

38-42

第12卷第1期
1997年3月中国病毒学
VIROLOGICA SINICA20173(6)
Vol. 12 No. 1
Mar. 1997

抗-HCV 阴性献血员中丙型肝炎病毒 RNA 检测及序列分析*

潘卫方芳 崔晓红 宋燕斌 戚中田

(第二军医大学微生物教研室, 上海 200433)

A

摘要 对 95 份抗-HCV IgG 阴性献血员采用逆转录聚合酶链反应法(PCR)检测丙型肝炎病毒 RNA, 结果 8 次中有 6 次共检测出 17 份阳性标本(17/95, 17.9%), 复查抗-HCV IgG 仍为阴性。对其中 8 份阳性产物中高变区 1 的序列分析结果表明均为不同株 HCV 序列, 排除了 PCR 污染的可能性。对其中 2 份阳性产物测定了全序列并与 HCV 各基因型代表株的相应序列比较, 与 HCV II 型相应序列的核苷酸同源性为 77%~79%, 而与 HCV I、III、IV 相应序列间的同源性为 62%~69%, 表明为 HCV II 型序列。结果提示献血员抗-HCV IgG 筛选不能完全排除 HCV 感染者, 漏检不是由于 HCV 基因序列变异, 而是检测方法本身缺陷所致。

关键词 丙型肝炎病毒, 序列, 聚合酶链反应

RNA 检测, 序列分析

输血是我国丙型肝炎病毒重要的传播途径^[1]。目前, 采用抗-HCV IgG 检测献血员进行筛选。尽管如此, 临床上仍发现输血后有丙型肝炎的发生。为了探索其中可能的原因, 我们在 1993 年 8 月至 1995 年 2 月对 95 例抗-HCV IgG 阴性的献血员, 采用逆转录及聚合酶链反应法检测其 HCV RNA, 并进行序列分析, 结果报道如下。

材料和方法

- 1 标本采集 献血员标本由上海长海医院血库提供。其中 1993 年 10 月 11 日和 1995 年 1 月 20 日两批标本为义务献血员标本, 其余标本均为职业献血员标本, 其中 1994 年 4 月 12 日及 13 日二批献血员有献浆史。
- 2 抗-HCV IgG 检测 见参考文献^[2]。
- 3 HCV RNA 的提取 见参考文献^[2]。
- 4 HCV RNA 的 RT-PCR 检测 采用套式 PCR 进行检测。引物序列为 SE1 5'-CTACTCCGGATCC-CACAAGC-3'(相应于 HCV-J 株核苷酸 1338~1357 位), ASE1 5'-GGGCTCGGAGTGAAGCAATA-3'(相应于 HCV-J 株 1848~1867 位), SE2 5'-ATTCCATGGTGGGAACTGG-3'(相应于 HCV-J 株 1414~1433 位), ASE2 5'-GCAATACACTGGACCACACA-3'(相应于 HCV-J 株 1833~1852 位)。HCV RNA 经引物 ASE1 引导逆转录合成 cDNA, 反应体积 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 1 h; 再由 SE1, ASE1 引导进行第一轮扩增, 扩增体积 50 μ L, 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 54 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2 min; 循环 35 个周期, 取第一轮扩增产物 5 μ L, 由 SE2, ASE2 引导进行第二轮扩增, 扩增体积 50 μ L, 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 54 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1.5 min; 循环 35 个周期。取产物 20 μ L 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外灯下观察结果。每次 PCR 检测各设二份阳性血清和阴性血清对照, 当二份阳性和阴性对照全部检出时, 认为此次检测结果可靠。
- 5 DNA 序列测定 参考文献^[3]进行, PCR 产物经琼脂糖超纯胶电泳纯化, 用作测序模板, 以 SE2 或 ASE2 末

收稿日期: 1996-04-08, 修回日期: 1996-07-22

* 国家自然科学基金资助项目, 批准号: 39470037

端标记同位素(32 P)用作测序引物,使用双链 DNA 循环测序盒(GIBCOBRL, MD, USA)进行序列分析。

结 果

1 献血员中 HCV RNA RT-PCR 检测

从 1993 年 8 月至 1995 年 2 月总计 8 次对抗 - HCV 检测阴性的献血员进行 HCV RNA RT-PCR 检测,结果见表 1。8 次共检测 95 份标本,其中有 6 次检出 17 份阳性标本,平均阳性检出率为 17.9%。最高的一次阳性检出达 40%。对上述 17 份 PCR 阳性检出标本复查抗 - HCV 均为阴性。

表 1 正常献血员 HCV RNA RT-PCR 检出

Tab 1 HCV RNA RT-PCR detection in normal blood donor

日期 Date	标本数 Specimens	阳性数 Positive No.	阳性百分率 (%)
8/2/93	13	2	15.4
10/11/93	10	0	0
4/13/94	13	4	30.8
4/12/94	15	6	40.0
11/11/94	8	2	25.0
1/18/95	14	1	7.1
1/20/95	10	0	0
2/12/95	12	2	16.7
Total	95	17	17.9%

* 1491

```

HCV-GE  ACGGGAGCACACATGTGACGGGGGGGTGCAAGCCATACCATCCGGGGCCTTCACGTCCTCTTTACACC
HCV-GE1 -----GTGC--AG-CATA-CAT-C---G-C-----
HCV-GE2 -----GTGC--AG-CATA-CAT-C---G-C-T-----T-
HCV-YE  -T---CAA--C--CAC--TA--A--AGCGC--TG-CACA-CG--CAC--G-----A-----T----
HCV-UE  -T---CA---C-GCAC---A-----GTAGC---CGCA-CA--A-T-G-C-T---A-----C-GTT-
HCV-XE  -T---CA---C-TCAC---A-----GTAGC---CGCA-TA--A-T-G-C-T---A-----C-GTT-
HCV-XE  -T---CA---C-GCAC---A-----GTAGC---CGCA-TA--A-T-G-C-T---A-----C-GTT-
HCV-ZE  -T---CA---C-GCAC---A-----GCAGC---CG--T-C-AT--C-TACG--CCTT--T-CAGT-T-
    
```

* 1571

```

TGGGCCAGCTCAGAGAATCCAGCTT
-----
-----
-----GT-----
C-----GT-C---A-----
C-----GT-C--C-A-----
C-----GT-C---A-----
C-----GT-C---A-----
    
```

图 1 8 例献血员 HCV RNA PCR 阳性产物中高变区 1 核苷酸序列的比较

Fig 1 Comparison of the nucleotide sequences of hypervariable region of HCV PCR products from 8 blood donors. The sequence between position 1491 and 1571 which are indicated by arrows is hypervariable region. The horizontal lines indicate sequences identical with which are shown on top line.

2 HCV RNA 扩增产物的序列测定结果

影响 PCR 方法检测血清中 HCV RNA 结果准确性的一个重要问题是可能存在 PCR 的污染。为了证实 PCR 检测结果的准确性,用 PCR 直接测序方法测定了 17 份阳性产物中的 8 份高变区 1 的 DNA 序列(图 1),由图可见测定的每个产物的高变区 1 序列均不完全相同,说明

HCV-J	<u>ATTCATGGTGGGAACTGGGGCTAAGGCTTTGATTGTGATGCTACTCTTTGCTGGCGTTGACGGGCACA</u>	70
HCV-C	-----T-----C--C-----I--G-I-	70
HCV-UE	-----T-----T-----C--I-----	70
HCV-XE	-----A-C-----T-----C--I-----	70
	CCCACGTGACAGGGGAAGGGTAGCCCTCCAGCACCCAGAGCCCTCGTGTCTGGCTCTCACAAGGCCCATC	140
	--I--C-T-I----GGC-CAG-G-CG-TC----TCG-GT--AC----CTCT-TA---CT--GG-C--	140
	--G-AC-----GGTA-C---CG--C---AGTG---TAC-A--CTCT--AGTCC--G--G--	140
	--T-AC-----GGTA-C---CG--CT--AGTG---TAC-A--CTCT--AGTCC--G--G--	140
	TCAGAAAATCCAACTCGTGAACACCAACGGCAGCTGGCACATCAACAGGACCGCTCTGAATTGCAATGAC	210
	-----G-----G--TA-A--T----T--T-----T--C-----G-----	210
	C-----G--T--A--TT-----T--T--A--T--T---C-----	210
	C--C-----G--TA-A--TT-----T--A--T--T---C-----	210
	TCCCTCCAAACTGGGTTTCATTGCTGGCTGTTGTACGCACACAGGTTCAACGGGTCCGGGTGCCAGAGC	280
	-----A-T-----TC---C-----TA-----A--G-----	280
	--T--AGC--C--A--C-C-----A-G--A-----T-----A--G--	280
	--T--AGC--C-----C-C-----A-G--A-----T-----A--G--	280
	GCATGGCTAGCTGCCGCCCATCGATGAGTTCGCTCAGGGGTGGGGTCCCATCACTCATGATATGCCTGA	350
	-----C-----T---ACA---A---C---C-----T--AC-GA-----	350
	-----C--T--T--A--T--CA---A---A-----T--T-C--CCGA--G--C	350
	-----C--T-----A--T--CA---A---A-----T--T-C--CCGA--G--C	350
	GAGCTCGGACCAGAGGCCATATTGCTGGCACTACGGCCCTCGACCGGTGGGGATCGTCCCTGGCTCGCAG	420
	[-----T-----AA-----C---A-----G--	420
	CGA-C-----A---T-G--T-----A---C-A-----C--T--A-----G--	420
	CGA-C-----A---T--T-----A---C-A-----C--T--A-----G--	420
	<u>GTGTGGTCCAGTGTATTGC</u>	

图2 HCV-UE, HCV-XE的核苷酸序列与日本株及中国株相应序列的比较

Fig 2 Comparison of HCV-UE, HCV-XE with corresponding sequences from Japan (HCV-J) and China (HCV-C).

The nucleotide sequences of HCV-J are shown on the top line. Horizontal lines indicate sequences identical with HCV-J. The primer sequences are underlined.

他们各自为不同株的HCV序列,排除了PCR污染的可能。为了了解扩增序列属哪一种HCV基因型,测定了其中2份阳性产物的全序列,图2显示二份扩增产物的全长核苷酸序列(HCV-UE, HCV-XE),及其与同一HCV基因型的日本HCV-J株(HCV II型)^[5]及中国河北株(HCV-C, HCV II型)^[6]相应序列比较结果。表2显示这两株序列与在我国感染者中存在的HCV I~IV基因型相应序列的核苷酸同源性,由表可见HCV-UE, HCV-XE与HCV II型的HCV-J及HCV-C株相应序列同源性最高,为77~79%,这与II型不同株(HCV-J, HCV-C)相应序列之间的核苷酸同源性(80%)相当,因此,所扩增的HCV基因序列属HCV II型序列。

表2 HCV UE, XE 核苷酸序列与 HCV I ~ IV 型代表株相应序列的同源性

Tab 2 Homologies of nucleotide sequences of HCV UE and HCV XE with corresponding sequences of HCV genotypes I ~ IV

	HCV1	HCV-J	HCV-C	HC-J6 ⁽⁷⁾	HC-J8 ⁽⁸⁾
HCV-UE	68	77	79	64	62
HCV-XE	69	77	79	65	63
HCV-J	-	-	80	65	63
HCV1	-	70	68	63	64
HC-J6	-	-	63	-	66
HC-J8	-	-	64	-	-

注: HCV1 为基因型 I 序列, HCV-J 及 HCV-C 为基因型 II 序列, HC-J6 为基因型 III 序列, HC-J8 为基因型 IV 序列。

* HCV1 is genotype I sequence; HCV-J and HCV-C are genotype II sequences; HC-J6 is genotype III sequence; HC-J8 is genotype IV sequence.

讨 论

在抗-HCV IgG 阴性的献血员血清标本中用 PCR 法检测出的 HCV RNA 阳性率高达 17.9% (表 1), 说明我国献血员中 HCV 的感染情况很严重。具体分析结果, HCV RNA 都是在职业献血员的标本中检出, 在有献浆史的献血员标本中检出率更高 (1994 年 4 月 12、13 日标本), 但在二次义务献血员标本中没有检出 (1993 年 10 月 11 日及 1995 年 1 月 20 日标本), 这一检测结果与 HCV 在这些人群中的感染情况基本相符。然而, 使用 PCR 法检测有一重要的问题就是由 PCR 污染造成的假阳性。HCV 的 E2 基因中有一核苷酸序列高度变异的区域称高变区 1, 这一区域的序列在不同的 HCV 感染株中均可不同, 具有个体化的特点。为了彻底排除 PCR 污染的可能, 我们在 PCR 的引物设计中包含了高变区 1 的序列。在对扩增产物进行高变区 1 的序列分析时, 直接用扩增产物作测序模板, 用 PCR 直接测序法进行序列分析, 避免了由 PCR 检测及测序过程中由酶介导的链合成反应时可能产生的序列错误, 从而保证了序列分析的可靠性。结果所测定的 8 个扩增产物中的高变区 1 序列 (图 1) 均有差异, 说明他们是不同 HCV 株序列, 从而排除了 PCR 污染的可能性, 肯定了 PCR 检测结果的正确性。

对 PCR 检测出的 17 份阳性标本复查抗-HCV IgG, 结果均为阴性。出现这种情况可能的原因一是 HCV 有较高的变异率, 目前发现至少存在有 6 个基因型, 在我国已证实有 4 个基因型 (I ~ IV), 其中以 II 型最为普遍^[10]。已有报道, 一种基因型的抗原可以与别的基因型 HCV 诱导的抗体发生交叉反应^[11], 而我国目前的抗-HCV IgG 检测试剂所使用的包被抗原均为 HCV II 型序列, 是否漏检的标本是别的基因型的 HCV 感染标本? 我们所测定的两个扩增产物的全序列 (图 2、表 2) 结果证实这些扩增产物不是别的 HCV 基因型序列, 而是 HCV II 型序列, 其余 6 个扩增产物高变区 1 以外的部分序列 (结果未显示) 也是 HCV II 型序列。因此, 抗-HCV IgG 漏检不是由于不同基因型的感染所引起的。另一种可能的原因是抗-HCV IgG 检测试剂的敏感度不足, 我国现行使用的检测试剂相当于国外第二代 ELISA 试剂水平, 与目前已发展成功的第三代试剂比较其敏感度有一定的差距。此外, 还有一种可能的原因是, HCV 感染后第 3 天即可出现病毒血症^[9], 而其抗体的出现则在一个半月后方可达到检测水平^[1], 在这段时间内抗-HCV 无法检出。由此可见, 为了彻底检出我国献血员中的 HCV 感染, 一方面需要提高目前抗体检测试剂的敏感度, 另一方面还需发展新的实用的能检测 HCV 病毒或抗原的筛选试剂。

参 考 文 献

- 1 戚中田, 杜平主编. 丙型肝炎病毒与丙型肝炎. 第一版. 上海: 上海科学技术出版社, 1992: 162
- 2 戚中田, 潘卫, 杜平等. 丙型肝炎病毒的血清抗体检测及基因组 cDNA 扩增. 第二军医大学学报, 1992, 13(1): 11
- 3 Murry V. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(21): 8889
- 4 Choo QL, Richman KH, Han JH *et al*. Genetic organization and diversity of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 2451
- 5 Kato N, Huikata M, Otsuyama Y, *et al*. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 87: 9524
- 6 毕胜利, 白宪鹤, 刘崇柏等. 我国丙型肝炎病毒河北株基因组的克隆及 cDNA 全序列的测定与分析. 中华实验和临床病毒学杂志, 1992, 6(4): 425
- 7 Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, *et al*. Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier; comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol*, 1991, 72: 2697
- 8 Okamoto H, Kurai K, Okada S, *et al*. Fulllength sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology reported isolates; comparative study of four distinct genotypes. *Virology*, 1992, 188: 331
- 9 Garson JA, Tuke PW, Makris M *et al*. Demonstration of viraemia patterns in haemophiliacs treated with hepatitis C virus contaminated factor V III concentrates. 1990, *The Lancet*, 336: 1022
- 10 崔晓红, 潘卫, 戚中田等. 肝癌患者肝组织中丙型肝炎病毒的基因分型. 1995, 75(2): 92
- 11 Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Yamaguchi K *et al*. A second group of hepatitis C virus. *Virus Genes*, 1991, 5(3): 243

Detection and Sequencing of Hepatitis C Virus RNA in Blood Donors without Anti-HCV IgG Antibodies

Pan Wei Fang Fang Cui Xiaohong *et al*

(Department of Microbiology, Department of Basic Medicine,
Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Reverse transcription polymerase chain reaction was used to detect hepatitis C virus (HCV) RNA in 95 serum specimens of blood donors with anti-HCV IgG negative. Six out of 8 detections, HCV RNA was detected in 17 of 95 specimens (17.9%). These 17 HCV RNA positive specimens were detected once more for anti-HCV IgG to confirm their negative detection. Sequencing data of hypervariable region from 8 of 17 positive PCR products showed that the amplified sequences came from different HCV strains, and were not the false amplification because of PCR contamination. In these 8 PCR products, two nucleotide sequences were determined at full length, and showed higher homology of 77%~79% with the corresponding sequences of representative strain of HCV genotype II than that of 62%~69% with the sequences of HCV genotypes I, III, IV, and were verified as HCV genotype II sequences which are most popular among Chinese HCV infected cases. Our data demonstrated that anti-HCV IgG detection is not sensitive enough for HCV screening in blood donors and the unavailable detection for HCV infection by anti-HCV IgG assay is not due to HCV sequence mutations.

Key words Hepatitis C Virus, Genome, Sequence