

系统进化树分析慢性丙型肝炎患者 HCV 基因分型

王美霞 徐 斌 段 瑾 金 铭

摘 要 **目的** 了解浙江省慢性丙型肝炎患者 HCV 基因型分布情况。**方法** 参考 Ohno 的分型方法,采用巢式 RT-PCR 法扩增抗 HCV 抗体阳性患者的血清样品 HCV 核心(core)基因部分区段(-12nt ~ +343nt),克隆并测序^[1];以 Clustalw 软件对所克隆片段进行系统进化树分析并分型。**结果** 在 60 份 HCV 抗体阳性血清中,HCV 检出率为 55% (33 例);系统进化树分析提示共有 1b、2a、3a、3b、6a 5 个不同的基因型,以 1b、3b 和 2a 基因型为主,其中 1b 阳性率为 52% (17 例)。**结论** 浙江省慢性 HCV 感染者中 HCV 基因型呈现出以 1b、3b 和 2a 为主、多基因型存在的特点。

关键词 肝炎病毒 丙型 基因型 系统进化树

Polygenetic Tree Analysis of HCV Genotype in Zhejiang Province. Wang Meixia, Xu Bin, Duan Jin, Jin Ming. Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract **Objective** To study the genotype distribution of hepatitis C virus (HCV) in Zhejiang province. **Methods** Fragment (-12nt ~ +343nt) of HCV core gene was amplified by nest RT-PCR from anti-HCV antibody positive serum and then cloned and sequenced referred to Ohno's method. The cloned sequences were then blasted and genotyped by using Clustalw based on polygenetic tree. **Results** HCV RNA positive rate was 55% (33 cases) in 60 serums. Genotype 1b, 2a, 3a, 3b and 6a existed in the 33 serum samples, among which 1b, 3b and 2a genotypes were the majority. **Conclusion** The features of HCV infection in Zhejiang province were 1b, 3b and 2a genotypes-based, multiple genotypes co-existing characteristic.

Key words Hepatitis virus; C type; Genotype; Polygenetic tree

HCV 感染极易慢性化。现已证明慢性 HCV 感染抗病毒治疗疗效与 HCV 基因型密切相关。在我国 HCV 感染抗病毒治疗指南中对基因 1 型和非 1 型的疗程做出了明确的规定,分别是 48 周和 24 周,所以明确患者所感染 HCV 的基因型对于决定疗程具有重要意义。目前 HCV 基因分型的方法众多,尚无“金标准”。本文采用 Ohno 的分型方法结合系统进化树分析来对浙江省慢性 HCV 感染者进行基因分型。

材料与方法

1. 材料:(1)临床标本:60 份抗-HCV 和 HCV RNA 双阳性的血清来自于杭州市第六人民医院 2008 年 12 月~2009 年 4 月期间门诊和住院患者,患者户籍均为浙江省。男性 49 例,女性 11 例。患者年龄 23~69 岁。平均感染时间 8.7 年。感染途径:42 例为输血感染,8 例系单采浆还输血球感染,5 例有纹刺史,1 例性传播,4 例原因不明。(2)主要分子生物学试剂:焦碳酸二乙酯(DEPC)购自上海英骏生物技术有限公司,T₄DNA 连接酶购自 NEB 公司,dNTP(2.5mmol/L)、琼脂糖凝胶、EX-Taq 酶、pUC18-T 载体以及大肠杆菌 JM109 感受态细菌均购自宝生物大连有限公司,胶回收试剂盒、QIAamp

MinElute Virus Spin Kit 购自 QIAGEN 公司,RT/Platinum Taq Mix kit、X-gal、IPTG 购自 Invitrogen 公司。

2. 方法:(1)血清 RNA 的抽提:血样总 RNA 的提取按 QIAamp MinElute Virus Spin Kit 试剂说明书进行操作。(2)HCV core 基因部分区段的扩增:根据 Ohno 的方法,采用巢式 RT-PCR 扩增 HCV core 基因部分区段,该区段位于 HCV 基因组 -12nt ~ +343nt。①引物序列如下:P₂:5'-GGGAG-GTCTCGTAGACCGTGCACCATG-3';Sa₂:5'-GAG(A/C)GG(G/T)AT(A/G)TACCCCATGAG(A/G)-3';P₁:5'-AGAC-CGTGCACCATGAGCAC-3';Sa₁:5'-TACGCCGGGGGTCA(T/G)T(G/A)GGGCCCCA-3';②一步法 RT-PCR 扩增:用 RT/Platinum Taq Mix kit,以 P₂、Sa₂ 为引物对血清 RNA 进行 RT-PCR(反应体系按说明配比,总体积 25μl)。RT-PCR 扩增程序为:55℃ 反转录 30min,94℃ 预变性 2min,前 10 个循环为 94℃ 1min、45℃ 1min、72℃ 1min,接下来 25 个循环为 94℃ 1min、55℃ 1min、72℃ 1min,最后 72℃ 延伸 7min;③PCR 扩增:采用 EX-Taq 酶,以 P₁、Sa₁ 为引物对 RT-PCR 产物再扩增(反应体系按说明配比,总体积 30μl)。PCR 扩增程序为:PCR 扩增采用热启动方式,即 94℃ 预变性 2min,待温度升高到 80℃ 后加入 Taq 酶,随后进入循环,94℃ 1min、60℃ 1min、72℃ 1min 共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 7min。(3)HCV core 基因部分区段的 T-A 克隆:①PCR 产物的回收:按 QIAGEN 公司胶回收试剂盒说明书进行操作,所得产物用于下步试验;

②回收 DNA 与 PUC18-T 载体连接及转化:EX-Taq 酶具有脱氧核糖核酸末端转移酶的活性,其 PCR 产物为带有 3'端突出为 A 碱基的 DNA 片段,故能高效克隆到 T 载体上。a. 10 μ l 连接反应体系中加入 7.5 μ l PCR 产物以及 0.5 μ l PUC18-T 载体,1 μ l 10 $\times$ 连接缓冲液以及 1 μ l T₄DNA 连接酶,4 $^{\circ}$ C 连接 20h;b. 将 10 μ l 连接混合物加入到 100 μ l JM109 感受态细菌中,冰浴 30min,42 $^{\circ}$ C 热休克 45~50s,快速冰浴 2min,加入 800 μ l 不含抗生素的 LB 培养液,37 $^{\circ}$ C、180r/min 振荡培养 60min,4000g 离心 2min 收集细菌,在含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的平板表面均匀涂布 40 μ l X-gal (20mg/ml) 和 5 μ l IPTG (200mg/ml),然后将收集的细菌均匀涂布在平板上,于 37 $^{\circ}$ C 培养 16h;③阳性重组子的筛选鉴定:a. 培养 16h 后可见平板上均匀分布约 100 多个蓝色和白色单菌落。挑取白色菌落于 600 μ l 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C、250r/min 培养 6h;b. 菌液 PCR 鉴定:每管细菌各取 50 μ l 煮沸 10min,4000g 离心 3min,取 1 μ l 上清为模板用 PUC18-T 载体通用引物进行 PCR 鉴定。通用引物为:#1224:5'-CGC-CAGGGTTTCCAGTCACGAC-3';#1233:5'-AGCGATAA-CAATTTTCACACAGGA-3'。反应体系包含 dNTP 2.0 μ l、10 $\times$ buffer 2.0 μ l、Taq 酶 0.5 μ l、BcaBEST 引物 RV-M0.5 μ l、BcaBEST 引物 M13~47.0.5 μ l、菌液 1 μ l、ddH₂O 13.5 μ l,总体积 20 μ l。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2min,94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s 共 25 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳,阳性重组子于 500bp 左右有特异性扩增条带。

3. HCV core 基因部分区段测序及分析:选取阳性克隆,送上海英骏生物技术有限公司,以 ABI 3730 型 DNA 自动荧光序列分析仪进行测序。采用 Clustalw 分析软件对所分离的 HCV 基因通过进化树分析进行基因型分析。基因型分析采用的标准株均来自 GenBank,分别为:HCV 1b 型 (D10074、AJ132996、AF207762、AB010785、AB154177),HCV 2a 型 (AF177036、AF238482),HCV 2b 型 (AF238486、AB030907、AY232746),HCV 3a 型 (AY231691、AF046866),HCV 3b 型 (AY231589、D49374),HCV 4a 型 (DQ418782、DQ41878、NC:009825、DQ988078),HCV 5a 型 (AF064490、D50466、NC:009826),HCV 6a 型 (AY859526、D88473、DQ480513、D88476),括号内为 HCV 各型别 GeneBank 登录号。

结 果

1. HCV core 基因部分区段的扩增:自 HCV 抗体阳性患者血清中抽提 RNA 并作为模板,经巢式 RT-PCR 后,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,33 份样品在约 350bp 处显示特异性条带,与预期的片段大小相符合,见图 1 (因篇幅有限,仅以部分代表)。

2. 阳性重组子的 PCR 鉴定:在含氨苄青霉素的 IPTG/X-Gal 培养板上挑取白色单菌落,培养后取少量菌液 pUC18 载体通用引物 #1233 及 #1224 进行

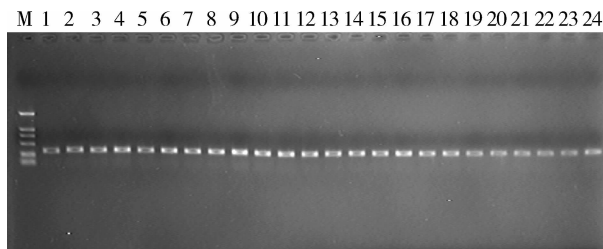


图 1 HCV core 部分基因片段巢式 RT-PCR 产物

M. DL2000 DNA 标志物 (分子质量从小到大分别为 100bp, 250bp, 500bp, 750bp, 1kb, 2kb); 1~24. 部分巢式 RT-PCR 产物

PCR,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,在约 550bp 处显示特异性条带,与预期的片段大小相符合。见图 2 (因篇幅有限,仅以部分代表)。

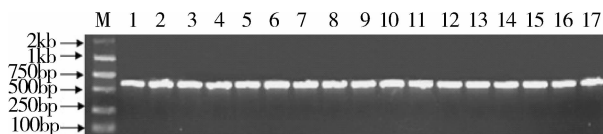


图 2 阳性重组子的 PCR 鉴定

M. DL2000 DNA 标志物; 1~17. 部分重组质粒 PCR 产物

3. HCV 基因型分析:核酸序列基因进化树分析 (图 3)。以 pUC18 通用引物 #1224 对阳性重组子测序。采用 Clustalw 分析软件对所获得的 HCV 序列做进化树分析以确定其基因型。用于分型的 HCV 1-6 型及部分亚型标准株共 33 株, HCV 1b 型 17 株 (52%), 对应血清号分别为: 11、36、29、8、24、16、2、55、31、37、54、45、13、34、48、18、51; HCV 2a 型 5 株 (15%), 对应血清号分别为: 4、22、32、38、57; HCV 3a 型 2 株 (6%), 对应血清号分别为: 9、26; HCV 3b 型 6 株 (18%), 对应血清号分别为: 19、23、43、46、49、52; HCV 6a 型 3 株 (9%), 对应血清号分别为: 3、5、42。未发现有 HCV1a、HCV1c、HCV2b、HCV4、HCV5 等基因型存在。

讨 论

HCV 基因型存在着明显的地域性分布,且与抗病毒治疗的应答、疾病的转归以及胰岛素抵抗等均有明确相关性。浙江省虽然是我国 HCV 感染的低流行区,但总体流行率亦达 2.7%,慢性丙型肝炎及相关肝硬化和肝癌仍然对人民健康造成了很大损害^[2]。基因分型是预测干扰素治疗疗效的 1 个重要因素。迄今为止,只有浙江大学第一医院刘克洲等^[3]在 1998 年按照 Okamoto 等^[4]所建立的型特异性引物巢式 PCR 基因扩增的方法对浙江省的 24 例慢性 HCV

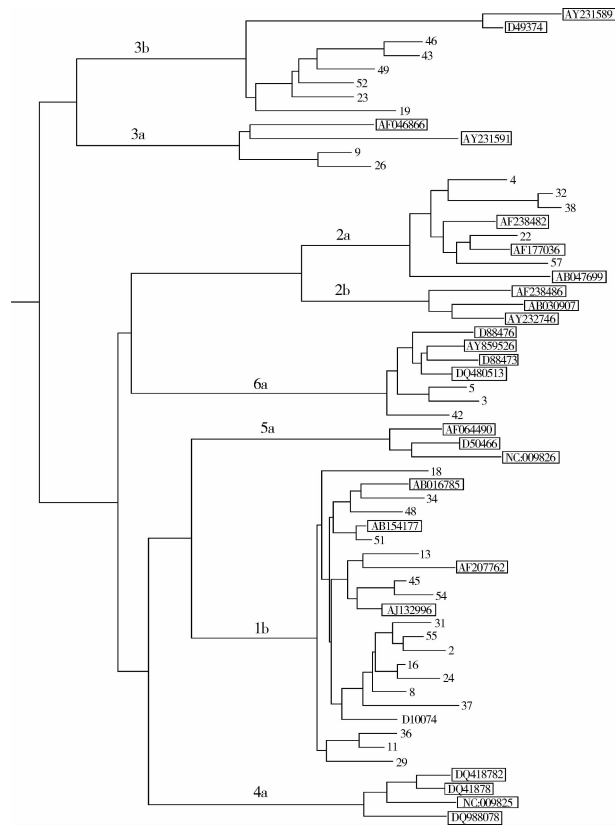


图3 核酸序列进化树分析

图中横线后加黑框的为 GenBank 中分型明确的 HCV 标准株基因登录号, 横线后数字为分离来自浙江地区 HCV 样本, 横线上的数字和字母代表 HCV 各型别

感染者的基因型流行情况作了初步研究, 结果为 II (1b) 为主要流行株, 占 63.14%, 同时存在 1a、2a 感染的情况。我们的研究结果表明 60 份血清中 HCV RNA 阳性者只占 33 例 (55%), 考虑与部分血清保存时间过长 (超过半年) 致 RNA 降解所致。1b 亚型仍然为主要流行株 (52%), 与国内其他地区结果一致。但与之前刘克洲等的研究相比呈现出 1b、2a、3a、3b、6a 等多种基因型存在的现象, 认为这与检测方法的改进、毒株的变异和地域性迁移相关。

1989 年 Chiron 公司发现并证实 HCV 是造成 90% 的 non - A, non - B 肝炎的原因, 引发了 HCV 基因分型方法探索的热潮。最早在 1993 年 Simmonds 等^[5]用亲缘关系分析法, 根据基因序列的同源性将 HCV 分成 6 个基因型和 10 多个亚型, 并得到国际上的认同; Nakao 等^[6]以限制性片段长度多态性分析的方法来进行 HCV 基因分型, 而 Okamoto 等^[4]和 Chayama 等以型特异性引物 PCR 扩增的方法进行分型。

HCV 基因分型的方法迄今没有金标准,目前的分型方法有型特异性探针杂交法,型特异性 PCR - RFLP 法,基因芯片法,限制性片段长度多态性法,特异引物错配延伸法,异源分子迁移率法和直接测序法等。目前国际上基因分型大部分是扩增 HCV 5'UTR, core, E1 和 NS5b 的部分基因,克隆后直接测序。这种方法的缺陷是不能够将所有的基因型区分开来。测序法分型最准确的是基于全基因组测序,但这在临床是难以实现的。本研究采用 Ohno 的分型方法结合系统进化树分析,即先以巢式 RT - PCR 扩增血清样品 HCV core 基因部分区段(- 12nt ~ + 343nt),克隆并测序;继而以 Clustalw 软件对所克隆片段进行系统进化树分析并分型。Clustalw 是一种渐进的多序列比对方法,先将多个序列两两比对构建距离矩阵,反应序列之间两两关系;然后根据距离矩阵计算产生系统进化指导树,对关系密切的序列进行加权;然后从最紧密的两条序列开始,逐步引入临近的序列并不断重新构建比对,直到所有序列都被加入为止。国内万祥辉等^[8]从生物信息学的角度研究表明以 HCV core 区建树进行的基因分型完全正确;认为基于系统进化树重建的体系有望成为 HCV 基因分型的“金标准”。

参考文献

- 1 Tomoyoshi O, Masashi M, Rong W, *et al*. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a[J]. Journal of clinical microbiology, 1997;201-207
- 2 中华医学学会肝病学会中华医学学会传染病与寄生虫病学会. 丙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(4): 194-198
- 3 窦骏, 刘克洲, 陈智, 等. 杭州地区 HCV 感染患者基因分型初步调查[J]. 南京铁道医学院学报, 1998, 17(3): 15
- 4 Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, *et al*. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type - specific primers; application to clinical surveys and tracing infectious sources[J]. J Gen Virol, 1992, 73: 673-679
- 5 Simmonds P, Alberti A, Bonino F, *et al*. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes[J]. Hepatology, 1994, 19: 132
- 6 Nakao T, Enomoto NT, Date T. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism[J]. J Gen Virol, 1991, 72: 2105-2112
- 7 万祥辉, 曾照芳. 用系统进化树重建方法确定 HCV 基因分型的最佳区域[J]. 生物数学学报, 2010, 25(3): 515-520

(收稿:2011-07-27)

(修回: 2011-08-29)