

# 中国 4 城市慢性乙型肝炎病毒感染者中 B 基因亚型分布

王杰 高俊薇 庄辉 李杰 王佳 李雅娟 金晖

**【摘要】** 目的 了解北京、石家庄、温州和深圳 4 城市慢性乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)感染者中 B 基因亚型(Ba 和 Bj)的分布情况。方法 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP),对北京(18 例)、石家庄(22 例)、温州(34 例)、深圳(27 例)市 101 例乙肝患者血清标本,经多对型特异性引物巢式 PCR 鉴定为 B 基因型慢性 HBV 感染者的血清标本进行 B 基因亚型分析,并对部分血清标本以 PCR 产物直接测序法确定其亚型,以验证 PCR-RFLP 的准确性。结果 经 PCR-RFLP 分析 101 例均为 Ba 亚型,未发现 Bj 亚型,其中 30 例经测序分析也证实为 Ba 亚型。结论 4 城市的 HBV/B 主要为 Ba 亚型。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒; 基因型; 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性

**Study on the distribution of sub-genotype B on hepatitis B virus in patients with chronic HBV infection from 4 cities of China** WANG Jie, GAO Jun-wei, ZHUANG Hui, LI Jie, WANG Jia, LI Ya-juan, JIN Hui. Department of Microbiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China Corresponding author: LI Jie, Email: jielie69@263.net; ZHUANG Hui, Email: zhuangbmu@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the distribution of sub-genotype B on hepatitis B virus (HBV) in patients with HBV chronic infection from 4 cities (Beijing, Shijiazhuang, Wenzhou and Shenzhen) of China. **Methods** A type-specific nested polymerase chain reaction(PCR) with multiplex pairs of primers was used for HBV genotyping, and Ba and Bj sub-genotypes were identified by a PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. A total of 101 serum samples collected from patients with chronic HBV/B infection were detected. Among them, 18 were collected from Beijing, 22 from Shijiazhuang, 34 from Wenzhou and 27 from Shenzhen. Thirty from the 101 serum samples were randomly selected and analyzed by PCR product sequencing. **Results** All of the 101 serum samples were identified as sub-genotype Ba, and none of them was sub-genotype Bj. **Conclusion** Sub-genotype Ba was a predominant strain of HBV/B in patients with chronic HBV infection from these 4 cities.

**【Key words】** Hepatitis B virus; Genotype; Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

目前,根据乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)全基因组核苷酸序列差异 $\geq 8\%$ 或 S 基因核苷酸序列差异 $\geq 4\%$ ,将 HBV 分为 8 个基因型(A~H)<sup>[1-4]</sup>。HBV 基因型不仅有明显的地域分布特征,且与疾病的临床表现、严重程度及对干扰素的疗效等密切相关。东亚地区(包括中国),主要为 B 型和 C 型感染。与 B 基因型比较,C 基因型感染与肝组织的炎症坏死和纤维化严重程度有关,可引起更为严重的肝脏疾病,对干扰素的疗效较差<sup>[5-10]</sup>。近年来,对 HBV 基因亚型的研究也逐步深入,如 A 基因型可进一步分为 3 个亚型<sup>[11,12]</sup>;B 型分为 5 个亚型,其中

Ba 亚型与 C 型在 preC/C 区存在重组,而 Bj 亚型与 C 型间无重组发生;C、D、F 基因型均有亚型<sup>[13-16]</sup>。本文对 4 城市 101 例鉴定为 HBV/B 的慢性乙肝患者血清标本进行 B 基因亚型分析。

## 材料与方 法

1. 血清标本:随机选取本研究室血清库中冻存的 101 例慢性乙肝患者血清标本,均为 HBV DNA 阳性,并经多对型特异性引物聚合酶链反应(PCR)鉴定为 B 基因型。其中北京 18 例,石家庄 22 例,温州 34 例,深圳 27 例。

2. 引物设计:引物 BAHBF、BJHBF、HBAS-4V、BJA-RV 用于巢式 PCR 扩增的内外引物<sup>[17]</sup>,由上海生物工程技术公司合成,序列见表 1。

3. PCR-RFLP 对 HBV/B 进行亚型分析:

基金项目:国家“十五”科技攻关课题资助项目(2004BA718B02)

作者单位:100083 北京大学医学部病原生物学系

通讯作者:李杰, Email: jielie69 @ 263. net; 庄辉, Email:

zhuangbmu@126.com

(1) 血清 HEV

DNA 提取:将 50 μl 待检血清加入到 60 μl 裂解液中,混匀,37℃ 水浴 10 min,加入 30 μl Tris 饱和酚和 30 μl 氯仿:异戊醇 (49:1) 溶液,充分混匀后,14 000 r/min 离

心 10 min,取上清,加入等体积异丙醇和 10 μl 醋酸钠 (NaAc) 溶液 (2 mol, pH 值 4.0), -20℃ 沉淀 2 h, 14 000 r/min 离心 15 min,弃上清,加入 75% 预冷乙醇 500 μl, 14 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀于 50℃ 干燥后,溶于 20 μl 灭菌双蒸水 (DDW) 中, -20℃ 保存备用,作为 PCR 反应的模板。

(2) 半巢式 PCR: ①Ba 亚型检测:用 BAHBF 和 HBAS-4V 分别作为上游和下游引物(外引物)进行第一轮 PCR 扩增,PCR 反应体系 (20 μl) 如下: 10× PCR 缓冲液 2 μl, dNTP (10 mmol/L) 0.4 μl, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.2 μl, BAHBF (10 mmol/L) 0.75 μl, HBAS-4V (10 mmol/L) 0.75 μl, Taq 聚合酶 (1×10<sup>6</sup> U/L) 0.2 μl, HBV DNA 模板 2 μl, 灭菌 DDW 12.7 μl; 按 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 30 s, 55℃ 45 s; 72℃ 1 min, 扩增 40 个循环; 72℃ 7 min; 然后以第一轮 PCR 产物为模板, BAHBF 和 BJA-RV 分别作为上游和下游引物(内引物)进行第二轮扩增, 反应体系 (40 μl) 如下: 10× PCR 缓冲液 4 μl, dNTP (10 mmol/L) 0.8 μl, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2.4 μl, BAHBF (10 mmol/L) 1.5 μl, BJA-RV (10 mmol/L) 1.5 μl, Taq 聚合酶 (1×10<sup>6</sup> U/L) 0.4 μl, 第一轮 PCR 产物 1 μl, 灭菌 DDW 28.4 μl, 按 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 扩增 35 个循环; 72℃ 7 min, 4℃ 保存; 取 8 μl 第二轮 PCR 产物在 100 V 电压下, 经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳 15 min 后, 在凝胶成像仪下观察是否为 110 bp 大小的条带。 ②Bj 亚型的检测:以 BJHBF 和 HBAS-4V 分别作为第一轮 PCR 反应的上游和下游引物(外引物), 以 BJHBF 和 BJA-RV 分别作为第二轮 PCR 反应的上游和下游引物(内引物), 反应体系及循环参数同 Ba 亚型的检测。

(3) RFLP: ①Ba 亚型检测:采用限制性内切酶 *Mse* I (10<sup>7</sup> U/L) 进行酶切, 反应体系 (20 μl) 如下: PCR 产物 10 μl, 10× 缓冲液 2 μl, 100× BSA 0.2 μl,

表 1 PCR-RFLP 鉴定 Ba 和 Bj 亚型所用引物序列

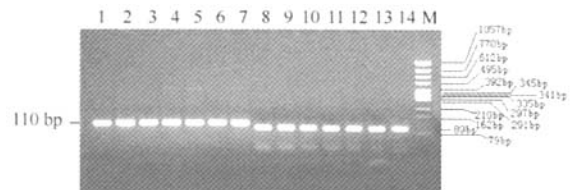
亚型	引物及序列
Ba	第一轮 正义链 BAHBF: 5'-ATG CAA CTT TTT CAC CTC TGC TTA 3' (nt1814~1837)
	第一轮 反义链 HBAS-4V: 5'-ATA GGG GCA TTT GGT GGT CT-3' (nt2316~2297)
	第二轮 正义链 BAHBF: 5'-ATG CAA CTT TTT CAC CTC TGC TTA 3' (nt1814~1837)
	第二轮 反义链 BJA-RV: 5'-TTC TTT ATA CGG GTC AAT GTC CAT G-3' (nt1924~1900)
Bj	第一轮 正义链 BJHBF: 5'-ATG CAA CTT TTT CAC CTC TGA CTA-3' (nt1814~1837)
	第一轮 反义链 HBAS-4V: 5'-ATA GGG GCA TTT GGT GGT CT-3' (nt2316~2297)
	第二轮 正义链 BJHBF: 5'-ATG CAA CTT TTT CAC CTC TGA CTA-3' (nt1814~1837)
	第二轮 反义链 BJA-RV: 5'-TTC TTT ATA CGG GTC AAT GTC CAT G-3' (nt1924~1900)

*Mse* I (10<sup>7</sup> U/L) 0.5 μl, DDW 7.3 μl, 混匀后 37℃ 水浴 2.5 h; 取酶切产物 16 μl 在 100 V 下, 于 30 g/L 琼脂糖凝胶中电泳 25 min 后, 在凝胶成像仪下观察; 如果 110 bp 的 PCR 产物被切成 89 bp 大小的片段, 则为 Ba 亚型。 ②Bj 亚型检测: 采用限制性内切酶 *Spe* I (10<sup>7</sup> U/L) 进行酶切, 反应体系 (20 μl) 如下: PCR 产物 10 μl, 10× 缓冲液 2 μl, *Spe* I (10<sup>7</sup> U/L) 1 μl, DDW 7 μl, 其余同 Ba 亚型的鉴定。

4. PCR 产物直接测序法分亚型以验证 PCR-RFLP 的准确性: ①PCR 产物直接测序: 从上述 101 例样本中随机选取 30 例, 将第一轮 PCR 产物直接测序; PCR 产物纯化和测序由北京华中生科技发展有限公司完成。 ②基因序列测定法分型: 使用 NCBI 的 Blast 功能和 DNASTar 软件将 30 例血清标本的测序结果与 GenBank 中已知的 HBV Ba 和 Bj 亚型序列进行序列比对和同源性分析, 以确定 HBV/B 基因亚型。

结 果

1. 半巢式 PCR-RFLP 鉴定 Ba 亚型结果: 半巢式 PCR 扩增的 Ba 亚型片段 (110 bp) 经限制性内切酶 *Mse* I 酶切后, 可获得 89 bp 的酶切片段 (图 1)。研究检测的北京、石家庄、温州和深圳市 101 例 HBV/B 血清样本, 结果均为 Ba 亚型。

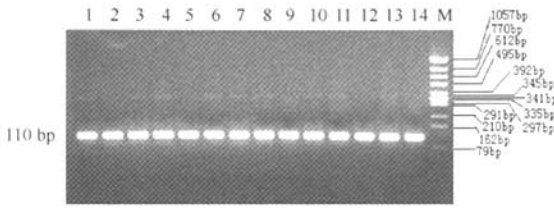


注: 1~7: 酶切前; 8~14: 酶切后; M: 低分子量 Marker

图 1 Ba 亚型的检测——第二轮 PCR 产物酶切前后 (均被切开)

2. 半巢式 PCR-RFLP 鉴定 Bj 亚型结果: 半巢式

PCR 扩增的 B<sub>j</sub> 亚型片段 (110 bp) 经限制性内切酶 *Spe* I 酶切后, 可获得 89 bp 的酶切片段, 其他亚型则不能被切开 (图 2)。本研究所检测的样本未发现 B<sub>j</sub> 亚型。



注: 1~7: 酶切前; 8~14: 酶切后; M: 低分子量 Marker

图2 B<sub>j</sub> 亚型的检测——第二轮 PCR 产物酶切前后 (均未被切开)

3. PCR 产物直接测序分析 B 基因亚型: 从上述 101 例样本中, 随机选取 30 例, 将第一轮 PCR 产物直接测序。并使用 NCBI 的 Blast 功能和 DNASTAR 软件将 30 例血清标本的测序结果与 GenBank 中已知的 HBV Ba 和 B<sub>j</sub> 亚型序列进行序列比对和同源性分析, 结果与 PCR-RFLP 检测 B 基因亚型的结果一致, 均为 Ba 亚型, 未发现其他亚型。

### 讨 论

自从 Okamoto 等利用全基因测序对 HBV DNA 进行基因分型以来, HBV 基因型的研究不断深入, 大量的研究证实, 不同的基因型在疾病的传播、发生、发展和预后等方面存在着一定的差异。但长期的临床观察发现, HBV 同一基因型内的不同毒株之间与临床疾病的关系也存在着一定的差异, 除了患者的个体差异之外, 还可能与 HBV 的基因亚型有关。以 B 基因型为例, 虽然 HBV/B 基因型已被分为 5 个亚型, 其中 B<sub>j</sub> 主要在日本流行, Ba 主要在中国、越南等亚洲国家流行, B<sub>3</sub> 仅局限于印度尼西亚, B<sub>4</sub> 局限于越南, B<sub>5</sub> 最近在菲律宾发现<sup>[16]</sup>, 但主要为 B<sub>j</sub> 和 Ba 两个亚型。HBV Ba 与 B<sub>j</sub> 亚型相比, 在 HBeAg 阳性率、病毒载量、ALT 水平以及 PreC 区的变异差异均有统计学意义。通常认为, 重组病毒具有更高的致病性, 这也可以部分解释, 虽然大部分学者认为 B 型感染者的预后较 C 型感染者好; 而有研究表明, B 型与慢性肝病和进展性肝病有关, 其预后较差。提示 HBV B 亚型与临床进展可能有关。

本研究对 4 个城市 101 例感染 HBV/B 基因型患者的血清标本, 应用 PCR-RFLP 进行 HBV Ba 和 B<sub>j</sub> 基因亚型分析结果均为 Ba 亚型。关于不同

HBV/B 基因亚型的致病性和免疫性特点有待进一步深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*, 1988, 69(10): 2575-2583.
- [2] Norder H, Hammas B, Lofdahl S, et al. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol*, 1992, 73(5): 1201-1208.
- [3] Stuyver L, de Gendt S, van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: Complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*, 2000, 81(1): 67-74.
- [4] Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, et al. A new American-Indian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*, 2002, 83(8): 2059-2073.
- [5] Kao JH, Wu NH, Chen PJ, et al. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol*, 2000, 33(6): 998-1002.
- [6] Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, et al. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. *Hepatology*, 2001, 33(1): 218-223.
- [7] Chan HL, Wong ML, Hui AY, et al. Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis B e antigen-positive patients. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(3): 1277-1279.
- [8] 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. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11(1): 11-13.
- [9] 李亚娟, 庄辉, 李杰, 等. 乙型肝炎病毒感染患者病毒基因型和亚型分布及其临床意义. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(10): 724-729.
- [10] 黄冀蓉, 李辉, 李卓, 等. 乙型肝炎病毒 DNA 基因分型与相关性肝病关系的临床研究. *中华内科杂志*, 2005, 44(7): 538-539.
- [11] Kramvis A, Weitzmann L, Owiredu WK, et al. Analysis of the complete genome of subgroup A hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol*, 2002, 83(4): 835-839.
- [12] Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, et al. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol*, 2005, 86(7): 2047-2056.
- [13] Sugauchi F, Orito E, Ichida T, et al. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol*, 2002, 76(12): 5985-5992.
- [14] Norder H, Courouce AM, Coursaget P, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*, 2004, 47(6): 289-309.
- [15] Sugauchi F, Kumada H, Sakugawa H, et al. Two subtypes of genotype B (Ba and B<sub>j</sub>) of hepatitis B in Japan. *Clin Infect Virol*, 2004, 38: 1222-1228.
- [16] Sakamoto T, Tanaka Y, Orito E, et al. Novel subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotypes B and C among chronic liver disease patients in the Philippines. *J Gen Virol*, 2006, 87(7): 1873-1882.
- [17] Sugauchi F, Orito E, Ichida T, et al. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology*, 2003, 124(4): 925-932.

(收稿日期: 2007-09-06)

(本文编辑: 尹廉)