

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.21.012

文章编号: 1005-8982(2017)21-0066-05

## 焦磷酸测序法和 Sanger 测序法检测 丙型肝炎病毒基因分型的方法学比较

渠滕, 田文君, 刘义庆, 刘春梅, 张庆, 崔朝杰, 邱畅

(山东大学附属省立医院 临床检验医学部, 山东 济南 250021)

**摘要:目的** 探讨焦磷酸测序法检测丙肝分型在临床应用中的准确性和敏感性,评价其方法的优缺点。**方法** 收集 100 例丙肝患者的血浆标本,分装相同的 2 份,通过焦磷酸测序法和 Sanger 测序法分别进行丙型肝炎病毒基因分型的检测,对两种测序方法的结果进行比较。**结果** 焦磷酸测序法和 Sanger 测序法检测 HCV-RNA 基因分型时,100 例标本中,92 例结果一致,8 例结果不一致,一致率为 92%。其中,HCV-RNA 病毒载量  $> 1 \times 10^4$  IU/ml 有 80 例,其测序结果完全一致为 100%,HCV-RNA 病毒载量  $< 1 \times 10^4$  IU/ml 有 20 例,其中焦磷酸测序共检测 20 例,Sanger 测序法共检测 14 例,12 例结果相同。**结论** 焦磷酸测序法检测丙型肝炎病毒基因分型,不仅结果准确可靠,而且与 Sanger 测序法比较,其敏感性更高。此外,焦磷酸测序还可以进行定量分析。

**关键词:** 丙型肝炎;焦磷酸测序;Sanger 测序

中图分类号: R135.2

文献标识码: A

## Comparison of Pyrosequencing and Sanger sequencing in detection of hepatitis C virus genotypes

Teng Qu, Wen-jun Tian, Yi-qing Liu, Chun-mei Liu, Qing Zhang, Chao-jie Cui, Yang Qiu

(Department of Clinical Laboratory Medicine, Shandong Provincial Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250021, China)

**Abstract: Objective** To compare the accuracy and sensitivity of Pyrosequencing and Sanger sequencing in detection of hepatitis C virus genotypes. **Methods** Pyrosequencing and Sanger sequencing were used to detect the hepatitis C virus genotypes using plasma of the same 100 patients, results of the two methods were analyzed. **Results** The results were consistent in 92 of 100 cases when detecting the HCV-RNA genotyping, of which the concordance rate was 92%. There were 80 samples whose HCV-RNA concentration was above  $1 \times 10^4$  IU/ml, with completely consistent sequencing results of the two methods. And there were 20 samples whose HCV-RNA concentration was below  $1 \times 10^4$  IU/ml, all of which were detected successfully by Pyrosequencing, while 14 of which were detected successfully by Sanger sequencing, 12 of which had identical results. **Conclusions** Compared with Sanger sequencing, Pyrosequencing can make results accurate and reliable, and the sensitivity of which is higher. In addition, Pyrosequencing can be used for quantitative analysis.

**Keywords:** hepatitis C; Pyrosequencing; Sanger sequencing

丙型肝炎(丙肝)是一种由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)引起、以肝脏受累为主,肾脏、骨髓和甲状腺等其他器官均可受累的全身性疾病<sup>[1]</sup>。人体感染 HCV 后,因急性丙肝常呈亚临床感染,症状

轻微,常常不能引起患者的重视而导致 50%~80%的丙肝患者发展成为慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC),而 CHC 自发清除病毒的比例很低,如果不能进行及时有效的抗病毒治疗,绝大多数将逐渐发展

收稿日期: 2017-02-20

[通信作者] 邱畅, E-mail: qpinger@163.com, Tel: 15863199632

为肝硬化、肝功能失代偿,甚至肝细胞癌,严重危害患者的健康和生命<sup>[2-3]</sup>。据世界卫生组织报告,全球丙型肝炎流行率平均为 3%,每年新发 HCV 感染 300~400 万例,估计已有 1.3~1.7 亿慢性 HCV 感染者。每年约 35 万人死于与 HCV 感染相关的肝脏疾病。据估计,今后 10~15 年内,丙型肝炎相关死亡将继续上升,到 2015 年丙型肝炎相关死亡将增加 2 倍,2025 年增至 3 倍<sup>[4-6]</sup>。在我国,根据 2006 年全国血清流行病学调查推算,我国一般人群 HCV 感染者约为 560 万<sup>[7]</sup>。目前,PR 方案(聚乙二醇化干扰素  $\alpha$  联合利巴韦林)仍是我国现阶段 HCV 感染者抗病毒治疗的主要方案,可应用于所有基因型 HCV 现症感染,同时无治疗禁忌证的患者。在 PR 治疗基因 1 型、2/3 型患者中,不同基因型患者 RBV 的用量不同,据应答指导治疗(responded guided therapy, RGT)的调整策略也不一样,同时丙型肝炎防治指南(2015 更新版)推荐意见中第 6 条建议抗病毒治疗前应根据病毒载量、基因分型、肝纤维化分期以及有无抗病毒治疗禁忌证等综合评估<sup>[8]</sup>。

目前,HCV 基因分型检测方法主要有直接测序、限制性片段长度多态性分析法(RFLP)、特异性引物聚合酶链反应(PCR)法、特异性探针荧光 PCR 法和基因芯片法等<sup>[9]</sup>。Sanger 测序法采用的就是直接测序法,是一代测序法的经典代表,发展较为成熟,测序片断较长,成本相比较低,但是只能测序,无法准确定量,同时操作耗时、烦琐、通量受局限,在临床应用不方便。焦磷酸测序技术是介于一代测序和二代测序之间的一种测序手段,不仅检测项目灵活可以同一批次检测多个项目,而且焦磷酸测序检测成本较低、耗时短、通量高和灵敏度高,适合临床常规检测的推广,但其测序的片断一般较短 <80 bp(大多数需要检测的与疾病相关的已知基因片断都很短),更适合对特定已知序列的定量分析<sup>[10]</sup>。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2016 年 1 月-2016 年 10 月在本院检测 HCV-RNA 阳性的血浆标本 100 例,采用 COBAS Taq Man 48 全自动病毒载量仪及相关试剂盒(购于瑞士罗氏公司)检测,检测下限为 15 IU/ml,其中, HCV-RNA 病毒载量  $>10^4$  IU/ml 有 80 例, HCV-RNA 浓度  $<10^4$  IU/ml 有 20 例。

### 1.2 主要试剂和仪器

病毒核酸纯化柱试剂盒(德国 Qiagen 公司),焦磷酸测序试剂盒(德国 Qiagen 公司),低温高速台式离心机(德国 Eppendorf 公司),荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),焦磷酸测序仪(Pyro Mark Q24 MDx, 德国 Qiagen 公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 焦磷酸测序** ①设置 Pyro Mark Q24 运行文件:点击新建程序按钮,输入运行的参数,设置测序板面板,从“Tools”菜单中选择“Pre Run Information”,打印测序信息表,关闭运行菜单,拷贝到一个 USB 盘中。将 PCR 产物结合到链霉亲和素 Beads 上:按照 2  $\mu$ l 磁珠加 40  $\mu$ l 结合缓冲液再加 28  $\mu$ l 高纯水配置用于 DNA 亲和反应的 Master mix,加入 70  $\mu$ l 的 Master mix 到 8 联管中,按照设定的 Pyro Mark Q24 程序加入 10  $\mu$ l PCR 产物到每一个孔中,用 PCR8 联盖密封 8 联管,1 400 r/min 摇动 10 min; ②测序引物退火缓冲液的配制:按照每孔 2.5  $\mu$ l 测序引物加 22.5  $\mu$ l 的退火缓冲液进行足量配制,按照设定的 Pyro Mark Q24 程序加 25  $\mu$ l 稀释的测序引物到 Pyro Mark Q24 测序板的孔上; ③单链 DNA 模板的制备:在真空工作站中,1 号槽加入 70%乙醇 50 ml, 2 号槽加入变性缓冲液 40 ml, 3 号槽加入洗液 50 ml, 4 号槽加入高纯水 50 ml, 5 号槽加入高纯水 70 ml。打开真空泵,将真空工具在 5 号位清洗 15 s,移动到 PCR8 联管吸附磁珠 15 s,依次在 1、2 和 3 号位清洗 5、5 及 10 s; ④引物杂交:将真空工具真空阀关闭,放入含有测序引物的 Pyro Mark Q24 测序板中,充分摇动释放磁珠,在 80℃杂交 2 min,室温冷却 10 min; ⑤运行 Pyro Mark Q24 进行测序:按照 Pre Run 运行报告将核酸、酶、底物分别按照合适的体积加入卡夹,打开测序板模块,放入卡夹和测序板,插入 USB 选择主菜单中的“Run”,按“OK”。

**1.3.2 Sanger 测序** 由上海申友生物技术有限责任公司使用 ABI 3730xl 测序仪测序。

### 1.4 统计学方法

数据分析采用 13.0 统计软件,计数资料以率(%)表示,比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2 种测序法的敏感性

血 HCV-RNA 为  $10^4$ 、5 000、2 000 及 1 000 IU/ml,

重复 10 次,血 HCV-RNA  $\geq 2\ 000$  IU/ml 的标本,焦磷酸测序法和 Sanger 测序法能稳定地检测出丙型肝炎病毒的基因分型,阳性检出率均为 100%,且两种方法的序列图谱清晰,满足临床对丙型肝炎病毒基因分型检测的需求;血 HCV-RNA  $\leq 2\ 000$  IU/ml 的标本,焦磷酸测序法无法稳定检出,虽可分出丙型肝炎病毒基因分型,但信号强度低、分辨率差,Sanger 测序法阳性检出率为 0;另外,两种方法检测 10 份健康对照者血浆标本,两种方法均低于检出限。

## 2.2 2 种测序法检测丙型肝炎病毒基因分型的结果比较

将 100 例丙肝患者血浆标本分装相同的两份,通过焦磷酸测序法和 Sanger 测序法分别进行丙型肝炎病毒基因分型的检测,100 例丙肝患者血浆标本检测结果显示:焦磷酸测序法共测出 100 例,未测出 0 例,检出率为 100%;Sanger 测序法测出 94 例,6 例未测出,检出率为 94%。其中,92 例结果一致,8 例结果不一致,总体一致率为 92%。焦磷酸测序法和 Sanger 测序法检测丙型肝炎病毒基因 1b、2a 以及其他型别的检出例数的比较,经  $\chi^2$  检验差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。标本测序结果资料。见表 1。

表 1 2 种测序法检测丙型肝炎病毒基因分型结果比较例(%)

分型	1b	2a	其他分型	合计
Sanger	54(54/100)	36(36/100)	4(4/100)	94(94/100)
焦磷酸	58(58/100)	37(37/100)	5(5/100)	100(100/100)
一致率/%	53(53/100)	36(36/100)	3(3/100)	92(92/100)
$\chi^2$ 值	0.330	0.020	0.120	-
P 值	0.569	0.883	0.733	-

## 2.3 2 种测序法对不同丙肝病毒载量组的检测结果比较

按病毒载量的不同将 100 例患者分为高载量组(HCV-RNA 病毒载量  $> 10^4$  IU/ml)80 例和低载量组(HCV-RNA 病毒载量  $< 10^4$  IU/ml)20 例。2 种方法在两组的丙肝分型检测结果比较(见表 2)。高通量组的 HCV-RNA 病毒载量  $> 10^4$  IU/ml,有 80 例,其测序结果完全一致为 100%,低通量组的 HCV-RNA 病毒载量  $< 10^4$  IU/ml,有 20 例,其中焦磷酸测序法测出 20 例,Sanger 测序法测出 14 例,12 例结果相同,2 例不同。检测高载量丙型肝炎病毒基因时,焦磷酸测序法和 Sanger 测序法的检出率无差异,而检测低载量丙型肝炎病毒基因时,焦磷酸测序法和 Sanger

测序法检出例数的比较,经  $\chi^2$  检验差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 2 种方法对不同病毒载量组的检测结果比较

病毒载量	高载量	低载量
Sanger	100(80/80)	70(14/20)
焦磷酸	100(80/80)	100(20/20)
一致率/%	100(80/80)	60(12/20)
$\chi^2$ 值		7.060
P 值		0.008

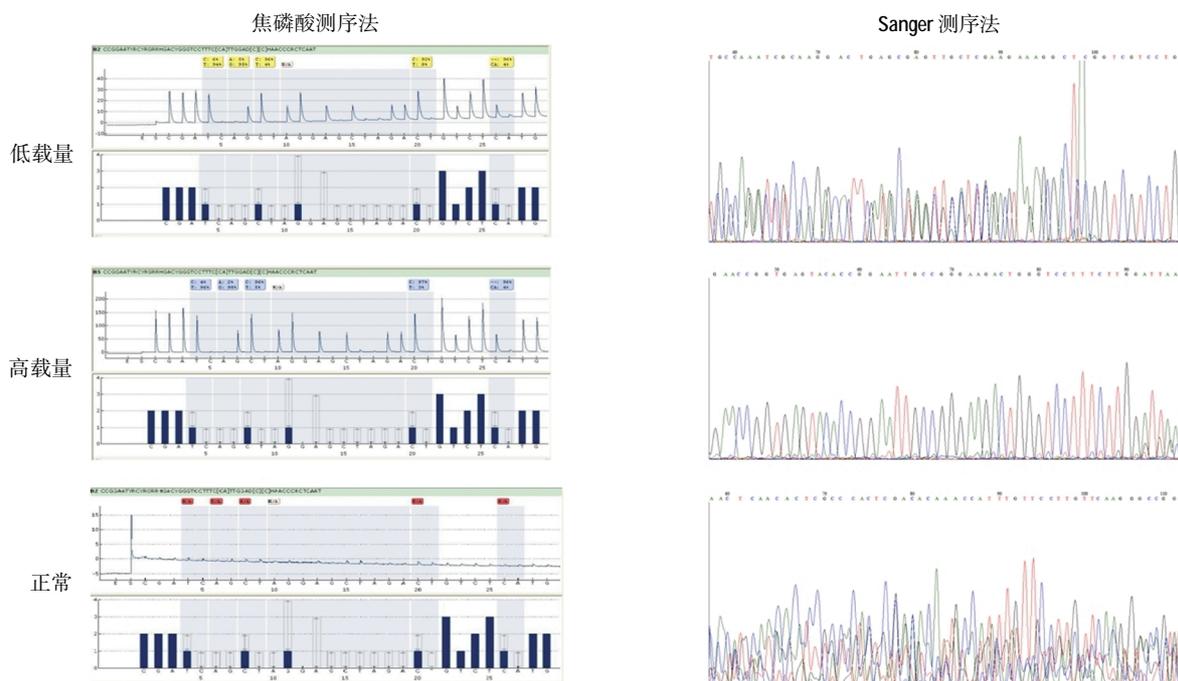
HCV-RNA 高水平载量、低水平载量和正常人 2 种测序方法的测序图(见附图)。应用 Sanger 测序法对丙型肝炎病毒分型检测,对于高病毒载量样本测序结果直观,但存在结果分析较为复杂,不能对突变株进行定量检测的问题;对于低载量样本,结果判读存在很大偏差,重复实验结果重现性很差,不能很好的判断型别;阴性标本测序结果呈现混乱的峰形图,无实际意义。而对于丙型肝炎病毒高载量样本,焦磷酸法分型测序结果直观、峰值高、读取简单和定量精确等特点;对于低载量样本测序结果存在基线不稳、峰值偏低的情况,但重复实验结果具备很好的重现性,不影响结果的判读;阴性标本无 PCR 扩增曲线,对 PCR 产物测序亦无峰值出现。

分别比较各组中 2 种检测方法的整体一致性较好。但高载量组与低载量组之间两种方法检测结果比较,高载量组的检测结果,两种方法一致率更好,低载量组焦磷酸测序法具有更高的检测率和更低的漏检率,其敏感性可能略优于 Sanger 测序法。

## 2.4 2 种测序法对不同低病毒载量组的检测结果比较

通过表 2 对比结果可知,两种测序方法在对丙型肝炎病毒基因分型的检测一致性较高,但在 HCV-RNA 病毒载量  $< 10^4$  IU/ml 中,测序结果有所差异,现将 20 例 HCV-RNA 病毒载量  $< 10^4$  IU/ml 的标本按病毒载量分成 2 组,分别用焦磷酸法和 Sanger 法进行测序,其检测结果比较。见表 3。

标本病毒载量在  $10^4 \sim 5\ 000$  IU/ml 范围中,检测 12 个样本,焦磷酸测序法和 Sanger 测序法均可检出,且测序结果一致性为 92%;当病毒载量  $< 5\ 000$  IU/ml 时,检测 8 个样本,焦磷酸法检出 8 个,检出率为 100%,Sanger 测序法检出 2 个,检出率为 25%,其中,两种方法检测一致的标本数为 1,一致率为 12.5%。检测病毒载量为  $10^4 \sim 5\ 000$  IU/ml 组丙型肝炎病毒



附图 2 种测序法在不同丙肝病毒载量组的测序图

表 3 2 种测序法在不同低病毒载量组的检测结果比较 %

病毒载量	10 <sup>4</sup> ~ 5 000/( IU/ml)	<5 000/( IU/ml)
Sanger	100(12/12)	25(2/8)
焦磷酸	100(12/12)	100(8/8)
一致率 /%	92(11/12)	12.5(1/8)
$\chi^2$ 值		9.600
P 值		0.002

基因时,焦磷酸测序法和 Sanger 测序法的检出例数无差异,而检测病毒载量 <5 000 IU/ml 组的丙型肝炎病毒基因时,焦磷酸测序法和 Sanger 测序法检出例数经  $\chi^2$  检验差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

通过 2 种测序方法对比可以看出在高载量检测中,2 种方法一致性更好,低载量检测中焦磷酸测序法可能有较高的检测率,其敏感性可能略优于 Sanger 测序法。故建议进行丙肝分型检测前应先进行 HCV-RNA 定量检测,分型标本病毒载量在  $>10^4$  IU/ml 效果最佳,若  $<10^4$  IU/ml,可优先考虑焦磷酸测序法。

### 3 讨论

丙型肝炎是一种由丙型肝炎病毒感染引起、以血源性传播为主的传染性疾病,大部分患者感染 HCV 后会发展成为慢性丙型肝炎,可导致肝脏慢性炎症反应、坏死和纤维化,更有部分患者发展为肝硬化,甚至是肝癌,对人类的健康构成严重威胁。而且

近年来我国丙肝报告病例数及报告发病率快速上升,2011 年报告发病率就达到 12.97/10 万<sup>[1]</sup>,但通过科学的抗病毒治疗,可以达到清除病毒、改善肝组织学、降低肝硬化发生率、防止肝脏功能衰竭和肝癌发生的目标<sup>[2]</sup>。HCV 分为 6 个基因型和多个亚型,不同基因型会导致不同的临床表现及后果,尤其是对于干扰素治疗的反应性有很大差异,因此,在治疗前了解 HCV 的基因型,不仅有助于预测患者病情,更重要的是可根据病毒的基因型采用更合理有效的治疗方案,从而既能节约治疗费用又能获得好的效果<sup>[13-15]</sup>。

本实验发现,两种测序方法在对丙型肝炎病毒基因分型检测的一致性高,无差异。100 例标本中,有 92 例结果一致,一致率为 92%。其中,HCV-RNA 病毒载量  $>10^4$  IU/ml 有 80 例,其测序结果完全一致为 100%,HCV-RNA 病毒载量  $<10^4$  IU/ml 有 20 例,其中焦磷酸测序共检测 20 例,Sanger 测序法共检测 14 例,12 例结果相同。初步证明,在检测丙型肝炎病毒基因分型方面,焦磷酸测序法快速准确,而且与目前应用较为成熟普遍的 Sanger 测序法比较,其敏感性更高。此外,焦磷酸测序还可进行甲基化分析(特定位点定量),且通量灵活(1 ~ 24)。因此,建议进行丙肝分型检测前应先进行 HCV-RNA 定量检测,分型标本病毒载量  $>10^4$  IU/ml 效果最佳,若  $<10^4$  IU/ml,可考虑焦磷酸测序法。

## 参 考 文 献:

- [1] 张长江, 朱研, 王小红. 慢性丙型肝炎病毒感染的肝外表现[J]. 中华传染病杂志, 2011, 29(2): 124-128.
- [2] 卢捷, 谢青. 直接抗病毒药物治疗丙型肝炎的研究新进展[J]. 临床内科杂志, 2015, 32(8): 518-521.
- [3] 丁洋, 窦晓光. 丙型肝炎规范化与个体化治疗[J]. 临床内科杂志, 2015, 32(8): 515-517.
- [4] 任红. 丙型肝炎防治,任重道远[J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(6): 401-402.
- [5] 李杰, 庄辉. 病毒性肝炎流行病学进展[J]. 肝脏, 2012, 17(1): 2-5.
- [6] 庄辉. 病毒性肝炎流行病学研究进展[J]. 中国继续医学教育, 2010, 2(3): 1-5.
- [7] 李杰, 陈杰, 庄辉. 丙型肝炎的流行病学[J]. 实用肝脏病杂志, 2012, 15(5): 379-381.
- [8] 中华医学会肝病学会. 中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南更新版[J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(12): 906-923.
- [9] 濮翔科, 杭双熊, 申红玉, 等. 常州地区丙型肝炎病毒基因分型及临床分析[J]. 放射免疫学杂志, 2012, 25(6): 663-665.
- [10] 王谦, 杜亚梅, 张国军, 等. 焦磷酸测序法与 Sanger 测序法检测 CYP2C19\*17 基因多态性方法学对比研究 [J]. 中国医药生物技术, 2014, 9(3): 222-224.
- [11] 秦倩倩, 郭巍, 王丽艳, 等. 1997-2011 年中国丙型肝炎流行特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(6): 548-551.
- [12] 王剑, 杨瑞锋, 魏来, 等. 丙型肝炎病毒基因型及其宿主基因型的检测及临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(2): 97-100.
- [13] 冯颖. 干扰素联合利巴韦林治疗不同病毒基因型慢性丙型肝炎患者的疗效[J]. 中国医药, 2013, 8(8): 1124-1125.
- [14] 温先勇, 唐敏, 邓正华, 等. 中国西南三地 HCV 基因型的分布及临床特征[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(23): 42-46.
- [15] 陈金栋, 许新, 孙东红, 等. 23 例丙型肝炎患者全髋关节置换术回顾性分析[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(16): 105-108.