potential clinical application value.

[Key words] hepatitis B virus; chronic hepatitis B; quantitative polymerase chain reaction; duplex polymerase chain reaction; pregenomic RNA; DNA; covalently closed circular DNA

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(5): 564-569]

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是引发肝硬化、肝功能衰竭、肝癌的主要原因^[1]。我国HBV感染者约有7 000万人,其中慢性乙型病毒性肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患

者有2 000万~3 000万人^[2]。HBV感染的肝细胞内的共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)是HBV前基因组RNA(pregenomic RNA, pgRNA)的唯一转录模板^[3], pgRNA在

[收稿日期] 2020-03-15

[接受日期] 2020-04-20

[基金项目] 国家自然科学基金(81872232, 81672798)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81872232, 81672798)。

[作者简介] 徐博文, 硕士生。E-mail: supernova.no1@hotmail.com

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871002-38, E-mail: linan@immunol.org

病毒衣壳内反转录合成松弛环状 DNA (relaxed circular DNA, rcDNA), 同时病毒衣壳被包膜包裹形成完整病毒颗粒并释放到细胞外, 然后再侵入感染新的肝细胞, 在细胞核内 rcDNA 被修复为完整的 cccDNA, 开始新一轮复制周期^[4]。上述 HBV 的生命过程揭示肝内 cccDNA 的存在是 HBV 复制活跃的基础。临床研究发现, 肝内能否检测到 cccDNA 是 HBV 是否被彻底治愈的重要指标^[5]。通过肝内穿刺活组织检查可以定量检测 cccDNA, 但穿刺属于有创检查, 不能作为临床常规检查手段。目前临床上已经常规应用一些血清学指标替代有创检测, 如用 HBsAg、HBcAb、HBV DNA 等监测肝内 HBV 的复制水平, 但这些指标均有其局限性。例如, HBV 患者经过核苷类似物治疗后, 血清 HBV DNA 水平可迅速降低到检测下限, 但肝脏活组织检查仍然能检出 cccDNA, 此时若停药, 复发的可能性将增大^[6]。

研究显示血清中存在包含 HBV pgRNA 的类病毒颗粒, 其滴度和经核苷类似物治疗停药后病毒的复发率具有相关性, 有望成为新的临床参考指标^[7]。但是目前尚没有公认的 HBV RNA 的检测方法。部分已发表文献中的检测方法是抽提样品总 RNA, 反转录后再做定量 PCR^[8], 但 RNA 提取物中可能存在 HBV DNA 污染, 从而导致定量结果偏高或假阳性。其他文献在反转录前使用 DNA 酶消化 HBV DNA^[9], 但这一过程能否完全降解 HBV DNA 尚不明确, 此外消化需要稀释 RNA 也可能降低检测灵敏度。本研究设计了一种新的 HBV RNA 检测方法, 该方法不仅能够有效解决 HBV DNA 的污染问题, 还可在一管反应中同时测定细胞培养上清中的 HBV DNA 和 pgRNA, 极大提高了检测效率, 降低了人力、经济成本, 具有潜在的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 引物与探针 为保证本检测方法的通用性, 从 HBV database 网站下载了 8 条不同的 HBV 全基因组序列 (HBV 基因型 A、B、C、D 各 2 条), 对比其共有保守序列设计引物和探针。本方法检测的是包括 rcDNA 和 cccDNA 在内的总 HBV DNA, rcDNA 相较于 cccDNA 在正链有部分缺失, 因此避开 rcDNA 正链缺失部分, 选择 rcDNA 和 cccDNA

共有的双链部分设计上、下游引物和探针, 分别命名为 AF、AR、PA, PCR 产物 seq A 长度为 173 bp, 定位于 HBV 基因组的 S 区; HBV RNA 包括 0.7、2.1、2.4、3.5 kb 4 种不同长度的 5 种 RNA (图 1)^[10-11]。为了特异性检测 pgRNA, 避免其他 RNA 的干扰, 在 pgRNA 5' 端 1 kb 内的区间设计上、下游引物和探针 (这段区间内的序列只有 3.5 kb 全长的转录本才有, 其他较短的 RNA 转录本缺失此段序列, 因此可以实现 pgRNA 的特异性检测), 分别命名为 BF、BR、PB, PCR 产物 seq B 长度为 118 bp, 定位于 HBV 基因组的 C 区。引物、探针由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物探针组 A 的上游引物 AF (方向 5'-3', 下同) 序列为 GTG GTG GAC TTC TCT CAA TTT TCT AG, 下游引物 AR 序列为 TGA GGC ATA GCA GCA GGA TG, 探针 PA 和修饰基团序列为 FAM-ACG CCG CAG ACA CAT-MGB; 引物探针组 B 的上游引物 BF 序列为 CCC TAT CTT ATC AAC ACT TCC GGA, 下游引物 BR 序列为 AGA TCT TCT GCG ACG CGG, 探针 PB 和修饰基团序列为 Texas Red-CGT CTG CGA GGC GAG-MGB。

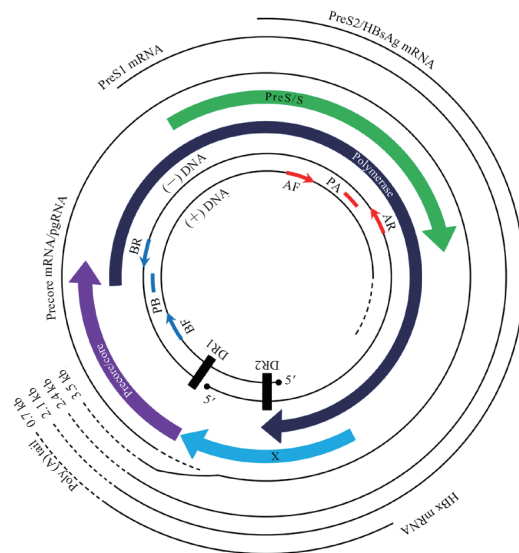


图 1 HBV rcDNA、基因、mRNA 和引物、探针设计位点示意图 (图片修改自文献 [11])

Fig 1 Diagram of rcDNA, genes, mRNAs of HBV and sites of primers and probes (modified from reference [11])

HBV: Hepatitis B virus; rcDNA: Relaxed circular DNA; pgRNA: Pregenomic RNA; HBsAg: Hepatitis B surface antigen; HBx: Hepatitis B virus X; DR1: Direct repeat 1; DR2: Direct repeat 2; AF, AR: Forward and reverse primers of PCR (seq A); BF, BR: Forward and reverse primers of PCR (seq B); PA, PB: Probes for seq A and seq B, respectively; PCR: Polymerase chain reaction

1.2 细胞系及其培养方法 人肝癌细胞系HepG2、SMMC-7721购自中国科学院细胞库;稳转含HBV全长基因组载体、表达类似HBV Dane颗粒^[12]的人肝癌细胞系HepG2.2.15由中国医学科学院基础医学研究所陈坤博士惠赠。HepG2、SMMC-7721细胞常规培养于含10% FBS(美国Gibco公司)的DMEM培养液(美国Gibco公司)。HepG2.2.15细胞常规培养于含10% FBS的MEM培养液(法国Biowest公司)。

1.3 载体 质粒pHBV1.3含有1.3倍全长HBV基因组(基因分型为B型,GenBank登录号:JN406371.1),载体骨架为pBluescript II KS⁺,基因组插入载体的酶切位点分别为EcoR I和Sal I^[13],由中国医学科学院基础医学研究所陈坤博士惠赠。

1.4 样本中RNA、核酸提取及反转录 采用柱式法(RNAfast200总RNA急速抽提试剂盒,上海飞捷生物技术有限公司)提取细胞总RNA,采用柱式法(血清RNA柱式法提取试剂盒,常州百代生物技术有限公司)提取细胞培养上清中的RNA,采用磁珠法(核酸提取或纯化试剂盒,广州达安基因股份有限公司)提取细胞或培养上清中的总核酸。用反转录试剂盒(日本Toyobo公司)将RNA反转录合成cDNA,按照试剂盒说明书常规操作。

1.5 双重定量PCR体系 采用qRT-PCR试剂盒(常州百代生物技术有限公司)进行双重定量PCR,总反应体系为20 μ L,其中10 μ mol/L引物、探针各取0.33 μ L,检测样本1 μ L,其余试剂用量同试剂盒说明书。采用LightCycler 96型自动化荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司)进行检测,荧光通道分别选择FAM检测探针PA和Texas Red检测探针PB。反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性10 min,95 $^{\circ}$ C变性12 s、60 $^{\circ}$ C退火延伸25 s,40个循环。定量方法为绝对定量,标准品为pHBV1.3载体。使用NanoDrop分光光度计(美国ThermoFisher公司)测定浓度并计算拷贝数后,用DNA稀释液[生工生物工程(上海)股份有限公司]按照10倍梯度稀释。最终稀释成 2.13×10^7 、 2.13×10^6 、 2.13×10^5 、 2.13×10^4 、 2.13×10^3 拷贝/ μ L 5个浓度,作为绝对定量标准品。为了比较双重定量PCR和常规定量PCR结果的一致性,分别使用常规、双重定量PCR检测已知浓度为 2.13×10^5 拷贝/ μ L的标准品,记录以下数据(每组重复10次):(1)常规定量

PCR扩增seq A的拷贝数;(2)常规定量PCR扩增seq B的拷贝数;(3)双重定量PCR同时扩增seq A和seq B二者各自的拷贝数。用统计学方法将检测值与实际浓度进行比较。

1.6 DNA凝胶电泳观察PCR产物条带 按2.5%浓度在1 $\times$ TAE缓冲液中加入琼脂糖粉末,用微波炉加热煮沸溶解,冷却至40 $^{\circ}$ C后按1:10 000比例加入核酸染料(上海天能科技有限公司),倒入加样模具凝固成胶块,将胶块放入盛有1 $\times$ TAE缓冲液的电泳槽中。在DNA样品中加入适量6 $\times$ 电泳上样缓冲液(日本TaKaRa公司)配制成工作浓度,加入胶块加样孔中,100 V电泳30 min,于凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)下紫外线曝光拍照。

1.7 验证HepG2.2.15细胞培养上清中含有HBV pgRNA 设计实验如下:(1)磁珠法抽提HepG2.2.15细胞培养上清中的总核酸,用基因引物BR反转录或者不处理(在等量核酸提取物中加入水,使总体积和反转录组相同),然后分别用定量PCR测定seq B的初始拷贝数和反转录后拷贝数,比较二者有无差异;(2)用RNA酶A(RNase A)消化总核酸或不处理,再用BR反转录,分别通过定量PCR测定RNase A处理和不处理组的seq B拷贝数,比较二者有无差异。RNase A消化过程如下:用水将10 mg/mL的RNase A(美国CST公司)原液配制成100 μ g/mL质量浓度,取1 μ L加入9 μ L核酸提取物中,使RNase A达到10 μ g/mL的工作浓度,37 $^{\circ}$ C消化30 min,随后加入1 μ L重组RNA酶抑制剂(日本TaKaRa公司)终止消化。对照组不处理,在9 μ L核酸提取物中加水2 μ L至总体积11 μ L。

1.8 验证通过反转录后拷贝数相减法检测细胞培养上清中HBV pgRNA的可行性 用双重定量PCR检测细胞培养上清核酸提取物中seq A和seq B初始拷贝数,比较二者有无差异;使用BR对核酸提取物反转录或不处理,分别检测seq A的初始拷贝数和反转录后拷贝数,比较二者有无差异。

1.9 验证本方法检测细胞中HBV pgRNA的可行性 抽提HepG2.2.15细胞的总核酸,并用双重定量PCR检测seq A和seq B的初始拷贝数,比较二者有无差异。用基因特异性引物AR对核酸提取物进行反转录并再次测定seq A与seq B拷贝数,比较反转录前后seq A和seq B增加的拷贝数有无差异。

1.10 检验本方法测定浓度和实际浓度的相关性 将HepG2.2.15细胞培养上清用新鲜培养液进行2倍和4倍稀释,然后分别提取培养上清原液、2倍稀释培养上清、4倍稀释培养上清、新鲜培养液(阴性对照)中的总核酸,用双重定量PCR测定HBV DNA、pgRNA的拷贝数,考察不同稀释倍数和检测值之间的相关性。

1.11 统计学处理 应用GraphPad Prism 5.0软件进行数据分析,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用Student *t*检验。对于不同稀释倍数细胞培养上清和实测拷贝数之间的相关性比较,首先将稀释倍数和实测拷贝数均作对数变换,即变成以2为底的稀释倍数或拷贝数的对数,然后对二者进行Pearson相关性分析。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 双重定量PCR体系的建立

2.1.1 最佳的退火、延伸温度为60℃ DNA凝胶电泳显示,当退火温度较低时反应体系会产生118 bp和173 bp目的条带以外的非特异性条带,随着温度升高非特异性扩增减少,60℃时非特异性条带完全消失(图2A);而在60℃、62℃、64℃、66℃等更高退火、延伸温度下,随着温度升高特异性条带减弱,说明60℃具有最佳的扩增效率,上述温度下HepG2和SMMC-7721 cDNA模板均未见扩增条带(图2B);在60℃的退火、延伸温度下,常规定量PCR和双重定量PCR条带位置一致,并且与173 bp的seq A和118 bp的seq B大小相符(图2C)。

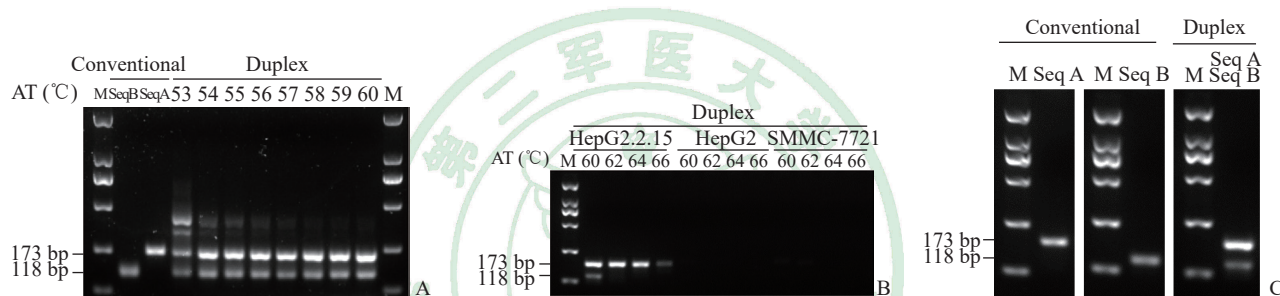


图2 PCR产物的DNA凝胶电泳图

Fig 2 DNA gel electrophoresis images of PCR products

A: Conventional and duplex PCR were performed at 53-60℃ annealing temperature (AT) with templates of HepG2.2.15 cDNA; B: Duplex PCR was performed at 60-66℃ with templates of HepG2.2.15, HepG2, and SMMC-7721 cDNA; C: Conventional PCR of seq A, conventional PCR of seq B and duplex PCR of seq A and seq B were performed at 60℃. M: Marker; PCR: Polymerase chain reaction

2.1.2 双重定量PCR的标准曲线具有较好的扩增效率 把浓度的常用对数作为 x 、Ct值作为 y 绘制标准曲线,seq A的线性回归方程为 $y = -3.352x + 37.329$,扩增效率为99%, $R^2 = 0.9976$;seq B的线性回归方程为 $y = -3.443x + 37.341$,扩增效率为95%, $R^2 = 0.9966$ 。

2.1.3 双重定量PCR与常规定量PCR的定量结果均与实际值一致 检测已知浓度为 2.13×10^5 拷贝/ μL (拷贝数用常用对数变换后为5.328拷贝/ μL)的标准品,检测结果以拷贝数的常用对数表示。常规定量PCR检测seq A的拷贝数为 (5.353 ± 0.058) 拷贝/ μL ,双重定量PCR检测seq A的拷贝数为 (5.343 ± 0.040) 拷贝/ μL ,二者差异无统计学意义($P > 0.05$, $n = 10$);常规定量PCR检测seq B的拷贝数为 (5.355 ± 0.060) 拷贝/ μL ,双重定

量PCR检测seq B的拷贝数为 (5.312 ± 0.048) 拷贝/ μL ,二者差异也无统计学意义($P > 0.05$, $n = 10$)。上述结果与实际值进行比较,差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

2.2 验证HepG2.2.15细胞培养上清中含有HBV pgRNA 使用基因特异性引物BR反转录后,细胞培养上清核酸提取物中的seq B拷贝数为 $(4\,013 \pm 319)$ 拷贝/ μL ;未经反转录处理的对照组seq B初始拷贝数为 $(2\,354 \pm 156)$ 拷贝/ μL ,二者差异有统计学意义($P < 0.01$, $n = 5$)。使用RNase A消化细胞培养上清核酸提取物,经过BR反转录后测定的seq B拷贝数为 $(2\,340 \pm 287)$ 拷贝/ μL ;未经RNase A消化的对照组,经过BR反转录后测定的seq B拷贝数为 $(3\,776 \pm 516)$ 拷贝/ μL ,二者差异有统计学意义($P < 0.05$, $n = 5$)。

2.3 验证通过反转录后拷贝数相减法检测细胞培养上清中 HBV pgRNA 的可行性 细胞培养上清核酸提取物中 seq A 的初始拷贝数为 $(2\ 323 \pm 108)$ 拷贝/ μL , seq B 的初始拷贝数为 $(2\ 354 \pm 156)$ 拷贝/ μL , 二者差异无统计学意义 ($P > 0.05$, $n = 5$); 使用 BR 反转录后, seq A 的拷贝数为 $(2\ 298 \pm 159)$ 拷贝/ μL , 与 seq A 的初始拷贝数相比, 二者差异无统计学意义 ($P > 0.05$, $n = 5$)。

2.4 本方法不适用于检测细胞中 HBV pgRNA 的水平 HepG2.2.15 细胞核酸提取物中 seq A 的初始拷贝数为 $(3\ 528 \pm 166)$ 拷贝/ μL , seq B 的初始拷贝数为 $(2\ 746 \pm 165)$ 拷贝/ μL , 二者差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $n = 5$); 使用 AR 反转录后, seq A 增加的拷贝数为 $(54\ 180 \pm 1\ 115)$ 拷贝/ μL , seq B 增加的拷贝数为 $(3\ 796 \pm 383)$ 拷贝/ μL , 二者差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $n = 5$)。

2.5 本方法的测定结果与细胞培养上清中实际抽提 HBV 总核酸的含量呈现较好的对应关系 对检测结果进行以 2 为底的对数变换, HepG2.2.15 细胞培养上清原液中 HBV DNA 的拷贝数为 (13.052 ± 0.066) 拷贝/ μL , HBV pgRNA 拷贝数为 (11.556 ± 0.270) 拷贝/ μL ; 2 倍稀释培养上清中 HBV DNA 拷贝数为 (11.850 ± 0.125) 拷贝/ μL , HBV pgRNA 拷贝数为 (10.911 ± 0.520) 拷贝/ μL ; 4 倍稀释培养液中 HBV DNA 拷贝数为 (11.023 ± 0.123) 拷贝/ μL , HBV pgRNA 拷贝数为 (9.834 ± 0.319) 拷贝/ μL ; 阴性对照样本均未检出 HBV DNA 或 pgRNA。对对数转换后的稀释倍数和实测拷贝数进行相关性分析, 稀释倍数和 HBV DNA 拷贝数的相关系数 $r = -0.986\ 1$, $R^2 = 0.972\ 4$ ($P < 0.01$, $n = 15$), 表明稀释倍数与 HBV DNA 拷贝数具有较强的负相关性; 稀释倍数和 HBV pgRNA 拷贝数的相关系数 $r = -0.870\ 2$, $R^2 = 0.757\ 2$ ($P < 0.01$, $n = 15$), 表明稀释倍数与 HBV pgRNA 拷贝数也具有较强的负相关性。

3 讨论

本研究设计了一种新的 HBV RNA 的检测方法, 首先抽提包含 DNA 和 RNA 在内的总核酸, 然后使用基因特异性引物反转录部分 HBV pgRNA, 通过双重荧光定量 PCR 同时定量 HBV 基因组上未经反转录段的 HBV DNA 拷贝数和经过反转录段

的 HBV DNA+pgRNA 拷贝数, 将二者相减间接求得 HBV pgRNA 的拷贝数。PCR-DNA 凝胶电泳结果显示, 本研究设计的双重定量 PCR 体系的最佳退火温度是 $60\ ^\circ\text{C}$, 此时具有较好的特异性和灵敏度。用 $2.13 \times 10^7 \sim 2.13 \times 10^3$ 拷贝/ μL 5 个不同浓度的标准品绘制双重定量 PCR 标准曲线, 2 条标准曲线均有较高的扩增效率 ($\geq 95\%$), 将标准品进一步稀释并测量, 发现 2 条标准曲线的线性范围均可低至 2.13×10^2 拷贝/ μL (结果未显示), 说明本检测体系具有较高的灵敏度。

为了保证本检测方法的准确性, 需要满足以下 2 个条件: (1) 反转录前 seq A 和 seq B 的初始拷贝数相等; (2) 反转录过程对 seq A (即 HBV DNA) 的拷贝数无明显影响。本实验结果表明, 在以 HepG2.2.15 细胞培养上清作为样本时满足上述条件, 因此该方法用于测定细胞培养上清中的 HBV DNA 和 pgRNA 具有可行性; 但是在检测细胞样本时发现 seq A 初始拷贝数 $>$ seq B, 表明在胞内有整合于细胞基因组的 HBV DNA。有研究者对 HepG2.2.15 细胞系进行了基因组和 RNA 水平的二代测序, 结果显示 HepG2.2.15 基因组中整合了 HBV DNA 并且高表达相应的 mRNA^[14], 这和本实验测定结果一致。由于细胞内整合 HBV DNA 的存在, seq A 和 seq B 的初始拷贝数不同, 因此通过拷贝数相减法间接计算 HBV pgRNA 可能会引起偏差。综上所述, 本实验建立的检测体系适合用于测定细胞培养上清中的 HBV DNA 和 pgRNA, 不适用测定细胞样本, 这也是下一步需要改进的问题。

分别检测 HepG2.2.15 细胞培养上清原液、2 倍稀释培养上清、4 倍稀释培养上清中 HBV DNA 和 pgRNA 的水平, 结果显示稀释倍数和实测 DNA 和 pgRNA 拷贝数均存在较强的负相关性, 说明本实验的检测值能够较为客观地反映样本中 HBV DNA 和 pgRNA 的实际浓度, 具有较高的准确性。

研究发现血清 HBV DNA 和 RNA 的综合水平对于判断 HBV 感染阶段、疾病预后具有重要意义^[15], 因此临床实践中往往需要同时检测 HBV DNA 和 RNA。本研究设计的检测方法通过双重荧光定量 PCR, 可一次检出 HBV DNA 和 pgRNA 的水平, 整个过程均可通过全自动化仪器完成, 耗时在 2 h 以内 (已发表文献抽提总 RNA 测定 HBV RNA 的方法中, DNA 酶消化步骤需要额外的人力,

而且会降低检测的灵敏度^[16], 依据笔者经验需额外耗时 40 min, 如另外检测 HBV DNA 所需时间将更长)。本实验提出的方法相比于分别检测 HBV DNA 和 pgRNA 所需的样本量更少(理论上只需后者的一半), 同时耗费的检测试剂及采样管等其他的医疗资源也会更少。

本实验建立的检测体系能够有效避免 HBV DNA 污染对结果的影响, 可同时检测出 HBV DNA 和 pgRNA, 提高了检测效率, 具有操作简单、节省材料和人力等优点, 临床实用性较强。该方法的局限性是整合于细胞基因组的 HBV DNA 可能会对测定结果造成影响, 因此理论上不适用于细胞检测, 更适用于测定细胞培养上清或血清中的 HBV DNA 和 pgRNA。

[参 考 文 献]

- [1] SCHWEITZER A, HORN J, MIKOLAJCZYK R T, KRAUSE G, OTT J J. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013[J]. *Lancet*, 2015, 386: 1546-1555.
- [2] 王贵强, 王福生, 庄辉, 李太生, 郑素军, 赵鸿, 等. 慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2019, 13: 441-466.
- [3] 鲁凤民, 曾婉嘉, 文夏杰, 廖昊, 邹军, 王雷婕, 等. 慢性乙型肝炎抗病毒治疗相关新型标志物及其临床应用[J]. *肝脏*, 2019, 24: 483-486.
- [4] WANG J, HUANG H, LIU Y, CHEN R, YAN Y, SHI S, et al. HBV genome and life cycle[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1179: 17-37.
- [5] NASSAL M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B[J]. *Gut*, 2015, 64: 1972-1984.
- [6] 鲁凤民, 窦晓光, 张文宏, 王福生. 慢性乙型肝炎患者血清HBV RNA检测的临床意义[J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34: 934-938.
- [7] WANG J, SHEN T, HUANG X, KUMAR G R, CHEN X, ZENG Z, et al. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound[J]. *J Hepatol*, 2016, 65: 700-710.
- [8] WU L, WANG W, ZHANG X, ZHAO X, YU G. Anti-HBV activity and mechanism of marine-derived polyguluronate sulfate (PGS) *in vitro*[J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 143: 139-148.
- [9] BUTLER E K, GERSCH J, MCNAMARA A, LUK K, HOLZMAYER V, DE MEDINA M, et al. Hepatitis B virus serum DNA and RNA levels in nucleos(t)ide analog-treated or untreated patients during chronic and acute infection[J]. *Hepatology*, 2018, 68: 2106-2107.
- [10] MITRA B, THAPA R J, GUO H, BLOCK T M. Host functions used by hepatitis B virus to complete its life cycle: implications for developing host-targeting agents to treat chronic hepatitis B[J]. *Antiviral Res*, 2018, 158: 185-198.
- [11] SEEGER C, MASON W S. Molecular biology of hepatitis B virus infection[J]. *Virology*, 2015, 479/480: 672-686.
- [12] SELLS M A, CHEN M, ACS G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 1005-1009.
- [13] YUE X, WANG H, ZHAO F, LIU S, WU J, REN W, et al. Hepatitis B virus-induced calreticulin protein is involved in IFN resistance[J]. *J Immunol*, 2012, 189: 279-286.
- [14] HU X, JIANG J, NI C, XU Q, YE S, WU J, et al. HBV integration-mediated cell apoptosis in HepG2.2.15[J]. *J Cancer*, 2019, 10: 4142-4150.
- [15] HUANG H, WANG J, LI W, CHEN R, CHEN X, ZHANG F, et al. Serum HBV DNA plus RNA shows superiority in reflecting the activity of intrahepatic cccDNA in treatment-naïve HBV-infected individuals[J]. *J Clin Virol*, 2018, 99/100: 71-78.
- [16] GAO M, FENG C, YING R, NIE Y, DENG X, ZHU Y, et al. A novel one-step quantitative reverse transcription PCR assay for selective amplification of hepatitis B virus pregenomic RNA from a mixture of HBV DNA and RNA in serum[J]. *Arch Virol*, 2019, 164: 2683-2690.

[本文编辑] 尹 茶