

232 - 236  
5  
R 373 21  
三株散发性戊型肝炎病毒变异株的部分序列比较

杨军, 张华远, 王佑春, 毛群颖, 李河民

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

**摘要:**对三株散发性戊型肝炎病毒 Ch-T11、Ch-T21、Ch-T40 的部分基因组做克隆测序, 经比较发现与其它国内外 HEV 株 ORF2 部分相应核苷酸序列同源性在 78.3-81.3%, Ch-T21 与 Ch-T40 的核苷酸同源性为 98.8%, 而 Ch-T11 与前两者的同源性则分别为 89.8% 和 90.2%。Ch-T11、Ch-T21、Ch-T40 与其它 HEV 株相应氨基酸序列同源性在 95.8-97.9%, 它们之间的氨基酸同源性则为 100%。系统进化树分析显示, 这三株 HEV 可能代表着一新型 HEV。

**关键词:**戊型肝炎病毒; 核苷酸同源性; 进化树

**中图分类号:**R373.21, R512.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5125(2000)03-0232-05

自 Reyes 于 1990 年首次克隆出戊型肝炎病毒(HEV)以来, 在各大洲不断发现新的 HEV (澳大利亚除外), 并且发现 HEV 基因型具有按地域分布的特征。现在大体将 HEV 分为亚洲株、非洲株、美国株和墨西哥株四群。但有不少报道(1-4)中国存在 HEV 变异株。我们对北京地区的三株散发性戊型肝炎病毒部分核苷酸序列分析发现, 它们可能是又一新型 HEV。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品

北京地区急性散发性肝炎病人, 临床诊断为戊型肝炎。将其粪便收集后立即 -70℃ 冻存。

### 1.2 引物

参照发表的中国株序列, 借助 OLIGO 软件设计引物, 引物序列的位置以中国河北株(ChinaB)为准。

外引物 正义链 5'-aggacggcaccaataactcata-3' (5 646 nt-5 666 nt)

反义链 5'-cttatectgtgagcattctctac-3' (6 392 nt-6 416 nt)

内引物 正义链 5'-ggttggtgctgctacaattc-3' (5 704 nt-5 723 nt)

反义链 5'-accagccgacgaaatcaattc-3' (6 302 nt-6 323 nt)

### 1.3 RNA 抽提

10% (w/v) 的粪便悬液 140 μL, 按照 QIAamp Viral RNA Kit(QIAGEN 产品)试剂盒操作说明抽提病毒 RNA。

### 1.4 cDNA 合成

14.6 μL RNA 模板, 0.7 μL dNTPs (10 mmol/L), 100 pmol 反义外引物, 0.5 μL RNasin (40 u/μL, Promega), 2 μL DTT (0.1 mol/L), 混匀后作短暂离心, 70℃ 5 min, 置于冰上。然后加 1.5 μL 10× 逆转录酶

收稿日期:1999-05-10, 修回日期:1999-07-05

作者简介:杨军(1969年-),男,山东青岛人,助研,中国药品生物制品检定所硕士毕业,从事乙肝、戊肝的分子生物学研究,诊断试剂质控参考品研制及质量控制。

缓冲液, 1.2  $\mu\text{L}$  M-MLV(200 u/ $\mu\text{L}$ )(GIBCO/BRL 产品), 总反应体积为 25  $\mu\text{L}$ 。37  $^{\circ}\text{C}$  1 h, 90  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 置于冰上 5 min。

### 1.5 PCR 反应

第一轮 PCR 取 2.5  $\mu\text{L}$  cDNA, 5  $\mu\text{L}$  10 $\times$  Thermopol Reaction Buffer, 1  $\mu\text{L}$   $\text{MgSO}_4$ , 1  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mmol/L), 50 pmol 外引物, 1 u DNA 聚合酶(以上为 New England Biolabs 产品), 加超纯水至 50  $\mu\text{L}$  反应体积。94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 30 循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。第二轮 PCR 取 1  $\mu\text{L}$  第一轮 PCR 产物, 其它同上。

### 1.6 PCR 产物的纯化及加尾反应

按 QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN 产品)操作说明纯化 PCR 产物后, 取 4  $\mu\text{L}$  PCR 产物, 2  $\mu\text{L}$  10 $\times$  PCR Buffer, 2  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ (25 mmol/L), 0.5  $\mu\text{L}$  dATP(10 mmol/L), 2  $\mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶(以上为 Promega 产品), 加超纯水至 20  $\mu\text{L}$ , 70  $^{\circ}\text{C}$  30 min。

### 1.7 克隆测序

将加尾后的 PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体上, 转化至 Eco6 细胞(本实验室保存), 筛选出阳性克隆, 用 Wizard Plus Minipreps DNA 纯化系统提取质粒进行测序。测序反应试剂盒购自 Perkin-Elmer 公司, 用 ABI PRISM 377 测序仪测序。

### 1.8 序列分析

用 Clustal W 分析软件进行核苷酸(去除两端引物)和氨基酸序列同源性比较。用 PHYLIP 分析软件(version3.5c; Felsenstein, 1993)作进化树分析。从 GenBank 中调出以下序列以供分析之用: 4 株中国株 HEV, ChinaA(新疆株, D11092), ChinaB(河北株, M94177), ChinaC(KS2 株, L25595), ChinaD(Uigh179 株, D11093); 缅甸株 1(Burma 1, M73218), 缅甸株 2(Burma 2, D10330); 墨西哥株(Mexico, M74506); 美国株 1(US-1, AF060668), 美国株 2(US-2, AF060669), 美国猪 HEV(Swine, AF011921); 乍得株(Chad, U62121); 巴基斯坦株(Pakistan, M80581); 印度株 1(India 1, X99441), 印度株 2(India 2, U22532); 摩洛哥株(Morocco, AF051351); 埃及株(93-Egypt, AF051351); 尼泊尔株(Nepal, AF051830); 爆发性肝炎株(Fulminant, X98292)。

## 2 结果

将三株散发性戊型肝炎病毒阳性克隆的测序结果经 BLAST 搜索证实为 HEV ORF2 的核苷酸序列, 产物长度为 620 nt, 并分别命名为 Ch-T11、Ch-T21 和 Ch-T40。

Ch-T11、Ch-T21、Ch-T40 与其它国内外 HEV 株相应核苷酸序列同源性在 78.3-81.3%, 但已报道的 4 株典型中国株(ChinaA, ChinaB, ChinaC, ChinaD)间该部分核苷酸同源性在 97.6-99.0%。Ch-T21 和 Ch-T40 的核苷酸同源性为 98.8%, 而 Ch-T11 与前两者的同源性则分别为 89.8% 和 90.2%。Ch-T11、Ch-T21、Ch-T40 与其它 HEV 株相应氨基酸序列同源性在 95.8-97.9%, 它们之间的氨基酸同源性则为 100%。(见图 1 和图 2)。

系统进化树分析显示, Ch-T11、Ch-T21 和 Ch-T40 这三株 HEV 独成一枝, 不同于典型中国株和其它株 HEV。(见图 3)非洲的乍得株与埃及株、摩洛哥株相比, 更接近亚洲株。

## 3 讨论

从核苷酸同源性比较和系统进化树分析的结果看, Ch-T11、Ch-T21、Ch-T40 这三株 HEV 不同于其它 HEV, 可能代表着一新型 HEV 在中国散发流行。Ch-T11 与 Ch-T21、Ch-T40 的核苷酸序列差异 10%, 但该部分氨基酸则 100% 同源性。报道的几株中国 HEV 变异株<sup>[1-4]</sup>, 由于序列不在同一区域无法比较, 要确定是否属于同一型尚需进一步研究。新型 HEV 的

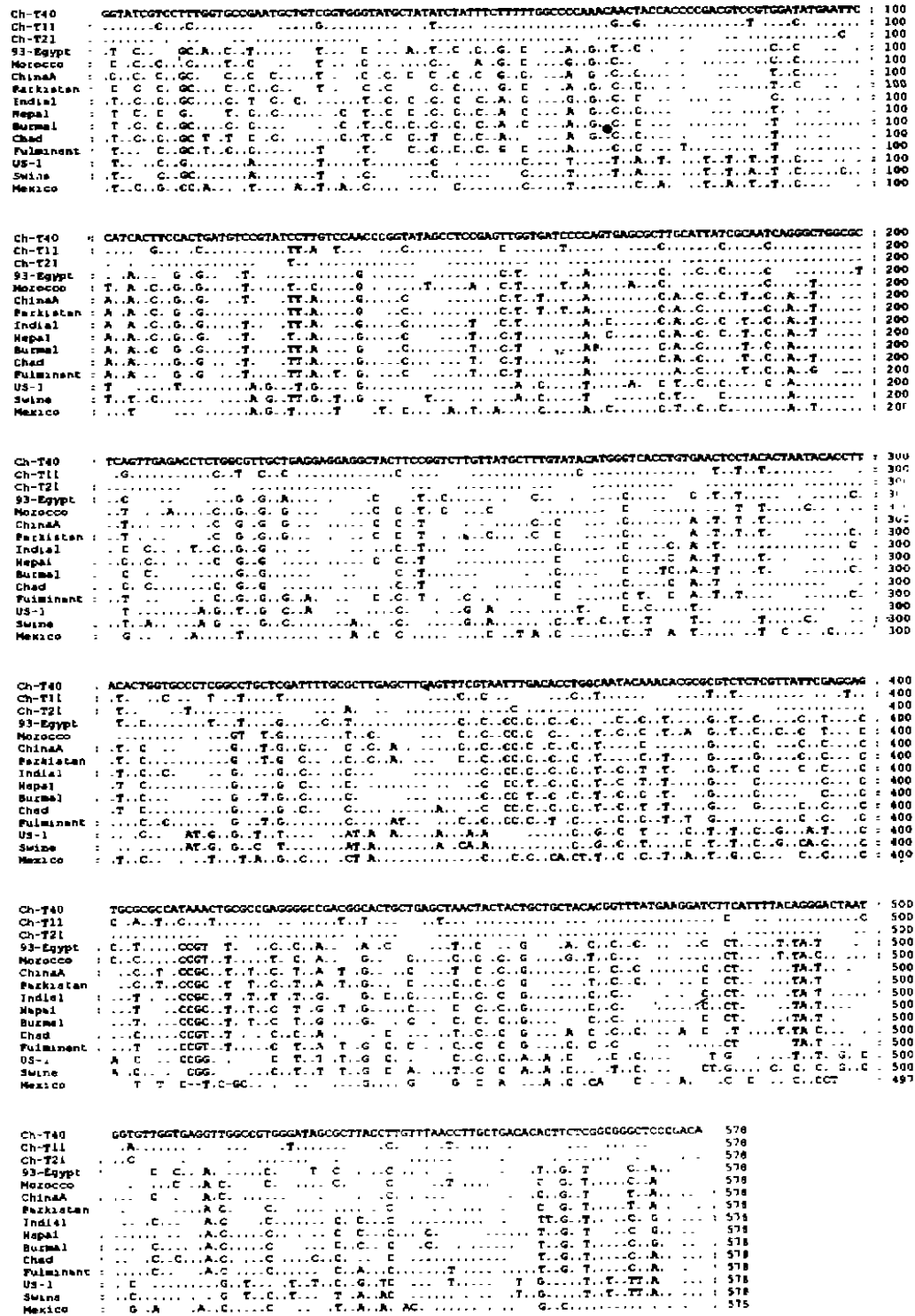


图 1 15 株 HEV ORF2 部分核苷酸序列比较

Fig. 1 Multiple alignment of partial ORF2 nucleotide sequences of 15 strains of HEV

Ch-T40	:	YRPLVFNNAVGGYALISISFMEQTTTTPTSVOMNSITSTDVRIIVQPGIASELVIPSERLHYRNQGWRSVETSGVAEEEATSGLVMLCIMG	:	90
Ch-T11	:	.....	:	90
Ch-T21	:	.....	:	90
93-Egypt	:	.....	:	90
Morocco	:	.....	:	90
ChinaA	:	.....	:	90
Parkistan	:	.....	:	90
India1	:	.....	:	90
Napel	:	.....	:	90
Burmal	:	.....	:	90
Chad	:	.....	:	90
Fulminant	:	.....	:	90
US-1	:	.....T.....	:	90
Swine	:	.....T.....	:	90
Mexico	:	.....	:	90
Ch-T40	:	PVNSYINTPTYGALGLLLOFALELEFRNLTPGNINTPVSRYSSARHKLRRGADGTAELTTTAAATRFMKDLHFTOTNGVGEVGRGIALTLF	:	180
Ch-T11	:	.....	:	180
Ch-T21	:	.....	:	180
93-Egypt	:	.....T.....R.....Y.SS.....	:	180
Morocco	:	.....T.....R.....Y.SS.....	:	180
ChinaA	:	.....T.....R.....Y.SS.....	:	180
Parkistan	:	.....T.....R.....Y.S.....	:	180
India1	:	.....T.....R.....Y.S.....	:	180
Napel	:	.....T.....R.....Y.S.....	:	180
Burmal	:	L.....T.....R.....Y.S.....	:	180
Chad	:	.....T.....R.....Y.S.....	:	180
Fulminant	:	.....F.....T.....R.....Y.S.....	:	180
US-1	:	.....T.....T.....R.....	:	180
Swine	:	.....T.....T.....R.....	:	180
Mexico	:	.....TC.....T.....SA.....L.....L.....	:	179
Ch-T40	:	NLADTLGGGLPT	:	192
Ch-T11	:	.....	:	192
Ch-T21	:	.....	:	192
93-Egypt	:	.....	:	191
Morocco	:	.....	:	192
ChinaA	:	.....	:	192
Parkistan	:	.....	:	192
India1	:	.....	:	192
Napel	:	.....	:	192
Burmal	:	.....	:	192
Chad	:	.....	:	192
Fulminant	:	.....	:	192
US-1	:	.....	:	192
Swine	:	.....	:	192
Mexico	:	.....	:	191

图 2 15 株 HEV ORF2 部分氨基酸序列比较

Fig. 2 Multiple alignment of partial ORF2 putative amino acids of 15 strains of HEV

现给疫苗和试剂的发展带来了新的问题。最近在美国本土发现的美国株 HEV 实验结果发现<sup>[5]</sup>,用基于缅甸株、墨西哥株和美国株 ORF2 和 ORF3 羧基端的合成肽分别做 ELISA 检测美国病人的血清,墨西哥株和缅甸株只能检测出美国株的抗-HEV IgG,而检测不出抗-HEV IgM,美国株则都能检出,而抗-HEV IgM 对于诊断是很重要的。对于中国的 HEV 是否存在血清学异质性还需要深入的研究。

### 参 考 文 献

- [1] Wang YC, Ling R, Erker JC, *et al.* A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80:169-177.
- [2] Li K, Zhuang H, Zhu W. Partial nucleotide sequencing of hepatitis E viruses isolated from 14 cities of China: Identification of 2 major variants of hepatitis E virus [J]. *J Med Virol*, In press.
- [3] Huang RT, Nakazono N, Ishii K *et al.* Existing variations on the gene structure of hepatitis E virus strains from some regions of China [J]. *J Med Virol*, 1995, 47:303-308.

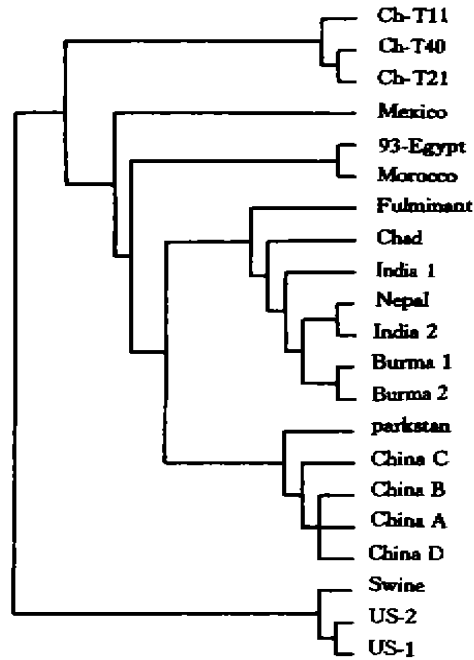


图3 21株HEV进行树分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of 21 strains of HEV

- [4] Hsieh SY, Yang PY, Ho YP, *et al.* Identification of a novel hepatitis E virus responsible for sporadic acute hepatitis in Taiwan. *J Med Virol*, 1998, 55:300 - 304.
- [5] Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC *et al.* The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79:447 - 456.

### Partial sequence comparison of three sporadic hepatitis E variants

YANG Jun, ZHANG Hua-yuan, WANG You-chun, MAO Qun-ying, LI He-min

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Partial genomes of three strains of sporadic hepatitis E virus (Ch-T11, Ch-T21, Ch-T40) were cloned and sequenced. The nucleotide and putative amino acid homology of Ch-T11, Ch-T21, Ch-T40 and other HEV strains were 78.3-81.3% and 95.8-97.9%, respectively. The nucleotide homology between Ch-T21 and Ch-T40 was 98.8%, while the nucleotide homology of Ch-T11 and Ch-T21, Ch-T40 was 89.8% and 90.2%, respectively. The amino acid homology among Ch-T11, Ch-T21 and Ch-T40 was 100%. Phylogenetic analysis suggested that Ch-T11, Ch-T21 and Ch-T40 may represent a new genotype of HEV.

**Key words:** Hepatitis E virus; Nucleotide homology, Phylogenetic tree