

# 基于Sequenom MassARRAY SNP技术的乙型肝炎病毒耐药突变质谱检测平台的建立与评价

梁钰英<sup>1,2</sup>, 陈水平<sup>2</sup>

<sup>1</sup>武汉市汉口医院检验科, 湖北武汉 430014; <sup>2</sup>解放军总医院第五医学中心检验科, 北京 100071

**摘要:**背景 HBV耐药突变检测是临床精准治疗的关键环节, 虽然目前检测方法较多, 但均不适于临床大规模应用。目的 基于Sequenom MassARRAY SNP技术, 建立检测HBV聚合酶基因型耐药突变的质谱检测平台。方法 随机选取解放军总医院第五医学中心2014年3月—2018年6月100例HBV核酸阳性患者进行聚合酶基因的全长序列测定, 其中男51例, 女49例, 中位年龄51岁。采用MEGA11.0进行序列比对及聚类分析, 分析测序成功的62例HBV聚合酶基因的序列特征和基因型, 并人工合成野生型和突变型聚合酶基因序列, 设计针对HBV主要耐药相关SNP位点(19个)的延伸扩增引物及单碱基延伸引物, 建立相应的耐药突变质谱数据库, 评估各耐药突变的检出限。从聚合酶区测序成功的62例临床血清样本中随机选取18例, 利用sanger测序法和Sequenom MassARRAY SNP法对聚合酶区的耐药突变进行检测。结果 基于聚合酶基因的进化树显示, 在62例临床HBV核酸阳性标本中, 基因B型和基因C型分别占25.8%和74.2%。设计并合成1条野生型聚合酶基因序列和5条突变型序列, 共覆盖基因B型和基因C型的15个耐药突变(包含19个SNP位点)。所建立的质谱检测平台经优化后, 对19个SNP位点的检出限均在1%~5%。在18例临床样本中, Sanger测序法均未检出HBV耐药SNP位点, 但Sequenom MassARRAY SNP检出5例样本含HBV耐药SNP位点, 其中4例基因B型, 1例基因C型。结论 本研究建立了基于Sequenom MassARRAY SNP技术的HBV耐药突变的质谱检测平台, 初步应用显示了该平台具有快速精准、高通量、高灵敏等特点, 一次实验可确定HBV的耐药特征, 具有良好的临床应用前景。

**关键词:**乙型肝炎病毒; 质谱分析法; 基因型; 病毒耐药性; 聚合酶基因; 高通量筛选试验; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

中图分类号:R512.62; R446.5; R318.08

文献标志码:A

文章编号:2095-5227(2025)10-0941-08

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.25010701

引用本文: 梁钰英, 陈水平. 基于Sequenom MassARRAY SNP技术的乙型肝炎病毒耐药突变质谱检测平台的建立与评价 [J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (10): 941-948.

## Development and evaluation of a sequenom MassARRAY SNP-based drug-resistance detection platform for hepatitis B virus

LIANG Yuying<sup>1,2</sup>, CHEN Shuiping<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, Wuhan Hankou Hospital, Wuhan 430014, Hubei Province, China; <sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, the Fifth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100071, China

Corresponding author: CHEN Shuiping. Email: shpchen@hotmail.com

**Abstract: Background** Precision treatments are crucial for HBV infections and detection of HBV drug-resistant sites is a prerequisite. However, none of the available kits for detection of HBV drug-resistant sites are suitable for large-scale clinical application. **Objective** To establish and evaluate the platform for detection of drug-resistant sites of hepatitis B virus (HBV) based on Sequenom MassARRAY SNP that combined single-base extension PCR, multiplex PCR, and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Methods** A total of 100 HBV-positive patients who were admitted to the Fifth Medical Center of PLA General Hospital from 2014 to 2018 were randomly selected. The cohort included 51 males and 49 females, with a median age of 51 years. Sequencing was successfully completed in 62 cases. Sequence comparison and cluster analysis were performed using MEGA11.0. The polymerase gene sequences of wild-type and mutant-type of HBV were synthesized. Amplification primers and single base extension primers for 19 SNP sites of HBV were designed and synthesized. The corresponding Sequenom MassARRAY SNP platform was established to evaluate the detection limit of each resistance SNP. Eighteen clinical serum samples were randomly selected from 62 samples with confirmed full-length polymerase sequences, and then detected by sanger sequencing and Sequenom MassARRAY SNP. **Results** Among the 62 HBV clinical samples, the genotype

收稿日期: 2025-01-07

基金项目: 首都临床特色应用研究(Z141107002514027)

第一作者: 梁钰英, 硕士, 主管技师。Email: 786847290@qq.com

通信作者: 陈水平, 博士, 研究员, 硕士生导师。Email: shpchen@hotmail.com

B and C accounted for 25.8% and 74.2%, respectively. The synthesized wild-type and mutant-type polymerase gene sequences covered a total of 15 drug-resistant sites (including 19 SNPs). The established Sequenom MassARRAY SNP detection platform showed that the detection limits of 19 SNPs were 1%-5%. No SNPs of HBV resistance were detected by Sanger sequencing among the 18 clinical serum samples, while 5 samples were detected to contain SNPs of HBV resistance by Sequenom MassARRAY SNP, including 4 genotype B and 1 genotype C. **Conclusion** The Sequenom MassARRAY SNP-based drug-resistance detection platform for hepatitis B virus is established. The preliminary evaluation demonstrates that this platform has the characteristics of rapid accuracy, high throughput, and high sensitivity, which can determine the drug-resistant profiling of HBV in one experiment.

**Keywords:** Sequenom MassARRAY; HBV; genotype; drug-resistant sites; polymerase gene

**Cited as:** Liang YY, Chen SHP. Development and evaluation of a sequenom MassARRAY SNP-based drug-resistance detection platform for hepatitis B virus[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(10): 941-948.

2016年5月,世界卫生组织提出2030年消除病毒性肝炎的全球战略目标(将新发感染减少90%,病死率减少65%),这使得慢性HBV感染的防治显得十分重要<sup>[1]</sup>。我国是世界上乙肝防治压力最大的国家,2021年我国一般人群HBsAg流行率为3%,虽然显著低于1973—1984年的9.6%,但仍高于发达国家<sup>[2]</sup>。目前的抗HBV药物主要为拉米夫定(lamivudine, LAM)、阿德福韦酯(adeфовир dipivoxil, ADV)、恩替卡韦(entecavir, ETV)、富马酸替诺福韦(tenofovir disproxil fumarate, TDF)、替比夫定(telbivudine, LdT)、富马酸丙酚替诺福韦酯(tenofovir alafenamide fumarate, TAF)等,均为靶向病毒的聚合酶。研究发现,病毒耐药与病毒聚合酶内的某些特异突变密切相关。目前HBV耐药突变检测方法较多,但它们均不适于临床的大规模检测,如基于探针的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点实时荧光PCR法不能同时检测多个位点,PCR-反向斑点杂交(PCR-reverse dot blot, PCR-RDB)技术检测成本较高,一代测序法灵敏度低,宏基因组测序法操作复杂等。近年来,质谱技术在核酸检测分析中显现出巨大的潜力,其在预防医学、传染病防控领域的应用飞速发展,在快速鉴定、分型溯源、耐药性等方面进展迅速,尤其是SNP位点分析层面<sup>[3-4]</sup>。本研究基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)技术并结合多重PCR及单碱基延伸PCR方法,建立检测HBV聚合酶基因型耐药突变的Sequenom MassARRAY SNP质谱平台,构建覆盖主要耐药突变的质谱数据库,旨在为HBV耐药突变的检测提供一个灵敏度高、重复性好、准确率高、通量高、快速经济的鉴定平台,同时为Sequenom MassARRAY SNP在其他检测领域的应用提供有益参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 HBV临床标本来源

从2014年3月—2018年6月的解放军总医院第五医学中心门诊患者中,采用分层抽样法(按照性别分层)随机选取HBV核酸阳性患者100例(核酸定量均 $>1 \times 10^3$  IU/mL,并剔除重复病例)。

### 1.2 试剂与仪器

全波长紫外/可见光扫描分光光度计NanoDrop-1000(美国NanoDrop),电泳仪(北京六一),凝胶成像仪(北京六一),Bio-Rad T100 PCR仪(美国伯乐),ABI9700 PCR仪(美国ABI),MALDI-TOF MS质谱仪及配套试剂(美国sequenom),病毒基因组提取试剂盒(德国凯杰),高保真聚合酶(美国赛默飞)等。

### 1.3 HBV全长聚合酶基因的sanger测序

采用病毒基因组DNA提取试剂盒,对100例HBV核酸阳性标本提取的DNA,并以提取的DNA为模板,扩增聚合酶基因。聚合酶区扩增引物为HBV-F(5' -GACTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3')和HBV-R(5' -CCCACAATTCKTTGACATAC TTTCC-3'),扩增长度745 bp<sup>[5]</sup>。扩增条件:94°C 5 min; 30个循环(94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 40 s); 72°C 10 min; 4°C ∞。剔除PCR扩增失败及条带较暗的标本,选取68例电泳条带特异的扩增产物同时进行正反两个方向的sanger测序。序列测定由北京六合华大基因科技有限公司完成。

利用MEGA11.0对测序成功的62个HBV聚合酶全长基因序列(745 bp)进行序列比对和进化树分析,确定其序列特征和基因型。

### 1.4 HBV耐药突变Sequenom MassARRAY SNP质谱平台的构建

根据成功测序的62个HBV聚合酶基因的序列特征,设计覆盖19个SNP位点的1条野生型序列(长度为754 bp)和5条突变型序列(长度分别为600 bp、

554 bp、246 bp、273 bp、282 bp)。以上核酸片段的合成和相应的质粒构建均由北京六合华大基因科技有限公司完成。

采用 Sequenom 公司的 Genotyping Tools 和 MassARRAY Assay Design 软件, 设计针对聚合酶基因中 19 个 SNP 位点的 PCR 扩增引物和单碱基延伸引物。以合成的野生型和突变型质粒作为模板, 评估 19 个 SNP 位点质谱峰图情况。如 SNP 位点质

谱图存在非特异性峰图或者假阴性, 进行复测或者引物优化, 以排除污染及引物的非特异性延伸问题。优化后的引物见表 1。引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

### 1.5 Sequenom MassARRAY SNP 质谱平台的检测流程

分别以野生型质粒和突变型质粒为模板, 在 384 孔板中进行多重 PCR 扩增。19 个 SNP 位点分 6

表 1 HBV 耐药突变检测引物

Tab. 1 Primers for detection of HBV resistance SNPs

序号	反应	耐药突变	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	单链延伸引物(5'→3')
1	W1	rtL180M_417	<i>ACGTTGGATG</i> CGAACCCTGAACAAAT GGC	<i>ACGTTGGATG</i> TCGCAAGATTCCTATGG GAG	CACTAGTAAACTGAGCCA
2	W1	rtS202I_484	<i>ACGTTGGATG</i> ATGTTGTACAGACTTGG CCC	<i>ACGTTGGATG</i> TGTTCAGTGGTTCGTA GGG	CCACTGTTTGGCTTTCA
3	W1	rtT128N_262	<i>ACGTTGGATG</i> TGTCCTCTACTCCAGG AAC	<i>ACGTTGGATG</i> CATAGAGGTTCTTGGAG CAG	CGTGCAGGTCTTGCATG
4	W1	rtL80I/V_117	<i>ACGTTGGATG</i> CCAAATCTCCAGTCACT CAC	<i>ACGTTGGATG</i> TGATAAAACGCCGCAG ACAC	GCAGACACATCCAGCGATA
5	W1	rtM250V_627	<i>ACGTTGGATG</i> AAACCAAACGTTGGGG CTAC	<i>ACGTTGGATG</i> GTTCTTTCGCGTAAAGTA CCC	ACTTCCAATTACATATCCCA
6	W1	rtV173L_396	<i>ACGTTGGATG</i> GGTATTCCCATCCATCAT CC	<i>ACGTTGGATG</i> AAACTGAGCCAGGAGA AACG	AAACGGACTGAGGCCCA
7	W2	rtA181V_421	<i>ACGTTGGATG</i> CGAACCCTGAACAAAT GGC	<i>ACGTTGGATG</i> TCGCAAGATTCCTATGG GAG	CAGTCCGTTTCTCCTGG
8	W2	rtM204I_491	<i>ACGTTGGATG</i> ATGTTGTACAGACTTGG CCC	<i>ACGTTGGATG</i> TGTTCAGTGGTTCGTA GGG	TGTTGGCTTTCAGTTATAT
9	W2	rtL229W_565	<i>ACGTTGGATG</i> TTAAGGGAGTAGCCCCA ACG	<i>ACGTTGGATG</i> CTTGAGTCCCTTTTAC CTC	ACCTCTATTACCAATTTTCT TT
10	W3	rtA181T/S_420	<i>ACGTTGGATG</i> CGAACCCTGAACAAAT GGC	<i>ACGTTGGATG</i> TCGCAAGATTCCTATGG GAG	TCAGTCCGTTTCTCCTG
11	W3	rtM204V_489	<i>ACGTTGGATG</i> ATGTTGTACAGACTTGG CCC	<i>ACGTTGGATG</i> TGTTCAGTGGTTCGTA GGG	CTGTTTGGCTTTCAGTTAT
12	W3	rtN236T_586	<i>ACGTTGGATG</i> CCTTGAGTCCCTTTTACC TC	<i>ACGTTGGATG</i> TTAAGGGAGTAGCCCC AACG	ACGTTTGGTTTTATTAGGG
13	W4	rtI169T_385	<i>ACGTTGGATG</i> GGTATTCCCATCCATCAT CC	<i>ACGTTGGATG</i> AAACTGAGCCAGGAGA AACG	GGCCCACTCCCATAGGA
14	W4	rtA194T_459	<i>ACGTTGGATG</i> ACTGAAAGCCAAACAG TGGG	<i>ACGTTGGATG</i> CCCTGGCTCAGTTTACTA GTG	TGTTTTCAGTGGTTCGTAGG
15	W4	rtI233V_576	<i>ACGTTGGATG</i> CCTTGAGTCCCTTTTACC TC	<i>ACGTTGGATG</i> TTAAGGGAGTAGCCCC AACG	GGTTTTATTAGGGTTCAAAAT GTA
16	W5	rtF166L_375	<i>ACGTTGGATG</i> TGCACTTGATTCCCATC CC	<i>ACGTTGGATG</i> AAACTGAGCCAGGAGA AACG	CCATAGGAATCTTGCAGAA
17	W5	rtL229V/M_564	<i>ACGTTGGATG</i> TTAAGGGAGTAGCCCCA ACG	<i>ACGTTGGATG</i> CCTTGAGTCCCTTTTAC CTC	TTACCTCTATTACCAATTTT CTT
18	W6	rtT184S_430	<i>ACGTTGGATG</i> GAAGATTCCTATGGGAGT GGG	<i>ACGTTGGATG</i> AGCCCTACGAACCACT GAAC	TCTCCTGGCTCAGTTTA
19	W6	rtL229F_566	<i>ACGTTGGATG</i> TTAAGGGAGTAGCCCCA ACG	<i>ACGTTGGATG</i> CCTTGAGTCCCTTTTAC CTC	ACCTCTATTACCAATTTTCT TTT

表内粗斜体的 10bp 碱基序列(*ACGTTGGATG*)为标签序列。

个反应管如表1(W1-W6)。扩增条件: 95°C 2 min; 45个循环(95°C 2 min; 56°C 30 s; 72°C 60 s); 72°C 5 min; 4°C ∞。PCR产物纯化后, 用虾碱性磷酸酶(shrimp alkaline phosphatase, SAP)处理, 以去除反应体系中游离dNTPs。反应条件: 37°C 40 min; 85°C 5 min; 4°C ∞。在碱性磷酸酶处理后, 利用EXTEND Mix反应液进行单碱基延伸反应。反应条件: 95°C 30 s; 94°C 5 s; 5个循环(52°C 5 s, 80°C 5 s); 40个循环(94°C 5 s, 52°C 5 s, 80°C 5 s); 72°C 3 min; 4°C ∞。利用Clean Resin树脂对单碱基延伸产物进行纯化。

### 1.6 质谱检测

启动MassARRAY Nanodispenser RS1000点样仪, 将经树脂纯化后的延伸产物转移至384孔SpectroCHIP (sequenom)芯片上, 利用MALDI-TOF MS对SpectroCHIP芯片进行检测。在相对分子质量5 000~9 000 Da范围内采集数据, 仪器及分析设置相关参数: 飞行管长800 mm、加速电压20 kV、激光器波长337 nm、激光束能量150 μJ、采集频率30 Hz等。利用TYPER4.0软件(sequenom)分析质谱峰图。

### 1.7 Sequenom MassARRAY SNP 质谱平台的检出限

将聚合酶基因突变型质粒分别按50%、20%、15%、10%、5%和1%的比例与野生型质粒进行混合, 然后以此为模板对19个SNP位点进行检测, 分析Sequenom MassARRAY SNP 质谱平台检测各SNP位点的检出限。

### 1.8 Sequenom MassARRAY SNP 质谱平台的初步评价

从测序成功的62个HBV标本中随机选取18例样本, 参照1.5的流程进行Sequenom MassARRAY SNP检测, 并与sanger测序结果进行比较。

### 1.9 统计学分析

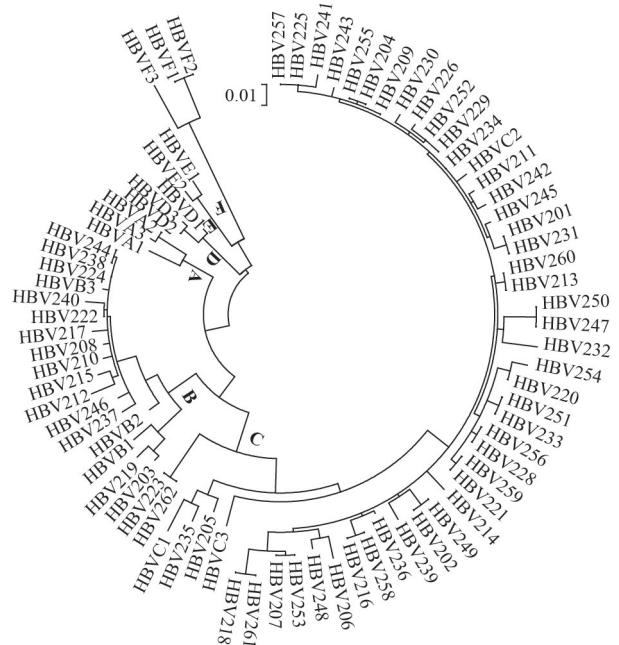
采用SPSS 26.0软件进行数据处理和统计分析, 计数资料采用绝对频(例)数表示, 成组比较采用Fisher's精确概率检验法, 配对比较采用优势性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HBV临床样本的基因分型

选取的100例临床样本中, 男51例, 女49例, 中位年龄51岁。以HBV全长聚合酶基因为靶标, 利用MEGA11.0对测序成功的62个HBV毒株进行

序列比对及聚类分析。结果显示, 在62个HBV毒株中, 基因B型占比25.8%(16/62), 基因C型占比74.2%(46/62), 其中基因B型和基因C型的型间同源性为92.0%~92.4%, 基因B型的型内同源性 $\geq 96.1%$ , 基因C型的型内同源性 $\geq 95.0%$ 。序列差异主要集中在SNP位点分布的区域(聚合酶基因为375~586 bp)。进化树分析结果见图1。



A、B、C、D、E和F代表不同的HBV基因型。

图1 62例HBV毒株聚类分析图

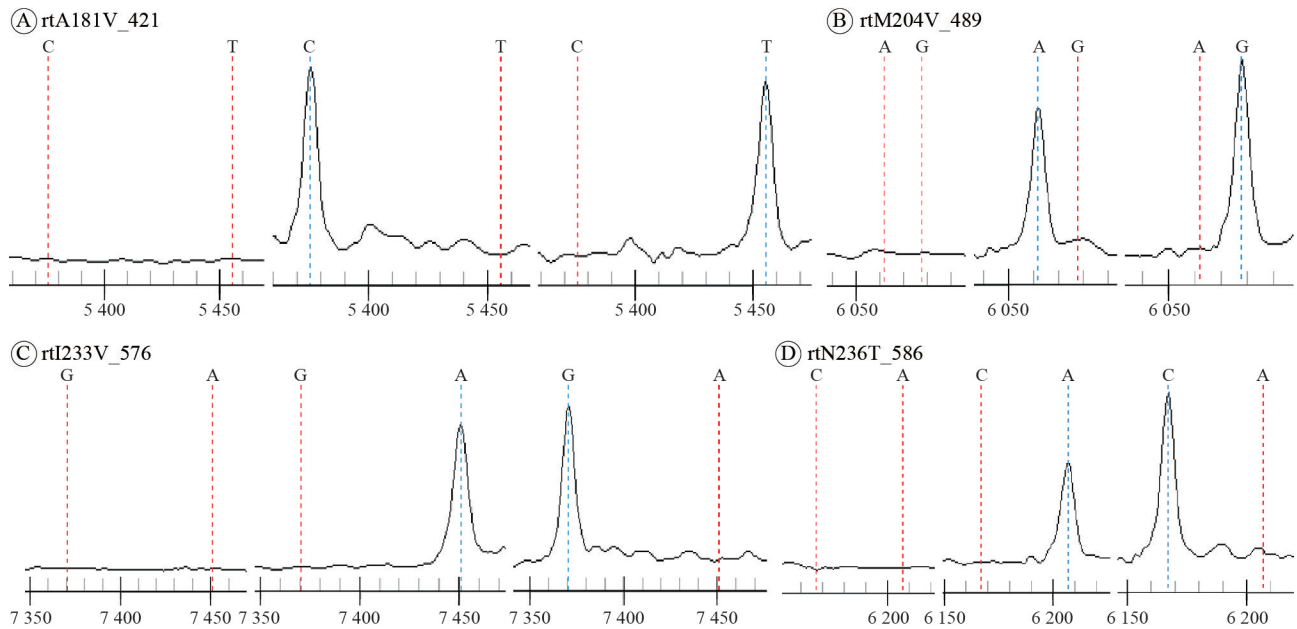
Fig. 1 Cluster analysis of 62 cases of HBV strain

### 2.2 Sequenom MassARRAY SNP 质谱平台耐药突变质谱数据库的构建

不同碱基分子量的差异, 在MALDI-TOF MS中可呈现出不同质荷比的质谱峰, 通过延伸产物质荷比与探针质荷比之间的差值判断延伸碱基的类型。本研究以HBV聚合酶基因为鉴定对象, 经多次优化, 建立包含15个密码子(19个SNP位点)的36个质谱峰图数据库(含19个野生型峰图与19个突变型峰图)。该质谱数据库中各耐药突变的峰图信噪比值均较高, 峰图特征图2为其中4个SNP位点(rtA181V\_421、rtM204V\_489、rtI233V\_576、rtN236T\_586)的峰图。

### 2.3 Sequenom MassARRAY SNP 质谱平台的检出限评价

聚合酶基因突变型质粒和野生型质粒经梯度稀释后, 对19个SNP位点进行MassARRAY SNP检测。结果表明(表2), 4个SNP位点(rtL180M\_417、rtL80I/V\_117、rtL229W\_565、rtI169T\_385)



A: rtA181V\_421; B: rtM204V\_489; C: rtI233V\_576; D: rtN236T\_586。

图2 HBV耐药突变质谱数据库中4个SNP位点质谱峰图

Fig. 2 Four SNPs in the mass spectrum database of HBV resistance

的检出限为1%，15个SNP点(rtS202I\_484、rtT128N\_262、rtM250V\_627、rtV173L\_396、rtA181V\_421、rtM204I\_491、rtA181T/S\_420、rtM204V\_489、rtN236T\_586、rtA194T\_459、rtI233V\_576、rtF166L\_375、rtL229V/M\_564、rtT184S\_430、rtL229F\_566)的检出限为5%。各SNP位点在稀释梯度为50%时，两峰间峰面积差异均小于1:2，在检出限处的峰图像信噪比(signal-to-noise ratio, SNR)均>3，实验结果可靠。图3是SNP位点rtL229M\_564、rtM250V\_627、rtL229W\_565和rtL80I/V\_117的SNP检测峰图。

#### 2.4 Sequenom MassARRAY SNP质谱平台的初步临床评价

从测序成功的62个HBV标本中随机选取18例样本，其中男9例，女9例，中位年龄48岁。在18例样本中，基因B型8例，基因C型10例。Sanger测序法均未检出HBV耐药突变，但Sequenom MassARRAY SNP质谱平台检出5例(5例阳性样本的SNP位点质谱峰图与质谱数据库峰图比对，峰图位置均正确无误，且SNR均>3)，其中4例为基因B型，1例为基因C型。经成组卡方检验，两法阳性检出率差异有统计学意义( $P=0.045$ )(表3)。经配对卡方检验(优势性检验)，两法优势性差异有统计学意义( $P=0.016$ )(表4)。初步临床评价显示，Sequenom MassARRAY SNP质谱平台比Sanger测序法具有更高的阳性检出能力。

表2 Sequenom MassARRAY SNP质谱平台检测HBV耐药突变的检出限

Tab. 2 Detection limit of Sequenom MassARRAY detection platform for HBV drug-resistant SNPs

序号	耐药突变	检出限	信噪比
1	rtL180M_417	1%	3.57
2	rtS202I_484	5%	4.02
3	rtT128N_262	5%	4.38
4	rtL80I/V_117	1%	4.12
5	rtM250V_627	5%	3.39
6	rtV173L_396	5%	4.16
7	rtA181V_421	5%	3.69
8	rtM204I_491	5%	3.92
9	rtL229W_565	1%	4.08
10	rtA181T/S_420	5%	3.62
11	rtM204V_489	5%	3.71
12	rtN236T_586	5%	3.83
13	rtI169T_385	1%	3.38
14	rtA194T_459	5%	3.97
15	rtI233V_576	5%	3.71
16	rtF166L_375	5%	3.87
17	rtL229V/M_564	5%	3.94
18	rtT184S_430	5%	3.79
19	rtL229F_566	5%	3.86

### 3 讨论

抗HBV的治疗药物核苷类似物(nucleoside analogues, NAs)因口服方便、价格低廉、安全性

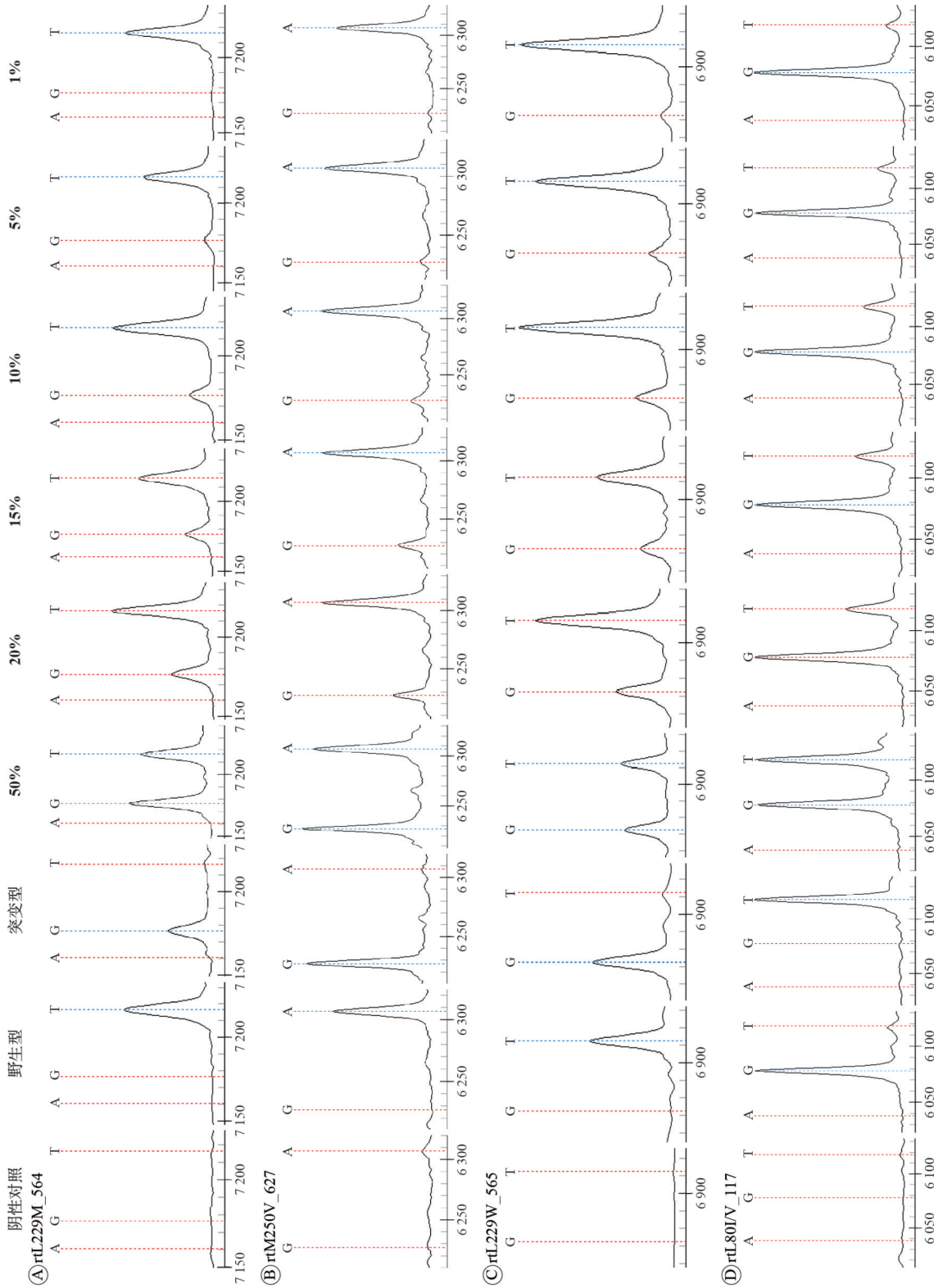


图3 Sequenom MassARRAY SNP 检出限评价

Fig. 3 Detection limit of Sequenom MassARRAY detection platform

A: rtL229M\_564; B: rtM250V\_627; C: rtL229W\_565; D: rtL80I/V\_117。

表3 Sequenom MassARRAY SNP检测平台的初步试测

Tab. 3 Preliminary testing of Sequenom MassARRAY SNP detection platform

方法	Sequenom MassARRAY SNP detection platform 和 Sanger sequencing		
	+	-	合计
Sequenom MassARRAY SNP test	5	13	18
Sanger sequencing	0	18	18
成组差异检验 $P$ (精确概率检验)	0.045		

表4 Sequenom MassARRAY SNP检测平台的临床评价

Tab. 4 Clinical evaluation of Sequenom MassARRAY SNP detection platform

方法	Sanger sequencing			合计
	+	-	合计	
Sequenom MassARRAY SNP test	+	0	5	5
	-	0	13	13
合计	0		18	
配对组优势性检验方正汇总行 $\chi^2, P$	5.8096, 0.016			

好、耐受性好等特点,在临床上应用广泛<sup>[6]</sup>。然而,大多数NAs口服疗程较长,长期使用易导致耐药突变,在增强病毒复制能力的同时,诱发肝炎、肝衰竭和肝癌,甚至死亡。交叉耐药和多重耐药,进一步增加了抗HBV治疗的难度,加重了治疗的经济负担<sup>[7-8]</sup>。近年来,有关多重耐药HBV的报道日渐增多,抗HBV治疗失败的病例屡见报道。因此,明确治疗前的HBV耐药基线和治疗过程的耐药突变变化对于HBV感染者的治疗,特别是个性化治疗极为重要,而针对HBV耐药突变的高通量、快速和精准检测方法则可发挥重要作用。

本研究针对核苷类似物长期治疗导致的HBV耐药突变这一临床难题,创新性地建立了基于Sequenom MassARRAY SNP技术的HBV聚合酶区耐药突变质谱检测平台,在技术性能和临床应用方面展现出显著优势。与现有检测方法相比,本平台兼具Sanger测序的准确性和二代测序的高灵敏度,同时克服了前者灵敏度低(突变检出限20%)和后者成本高、操作复杂的局限性。在检测范围方面,本研究创新性地实现了基因B、C型的15个HBV耐药突变和19个SNP位点的同步检测,覆盖了聚合酶区所有常见耐药突变,且所有SNP位点的峰图均特异,峰图像信噪比值高,且检出限可达1%~5%,与Rybicka等的研究结果相当<sup>[9-13]</sup>,在质谱检出限分析过程中,野生型质粒和突变型质粒的比例在50%时,各SNP位点峰图面积均 $<1:2$ ,

说明检测过程不存在污染,且检出限处的峰图信噪比均 $>3$ ,检出限结果可靠<sup>[14]</sup>;并初步完成了18例临床耐药突变的临床评价,所检测的5例耐药突变阳性标本中的4例为基因B型,主要为LMV和ADV耐药突变。

MALDI-TOF质谱核酸检测平台在临床应用中具有优势。Sanger测序法是检测DNA变异的金标准,但由于灵敏度较低(突变率需高于20%),低频突变及多重突变的杂合序列难以检出而限制了其应用。二代测序虽然具有通量高、特异性高和灵敏度高的特点,但缺点是费用高,操作复杂,环境要求高,难以在临床广泛应用<sup>[15]</sup>。Sequenom MassARRAY SNP检测结合多重PCR技术、MassARRAY iPLEX单碱基延伸技术和MALDI-TOF质谱技术,其优势在于快速精准、高通量、高灵敏度、高性价比等,并且其反应体系所需样本量少(10 ng),准确性 $>95%$ ,检出率 $>90%$ ,不存在潜在的错配干扰,也不需要引入各种标志物。另外,该平台采用高密度的SpectroCHIP点阵芯片和高智能化的识别软件进行分型检测,一张芯片可对384个样本进行检测,每个体系最多可实现40重反应,是当前SNP分型的金标准<sup>[16]</sup>。当前MALDI-TOF MS已成为临床检测领域的重要技术平台,其应用涵盖遗传性耳聋筛查、遗传代谢病诊断、心血管药物基因组学指导、肿瘤靶向治疗评估,以及病原微生物分型与耐药性检测等多个方向<sup>[17-19]</sup>。值得关注的是,近年发展的高分辨质谱技术,如四极杆-飞行时间串联质谱(Q-TOF-MS)和轨道阱质谱(Orbitrap-MS),在应用场景和技术定位上与MALDI-TOF MS具有显著差异。Q-TOF-MS与Orbitrap-MS的核心优势是对复杂生物的深度组学解析,如代谢组学研究中实现对小分子代谢物的全谱鉴定与代谢通路重构,蛋白质组学研究中翻译后修饰谱的精准解析和蛋白质相互作用网络的动态构建,脂质组学研究中脂质分子结构的精细表征和代谢通量分析。而MALDI-TOF质谱则在临床转化应用中展现出独特的优势:高通量检测能力、较低的单样本检测成本和相对简单的数据分析流程<sup>[20-22]</sup>。然而需特别指出的是,与常规分子检测技术相比,MALDI-TOF质谱核酸检测技术仍然面临挑战,急需建立标准化的操作规范,并加强技术人员在引物设计、质谱参数优化等方面的系统培训,进一步提升该技术在临床上的应用效能。

HBV的基因型分布和突变特征在不同国家和

地区存在一定的差异。在现有10个基因型(A~J)中,我国以B型和C型为主,其中东北部、北部和东部地区,C型居多,其次为B型,也有极少数的A和D型;在中部和南部地区,B型居多,其次是C型、I基因型和C/D重组基因型;而在西北地区,C/D重组基因型占优势<sup>[23]</sup>。本研究所在地区的优势基因型为基因B型,与文献报道基本一致。HBV在复制过程中其基因组发生错配的概率较高,文献报道大多数临床相关的突变主要与特定基因型有关,巴西研究人员通过比较HBV A、D、F 3种基因型突变率及突变位点的特征,发现不同基因型差别很大<sup>[24]</sup>;国内研究也发现,安徽、闽南等地区在耐药突变率方面,基因C型的突变率高于基因B型,突变模式较复杂。在NAs药物选择压力下,HBV B型感染者和C型感染者表现出不同耐药突变特点,例如,对于LDT耐药M204相关的伴随突变在基因B型和C型中亦表现出不同的倾向性:M204I单独突变更易出现在基因B型患者中,而L180+M204I、T184+L180+M204V更易出现在基因C型患者中;基因B型更易出现LMV和ADV的天然耐药,其中对LMV天然耐药基因突变类型以rtM204V为主<sup>[25-27]</sup>。本研究所检测的5例耐药突变阳性标本中的4例也为基因B型,主要为LMV和ADV耐药突变。

该平台可检测聚合酶编码区所有常见耐药突变,且覆盖了国内常见基因型。通过一次检测即可全面评估HBV的耐药特征,便于临床精准选择治疗方案和动态监测耐药演变,实现乙肝患者的个体化治疗。

本研究存在以下局限性。首先,由于成本和技术上的考虑,本研究纳入的临床样本量相对有限(18例),尤其是对较少见的基因型(如A和D型)覆盖不足。其次,尽管质谱技术灵敏度显著优于Sanger测序,但对低频突变样本仍需更高灵敏度的方法进行验证。为进一步完善Sequenom MassARRAY SNP检测平台,在优化扩增引物和单碱基延伸引物的基础上,拟纳入更多基因型和临床病例,并利用二代测序平台作为参照,对该质谱检测平台进行系统的临床评价。

综上所述,本研究构建的HBV耐药突变质谱检测平台具有快速精确、高通量、高灵敏的特点,一次实验可确定HBV的耐药特征,在HBV感染的

个性化诊疗方面具有良好的临床应用前景。

**作者贡献** 梁钰英:实验设计与实施,论文撰写;陈水平:实验设计与指导,审读和修订,获取研究经费。

**利益冲突** 所有作者声明无利益冲突。

**数据共享声明** 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取,Email: 786847290@qq.com。

#### 参考文献

- WHO. Global Health Sector Strategies on, Respectively, HIV, Viral Hepatitis and Sexually Transmitted Infections for the Period 2022-2030 [EB/OL]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240053779>.
- Hsu YC, Huang DQ, Nguyen MH. Global burden of hepatitis B virus: current status, missed opportunities and a call for action [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20 (8): 524-537.
- Cox CR, Harris RM. Mass spectrometry and microbial diagnostics in the clinical laboratory [J]. *Clin Lab Med*, 2021, 41 (2): 285-295.
- Wu XC, Tan GK, Yang JH, et al. Prediction of Mycobacterium tuberculosis drug resistance by nucleotide MALDI-TOF-MS [J]. *Int J Infect Dis*, 2022, 121: 47-54.
- Luan J, Yuan J, Li XH, et al. Multiplex detection of 60 hepatitis B virus variants by maldi-tof mass spectrometry [J]. *Clin Chem*, 2009, 55 (8): 1503-1509.
- Zheng JR, Wang ZL, Feng B. Hepatitis B functional cure and immune response [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1075916.
- Sedohara A, Takahashi K, Arai K, et al. Characterization of mutations in hepatitis B virus DNA isolated from Japanese HBsAg-positive blood donors in 2021 and 2022 [J]. *Arch Virol*, 2024, 169 (5): 103.
- Phinius BB, Anderson M, Gobe I, et al. High prevalence of hepatitis B virus drug resistance mutations to lamivudine among people with HIV/HBV coinfection in rural and peri-urban communities in Botswana [J]. *Viruses*, 2024, 16 (4): 592.
- Rybicka M, Stalke P, Dreczewski M, et al. High-throughput matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative approach to monitoring drug resistance of hepatitis B virus [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52 (1): 9-14.
- Daghestani M, Othman N, Omair MA, et al. Single nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis in Saudi patients [J]. *J Clin Med*, 2023, 12 (15): 4944.
- Al-Eitan L, Abu Kharmah H, Alghamdi M. SNP analysis of stress-related genes reveals significant correlations with drug addiction in Jordan [J]. *Saudi Pharm J*, 2024, 32 (11): 102171.
- 余艳芳, 赵开顺, 屠春林, 等. 核酸质谱检测结核分枝杆菌耐药方法的建立 [J]. *临床肺科杂志*, 2021, 26 (1): 74-81.
- 王俊, 张栋, 陈晴晴, 等. PCR-核酸飞行时间质谱系统检测新型冠状病毒方法的建立及应用研究 [J]. *中国全科医学*, 2020, 23 (35): 4430-4435.
- 中国核酸质谱应用专家共识协作组. 中国核酸质谱应用专家共识 [J]. *中华医学杂志*, 2018, 98 (12): 895-900.
- Igumnova V, Kivrane A, Viksna A, et al. Next-generation sequencing and bioinformatics-based protocol for the full-length CYP2E1 gene polymorphism analysis [J]. *Pharmgenomics Pers Med*, 2022, 15: 959-965.