

## HIV-1 抗体阳性血浆中 HIV-1 病毒基因分型研究

钟平 刘桂珍 朱为 段继良 张依磺

(卫生部上海生物制品研究所, 上海 200052)

R 373.9

Katrien Fransen Leo Heyndrickx Wouter Jansens Guido van der Groen

(Institute of Tropical Medicine, B-2000 Antwerp, Belgium)

**摘要** 为了解 HIV 抗体阳性血浆中的 HIV-1 病毒基因亚型的情况,应用逆转录 PCR 和 DNA 序列测定技术,对 6 份获自高危人群的抗 HIV-1 阳性血浆进行序列分析和基因亚型分型的研究,结果表明均属 HIV-1B 亚型。V3 环氨基酸序列分析指出这些 HIV-1B 亚型病毒株与泰国 HIV-1B 亚型病毒株核苷酸和氨基酸序列相似;同时发现 HIV-1 cDNA 和氨基酸序列均相同,推测这 6 份标本可能来自同时感染同一株 HIV 病毒的感染者。本研究对了解高危人群中 HIV-1 流行的遗传变异和 HIV-1 亚型病毒株的分子流行病学分析具有一定的意义。

**关键词** 人免疫缺陷病毒, 逆转录 PCR, DNA 序列测定, 基因亚型

人免疫缺陷病毒(HIV)是引起获得性免疫缺陷综合征(又称艾滋病, AIDS)的病原体,现在世界上已经有将近 3 000 万 HIV 感染者。AIDS 是危害人类健康的严重的传染病之一。由于 HIV-1 的遗传变异,目前已经有 A 至 J 十种基因亚型<sup>[1]</sup>,另外,近年来在非洲和欧洲发现了一株 HIV-1 的新的变异株,被称为 O 亚型<sup>[2]</sup>。研究 HIV 的遗传变异无论对了解 HIV-1 亚型病毒株与病毒的传染性、致病性、免疫原性等之间的关系,还是对 HIV 亚型株感染的诊断、广谱疫苗的开发以及分子流行病学调查,都有一定的现实意义。为此,我们对所获得的 6 份 HIV-1 阳性血浆进行 HIV-1 cDNA 序列分析,鉴定其基因亚型。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 6 份血浆标本 获自国内某一高危人群组。

1.1.2 HIV 抗体检测试剂 为芬兰 Labsystems 抗 HIV-1/2 ELISA 和本室建立的抗 HIV-1/2 ELISA (合成肽 gp41 和 gp36)。抗 HIV-1 阳性的确证试剂为美国 BIORAD 公司的 WB 确证试剂。

1.1.3 PCR 试剂和 DNA 序列测定试剂 Dnatom 购自 Janssen Chimica 公司;脱氧核苷三磷酸(dNTPs)和逆转录酶(MMLV)购自 GIBCO 公司;随机引物购自 Pharmacia 公司;Taq DNA 酶购自 Perkin Elmer 公司;引物 HIE100、HIE200、HIE101 和生物素标记的 HIE 201 由比利时热带病医学研究所提供;亲和素标记的磁性微珠(Dynabeads M280 Streptavidin)购自 Dynal AS 公司;测序试剂盒(T7 Sequence™ kit)购自 Pharmacia 公司。

收稿日期:1997-12-29,修回日期:1998-03-09

## 1.2 方法

1.2.1 抗 HIV-1 抗体检测和确证试验 均按照试剂的说明书操作要求进行。

1.2.2 提取 RNA 参照 Boom 等<sup>[1]</sup>方法提取 RNA, 简述如下: 取血浆 100  $\mu$ L, 加入 900  $\mu$ L 溶解缓冲液 (120 g GuSCN, 100 mL 0.1 mol/L Tris-HCl, pH6.4, 22 mL 0.2 mol/L EDTA, pH8.0 和 2.4 mL TritonX-100) 和 40  $\mu$ L Diatom 悬液 (10 g/50mL 蒸馏水, 500  $\mu$ L 32% HCl), 快速混匀后置室温 10 min, 混匀后用 TGL-168 型离心机以 12 000 r/min 离心 15 s, 弃上清液, 用 1 mL 洗净缓冲液 (120 g GuSCN, 100 mL 0.1 mol/L Tris-HCl, pH6.4) 洗涤沉淀物两次, 在振荡器上将沉淀物完全悬浮后 12 000 r/min 离心 15 s, 弃上清液, 同样, 用 1 mL 70% 乙醇洗涤两次, 最后用 1 mL 丙酮洗涤一次, 沉淀物在室温下干燥 20 min, 加入 50  $\mu$ L TE 缓冲液 (0.1  $\mu$ L RNA 保护剂和 0.5  $\mu$ L 0.1 mol/L DTT) 混匀, 置 56  $^{\circ}$ C 15 min, 用上述离心条件离心 2 min, 吸取上清液置 -20  $^{\circ}$ C 备用。

1.2.3 逆转录套式 PCR<sup>[1]</sup> 取 9  $\mu$ L RNA 加到 11  $\mu$ L 的逆转录反应液中 (含 1  $\mu$ L 随机引物和 50 u 逆转录酶), 37  $^{\circ}$ C 1 h。在 50  $\mu$ L PCR 反应液中含 5  $\mu$ L RNA 外引物 HIE100 和 HIE200<sup>[5]</sup> 引物各 0.4 mmol/L, 0.2 mmol/L dNTPs, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 u DNA 聚合酶, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.01% 明胶。PCR 扩增仪为 Perkin Elmer 480 型。第一轮 PCR 扩增反应为 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 50  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min。第二轮 PCR 扩增反应的内引物是 HIE101 和生物素标记的 HIE201<sup>[5]</sup>, 取第一轮 PCR 反应液 1  $\mu$ L, PCR 扩增反应为 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 55  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 PCR 产物直接固相测序和分析<sup>[5]</sup> 含有生物素的 PCR 产物经氯仿和乙醚抽提处理后与链霉亲和素标记的磁性微珠混合 (2 pmol/L DNA 结合于 0.15 mg 磁性微珠), 然后加入 0.15 mol/L NaOH 使 PCR 产物 cDNA 形成两股单链, 吸出上清液用 pH7.0 的缓冲液中和, 使用荧光素标记的测序引物和测序试剂盒 (T7 Sequence™ kit), 根据说明书操作对上清液 (含正链) 和磁性微珠液 (含负链) 同时进行测序反应。在 ALF 全自动 DNA 测序仪上测序, 应用系统树分类方法进行 HIV-1 亚型分型分析<sup>[3]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 血清学分析

6 份血浆标本用芬兰 Labsystems 和本室制备的抗 HIV-1/2 ELISA 试剂检测为抗 HIV-1 阳性。进一步用美国 BIORAD 公司的 WB 试剂确证为抗 HIV-1 阳性, 6 份血浆标本都含有 HIV-1 p24、p32 (除 S-139 和 S-302 外), gp41、p55、p65 和 gp120/160 抗体成分, 标本 S60、S62、S139 和 S302 还含有 p18, 见表 1。

表 1 抗 HIV-1/2 酶联免疫测定和免疫印迹法结果  
Table 1 The results of ELISA and Western blot for HIV-1/2

标本号* No. of samples	BIORAD WB						
	p18	p24	p32	gp41	p55	p65	gp120/160
S-60	+	+	+	-	+	+	+
S-62	+	+	+	+	+	+	+
S-72		+	-	+	+	+	+
S-78		-	+	+	-	+	+
S-139	-	+		+	+	+	+
S-302	+	+		-	+	+	+

\* 用 Labsystems 和本室制备的 HIV-1/2 ELISA 试剂检测, 全部为阳性; All of six samples were positive, detected by HIV-1/2 ELISA diagnostic kit made in Labsystems, Finland, and in house



```

cDNA Consensus 1 CTG TTG AAT GGC AGT CTA GCA GAA GAG GTA GTA ATT AGA TCT AGC AAT TTC
AA Consensus 1 L L N G S L A E E V V I R S S N F
55 ACG GAC AAT GCT AAA GTC ATA ATA GTA CAG CTG AAT GAA TCT GTA GAA ATT AAT
19 T D N A K V I I V Q L N E S V E I N
109 TGT ATA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT ATA CAT CTA GGA CCA GGG CAA
37 C I R P N N N T R K S I H L G P G Q
163 GCA TGG TAT ACA ACA GGA CAA ATA ATA GGA GAT ATA AGA CAA GCA CAT TGT AAC
55 A W Y T T G Q I I G D I R Q A H C N
217 CTT AGT AGA ACA CAA TGG AAT AAC ACT TTA AAA CAG ATA ACT GAA AAA TTA AGA
73 L S R T Q W N N T L K R I T E K L R
271 GAA CAA TTT GGG AAC AAA ACA ATA ATC TTT AAT CAA TCT TCA GGA GGG GAC CCA
91 E Q F G N K T I I F N Q S S G G D P
225 GAG ATT GT
109 E I

```

图 1 6 份血浆标本 HIV-1 gp120 C2V3 区 cDNA 序列(332 碱基)和推导的氨基酸序列  
 Fig 1 cDNA (332 bp) and deduced amino acid (AA) consensus sequences of HIV-1 gp120 C2V3 derived from six plasma samples

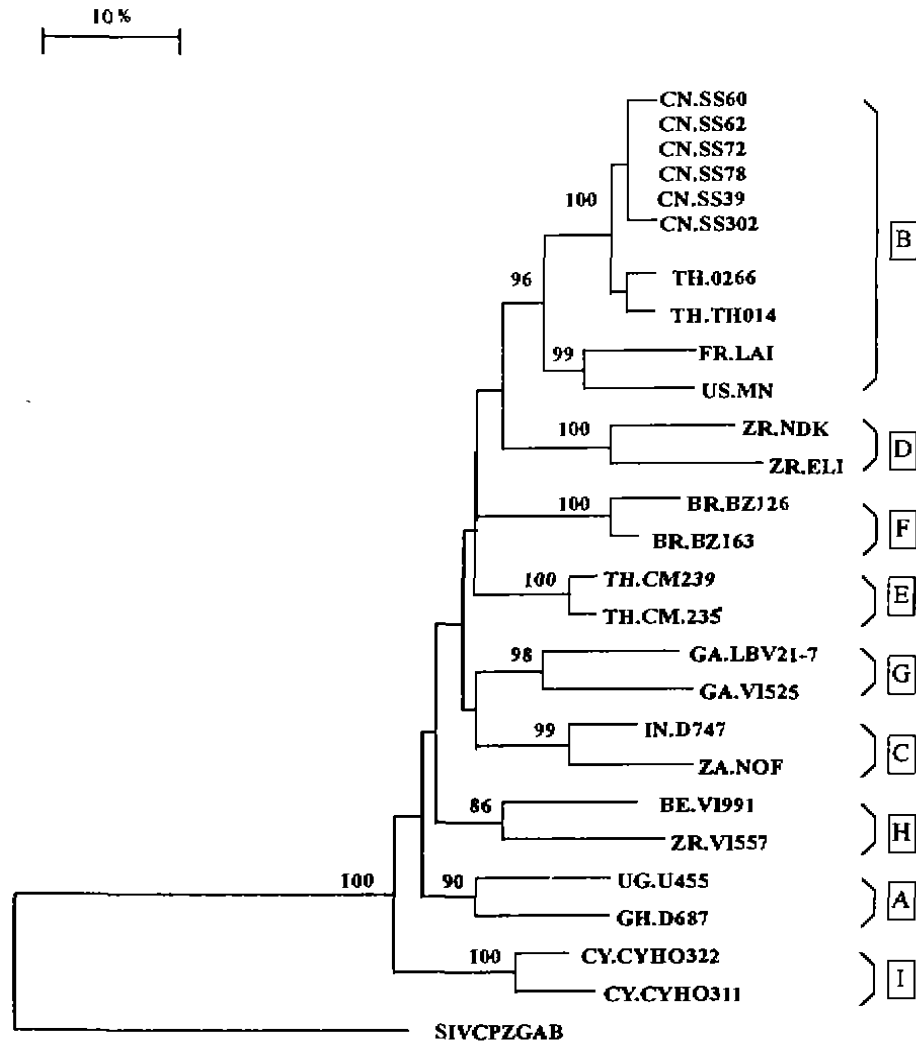


图 2 6 份 HIV-1 和其他国际 HIV-1 亚型代表株同源序列系统图

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of six HIV-1 cDNA sequences with international HIV-1 subtypes consensus sequences

CN(China): 中国; UG(Uganda): 乌干达; BE(Belgium): 比利时; GH(Ghana): 加纳; ZR(Zaire): 扎伊尔;  
 CM(Cameroon): 喀麦隆; GA(Gabon): 加蓬; TH(Thailand): 泰国; FR(France): 法国; IN(India): 印度;  
 SA(South Africa): 南非; BR(Brazil): 巴西; CY(Cyprus): 塞浦路斯; US(United States): 美国

证实了邵一鸣教授关于我国目前的 HIV-1 病毒株的 gp120 V3 环顶端由 GPGR 向 GPGQ 漂移和欧美 HIV-1 B 亚型转变为泰国 HIV-1 B 亚型的报道<sup>[10]</sup>(见图 1), 因此可以说这 6 份感染血浆的 HIV-1 病毒株属于泰国型的 HIV-1 B 基因亚型的病毒株; (3) 从 cDNA 序列中我们发现这 6 份血浆标本的 HIV-1 cDNA 序列完全相同, 推测 6 份血浆标本获自某种途径同时感染一种 HIV-1 病毒株的感染者。HIV-1 亚型分型分析目前有几种方法, 如 DNA 序列测定分析、V3

多肽 ELISA 分型、异源 DNA 双链体电泳分析(HMA)、限制性片段长度多形态测定(RFLP)和寡核苷酸探针杂交测定。尽管与其他分型方法相比,DNA 序列分析比较昂贵和费时,但是这种方法能够最终判断和分析被检标本的 DNA 或 cDNA 序列,在 HIV 的分子流行病学调查和监测 HIV 的遗传变异方面起到重要的作用。

### 参 考 文 献

- 1 Heyndrickx L, Janssens W, Alary M *et al.* Genetic variability of HIV type 1 in Benin. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 1996, 12: 1495~1497
- 2 Vanden Haesevelde, Decourt M. J. - L, De leys R J *et al.* Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virology*, 1994, 69: 6191~6198
- 3 Boom R, Sol C J A, Salimans M M M *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clinical Microbiology*, 1990, 28: 495~503
- 4 Van Kerkhoven I, Franssen K, De Beenhouwer H *et al.* Quantification of human immunodeficiency virus in plasma by RNA-PCR: viral culture and p24 antigen detection. *J Clinical Microbiology*, 1994, 32: 1669~1673
- 5 Janssens W, Heyndrickx L, Van de Peer Y *et al.* Molecular phylogeny of part of the env gene of HIV-1 strains isolated in Cote d'Ivoire. *AIDS*, 1994, 8: 21~26
- 6 Hultman T, Stahl S, Hornes E *et al.* Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17: 4937~4946
- 7 曾毅,王必常,汤得骥等.血友病患者血清中淋巴腺病毒/人 T 细胞 III 型病毒抗体检测. *病毒学报* 1986, 2: 97~99
- 8 Shao YM, Zhao Q, Guan Y *et al.* Follow-up studies on molecular epidemiology of HIV-1 strains in Ruili region of southwest China. XI International Conference on AIDS, July 7-12, 1996, Vancouver, Canada Abstract Vol 2, We C. 341
- 9 Pfützer A, Dietrich U, von Eichel U *et al.* HIV-1 and HIV-2 infections in a high-risk population in Bombay, India: evidence for the spread of HIV-2 and presence of a divergent HIV-1 subtype. *J Acquired Immune Deficiency Syndrome*, 1992, 5: 972~977
- 10 邵一鸣,赵全璧,王斌等.我国云南德宏地区 HIV 感染者 HIV 病毒株膜蛋白基因的序列测定和分析. *病毒学报*, 1994, 10: 291~299

## Genotyping of HIV-1 in Anti- HIV-1 Sero-Positive Plasma

Zhong Ping    Liu Guizheng    Zhu Wei *et al.*

(Shanghai Institute of Biological Products, Shanghai 200052)

Katrien Franssen    Leo Heyndrickx    Wouter Janssens    Guido van der Groen

(Institute of Tropical Medicine, B-2000 Antwerp, Belgium)

**Abstract** Six of anti-HIV-1 sero-positive plasma derived from a local high-risk population were investigated by RT-PCR and cDNA sequencing. The results indicated that HIV-1 prevalent in a local high-risk population belonged to HIV-1 subtype B. The sequences of nucleic acids and amino acids in V3 loop of 6 cDNA were completely similar to that of Thailand HIV-1 subtype B strains. Besides, the sequences of cDNA and amino acid from 6 plasma samples were identical. It implied that they might be derived from 6 HIV-1-infected people who were infected with HIV-1 at the same period. This study could provide a better understanding of prevalence of HIV-1 subtype strains in a local high-risk population.

**Key words** HIV-1, cDNA sequencing, Geno-subtype