

世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2004 年 2 月 15 日 第 12 卷 第 2 期 (Volume 12 Number 2)



2/2004

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,
《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.
世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2004 年 2 月 15 日 第 12 卷 第 2 期 (总第119期)

述 评	253 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响 成军
胃 癌	258 胃癌线粒体DNA拷贝量的变化 韩琤波, 李凡, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东瑛, 辛彦 262 胃癌前病变p21 ^{ras} , c-erbB-2, p53表达与中医证候的关系 胡玲, 劳绍贤 266 胃癌淋巴结转移预测的多因素分析 黄宝俊, 徐惠绵, 赵雨杰, 王天骄, 田大彤, 陈峻青
肝 癌	271 人鼠嵌合Fab抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原HAb18G嵌合Fab抗体的表达 邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南 276 肝癌细胞H ₂₂ 与树突状细胞杂交瘤苗的实验研究 张娟, 张锦堃, 卓少宏 280 肝细胞癌hOGG1 mRNA及其蛋白的表达 周秀敏, 林菊生, 章金艳, 张莉, 周鹤俊 283 小鼠AFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建及鉴定 田耕, 易继林
病毒性肝炎	286 丙型肝炎病毒核心蛋白结合视黄醇脱氢酶11蛋白 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 291 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A结合蛋白37小鼠同源基因的克隆化及结构分析 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 298 新生儿HBe Ag在HBV宫内感染中的作用 邵中军, 门可, 徐剑秋, 徐德忠, 闫永平, 张景霞 302 应用抑制性消减杂交技术筛选TAHCCP2的反式调节基因 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花 306 基因表达谱芯片筛选NS5ATP3转染细胞差异表达基因 刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花 311 基因表达谱芯片技术筛选NS5A-TP4蛋白反式调节基因 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 张树林 315 HCV包膜糖蛋白E2基因的克隆、蛋白表达及纯化 杜德伟, 贾战生, 秦鸿雁, 刘秋平, 周永兴, 韩 骅 319 应用表达谱芯片技术对NS5ATP7反式调节基因的研究 张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 李强, 刘 敏 323 应用表达谱芯片技术筛选NS5ATP9反式调节基因的研究 李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 王建军, 张健, 刘妍, 程明亮 327 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳 332 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型 温志立, 谭德明
基础研究	336 人肝素酶基因正反义腺病毒表达载体的构建及鉴定 蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭 339 正常与硬化肝组织基因表达差异的初步分析 刘连新, 陈志宏, 武林枫, 李宏伟, 刘芝华, 姜洪池, 王秀琴, 吴 旻 344 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响 廖 冰, 薛 玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪 347 中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和Ic-fos表达 杨 玲, 朱清静, 笪邦红, 张赤志

	<p>351 实验性肝硬化大鼠小肠血红素氧合酶的表达 田德安, 周晓黎</p> <p>355 胃黏膜保护剂预防幽门螺杆菌培养上清液所致小鼠胃黏膜损伤 崔梅花, 胡伏莲, 董欣红</p> <p>359 结肠充气CT对检测大肠肿瘤的敏感性和特异性 王毅, 龚水根, 张伟国, 陈金华, 张连阳, 陈金萍</p> <p>363 胃溃疡大鼠胃泌素、生长抑素和GD细胞的变化 孙凤莲, 宋于刚, 覃汉荣</p> <p>367 当归多糖对大鼠乙酸性结肠炎的保护作用 刘少平, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平, 吴东方</p> <p>371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响 周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球</p>
临床研究	<p>376 恶性腹水基质金属蛋白酶活性分析 孙晓敏, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平</p> <p>379 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与水通道蛋白4蛋白表达的关系 周正, 劳绍贤, 黄志新, 张向菊, 黄烈平, 匡忠生</p> <p>382 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞的变化 王静, 梁列新, 张志雄, 李国华, 钱伟, 侯晓华</p> <p>385 MRI评估肝硬化再生结节和退变结节 徐海波, 孔祥泉, 熊茵, 冯敢生</p>
焦点论坛	<p>390 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>391 乙型肝炎病毒DNA聚合酶末端蛋白研究进展 陈国凤, 成军, 张玲霞, 李莉</p> <p>393 乙型肝炎病毒DNA 多聚酶P结构域研究进展 陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉</p> <p>397 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子ATF-1的调节 王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕</p> <p>401 乙型和丙型肝炎病毒与胱冬肽酶3的关系 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花</p> <p>403 乙型和丙型肝炎病毒对转录因子Nur77的调节 成军</p> <p>406 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对层粘连蛋白表达的调节 王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花</p> <p>408 转录因子C/EBPb的生物学功能 成军</p> <p>412 活性氧簇与肝炎病毒的关系 梁耀东, 成军, 吴君, 程明亮</p> <p>414 趋化因子与病毒性肝炎的关系 陆荫英, 成军, 张玲霞</p> <p>417 病毒性肝炎发病机制中环氧合酶的作用 刘敏, 成军, 张树林</p>
文献综述	<p>420 乙型肝炎病毒DNA整合的机制及后果 成军</p> <p>428 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化 郑伟达, 王小众</p> <p>432 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病 贾林</p> <p>434 右叶部分肝移植临床解剖进展 刘静, 高毅, 钟世镇</p> <p>439 肝素酶: 抗肿瘤转移的新靶点 陈陵, 杨仕明, 房殿春, 王东旭</p> <p>443 肠道上皮特异性基因CDX2 宋艳, 李凌</p> <p>446 细胞凋亡与肝移植免疫耐受 刘静, 汪爽, 高毅, 孙尔维</p> <p>450 自身免疫性肝炎诊断与治疗 欧强, 谭德明</p> <p>454 VEGF在肝癌中作用 邓靖宇, 何生</p>
研究快报	<p>459 胰腺癌组织中COX-2和Bcl-2蛋白的表达及其意义 刘希双, 李玉军, 田宇彬, 张翠萍, 孙显路, 魏良洲, 薛会光, 刘思良</p> <p>461 3种富集胃癌患者外周血中胃癌细胞方法的比较 陈健, 郭俊明, 金之瑾, 肖丙秀</p> <p>464 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响 黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇</p> <p>467 MUC5AC蛋白在大肠肿瘤中的表达及意义 卜晓东, 李俐, 黄培林, 樊克武, 赵建华</p> <p>469 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>471 肛管直肠原发性恶性黑色素瘤临床病理特点 赵尔增, 张建中, 岳茂兴</p> <p>473 细胞周期蛋白D1 RT-PCR ELISA的建立及其初步应用 陈兵, 张雪, 府伟灵, 常杭花, 刘为纹, 徐采朴, 史景泉</p> <p>476 胃肠激素与不同类型反流所致食管炎的相关性 王雯, 李兆申, 许国铭, 张志坚, 林克荣</p> <p>477 尼美舒利对结肠癌细胞ICAM-1 mRNA表达的影响 刘伟, 张超</p>

临床经验

- 480 腹腔镜次/全结肠切除术治疗结肠慢传输性便秘4例 张连阳, 刘宝华, 陈金萍, 文亚洲
- 481 内镜下氩离子凝固术治疗胃肠息肉 毛振彪, 黄介飞, 陆静娴, 俞智华, 倪润洲
- 483 肝硬化门脉系统食管侧支血流动力学与血浆内皮素的关系 肖际东, 李瑞珍, 周平, 朱文晖
- 485 大黄与促肝细胞生长素联合治疗重型肝炎 黄以群, 林珍辉, 纪树梅, 王喻, 王崇国
- 487 5 km长跑对新兵胆囊排空及胃肠激素的影响 李小丽, 郝悦, 杨凤江, 邹勤, 李智力, 李晓春
- 488 药物性肝病41例 苏淑慧, 王春平, 李迎新, 冯永毅
- 490 数字化成像结肠双对比造影检查345例 何发清, 官泳松, 王小林, 郭兵文, 孙龙
- 492 胃十二指肠隐匿性穿孔的诊断与治疗4例 詹世林, 吴良平, 蒲森水
- 494 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达 孟华, 刘丽娜, 吕申
- 497 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析 周惠萌, 范欣敏
- 499 原发性胆汁性肝硬化37例临床分析 董正芳, 程留芳
- 501 射频消融联合局部热化疗治疗特殊部位肝脏恶性肿瘤 田伏洲, 陈涛, 蔡忠红, 陈琪
- 503 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒

封面故事

- 371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响
周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球 世界华人消化杂志 2004; 12(2): 371-375
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v12/i2/371.htm>

国际会议

- 13th United European Gastroenterology Week, UEGW
October 15-20, 2005
- American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting
October 28-November 2, 2005
- ISGCON 2005
November 11-15, 2005
isgcon2005@yahoo.co.in
www.isgcon2005.com
- Advanced Capsule Endoscopy Users Course
November 18-19, 2005
www.asge.org/education
- II Latvian Gastroenterology Congress
November 29, 2005
gec@stradini.lv
www.gastroenterologs.lv
- 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases
December 1-3, 2005
c.chase@imedex.com
www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm
- 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus
February 22-25, 2006
isde@sapmea.asn.au
www.isde.net

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(半月刊)

创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2004-02-15
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生

编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁

英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

2005年版版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年576.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型

温志立, 谭德明

温志立, 谭德明, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008
温志立, 男, 1972-06-16 生, 江西省吉安市人, 汉族. 2001 年湖南医科大学病原生物学硕士, 现为中南大学湘雅医院传染病学博士生. 主要从事病毒性肝炎的分子生物学研究.

项目负责人: 温志立, 410008, 湖南省长沙市湘雅路 141 号, 中南大学湘雅医院传染科. zhiliwen@sina.com
电话: 0731-4362611

收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2003-09-24

Detection for genotypes of hepatitis B virus in Hunan Province of China by nested PCR with multiplex pairs of primers

Zhi-Li Wen, De-Ming Tan

Zhi-Li Wen, De-Ming Tan, Department of Infectious Disease, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Correspondence to: Dr. Zhi-Li Wen, Department of Infectious Disease, Xiangya Hospital, 141 Xiangya Road, Changsha 410078, Hunan Province China. zhiliwen@sina.com

Received: 2003-08-08 Accepted: 2003-09-24

Abstract

AIM: To determine the genotypes of hepatitis B virus (HBV) in Hunan Province of China by nested PCR with multiplex pairs of genotype-specific primers.

METHODS: Ten outer and inner primers were designed on the basis of the conserved nature of nucleotide sequences in regions of the Pre-S1 through S genes, in which 8 inner primers were divided into mix A and B to amplify HBV of genotype A, B, C and D, E, F respectively. The two different products from one sample in second-round PCR were separately electrophoresed on a 3% agarose gel. Genotypes of HBV were determined directly by the size of PCR products. To test its reliability and veracity, we compared new nested PCR with popular PCR-RFLP, followed by repeated experiments. This nested PCR was also used in the genotyping of HBVs in 220 Hunan patients with chronic hepatitis B to know the distribution of HBV genotype in Hunan Province of China.

RESULTS: The results showed complete concordance between the two assays and 100% recurrence in the repeated experiments. Of the 220 Hunan patients, 190 (86.4%) were genotype B and 30 (13.6%) were genotype C.

CONCLUSION: This new nested PCR can help to determine HBV genotypes clearly and directly with reliable and accurate results. With the application of this new method, the predominant HBV genotypes in Hunan are confirmed to be genotypes B and C.

Wen ZL, Tan DM. Detection for genotypes of hepatitis B virus in Hunan Province of China by nested PCR with multiplex pairs of primers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):332-335

摘要

目的: 采用多对型特异性引物, 通过巢式 PCR 法检测湖南省乙肝患者血清中乙型肝炎病毒(HBV)基因型的分布情况.

方法: 根据从前 S1 基因到 S 基因中的保守序列设计出 10 条内外引物, 并将其中 8 条内引物分成 A、B 两组, 分别扩增 A、B、C 和 D、E、F 型 HBV, 然后将第 2 轮 PCR 的两组产物分别用 3% 琼脂糖进行电泳, 根据 PCR 产物片段大小直接判定 HBV 基因型. 与目前常用的 PCR-RFLP 法进行了比较, 并做重复试验以证实该方法的可靠性和准确性. 用此法检测了 220 例湖南籍慢性乙肝血清中的 HBV 基因型, 以了解湖南人群的 HBV 基因型分布情况.

结果: 多对型特异性引物巢式 PCR 与 PCR-RFLP 法的检测结果完全一致, 重现率(100%); 湖南人群 HBV 基因分型结果为 B 型 190 例(86.4%)、C 型 30 例(13.6%).

结论: 这种新的巢式 PCR 分型法能清晰直观地辨别 HBV 基因型, 结果准确可靠. 用此法证实了湖南人群的 HBV 优势基因型以 B 型为主, C 型次之.

温志立, 谭德明. 多对型特异性引物巢式 PCR 检测湖南省乙肝病毒基因型. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):332-335

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/332.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是引起慢性肝炎的最常见病毒之一,^[1-12] 目前全世界至少有 3.5 亿慢性乙肝患者^[13-16]. HBV 具有环状双链 DNA 结构, 3.2 kb 长的基因组中含有 4 个开放读码框架. 根据 HBV 基因序列的差异可将其分为 A-F 六种基因型. HBV 的基因型具有明显的地理分布特点, 如 A 型主要在北欧和非洲, B 型和 C 型主要在东亚, D 型在中东、北非和南欧, E 型在非洲, F 型仅在南美^[17]. 近年研究发现 HBV 基因型的类别与 HBV 传播方式、临床疾病谱、预后判断及抗病毒治疗的选择都有一定的相关性. 目前诊断 HBV 基因型的方法有全基因分析^[18] 或 S 基因测序法^[19]、聚合酶链反应(PCR)法^[20-21]、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法^[22-27]、微板核酸杂交 ELISA 法^[28-29] 等. 在大规模检测方面, PCR 因为具有简单快速的特点而使用普遍, 而巢式 PCR 使检测的特异性又进一步增高. 我们利用巢式 PCR 这一特性, 并采用多对型特异性引物同时进行扩增, 通过 PCR 产物片段的大小直接判定 HBV 基因型. 该法简捷快速, 准确性和特异性都很

高, 便于大批量标本的检测. 用此法检测了湖南省 HBV 基因型的分布情况, 结果如下.

1 材料和方法

1.1 材料 PCR 扩增仪(美国 SABC 公司); 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司, 型号 GS-15R); 稳压稳流电泳仪和紫外分析仪均为上海 Tanon 公司产品, 型号分别为 EPS-300 和 UV-2000; 血清 DNA 抽提所用试剂盒购自上海申友公司; dNTP、PCR 缓冲液、超纯型 Taq Plus 多聚酶、Marker(DGL2000)、琼脂糖均为北京鼎国公司

产品; 引物由上海申友公司合成; 限制性内切酶 *StyI* 和 *BsrI* 分别为日本 TaKaRa 公司和美国 MBI 公司产品; 所用水均为已灭菌的二次蒸馏水(DDW). 2002-06/2003-03 中南大学湘雅医院传染科门诊和住院部的湖南籍慢性乙肝血清, 经传染科检验室荧光 PCR 鉴定 HBV-DNA 为阳性者 220 例. 引物设计参照文献[30], 根据从前 S1 基因到 S 基因中的保守序列设计出 10 条引物(外引物 2 条, 内引物 8 条), 包含 6 种基因型在内. 每条内引物均具有型特异性, 同时还能使每种基因型最终 PCR 产物的片段大小各不相同, 以便通过琼脂糖电泳能辨别出来(表 1).

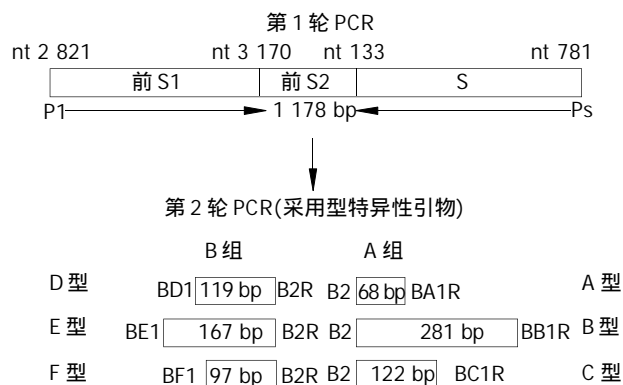
表 1 巢式 PCR 进行 HBV 基因分型所用引物的序列

引物	序列(位点, 特异性, 方向)
第 1 轮 PCR(外引物)	
P1-----	-5' -TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3'(nt 2821-2843, 通用, 正义)
Ps-----	-5' -AGA TGT TGT ACA GAC TTG G-3'(nt 763 - 781, 通用, 反义)
第 2 轮 PCR(内引物)	
A 组	
B2-----	-5' -GGC TCC AGT TCA GGA ACA GT-3'(nt 65-84, A-E 型特异, 正义)
BA1R-----	-5' -CTC GCG GAG ATT GAC GAG ATG T-3' (nt 111-132, A 型特异, 反义)
BB1R-----	-5' -CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-3'(nt 322-343, B 型特异, 反义)
BC1R-----	-5' -GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3'(nt163-184, C 型特异, 反义)
B 组	
BD1-----	-5' -GCC AAC AAG GTA GGA GCT-3'(nt 2977-2994, D 型特异, 正义)
BE1-----	-5' -CAC CAG AAA TCC AGA TTG GGA CCA-3'(nt2953-2976, E 型特异, 正义)
BF1-----	-5' -GCT ACG GTC CAG GGT TAC CA-3'(nt 3030-3049, F 型特异, 正义)
B2R-----	-5' -GGA GGC GGA TCT GCT GGC AA-3'(nt 3076-3095, D-F 型特异, 反义)

1.2 方法 血清 DNA 提取按照试剂盒说明书进行, 采用浓缩裂解法, 略改动, 即取浓缩液 50 μ L 到 0.5 mL 离心管中, 再加入待测血清 50 μ L, 振荡混匀后静置 2 min, 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清. 加入裂解液 10 μ L, 剧烈振荡至无沉淀后短暂离心, 沸水浴 10 min, 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 2 μ L 做多对型特异性引物巢式 PCR(图 1), PCR 按 Naito et al.^[30]方法进行, 稍作改动. 首先用一对外引物(P₁、Ps)进行第 1 轮 PCR, 在 0.5 mL 离心管中依次加入 P₁(50 pmol/ μ L)1 μ L、Ps(50 pmol/ μ L)1 μ L、dNTP(10mM) 1 μ L、Taq 聚合酶(2u/ μ L) 1 μ L、10 \times PCR 缓冲液(含 20 mM Mg²⁺) 5 μ L、血清 DNA 提取物 2 μ L, 加 DDW 至 50 μ L, 混匀后加 40 μ L 石蜡油覆盖液面. 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min. 然后分别以 A 组(B2、BA1R、BB1R、BC1R)和 B 组(B2R、BD1、BE1、BF1)为内引物进行第 2 轮 PCR, 分别检测 A-C 型和 D-F 型 HBV, PCR 反应体系中除引物外的其余成分同第 1 轮. 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 40 个循环后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min.

最后将两组 PCR 产物分别在 3% 琼脂糖中进行电泳, 同时加入低分子量 Marker, 通过产物片断的大小来判断基因型. 随机选取 30 份已用多对型特异性引物巢式 PCR 鉴定基因型的血清, 再用目前常用的 PCR-RFLP 法检测这些血清中 HBV 的基因型, 方法参照文献[26]. 由于我国的 HBV 基因型以 B、C、D 型为主, 故只选取其中检测 B-D 三型的方法进行检测. 用引物对 YS₁(nt205-223, 5' -GCG GGG TTT TTC TTG TTG A-3') 和 YS₂(nt769-789, 5' -GGG ACT CAA GAT GTT GTA CAG-3')扩增出 585 bp 大小的 S 基因片段, 限制性内切酶 *StyI* 和 *BsrI* 分别仅在 C 型第 456 位和 B 型第 329 位有酶切位点, S 基因片段分别被切成 252 bp, 333 bp 和 125 bp, 460 bp 两个片段, 可区别 B、C 两型. 用引物对 YP₁(nt 2 820-2 841, 5' -CAC CAT ATT CTT GGG AAC AAG A-3')及 YP₂(nt 3 024-3 042, 5' -GCC CGA ATG CTC CCA CTC C-3')扩增前 S1 基因片段, 非 D 基因型长度为 223 bp, D 基因型由于在 nt 2 852 后(即前 S1 起始密码子 ATG 之后)连续缺失 33 个碱基, 只有 190 bp 大小, 可以此鉴定 D 基因型. 随机选取 30 份已用多对型特异性引物巢式 PCR 鉴定过基因型的血清

样品,再次采用此种巢式PCR法进行检测,以了解该方法的重现性和准确性。



2 结果

通过两轮 PCR 进行扩增,能清晰直观地辨别出 HBV 的基因型(图2)。实验中还发现有些血清样品第一轮扩增为阴性,但在第2轮呈阳性,表明此种巢式PCR的特异性较高,可减少假阴性和假阳性的发生。已用多对型特异性引物巢式PCR法鉴定基因型的30份血清样品中,有5例PCR产物为阴性,无法进行分型,可能为样品中HBV浓度较低的原因所致,其余25例样品的分型结果与多对型特异性引物巢式PCR完全一致,相符率达100%(图3)。随机选取的30份血清样品经2次多对型特异性引物巢式PCR重复扩增,其结果均一致,重现率100%,表明该法准确性和可靠性较高。此次对220例湖南籍慢性乙肝患者进行HBV基因分型,结果为B型190例(86.4%),C型30例(13.6%),未检测到A、D、E、F型。结果提示湖南人群携带的乙肝病毒大多数为B型,少数为C型。

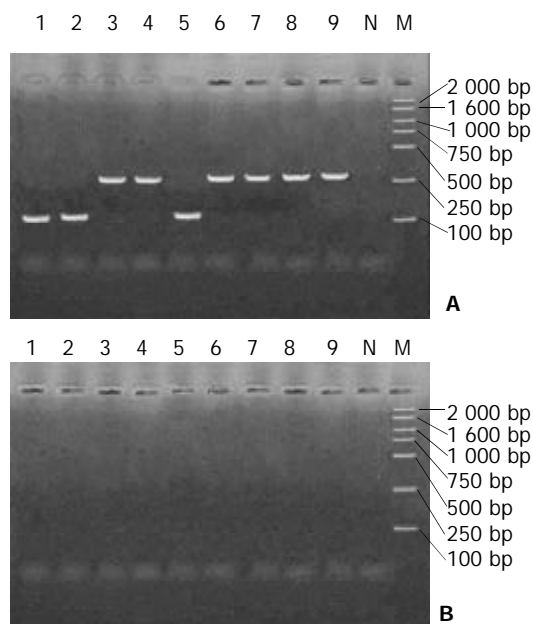


图2 多对型特异性引物巢式PCR分型结果。A: 组引物对, 1、2、5为C型, 3、4、6、7、8、9为B型, N为阴性对照, M为Marker; B: 组引物对, 1-9均为非D、E、F型, N为阴性对照, M为Marker。

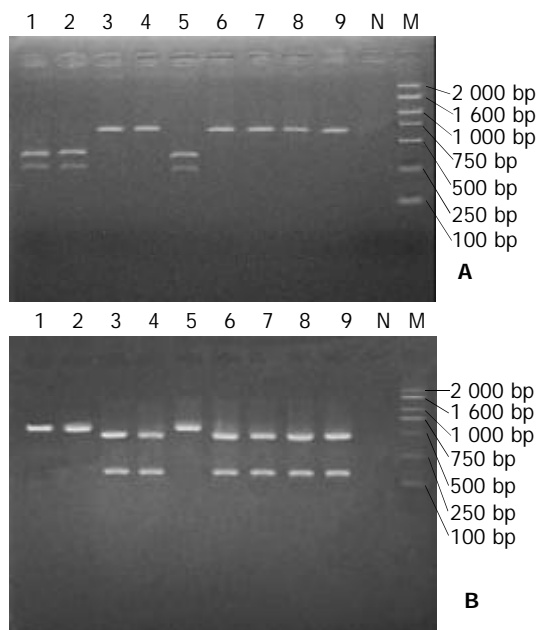


图3 PCR-RFLP分型结果。A: StyI 37℃酶切3 h后, 1、2、5为C型, 其余为非C型; N为阴性对照, M为Marker; B: BsrI 65℃酶切3 h后, 3、4、6、7、8、9为B型, 其余为非B型; N为阴性对照, M为Marker。

3 讨论

HBV基因型与乙肝的传播方式、临床疾病谱、预后判断及抗病毒治疗的选择都有一定的相关性,因此对HBV基因型的检测意义重大。目前现有的分型方法尚有一些不足之处,如测序法价格昂贵,需反复比较分析才能得出结论,无法进行大规模检测;一般的PCR或巢式PCR大多也是扩增后再测序,比直接测序法也只稍微节省成本,或用型特异性引物进行单引物对PCR,1份标本需做6次PCR才能鉴定基因型,试剂用量大,操作繁琐;微板核酸杂交ELISA法虽然特异性较高,但杂交后需复杂的显色步骤,杂交背景也很容易受各种因素的干扰。

我们采用多对型特异性引物,经两轮PCR分别扩增A-C和D-F型HBV,从PCR产物片段的大小即可直接判定HBV基因型,方法简便易行、特异性高。通过与PCR-RFLP法进行对比,显示两种方法分型结果完全一致,重复试验也表明该方法重现性良好,重现率达100%,表明这种型特异性引物对巢式PCR的分型结果准确、稳定、可靠。同时需要指出的是,PCR-RFLP法虽然由于限制型内切酶对酶切位点的严格选择性而有很好的特异性,但有少量样品由于HBV浓度较低等原因呈假阴性而导致无法分型,且由于酶切不完全等原因,可能会出现较复杂的带型,不利于结果判断,尤其当同一标本混有两种基因型时更无能为力,而且由于HBV基因变异的多样性和酶切位点单一性之间的矛盾,PCR-PFLP分型法不能鉴定100%的样品。本方法通过合理设计型特异性引物,理论上可鉴定100%的样品,且不需酶切步骤,因此本文认为此法优于PCR-RFLP法。采用此种多对型特异性引物巢式PCR法检测了220例湖南籍慢性乙肝患者的HBV基因

型, 发现 B 型 190 例(84.6%)、C 型 30 例(13.6%), 未检测到 A、D、E、F 型, 与文献[31]报道的 HBV 湖南优势基因型相同, 但与其 B 型 73.5%、C 型 26.5% 略有出入. 考虑到 HBV 基因型与临床表型有关, 可能为二者采集的标本结构组成不同所致, 有待进一步研究证实.

4 参考文献

- 1 阎全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰. 慢性乙型肝炎病毒清除自杀基因平衡制约载体系统的构建. 世界华人消化杂志 2003;11:1515-1519
- 2 余祖江, 杨东亮, 张俊, 郝友华, 王宝菊, 郝连杰. 乙型肝炎病毒 S 基因系列单突变克隆人工构建. 世界华人消化杂志 2003;11:1500-1504
- 3 王永刚, 王宇明. 肝移植后乙型肝炎病毒再感染相关因素的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1460-1464
- 4 代志琰, 徐启桓, 李刚, 马会慧, 汤正好, 舒欣, 姚集鲁. 肝癌患者乙型肝炎病毒 X 基因变异的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1349-1352
- 5 李永纲, 刘明旭, 王福生, 金磊, 洪卫国. 汉族人 IL-12b 和 IL-10 启动子区基因多态性与 HBV 感染的相关性. 世界华人消化杂志 2003;11:1139-1143
- 6 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林. 羧肽酶 N 调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1131-1134
- 7 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白与去唾液酸糖蛋白受体 2 突变体相互作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1126-1130
- 8 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识. 世界华人消化杂志 2003;11:1073-1080
- 9 周永兴. 隐匿性 HBV 感染是一个潜在的威胁. 世界华人消化杂志 2003;11:246-248
- 10 游晶, 庄林, 唐宝璋, 杨惠, 杨微波, 李武, 张宏丽, 张艳梅, 张禄, 严绍明. 干扰素联合胸腺肽治疗慢性乙型肝炎. 世界华人消化杂志 2001;9:388-391
- 11 陈雪娟, 李刚, 刘淑芳, 陈文思, 李桂侠. HBV 感染者 HBV DNA 与抗原抗体标志物的关系. 世界华人消化杂志 2003;11:870-871
- 12 段国荣, 聂青和, 周永兴, 王全楚, 田长印, 刘拉羊, 薛红安. 胸腺肽 alpha1 对慢性乙型肝炎患者免疫系统的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:701-704
- 13 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:1207-1209
- 14 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;118:554-559
- 15 Kao JH. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:643-650
- 16 Tsubota A, Arase Y, Ren F, Tanaka H, Ikeda K, Kumada H. Genotype may correlate with liver carcinogenesis and tumor characteristics in cirrhotic patients infected with hepatitis B virus subtype adw. *J Med Virol* 2001;65:257-265
- 17 Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus-large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997;175:1285-1293
- 18 Norder H, Hammas B, Lee SD, Bile K, Courouce AM, Mushahwar IK, Magnius LO. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* 1993;74(Pt 7):1341-1348
- 19 Borchani-Chabchoub I, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Genotyping of tunisian hepatitis B virus isolates based on the sequencing of preS2 and S regions. *Microbes Infect* 2000;2:607-612
- 20 杨洁, 骆抗先, 郭亚兵, 戴琳, 阎丽, 侯金林. 乙型肝炎病毒基因型(A-F)多引物 PCR 分型法的初步建立. 中华肝脏病杂志 2002;10:55-57
- 21 王永忠, 周国平, 李夏亭, 周志武, 周胜生, 阮雨花, 陈敏, 邓为群. 乙型肝炎病毒基因分型及临床应用研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:367-369
- 22 Lee CM, Chen CH, Lu SN, Tung HD, Chou WJ, Wang JH, Chen TM, Hung CH, Huang CC, Chen WJ. Prevalence and clinical implications of hepatitis B virus genotypes in southern Taiwan. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:95-101
- 23 Kato H, Ruzibakiev R, Yuldasheva N, Hegay T, Kurbanov F, Achundjanov B, Tuichiev L, Usuda S, Ueda R, Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes in Uzbekistan and validity of two different systems for genotyping. *J Med Virol* 2002;67:477-483
- 24 Li KS, Yamashiro T, Sumie A, Terao H, Mifune K, Nishizono A. Hepatitis B virus harboring nucleotide deletions in the core promoter region and genotype B correlate with low viral replication activity in anti-HBe positive carriers. *J Clin Virol* 2001;23:97-106
- 25 De Castro L, Araujo NM, Sabino RR, Alvarenga F, Yoshida CF, Gomes SA. Nosocomial spread of hepatitis B virus in two hemodialysis units, investigated by restriction fragment length polymorphism analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:531-537
- 26 阎丽, 侯金林, 郭亚兵, 王战会, 林裕龙, 骆抗先. 乙型肝炎病毒基因型 S 基因 PCR-RFLP 分型方法的建立. 中华传染病杂志 2001;19:224-228
- 27 丁红兵, 郭亚兵, 戴琳, 阎丽, 彭吉力, 周福元. RFLP 基因分型在动态监测乙型肝炎病毒基因变异中的应用. 第一军医大学学报 2001;21:81-84
- 28 王虹, 万成松, 王省良, 彭华国. 采用 PCR 微板核酸杂交 ELISA 技术进行 HBV DNA 基因分型的研究. 中华微生物学和免疫学杂志 2001;21:234-236
- 29 苏冬娜, 吴诗品, 石之磷. HBV 基因分型的检测及其意义. 临床荟萃 2002;17:1303-1304
- 30 Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001;39:362-364
- 31 刘映霞, 胡国龄, 谭德明. 湖南省乙肝病毒基因型分布及临床意义. 湖南医科大学学报 2002;27:29-31



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

