

丙型肝炎病毒逆向点杂交基因分型方法的建立及初步应用

杨光 陈姝 崔金环 司建华 谭家驹

【摘要】 目的 利用逆向点杂交技术建立丙型肝炎病毒(HCV)基因分型新方法。方法 在 HCV 5'端非编码区(5'UTR)设计引物与分型探针,将活性氨基标记的分型探针依次固定在尼龙膜上,制成 HCV 基因分型逆向点杂交检测膜条。分离纯化血清中的 HCV RNA,经逆转录反应和生物素标记引物聚合酶链反应(PCR)巢式扩增后,将扩增产物与检测膜条杂交,过氧化物酶和四甲基联苯胺显色,判断基因分型结果。最后,通过与基因测序结果比较确定新方法的有效性。从佛山地区丙型肝炎患者中随机抽取 60 份经荧光定量 PCR 方法对 HCV RNA 进行过定量分析的血清,用新建方法进行 HCV 基因分型检测。**结果** 新建 HCV 逆向点杂交基因分型方法可对所有 60 份 HCV RNA 拷贝数在 $10^2 \sim 10^6$ /ml 之间的抽检血清进行基因分型,发现 1b 型 50 例,占 83.3%;1a 型 2 例,占 3.3%;2a 型 2 例,占 3.3%;1a、1b 混合型 5 例,占 8.0%;1b、2a 混合型 1 例,占 1.7%;未发现 2b、3a 和 3b 型。新方法基因分型结果与测序分型结果一致。**结论** PCR-逆向点杂交技术可以准确有效和简便经济地进行 HCV 基因分型,适用于临床检测与流行病学研究。在佛山地区人群中感染的 HCV 以 1b 型为主。

【关键词】 丙型肝炎病毒; 基因分型

Development and application of a new hepatitis C virus genotyping method with polymerase chain reaction-reverse blot dot technique YANG Guang, CHEN Shu, CUI Jin-huan, SI Jian-hua, TAN Jia-ju. Institute of Medical Researches, the First People's Hospital of Foshan, Foshan 528000, China

【Abstract】 Objective Using polymerase chain reaction-reverse blot dot (PCR-RDB) technique to establish a new method for hepatitis C virus (HCV) genotyping and to study the distribution of HCV genotypes in Foshan area. **Methods** HCV primers and probes were designed in 5'-untranslated region (nt-1-nt-299) of HCV. HCV RNA in serum was isolated and purified, and its cDNA was obtained by reversed transcription. Nested PCR using biotin-labelled primers, was done. PCR products were hybridized with immobilized specific probes (genotype 1a to 3b) on Biotodyne C membrane to genotype HCV by color development while adding POD and TMB. A certain judgment could be made according to the position of color reaction. The reliability of this new method was verified by sequencing. HCV RNA levels in serum were determined by real time fluorescent quantitative (FQ)-PCR. 60 FQ-PCR-positive HCV sera from Foshan area were genotyped using this assay. **Results** All 60 sera could be successfully genotyped by PCR-RDB. 50 (83.3%) cases were found to be genotype 1b, 2 (3.3%) as genotype 1a and 2 (3.3%) as genotype 2a while 5 (8.0%) to be mixture of genotype 1a and 1b, and 1 (1.7%) to be mixture of genotypes 1b and 2a. No genotypes 2b, 3a and 3b were found. The results of PCR-RDB genotyping methods coincided with sequence analysis. **Conclusion** Newly established HCV genotyping system was proved to be sensitive, specific, precise and economic, thus suitable for clinical and epidemiologic studies. The results of HCV genotyping showed that genotype 1b was the predominant genotype in Foshan area.

【Key words】 Hepatitis C virus; Genotyping

丙型肝炎(丙肝)病毒(HCV)感染的慢性化率与肝癌诱变率均高于其他各型肝炎病毒。其核苷酸与氨基酸序列均可有显著的差别,根据 HCV 分离株的基因组的变异程度,可将其分为不同的基因型;

其中 Simmonds 等根据病毒基因组核苷酸序列的同源性提出了 HCV 基因型分类命名系统^[1]。研究表明不同基因型的 HCV 与地区分布、感染的途径、致病性、疾病进程、干扰素疗效及与肝癌的发生等都有一定的相关性^[2,5]。由于基因测序分型方法较复杂,目前尚缺乏适合于临床应用的 HCV 分型方法。本

作者单位:528000 广东省佛山市第一人民医院临床医学研究所

研究旨在采用聚合酶链反应-逆向点杂交技术(PCR-RBD),建立一种适合临床应用的 HCV 基因分型新方法。

材料与方法

1. 标本来源:①HCV RNA 阳性血清:从 2003 年 3-12 月在佛山市第一人民医院传染科住院及门诊进行诊治的患者中,随机抽取 60 份经荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测 HCV RNA 浓度在 $10^2 \sim 10^6$ 拷贝/ml 之间的血清;②HCV RNA 阴性血清:50 份健康人血清取自佛山市血站经 FQ-PCR 检测 HCV RNA 阴性的自愿献血者。

2. 主要试剂:Biodyne C 膜为美国 PALL 公司产品;EDC[1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐]和 SDS 为美国 Sigma 公司产品;氯化四甲胺(Me_4NCl)为上海化学试剂公司产品;Taq 酶为华美生物公司产品;FQ-PCR 检测试剂、RNA 提取液、逆转录酶反应体系、逆转录酶、TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)、过氧化物酶(POD)由中山大学达安基因诊断中心提供。

3. HCV 定量测定:采用 RT-FQ-PCR 法,按操作说明在 PE5700 自动荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司产品)上进行。

4. PCR-RBD HCV RNA 基因分型:应用 PCR-RBD 技术,将基因扩增、核酸杂交和酶联显色技术结合,自行建立一种简便易行的 HCV RNA 基因分型新方法。

(1)引物与探针:根据 GenBank 中已经发表的 25 株 HCV(包括 1a、1b、2a、2b、3a、3b)的基因序列,采用 DNADIST 软件和 Tree view 软件确定 HCV 的基因型特点。选择 HCV 5' 非编码区(nt-299~nt-1),采用 primer premier 5.0 软件自行设计内外 2 对引物、型特异性探针(1a~3b)和监测 HCV RNA PCR 扩增与否的通用探针(S)。在下游引物(Primer4)的 5' 端标记生物素,探针的 5' 端修饰活性氨基。引物和探针均由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 引物和各型探针序列见表 1。

(2)膜条制备:用 HCl 快速漂洗 Biodyne C 膜条,并在 20%EDC 溶液中浸泡 15 min,将 1a~3b 分型探针及通用探针 S(溶于碳酸盐缓冲液中)从左到右依次点于膜上,室温孵育 15 min,再用 NaOH、双蒸水漂洗,风干待用。

表1 引物和分型探针序列

引物	序列 5'-3'	结合位点
Primer1	CCCTGTGAGGAAGTCTGTCTTCACGC	-299
Primer2	GGTGCACGGTCTACGAGACCT	-1
Primer3	TCTAGCCATGGCGTTAGTRYGAGTGT	-264
Primer4	CACTCGCAAGCACCTATCAGGCAGT	-29
Probe1a	TCTTGATAAACCCGC	-146
Probe1b	CCGCGAGACTGCTAGC	-103
Probe2a	ACCCACTCTATGCCCCG	-136
Probe2b	ACCCACTCTATGTCCG	-136
Probe3a	AATCGCTGGGGTGACC	-170
Probe3b	AATCGCCGGGATGACC	-170
Probe s	TCTGCGAACCCGGTGA	-195

注:W:A 或 T;R:A 或 G;Y:C 或 T

(3)标本处理与 RT 反应:使用中山大学达安基因诊断中心提供的试剂盒,取 RNA 提取液 A 10 μl ,加入待测血清 50 μl ,再加入 200 μl 提取液 B,充分混匀,室温放置 5 min,6000 r/min 离心 1 min,去上清,75%的预冷乙醇(DEPC 水配制)洗沉淀 2 次,65 $^{\circ}\text{C}$ 干燥沉淀 10 min。向沉淀管内加入 18 μl RT 反应液及逆转录酶 2 μl ,震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 45 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 3 min,离心后上清备用。

(4)PCR 反应体系与巢式 PCR 基因扩增:第一轮 PCR:在 50 μl 反应体系中进行,在 PCR 缓冲液中,加入 MgCl_2 1.5 mmol/L、dNTP 0.2 mmol/L、引物 Primer 1 和 2 各 200 nmol/L、Taq 酶 1.5 U。加入 5 μl 模板于反应管内上机扩增。预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,循环条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 55 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 55 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 55 s,共循环 35 次;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。设置无模板的空白对照。第二轮 PCR:在 PCR 缓冲液中加入引物 Primer 3 和 4 各 200 nmol/L,其余 PCR 反应组分与第一轮 PCR 相同。加入 1 μl 第一轮 PCR 的产物于反应管内上机扩增,循环条件与第一轮相同。

(5)PCR 产物电泳鉴定:产物经含 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中电泳,紫外透射仪下观察。

(6)逆向点杂交:把杂交液(2 \times SSC-1%SDS, 3 mol/L Me_4NCl)、膜条、扩增产物加入杂交管内,100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min 后置 42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。次日 42 $^{\circ}\text{C}$ 洗膜(0.5 \times SSC-0.1%SDS, 3 mol/L Me_4NCl)后,加入 POD 作用 15 min,洗涤后,膜条在含 TMB 显色液中避光显色 10 min 后开始观察结果。结果判断:在通用探针处出现蓝色斑点表明有 HCV RNA 阳性;在通用探针位点及某基因型探针位点同时出现蓝色斑点则为该类型 HCV;在两种或以上基因型探针位点同时出现蓝色斑点则为混合型。如在通用探针 s

与探针 1b 处同时出现蓝色斑点,则该血清标本为 1b 型,在探针 s、1b、2a 处同时出现蓝色斑点,则为 1b、2a 混合型。无蓝色斑点出现则判断为 HCV RNA 阴性。

(7)重复性实验:从 60 份已经进行分型鉴定的血清中随机挑选 20 份,重新进行基因分型鉴定,对比前后分型结果。

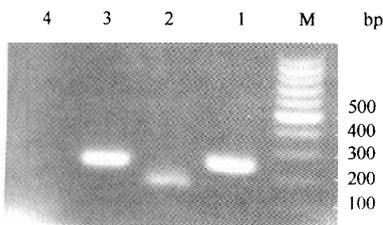
5. PCR 产物序列测定:随机挑选经膜条检测为基因型 1a、1b、2a 的扩增产物各 2 份,经醋酸钠/乙醇纯化后,以 PCR 引物为直接测序引物,由中山大学达安基因诊断中心协助完成测序。将测得的序列输入 DNASTAR 分析软件中,与 GenBank 中已知 HCV 各基因型序列进行同源性比较与序列排列对比分析,明确其基因型。

6. 不同基因型的混合血清的检测:将经过测序确定单一基因型 1a、1b、2a 感染的血清分别两两组合按一定的拷贝数比例混合后,采用 PCR-RBD 方法进行基因分型。

结 果

1. HCV RNA PCR 定量测定:经荧光定量 PCR 测定 60 份慢性丙肝患者的血清中 HCV RNA 的拷贝数在 $10^2 \sim 10^6$ /ml 范围之间;50 份健康对照组血清中的 HBV RNA 为阴性。

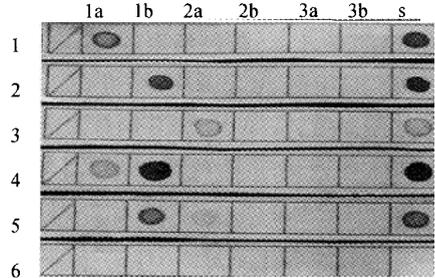
2. PCR 产物琼脂糖电泳:50 份健康对照血清未见扩增条带。HCV 阳性血清均可见到 235 bp 大小左右的扩增片段,但条带强弱不同,片段迁移率也不同。强阳性的片段迁移率 < 235 bp,弱阳性的片段迁移率 > 235 bp,这可能是由于扩增片段中所带的生物素对迁移率有影响所致(图 1)。



M:DNA 标准分子量;1~3:HCV RNA 扩增片段;4:阴性对照
图1 HCV RNA 的 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

3. HCV 的 PCR-RBD 基因分型:应用自建方法对 60 份定量测定拷贝数在 $10^2 \sim 10^6$ /ml 范围之间的 HCV RNA 阳性血清标本,均可以进行基因分型,其中包括 20 份拷贝数为 10^2 /ml 的低病毒量血清。分

型结果为 1b 型 50 份,占 83.3%;1a 型 2 份,占 3.3%;2a 型 2 份,占 3.3%;1a、1b 混合型 5 份,占 8.0%;1b、2a 混合型 1 份,占 1.7%。混合型多数病例出现一强一弱蓝色斑点。未见单独型 2b、3a、3b 感染。50 份健康体检者血清全部阴性。表明 PCR-RBD 分型方法有较好的敏感和特异性(图 2)。



1a~3b:分型探针; s:HCV 通用探针; 1:基因型 1a; 2:基因型 1b; 3:基因型 2a; 4:基因型 1a+1b; 5:基因型 1b+2a; 6:阴性对照

图2 HCV 的 PCR-RBD 基因分型结果

4. 重复性实验:对随机抽取的 20 份血清标本,应用 PCR-RBD 方法再次分型,前后实验结果符合率为 100%。表明 PCR-RBD 分型结果有很好的—致性。

5. 测序结果:随机挑选 PCR-RBD 检测基因型为 1b、1a、2a 的扩增产物各 2 份进行测序,用 DNASTAR 分析软件进行与 GenBank 中基因序列比较,确定其基因型。PCR-RBD 基因分型结果与测序分型结果完全一致,表明 PCR-RBD 分型方法准确可靠。

6. 不同基因型混合血清的检测结果:PCR-RBD 基因分型法对不同基因型的混合血清进行检测,均可以正确有效地检出混合血清中所含的各单一基因型,当混合血清中的一种亚型的拷贝数低到 10^2 /ml,仍然能很好的检出。表明 PCR-RBD 分型方法可有效地检出各种混合感染。

讨 论

HCV 是单链 RNA 病毒,利用 RNA 依赖的 RNA 聚合酶进行复制,由于该酶缺乏碱基的错配校正功能,导致 HCV 的变异率较高。按照 Simmonds 基因分型的标准,当 HCV 全基因序列差异在 30% 以上时,可界定为一种基因型,同一基因型 HCV 的全基因序列差异在 20% 以上时,可界定为一种亚型。HCV 基因分型方法有多种^[6,7],但均存在着价格昂贵、操作繁琐或实验条件要求高等不同的缺陷,

因此 HCV 基因分型国内尚无普遍推广应用的标准诊断试剂盒。本项研究基于型特异性探针反向杂交原理,选择比较保守且可区分 HCV 主要基因型的 5' 端非编码区 (5' NCR) 为探针设计区域,采用 Simmonds 基因分型的标准,设计出 6 条中国常见的 HCV 1a、1b、2a、2b、3a、3b 的型和亚型特异性探针,点于 Biotyne C 膜上,用生物素标记 PCR 引物进行扩增,最后将 PCR 扩增产物与 C 膜上的分型探针进行反向杂交,经酶联显色后即可肉眼判读结果。原则上每个探针 T_m 值基本相同,各探针 T_m 值之间的差异控制在 2~3℃ 左右,为了最大程度的减少因各探针中 CG 含量不同所导致的在同一杂交与洗膜温度下复性不均的问题,我们在杂交体系中加入了 3 mol/L 的 Me_4NCl ,通过其选择性地与 A:T 对结合,升高 T_m 值,可使 A:T 对和 G:C 对的解链温度趋于相同,以保证不同 T_m 值的探针在同一温度下的敏感性趋于一致。

采用本研究方法经一次杂交可对国内主要流行的 6 个亚型的 HCV 进行基因分型,经过与 HCV 测序分型结果进行比较,对 1a、1b、2a 基因型单独感染的血清分型与测序分型结果具有很好的一致性。测序方法因对不同基因型混合感染的血清很难进行分型,我们便将经测序已经验证的 2 种不同单一基因型感染的血清混合后再用本方法检测,检出的结果也为这两种基因型的混合感染。当混合血清中一种亚型的拷贝数低到 10^2 /ml,仍然能很好的检出,具有较高的灵敏度。在病毒载量较高时,未出现明显的非特异性杂交,特异性较好。表明本研究所建立的逆向点杂交 HCV 基因分型方法,是一种高效、特异和敏感,而且简单易行,成本较低的分型方法,便于临床应用。

HCV 基因分型对于流行病学调查和临床诊断、治疗方案的选择和预后的判断以及丙肝发病机制的研究都有重要意义。既往的流行病学调查表明 HCV 基因型的分布具有一定的地域或种族特征^[8,9]。本研究通过对佛山地区 60 份经 FQ-PCR 检测的 HCV RNA 阳性的随机抽样血清标本进行基因分型,发现以 1b 型感染占 83.3%, 1a 型占 3.3%, 2a 型占 3.3%, 1a、1b 混合型占 5.0%, 1b、2a 混合型占 1.7%, 未见单独型 2b、3a、3b 感染。本研究结果与安阳等^[10]采用型特异性引物 PCR 法报道的广州

地区 HCV 基因型的分布基本一致。研究还发现佛山地区有少量国内报道较少的,既往认为仅仅分布在新疆、西藏等地区的少数民族中的 1a 型^[11],且多以 1a 与 1b 混合型的形式出现。我们发现的混合型,多数病例的蓝色斑点呈现出一强一弱的特点,这可能是因为其中一个为优势基因型,另一个为劣势基因型。本研究所涉及的丙肝感染者多数接受过输血或血浆制品,由于血液制品如血浆、丙种球蛋白或白蛋白等,一般为多个献血员血液成分的混合制品,可能易于造成混合亚型的感染;另外,目前国内人口流动加快,佛山地区外来人口比例较高,可能也是一些少见基因型和混合型出现的原因。应用本研究所建立的逆向点杂交 HCV 基因分型方法研究发现,佛山地区人群中感染的 HCV 以 1b 型为主。

参 考 文 献

- 1 Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *J Gen Virol*, 1993, 74: 2391-2399.
- 2 唐小平,吴婉芬,袁小珍. 丙型肝炎病毒基因分型及其与疾病程度、感染途径和干扰素疗效的关系. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1997, 17: 92-95.
- 3 苏英豪. 丙型肝炎病毒基因分型及其意义. *国外医学微生物学分册*, 1999, 22: 8-11.
- 4 Oshioka K, Kakumu S, Wakita T, et al. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology*, 1992, 16: 2993-2994.
- 5 Yotsuanagi H, Koike K, Yasuda K, et al. Hepatitis C virus genotypes and development of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 1995, 76: 1352-1355.
- 6 Okamoto H, Kobata S, Sakamoto M, et al. A second generation method of genotyping hepatitis C virus by the polymerase chain reaction with sense and antisense primers deduced from the core gene. *J Virol Meth*, 1996, 57: 31-45.
- 7 Stuyver L, Wyseur A, Amhem W, et al. Second generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol*, 1996, 34: 2259-2266.
- 8 王宇,陶其敏,李岱,等. 用逆转录-DNA 扩增法分析中国人丙型肝炎病毒基因型. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1993, 7: 6-9.
- 9 顾秀华,高连相,刘芳华,等. 静脉药瘾者 HCV 感染与基因分型. *中华传染病杂志*, 1995, 13: 228-229.
- 10 安阳,杨绍基,姚集鲁. 广州地区丙型肝炎患者病毒基因分型及其与临床病情的关系. *中山医科大学学报*, 1999, 20: 69-72.
- 11 宋宏彬,王海涛,唐时幸,等. 中国藏族和维吾尔族人群丙型肝炎病毒基因型分析. *中华肝脏病杂志*, 1996, 4: 154-156.

(收稿日期: 2004-09-16)

(本文编辑: 尹廉)