维普资讯 http://www.cqvip.com

第18卷6期
2003年12月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

18（6）：611—613
December 2003

河北省丙型肝炎病毒基因分型研究*

牛建章[1,2]，许若丹[1]，白瑞婷[2]，田 茶[2]，张立平[1]，孟宗达[2]

（1、河北大学生命科学学院，河北保定，071002；2、河北省疾病预防控制中心，河北石家庄，050011）

Genotyping of Hepatitis C Virus in Hebei Province

NIU Jian-zhang[1.2], XU Ruo-dan[1], BAI Rui-ting[2], TIAN Cha[2],
ZHANG Li-ping[1], MENG Zong-da[2]

(1. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, *China; 2. Center of Disease Control, Hebei Province, shijiazhuang* 050011, *China)*

Abstract: Using nested RT-PCR and type special primers of HCV, we performed genotype analysis of HCV RNA from five representative cities in Hebei Province. Among 168 samples with HCV RNA, 104 sera was type1b(61.9%), type 2a account for 22.6%（38/168）, and 1b/2a mixed-type was 15.5%（26/168）. The results indicate that type1b is the dominance strain in Hebei Province. Compared with type 2a, type1b has important relationship with chronic hepatitis C. This study build up some foundations for diagnosis, treatment and vaccine study of hepatitis C.

Key word: *Hepatitis C virus*(HCV); Genotyping; Nested RT-PCR

关键词：丙型肝炎病毒；基因分型；巢式 RT-PCR

中国分类号：R512.6　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2003)06-0611-03

丙型肝炎病毒（*Hepatitis C virus*, HCV)感染是输血后肝炎的主要原因[1]，主要通过输血或使用污染的血制品传播[2]，且与肝硬化和肝细胞癌的发生有密切关系。1985年河北省在国内首先报告了丙型肝炎的爆发流行[2]，此后，在HCV的病源学[3]、流行病学[4]和检测技术[5]等方面进行了较深入的研究，取得了一批重要的研究成果。1991年美、日学者先后报告了HCV的全基因序列,为基因分型研究奠定了重要基础。Okamoto等[6.7]根据HCV核心区基因序列的不同，设计型特异性引物，用巢式RT-PCR方法，将HCV分为Ⅰ(1a)、Ⅱ(1b)、Ⅲ(2a)、Ⅳ(2b)4型。为了探讨河北省HCV基因型分布，为病毒性肝炎的防治提供科学依据，本文对河北省HCV基因型分布进行了研究。

1 材料和方法

1.1 标本来源

在河北省内选择有代表性的5个市(县)为标本采集点，采静脉血，分离血清，-70℃冻存备检。共筛检出HCV RNA阳性血清标本168份。其中，廊坊市36份、石家庄市54份、保定市30份、邯郸市14份和张家口34份。

1.2 主要试剂和仪器

异硫氰酸胍、Sarcosyl均为美国Sigma公司产品。TaKaRa BcaBEST™ RNA PCR试剂盒（TaKaRa公司产品，Code DRR023）严格按说明书操作，效期内使用。Biometra T-GRADIENT Thermoblock基因扩增仪(德国产品)。检测用和分型用引物由宝生物工程有限公司商业合成，序列见表1。

1.3 血清中HCV RNA提取

采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法[8]。200μL血清加500μL裂解液,混匀,加50μL NaAc,500μL饱和酚、氯仿-异戊醇抽提两次，经无水乙醇沉淀，沉淀用75%乙醇洗两次，真空干燥后用10μL DEPC处理水溶液并加入2μL RNasin，-20℃保存备用。

1.4 HCV RNA反转录检测方法

收稿日期：2003-05-19，修回日期：2003-07-04
* 基金资助：河北省医学重点跟踪项目（99037）
作者简介：牛建章，（1958-），男，教授，研究方向为生物工程药物和疫苗。E-mail: niujzh@163.com.

维普资讯 http://www.cqvip.com

按牛建章等[9]报告的方法进行。

表1 HCV RNA RT-PCR 检测用引物及 HCV 核心区分型引物

Table 1 Primers of HCV RNA RT-PCR detection and genotyping primers in HCV RNA C region

Primers	Sequence (5'-3')	genotype
F1	GCGTGCAGGCCTCCTCCTAGC	
R1	TGTTGTAGGCATAAACCATGT	
F2	GAAGATCTTGAGAGGGAAGTATCCGT	
R2	GGAATTCTGTTGTGGCATAGACCA	
Core region		
A	CGCGCGACTAGGAAGACTTC	
B	ATGTACCCCATGAGGTCGGC	
C	AGGAAGACTTCCGAGCGGTC	
D1	TGCCTTGGGGATAGGCTGAC	1a
D2	GAGCCATCCTGCCCTCCCCA	1b
D3	CCAAGAGGGACGGGAACCTC	2a
D4	ACCCTCGTTTCCGTACAGAG	2b

1.5 RT-PCR 分型方法[9,10]

反转录反应及第一轮扩增: cDNA 合成与第一轮 RT-PCR 反应同步进行。反应终体积 50μL,含有如下成份:10mmol/L Tris-HCl(pH9.0,25 ℃), 50mmol/LKCl, 0.1%Triton X-100, 1.5mmol/L $MgCl_2$, 0.2mmol/L dNTP, 正向(A)和反向(B)引物各 20pmol, RNasin 8U, BcaBEST 多聚酶 22U 和 RNA 模板 5μL。反应过程为 65℃1min,30℃ 5 min, 15min～30min 内匀速升温, 65℃15min～30min, 98℃5min, 5℃ 5min。第一轮扩增条件: 94℃30s, 55℃30s, 72℃ 1min, 扩增 30 个周期, 最后延伸 72℃5min。

第二轮 RT-PCR 反应: 第二轮 PCR 用第一次 PCR 产物 1μL, 一条通用内引物 C(正向)及四条特异性外引物 D1, D2, D3 和 D4(均为反向)。扩增条件同第一轮。产物及分子量标记物各 10μL, 通过 2.5%琼脂糖电泳, 溴化乙锭染色, 用 Doc 2000 凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司产品)观察结果并拍照。出现预期大小的 DNA 带为阳性, 按 bp 长度判断基因型。

2 结果

2.1 HCV RNA 阳性血清标本检测结果

从采集的抗-HCV 阳性血清中共检测出 168 份 HCV RNA 阳性血清标本(电泳照片略)。

2.2 巢式 RT-PCR 检测 HCV RNA 结果

巢式 RT-PCR 检测 HCV RNA 基因分型结果详见图 1。

第 1 列有一条 174bp 的基因带, 为 HCV 2a 型; 第 2 列有一条 144bp 和一条 174bp 的基因带, 为 1b/2a 混合型; 第 3 列有一条 144bp 的基因带, 为 1b 型; 说明本研究仅检出了 1b 型和 2a 两种基因型, 并检出这两种基因型的混合感染, 但未检出 1a 型、2b 型。

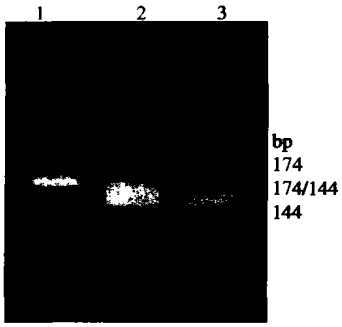

图 1 巢式 RT-PCR HCV RNA 基因分型结果

Fig. 1 Result of genotyping in nested RT-PCR HCV RNA

1, HCV 2a genotype(174 6p); 2, HCV 1b/2a mix-genotype(174/144 bp);3, HCV 1b genotype(144bp).

2.3 各采样点标本 HCV 基因分型结果

各采样点标本 HCV 基因分型结果详见表 2。

表 2 河北省不同地区 HCV 基因分型结果

Table 2 Result of HCV RNA Genotyping in different regions of Hebei Province

Region	Diagnosis	Number	1a(%)	1b(%)	2a(%)	2b(%)	1b/2a(%)
Langfang	PTHC	36	0.0	50.0	38.9	0.0	11.1
Shijiazhuang	CHC	54	0.0	85.2	0.0	0.0	14.8
Zhangjiakou	Donors	34	0.0	47.1	52.9	0.0	0.0
Handan	Donors	14	0.0	85.7	14.3	0.0	0.0
Baoding	Donors	30	0.0	40.0	13.3	0.0	46.7
合计		168	0.0	61.9	22.6	0.0	15.5

3 讨论

自 1989 年 Choo 等[11]首先获得 HCV 克隆以来, 对 HCV 的分子生物学研究取得了很大进展。目前,

维普资讯 http://www.cqvip.com

HCV 基因分型尚无统一标准[12]，常用的 HCV 基因分型的方法主要有:1)核苷酸总的同源性分型法; 2）核心区核苷酸变异分型法（型特异性引物 RT-PCR 扩增法）; 3)限制性片段长度多态性分型法(RFLP); 4）遗传树分型方法; 5）分子杂交法; 6）血清学分型法。HCV 分型方法中[13]，以引物特异性 PCR 法较简单、迅速、灵敏度高，但此法尚不够精确，因为同一型病毒株之间的差异仍很大；而 RFLP 法虽较精确但灵敏度低；目前在向血清学法靠拢，即达到更能反映出 HCV 感染时的抗体应答反应类型；HCV 分型方法的统一，要综合各种分型方法的优点，进行综合分类[14.15]。本文根据现有实验室环境条件利用型特异性引物 RT-PCR 法对 HCV 进行基因分型研究。

目前对世界各地获得的 HCV 病毒株的基因型的分析表明，不同 HCV 有一定的地区分布。如欧美国家 HCV1a、1b、2a 型常见，其中 1 a 型占绝大多数; 远东包括中国、日本的大部分地区 1 b、2 a、2 b 型常见, 1 b 型为主要的优势株[16]。从国内 HCV 基因分型结果分析，基因型呈南北差异。 Wang 等[17]调查了中国大陆 7 个城市，认为我国南方城市主要流行 1 b 型，如南京、南宁、成都等地区 90 % 以上为 1 b 型，而北方城市以 2 a 型为主，如哈密、沈阳、兰州等地 2 a 型占 46%～ 70 % 。

本文研究结果与上述结果相符，河北省 HCV 基因型以 1b 型为主优势株，占 61.9%，与国内其他城市相比，明显低于南方城市，而与北方城市接近；2a 型也占有相当高的比例，高于南方城市，近似于北方城市；并有 15.5%的混合感染，这在内地又是一新发现。不同地区 HCV 分型有不同原因，可能为 HCV 的进化与亲缘关系、HCV 与宿主间的免疫应答机制不同所致。另外还与分型方法不同、研究对象不同、研究的例数等有关。结果还显示，不同地区人群的 HCV 感染状况及型别分布也存在一定差异。河北省丙型肝炎基因型以 1b 型为主，与 HCV2a 型相比较, HCV1b 型感染与慢性肝炎有更密切关联。这对河北省丙肝患者的治疗、预后判断及疫苗研制有一定指导意义，并使国内 HCV 基因型分布资料进一步完善。

在河北省基因型检测中并未发现 1a 型和 2b 型，可能由于 HCV DNA 滴度过低，未能分型，也可能还存在其它基因型。

参考文献

[1] Choo Q L, Weiner A J, Overby LR, *et al*. Hepatitis C virus: The major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis[J]. British medical Bulletin,1990,46:423.

[2] Meng Z D, Song Y D, Chen X R, *et al*. A serological study of hepatitis C infection in plasmapheresis donors[J]. Chinese Medical Journal,1991, 104(6): 494-497.

[3] 徐东刚，孟宗达，逯好英，等. 输血后丙型肝炎病毒血症、抗体及转氨酶动态研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志. 1994, 8（4）:340-343.

[4] Meng Z D, Sun D G, Hu Z H, *et al*. A prospective study on post-transfusion hepatitis C[J]. Virus Information Exchange Newsletter, 1991, 8(3):118.

[5] 牛建章，徐东刚，孟宗达，等. 重组 HCV NS5 区蛋白抗原在丙型肝炎检测中的应用[J]. 中国病毒学.1997，12（3）：248-253.

[6] Okamoto H. Full-lenth sequence of hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes[J].Viroloy 1992;188:331.

[7] Okamoto H.PCR-band genotyping with genotype-specific primers derived from the C gene of HCV genome[J]. Nippon Rinsho.1995 Sep;53 Suppl(Pt 1):312-320.

[8] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by guanidinium hiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1978, 162:156.

[9] Niu J Z, Xu D G, Lu H Y, *et al*.Comparison on detection of hepatitis C virus RNA in blood donor serum by nested PCR using primers from different regions of the hepatitis C virus genome[J].Virus information Exchange Newsletter, 1992, 9(3):90-91.

[10] Yun Z, Johansson B, Weiland O,Sonnerborg A.Genotyping of hepatitis C virus performed by typespecific PCR in comparison to nucleotide sequencing of NS5 and core region[J]. Res Virol,1997, 148(3): 233-237.

[11] Choo Q L,Kuo G,Weiner A J,*et al*.Isolation of a cDNA clone derived from blood borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science, 1989, 244(4902): 359-362.

[12] 成 军，杨守纯，李立新等。现代肝炎病毒分子生物学[M]。北京：人民军医出版社。1997.58-63.

[13] Seme K, Poljak M, Dovc P, *et al* Comparative evaluation of four genotyping methods for hepatitis C virus[J].Folia Biol(Praha), 1997, 43(6):219-224.

[14] Chinchai T, LaboutJ, Noppornpanth S, *et al*. Comparative study of different methods to genotype hepatitis C virus type 6 variants[J]. J Virol Methods; 2003, 109(2); 195-201.

[15] Simmonds P.Virology of hepatitis C virus[J]. Clin Ther,1996,18 (Suppl B):9-36.

[16] Mellor J, Walsh E A, Prescott L E, *et al*.Survey of type 6 group variants of hepatitis C virus in Southeast Asia by using a core-based genotyping assay[J]. J Clin Microbiol, 1996 ,34(2):417-423.

[17] Wang Y,Okamoto H,Tsuda F,*et al*. Prevalence,genotypes,and an isolate(HC- C2)of hepatitis Cvirus in Chinese patients with liver disease[J]. J Med Virol,1993 ,40 :2 54- 2 60.