

182-184

第13卷第2期
1998年6月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol.13 No.2
Jun 1998

一株丙型肝炎病毒缺陷株 NS5A 基因片段的序列分析

朱分禄¹ 逄好英² 孟庆华³ 戚中田¹ R373.21¹(第二军医大学微生物学教研室,上海 200433)²(军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850)³(北京佑安医院,北京 100054)**关键词** 丙型肝炎病毒,缺陷株,序列分析

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)引起的一种严重的传染病。丙型肝炎病毒主要通过输血和应用不洁的血液制品传播,所以利用敏感、特异的检测方法筛选献血员对丙型肝炎的预防尤为重要。现在第二代HCV检测试剂已大批应用,加入NSSA抗原的第三代试剂也正在研制中。在克隆与表达NS5A基因片段时,我们发现有一分离株的核苷酸序列中一个三连体密码突变为终止密码。现将有关结果报告如下:

材料与amp;方法

1 血清标本

4份阳性血清来自河北固安县,经Abbott第二代HCV试剂检测抗HCV抗体强阳性,用HCV 5'非编码区引物扩增证明为HCV RNA阳性。

2 引物合成

依据HCV-BK^[1]序列,经计算机分析NSS蛋白的抗原表位,设计了扩增NSSA基因片段的巢式引物。

外引物:F1 5'-GGGTGCAGGCCTCCTCTACG-3'

R1 5'-TGTTGTAGGCATAAACCATGT-3'

内引物:F2 5'-GGAATTCCGTACCTGGTTGGTCAACAG-3'

R2 5'-GCTCTAGACGCCTCCGCAGCCATGG-3'

在内引物的5'端分别加上EcoRI和XbaI酶切位点以利于克隆。

3 RNA模板的提取

HCV RNA的提取采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法^[2]

4 PCR反应

参阅文献[3][4],采用逆转录巢式PCR法,反应产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳分析。

5 cDNA片段的克隆及序列分析

将扩增得到的cDNA片段克隆至M13 mp18/19中,分别从正反两个方向进行序列测定。RF型M13 mp18/19、工具酶等购自华美生物工程公司,WizardTM M13 DNA Purification System购自Promega公司。序列

收稿日期:1997-09-08,修回日期:1997-11-04

测定采用 Taq DNA 聚合酶及荧光标记的通用引物,利用 ABI370A 全自动序列分析仪及配套试剂进行。

6 核苷酸及氨基酸序列比较

将 cDNA 片段的序列与已知的部分 HCV 序列进行同源性分析,分析软件为军事医学科学院基础所的 Goldkey 软件。

结果与讨论

采用逆转录巢式 PCR 法,从两份血清中扩增出预期大小的基因片段(图 1)。取其中一份 cDNA 片段克隆至 RF 型 M13 中,利用全自动序列分析仪,从正反两个方向测定基因片段的核苷酸序列。结果显示基因片段长 868 bp, G+C 含量为 60%,推测氨基酸 287 个,在 411 位核苷酸处出现一个 G→A 突变,使三联体密码 TGG 变为 TGA 终止密码(图 2),经与原依据序列

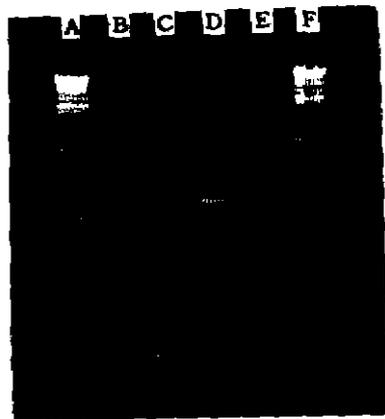
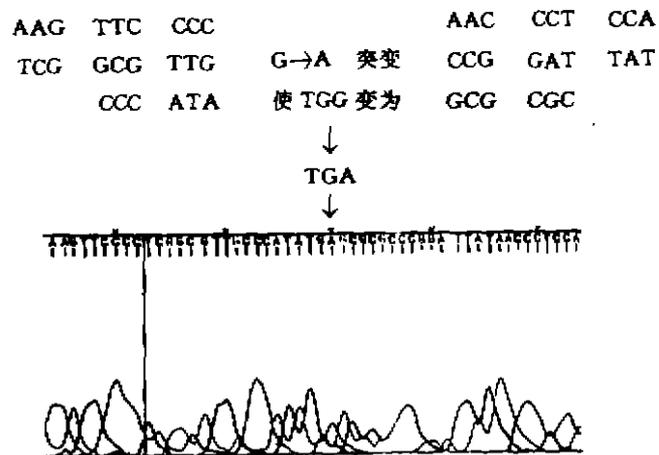


图 1 RT-PCR 扩增的 HCV NS5A 基因片段的电泳分析

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of HCV NS5A gene fragment amplified by RT-PCR



注: 箭头所指为突变的核苷酸

图 2 突变位点部分的序列分析

Fig 2 Sequencing of the mutation site of the NS5A fragment

比较,证实为 HCV NS5A 基因片段。将本研究克隆的 NS5A 基因片段与 HCV I、II 型代表株 HCV 1^[5]、HCV-BK、中国台湾株 HCV-TW^[6]和中国河北株 HCV-CH^[7]等相应部分序列进行核苷酸及氨基酸同源性分析(NS5A 基因片段与 III、IV 型代表序列的同源性很低,几乎不能进行比较分析),结果表明,与 I 型 HCV 1 的核苷酸同源性为 71.8%,氨基酸同源性为 80.5%;与 II 型代表株 HCV-BK、HCV-TW 和 HCV-CH 的核苷酸同源性为 90.6%~92.5%,氨基酸同源性为 91.2%~94.6%,因此本研究中的 HCV 分离株应为 HCV-II 型。

克隆的 NS5A 基因片段中第 411 位核苷酸突变,产生一个阅读框架内终止密码。类似的现象已有资料报道, Martell^[8]等发现 20 个 HCV 克隆株中有两株于 NS3 区出现终止密码。Higashi 等^[9]也于 HCV E2/NS1 区内发现阅读框架内终止密码并提出“类似株”(Quasispecies)的概念。认为由于 HCV RNA 的高度变异,血液循环中的病毒颗粒除一半相同外,其余 50%

为相差1~4个核苷酸的类似株,这些类似株中包括了含有框架内终止密码的缺陷性病毒。此类缺陷性病毒细胞毒性较低,大量出现很可能是丙型肝炎病毒持续性感染的原因之一。

参 考 文 献

- 1 Takamizawa A, Mori C, Fuke I *et al*. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol*, 1991, 65: 1105 ~ 1113
- 2 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156 ~ 159
- 3 Wideff A, Mansson AS, Sundström G *et al*. Hepatitis C virus RNA in blood donor sera detected by the polymerase chain reaction; comparison with supplementary hepatitis C virus antibody assays. *J Med Virol*, 1991, 35: 253 ~ 258
- 4 Cristiano K, Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH *et al*. Hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic non-A, non-B hepatitis; detection by the polymerase chain reaction using multiple primer sets. *Hepatology*, 1991, 14: 51 ~ 55
- 5 Choo QL, Richman KH, Han JH *et al*. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 2451 ~ 2455
- 6 Chen P-J, Jan MH, Tai KF *et al*. The Taiwanese hepatitis C virus genome: sequences determination and mapping the 5' termini of viral genomic and antigenomic RNA. *Virology*, 1992, 188: 102 ~ 113
- 7 毕胜利, 白宪鹤, 从勉尔等. 中国人丙型肝炎病毒基因组的一级结构及其变异. *病毒学报*, 1993, 9: 114 ~ 127
- 8 Martell M, Esteban JI, Quer J *et al*. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol*, 1992, 66: 3225 ~ 3229
- 9 Higashi Y, Kakumu S, Yoshioka K *et al*. Dynamics of genome change in the E2/NS1 region of hepatitis C virus *in vivo*. *Virology*, 1993, 197: 659 ~ 668

Sequencing of a cDNA Fragment of NS5A Region of the Defective Hepatitis C Virus

Zhu Fenlu Lu Haoying Meng Qinghua *et al*

(Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract Sensitive and specific anti-HCV diagnostic kits are very important for preventing of the transmission of hepatitis C virus. Adding HCV NS5A antigen in diagnostic kits may increase the sensitivity of diagnostic reagents. The result of sequencing of NS5A cDNA fragment showed that it shares over 90% nucleotide acid and amino acid homology with HCV-BK etc., so the isolate of this study belongs to HCV-II. Besides, a mutation at 411nt in NS5A segment, which created a stop codon TGA in the reading frame was found, indicating that the isolate might be a defective virus. Perhaps the defective virus causes the persistent infection of HCV.

Key words Hepatitis C virus, Defective virus, Sequence analysis