

新疆猪粪便戊型肝炎病毒 RNA 的检测及序列分析

马 勋, 陆承平**

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095)

Detection and Analysis of Partial Sequences of Swine Hepatitis E

Virus in Xinjiang

MA Xun, LU Cheng-ping**

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic & Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To investigate *Hepatitis E virus*, (HEV) infection in swine in Xinjiang and the extent of genetic variation among Chinese swine HEV strains, seventy pig fecal samples from an anti-HEV positive farm in Xinjiang were tested for the presence of HEV RNA by reverse transcription nested polymerase chain reaction (RT-nPCR). Thirteen of 70 (18.57%) pigs were positive for HEV RNA. The nucleotide sequence of 348bp region within open reading frame 2(ORF2) of the 13 swine HEV isolates was determined. The DNASTAR software was used for nucleotide sequences analysis. Sequence comparison showed that 13 swine HEV isolates shared 97.1%~100% nucleotide sequence identities and 74.1%~77.6%, 71.6%~74.1%, 73.3%~78.2%, and 82.8%~91.4% homogeneity to human HEV genotypes I, II, III and IV, especially had a 89.4%~91.4% identity to Chinese human HEV subgenotype IVA. Phylogenetic analyses further revealed that these swine HEV isolates were closely related to HEV IVA isolated from patients with acute hepatitis. Meanwhile these swine HEV isolates had 82.6%~91.3% homogeneity to other Chinese swine HEV and were grouped into genotype IV. Our findings further support the hypothesis that swine reservoirs for HEV infection.

Key Word: *Hepatitis E virus*; Genotype; Reverse transcription nested polymerase chain reaction

摘要: 从戊型肝炎病毒 (*Hepatitis E virus*, HEV) IgG 检测阳性的新疆某猪场采集 70 份猪粪便, 利用逆转录套式聚合酶链方法 (RT-nPCR), 检测 HEV RNA, 其中 13 份为阳性, 阳性率 18.57%。将 PCR 扩增产物克隆到 pMD18-T 载体上, 构建成重组质粒并测序, 结果表明, 13 株猪源 HEV 分离株在 HEV ORF2 348bp 核苷酸序列的同源性为 97.1%~100%, 为同一基因型; 与 HEV I、II、III、IV 的同源性分别为 74.1%~77.6%, 71.6%~74.1%, 73.3%~78.2% 和 82.8%~91.4%, 与 IVA 亚型的同源性同源性最高达 89.4%~91.4%。以该核苷酸片段绘制的基因进化树显示 13 株猪源 HEV 与 HEV IV T1 株在同一分支上, 属基因 IV 型; 与国内其他猪源 HEV 分离株该片段核苷酸序列的同源性为 82.6%~91.3%, 提示中国猪源 HEV 的基因型比较一致, 同属 HEV IV 型。

关键词: 戊型肝炎病毒; 基因型; RT-nPCR

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0360-04

戊型肝炎病毒 (*Hepatitis E virus*, HEV) 是一种严重危害人类健康的肝炎病毒, 世界范围内存在,

其核酸类型为单股正链 RNA, 大小约 7.2kb, 包括 5' 非翻译区 (UTR), 三个开放读码框架 (ORFs1-3) 和有

收稿日期: 2003-12-19, 修回日期: 2004-03-15

作者简介: 马 勋 (1967-), 女, 新疆石河子籍, 在读博士, 研究方向为病毒学。

** 通讯作者: 陆承平 (1945-), 男, 上海市籍, 教授, 博士, 研究方向为鱼虾病原微生物学、兽医微生物学与免疫学。

Corresponding Author. Tel: 025-84395328, E-mail: lucp@njau.edu.cn

PolyA 尾的 3'非翻译区。ORF1 位于第 28-5107nt 之间,主要编码与 HEV 复制有关的非结构蛋白; ORF2 位于 5147-7127nt 之间,为主要结构蛋白编码区,编码病毒衣壳蛋白,此区的核苷酸序列最保守; ORF3 由 369nt 组成, 5'端与 ORF1 有 1nt 重叠, 3'与 ORF2 有 328nt 重叠, 编码产物与 HEV 的特异性免疫反应有关^[1]。根据现有分离株的核苷酸序列分析, 分成 4 个主要的基因型^[2]。基因 I 型主要来自亚洲和非洲, 基因 II 型以墨西哥株为代表, 基因 III 型以美国株为代表, 基因 IV 型来自中国大陆、中国台湾和日本。自从 Meng 等发现猪源 HEV 与美国本土急性戊型肝炎患者分离的 HEV 核苷酸的同源性在 92%以上, 属基因 III 型^[3], 此后各国纷纷对 HEV 的动物宿主进行研究, 为了了解新疆猪源 HEV 和我国人 HEV 的基因型的关系, 对新疆某 HEV IgG 的阳性猪场进行了 HEV RNA 的检测, 并对序列进行了分析。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

2001 年采集 70 份新疆北部某城市郊区集约化猪厂 2-3 月龄猪粪便, 液氮运输, -20℃保存备用。大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。克隆载体 pMD18-T 载体购自大连宝生物。M-MLV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品, Rnasin 为华美公司产品, TRIzol 为美国 MD 公司产品, PCR 产物胶回收试剂盒和 dNTPs 购自中科开瑞公司, *EcoR* I 和 *Pst* I 购自大连宝生物, 氯仿、异丙醇等其他试剂均为分析纯试剂。

根据 GenBank 的 HEV 序列从 ORF2 设计一套简并引物, 由大连宝生物公司合成。

外引物: P1: 5'-AAT(C)TATGCC(A)CAGTACCGGG
TTG

P2: 5'-CCCTTATCCTGCTGAGCAITTC

内引物: P3: 5'-GTT(C)ATGCC(T)TT(C)TGCATACA
TGGCT

P4: 5'-AGCCGACGAAATC(T)AATTCTG
TC

1.2 HEV 基因组 RNA 的提取

用 PBS (0.01mol/L, pH7.4) 将猪粪便制备成 10%的悬液, 充分混匀, 然后 6000r/min 于 4℃离心 45min, 收集粪便上清保存于 -20℃。取 100μL 粪便上清加 1mL TRIzol, 按说明书操作, 最后获得纯化的 RNA 溶液。

1.3 RT-nPCR

RT 反应体系组成: RNA 模板 5μL, 5×反转录

缓冲液 4μL, 10mmol/L dNTPs 2μL, P2 (40pmol/μL) 0.5μL, M-MLV RT 1μL, RNasin 0.5μL, 加 ddH₂O 至终体积 20μL。反应条件: 72℃5min, 立即冰浴, 然后 42℃孵育 1h, 95℃5min。PCR 反应体系组成: cDNA 3μL 或第一轮 PCR 扩增产物 1μL, 10×PCR 缓冲液 2.5μL, 25mmol/L MgCl₂ 2μL, 10mmol/L dNTPs 1μL, 内或外引物各 0.5μL (20pmol/μL), TaqDNA 聚合酶 (5U/μL) 0.25μL, 用 ddH₂O 调整终体积至 25μL。反应条件: 94℃45s、55℃45s、72℃ 45s 扩增 30 个循环。反应结束后, 取 5μL 于 1%的琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

1.4 PCR 扩增产物的纯化、克隆及测序

对阳性的 PCR 产物进行割胶纯化, 操作按照中科开瑞公司的柱式胶回收试剂盒说明进行。将回收的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上, 将连接产物按常规方法转化感受态大肠杆菌 DH5 α, 进行氨苄青霉素抗性筛选, 对抗性菌落按常规碱裂解法提取质粒, 用 *EcoR* I、*Pst* I 双酶切和 PCR 同时鉴定, 对阳性重组质粒进行测序, 测序由开瑞公司完成。

1.5 遗传进化树的构建

用 DNASTar 进行序列的比对, 计算核苷酸序列的同源性, 绘制基因进化树。

2 结果

2.1 猪粪便中 HEV RNA 的检测

用 ORF2 简并引物分别检测了 70 份猪粪便, 结果 13 份样品为阳性 (编号为: swCH11、swCH12、swCH15、swCH22、swCH23、swCH24、swCH25、swCH28、swCH57、swCH62、swCH65、swCH70、swCH72), 阳性率 18.57%。在 1%琼脂糖胶上出现预计的 348bp 的条带, 对阳性产物的克隆测序证明为 HEV 基因序列。

2.2 序列分析

13 个分离株序列分析结果已登录 GenBank, 登录号分别为 swCH72 (AY596308)、swCH70 (AY596309)、swCH65 (AY596310)、swCH62 (AY596311)、swCH57 (AY596312)、swCH28 (AY596313)、swCH25 (AY596314)、swCH24 (AY596315)、swCH23 (AY596316)、swCH22 (AY596317)、swCH15 (AY596318)、swCH12 (AY596319)、swCH11 (AY596320), 其同源性为 97.1%~100%, 为同一基因型。与 HEV I、II、III 和 IV 型的同源性分别为 73.3%~77.6%、72.5%~74.8%、73.3%~78.2%和 82.8%~91.4%, 其中与 IV A 亚型的同源性最高, 达 89.7%~91.4% (表 1), 对以该 348bp 片段绘制的进化树进行分析, 13 个分离

株与 IVA 亚型的代表株 T1 在同一分支上(图 1)。同时进行了 13 个分离株与国内其他人和猪源 HEV 及国外猪源 HEV 分离株 299 个核苷酸序列比较, 与中国人和猪源 HEV 基因 IV 的同源性分别为 80.6%~90.0% 和 82.6%~91.3%, 与国外同一基因型猪源 HEV 同源性为 80.6%~86.0%, 而与国外其他基因型猪源 HEV 的同源性只有 68.6%~77.6%(表 2)。

表 1 HEV ORF2 部分核苷酸序列同源性的比较 (%)
Table 1 Nucleotide identity (%) of HEV ORF2 partial sequences

Genotype	I	II	III	IVA	IVB	Isolates (13 strains)
Isolates (13 strains)	73.3-77.6	72.5-74.8	73.3-78.2	89.9-91.4	82.8-85.6	97.1-100
IVB	78.4-80.2	75.1	77.0-78.2	84.8		
IVA	74.4-76.7	74.8	76.1-78.2			
III	74.7-77.0	69.0-70.7	91.7			
II	73.6-75.7					
I	90.2-100					

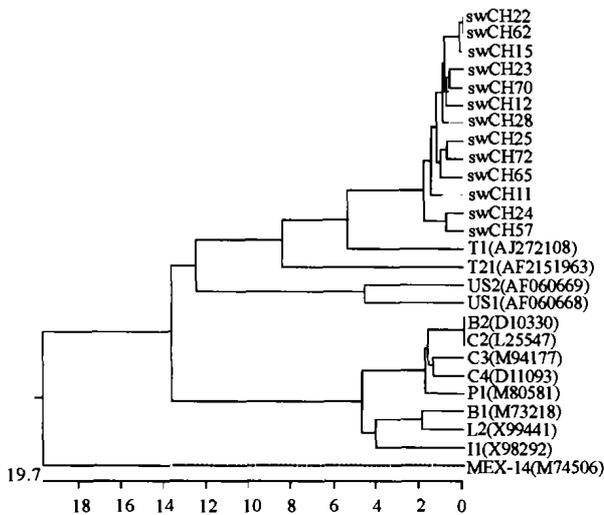


图 1 HEV ORF2 部分核苷酸序列的进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of partial nucleotide sequence (348bp) from HEV ORF2

Note: Accession nos. for the reference sequences are indicated in parentheses

3 讨论

本试验从新疆某猪场 2-3 月龄猪粪便内检测到 HEV RNA, 阳性率达 18.57%, 说明新疆存在猪源 HEV 的感染, 这是新疆猪 HEV 感染情况的首次报道。

13 个猪源 HEV 分离株 ORF2 348bp 同源性为 97.1%~100%, 为同一基因型, 与 I、II 和 III 的同源性在 72.5%~78.2% 之间, 与 IV 的同源性达 82.8%~91.4%, 且与 IVA 亚型的同源性最高, 为 89.9%~

表 2 13 个分离株与国内外人和猪源 HEV 分离株的比较

Table 2 Comparison of the 299bp ORF2 sequence of 13 swine HEV isolates with human and swine HEV isolates

Genotype (no. of isolate)	Nucleotide identity (%) 13 strain Isolates in this study
13 strain isolates from Xinjiang	97.3-100
Known China isolates of human HEV	
Genotype I (18)	69.9-73.9
Genotype IVA(1)	89.6-91.3
Genotype IVB(3)	82.3-84.9
Genotype IVC(1)	84.9-87.0
Genotype IV(18)	81.3-90.0
Known China isolates of swine HEV	
Genotype III	
Taiwan swine HEV (3)	68.6-72.9
Genotype IV	
China swine HEV (5)	82.6-91.3
Taiwan swine HEV (3)	83.3-86.0
Known non-China isolates of swine HEV	
Genotype III	
Canadian swine HEV (1)	
US swine HEV (20)	70.9-76.3
Japanese swine HEV (30)	69.9-76.6
Korea swine HEV (3)	71.6-74.9
Netherland swine HEV (15)	68.6-77.6
Genotype IV	
Japanese swine HEV (3)	80.6-84.6

Note: China isolates of human HEV: genotype I comprises C1(D11092), C2(L25595), C3(M94177), C4(D11093), C5(L08816), C6(L25595), F8(AJ428851), AF141652, NC_001434, 219(AJ344190), 153(AJ344189), 290(AJ344187), 152(AJ344182), 170(AJ344178), 273(AJ344176), 226(AJ344175), 218(AJ344174), 185(AJ344173); subgenotype IVA comprises T1(AJ272108); subgenotype IVB comprises T21(AF151963), HF-044(AF134812), T11(AF151962); subgenotype IVC comprises LZ-105(AF103940); genotype IV comprises 287(AJ344194), 266(AJ344193), 210(AJ344192), 194(AJ344191), 181(AJ344188), 254(AJ344186), 253(AJ344185), 202(AJ344184), 277(AJ344183), 108(AJ344181), 255(AJ344180), 241(AJ344179), 297(AJ344177), 292(AJ344172), 87(AJ344171), CCC220(AB108537), HF-030(AF134916), HF-054(AF134917); China isolates of swine HEV: genotype III comprises TW12SW(AF296165), TW13SW(AF296166), TW3SW(AF296167); genotype IV comprises SJ14(AJ428856), SH1(AJ428855), G8(AJ428854), G6(AJ428853), SB2(AJ428852), TW74SW(AF117281), TW32SW(AF117280), TW11SW(AF302068); non-China isolates of swine HEV: genotype III comprises Arke11(AY115488), Meng(AF082843), swUS27(AF466685), swUS26(AF466684), swUS25(AF466683), swUS24(AF466682), swUS23(AF466681), swUS22(AF466680), swUS21(AF466679), swUS20(AF466678), swUS19(AF466677), swUS18(AF466676), swUS17(AF466675), swUS16(AF466674), swUS15(AF466673), swUS14(AF466672), swUS13(AF466671), swUS12(AF466670), swUS11(AF466669), swUS10(AF466668), swUS07(AF466665), swJ1-1(AB094203), swJ2-1(AB094207), swJ3-1(AB094212), swJ4-1(AB094215), swJ5-1(AB094216), swJ6-1(AB094217), swJ8-1(AB094226), swJ10-1(AB094238), swJ11-1(AB094240), swJ12-1(AB094250), swJ15-1(AB094256), swJ16-1(AB094267), swJ17-1(AB094272), swJ18-1(AB094275), swJ19-1(AB094279), swJ20-1(AB094290), swJ22-1(AB094293), swJ23-1(AB094305), swJ24-1(AB094306), swJ25-1(AB094317), swJC1990(AB096756), swJ570(AB073909), swJ681(AB0073910), sw791(AB073911), swL82(AB105898), swL97(AB105-

899)、swL98(AB105900)、swL131(AB105901)、swL234(AB105903)、swL235(AB105904)、KOR1(AF516178)、KOR2(AF516179)、KOR3(AF52-7942)、(NLSW122(AF336299)、NLSW105(AF336298)、NLSW99(AF33-6297)、NLSW97(AF336296)、NLSW85(AF336295)、NLSW82(AF336294)、NLSW36(AF336293)、NLSW28(AF336292)、NLSW22(AF336291)、NLSW20(AF336290)、NLSW91(AY032759)、NLSW50(AY032758)、NLSW76(AY032757)、NLSW68(AY032756); genotype IV comprises: swJ7-1(AB0-94219)、swJ13-1(AB094254)、swJL145(AB105902)。

91.4%, 因此, 该 13 株猪源 HEV 分离株属于 IV 型中的 IVA 亚型, 同时对该区域的基因进化树进行分析, 其结果与核苷酸同源性的结果相同, 13 个分离株与 IVA 亚型的代表株 T1 在同一分支上。

13 个猪源 HEV 分离株 ORF2 299bp 片段与中国大陆人 HEV 基因 IV 型同源率为 81.3%~91.3%, 这与国内外报道各国猪源 HEV 与本国 HEV 的同源性都很高相一致^[3-11], 进一步从基因水平佐证戊型肝炎是一种人畜共患的传染病。与中国大陆 5 株猪源 HEV 比较, 同源率为 82.6%~91.3%, 由于这 5 株分别来源于中国大陆浙江、河南和北京, 因此可以推测中国大陆猪源 HEV 基因型单一且一致, 同属于 HEV IV 型, 或者至少可以推测 HEV IV 型是中国大陆猪源 HEV 的主型。

虽然猪感染 HEV 后一般不表现临床症状^[3], 对猪生产的影响不是很大, 但由于猪可能是人 HEV 的动物宿主, 故仍是食品安全和异种器官移植不可忽视的潜在问题。

参考文献

- [1] Purcell R H, Emerson S U. Fields virology[M]. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 3051-3061.
- [2] Schlauder G G, Mushahwar I K. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus[J]. J Med Virol, 2001, 65: 282-292.
- [3] Meng X J, Purcell R H, Harbur P G, et al. A novel virus in swine is closely related to the hepatitis E virus [J]. Proc Natl Ac Sci USA, 1997, 94(18):9860-9865.
- [4] Huang F F, Haqshenas G, Guenette D K, et al. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States [J]. J Clin Microbiol, 2002,40 (4):1326-1332.
- [5] Hsieh S Y, Meng X J, Wu Y H, et al. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus[J]. J Clin Microbiol, 1999,37: 3828-3834.
- [6] Wu J C, Chen C M, Chiang T Y, et al. Clinical and epidemiological implications of swine hepatitis E virus infection [J]. J Med Virol, 2000, 60 (2): 166-171.
- [7] van der Poel W H, Verschoor F, van der Heide R, et al. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands[J]. Emer Infect Dis, 2001, 7 (6): 970-976.
- [8] Choi I S, Kwon H J, Shin N R et al. Identification of swine hepatitis E virus (HEV) and prevalence of anti-HEV antibodies in swine and human populations in Korea [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41 (8): 3602-3608.
- [9] Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, et al. Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus[J]. J Gen Virol, 2003, 84 (4): 851-862.
- [10] Takahashi M, Nishizawa T and Okamoto H. Identification of a genotype III swine hepatitis E virus that was isolated from a Japanese pig born in 1990 and that is most closely related to Japanese isolates of human hepatitis E virus[J]. J Clin Microbiol, 2003 41(3): 1342-1343.
- [11] 王佑春, 张华远, 蓝海云, 等. 猪戊肝病毒的克隆和部分序列分析 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, 22(3): 262-265.