

254 ← 219

3

R373.21

15株中国TTV病毒基因型鉴定和部分序列分析 R512.6

温淑娟¹, 黄镇华¹, 程群¹, 谷祯梅¹, 侯金林²¹(广州南方医院医学基因技术中心, 广州 510515)²(广州南方医院感染病科, 广州 510515)

摘要: TTV病毒(TTV)为一种新鉴定的输血后肝炎相关的病毒。用聚合酶链式反应(PCR)扩增TTV DNA序列核苷酸1915到2185之间的片段,并将该片段克隆入pGEM-T Easy载体。重组克隆经酶切鉴定后,用全自动测序仪测序,发现本组病例中15株TTV毒株间的同源率在66.8%到99.3%之间,与TTV日本株比较同源率在66.1%到97.4%之间,分析结果显示在我国不仅有国外已报告的不同基因亚型毒株存在,而且,分离到的3株TTV毒株与日本株G1组和G2组的异源性分别达到13.3% - 33.2%,可能为新的TTV基因亚型。

关键词: 献血员; 肝炎; TTV; 基因型

中图分类号: R373.21 R512.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)03-0214-06

1997年底国外学者发现了一种可能与输血后肝炎相关的病毒即TTV^[1-4]。国内已从献血员、非甲非庚型肝炎病人、以及暴发流行的单项转氨酶升高为特点的肝炎患者的血清与粪便中,发现TTV的存在^[5,6]。

对TTV初步的分子病毒学研究结果发现,该病毒为单链环状负链病毒,该病毒可能属于圆环病毒科,它与某些动物单链病毒如细小病毒19相近似^[1,2,7]。日本将分离的TTV的部分序列据其异源性大于30%分为两个组—G1组和G2组^[1]。我国报告的TTV毒株与日本株的同源性大于97%^[6]。在本研究中我们用PCR扩增和测序TTV核苷酸1915到2185片段,发现15株TTV毒株间的同源率在66.8%到99.3%之间,表明在我国有不同基因亚型毒株存在,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 主要材料和试剂

1.1.1 血清标本来源 PCR筛查TTV DNA阳性者15例,其中:南方医院透析中心维持性血液透析患者7例,除其中1例外,其余病例谷丙转氨酶均正常。职业献血员8例,均为南方输血中心1998年初时采血者,其中男5例,女3例。均为广州市郊区农民或外来民工,谷丙转氨酶均正常,乙型肝炎病毒表面抗原和丙型肝炎病毒抗体均为阴性。

1.1.2 主要试剂 Taq酶、T4连接酶和工具酶均购自华美公司;T载体和XL1-Blue菌为美国Invitrogen公司产品;Wizard PCR Preps DNA纯化试剂为Promega公司产品;酶免疫法检测HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、

收稿日期:1999-03-15,修回日期:1999-05-20

作者简介:温淑娟(1962年~),女,辽宁沈阳人,主管技师、大学本科,主要从事基因诊断及研究工作

抗-HBc、IgM、抗-HCV及抗-HDV均为夏华公司产品。PCR引物NG059(5'-ACAGACAGAGGA-GAAGGCAACATG 3'), NG063(5'-CTGGCATTTCACATTTCCAAAGTT-3'), NG061(5'-GGCAACATGT-TATGGATAGACTGG-3')均由新加坡裕立宝公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA抽提^[6] 血清和蒸馏水各50 μL混匀稀释后,加入100 μL裂解液(25 mmol/L醋酸胺,2.5 mmol/L EDTA,1% SDS,2 mg/mL蛋白酶K)和10 μg/mL tRNA载体,68℃消化2 h后,常规苯酚和氯仿法抽提。

1.2.2 TTV DNA PCR扩增^[1] 用半套式PCR方法,第一轮引物用NG059和NG063,第二轮引物用NG061和NG063。第一轮PCR反应条件:取模板3 μL,10×PCR反应缓冲液3 μL,4×dNTP各200 μmol/L,NG059/NG063各15 pmol,Taq DNA多聚酶1.5 u,总反应体积30 μL,94℃预变性180 s,93℃ 40 s,54℃ 40 s,70℃ 60 s,扩增30个循环,70℃ 180 s结束反应。取第一轮PCR产物3 μL作模板,用NG061/NG063引物进行第二轮扩增,扩增条件同第一轮循环。取PCR产物10 μL于2%琼脂糖凝胶中电泳,EB染色,紫外灯下观察结果。

1.2.3 产物测序 取PCR产物经电泳纯化,克隆入pGEM-T Easy载体(Promega Co.)。重组克隆经酶切鉴定后,用ABI 310全自动测序仪测序。测序引物用T7和SP6。得到的TTV序列片段(1915到2185核苷酸片段)与TTV日本株比较(序列号AB008394)。

2 结果

15株TTV序列片段(核苷酸1915到2185)与TTV日本株(序列号AB008394)及不同亚型比较(图1),同源性在66.8%—99.3%之间,其中从献血员58、79、84分离的3株TTV毒株与G1组同源性在66.8—69.1%之间,与G2组同源性在86.7—87.8%之间,这3株TTV毒株可以认定为在中国广东地区存在的一种TTV新基因亚型。

3 讨论

Okamoto等已克隆TTV,全基因组长3739个核苷酸。它与某些动物单链病毒如细小病毒19相近似,然而,目前仍不确定该病毒属于病毒的哪一科^[1]。

目前认为TTV有2个基因型,4个基因亚型^[1]。日本学者将分离的78株TTV的部分序列据其异源性大于30%分为两个基因型:G1组76株,G2组2株。G1组据组内差异11%—15%又分为两亚型,即:G1a,包括22、TA278及另50株,亚型间的序列同源性为93.3—100%;和G1b(24株),亚型间的序列同源性为93.5—100%。G2组间的2毒株间相差14%,分别为G2a和G2b^[1]。国内已报告的结果扩增的部分病毒基因组来自于第一开放阅读框,与日本株相应位置的核苷酸同源性在97%以上,均属同一亚型的不同分离株^[5,6]。本文用PCR扩增同一位置TTV基因组,发现本组病例中15株TTV毒株间的同源性在66.8%到99.3%之间,与TTV日本株(序列号AB008394)比较同源性在66.1%到97.4%之间,分析结果显示在我国不仅有国外已报告的不同基因亚型毒株存在,而且,从献血员58、79、84分离的3株毒株与日本株G1组和G2组的异源性分别达到33.2%和13.3%,可以认定为一新的TTV基因亚型。

目前国内外有关研究的文献集中在用PCR进行的一般流行病学调查和个别的TTV全序列分析^[2-6]。进一步对该病毒基因型分子流行病学调查,将可能揭示这一病毒基因型分布规律与临床疾病谱和病毒传播途径等关系。

	10	20	30	40	50		
AB008394	1915	GGCAACATGT	TATGGATAGA	CTGGCTAAGC	AAAAAAAAACA	TGAACTATGA	1964
10. SEQ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	50
26. SEQ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	50
34. SEQ	-----	-----	-----T	-----	-----A	-----	50
47. SEQ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	50
48. SEQ	-----	-----	-----T	-----	-----	-----	50
52. SEQ	-----	-----	-----T	-----	-----A-A	-----	50
54. SEQ	-----	-----	-----C	-----	-----	-----	60
58. SEQ	-----	-----	-----CT	-----G-T-G-T	-----CAG-A-CTC	-----	50
61. SEQ	-----	-----	-----GTA	-----G-C-G-T	-----CT-A	-----	50
78. SEQ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	50
79. SEQ	-----	-----	-----CT	-----G-T-G-T	-----CAG-A-CTC	-----	50
82. SEQ	-----	-----	-----T	-----C	-----A	-----	50
84. SEQ	-----	-----	-----CT	-----G-T-G-T	-----CAG-A-CTC	-----	50
X85. SEQ	-----	-----	-----G	-----	-----	-----	50
X63. SEQ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	50

	60	70	80	90	100		
AB008394	1965	CAAAGTACAA	AGTAAATGCT	TAATATCAGA	OCTAOCCTCTA	TGGGQAGCAG	2014
10. SEQ	-----	-----	-----G	-----	-----	-----	100
26. SEQ	-----	-----	-----G	-----	-----	-----	100
34. SEQ	-----G	-----G	-----C-G-C	-----G-G	-----A-G	-----	100
47. SEQ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	100
48. SEQ	-----C	-----	-----G	-----	-----	-----	100
52. SEQ	-----G	-----G-C	-----G-G	-----A	-----	-----	100
54. SEQ	-----	-----	-----G	-----A	-----	-----	100
58. SEQ	-----A-AC-G	-----C-G-TC	-----C-GA-A	-----A-G-CT-G	-----CT	-----	100
61. SEQ	-----GAC-GC	-----C	-----C-T	-----GA-A	-----A-T-T-G	-----T	100
78. SEQ	-----C	-----	-----G	-----	-----	-----	100
79. SEQ	-----A-AC	-----C-G-TC	-----C-GA-A	-----A-G-CT-G	-----GCT	-----	100
82. SEQ	-----T-G	-----G-C	-----G-G	-----A-G	-----	-----	100
84. SEQ	-----A-AC	-----C-G-TC	-----C-GA-A	-----A-G-CT-G	-----GCT	-----	100
X85. SEQ	-----	-----	-----G	-----	-----	-----	100
X63. SEQ	-----	-----	-----G	-----	-----	-----	100

	110	120	130	140	150		
AB008394	2015	CATATGGATA	TGTAGAATTT	TGTGCAAAAA	GTACAGGAGA	CCAAAACATA	2064
10. SEQ		-----	-----	-----	-----	---G---	150
26. SEQ		-----	-----	-----	-----	---G---	150
34. SEQ		-----T--	-T-----C	--CT-T---	-C-----	-AC-----	150
47. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	150
48. SEQ		-----	-----	-----	-----	---G---	150
52. SEQ		-----T--	-T-----C	--CTGT---	-C-----	-AC-----	150
54. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	150
58. SEQ		TG--C----	CAC--G-AC	--CAGC--G	TA-----	-AC-----	150
61. SEQ		T--C--G--	C-C--G-AC	--C--C--GG	CC--G----	-TCT-----	150
78. SEQ		-----	-----	-----	-----	---G---	150
79. SEQ		T--C----	CAC--AC	--CAGC--G	TA-----	-AC-----	150
82. SEQ		-----T--	-T-----C	--CT-T---	-C-----	-AC-----	150
84. SEQ		T--C----	CAC--AC	--CAGC--G	TA-----	-AC-----	150
X85. SEQ		-----	-----	-----	-----	---G---	150
X63. SEQ		-----	-----	---C-----	-----	---G---	150

	160	170	180	190	200		
AB008394	2065	CACATGAATG	CCAGGCTACT	AATAAGAAGT	CCCTTTACAG	ACCCACAACCT	2114
10. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	200
26. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	200
34. SEQ		-----	---A-G-	-----	---T---	---C-G-	200
47. SEQ		-----	-----	-----	-----	---G-	200
48. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	200
52. SEQ		-----	---A-G-	-----	---T---	---C-G-	200
54. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	200
58. SEQ		G-ACAC--CT	GT--ATGTG-	T--T----C	---A----	TA-----	200
61. SEQ		G-----C-	---AG--G-	T--C--G--C	---A--TA	CA--C--A-	200
78. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	200
79. SEQ		G-ACAC--CT	GT--ATGTG-	T--T----C	---AC---	TA-----	200
82. SEQ		-----	---A-G-	-----	---T---	---C-G-	200
84. SEQ		G-ACAC--CT	GT--ATGTG-	T--T----C	---AC---	TA-----	200
X85. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	200
X63. SEQ		-----	-----	---G-----	-----	-----	200

	210	220	230	240	250		
AB008394	2115	ACTAGTACAC	ACAGACCCCA	CAAAAGGCTT	TGTTCTTAC	TCTTTAAACT	2164
10. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	250
26. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	250
34. SEQ		-A-----	-----	-T-----	-A-C-T-----	-----	250
47. SEQ		-----	-----	-----	-C-----	-----	250
48. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	250
52. SEQ		-A-----	-----	-C-----	-A-C-T-----	-----	250
54. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	250
58. SEQ		GT-AC-----	-ACA-T-C	TC-G-A-A	-A-----	T-AGC-T-----	250
61. SEQ		GAC-ACACT	-AT-----	TC-T-G-----	-A-AGTA-----	AGC-T-----	250
78. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	250
79. SEQ		-T-AC-----	-ACA-T-C	TC-G-A-A	-A-----	T-AGC-C-----	250
82. SEQ		-A-----	-----	-T-----	-A-C-T-----	-----	250
84. SEQ		-T-AC-----	-ACA-T-C	TC-G-A-A	-A-----	T-AGC-C-----	250
X85. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	250
X63. SEQ		-----	-----	-----	-----	-----	250

	260	270		
AB008394	2165	TTGGAAATGG	TAAAATGCCA	G
10. SEQ		-----	-----	-
26. SEQ		-----	-----	-
34. SEQ		-----	-----	-
47. SEQ		-----	-----	-
48. SEQ		-----	-----	-
52. SEQ		-----	-----	-
54. SEQ		-----	-----	-
58. SEQ		-----	-----	-
61. SEQ		-----	-----	-
78. SEQ		-----	-----	-
79. SEQ		-----	-----	-
82. SEQ		-----	-----	-
84. SEQ		-----	-----	-
X85. SEQ		-----	-----	-
X63. SEQ		-----	-----	-

图 1 15 株 TTV 序列片段与 TTV 原型株比较

Fig. 1 Nucleotide sequences of 15 TTV isolates from Chinese compared with Japanese isolates

参 考 文 献

- [1] Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology [J]. *Hepatology Res*, 1998, 10:1 - 16
- [2] Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, *et al.* A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241:92 - 97
- [3] NV Naoumov, EP Petrova, MG Thomas, *et al.* Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease [J]. *Lancet*, 1998, 352:195
- [4] P Simmonds, F Davidson, C Lycett, *et al.* Detection of a novel DNA virus (TT virus) in blood donors and blood products [J]. *Lancet*, 1998, 352:191 - 195
- [5] 骆抗先, 章康, 王珊瑚, 等. 一种新型肠传性病毒性肝炎的流行病学、临床、病理和病毒学的初步研究[J]. 第一军医大学学报, 1998, 18:87 - 89
- [6] 黄呈辉, 周育森, 陈汝光, 等. 献血员中病毒检测及部分序列测定[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1998, 12:237
- [7] Y Cossart. TTV a common virus, but pathogenic? [J] *Lancet*, 1998, 352:196
- [8] 侯金林, Karayiannis P, Waters J, *et al.* A unique insertion in the S gene of surface antigen-negative hepatitis B virus Chinese carriers [J]. *Hepatology*, 1995, 21:273 - 278

Genotyping and Sequencing analysis of 15 strains of TT Virus from Chinese isolates

WEN Shu-juan, HUANG Zheng-hua, CHEN Qun *et al*

(Genetic Center, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Recently, a novel virus named TT Virus has been identified in serum from patients with elevated ALT levels and others. TTV was detected by PCR using a set of primers from conserved region in the TTV genome. cloning and sequencing of the amplifications in 15 cases of Chinese blood donors and dialysis patients were carried out. Sequence comparison within 271 base pairs in the region between positions 1915 and 2185 showed homology rates varying from 66.8% to 99.3% among 15 Chinese isolates, and from 66.1% to 97.4% between Chinese strains and TTV isolates from Japanese isolates sequenced. This result suggests that a new sub-genotype exists in Chinese TTV isolates.

Key words: Blood donor, Hepatitis, TTV, Genotype