

中国庚型肝炎病毒 NS3 区部分基因的克隆 与基因特点的分析^①

(1996 年 4 月 17 日收到)

谭文杰 夏宁邵* 王海林 侯云德

曾定* 詹美云

(中国预防医学科学院病毒学研究所 北京 100052)

(*厦门大学生物系 厦门 361005)

摘 要

利用逆转录多聚酶链式反应(RT-PCR),从我国一输血后丙型肝炎病人血清中克隆到了庚型肝炎病毒 NS3 区的部分基因。经序列分析表明:我国庚型肝炎病毒 NS3 区与已知的 GBV-C 及 HGV 的核苷酸同源性在 81.7—88.0%之间,而氨基酸同源性均大于 96%,氨基酸序列与 HCV、GBV-A、BGV-B 具有一定的结构相似性及数个共有的保守位点。

关键词: 庚型肝炎病毒, cDNA 克隆, 序列分析

一、引 言

病毒性肝炎是危害人类健康的重要传染病之一,目前已确定的五型肝炎病毒(甲、乙、丙、丁、戊)的感染指标^[1],在约有 10—20%的病毒性肝炎检测中检测不到,故推测可能存在一种非甲-戊型(Non A-E)肝炎病毒因子,深入研究可能存在的非甲-戊型肝炎病毒因子是近年来国内外研究和关注的重点。

最近美国 Abbott 公司^[2,3]与 Genlabs 公司^[4]等研究单位相继宣布发现了与人类肝炎相关的两种新的黄病毒样病原因子,分别称之为 GBV-C 和 HGV。它们的基因序列分析结果显示:GBV-C 与 HGV 是不同于 HCV 的新病毒,尽管它们的基因特点与 HCV 很相近,皆为正链 RNA 病毒,长约 10Kb,编码一个约 2900 个氨基酸的多肽,且均可经血液传播,已发表的 GBV-C 与 HGV 两者间基因结构十分相似,同源性高达 85%,很可能属于同一种病毒或是同一病毒的不同基因型,故我们统称为庚型肝炎病毒(已型肝炎病毒是 Deka 等人^[5]发现的一种非甲非戊型肠道传播的肝炎病毒)。

为了解庚型肝炎病毒与我国非甲-戊型肝炎和输血后肝炎的关系及其基因特征,我们参照 Simons 等人发表的有关基因序列,针对 GBV-C 解旋酶(NS3)区的基因相对保守特点,设计了特异性的扩增引物,对采自于湖南、厦门、北京三地的 118 份肝炎病人血清进行逆转录套式聚合酶链反应(RT-Nest-PCR)筛选^[6],从其中一份湖南的输血后慢性丙型肝炎病人血清中克隆到一段 NS3 区的 dDNA,并对其进行序列测定分析,现将结果报道如下。

二、材料与方 法

1. 标本与试剂来源

(1) 标本:采自于湖南省娄底地区一位输血后慢性丙型肝炎病人血清,检测抗 HAV IgM 抗体、

① 863 计划资助项目

HBsAg、HBeAg、HBsAb、HBeAb、HBcAb、HDAb、HDAg、抗 HEV IgM 抗体、HBV-DNA (PCR) 均为阴性, 抗 HCV 抗体、HCV-RNA (RT-PCR) 均为阳性。

(2) 试剂: 异硫氰酸胍、Superscript II M μ LV、Taq DNA 聚合酶均为美国 BRL 公司产品; dNTP、RNasin、T4 DNA Ligase、PGEM-T 载体及内切酶购自于美国 Promega 公司; 其余化学试剂均为进口或国产分析纯。

2. 引物设计

参照 Simons 等发表的 8 株 GBV-C 的序列结果 (Genbank Accession: U25538-25545) 设计针对 NS3 的两对引物: 外侧引物 CF3: 5' GACGTTGGTGATCCCCT 3' (nt4238-4257), CR4: 5' CGAAGTTTCTGTGTACCC 3' (nt4487-4475), 扩增段为 236bp; 内侧引物 CF1: 5' GGATCCCCTT TATGGGCATGGC3' (nt 4248-4270), CR2: 5' ATGGGATCCCGGTAGATAGCGC 3' (nt 4444-4465), 扩增片段为 217bp。

3. RT-Nest-PCR^[6]

采用异硫氰酸胍一步法从 200 μ l 血清中提取 RNA, 溶于 10 μ l DEPC H₂O 中, 加随机引物在 20 μ l 体积中进行逆转录, 逆转录产物一半加外侧引物 CF3、CR4 用于第一次 PCR、反应条件为 94 $^{\circ}$ C 45 秒、52 $^{\circ}$ C 45 秒、72 $^{\circ}$ C 45 秒、35 个循环; 从第一次 PCR 产物取出 1 μ l 加内侧引物 CF1、CR2 用于第二次 PCR, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 40 秒、55 $^{\circ}$ C 40 秒、72 $^{\circ}$ C 40 秒, 30 个循环, PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

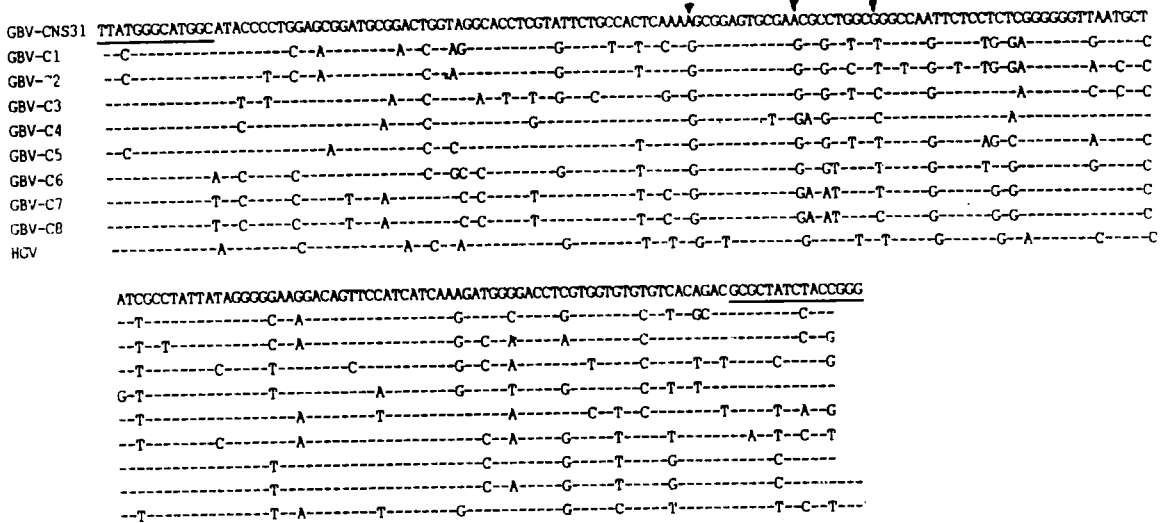


图 1 我国克隆的 GBV-C NS3 部分基因序列 (GBV-CNS31) 及与国外已知的 GBV-C (C1-8) 和 HGV 相应的基因序列比较 (划线部分为引物序列)

4. PCR 产物的克隆

用低熔点琼脂糖凝胶回收 PCR 产物连接于 PGEM-T 载体上, 转化已致敏的 JM101 宿主菌 37 $^{\circ}$ C 培养 8-10 小时, 挑单斑摇菌扩增, 碱法小提质粒用 NcoI 与 SalI 双酶切鉴定阳性克隆。

5. cDNA 克隆的测序

挑取 3 个独立的阳性克隆, 用碱裂解/聚乙二醇法提取质粒模板, 用 T7 与 SP6 引物从两侧进行荧光自动测序分析, 序列结果应用 DNA 分析软件包进行分析比较。

三、结 果

(1) 我国克隆的 GBV-C NS3 部分基因序列测定结果及与国外已知的 GBV-C 和 HGV 相对应的基因序列比较见图 1。将我国克隆的庚型肝炎病毒 NS3 的核苷酸序列命名为 GBV-CNS31. Seq, 如图 1 所示, 除去引物序列外已测定的 175 个核苷酸中, 与已知的 GBV-C 序列及 HGV 序列皆存在一定的基因异质性, 并存在 3 个独特的碱基, 即图中所示第 66 位 (G→A)、第 79 位 (G→A)、第 88 位 (T, C→G)。

(2) 由 GBV-CNS31. seq 推导的氨基酸序列结果及与国外已知的 GBV-C、HGV、GBV-A、GBV-B、HCV-1 (美国株)、HCV-CH (中国株) 相关氨基酸序列比较见图 2。将 GBV-NS31. seq 推导的氨基酸序列命名为 GBV-CNS31. ami, 如图 2 所示, GBV-NS3 区该区段氨基酸序列高度保守即 GBV-C 各株与 HGV 之间变异极少; 与 HCV-CH、GBV-A、HCV-1 及 GBV-B 氨基酸结构有一定相似性并存在数个共有的保守位点。

```

GBV-CNS31 GHG1PLERMRTGRHLVFCNSKAECERLAGQFSSRGVNAIAYYRGKSSIIK.DGDLVVCATDALST
GBV-C1      -----G-----A-----H-----
GBV-C2      -----A-----
GBV-C3      -----Q-----R-----
GBV-C4      -----V-----
GBV-C5      -----A-----
GBV-C6      -----
GBV-C7      -----A-----
GBV-C8      -----
HGV          -----A-----
GBV-A      CQFL--S-YA----L----V--T--SSALA-F---TVV-F---ETD..P..T-VC-----
HCV-CH     -KA--I-AI-G---I----KK-DE--AKL--L-L--V----L-V-V-PSS--V--V---M-
HCV-1      -KA---VIKG---I----KK-DE--AKLVAL-I--V----L-V-V-PTS--V--V---M-
GBV-B      -KK-KE-NLKK---I-EAT-KH-DE--NELARK-IT-VS---C-I-K-P.E--C--V---C-
    
```

图 2 由 GBV-CNS31. seq 推导的氨基酸序列及与国外已知的 GBV-C、HGV、GBV-A、GBV-B、HCV-1 (美国株)、HCV-CH (中国株) 相关氨基酸序列比较

(3) 我国 GBV-CNS31 区部分基因与已发表的 GBV-C 及 HGV 核苷酸和氨基酸相关序列的同源性比较见表 1。表 1 示出我国 GBV-CNS31 与已知的 GBV-C 各株及 HCV 核苷酸同源性在 81.7—88.0% 之间, 而氨基酸同源性均大于 96%。

表 1 我国 GBV-CNS31 区部分基因与已发表的 GBV-C 及 HGV 核苷酸和氨基酸相关序列的同源性比较

	核苷酸 (氨基酸) 同源性 (%)								
	GBV-C1	GBV-C2	GBV-C3	GBV-C4	GBV-C5	GBV-C6	GBV-C7	GBV-C8	HGV
GBV-NS31	81.7	82.1	82.1	88.0	86.9	84.6	84.6	85.1	85.1
	(96.0)	(98.5)	(97.0)	(98.5)	(98.5)	(100)	(98.5)	(100)	(98.5)

四、讨 论

现有资料表明^[3,7,8], GBV-C (或 HGV) 是一种世界范围的与人类肝炎相关的血液传播性病原, Abbott 公司与 Genlabs 公司等研究小组通过逆转录 Nest-PCR 在美国、日本、新西兰、欧洲和非洲等

地区不同来源的肝炎病人血清中检测到 GBV-C (HGV) -RNA。其中静脉药瘾者、多次输血史病人、非甲-戊型肝炎病人和慢性丙型肝炎中检出率较高,我们也首次在中国证实了庚型肝炎病毒的存在^[6],为探讨我国庚型肝炎病毒的基因特征,本文首次对我国分离的毒株 NS3 区部分序列进行了分析,结果表明,我国庚型肝炎病毒毒株在 NS3 区虽然核苷酸序列与已发表的毒株存在 12—19.3% 异质性,但氨基酸高度保守(同源性高于 96%),亦说明大部分核苷酸的变异发生在密码子的第三位上,为沉默突变(silent mutation)。此外,庚型肝炎病毒与其它黄病毒科的肝炎病毒相比,氨基酸结构有一定相似性并存在数个共有的保守位点,其中与 HCV-CH、GBV-A、HCV-1 的同源性(60%左右)高于 GBV-B (50%左右),说明庚型肝炎病毒与前者在进化关系上更为相近。

庚型肝炎病毒在丙型肝炎阳性人群中检出率较高^[3,8],我们所分离的该样品亦来源于一份输血后慢性丙型肝炎病人,庚型肝炎病毒与丙型肝炎病毒重叠感染在致病及感染慢性化中的协同作用有待深入研究。

致谢:感谢毕胜利副研究员对本研究的支持及丛旭同志在实验过程中提供的帮助。

参考文献:

- [1] Purcell RH. *PNAS USA*, 1994, 91:2401
- [2] Leary TP et al. *J Med Virol*, 1996, 48:60
- [3] Simons JN et al. *Nature Medicine*, 1995, 6:564
- [4] Linnen J et al. *Science*, 1996, 271:505
- [5] Deka N et al. *J Virol*, 1994, 68:7810
- [6] 王海林等. *病毒学报*, 1996, 12(2)
- [7] Moaven L et al. *Today's Life Science*, 1995, 11:24
- [8] Zuckerman AJ. *The Lancet*, 1995, 345:1453

Molecular Cloning and Structure Analysis in Non-structure III Region of Chinese Hepatitis G Virus Isolate

(received April 17, 1996)

Tan Wenjie, Xia Ningshao*, Wang Hailin, Hou Yunde, Zeng Ding*, Zhan Meiyun

(Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052)

(* Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract

The partial fragment of non-structural III region (NSS) cDNA of hepatitis G virus (HGV) is obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction from a patient with posttransfusion hepatitis C. Sequence analysis indicates that the fragment is 81.7%—88.0% identical at nucleotide level, but more than 96.0% identical at amino acid level with that of other known GBV-C and HGV isolates.

Key words: Hepatitis G virus, cDNA Cloning, Sequence analysis