­­­­第一章 引言

1. 乙型肝炎的介绍

1.1 乙肝的全球范围内的流行情况

乙型肝炎，简称乙肝，是一种由乙肝病毒(hepatitis B virus，HBV)感染所引起的肝脏疾病，长期的病毒感染会导致肝硬化或肝癌，是威胁全球人类健康的主要因素之一。根据世界卫生组织的统计，全世界共有三分之一的人口是HBV的感染者，而其中慢性乙肝患者的人数约为2.4亿，每年约有75万人死于慢性乙型肝炎。目前，HBV感染主要集中在亚洲和非洲的部分区域，约5%-10%的成人被感染，而欧美等国家和地区的感染率较低，仅为1%。中国是HBV感染的高发区域，仅携带者就超过了2亿，约占总人口的10%-15%。

1.2 传播途径

在乙型肝炎的高发区域，最常见的传播途径是母婴传播或在幼儿期的儿童间传播。在乙型肝炎低度流行地区，性传播和血液传播是主要的传播途径。HBV在体外可存活至少7天，在此期间，如果病毒进入未接种乙肝疫苗者的身体，依然可造成感染。HBV不会通过受污染的食品或水传播，通常不可能在工作场所传播。HBV潜伏期平均达75天，但也可能为30至180天不等。HBV在感染后30至60天即可发现，持续时间长短不一。

1.3 发病症状

多数人在急性传染期没有任何症状。但有些人有急性病患，症状可持续数周，包括皮肤和眼睛发黄（黄疸），尿色深，极度疲劳，恶心，呕吐和腹痛。HBV可能造成一些人慢性肝脏感染，以后可能发展成肝硬化或肝癌。感染HBV的健康成年人中，90%以上的人在六个月内会痊愈并完全清除病毒。

2 乙肝病毒

2.1 乙肝病毒与嗜肝DNA病毒科

嗜肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)是能导致动物肝脏（包括人类）感染的有包膜，双链DNA病毒家族；基因组较小，约有3.0-3.2kb，是已知的最小DNA病毒之一；其病毒粒子结构类似，宿主范围非常狭窄且有肝组织嗜性的特点，HBV是嗜肝DNA病毒科的典型代表。嗜肝DNA病毒科各种之间基因组结构、复制机理等具有很高的相似性，因此有大量关于HBV的认识来至于嗜肝病毒科其他病毒的研究，常见的如鸭乙肝病毒（duck hepatitis B virus，DHBV）。

2.2 乙肝病毒的基因组结构

HBV的基因组是部分双链、松弛环状DNA，其中负链是完整且长度恒定的，而正链的链长稍短变长的，正链长度约为负链长度的50%-80%，在病毒的复制过程中，松弛环状DNA(RC-DNA)会被病毒酶催化成cccDNA。HBV基因组由四个完全或部分重叠的开放阅读框（Open Reading Frame，ORF）构成，分别为P（polymerase）、S（surface）、C（core）和X。其中P ORF的长度最长，约为2.5kb，占整个基因组大小的80%，主要负责HBV基因组的复制相关功能；S ORF可分为pre-S1、pre-S2和S三个部分，可以编码三个不同长度的表面蛋白S、M、L，M和L都是S的末端加长形式，三种蛋白共同构成HBV的表面外膜蛋白，与病毒颗粒的释放和宿主免疫压力的逃逸有关；C ORF 包括pre-C和C区，它们具有共同的羧基端，但是pre-C比C多编码29个N端的氨基酸；X ORF编码X蛋白，目前功能尚不明确，相关研究表明X蛋白可能与体内感染的建立有密切关系。

2.3 病毒的复制

2.3.1 乙肝病毒和普通逆转录病毒的区别

HBV是通过逆转录过程来进行基因组的复制，但是和常见的逆转录病毒的复制过程有明显的区别：首先，DNA合成的起始是通过一种独特的protein-priming机制，表现在HBV的逆转录酶有一段额外的末端蛋白结构域(terminal protein,TP)，而在其他逆转录病毒中尚未发现；其次，P蛋白在和模版RNA绑定以及DNA合成过程中，对于分子伴侣有着绝对的依赖。

2.3.2 乙肝病毒粒子

HBV病毒粒子主要由镶嵌三种表面糖蛋白(S, M, L)的磷脂包膜和包含3kb松弛环状DNA基因组的核心蛋白构成。长的负链DNA和P蛋白的TP结构域共价连接，S蛋白是表面包膜蛋白的主要成分，并且介导包含成熟DNA的核衣壳的包膜过程，而L蛋白是病毒粒子吸附和进入细胞不可或缺的因子。

2.3.3 复制过程

病毒核心进入被感染细胞之后，核衣壳被通过核孔被转运到细胞核内，RC-DNA基因组被释放到核基质中，被转化成cccDNA，作为HBV复制的胞内核心中间产物。CccDNA具有高度的稳定性和较长的半寿期，难以彻底被清除，是HBV难以治愈的原因之一。细胞内RNA polymerase II以cccDNA为模板转录一系列的亚基因组RNA(subgenomic RNA)以及两条比基因组更长的RNA，较长的是precore mRNA，较短的是pgRNA。亚基因组RNA编码包膜蛋白以及目前功能尚不明确的X蛋白；precore mRNA编码core蛋白的N末端加长形式的一种非组装蛋白，在经过加工之后释放到细胞外，称为HBeAg，临床上可以作为HBV感染的血清指标；而pgRNA编码壳蛋白和P蛋白，P蛋白在多种宿主分子伴侣如hsp40、hsp70和hsp90等的协助下特异性的结合到pgRNA的5’茎环结构ɛ，形成P-ɛ核酸蛋白复合物(ribonuceloprotein complex)启动核衣壳的装配，P蛋白和部分RNA被装配到核衣壳内部。结合同时以一种protein-priming的形式启动逆转录过程，在新形成的核衣壳内，pgRNA被P逆转录为RC-DNA，完成复制。这些新产生的含有RC-DNA的核衣壳有两种不同的途径：一种是被继续转运到细胞核内，建立10-100个拷贝的cccDNA池；另一种是经过包膜蛋白的修饰，被释放到细胞外，形成新的感染性的病毒粒子。

3. HBV的耐药性研究

3.1 治疗药物

慢性乙型肝炎的治疗主要有两大类药物：干扰素以及核苷类似物(nucleotide analog, NA)。干扰素是一类由单核细胞或淋巴细胞产生的细胞因子，具有光谱的抗病毒活性，还能影响细胞生长、分化以及调节免疫等多种功能。目前，临床上用于治疗乙肝的主要是ɑ干扰素(interferon-ɑ, IFN-ɑ)，具有抗病毒和免疫调节双重功效。在抗病毒方面，主要通过刺激细胞内寡核苷酸的合成来竞争性抑制病毒mRNA的合成；在免疫调节方面，通过增强人白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA) I类和II类分子的表达，以及调节白介素IL-1，IL-2、肿瘤坏死因子等细胞因子的水平来增强宿主自身的抵抗力。由于多种优点，IFN-ɑ在临床上一度得到了广泛的应用，但是缺点逐渐暴露，持续应答率较低，大约只有三分之一的病人能够产生稳定药物应答，而且往往会产生较为严重的副作用。

核苷类似物通过模拟天然核苷的结构，竞争性结合到聚合酶的活性中心，加入到正在合成的病毒DNA链中，终止DNA的延伸过程，从而抑制了病毒的复制。目前临床上使用的核苷类似物主要有五种：拉米夫定(lamivudine, LAM)、阿德福韦(adefovir, ADV)、恩替卡韦(entecavir, ETV)、替比夫定(telbivudine, LdT)以及替诺福韦(tenofovir, TDF)。由于口服核苷类似物治疗的应用，近十年来慢性乙型肝炎的治疗情况有了极大的改善。这些核苷类似物的耐受性较好，对病毒复制的抑制性较强，而且就目前看来副作用小，较为安全。但是核苷类似物治疗最大的缺点是需要长期持续的用药，否则极大概率导致病毒学反弹。不幸的是，长期用药治疗会导致病毒耐药性的产生，导致严重的后果甚至死亡。因此，最大的挑战是怎样最好的使用这些药物来尽可能地减小耐药性产生的可能性，如单药物治疗、多药物交替治疗以及多药物共同治疗等等方案，针对不同情况，选择最好的治疗方案具有重要的意义。

3.2 耐药性产生的原因

尽管HBV是一种DNA病毒，它的复制确实通过RNA中间产物的逆转录来完成。由于RNA聚合酶缺乏校对活性，在逆转录的过程中会产生大量的突变，病毒以准种(quasispecies)的形式存在。在药物的选择压力下，具有复制优势的突变病毒被选择，成为准种中的主导毒株，这些突变称为主要突变(primary mutation)。但是，通常这些具有复制优势突变毒株与野生型毒株相比，病毒健康度(viral fitness)较低，所谓病毒健康度指的是病毒在给定环境中的复制能力。随着时间的推移，会产生一些补偿突变(compensatory mutation)，来提升病毒健康度。核苷类似物的药效(potency)指的是核苷类似物对于HBV逆转录酶自然底物竞争性抑制力的大小，临床上表现为达到对病毒复制抑制的时间的长短。核苷类似物药效大小也会对耐药性的产生有一定的影响，药效强的核苷类似物能够快速且完全地抑制病毒的复制，由于病毒耐药的产生极大依赖于复制的数量，所以使耐药产生可能性降到最低。而中等药效的药物不能完全抑制病毒的复制，并且产生较强的选择作用，导致耐药性产生的概率最高。

3.3 耐药性的临床分类

National Institutes of Health Workshop对于HBV的耐药性进行了规范定义，主要根据HBV 病毒载量的变化情况来进行分类。

3.3.1 初期不应答(primary non-response)

初期不应答的定义是：在核苷类似物治疗的最初6个月内，血清HBV病毒载量下降不超过1log IU/ml(international units per ml)。初期不应答可能由多种因素造成，如宿主、病毒、药物等。催化药物成为活性复合物的酶的多样性以及使核苷类似物磷酸化成为三磷酸形式都可能导致初期不应答，药物服用的剂量也是因素之一。初期不应答的监测十分重要，因为在最初6-12个月的治疗后，血清中HBV载量仍保持较高的情况下，就会有很高的风险发生耐药反应。

3.3.2部分应答(partial response)

在长期持续的治疗中，如果仍然能够通过real-time PCR方法检测到HBV DNA，就称该临床反应为部分应答。

治疗的第24周被发现能够对LdT或者LMV的治疗结果有一定预测作用。在第24周病毒载量大于1000copies/ml(约等于200 IU/ml)的病人比低于该病毒载量的病人有更高发生耐药的风险。

3.3.3 病毒学爆发(Virological Breakthough)

病毒学突破指的是在病人对药物发生应答反应之后，并且遵守治疗过程的情况下，血清病毒DNA载量上升≥1logIU/ml。病毒学突破通常与耐药性的发生有着密切的关系。在治疗的初期病毒DNA载量大幅度下降，可能是由于耐药突变体相比野生型的毒株健康度较低，复制活力不足。但是由于后期补偿突变的出现，会弥补主要耐药突变引起的健康度下降，最终导致了病毒反弹(viral rebound)，可能会反弹到会治疗前更高的水平。

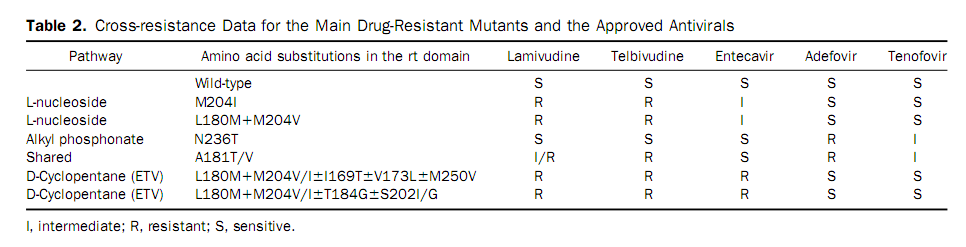
3.3.4 生化爆发(Biochemical Breakthough)

生化突破的定义是初期达到正常水平的血清转氨酶(aminotransferase)在治疗过程中大幅度升高。血清转氨酶水平在发生病毒学爆发后也可能保持正常水平，持续时间几周到几年不等。生化爆发通常与病毒反弹的过程一致，在某些情况下，血清转氨酶的大量上升会引起肝炎，少数情况下会导致肝功能障碍。

3.4 针对乙肝耐药不同情况的治疗

3.4.1 初期不应答的治疗

初期不应答反应经常发生在ADV的治疗的病人中，大约占到10%-20%，主要原因可能是使用剂量不足。如果发现病人对ADV不应答，应答迅速将ADV转换成TDF或者ETV来治疗。初期不应答在LMV, LdT,ETV或者TDF治疗病人十分少见，因此在这些病人中主要要保持服药的依从性。如果服药依从性良好，依旧发生了初期不应答反应，可以通过对耐药突变位点的分析来针对性地进行治疗方案的转换（见下表）。



3.4.2 部分应答

部分应答在所有的核苷类似物治疗中都有发生，相比初期不应答，具有更高的普遍性。同样的，服药的依从性也应该首先进行检查，以确定是否由病人自身不配合治疗而引起的。对于LMV，ADV或者LdT治疗的病人，如果发生部分应答反应，主要有两种治疗方案：换成一个药效更高的核苷类似物或者加入一个药效更高的药物共同治疗。当然，新方案的选择也有很多方面的考虑，最好不要选择具有相似化学性质的核苷类似物，如在ADV的治疗中不能加入TDF，因为它们都属于烷基磷酸盐类化合物。

3.4.3 病毒学爆发

病毒学爆发在服药依从性良好的病人中发生，是由病毒产生了耐药性引起的。产生耐药性主要和以下几个因素有关：初期治疗选择的核苷类似物；治疗前病人血清的HBV病毒载量的高低；部分应答也会导致病毒学爆发。耐药性越早发现越好，最好是在血清转氨酶水平上升之前，通过监测血清HBV DNA水平的变化情况初步确定，如果条件允许，可以对耐药突变位点的产生进行鉴定。后续的治疗方案的选择会基于鉴定的耐药位点，根据不同的耐药位点，选择最合适的方案。临床学和病毒学的研究表明，尽早的发现耐药现象，转变治疗方案，对后续的治疗效果有非常大的帮助。如果确定发生了耐药性，应当选择具有最强药效并且最小概率发生多药物抗性的药物，因此，加入一种和早期治疗药物不同化学性质并且有较强药效的药物是首先选择方案。

治疗方案转变的一些依据和原则如下：

发生LMV耐药反应：加入TDF或者ADV共同治疗，首选TDF。

发生ADV耐药反应：推荐用TDF替换ADV，并且加入另外一种无交叉抗性的药物。如果发现了rtN236T耐药位点，加入LMV、ETV或者LdT共同治疗，或TDF+恩曲他滨(emtricitabine)替换先前方案。如果发现了rtA181V/T耐药位点，推荐加入ETV共同治疗，或者TDF加上ETV或者恩曲他滨共同治疗。

发生LdT耐药反应：推荐加入TDF或者ADV共同治疗。

发生ETV耐药反应：推荐加入TDF。

发生TDF耐药反应：TDF的主要耐药位点到目前为止还未发现，推荐首先做基因型和表现的鉴定，查明交叉耐药位点的存在情况，再根据不同的情况选择不同药物共同治疗，可以加入ETV、LdT、LMV或者恩曲他滨等。

值得注意的是，在长期的治疗下，多药物共同的治疗的安全性到目前还是未知的，而且追加治疗也不一定能够达到足够的病毒抑制作用。

3.5 预防耐药性产生

通过一些手段和措施可以尽可能的减少耐药反应的产生，例如：避免不必要的药物使用，更加小心的选择多药物组合治疗方案，持续的耐药位点监测等。

由于HBV复制过程的特殊性，在逆转录的过程中，由于逆转录酶缺乏校对活性，会产生大量的突变，导致病毒群体的遗传多样性。所以，在未接受治疗的病人中，即使缺乏药物的选择压力，也会有含耐药位点的少部分准种的存在。在一般情况下，大部分病人不需要接受抗病毒治疗，HBV的携带者的数量庞大，但是真正发病的群体只占小部分。一些专业的机构包括美国肝脏研究协会(the American Association for the Study of the Liver)、欧洲肝脏研究协会(the European Association for the Study of the Liver)、亚太肝脏研究协会(the Asian Pacific Association for the Study of the Liver)、国立健康研究所(the National Institute of Health)会定期更新一些指导方案，协助临床工作者来对慢性乙肝进行识别、诊断、预防和管理。这些机构都一建议，只有具有严重肝脏病变的病人才需要进行抗病毒治疗，一些症状较轻或几乎未发现症状的病人接受治疗，只会加速耐药性的产生。起到适得其反的作用。治疗算法已经制定出来，用于识别需要接受治疗的病人，并且决定最佳的治疗时机。

因为耐药准种种群的建立和扩大是建立在大量复制的基础上，所以抗病毒治疗一旦开始，就应该以彻底和迅速的抑制病毒复制为目标，这样才能最大减少耐药反应产生的机率。相比而言，TDF和ETV比LMV、LdT以及ADV具有更小的耐药反应产生机率，所以TDF和ETV被作为一线治疗选择药物，特别是在肝脏移植、肝硬化以及肝功能障碍的病人中，因为这些病人中更容易发生耐药反应。

多药物组合治疗在慢性乙肝治疗中更为常见。适当组合方案的选择极为有效，能够极大地降低耐药反应的产生。因为对单个药物具有抗性的突变体在未接受治疗的病人中十分常见，但是具有多重抗性的突变体却是极为罕见的。理想情况下，组合药物的选择应该具有不同的抗病毒机制，这样才能相互配合，发挥最大的抗病毒作用。核苷类似物的组合使用虽然能够减少耐药反应产生的机率，却不能提高抗病毒效力。干扰素和核苷类似物组合使用是下一步的治疗方案。

多药物治疗组合方案选择不当并不能起到预期的作用，甚至会适得其反。多个L-nucleoside的治疗并不会比单个L-nucleoside更为有效，相反可能会产生竞争性抑制反应，因为它们会竞争胞内激活机制以及病毒靶点。胞外实验中并没有发现同时对LMV和ADV具有抗性的突变体存在，并且一些临床研究表明两者组合治疗具有较好的药效，所以LMV和ADV是一种有效的组合方案。一些初步的数据也支持ETV和ADV或者TDF组合使用，但是还缺乏一些临床实验和成本效益分析的支持。

为了更早的发现耐药反应的发生，每个病人的临床治疗反应该被仔细地监测，最好在病毒学爆发和病情恶化之前。血清HBV病毒载量和转氨酶的水平应到在治疗开始后每3-6个月测量一次，来确定药效和治疗依从性是否良好。缺乏治疗依从性是导致初期不应答的主要原因。在治疗期限达到两年之后，测量应当缩短到每三个月一次，因为这是产生耐药反应机率最大的时期。对于耐药反应产生较快且病情较为严重的病人，也应当每三个月进行一次血清病毒载量和转氨酶含量的测量，一旦病毒载量上升到1.0 logIU/ml，HBV的逆转录酶基因应该被测序，确定耐药突变的类型，来作为下一步治疗方案选择的依据。

第二章 HBV准种的研究进展

准种的定义指的是：受到遗传变异、竞争和选择等一系列过程影响的高度相关的但不完全相同的变异株和重组基因组组成的动态种群。这一概念最先有Eigen等人在研究RNA分子复制机制的时提出。HBV的种群是以准种的形式存在的，由于HBV在复制过程中高复制率，以及缺乏校对功能的逆转录过程，出错率较高，导致大量变异株的产生，这些变异株就构成了HBV的准种。进一步的研究发现，HBV的准种可能与患者的临床表现、抗病毒治疗结果以及乙肝疫苗的作用效果密切相关。

随着科学技术的发展，各种新技术逐渐被应用于 HBV 准种研究。近年来，DNA 测序技术被不断改进和创新，第二代测序技术以其超深度和高灵敏度等特点给 HBV 准种带来了新的研究策略。现就 HBV 准种的研究技术（特别是第二代测序技术）以及应用该技术所取得的研究进展作简单的介绍。

HBV准种研究技术的概况

在目前关于 HBV 准种的研究工作中，常见研究方法有：PCR直接测序(PCR Direct Sequencing)、PCR-克隆-测序(PCR Clone-Sequencing)、反向杂交(Reverse Hybridization)等，还有新出现的超深度焦磷酸测序技术 (Ultra-deep Pyrosequencing，UDPS)。

这些技术在病毒准种研究中有各自的优缺点和不同的适用性。

直接测序法，即 PCR 测序法，其测序方法为传统的 Sanger- 毛细电泳测序。该方法操作较为省时省力，但是敏感度较低，只能检测病毒种群中 > 20% 的变异，难以检测病毒准种中比例较低的变异株。

反向杂交技术中常用的反向线性探针杂交技术 (Line Probe Assay，LIPA)，能够检测到在病毒种群中 > 5% 的变异，其敏感度相比直接测序有所提高。由 Innogenetics 公司开发的 INNO-LiPA HBV DRv2 试剂盒已经能够用于临床检测，对于常见核苷类似物，如拉米夫定、替比夫定、阿德福韦酯和恩曲他滨的耐药突变均可进行检测，但由于价格昂贵等因素未在国内普及。

PCR-克隆-测序法是HBV准种研究的“黄金标准”，在国内外很多病毒准种研究中使用了该方法。克隆-测序技术对检测病毒种群中相对比率较低的变异株有较高敏感性，但是开销较大，而且耗费时间和人力物力。此外，在克隆挑取的过程中存在随机性，一个患者样本能够提供克隆测序的数目似乎不能充分代表整个病毒种群的遗传变异，所挑取的克隆与患者血清中的准种组成相比存在偏倚。随着测序技术的发展及第二代测序技术平台的商品化，超深度焦磷酸测序这种全新的技术逐渐在HBV准种的研究中得到广泛的应用。

测序技术的起源与发展

基于组包含了生物体的全部遗传信息，快速而又准确地获取基因组信息对于生命科学的研究具有重要的意义。测序技术能够真实地反映基因组DNA上的遗传信息，进而比较全面地揭示基因组的复杂性和多样性，因而在生命科学研究中扮演重要的角色。

测序技术最早可以追溯到20世纪50年代，早在1954年就已经出现了关于早期测序技术的报导，即Whitfeld等用化学降解的方法测定多聚核糖核苷酸序列[1]。1977年Sanger等发明的双脱氧核苷酸末端终止法和Gilbert等发明的化学降解法，标志着第一代测序技术的诞生[2, 3]。此后在三十几年的发展中陆续产生了第二代测序技术，包括Roche公司的454技术[4, 5]、Illumina公司的Solexa技术[6-8]和ABI公司的SOLiD技术[9, 10]。最近，Helicos公司的单分子测序技术[11-13]、PacificBiosciences公司的单分子实时(Single Molecule Real Time,SMRT)测序技术[14, 15]和 Oxford Nanopore Technologies公司正在研究的纳米孔单分子测序技术[16]被认为是第三代测序技术[17]。测序技术正在向着高通量、低成本、长读长的方向发展[18]。

第一代测序技术帮助人们完成了从噬菌体基因组到人类基因组草图等大量的测序工作，对生命科学的研究产生了巨大的推动作用，但由于其缺点也较为明显，成本高、速度慢等。经过不断的开发和测试，进入21世纪后，以Roche公司的454技术[4, 5]、Illumina公司的Solexa技术[6-8]和ABI公司的SOLiD技术[9, 10]为标志的第二代测序技术诞生了。与第一代技术相比，第二代测序技术不仅保持了高准确度，而且大大降低了测序成本并极大地提高了测序速度。使用第一代Sanger的测序技术完成的人类基因组计划，花费了30亿美元巨资，用了三年的时间；然而，使用第二代SOLiD的测序技术，完成一个人的基因组测序现在只需要一周左右的时间，极大地减少测序的时间和成本。



Roche公司的454测序技术

454测序系统是第二代测序技术中第一个商业化运营的测序平台[4]。它的原理是：

① 待测DNA文库的构建

把待测序列用喷雾法(nebulization)打断成300-800 bp的小片段并在小片段两端加上不同的接头，或将待测序列变性后用杂交引物进行PCR扩增，连接载体，构建单链DNA(ssDNA)文库。

② Emulsion PCR

将这些ssDNA与水油包被的直径大约28 μm的磁珠在一起孵育、退火，由于磁珠表面含有与接头互补的寡聚核苷酸序列，因此ssDNA会特异地连接到磁珠上。同时孵育体系中含有PCR反应试剂，因此可以保证每一个与磁珠结合的小片段都会在各自的孵育体系内独立扩增, 扩增产物仍可以结合到磁珠上。反应完成后，破坏孵育体系并富集带有DNA的磁珠。经过扩增反应，每一个小片段都将被扩增大约100万倍，从而达到下一步测序反应所需的模板量。

③ 测序

预 先 用 Bacillus stearothermophilus 聚合酶和单链结合蛋白处理带有DNA的磁珠，然后将磁珠放置在一种叫做PicoTiterPlate(PTP)的平板上。PTP板上含有很多直径约为44 μm的小孔，每个小孔仅能容纳一个磁珠，通过这种方法固定每个磁珠的位置以监测接下来的测序反应。测序反应采用焦磷酸测序法，将一种含有比PTP板上小孔直径更小的磁珠放入小孔，启动测序反应。测序反应以磁珠上大量扩增的ssDNA为模板，每次反应加入一种dNTP进行合成反应。如果这种dNTP能与待测序列配对，则会在合成后释放焦磷酸基团。释放的焦磷酸基团会与反应体系中的ATP硫酸化酶反应形成ATP。生成的ATP和荧光素酶共同氧化反应体系中的荧光素分子并发出荧光。测序反应产生的荧光信号由放置在PTP板另一侧的CCD照相机记录，再经过计算机分析转换为测序结果。由于每种dNTP在反应中产生的荧光颜色不同，因此可以根据荧光的颜色来确定被测分子的序列。反应结束后，游离的dNTP会在双磷酸酶的作用下降解ATP，导致荧光淬灭，从而使反应体系再生。作为一个反应器，由于PTP板上每个小孔之间相互独立，因而大大降低了反应的干扰和误差。

在2008年，Roche公司推出了454技术最新的GS FLX Titanium系列试剂和软件，提升了读取长度与测序通量，使454技术的平均读取长度达到400 bp，每个循环能产生总量为400-600 Mb的序列，耗时约10小时[5]。454技术的主要缺点是无法准确测量同聚物(homopolymer)的长度。例如当待测序列中出现Poly(A)的情况下，测序反应中会一次加上多个T，而加入T的数目只能从荧光信号的强度来推测，有可能造成结果不准确。也正是因为这个原因，454技术主要的错误不是来自核苷酸的替换，而是来自插入或缺失。454技术最大的优势在于较长的读取长度，使得后继的序列拼接工作更加高效、准确。

超深焦磷酸测序在HBV准种耐药研究中的应用

由于HBV难以完全的清除，目前慢性乙肝的治疗目的主要是抑制病毒的复制，防止肝脏进一步恶化和肝癌的产生。但是，核苷类似物治疗虽然能够抑制病毒的复制，长期的治疗会引发耐药突变，使抗病毒治疗失败。所以，对耐药产生的位点进行鉴定，有助于后续治疗方案的选择，具有重要的意义。

灵敏度的对比

超深焦磷酸测序以其超高灵敏度 （可以检测0.1%水平的突变）的优势，在HBV准种的耐药突变研究中得到了广泛的应用。Margeridon-Thermet 等对超深焦磷酸测序技术和传统的PCR直接测序技术进行了对比，用两种方法分别对 20 份接受过核苷类似物 (LAM、ADV和ETV) 治疗和 17 份未接受过治疗的乙型肝炎患者血清进行分析，检测其相关突变位点，在 10 份用过药的患者血清中发现了用超深焦磷酸测序检测到而PCR直接测序未能检测到的 NAs 治疗相关的耐药突变，包括 rtV173L、rtL180M、rtA181T、rtT184S、rtS202G、rtM204V 和 rtN236T 等位点。在接受过核苷类似物治疗的病人中，每个血清样本应用超深焦磷酸测序法比PCR直接测序法平均多检测到4.6个突变位点，突显出了超深焦磷酸测序技术的巨大优势。

Solmone等用超深焦磷酸测序、克隆-测序和 LIPA 三种方法对13位乙肝病人的血清进行研究，得到使用超深焦磷酸测序技术检测突变株的灵敏度远远高于其他两种方法的结论。在超深焦磷酸测序技术的研究中，无论患者用药与否，在HBV逆转录酶RT基因的功能区及非功能区都存在变异位点，但用接受过治疗的患者变异位点总数比未用药的患者要多，而且这种差别在功能区表现得更为明显。此外，同种变异在不同患者病毒准种中的相对比例差异很大，在 l% - 99% 之间。

RT和S重叠区域的研究

RT基因和 S基因重叠，因此RT基因的变异往往导致S基因的变化，两者相互影响。RT突变可能破坏S蛋白的表位构象，导致免疫逃逸，使得HBV疫苗失效。Margeridon-Thermet 等应用超深焦磷酸测序分析了10份未接受过核苷类似物治疗和 7 份接受过治疗患者的血清，发现 13 个 S 蛋白突变位点中有 3 个和 RT 区的氨基酸 (AA) 改变相关，而其他位点的变异则多数和 RT 区的同义突变相关。

同时，这 17 份血清样本中，他们在 S 基因与 RT 区未重叠区域的 13 个位点发现了 40 个终止密码子突变，提示 S 基因介导的 S 蛋白终止密码子突变与 RT 区相关的 S 蛋白终止密码子变异可能承受不同的选择压力。有研究结果表明，RT和S虽然共用同一条序列，但是为了保持各自的功能，它们的进化互相独立。

Solmone 等研究发现，虽然 表面抗原蛋白和逆转录酶的ORF相互重叠，但是两个ORF的氨基酸替换频率并不完全重叠，分析原因可能是由于一个 ORF 的非同义突变在另一个 ORF 表现为同义突变。

此外，他还提出 HBsAg的a 决定簇的所有替换位点都和 RT 区的突变相关。由于 a 决定簇包括抗 HBs 的构象表位，a 决定簇中或其周围的氨基酸替换都可能产生免疫逃逸毒株。所以，由核苷类似物耐药诱发的免疫逃逸毒株的临床影响应得到广泛关注。

超深度焦磷酸测序与 HBV 准种异质性

HBV 准种是一群互相作用的变异株，可以认为是一个动态变化的病毒种群，而不是一群独立的个体。病毒准种在遗传学上高度相关，但是也存在细微差异，主要表现为准种序列的异质性 (heterogeneity)。准种异质性可以通过准种复杂度(complexity) 和准种离散度 (diversity) 两方面来评估。有研究结果表明，相比患者血清中 HBV DNA 含量的变化，准种复杂度的动态变化能够更好、更早地预测抗病毒治疗的效果及耐药情况的发生。

利用定量的超深焦磷酸测序技术不仅可以分析 HBV 基因中每个位点的突变率，还可以检测同一基因组的氨基酸组合变异情况（连锁分析），进而对准种异质性进行定量检测。Nishijuna 等应用 Illumina 技术研究分析了14个未接受核苷类似物治疗的病人，发现准种复杂度和患者的 HBV DNA 水平及肝纤维化程度无关。

Rodriguez-Frias 等对1位先后接受 LAM、ADV、ETV、TDF治疗的慢性乙肝患者进行了长期跟踪研究，用超深焦磷酸测序依次分析了各个时间节点患者的血清DNA序列，发现在进行核苷类似物治疗后DNA水平和氨基酸水平的准种多样性都显著增加。另外，在氨基酸水平，S比RT更高，反映了在宿主的免疫压力下，表面抗原蛋白比逆转录酶更容易发生选择性进化，这一点在未进行抗病毒治疗的患者体内表现得更加明显。