

过对一株汉坦病毒弱毒株和一株强毒株核苷酸序列分析比较发现,仅仅是由于强毒株糖蛋白第1124位的丝氨酸在弱毒株上被置换为甘氨酸,后者就失去了细胞融合、CTL活性和对乳鼠的致死力等生物学性状。这些都说明汉坦病毒核苷酸序列中的某些关键部位的微小变异即可引起表型的改变。因此加强对我国各疫区流行株的基因结构的研究,建立我国的汉坦病毒基因库,无论对汉坦病毒的结构与功能研究还是对HFRS分子流行病学研究都具有重要意义。

此外,使用McAb进行抗原位点分析中还发现,陈株重组NP与两株具有中和活性的McAb呈阳性反应,进一步揭示在汉坦病毒NP上似乎存在有中和性McAb的靶抗原,这种抗原的性质和基因定位需做更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 Yoshimatsu K, Y-C Yoo, Yoshida R. Protective immunity of Hantaan virus nucleocapsid and envelope protein studied using baculovirus-expressed protein. *Ach Virol*, 1993, 130:365-376
- 2 徐志凯,王海涛,肖毅等.肾综合征出血热病毒50 kD结构蛋白的抗原位点分析.单克隆抗体通讯,1992,2:30-34
- 3 梁米芳,宋干,杭长寿等.流行性出血热病毒单克隆抗体的特性鉴定及其对病毒结构蛋白作用的初步研究.病毒学报,1989,3:217-223
- 4 王海涛,徐志凯,肖毅等.单克隆抗体用于肾综合征出血热病毒的型别鉴定.中华流行病学杂志,1992,13(特):243-245
- 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. Second ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 1:53-1.59
- 6 Antic D, Yong Kang C, Bpik K *et al*. Comparison of the deduced gene products of the L, M and S genome segments of Hantavirus. *Virus Res*, 1992, 24:35-46
- 7 Mifang L, Pexun L, Shu Yuan X *et al*. Antigenic and molecular characterization of Hantavirus isolates from China. *Virus Res*, 1994, 31:219-233
- 8 尹文,徐志凯,闫岩等.汉坦病毒S基因分段表达及其表达产物的鉴定.细胞免疫与分子免疫学杂志,1998,1:44-46

Cloning, Sequencing and Expression of S Gene Encoding Region of Hantaan Virus Strain Chen

Xue Xiaoping Xu Zhikai Ma Wenyu *et al*.

(Dept. Microbiology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract RNA of Hantaan virus (HNTV) strain Chen isolated from China was extracted from lysate of Vero-E₆ cell infected by the virus. With the RNA as template, 1.3kb cDNA fragment containing the region encoding nucleocapsid protein (NP) was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). This fragment was cloned into pGEM-7zf(+) plasmid and sequenced. Homology comparison showed that the homology of the nucleotide and amino acid sequences between strain Chen and strain 76-118 was 86% and 97%, respectively. The RT-PCR product was cloned into pGEX-4T-1 vector and was efficiently expressed in *E. coli*. The expressed product is NP-GST fusion protein with molecular weight about 70 kD in SDS-PAGE. Its antigenic epitope was recognized by Western-blotting and ELISA using the McAbs. The results showed that there were some differences on antigenic epitopes between strain Chen and strain 76-118.

Key words Hantaan virus, S gene, Nucleotide sequencing, Expression

一例乙型肝炎患者体内不同 HBV 克隆的序列差异*

房德兴¹ 甘人宝² 李载平² 翟春生¹ 周宗安¹¹ (南京军区军事医学研究所, 南京 210002)² (中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

R373.21

摘要 采用 PCR 扩增、噬菌体克隆和核苷酸序列分析的方法对一例乙型肝炎患者体内 HBV 的 HBsAg 编码区和部分前 S2 区进行序列分析。结果发现同一患者体内获得的不同 HBV DNA 克隆间存在个别碱基的差异,而这种差异并非方法学本身产生的。由此得出的结论是,这种碱基“突变”反映了乙型肝炎患者体内 HBV 基因组实际存在的多态性。

关键词 乙型肝炎病毒, S 基因, 序列分析, 点突变, 多态性

乙型肝炎病毒属于 DNA 病毒,但其复制中有一个反转录过程,这一特点决定了其基因组的高突变率。据估计,嗜肝 DNA 病毒体内突变率近于 2×10^{-4} /位·年^[1],这比 RNA 病毒低 1~2 个数量级,但比一般的 DNA 病毒高 4 个数量级^[2]。Okamoto 等(1987)对一个 54 岁乙型肝炎患者体内 HBV 进行突变分析表明,假如病毒来自出生时感染的同一母源毒株,则在其体内突变率为 $1.4 \times 10^{-5} \sim 3.2 \times 10^{-5}$ /位·年^[3]。分析已发表的 HBV 全基因组或部分基因序列可以看出,即使同一亚型也有很大差异,而其中来自中国人的序列数目极少,建立中国人不同亚型 HBV 基因库对于正确指导 HBV 变异研究工作极其重要^[4]。

我们在研究 HBV 表面抗原变异中曾经发现不同于国外报道的新型变异株^[5~8],并分别发表了其 HBsAg 编码区的全序列(GenBank Accession Number AF013629, AF013630, AF013631)。本文报道了从免疫失败儿童体内分离到的另一个 HBV 变异株的 HBsAg 编码区的全序列和部分前 S2 序列以及该患者体内 HBV 基因组可能存在的多态性。

1 材料与方 法

1.1 血清样本及 PCR 扩增的 HBV S 基因片段 患者 24 号(No. 24)的血清学资料及 HBV S 基因片段的 PCR 扩增结果见参考文献^[7]。简要地说,该患儿注射过乙型肝炎疫苗,但抗 HBs 抗体阴性,经 PCR 扩增从其血清中获得 HBV 全长 S 基因。基因位置相当于 HBV 基因组 nt2826~nt839,长约 1.2 kb。该片段 5'端设计有 BamHI 酶切位点,3'端有 PstI 酶切位点。

1.2 分子生物学工具酶和试剂(盒) BamHI、PstI、XbaI、T4 DNA 连接酶和 Tag DNA 聚合酶购自 Promega 公司;T7 DNA 序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司;SILVER SEQUENCE DNA 序列分析试剂盒购自

收稿日期:1998-04-20,修回日期:1998-10-26

* 本研究受国家自然科学基金和江苏省自然科学基金部分资助

GenBank 编号(GenBank Accession Numbers): AF036236, AF036237, AF036238, AF036239

Promega 公司。

1.3 DNA 克隆和核苷酸序列分析 DNA 克隆与鉴定方法参考文献^[8]。DNA 序列分析方法采用双脱氧终止法,按照 DNA 序列分析试剂盒操作手册进行。

2 结果

2.1 含 HBV 全长 S 基因片段重组噬菌体的筛选 将 PCR 扩增的 1.2 kb DNA 片段以 BamHI-PstI 双酶切后,与经同样双酶切的 M13mp18 RF DNA 载体片段相连接;用此连接物转化 *E. coli* TG1 感受态菌,在含 X-gal 和 IPTG 的半固体 LB 培养皿中培养,随机挑取 10 个白色噬菌斑培养后,按常规方法抽提噬菌体 RF DNA。经 BamHI-PstI 双酶切,有 8 个含有插入片段(约 1.2 kb),见图 1 所示。



图 1 重组噬菌体的限制性酶切鉴定结果

Fig. 1 Characterization of recombinant bacteriophage by restriction digestion

Lane M: Molecular marker (pBR322 DNA digested by HinfI); Lane 1 to Lane 10: Bacteriophages No. 2401 to No. 2410, showing that eight have insert fragments

2.2 核苷酸序列分析结果 分别培养重组噬菌体 2401、2402、2409 和 2410,按常规方法抽提单链重组噬菌体 DNA,以 pUC/M13 通用引物(序列为 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACG-AC-3')和 P4(5'-GAAGATGAGGCATAGCAG-3', HBV 基因组特异性序列, nt433~nt416,反向引物)为引物进行核苷酸序列分析。4 个克隆的 HBsAg 编码区全序列及部分前 S2 序列如图 2 所示。根据已有的资料结合上述核苷酸序列分析结果,可见该患者感染的 HBV 属于 adr 亚型(nt364~nt366 为 Arg 密码子 AGA, nt478~nt480 为 Lys 密码子 AAG)。同时值得注意的有以下两点:(1) 在 HBsAg 编码区 nt376~nt378 位为 Thr 密码子 ACT,这与已知的所有 adr 亚型 HBV 不同;(2) 不同克隆间存在碱基差异,表 1 列出了 4 个克隆相差碱基及位置。

2.3 单基因组的扩增、克隆和核苷酸序列分析 鉴于在同一患者体内检测到不同的 HBV DNA 序列,为了排除方法学所产生突变的可能性,对本实验室所克隆的已知 adr 亚型 HBV DNA (pADR-1)^[9],按同样方法进行 PCR、M13 噬菌体克隆和核苷酸序列分析。结果在随机挑取的 3 个重组噬菌体克隆中 HBV DNA 序列完全相同,并与预期的相符合(结果未列出)。

3 讨论

众所周知,HBsAg 有一个共同的属特异性抗原决定簇 a 和至少两种型决定簇 d/y 和 r/w,

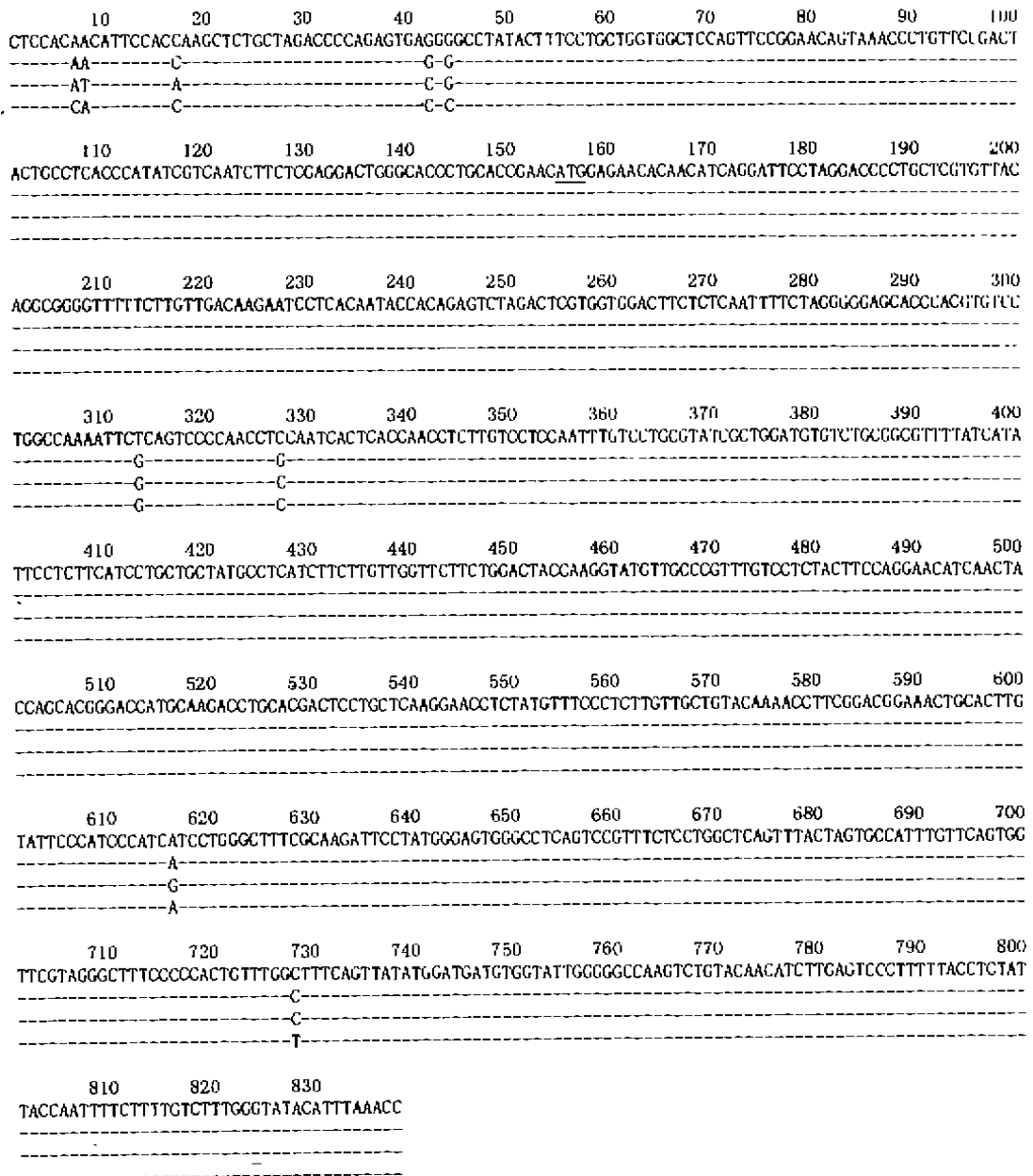


图 2 由 4 个重组噬菌体克隆测定的 HBsAg 编码区及部分前 S2 区序列的比较分析

Fig. 2 Comparison of the HBsAg coding region and partial pre-S2 region from 4 different recombinant bacteriophage clones

The underlined is the starting codon of HBsAg. The first C of the relative EcoRI site (GAATTC) of the nucleotide sequences is numbered as ntl. GenBank accession numbers are AF036236, AF036237, AF03638 and AF036239, respectively

表1 4个不同重组噬菌体克隆中HBV基因序列相差碱基及位置

Table 1 Different bases and position among four recombinant bacteriophage clones of HBV S gene

克隆 Clones	碱基及其位置				Bases and position				
	7	8	17	42	44	313	327	616	728
2401	A	A	C	G	G	<u>I</u>	C	A	C
2402	A	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	G	G	C	<u>G</u>	C
2409	<u>C</u>	A	C	<u>C</u>	<u>C</u>	G	C	A	<u>T</u>
2410	A	A	C	G	G	G	<u>G</u>	A	C

由此决定了HBV的4个主要血清学亚型:adr、adw、ayr和ayw。对于这些血清学亚型的核苷酸位点,已有过较为详细的研究,aa122和aa160位是分别决定d/y和r/w的关键位点。关于aa126位点实际存在的差异,似乎一直未加重视。直到1990年Ohnuma等报道了对该位点不同的HBsAg的研究结果,并提出第三对等位基因亚型决定簇(i/t)的概念,即aa126位Ile为i亚型,aa126位Thr为t亚型,人们才开始认识到这一位点在血清学分型中的重要性^[10]。由于迄今已发表的所有adr亚型HBV在该位均为Ile密码子ATT, No.24患者感染的HBV显然是一个adri→adrt变异株。我们在进行HBV表面抗原变异的系列研究工作中曾发现一个aa126位由Ile变为Ser的免疫逃避变异株^[7]。鉴于在adw/ayw亚型的aa126位存在Thr(ACT), No.24 adri→adrt变异株与临床免疫学的关系尚待进一步研究。

从表1可以看出4个重组噬菌体克隆间有9个位置存在碱基差异。由于在实验中采用了PCR扩增和M13噬菌体克隆方法,两者都是可能产生突变的因素。然而这些方法学上的突变在理论上不可能大到在小样本(小于10)随机抽样中可以检测到的水平,尤其是nt42位2个克隆(2402和2409)为C,另外2个克隆(2401和2410)为G,因此这种同一患者体内检测到的不同HBV基因序列显然反映了HBV基因组的多态性。对单一克隆HBV DNA进行的实验结果表明,在小样本挑选时,不同克隆间序列完全一致,排除了本研究中方法学产生突变的可能性,进一步肯定了该患者体内HBV DNA序列的不均一性。事实上在对另一例患者No.19感染的HBV S基因进行的核苷酸序列分析中,也同样发现这种多态性。该患者感染的是一个HBsAg aa126 Ile→Ser变异株^[7],在同时测定3个克隆后,发现有3个位置存在碱基差异,分别为nt13(1901T, 1903T, 1904C)、nt36(1901C, 1903T, 1904C)和nt143(1901A, 1903G, 1904A)。

基于PCR的HBV DNA突变分析中,为了排除方法学上产生的“突变”,得到患者所感染HBV的“真实”序列,可考虑两种方案。其一,直接对PCR产物进行序列分析;其二,先将PCR产物克隆(通常采用M13噬菌体克隆方法以获取单链重组DNA),然后分别对多个克隆进行序列分析。本研究表明,PCR扩增-克隆-序列分析方法学本身(即使产生了突变也)不会将突变反映在实验结果中。因此,通过克隆得到的核苷酸序列是患者体内存在的HBV“真实”序列,根据对多个克隆的序列分析结果可以推断患者感染的HBV源毒株(序列)。

参 考 文 献

- 1 Groner R, Miller RH. Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology*, 1989, 170:595~597
- 2 Liang TJ, Blum HE, Wands JR. Characterization and biological properties of a hepatitis B virus isolated from a patient without hepatitis B virus serologic markers. *Hepatology*, 1990, 12:204~212

- 3 Okamoto H, Imai M, Kametani M *et al*. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through maternofetal transmission. *Jpn J Exp Med*, 1987, 57:231~236
- 4 侯金林,梁焯森,骆抗先. 乙型肝炎病毒 S 基因“a”决定簇基因序列的多态性. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1996, 16:1~4
- 5 倪方得,甘人宝,杜传书等. 一个表面抗原 144 位 Asp→Ala 新乙型肝炎变异株. *病毒学报*, 1994, 10:57~62
- 6 Ni F, Fang D, Gan R *et al*. A new immune escape mutant of hepatitis B virus with an Asp to Ala substitution in aa144 of the envelope major protein. *Res Virol*, 1995, 146: 397~407
- 7 房德兴,甘人宝,李载平等. 乙型肝炎病毒的表面抗原 126 位 Ile→Ser 变异株. *生物化学和生物物理学报*, 1996, 28:429~433
- 8 房德兴,甘人宝,张倩等. 乙型肝炎病毒表面抗原 126 位 Ile→Ser 变异株 HBsAg 的暂时表达和抗原性鉴定. *病毒学报*, 1998, 14(1):1~9
- 9 甘人宝,储美瑾,沈绿萍等. 克隆的 adr 亚型乙型肝炎病毒(pADR-1) DNA 的全顺序. *中国科学(B 辑)*, 1986, 1:55~65
- 10 Ohnuma H, Takai E, Machida A *et al*. Synthetic oligopeptides bearing a common or subtypic determinant of hepatitis B surface antigen. *J Immunol*, 1990, 145:2265~2271

Different Nucleotide Sequences of Hepatitis B Virus Clones within One Patient

Fang Dexing¹ Gan Renbao² Li Zaiping²
Zhai Chunsheng¹ Zhou Zongan¹

¹(Huadong Research Institute for Medical Biotechnics, Nanjing 210002)

²(Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

Abstract The HBV HBsAg coding region of a hepatitis B patient was analyzed by PCR amplification, bacteriophage cloning and nucleotide sequencing. It was showed that among different clones from the same patient there were point mutations and these different nucleotide changes were not resulted from the methodologies. It is concluded that there are polymorphic HBV genomes within the same hepatitis B patient.

Key words Hepatitis B virus, S gene, Nucleotide sequencing, Point mutation, Polymorphism