·论　　著·

NS5B 区核酸序列测定的丙型肝炎病毒基因分型研究*

李　峥[1]，高玉红[1]，张桂前[1]，毕　胜[1]，杨　曦[1]，夏雪山[2]，冯　悦[2]，何丽华[2]
（1 昆明医学院附属昆华医，云南昆明 650032；2. 昆明理工大学生命科学和技术学院，云南昆明 650000）

摘　要：目的　了解昆明市丙型肝炎感染者 HCV 基因型分布特征。**方法**　用 RT-PCR 法扩增 40 例 HCVRNA 阳性的患者血清样本丙型肝炎病毒 NS5B 区段，PCR 产物纯化后进行测序分析，测序结果与参考序列共同构建系统进化树，得到丙型肝炎病毒基因型和基因亚型。**结果**　丙型肝炎病毒 NS5B 区段基因序列的系统进化树分析能对丙型肝炎病毒感染者样本进行很好的分型；分型结果显示，昆明地区丙型肝炎病毒主要的基因型是 3b 型占 45.0%，其次 2a 型占 22.5%，1b 型占 20.0%，3a 型占 7.5%，6n 型及 6a 型各占 2.5%。**结论**　构建丙型肝炎病毒 NS5B 区系统进化树分析能得到准确的 HCV 基因型和亚型；昆明地区的丙型肝炎病毒基因型以 3 型为主，其次 2a、1b 型，同时发现 6 型；昆明丙型肝炎感染者中 HCV 基因型分布更接近于中国香港和东南亚国家的丙型肝炎病毒基因分布。

关键词：HCV；　基因型；　系统进化树
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.009　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1673-4130(2011)05-0550-03

The investigation fo HCV genotype using nucleic acid sequence analysis of NS5B region

Li Zheng[1], *Gao Yuhong*[1], *Zhang Guiqian*[1], *Bi Sheng*[1], *Yang Xi*[1], *Xia Xueshan*[2], *Feng Yue*[2], *He Lihua*[2]
(1. *The Kunhua Hospital Affiliated to Kunming Medical College*, *Kunming*, *Yunnan* 650032, *China*;
2. *The College of Life Science and Technology*, *Kunming University*, *Kunming*, *Yunnan* 650000 *China*)

Abstract: Objective　To explore the hepatitis C virus (HCV) genotype distribution in Kunming. **Methods**　By using RT nested PCR, the NS5B region of HCV of forty patients was amplified. The PCR products were purified and analyzed by sequencing. The sequences were compared with the Genebank sequences to construct the HCV NS5B phylogenetic tree and to obtain the identified HCV NS5B genotype. **Results**　The genotypes of all samples can be matched by using HCV NS5B phylogenetic tree. The major HCV NS5B genotype in Kunming are 3b (45.0%), 2a (22.5%), 1b (20.0%), 3a (7.5%), 6n (2.5%) and 6a (2.5%). **Conclusion**　The accurate HCV NS5B genotype and subgenotype can be obtained by establishing the phylogenetic tree of HCV NS5B region. The main HCV NS5B genotypes in Kunming are 3b, 2a and 1b. We also found HCV 6 at the same time. The distribution of HCV genotype in Kunming is closer to those in Southeast Asian countries.

Key words: Hepatitis C Virus;　Genotype;　Phylogenetic tree

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus，HCV)是引起输血后慢性肝炎的主要病原体。HCV 全球分布，估计感染率为 3%，即有 1.7～2.0 亿人为 HCV 感染者[1]。近年来，HCV 在部分地区的流行呈增长态势[2]。我国的 HCV 估计感染率为 2.5%～4.9%，总感染人数超过 500 万人[3]。HCV 引起的肝炎约 80%发展为慢性肝炎，其中约 25%发展为肝硬化、肝癌[4]。HCV 已成为继乙型肝炎病毒后肝炎、肝硬化和肝癌等疾病的第 2 大病因。由于对 HCV 至今尚无疫苗和可治愈的药物问世，HCV 的危害性远大于其他类型的病毒性肝炎。HCV 属黄病毒科，为单股正链 RNA 病毒，基因组全长 9.5 Kb，由于病毒复制过程中依赖 RNA 的 RNA 聚合酶缺乏校对功能，HCV 的基因极易发生变异，根据核苷酸序列的同源性，HCV 可被分为 6 个基因型和 70 多个亚型。研究发现，HCV 基因型的变化和 HCV 病毒复制速度，HCV 疾病进程，及药物治疗反应性直接相关[5]。另外，HCV 基因型分布具有明显的地域差异和人群差异。目前，HCV 基因分型的方法有多种，而根据 HCV NS5B 区基因序列而进行的基因分型被公认为 HCV 基因分型的“金标准”[6]。本研究建立了基于 HCV NS5B 基因序列系统进化树分析的基因分型方法，并对昆明地区 40 例慢性 HCV 感染者进行了基因分型，现将结果报道如下。

1　材料与方法

1.1　标本来源　标本来源于 2008 年于昆明医学院附属昆华医院就诊的 HCV 感染者，且 HCV RNA 阳性血清标本 40 例。排除甲、乙病毒性肝炎及自身免疫性肝炎。

1.2　主要试剂和仪器　病毒核酸提取试剂盒(德国罗氏公司)、一步法 RNA 提取试剂盒(大连宝生物工程公司)、DNA 扩增试剂盒(大连宝生物工程公司)、UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒(上海生工)严格按说明书操作，有效期内使用。Life Express 基因扩增仪、天能 EPS300 电泳仪等。

1.3　方法

1.3.1　HCV RNA 检测　HCV RNA 检测采用上海科华生物公司的丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法)。操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.3.2　HCV NS5B 区序列测定与分析

1.3.2.1　引物设计合成　引物根据 HCV 病毒 RNA 的全长序列设计，设计区域选择 HCV RNA NS5B 区，计算机辅助设计软件为 Primer Premier5.0，引物由上海生工合成，序列如下。

*　基金项目：云南省自然科学基金面上项目资助(2009CD194)。

外扩增上游引物：YE1 5′-GGS TTY TCG TAT GAY ACC MGB TGY TTT GA-3′(8247-8275)；外扩增下游引物：A9521 5′-CTA CCC CTA CRG SRA GYA GGA GTA GGC-3′(9351-9325R)；内扩增上游引物：YE2 5′-GCT GYT TTG AYT CAA CNG TCA C-3′(8266-8287)；内扩增下游引物：A9470 5′-GRG CMY GRG ACA CGC TGT GAT ASA TGT C-3′(9302-9274R)。

1.3.2.2 序列测定　用 High Pure Viral Nucleic Acid Kit(德国罗氏公司)，从 200 μL 血清中提取 HCV RNA。用 One Step RNA PCR Kit(大连宝生物工程公司)，以引物 YE1 和 A9521 完成逆转录和 HCV RT-PCR，反应混合液组分为 HCV RNA 4.0 μL，上引物 YE1(10 μM)1.0 μL，下引物 A9521(10 μM) 1.0 μL，10×反应缓冲夜 2.5 μL，dNTP 混合液(10 mM)2.5 μL，Mg^{2+}(25 mM) 5.0 μL，核糖核酸酶抑制剂(40 U/μL) 0.5 μL，逆转录酶(5 U/μL) 0.5 μL，逆转录聚合酶 Tap(5 U /μL) 0.5 μL，DEPC H_2O 7.5 μL，总体积 25.0 μL。反应条件为 50 ℃ 30 min，94 ℃ 3 min，1 个循环；94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s 72 ℃ 2 min，40 个循环；72 ℃ 5 min。

HCV nested-PCR，合成反应混合液组分为第 1 轮 PCR 产物 5.0 μL，上引物 YE2 (10 μM)1.0 μL，下引物 A9470 (10 μM)1.0 μL，聚合酶链反应混合液 12.5 μL，DEPC H_2O 5.5 μL。总体积 25.0 μL。反应条件与第 1 轮相同。整个试验过程均设置阴性及阳性对照。nested-PCR 产物通过 1%琼脂凝胶电泳检测 1 037 bp 目的片段。

PCR 产物利用 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒(上海生工)纯化后，由上海生工生物工程公司进行核酸序列测定。

1.3.3 核苷酸序列测定及数据分析　所得到原始序列，用 Chromas 进行核苷酸峰型校对，用 Clustal X1.83 进行序列同源对比，Bioedit(Ver7.0.0)进行序列编辑，最终用 MEGA3.0 建立同源关系树(Bootstrap NJ Tree)。HCV 基因型和亚型的分类以 Simmonds 等提出的命名法为参考依据。

1.3.4 选用的参考株如下

1 型：AF165045、D87362、AF483269、AJ000009、U16362、AF139594、L02836、AY460204、AY051292、AF009606

2 型：AF169002、AB047639、D00944、D49760、D50409、DQ155561、AB031663、AF238486

3 型：D37854、D16617、D49374、D16615、D16621、D16613、D16619、D63821、D28917、D17763、D14308

4 型：Y11604

5 型：D50467

6 型：DQ314806、EF424625、EF424626、D37857、EF424627、D37858、D30797、EF632069、D37863、D37862、D84265、AY878650、DQ278893、D84264、DQ835763、DQ835765、DQ278894、DQ835768、AY859526、D87362、D84262

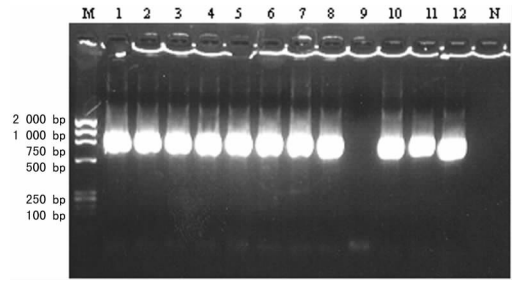
2 结　果

2.1 HCV RNA 的定量检测　选择 HCV RNA 阳性血清 40 例，检测 HCV RNA 含量为 $10^{4.48\sim7.34}$ Iu/md 之间，平均为 $10^{5.63}$ Iu/md。

2.2 PCR 扩增(见图 1)　RT-nested-PCR 扩增产物全长 1 037 bp，条带清晰，特异性好。

2.3 HCV 参照序列 NS5B 基因型的系统进化树的构建　40 例 HCV NS5B 测序结果与已明确基因型的参考株序列共同进行系统进化树分析，结果见图 2。用系统进化树分析 HCV NS5B 的 1 037 bp 序列能得到准确的 HCV 型和亚型。

2.4 40 例 HCV RNA 阳性血清基因型和亚型的分型结果　用系统进化树对 40 例 HCV 感染者的基因分型结果，发现 6 种 HCV 基因型亚型：3b 型占 45.0%(18/40)，2a 型占22.5%(9/40)，1b 型占 20.0%(8/40)，3a 型占 7.5% (3/40)，6n 型、6a 型各 1 例。未发现其他基因型，分型成功率达 100%。



M：标准带；N：表示未加样品。1～12 号为 HCV 感染者样品。

图 1　NS5b 区 RT-PCR 扩增电泳图

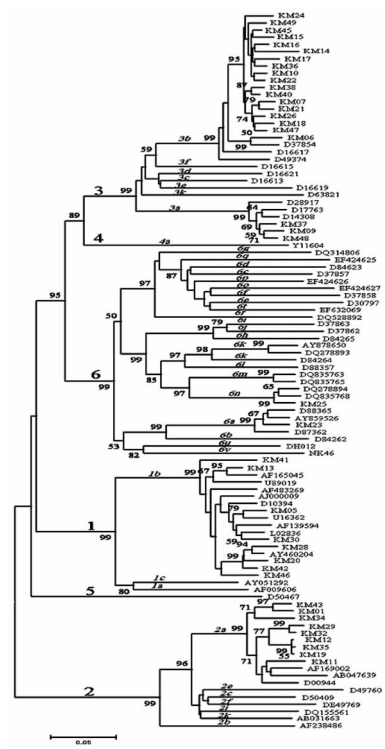


图 2　HCV NS5B 测序结果与已明确基因型参考株序列共同进行系统进化树分析

3 讨　论

据报道中国的 HCV 基因型分布以 1b 和 2a 型较为常见，其中以 1b 型为主，2a 型次之。某些地区有 1a、2b 和 3b 型报道，6 型主要见于香港和澳门地区，而在华南、西南等南方边境省份基因型分布有一定的特殊性及复杂多样性。张帆等对重庆地区 77 株 HCV 进行分型，主要流行的基因型为 1b(38%)，并检出基因型 2a(13%)、3a(16%)、3b(14%)、6a(19%)，除 1b 外各个型所占比例相近，没有发现 1a 与 2b 型。Lu 等[7]对中国大陆 9 个城市的基因型分布进行了测定评估。分型结果显示在珠江三角洲地区 6a 型已取代 2a 型成为该地区流行程度仅次于 1b 型的基因型，本研究显示昆明以 3b 型为主，呈现

1b、2a、3a、6a 和 6n 多种基因型分布。

本研究的 40 例昆明地区丙型肝炎感染者基因型分布显示 3b 型为主要流行型占 45.0%(18/40),其次为 2a 型占 22.5%(9/40),1b 型占 20.0%(8/40),3a 型占 7.5%(3/40)),同时发现 6n 和 6a 型各 2.5%(1/40)。这与 HCV 在我国其他省份普通人群中 1b、2a 为主的基因分布明显不同。云南省与东南亚多个国家毗邻,在这些国家中,泰国主要以 3 型为主,其次为 1b 和 6 型[8],缅甸也具有基本相同的 HCV 基因分布[9],在越南和中国香港地区 6 型 HCV 病毒株有更多流行[10]。由于云南省与这些国家山水相连,人员来往频繁的地缘关系,昆明 HCV 感染者中 HCV 基因型分布更接近于东南亚国家的 HCV 基因分布情况。

HCV 基因分型的方法有多种:(1)特异性引物扩增片段分型法;(2)基因芯片法和型特异性探针杂交法;(3)限制性片段长度多态性(RFLP);(4)核苷酸序列分析法及遗传发育关系进化树。其中最经典、最可靠的方法是核苷酸序列分析法及构建遗传进化树。该方法通过 PCR 扩增有代表性的基因片段(如 5′NCR 区、C 区、NS5B 区),再进行核苷酸序列测定。进行核酸序列分析法最关键的步骤便是对核酸序列分析区域的选择,区域选择的好坏直接影响最后的分型结果。万祥辉等[11]对 HCV 已有的 15 条来源于不同国家和地区的 HCV 全基因组序列,分别用 5′NCR 区、C 区、E1 区、E2 区、NS5B 区构建系统进化树,结果发现,5′NCR 区未能区分 2 条序列,存在分型错误,其他区虽能正确分型,但同一基因型不同病毒株的核苷酸演化距离不同,其中 NS5B 区进化树最能反映病毒株间的演化距离,与全基因组序列分型结果完全一致。于静等[12]的研究表明,在基因型相同基因亚型不同的病毒株之间,NS5B 区的平均差异达到了 16.5%～20.1%,5′NCR 区核苷酸组成的平均差异仅为 1%～3.3%,因而 NS5B 区更适用于 HCV 分子流行病学中基因亚型的区分,本实验采用的基于 NS5B 基因的系统进化树分型方法,对本组所有标本进行正确的基因分型,证明此方法是 HCV 分型准确可靠的方法。

参考文献

[1] WHO. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium[J]. Viral Hepatitis, 1999, 6(12): 35-47.

[2] 武红梅. 输血前检查血清感染性指标的临床分析[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(1): 72-73.

[3] WHO. Hepatitis C-global prevalence (update)[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2000, 75(3): 18-19.

[4] 李蒙, 李玲, 余鹃春, 等. 量子点技术快速检测 HCV 核心抗原的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 430-436.

[5] Nakano I, Fukuda Y, Katano Y, et al. Interferon responsiveness in patients infected with hepatitis C virus 1b differs depending on viral subtype[J]. Gut, 2001, 49(2): 263-267.

[6] Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis[J]. Gastroenterology, 2002, 122(6): 1554-1568.

[7] Lu L, Nakano T, He Y, et al. Hepatitis C Virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants[J]. J Med Virol, 2005, 75(20): 538-549.

[8] Kanistanon D, Neelamek M, Dharakul T, et al. Genotypic distribution of hepatitis C virus in different regions of Thailand[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(19): 1772-1776.

[9] Shinji T, Kyaw YY, Gokan K, et al. Analysis of HCV genotypes from blood donors shows three new HCV type 6 subgroupes exist in Myanmar[J]. Acta Med Okayama, 2004, 58(6): 135-142.

[10] Mellor J, Walsh EA, Prescott LE, 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(7): 417-423.

[11] 万祥辉, 曾照芳, 杨细媚. 用生物信息学方法确定丙型肝炎病毒基因分型的最佳区域[J]. 生物技术通报, 2008, 24(3): 81-83.

[12] 于静, 夏雪山, 台虹, 等. 基于 NS5B 区核酸序列同源性的 HCV 基因分型方法[J]. 昆明理工大学学报(理工版), 2005, 512(32): 6.

(收稿日期:2010-07-25)

(上接第 549 页)

与红细胞－80 ℃深低温保存血库的建立,开辟了突发事件医疗救护用血绿色通道,从而保障血液的供给,尤其是 RhD 阴性稀有血型血液的供给。

本研究结果表明,建立 RhD 阴性稀有血型供者信息库和储备 RhD 阴性稀有血型冰冻红细胞保存库,具有深远的实际意义和战略意义。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB18467-2001 献血者健康检查需求[S]. 北京:中国标准出版社, 2001.

[2] Yu ZQ, Hu LH, Han M, et al. The popularization and Application of Cold Storage Red Blood Cells or Whole Blood at －80 ℃ of the Rh(D) Negative Patients in the Surgical Operation[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2002, 22(2): 155-157.

[3] 余忠清, 胡丽华, 饶神宗, 等. 红细胞－80 ℃冷冻保存的实验观察[J]. 同济医科大学学报, 2001, 30(2): 175-177.

[4] 王培华. 输血技术学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1998: 62-67.

[5] 邱艳. 全血成分血液质量要求与血液标准化[M]. 北京:中国标准出版社, 2003: 71-78.

[6] 中华人民共和国卫生部. 中国输血技术操作规程-血站部分[M]. 天津:天津科学技术出版社, 1997: 60-87.

[7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB 18469-2001 全血及成分血质量要求[S]. 北京:中国标准出版社, 2001.

[8] 王东, 夏传友, 伍建宁, 等. 顺德地区 RhD 阴性供者信息库的建立与临床应用[J]. 临床输血与检验, 2009, 11(3): 240-241.

[9] 王芳, 黄霞, 毛伟, 等. 重庆地区献血者 RhD 阴性血型抗原分布调查[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(2): 199-203.

[10] 王平, 洪流, 罗月明. ABO 和 Rh D 血型定型试剂滴加在白瓷板后的稳定性观察[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(6): 589-591.

[11] 陈才生. ABO、Rh(D)血型分布及质量分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 77-78.

(收稿日期:2010-09-20)