

## 从重症肝炎病人血清分离的丁型肝炎病毒核酶区的克隆与序列分析\*

李如琳<sup>1</sup> 王海涛<sup>2</sup> 万泽生<sup>3</sup> 徐德忠<sup>1</sup> R373.21

<sup>1</sup>(第四军医大学流行病学教研室, 西安 710032)

<sup>2</sup>(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

<sup>3</sup>(第三军医大学微生物教研室, 重庆 630038)

R512.602

**A 摘要** 从我国一例四川丁型肝炎病毒 HDV RNA, 丁型肝炎抗原均阳性的重症肝炎患者的血清中, 用异硫氰酸胍法提取 RNA, 经过逆转录 PCR 扩增后获得一长 289 bp 的 HDV cDNA 片段, 将 PCR 产物回收后直接克隆到 PCR<sup>TM</sup> II 质粒, 挑出阳性克隆并亚克隆入 M<sub>13mp19</sub> 的 EcoR I 位点, 提取单链进行序列分析, 结果显示与已知的中国河南、美国、日本、秘鲁和中国台湾 5 株 HDV cDNA 相同片段比较, 同源性分别为 97.2%、93%、94%、79%、96%。

**关键词** 丁型肝炎病毒, 逆转录聚合酶链反应, 核酶, 核苷酸序列分析

核酶区, 克隆, 重症肝炎

丁型肝炎病毒为一单股负链环状的 RNA 病毒, 长约 1.7 kb 左右<sup>[1-6]</sup>, 基因组结构与类病毒、拟病毒有许多相似之处, 丁肝感染常与乙型肝炎病毒重叠感染 (superinfection) 或共同感染 (coinfection), 并与暴发性肝炎、重症肝炎及肝硬化密切相关<sup>[7-10]</sup>。另一方面对 HDV RNA 的一些特殊功能, 如核酶 (Ribozyme), 编辑 (Editing) 的研究, 不仅有助于全面理解 HDV 的复制机制, 而且为人工设计核酶来预防、治疗 HDV 及其它致病因子的感染提供了某些可能的线索。我们用 RT-PCR 法从一重症肝炎病人血清中克隆了 HDV RNA 核酶区基因, 并进行了序列分析。

### 材料和方法

- 1 标本来源** 一男性病人, 58 岁, 诊断为慢性重症肝炎, HBsAg(+), HBeAg(+), HBcAg, HDAg(+), 抗-HDIgM(+), 抗-HAVIgM(+), HDVRNA(+).
- 2 主要试剂** 逆转录酶 AMV, RNasin, 各种内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司, Taq 酶及其 Buffer 购自京海公司, X-Gal, IPTG 购自 Promega 公司, 载体 PCR<sup>TM</sup> II 及 M<sub>13mp19</sub> 分别购自 Invitrogen 公司及华美生物公司, DNA 测序试剂盒购自 USB 公司。
- 3 引物** 抗基因组序列为 5'-ACTCACAGGTTTGGCTCTCGCGTC-3' (941 nt-918 nt), 基因组序列为 5'-ACTCTGCAGGGTCCGCGTTCCA-3' (651 nt-672 nt), 由中国预防医学科学院病毒学研究所肝炎室詹美云、刘善虑研究员惠赠。

收稿日期: 1996-10-27, 修回日期: 1997-03-10

\* 此工作在军事医学科学院微生物流行病学所完成

4 HDV RNA 提取、逆转录和 PCR 扩增 取 HDAg、HDV DNA 均阳性血清 200  $\mu$ L 参照文献<sup>[11]</sup>的方法,提取 HDV RNA,随后加入随机引物,在 10  $\mu$ L 反应体积中(含 5 x RT buffer 4  $\mu$ L, RNasin 40 u, 10mmol/L dNTP 2  $\mu$ L, Random Primer 2  $\mu$ L, Superscript II 10 u)50  $^{\circ}$ C 1 h,取 10  $\mu$ L 逆转录产物,在 50  $\mu$ L 反应体积中(含 10X PCR buffer 5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 引物各为 1  $\mu$ L),94  $^{\circ}$ C 1 min,55  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 1 min 30 sec,40 循环,第一轮循环前预变性 7 min,循环结束时,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

5 PCR 产物的克隆 PCR 产物用电泳洗脱法回收后,直接与 PCR<sup>TM</sup> II 载体进行连接,连接体积为 10  $\mu$ L,取 1  $\mu$ L 转化 INV $\alpha$ F' 感受态细胞,利用 X-Gal, IPTG 挑选白色菌落,碱裂解法提取质粒,用 EcoR I 进行酶切鉴定,挑出阳性克隆。

6 核苷酸序列分析 大量提取阳性克隆的质粒后用 EcoR I 切下的插入片段插入 M<sub>13mp19</sub> 的 EcoR I 位点,挑选白色噬斑,提取单链,采取双脱氧链终止法测序。

## 结 果

### 1 PCR 产物及阳性克隆的鉴定

从 PCR 产物 50  $\mu$ L 中取 5  $\mu$ L 在 1% 的琼脂糖凝胶电泳,可见一条约 290 bp 的 DNA 条带。从 20 个白色菌落中提取质粒做 EcoR I 酶切鉴定,获得 8 个阳性克隆,随后经 PCR 进行验证,均含有插入片段。

### 2 HDV cDNA(651 nt - 941 nt)片段序列与已知 5 株 HDV 序列比较

如图 1 所示,根据所测得的结果,HDVcDNA(651 nt - 941 nt)与河南株、台湾株、美国株、日本株、秘鲁株的同源性分别为 97.2%、96%、93%、94%、79%。可以看出,四川重症肝炎与除秘鲁株以外的其他四株的同源性相当高,其中与河南株的同源性为最高。与其他株相比,只是在第 686 位、695 位碱基发生了突变,分别由 G $\rightarrow$ A,由 C $\rightarrow$ T。在 804 位、850 位和 853 位发生了缺失,而 842 和 843 位的 CG $\rightarrow$ GC。其中还含有基因组 RNA 和反基因组 RNA 的自我剪切位点。

## 讨 论

丁型肝炎病毒 RNA 中 GC 含量高达 60%,形成非常复杂的二级结构。尤其是核酶区的二级结构则更为复杂。我们采用在较高温度下能发挥反转录作用且无 RNA 酶 H 活性的反转录酶 Superscript II,能在 RNA 分子空间结构充分打开的情况下进行反转录,就可以获得足够长的 cDNA。这样就可扩出完整的核酶区 cDNA。同时,从以上序列可知,丁型肝炎病毒核酶区的序列相当保守,除秘鲁株外,四川重症株与其他几株的同源性均在 90% 以上,也与其所具有的生物学功能相适应,其基因组的自我剪切活性不仅是结构依赖性的,而且与其一级结构也有很大的关系。流行病学调查已经显示,重症乙肝或暴发型乙肝与丁型肝炎病毒的重叠感染有一定的关系<sup>[10]</sup>,发现重型肝炎组抗-HDAg IgM 检出率明显高于急性乙肝组(27.8%比 5.3%, $P < 0.05$ ),提示 HDV 感染是重型肝炎中重要的病原学因素之一。我们试图从丁型肝炎病毒的核苷酸水平上探讨导致肝炎重症化的原因。值得注意的是,其发生在第 842 位和 843 位的 CG $\rightarrow$ GC 的突变,也同样发生在从一重症肝炎患者血清中克隆到的秘鲁-1 株<sup>[12]</sup>的序列中,这是偶然的巧合,还是由于此位点的突变导致了病毒株致病性的改变,从而引发了肝炎的重症化,还有待进行更多的重症肝炎病毒株的序列分析。

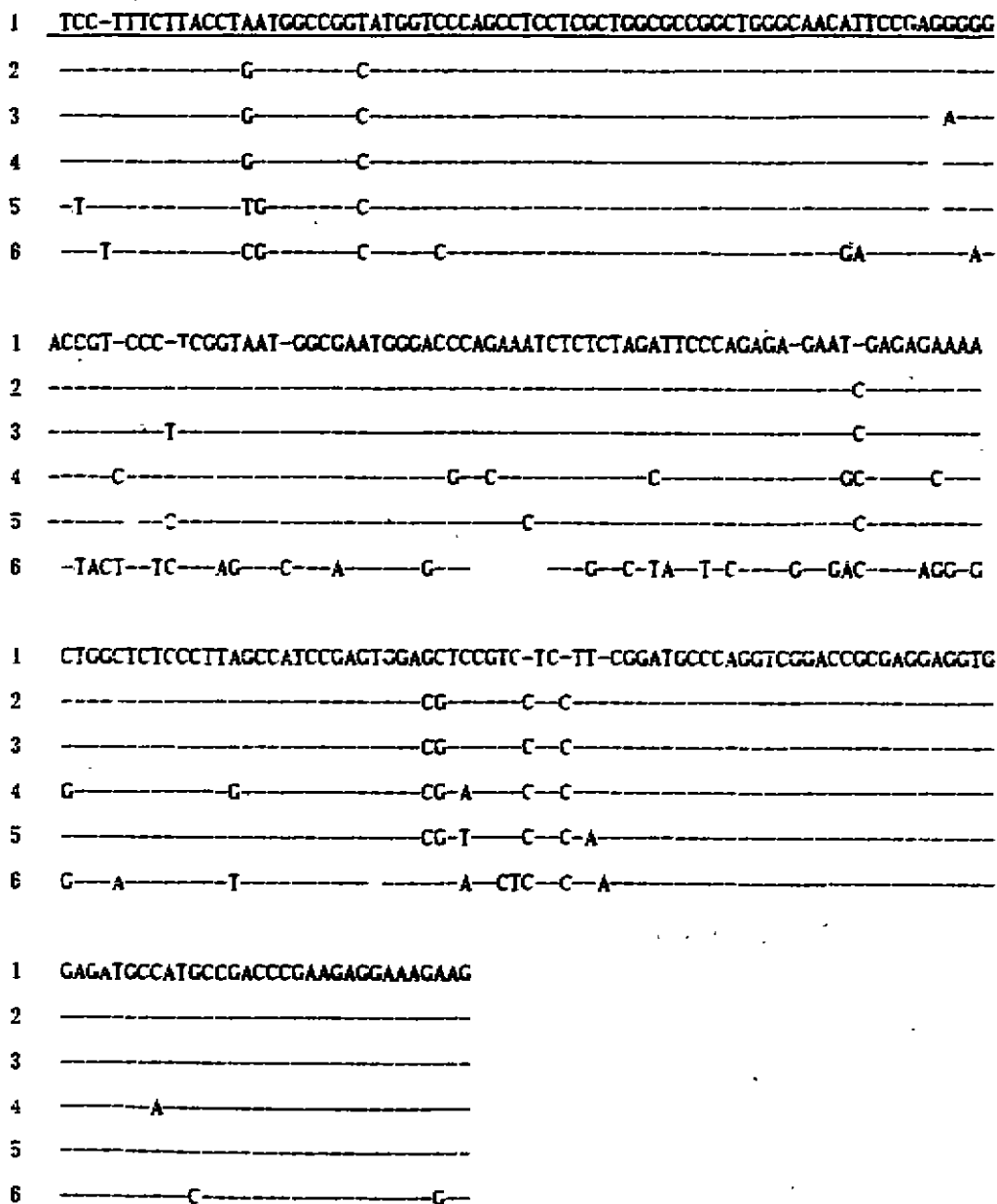


图1 四川重症肝炎 HDV 株核酶区 cDNA(651 nt-941 nt)序列与已知 5 株 HDVcDNA 相同片段的同源性比较

Fig1 Comparison of homology between the sequence of ribozyme region (651 nt-941 nt) of Sichuan HDV isolate and the sequences of other five known isolates

- 1:四川株 2:河南株 3:台湾株 4:美国-1株 5:日本-1株 6:秘鲁-1株  
 1:Sichuan strain 2:Henan strain 3:Taiwan strain  
 4:US-1 strain 5:Japan-1 strain 6:Peru-1 strain

## 参 考 文 献

- 1 Wang K-S, Choo Q-L, Weiner AJ *et al.* Structure, sequence and expression of the hepatitis delta viral genome. *Nature*, 1986, 323:508-513
- 2 Mahim S, Chang M-F, Shieh C-K *et al.* Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta virus RNA. *Nature*, 1987, 329:343-346
- 3 Kuo M Y, P. Sharmeen L, Dinter-Gottlieb *et al.* Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver; sequence, structure and applications. *Journal of Virology*, 1988, 62, 1855-1861
- 4 Chao Y C, Lee C M, Tang H S *et al.* Molecular cloning and characterization of hepatitis delta virus from Taiwan. *Hepatology*, 1991, 2:345-352
- 5 Seldanaba J A, Thomas H C, Moniardino J P *et al.* Cloning and Sequencing of hepatitis delta virus isolated from human serum. *Journal of General Virology*, 1990, 71:1603-1606
- 6 Lee C M, Bith F Y, Chao Y C. *et al.* Evolution of hepatitis delta virus RNA during chronic infection. *Virology*, 1992, 188: 265-273
- 7 Singer HL, Klotz G, Riesner D *et al.* Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73:3852-3856
- 8 Rizzetto M. The delta agent. *Hepatology*, 1983, 3:729-737
- 9 Rizzetto M, Hoyer B, Canese M G *et al.* Delta agent: Association of delta antigen with hepatitis B surface antigen. *J Virol*, 1993, 67:2672-2680
- 10 黄德庄, 王全源, 贺丽香等. 重型病毒性肝炎中丁型肝炎病毒的检测. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1994, 8(4):336-339
- 11 Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162:156-159
- 12 Casey J A, Thomas L Brown, Ernesto J Colan *et al.* A genotype of hepatitis delta virus that occurs in Northern South America. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:9016-9020

## Molecular Cloning and Sequencing of Ribozyme Region of HDV from a Serious Hepatitis Patient

Li Lulin    Wang Haitao    Wan Zesheng    Xu Dezhong

<sup>1</sup>(Department of Epidemiology, The 4th Military Medical University, Xi'an 710032)

<sup>2</sup>(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071)

<sup>3</sup>(The 3rd Military Medical University, Chongqing 630038)

The cDNA (651nt-941nt) fragment of an isolate of hepatitis delta virus with 289 bp was determined by cloning and sequencing, from a HBsAg carrier positive both for anti-HDAg and HDV RNA from China, Sichuan Province, using reverse transcription polymerase chain reaction. It contains the region of HDV ribozyme and its self-cleavage site. Comparing this Sichuan isolate with other known HDV isolates from Henan, US-1, Japan, Peru and Taiwan, the result showed that the homology of nucleotides is 97.2%, 93%, 94%, 79%, 96%, respectively.

**Key words** Hepatitis Delta Virus, RT-PCR, Ribozyme, Sequencing