

224-228

30/57(6)

第12卷第3期
1997年9月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 12 No. 3
Sep. 1997

庚型肝炎病毒 5'端非编码区 cDNA 的序列分析*

李刚 姚集鲁 陈青 彭文伟 汤文辉**

(中山医科大学传染病学教研室, 广州 510630)

A

摘要 为了解我国 GBV-C/HGV 株的基因序列与国外分离株的同源性状况, 对我国 GBV-C/HGV 的 5'端非编码区(5'NCR) cDNA 进行了序列测定。参考国外发表的序列资料, 在相对保守的 5'NCR 设计两对 HGV 特异性引物。采用热变性法提取云南省一个静脉吸毒者血浆中的 GBV-C/HGV RNA, 逆转录为 cDNA 后进行巢式聚合酶链反应(PCR)扩增, 获得 238 bp 的片段。PCR 产物纯化后直接经双脱氧链末端终止法测定核苷酸序列。与国外分离株比较, 同源率为 86.36%~90.91%, 部分区域变异较大。结果表明, 所扩增片段属于 GBV-C/HGV 基因, 所测序列可为引物设计提供依据, 对核酸变异性分析有一定意义。

关键词 庚型肝炎病毒, 聚合酶链反应, DNA 序列测定

5'端非编码区, cDNA,

感染, 序列分析

在临床上, 有相当一部分肝炎患者即使用敏感的检测方法, 甲乙丙丁戊五型肝炎病毒标记物始终阴性, 是否存在除外上述五型肝炎病毒的新型肝炎病毒, 是国内外研究和关注的热点^[1]。1995年末, Leary 等从西非一个不明原因肝炎病人血浆中鉴定了一种新的黄病毒样肝炎病毒, 因其基因组结构与新近发现的 GBV-A 及 GBV-B 类似, 称为 GBV-C^[2]。同一时期, 在不同研究机构的 Linnen 和 Kim 等在两个美国病人(PNF2161 和 R10291)血浆中鉴定了一种新的黄病毒样肝炎病毒, 他们暂将其命名为庚型肝炎病毒(HGV)^[3]。经分析 NS3 区 331 bp 序列后发现, GBV-C 与 HGV 核苷酸同源率为 85.5%, 氨基酸同源率为 100%, 根据种系发生分析方法, GBV-C 与 HGV 应属于同型肝炎病毒, 只是不同的变异株或亚型而已。本研究将 GBV-C 与 HGV 作为同一型肝炎病毒(庚型肝炎病毒, GBV-C/HGV)。该病毒基因组结构类似其他黄病毒, 为单股正义链 RNA, 全长约 9.4 kb, 分为 5'和 3'非编码区及中间的结构蛋白和非结构蛋白编码区, 编码约 3000 个氨基酸。GBV-C/HGV 在人群中的感染率及传播途径类似丙型肝炎病毒(HCV), 可致持续病毒血症, 大多数临床症状轻微。目前, 确定 GBV-C/HGV 感染的手段主要依靠逆转录聚合酶链反应(RT-PCR), 仍无检测抗体的 ELISA 试剂盒出售。本研究用 RT-PCR 对 GBV-C/HGV 5'NCR 基因进行扩增, 并测定了该扩增片段的核苷酸序列。

材料与方 法

1 血浆标本

来自云南昆明市某强制戒毒所一静脉吸毒者, 男性, 26 岁, 汉族, 抗 HCV(+), 抗 HBs(+), 吸毒期为半

收稿日期: 1996-10-03, 修回日期: 1996-11-27

* 国家自然科学基金资助项目(编号 39600130)

** 云南省昆明医学院附属一院传染科, 昆明 650031

年,有共用注射器史。血浆在1994年1月采集,-20℃以下保存。

2 主要试剂

RNasin, AMV 逆转录酶, Taq DNA 聚合酶, 123 bp DNA Marker, Wizard PCR preps DNA purification system (Promega), Sequencing kit (ABI)。

引物:根据 Genbank 中 GBV-C 序列(U36380)、HGV PNF2161 株序列(U44402)及 HGV R10291 株序列(U45966)设计。位置及序列如下:G1 5' ATGCGTGATGACAGGGTTGG 3' (+) (117~136,按 PNF2161 株位置,下同);G2 5' TAGGTGGCCCCATGCATTTCC 3' (-) (451~471);G3 5' GGTAGCCACTATAGGTGGGT 3' (+) (161~180);G4 5' CACTGGTCCTTGTCAACTCG 3' (-) (379~398)。G1, G2 为外引物, G3, G4 为内引物,位 5'NCR,巢式扩增后产物为 238 bp。

3 RT-PCR

采用热变性的方法制备 RNA 模板^[4],取待检血浆标本及阳性对照血浆标本各 100 μL,分别加入裂解液 10 μL (成份:0.5% 2-巯基乙醇,25 mmol/L MgCl₂),95℃ 15 min,10000 r/min 离心 5 min,取裂解上清 10 μL 进行逆转录,逆转录反应体积 20 μL,内含引物 G2 100 ng,AMV 逆转录酶 10 u,0.25 mmol/L dNTP 2 μL,RNasin 40 u,10×buffer 2 μL,42℃ 45 min。第一次 PCR 反应体积为 40 μL,含逆转录液 20 μL,引物 G1 100 ng,G2 50 ng,0.25 mmol/L dNTP 4 μL,10×buffer 4 μL,Taq DNA 聚合酶 2 u。在 94℃ 30 sec,55℃ 30 sec,72℃ 40 sec,循环 30 次,72℃ 延伸反应 7 min。第二次 PCR 反应体积为 50 μL,内含第一次 PCR 反应液 10 μL,引物 G3 100 ng,G4 100 ng,0.25 mmol/L dNTP 5 μL,10×buffer 5 μL,Taq DNA 聚合酶 2 单位,循环条件同第一次 PCR。取 10 μL 在含溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中电泳,与标准分子量作对照,在紫外灯下观察结果。

4 PCR 产物测序

取 PCR 产物 50 μL 按试剂盒所述方法纯化,然后与特异引物混合、变性、冷却,再与标记脱氧核苷酸混合进行双脱氧链末端终止反应,用 Taq DNA 聚合酶引导测序反应,具体方法按试剂盒说明。制备 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶,样品在 373A DNA 全自动测序仪(ABI)上电泳测定核苷酸序列,同一片段经正反两方向测定。所测序列与国外已知分离株(来自 Genbank)进行同源性分析。

结 果

1 PCR 产物的获取

GBV-C/HGV RNA 经热变性后释放到裂解上清液中,GBV-C/HGV 特异负链外引物(G2)引导逆转录反应,合成 cDNA,第一次 PCR 用外引物 G1、G2 扩增,第二次 PCR 用内引物 G3、G4 扩增,巢式扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下溴化乙锭染色可见单一条带,与标准分子量作对照,其大小与预期的 238 bp 相符(见图 1)。

2 GBV-C/HGV 中国株(HGV-CN)及其比较

HGV-CN 5' NCR cDNA 核苷酸序列及其与国外已知分离株的比较,见图 2;同源性分析,见表 1。

表 1 HGV-CN 5'NCR cDNA 序列与国外分离株的同源性分析(%)

Table 1 Analysis of 5'NCR cDNA sequence homology between HGV-CN and several previously reported isolates

	PNF2161	R10291	GBV-C
HGV-CN	90.91	89.90	86.36



图1 GBV-C/HGV 经 RT-PCR 获得的产物

1. 从吸毒者标本中扩增的片段
2. 123 bp DNA 分子量标准

Fig. 1 Product of GBV-C/HGV by RT-PCR

1. Amplified fragment from the plasma of a drug user
2. 123 bp DNA ladder

```

HGV-CN      gctagccactatagstgggt CTTAAGGGTT GGTCAGGTT CCTCTGGCGC 210
PNF2161     .....A.AA ...T...A.. .....T.T..
R10291     .....A.AA ...T...A.. .....T.T..
GBV-C       .....GA ..CT.C...C .....T....

TTGTGGCGAG AAAGCGCAGG GTCCACAGGT GTTGGCCCTA CCGGTGTGAA TAAGGGCCCG 270
C..C..... .CC..... .....G... .....
C..C..... .CC..... .....G... .....
A.A...A.GA .....T.... .....A....

ACGTCAGGCT OGTOGTTAAA CCGAGCCCAT TACCACTG GGCAAAGAC GOCATGTAC 330
.....G..... .....C....
.....G. A...G.... .....C....
G..CT...A ..C..... .....G. ...T.C.... .....C....

GGTCCAGTC GOCCTACTAT GTCTCTCTG ACCAATAGGC TTIGCCGG gctcaactgttctctgtcac 398
.....T.A.. .....G.A.....
.....T.A.. ...G..... ..A.....
.....T.A.. .....G.A ...
    
```

图2 HGV-CN(中国株)5'NCR cDNA 序列与国外分离株(PNF2161, R10291, GBV-C)相应序列的比较。小写为引物序列。圆点表示与 HGV-CN 序列相同。

Fig. 2 Comparison of 5'NCR cDNA sequence of HGV-CN with corresponding sequences from previously reported isolates (PNF2161, R10291, GBV-C). Small letters stood for the sequences of primers. Dots indicated identity with sequence of HGV-CN.

讨 论

GBV-C/HGV 是最近一年来经反向病毒学方法鉴定的肠道外传播非甲乙丙丁戊型肝炎的病原之一。目前对其特性、形态、致病等仍不清楚,已知其基因组结构类似黄病毒属,如丙型肝炎病毒(HCV)、登革病毒、乙型脑炎病毒等,但与 HCV 的同源性小于 30%,从而排除 GBV-C/HGV 是 HCV 的变异株、缺陷病毒或新的基因型,证明是一种独立的病毒,可能与 HCV 呈平行关系。目前已报道的 GBV-C 及两株 HGV(PNF2161 和 R10291)在核苷酸及氨基酸水平有高度同源性,超过 85%^[2,3]。由于是不同机构的研究结果,其命名有待进一步确定,暂将他们称为 GBV-C/HGV。

GBV-C/HGV 在血液中滴度很低,其基因组必须经过 PCR 扩增后才能检测到。目前确立 GBV-C/HGV 感染的唯一手段是 RT-PCR,检测抗体的 ELISA 法尚不成熟^[5]。GBV-C/HGV 和 HCV 具有共同的危险因素,输血和不洁注射是重要的传播途径,容易出现两种病毒双重感染。据报道,超过 10% 的 HCV 感染者可检测到 GBV-C/HGV,静脉吸毒者是两种病毒感染的高危人群。

我们从云南省一个静脉吸毒者血浆中扩增 GBV-C/HGV5'NCR 基因,获得 238 bp 的片段,测定其核苷酸序列,将所测序列与国外已知分离株相应序列比较后发现,与 GBV-C 同源率为 86.36%,与 HGV PNF 2161 株及 R10291 株的同源性分别为 90.91% 和 89.90%,与 GBV-C 的同源性相对较小。根据种系发生分析法,所扩增的片段来自 GBV-C/HGV,证明我国的静脉吸毒者存在 GBV-C/HGV 感染。与其他株比较,GBV-C/HGV 中国株(HGV-CN)较大变异区位于第 187~223 位核苷酸(按 PNF2161 株位置),其他区段属高度保守区,只有散在的碱基变异。

在黄病毒属中,5'NCR 含有内部核糖体结合位点,对病毒核酸的转录和翻译起重要作用。同时由于其保守性,设计 PCR 引物时多选择此区段,可提高检测的敏感性,本研究测定的 GBV-C/HGV5'NCR 序列可为设计适合我国 GBV-C/HGV 株检测的引物提供依据。

参 考 文 献

- 1 Yoshida M, Okamoto H, Mishiro S. Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fluminant hepatitis of unknown aetiology. *The Lancet*, 1995, 346:1131~32
- 2 Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN *et al*. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the Flaviviridae associated with human non A-E hepatitis. *J Med Virol*, 1995, 48:60~67
- 3 Linen J, Wages J, Zhang-keck ZY *et al*. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus; a transfusion-transmissible agent. *Science*, 1996, 271:505~508
- 4 高志良,姚集鲁.热变性 HCV RNA 模板直接法扩增. *中山医科大学学报*, 1994, 15(3):68
- 5 Schlauder GG, Dawson GJ, Simmons JN *et al*. Molecular and serologic analysis in the transmission of the GB hepatitis agents. *J Med Virol*, 1995, 46:81~90

Sequence Analysis of GBV - C/HGV 5' Non - coding Region cDNA

Li Gang Yao Jilu Chen Qing *et al*

(*Department of Infectious Diseases, Sun Yat - sen
University of Medical Sciences, Guangzhou 510630*)

The cDNA sequence of 5' non - coding region (5'NCR) of GBV - C/HGV strain from China was determined. According to the previously reported sequences of HGV, two pairs of primers specific for HGV from relatively conserved region in the 5' NCR was designed. GBV - C/HGV RNA derived from the plasma of a intravenous drug user in Kunming district (Yunnan Province, China) was extracted using the heat denaturation method and was subsequently converted to cDNA by reverse transcription before nested RCR. The amplified product with 238 bp was purified and then directly sequenced by dideoxy nucleotide chain termination method. A comparison of the nucleotide sequence of GBV - C/HGV from China with that of several previously reported isolates from abroad showed the homology to be 86.36% ~ 90.91% and a divergent region. The results demonstrated that the amplified fragment was derived from the genome of GBV - C/HGV. The sequence of the GBV - C/HGV 5' NCR determined here was useful for the selection of primers and for the variation analysis of GBV - C/HGV gene.

Key words Hepatitis G virus, Polymerase chain reaction, DNA sequence determination