维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0053-04

型特异引物 PCR 法分析 238 株乙肝病毒基因型

曾爱中[1,2],黄爱龙[1],郭进军[1],黄文祥[2],李青岭[1],张祯祯[1],郝美君[1]

(1. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所、教育部感染性疾病分子生物学重点实验室, 重庆 400016;
2. 重庆医科大学附属第一医院感染科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究乙肝病毒(HBV)感染者 HBV 基因型分布状况,并建立一套 HBV 病毒株分型的简便可靠的分析法。方法:设计型特异引物,采用基因型特异引物聚合酶链反应(PCR)法分型。结果:238 株 HBV 中 218 株得到分型。其中 B 型 149 例 (男 115 例、女 34 例);C 型 63 例(男 47 例、女 16 例);B+C 混合型 6 例(男 4 例、女 2 例)。B 型、C 型和 B+C 混合型检出率分别为 68.3%(男 69.3%、女 65.3%)、28.9%(男 28.3%、女 30.8%)和 2.8%(男 2.4%、女 3.8%)。未检出 A、D、E、F、G、H 基因型。结论:HBV感染者以 B 基因型为主。基因型 B 检出率显著高于其它基因型,其差异具有统计学意义($P<0.01$)。HBV 各基因型分布与性别无关($P>0.01$)。

【关键词】乙型肝炎病毒;基因型;型特异核苷酸;聚合酶链反应
【中国图书分类法分类号】R512.62 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-20

Genotyping of 238 HBV strains by the methods of type-specific primers PCR

ZENG Ai-zhong, et al

(*Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a set of suitable and reliable methods and to study the distribution of HBV genotypes. *Methods*: Type-specific primers were designed, and type-specific primers PCR was used to genotype the HBV strains. *Results*: A total of 218 out of the 238 strains were genotyped. Among them, 49(68.3%) cases were genotype B(male 69.3%, female 65.3%), 63(28.9%) cases were genotype C(male 28.3%, female 30.8%), 6(2.8%) cases were mixtures of genotype B and C (male 2.4%, female 3.8%). No genotype A, D, E, F, G and H were found. *Conclusion*: Genotype B is the most dominant type for HBV strains and there is no relationship between the gender and HBV genotypes.

【Key words】 Hepatitis B virus; Genotype; Type-specific nucleotides; Polymerase chain reaction(PCR)

乙型肝炎(下称乙肝)是严重危害人类身体健康的常见传染病。由于乙肝病毒(HBV)DNA 聚合酶缺乏 3'→5'外切核酸酶活性,导致 HBV 基因变异率较高,根据 HBV-DNA 全序列的差异将其分为A、B、C、D、E、F、G、H8 个基因型[1]。HBV 基因型呈一定的地域性分布,人类感染 HBV 后的疾病谱、肝脏病变程度、愈后转归以及治疗效应与 HBV 基因型存在着一定的相关性[2,3]。HBV 基因分型是 HBV 分子病毒学和临床研究的基础。本文结合基因库中新增加的 HBV12 株 G 型、11 株 H 型序列设计型特异引物,运用型特异引物 PCR 法,分析 238 例慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型。现将结果分析报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源

从 2004 年 11 月~2007 年 7 月在重庆医科大学附属第一医院感染科门诊和住院部送检的慢性乙肝患者空腹血清,共计 238 份,其中男性 179 例,女性 59 例,年龄 19~60 岁,平均年龄为(36.1±8.6)岁。诊断符合 2000 年"病毒性肝炎防治方案"的标准[4]。待检血清标本于 -80℃冰箱存放,集中检测。

1.2 仪器设备及试剂

Eppendorf Mastercycler 基因扩增仪(德国),Eppendorf 高速台式离心机(德国),Eppendorf 5301 真空干燥仪(德国),Hermle Z 233 MK-2 高速低温台式离心机 (德国)。Gene

作者介绍: 曾爱中(1969-),男,副主任医师,博士生,主要研究方向: 肝病的治疗及耐药机制研究。
通讯作者: 黄爱龙,男,教授,E-mail:ahuang1964@yahoo.com.cn。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Genius Bio Imaging System 凝胶成像仪(美国基因公司)。蛋白酶 K、酚氯仿(PDO419-1)购自上海生工生物技术公司,dN'I'P 和 Taq DNA 聚合酶、50bp DNA Marker 购自 TaKaRA 宝生物工程(大连)有限公司),琼脂糖(OXOID LP0028A 英国),ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer(HITACHI 日本)

1.3 方法

1.3.1 血清标本 HBV-DNA 提取 采用蛋白酶 K- 酚氯仿法提取病毒 DNA,参照 Naito 等[5]的方法并改进。溶于 50μl TE 中 -80℃保存备用。

1.3.2 采用巢式 - 多重 PCR 扩增 PreS 及 S 区基因 A ~ H 型型特异引物参见 Naito 等[5],根据对 GenBank 中 12 株 HBV G 型、11 株 HBV H 型核苷酸序列自行设计扩增 HBV G 型、H 型内引物。见表 1。

第 1 轮 PCR 反应液体积 25μl 中含:10 × PCR buffer (Mg^{2+} plus) 2.5μl、2.5mmol/L dNTPs(2.5mmol) 2μl、5mmol/ 外引物 P1 和 P2 各 1.0μl、模板 2μl、Taq 酶 0.125U、灭菌 ddH_2O 16.5μl。反应条件:95℃ 10min,然后 94℃ 20s、54℃ 20s、72℃ 60s,共 40 个循环。第 2 轮 PCR 反应以第 1 轮 PCR 产物 1μl 作为模板、引物各 1μl。反应条件:95℃ 10min,然后 94℃ 20s、57℃ 20s、72℃ 30s,20 个循环,再 94℃ 20s、59℃ 20s、72℃ 30s,20 个循环。第 2 轮 PCR 产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察,A 组:出现 68bpDNA 条带者为 A 型,281bpDNA 条带者为 B 型,122bpDNA 条带者为 C 型,438bp 条带者为 G 型;B 组:出现 119bp 条带者为 D 型、167bp 为 E 型、97bp 为 F 型、252bp 为 H 型。

2 结 果

2.1 HBV 各基因型男、女性别分布

238 例慢性乙肝患者 HBV 基因分型结果:基因型 B 149 例(男 115 例、女 34 例)、基因型 C 63 例(男 47 例、女 16 例)、基因混合型(B+C) 6 例(男 4 例、女 2 例)。未检出 A、D、E、F、G、H 基因型。各基因

表 1 巢式-多重 PCR HBV 基因分型引物序列

引物	核苷酸序列(位置)
第 1 轮 PCR	
P1 5'-TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA -3'	(nt2 823~2 845 正义通用引物)
P2 5'-CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC -3'	(nt685~704 反义通用引物)
第 2 轮 PCR	
A 组	
P3 5'-GGC TCM AGT TCM GGA ACA GT-3'	(nt67~86 ABCG 型正义通用引物)
P4 5'-CTC GCG GAG ATT GAC GAG ATG T -3'	(nt113~134 A 型反义引物)
P5 5'-CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A -3'	(nt324~345 B 型反义引物)
P6 5'-GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G -3'	(nt165~186 C 型反义引物)
P7 5'- CAG GAT CCT CGA CCA CCA GT -3'	(nt486~505 G 型反义引物)
B 组	
P8 5'-GGAGGC GGA TYT GCT GGC AA-3'	(nt3 078~3 097 DEFH 反义通用引物)
P9 5'-GCC AAC AAG GTA GGA GCT -3'	(nt2 979~2 996 D 型正义引物)
P10 5'- CAC CAG AAA TCC AGA TTG GGA CCA -3'	(nt2 955~2 978 E 型正义引物)
P11 5'-GYT ACG GTC CAG GGT TAC CA -3	(nt3 032~3 051 F 型正义引物)
P12 5'-TAC AGC ATG GGA GCA CCT CTC -3'	(nt2 845~2 865 H 型正义引物)

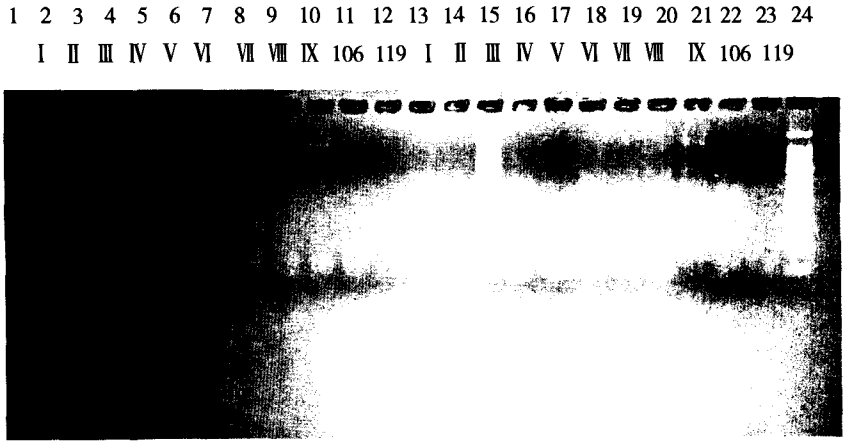
"M"代表核苷酸 A 或 C;"Y" 代表核苷酸 C 或 T

表 2 218 例 HBV 基因型在不同性别检出率 n (%)

性别	n	B 型	C 型	B 型 +C 型	A 型	D 型	E 型	F 型	G 型	H 型
男	166	115(69.3)	47(28.3)	4(2.4)	0	0	0	0	0	0
女	52	34(65.3)	16(30.8)	2(3.8)	0	0	0	0	0	0
合计	218	149(68.3)*	63(27.9)	6(2.8)	0	0	0	0	0	0

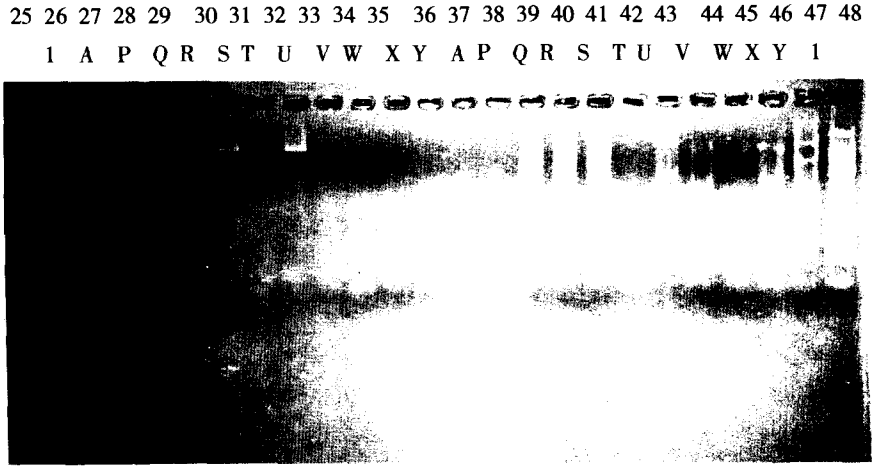
* 基因型 B 与其它基因型比较 $P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com



1、24 Marker 2～12（Ⅰ Ⅱ Ⅲ Ⅳ Ⅴ Ⅵ Ⅶ Ⅷ Ⅸ 106 119） Mix B；
13～23（Ⅰ Ⅱ Ⅲ Ⅳ Ⅴ Ⅵ Ⅶ Ⅷ Ⅸ 106 119）. Mix A； B 型 281bp； C 型 122 bp

图 1 巢式-多重型特异 PCR 扩增 HBV S 区基因产物



25、48 Marker 25～36（A P Q R S T U V W X Y Mix B）
36～48（A P Q R S T U V W X Y Mix A） B 型 281bp C 型 122 bp

图 2 巢式-多重型特异 PCR 扩增 HBV B、C 型 S 区基因产物

型男、女性别检出率比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。基因型 B 与其它基因型比较差异有统计学意义（$P<0.01$）。238 例慢性乙肝患者 HBV 基因型在不同性别检出率比较见表 2。

2.2 巢式-多重 PCR HBV 基因分型

巢式-多重 PCR 产物经 3%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，紫外灯下观察，只观察到 3 种类型条带，均出现在 A 组：出现 281bp 条带者为 B 型，出现 122bp 条带者为 C 型，出现 281bp 和 122bp 2 种条带者为 B+C 混合型。出现混合型条带者均经第 2 次 PCR 重复扩增以证实。未见其它类型条带出现。分型判断结果见图 1、图 2。

3 讨 论

现行 HBV 基因分型方法有：(1)基因测序分型法；(2)聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分型法（PCR-RFLP）；(3)PCR 微板核酸杂交酶联免疫分型法；(4)基因型特异性表位单克隆抗体酶联免疫分型法（ELISA）；(5)线型探针分析法（INNO-LiPA）；(6)型特异引物聚合酶链反应法（PCR）。基因序列测定法基因序列测定是最直接、最可信的 HBV 基因分型方法，是 HBV 基因分型的金标准。但不管是全序列还是 S 基因序列测定，均不可避免面临大量

维普资讯 http://www.cqvip.com

序列测定的实际困难,且费用较高,不适合大规模的临床和流行病学调查。PCR-RFLP 分型方法不需对酶切产物进行杂交和测序,是一种有效、简便的分型方法,适用于流行病学调查研究。但它也有以下缺点:(1) 只有恰好在限制酶识别序列内的突变才能被识别;(2) 如果限制酶消化待测序列不彻底或 HBV 各基因型混合感染时就会出现复杂条带,导致结果不好解释;(3)参考序列少,图谱较复杂。单克隆抗体酶联免疫法的特点是操作简便,可用于大样本的检测。但要求所检测的必须是乙型肝炎病毒表面抗原阳性血清,对有些混合型感染和 HBsAg 低水平表达的标本可能无法鉴别,并且建立一套抗前 S2 区基因特异性表位的单抗较为困难。INNO-LiPA 基因分型法是一种可信便利、快速的方法,能检测所有基因型 A~H,其最大优点是对混合基因型检测非常敏感,可鉴别某些用直接测序不能区分的混合型感染。缺点是只能对已建立的基因型进行分型, 且检测成本高,不利于推广。HBV 基因型特异性引物 -PCR 分型法是一种简单、快速、特异的分型方法,可应用于临床感染诊断和大规模的流行病学调查。在 Naito[5] 研究基础上, 根据对 GenBank 中 12 株 HBV G 型、11 株 HBV H 型核苷酸序列自行设计扩增 HBV G 型、H 型内引物以了解本地 HBV 基因型构成并探讨有无 HBV G 型、H 型存在。

应用 A ~ H 基因型特异性引物 -PCR 分型法我们成功对 218 株 HBV 进行分型。其中 B 型 149 例 (男 115 例、女 34 例); C 型 61 例(男 47 例、女 16 例); B+C 混合型 6 例(男 4 例、女 2 例)。B 型、C 型和 B+C 混合型检出率分别为 68.3%(男 69.3%、女 65.3%)、27.9%(男 28.3%、女 30.8%)和 2.8%(男 2.4%、女 3.8%)。未检出 A、D、E、F、G、H 基因型。研究表明重庆地区慢性 HBV 感染者以 B 基因型为主,基因型 B 检出率显著高于其它基因型,其差异具有统计学意义($P<0.01$)。HBV 各基因型分布与性别无关($P>0.01$)。另外 20 株未能分型,一方面可能是基因型内个别核苷酸变异所致,这可能是型特异性引物 -PCR 分型法和 PCR-RFLP 所面临的共同问题,目前还没有一种引物能够检测所有基因型,引物的设计也需要进一步优化;另一方面可能与病毒滴度偏低,HBV-DNA 提取效率不稳定有关。

国内对 HBV 基因型检出率报道不一[6,7]:深圳地区基因型分布 C 型 68.0%、B 型 10.0%、D 型 6.0%、F 型 2%、混合型(B+C)/(B+C+D) 8%;兰州地区 C 型 67.0%、B 型 12.5%、混合型(B+C)18.2%、(A+D)型 2.3%; 温州地区 C 型 66.46%、B 型20.49%、D 型 1.97%、混合型(B+C)/(C+B)11.08%; 浙江仙居地区 C 型 80.2%、B 型 14.4%。这些地区基因型以 C 型为主,基因型检出率高低顺序是 C>B>D。青岛报道基因型 C 型 1.5%、B 型 89.7%、A 型 8.82%; 湖南省报道基因型检出率 B 型 73.5%、C 型 26.5%。这些地区以基因型 B 型为主。东莞地区基因型 C 型为主要检出型,同时检出 3 种混合型(B+C、C+D、B+D),其种类多,检出率偏高这一特点提示,慢性乙肝漫长的病毒感染过程中,病毒群体中不同毒株的变迁或者重叠感染不同的基因型 HBV 所致。

型特异性引物 -PCR 分型法具有快速、准确及费用低廉等特点,能对绝大多数 HBV 进行分型。关于 HBV 基因型的研究将是我国 HBV 资料库的一个重要补充,对指导临床治疗、流行病学分析都具有重要意义。

参 考 文 献

[1] Song YJ,Dai EH,Wang J,et al. Genotyping of hepatitis B virus (HBV) by oligonucleotides microarray[J]. Molecular and Cellular Probes,2006;20(2):121-127.

[2] Chu CJ,Lok ASF. Clinical significance of hepatitic B virus genotypes[J]. Hepatology,2002;29(5):1 274-1 276.

[3] Kao JH,Wu NH,Chen PJ,et al. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy[J]. J Hepatol,2000;33(6):998-1 002.

[4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会·肝病学分会.病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志,2000;8(6):324-329.

[5] Naito H,Hayashi S,Abe K.Rapid and specific genotyping System for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers[J]. J Clin Microbiol,2001;39(1):362-364

[6] 许 军,王齐欣,蒋 栋,等.乙型肝炎病毒基因型与病情轻重的关系[J]. 中华肝脏病杂志,2003;11(1):11-13.

[7] 刘映霞,胡国龄,谭德明.湖南省乙肝病毒基因型分型及临床意义[J]. 湖南医科大学学报,2002;27(1):29-31.

(责任编辑:冉明会)