

中国丙型肝炎患者中发现新的
丙型肝炎病毒核苷酸序列*R373.21
Q74

陈元鼎, 刘名英, 李嘉琦, 赵玮, 彭梅

(中国医学科学院中国协和医科大学 医学生物学研究所, 昆明 650107)

周曾全, 余文霖, 李惠琼

(昆明市传染病医院, 昆明 650041)

Sergio G. Tisminetzky, Francisco E. Baralle

(International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, 34012-Trieste, Italy)

摘要:应用 RT-PCR 和 DNA 克隆重组技术, 从中国云南地区丙型肝炎患者血清中克隆到 3 个丙型肝炎病毒(HCV)5'端非编码区(5'NCR)核苷酸序列。这 3 个序列分别来自 3 个不同的丙型肝炎患者。与国内外已发表的 HCV 原型株同源序列比较研究发现, 这 3 个 HCV 5'NCR 序列中分别存在部分核苷酸序列的缺失或出现插入重复。在 YS225-1 5'NCR 序列 -155~-174 位之间, 有 18 个核苷酸序列缺失; 在 YS203-4 和 YS242-1 5'NCR 序列 -55~-56 位之间, 分别有 28 个(YS203-4)和 40 个(YS242-1)核苷酸序列插入。这些插入序列(28 个核苷酸)在其相邻部位已有存在, 即为重复序列。YS242-1 插入序列中有 11 个核苷酸出现两次重复。其它部位的核苷酸变异也同已知基因型的相应核苷酸变异有很大差异。结果表明, 这 3 个序列是迄今为止国内外都未曾发现过的新的 HCV 核苷酸序列。

关键词:中国丙型肝炎患者; 丙型肝炎病毒; 5'端非编码区; 核苷酸序列; 缺失; 插入; HCV 核苷酸序列

中图分类号: R512.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)02-0136-07

丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)为单股正链 RNA 病毒, 属黄病毒科(Flaviviridae)。HCV 基因组为一条约 9 400 个核苷酸长的单链 RNA 分子, 只有一个开放读码框架结构, 编码一个约 3 010 氨基酸的前体多肽。在 HCV 基因组的 5'端, 有一个由长约 340 个核苷酸组成的区域, 称为 5'端非编码区(5'NCR)。自从 1989 年 Choo 等人^[1]发现 HCV 基因组核苷酸序列后, 世界各地都陆续报道了许多完整的或部分 HCV 核苷酸序列。迄今为止发现的所有 HCV 序列都证实 HCV 5'NCR 是 HCV 中最保守的区域, 它与黄病毒科中其它成员中的相

收稿日期: 1999-03-08, 修回日期: 1999-06-14

* 基金项目: International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology 国际合作研究基金项目(CRP/CHN96-05); 云南省国际合作研究基金项目(97C009)

本文中发表的新的核苷酸序列已在 Database 注册, Accession number 为: AJ388389, AJ388390 和 AJ388391

作者简介: 陈元鼎(1959年-), 男, 云南昭通人, 副研究员, 博士后, 研究方向为分子病毒学、分子病理学及病毒疫苗。

序列在结构和功能上都有很大差别^[2]。5'NCR 核苷酸序列决定着 HCV 的复制和基因调控等生物学和免疫学功能。因此,它在 HCV 研究中具有重要的地位。

在对中国丙型肝炎患者中 HCV 基因组的研究中,我们发现了 3 个新的 HCV 5'NCR 序列。在这 3 个序列中分别存在部分核苷酸序列的缺失或重复出现。现将结果报道如下:

1 材料和方法

1.1 患者、血清样品及 HCV-RNA 的抽提

本研究中的患者均为中国人,临床诊断为慢性丙型肝炎患者。静脉采血后,用异硫氰酸胍-酚法^[3],从 450 μ L 血清中提取 HCV RNA。RNA 最后溶于 45 μ L 蒸馏水中。

1.2 引物合成

以已发表的 HCV 5'NCR 核苷酸序列^[1]为模板,合成逆转录、扩增、克隆用寡核苷酸引物(上海 Sangon Co. 产品)。见表 1。

表 1 逆转录、扩增、克隆用寡核苷酸引物

Table 1 Primers for RT-PCR, amplification and cloning of PCR products

引物 Primers	寡核苷酸序列(5'-3') Sequence(5'-3')	在 5'NCR 中的位置* Positions in 5'NCR
For RT-PCR		
AS-1:	5'-GTGCACGGTCTACGAGACCT-3'	-21~-2
S-1:	5'-GCCATGGCGTTAGTATGAGT-3'	-260~-241
For amplification		
AS-2:	5'-GGCACTCGCAAGCACCCCTAT-3'	-46~-27
S-2:	5'-GTGCAGCCTCCAGGAOCC-3'	-237~-221
For cloning		
AS-3:	5'-CGGGGAGCTCGCAAGCACCCCTAT-3' Sac I	
S-3:	5'-GTCGTGGTACCTCCAGGACC-3' Kpn I	

* See reference 1

RT-PCR 引物(表 1 中 AS1 和 S-1)、扩增引物(表 1 中 AS-2 和 S-2)寡核苷酸序列分别为原型病毒核苷酸序列^[1]编码区上游第 -21~-2 和 -260~-241 位核苷酸与 -46~-27 和 -237~-221 位核苷酸。克隆引物(表 1 中 AS-3 和 S-3)为克隆单一核苷酸序列用,其序列分别来源于扩增引物 AS-2 和 S-2,仅在 AS-2 和 S-2 中引入了克隆酶切位点 SacI 和 KpnI,以作克隆用。

1.3 HCV cDNA 合成

HCV cDNA 合成的方法详见文献^[4]。简述如下:13 μ L pre-RT 混合液[50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L spermidine, 10 mmol/L DTT 以及各 1.25 mmol/L dNTPs (Promega Biological Products Ltd., Shanghai)和 150 ng 引物 AS-1]与 2 μ L HCV RNA 提取液(见步骤 1)混匀。混合液在 92 $^{\circ}$ C 30 s 变性,转冰上快速冷却后,加入 5 μ L RT 混合液[含 20 u RNasin, 10 u AMV 逆转录酶(Promega)],混匀后置 42 $^{\circ}$ C, 60 min。

1.4 PCR 扩增

第一次 PCR 扩增:制备 80 μ L PCR 反应混合液[含 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 各 150 ng 引物 AS-1 和 S-1, 各 5 mmol/L dNTPs, 5 u Taq DNA polymerase (Promega)]。将上述 RT-反应混合液(20 μ L, 见步骤 3)加入 PCR 反应混合液。混匀后在 PCR 仪(Perkin-Elmer/Cetus, USA)上作第一次 PCR 扩增,条件为 94 $^{\circ}$ C, 45 s; 56 $^{\circ}$ C, 45 s; 72 $^{\circ}$ C, 45 s; 30 个循环。

第二次 PCR 扩增:取 1 μ L 第一次 PCR 扩增混合液,加入第二次 PCR 扩增混合液。第二次 PCR 扩增反应除使用内层扩增引物 S-2 和 AS-2 代替外层引物 S-1 和 AS-1 外,其余均同第一次 PCR 扩增反应。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色分析。

1.5 HCV-cDNA 的克隆及序列测定

1.5.1 HCV-cDNA 的克隆

第二次 PCR 扩增产物凝胶电泳检测阳性的血清样品,取其第一次 PCR 产物为模板,再进行第三次 PCR 扩增。第三次 PCR 扩增反应中,除使用克隆引物 S-3 和 AS-3 代替外层引物 S-1 和 AS-1 外,其余均同第一次 PCR 扩增反应。

第三次 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化, Kpn I 和 Sac I 双酶切,制备酶切克隆片段,再将此片段克隆到 pBluescript KS+/- (pBS) 质粒 DNA 上,获得重组 pBS-HCV 质粒 DNA(图 1)。重组 pBS-HCV 质粒 DNA 经转化 DHS α 细胞并在 LB 培养液中培养扩增^[5]后,最后进行核苷酸序列测定。

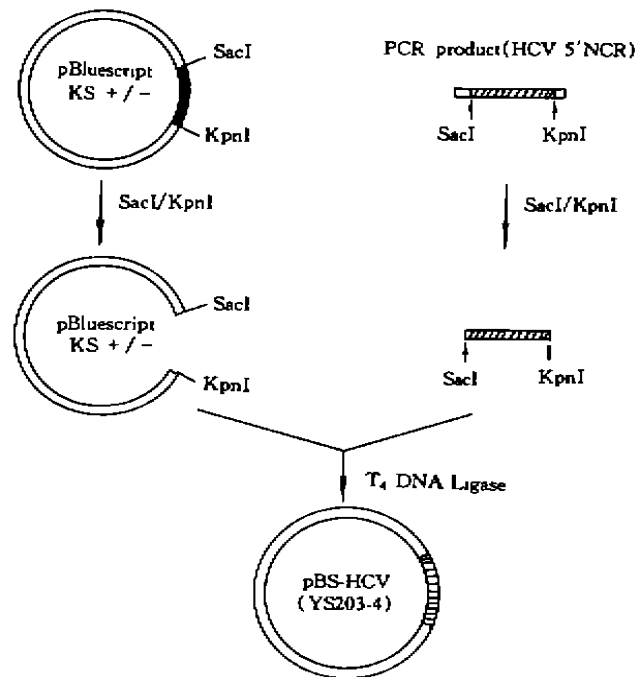


图 1 HCV cDNA 的克隆——重组 pBS-HCV 的构建

Fig.1 Construction of recombinant pBS-HCV; cloning of HCV 5'NCR cDNA

1.5.2 HCV-cDNA 进行核苷酸序列测定

使用 T⁷ Sequencing Kit (Pharmacia Biotech Inc., USA), 按说明书对重组 pBS-HCV 中 HCV-cDNA 进行双脱氧核苷酸末端终止反应,进行序列测定。为将序列测定误差减至最小程度,测序反应中,使用与克隆扩增引物同一的 AS-3 和 S-3,并作双向测定。

1.6 HCV-cDNA 核苷酸序列分析

将已测定的 HCV-cDNA 序列,与国内外已发表的不同基因型代表株同源核苷酸序列进行比较,研究其核苷酸序列差异及可能的基因型。

2 结果

运用双巢式 RT-PCR 扩增和基因工程技术,对来自中国丙型肝炎患者血清中的 HCV 基因组 5'NCR 第 -220~-47 位核苷酸序列进行逆转录、克隆和序列测定。从 140 多位患者血清样品获得的 89 个克隆中,发现了 3 个来自不同慢性丙型肝炎患者的 HCV 5'NCR 序列有多个核苷酸缺失或插入,见图 2。在 89 个克隆序列中,有 3 个与 YS242-1 的序列完全一致;而序列 YS204-1 和 YS225-2 仅各发现一个克隆。

	-220	-216	-198	-176	-166	-126	-47
HCV1	CCCC	TCTCGGAGAGCCATAGTGG	TCTCGGGAACCGGTGAGTAC	ACTCGAATTGCCAGGACGAC	CGGTCCTTCTCTGGATCAA	CCGCTCAATCCCTGGAGAT	
HCVJ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HC-J6	-----	-----	-----	-----G--A--	T-----A--	---A---T---C---TC---	
HC-J8	-----	-----	-----	-----A--G--A--	T-----A--	---A---T---C---TC---	
Eb1	-----	-----	-----	-----C--TG--G--	-----G--	-----A--CA--A--	
YS203-4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YS225-1	-----	-----	-----	-----	-----A--	-----A--CA--A--	
YS242-1	-----	-----	-----	-----C--G--	-----A--	-----A--	

	-116	-94	-76	-64	-56	-47
HCV1	TGGGGCTGTC CCCCAGAG	CTGCTAGCCGAGTAGTGTTC	GGTCGGAAAGGCGCTGTGG	*****	*****	TACTGCTG
HCVJ	-----G--	-----	-----	*****	*****	-----
HC-J6	-----	-----C--	T-----	*****	*****	-----
HC-J8	-----AC--	-----C--	T-----	*****	*****	-----
Eb1	-----G--	TCA-----	-----	*****	*****	-----
YS203-4	-----G--	A-----	-----G--	*****TACTGCTG	GATCGGAAAGGCGCTGTGG	-----
YS225-1	-----G--	TCA-----	-----G--	*****	*****	-----
YS242-1	-----G--	TCA-----	-----G--	TAGGCTGTGGTAGTGTTC	GATCGGAAAGGCGCTGTGG	-----

图 2 中国丙型肝炎患者中分离到的 HCV 5'NCR (YS203-4, YS225-1 和 YS242-1) 序列分析

Fig. 2 The new nucleotide sequences of HCV 5'NCR (YS203-4, YS225-1 和 YS242-1) isolated from Chinese patients; Comparison with previously published HCV sequences. Dashes indicate identity with sequence of HCV1 (top line). Nucleotide substitutions are indicated. Stars represent the nucleotides that not exist. Nucleotide numbering corresponds to that described for the prototype HCV1⁽¹⁾. The published sequences come from: ref. 1 for HCV1 (genotype 1a); ref. 5 for HCV-J (genotype 1b); ref. 6 for HC-J6 (genotype 2a); ref. 7 for HV-J8 (genotype 2b); and ref. 8 for Eb1 (genotype 3a).

与国内外已发表的 HCV 5'NCR 核苷酸序列比较,本研究所发现的 HCV 5'NCR 核苷酸序

列,在 YS225-1 - 174 ~ - 155 位之间有 18 个核苷酸缺失;在 YS203-4 和 YS242-1 - 55 ~ - 56 位之间,分别有 28 个和 40 个核苷酸插入。进一步分析结果表明,这些插入序列在其自身序列的相邻部位(自身序列 - 83 ~ - 56 位)已有存在,即为重复序列。在 YS242-1 插入序列中有 11 个核苷酸序列(自身序列中 - 76 ~ - 56 位,图中划底线部分)出现两次重复。YS242-1 插入序列中的第一个核苷酸(T)为一新的碱基。此外,在同已知基因型的标准株 HCV 同源核苷酸序列进行的比较研究结果表明,如除去缺失或插入部分不考虑,其余的序列具有基因组 1 或基因组 3 的特征。YS203-4 具有基因型 1b(HCVJ)的特征,但其 - 93 位核苷酸为 A, - 61 位为 G,则为 1b 型所没有;YS225-1 虽具有基因组 3 的特征,但在其 - 139 和 - 138 位核苷酸 AT, - 70 位点为 T, - 61 位点为 G,则为基因组 3 所没有;YS242-1 虽在 - 118 位(A)和 - 95 ~ - 93 位(TCA)具有基因组 3 的特征,但其它部位的变异与已知基因型 3 差别很大。特别是这 3 个新发现的序列中, - 61 位核苷酸均为 G,这在国内外已报道的 HCV 序列中都未曾发现过。

3 讨论

在对中国丙型肝炎患者血清 HCV 5'NCR 核苷酸序列的研究中,发现了 3 个新的 HCV 5'NCR 核苷酸序列,同国内外已发现的 HCV 同源序列比较,它们的 3'端方向存在多个寡核苷酸的缺失或插入,是迄今未曾发现过的序列。在 YS203-4 患者的同一份血清样品中,我们还测定了另外两个同源序列克隆,这两个克隆序列与本文报道中的(YS203-4)不一样,没有插入序列。而且,这两个序列的其它部分也与 YS203-4 有很大差异,它们分属基因型 1 和 3(资料中未显示)。同样地,我们对来自 YS225-1 患者的同一份血清中的另外 5 个克隆进行了测定,发现这 5 个克隆序列与本文报道中的 YS225-1 序列也不一样,没有碱基序列的缺失,且都属于基因型 3,但彼此之间也不一致。而在 YS242-1 患者的同一份血清样品中分离到的另外两个克隆的核苷酸序列则与本文报道中的 YS242-1 序列完全一致(资料中未显示)。为了减低测序中的误差,所有序列都进行了 5'→3'和 3'→5'双向测定,实验结果是真实可靠的。同一患者分离的不同 HCV 5'NCR 克隆存在不同的核苷酸序列,在我们进行的大量序列分析研究中也得到了证实(将在另文中报道)。

HCV 5'NCR 是 HCV 基因组中最保守的区域。不同基因型 HCV 5'NCR 具有其特征性的核苷酸序列。各国已发现的 HCV 5'NCR 核苷酸序列比较研究结果表明,不同病毒株具有不同长度的 5'NCR,但此区域内的核苷酸序列除少数基因型存在 1 个或 2 个碱基缺失或插入(如基因型 6a^[9,10]),绝大多数都是很保守的。本文报道的 3 个新核苷酸序列,与原型病毒株基因组比较位于 5'NCR 中第 - 221 ~ - 46 位碱基之间,在其序列中有如此多的碱基缺失或插入,在国内外都不曾出现过。

HCV 5'NCR 是一个非常保守的区域,它具有基因调控和决定病毒复制等功能,其核苷酸序列的差异可反映 HCV 的基因组结构和/或功能的变异,并由此可将不同 HCV 分离株分为不同基因型和亚型。5'NCR 基因结构的显著变异,可能引起病毒分子生物学、分子流行病学、分子病理学及临床药物治疗和疫苗预防等诸多方面的重大差异。因此,5'NCR 在 HCV 的基因分型、分子进化、基因调控、疫苗研制及药物治疗研究中具有十分重要的意义。

对本研究中所发现的新 HCV 5'NCR 的二级结构及其体外转录效率及分子流行病学的进一步研究,将有助于阐明其分子生物学和分子病毒学意义,以及病毒基因组进化机制。

参 考 文 献

- [1] Choo QL, Richman KH, Han JH, *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:2451~2455
- [2] Han JH, Shyamala V, Richman KH, *et al.* Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: Identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:1711~1715
- [3] Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162:156~159
- [4] Tisminetzky SG, Gerotto M, Pontisso P, *et al.* Genotypes of hepatitis C virus in Italian patients with chronic hepatitis C [J]. *Int Hepatol Commun*, 1994, 2:105~112
- [5] Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, *et al.* Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:9524~9528
- [6] Okamoto H, Okada S-I, Sugiyama Y, *et al.* Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: Comparison with reported isolates for conserved and divergent regions [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72:2697~2704
- [7] Okamoto H, Kurai K, Okada S-I, *et al.* Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparison study of four distinct genotypes [J]. *Virology*, 1992, 188:331~341
- [8] Chan S-W, McOmish F, Holmes EC, *et al.* Analysis of new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants [J]. *J Gen Virol*, 1992, 73:1131~1141
- [9] Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:4942~4946
- [10] Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, *et al.* Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: Implications for secondary structure, virus detection and typing [J]. *J Gen Virol*, 1995, 76:1749~1761

New Nucleotide Sequences of the 5' Non-coding Region of Hepatitis C Virus Isolated from China

CHEN Yuan-ding¹, LIU Ming-ying¹, ZHOU Zeng-quan², LI Jia-qi¹, YU Wen-lin²
ZHAO Wei¹, PENG Mei¹, LI Hui-qiong², Sergio G. Tisminetzky³, Francisco E. Baralle³

¹(*Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences &
Peking Union Medical College, Kunming 650107, China*)

²(*Kunming Infectious Diseases Hospital, Kunming, 650041*)

³(*International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste 34012, Italy*)

Abstract: From the sera of 3 Chinese patients with hepatitis C, 3 new nucleotide sequences of the 5' non-coding region (5'NCR) of hepatitis C virus (HCV) were found using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and DNA recombinant and sequencing techniques. Comparing with previously published HCV corresponding sequences, these new sequences have some consecutive nucleotides deleted or inserted. Sequence YS225-1 has 18 nucleotides deletion between

the original position 174 ~ - 155 compared with the corresponding sequence of the prototype, HCV-1 (gene 1a); while sequence YS203-4 and sequence YS242-1 respectively contain extra 28 nucleotides and 40 nucleotides insertion between the original position - 56 ~ - 55. These nucleotides are the repeating sequences existing in the forward sense (original position - 83 ~ - 56). In sequence YS242-1, there is a sequence containing 11 nucleotides (corresponding to the original position - 76 ~ - 56) repeated twice. In addition, variations of the nucleotides among these sequences are quite different from that previously published. The findings showed that these sequences are new HCV 5'NCR sequences that have not been previously discovered.

Key words: Chinese patients with hepatitis C; HCV 5'NCR; Nucleotide sequence; Deletion; Insertion; HCV nucleotide sequences