

北京地区部分人类免疫缺陷病毒基因型分析

宋爱京, 李秀华, 张春涛, 王佑春**

(中国药品生物制品检定所细胞室, 北京 100050)

Analysis of HIV Genotypes Isolated from Blood Donors in Beijing

SONG Ai-jing, LI Xiou-hua, ZHANG Chun-tao, WANG You-chun**

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

Abstract: To investigate HIV genotypes isolated from blood donors in Beijing, the samples positive for anti-HIV antibody with ELISA were confirmed by HIV blot. All 26 samples were confirmed positive for anti-HIV antibody. RNA from those samples were detected with RT-PCR. 20 of them were positive for HIV RNA. The purified PCR products were cloned. The sequences were determined and analyzed. The results showed that 10 of 20 isolates were CRF BC, 9 of them were genotype B, 1 of them were CRF AE. 6 of 9 genotype B belong to B'(Thailand B), the remaining 3 isolates may belong to western genotype B. The results indicated that several different genotypes of HIV which are predominant in China may exist in Beijing. This result may be helpful for the development of HIV vaccine in Beijing.

Key words: Human immunodeficiency viruses(HIV); Cloning; Sequencing; Genotype;

关键词: 人类免疫缺陷病毒; 克隆; 测序; 基因型;
中图分类号: R373.9

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)05-0517-03

我国于 1985 年发现第 1 例 AIDS 患者, 据估计到 2001 年底我国艾滋病病毒(Human immunodeficiency viruses, HIV)感染者和患者累计数已达 84 万人, 而且我国艾滋病的传播呈快速增长的态势, 2001 年报告艾滋病病毒感染数较上年增长了 58%。HIV 主要通过静脉吸毒、输血或使用血液制品以及不良性行为传播。我国流行病学调查显示, 经静脉吸毒传播 HIV 的占 68.0%, 经采血途径感染占 9.7%, 经性传播途径占 7.2%, 经血液和血液制品感染占 1.5%, 经母婴传播占 0.2%, 传播途径不详者占 13.4%。HIV 的变异显著, 不同的 HIV-1 分离株之间存在着较大的变异, 根据变异程度国际上已将 HIV 分为 11 种基因型, 而且不同基因型具有明显的地域性。北京作为国际化城市, 国际交往和流动人口较多, 可能存在 HIV 的多种基因型。分析该地区的 HIV 基因型, 将对开发用于该地区的 HIV 疫苗提供分子生物学的基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

26 份 HIV 抗体阳性血浆来自北京地区献血员, 样品采集于 1995 年至 2003 年, 所有样品均保存于 -50℃。样品编号为 BJ1-BJ26。

阿克苏 HIV 抗体酶联免疫诊断试剂, Othro 公司 HCV 抗体酶联免疫诊断试剂, 华美公司 HBsAg 酶联免疫诊断试剂, HIV 抗体确证试剂为新加坡 Genelabs 公司的 HIV Blot 2.2。

1.2 HIV 核酸提取、逆转录和扩增

用 Qiagen 公司的病毒 RNA 提取试剂盒按说明书提取病毒 RNA, 每 560μL 血浆可获得 60μL 的 RNA 提取液。用 SuperScript™ First-Strand Synthesis System 按说明书对 RNA 进行逆转录, 取 RNA 提取液 6μL, 用随机引物 50 pmol, 10 mmol/L 的 dNTPS 1μL, 加水至总体积 10μL, 65℃反应 5min, 取出后置冰浴 2~3 min; 然后按说明书的要求加入逆转录缓冲液、DTT、RNA 酶抑制剂及 SuperScript™ II 酶, 加水至 20μL 液体, 42℃反应 50 min 后, 再 70℃反应 15 min。

收稿日期: 2004-03-26, 修回日期: 2004-05-08

作者简介: 宋爱京 (1971-), 女, 北京籍, 技师, 主要从事 HIV 诊断试剂质量检定及 HIV 基因型的分析

** 通讯作者: 王佑春 (1964-), 男, 博士, 研究员, 主要从事肝炎病毒和 HIV 病毒分子生物学的研究。Corresponding author. Tel: 010-67017755-415. Email: wangyc@nicpbp.org.cn

· 采用 HIV *env* 区的分型引物进行扩增, 外侧引物序列为: ED5: 5-atgggatcaaacgctaaagccatgtg-3, ED12: 5-agtgtctcctgctgctcccaagaaccaag-3; 内引物序列为: ES7: 5-ctgttaaagcagctctagc-3, ES8: 5-cacttctccaattgctcctca-3。取 2 μ L 逆转录液, 上下游引物各 5 pmol, Taq 酶 5 U, 并加入其它反应液配置成 50 μ L 的 PCR 反应体系, 采用减温 PCR 的程序进行扩增, 其反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 2min, 然后 94 $^{\circ}$ C 15s, 55 $^{\circ}$ C/0.5 45s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 30 个循环; 94 $^{\circ}$ C 45s, 40 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 15 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 10min。第二轮 PCR 除使用内引物以外, 其他与第一轮 PCR 反应相同。

1.3 PCR 阳性产物克隆

将阳性产物从电泳胶中切出, 用博大科技 DNA 片段玻璃奶回收试剂进行纯化, 将纯化的产物连接到 pMD 18-T 载体上。

1.4 测序及序列分析

对阳性 PCR 产物进行纯化, 用 ES7 引物直接测序。用 Clustal X 对所有序列进行对比分析, 所用的参考序列为: A 亚型为 AF413987; B 亚型为 U71182、NC001802、K02007 和 D10112; C 亚型为 AF443115; D 亚型为 AF133821; F 亚型为 X96527; G 亚型为 AF423760; H 亚型为 AF190128; AE 重组为 AB032741、AB052995; AG 重组为 AB052867; BC 重组为 AF503396。Genedoc3.2 对核苷酸序列的同源性进行分析, Treeview 对基因进化树进行分析。

2 结果

2.1 HIV、HCV 和 HBV 病毒标志物的检测

26 份样品均为 HBsAg 阴性, HIV 抗体单独阳性者 7 份 (BJ3, BJ14, BJ15, BJ17, BJ19, BJ20 和 BJ23), HIV 抗体和 HCV 抗体同时阳性者 18 份 (BJ2, BJ4, BJ5, BJ6, BJ7, BJ8, BJ9, BJ10, BJ11, BJ12, BJ13, BJ16, BJ18, BJ21, BJ22, BJ24, BJ25 和 BJ26)。经确认试剂检测, 除 BJ20 只有 GP160, GP120, P24 和 P17 抗体带型外, 其余样品均有全抗体带型, 即 gp160、gp120、p66、p55、p51、gp41、p31、p24 和 p17。

2.2 核酸序列分析

对 26 份样品均进行 HIV RNA 的检测, 其中有 20 份样品为 HIV RNA 阳性。对所有 PCR 产物进行纯化、克隆并测序。通过核苷酸序列同源性分析, 显示 20 株 HIV 基因序列可以分为 4 组, 其中 10 株序列 (BJ4, BJ5, BJ6, BJ7, BJ8, BJ9, BJ10, BJ11, BJ12, BJ13) 之间的核苷酸序列的同源性在

85%~94%之间, 与 BC 重组的核苷酸序列的同源性在 88%~95%之间, 同源性最高, 基因进化树分析也显示该 10 株序列与 BC 重组亚型最近 (图 1), 可定为 BC 重组亚型。6 株序列 (BJ1, BJ2, BJ18, BJ21, BJ22, BJ26) 之间的核苷酸序列的同源性在 80%~94%之间, 与 B' 亚型的同源性在 83%~92%之间, 与西方 B 亚型之间为 77%~85%, 与其它亚型的同源性在 72%以下, 基因进化树分析也显示与 B' 亚型的进化距离最近, (图 1), 可定为 B' 亚型。另 3 株序列 (BJ14, BJ19 和 BJ20) 之间的核苷酸序列同源性为 83%~90%, 与 B' 亚型的同源性为 81%, 与西方 B 亚型之间为 79%~81%, 与其它亚型的同源性在 72%以下, 基因进化树分析也显示与 B 亚型包括 B' 和西方 B 的进化距离最近, 可定为 B 亚型, 但又单独形成一支 (图 1), 是否属于一个新的亚亚型或基因型还需进行多片段的基因序列分析而定。另 1 株序列 (BJ16) 与 AE 重组的同源性为 84%~88%, 与其他亚型的同源性在 73%以下, 基因进化树分析显示与 AE 重组最近 (图 1), 可定为 AE 重组。

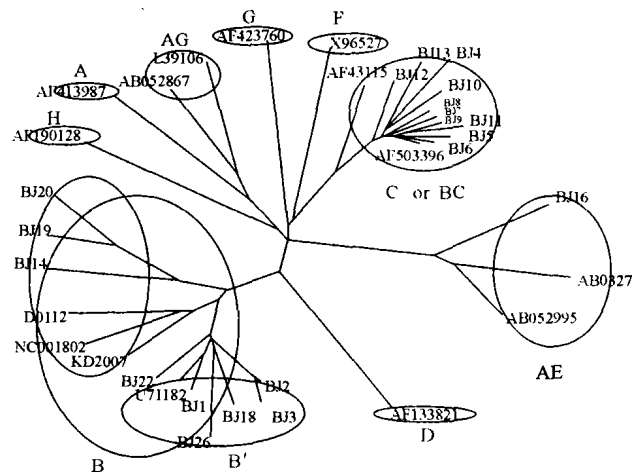


图 1 HIV 基因进化树显示 HIV 各分离株之间的关系
Fig. 1 The phylogenetic tree showing the relationship of different HIV isolates

2.3 蛋白序列分析

将氨基酸序列的同源性和进化关系进行了分析, 结果与核苷酸序列分析结果相同, 20 株病毒也分为 4 组, 其中 BJ4, BJ5, BJ6, BJ7, BJ8, BJ9, BJ10, BJ11, BJ12 和 BJ13 之间的氨基酸序列的同源性在 74%~88%之间, 为 BC 重组。BJ1, BJ2, BJ18, BJ21, BJ22 和 BJ26) 之间的氨基酸序列的同源性在 69%~83%之间, 为 B' 亚型。BJ14, BJ19 和 BJ20 之间的氨基酸序列的同源性在 65%~72%

之间, 为 B 亚型。BJ16 与 AE 重组的氨基酸序列同源性为 64%~69%之间, 为 AE 重组。

3 讨论

国际病毒命名工作组将 HIV-1 分为组 (Groups)、亚型 (Subtypes)、亚亚型 (Sub-subtypes) 和重组形式 (Circulating Recombinant Form (CRF)) 四类。HIV-1 各组之间核苷酸序列变异较大, 主要包括 M、O 和 N 组, M 为主要的病毒组^[1]。O 组是从非洲喀麦隆和加蓬分离到的一种新型毒株。亚型主要指 M 组内变异比较大的病毒株, 目前主要分为 A、B、C、D、F、G、H、J 亚型^[2,3]。亚亚型主要指在各亚型内部变异较大, 但其变异程度又不足以将其分为一个新的亚型。重组形式主要是指在同一病毒株中有不同亚型的基因结构, 主要存在 AE、AG、AB 和 BC 重组形式等。各种亚型和重组形式有明显的区域分布。从 1996 年到 2002 年邵一鸣等共采集 20 多个省、市、自治区的 1011 份标本, 并测定了其基因序列(邵一鸣教授的会议报道)。结果显示我国目前流行的毒株中 B 亚型最多, 约占总数的 45%, 其中西方 B 亚型仅占总数的 4%左右; C 亚型或 BC 重组其次, 约占总数的 41%, 而 AE 亚型则在 10% 以上, 另有少量的欧美 B 亚型和个别 A 亚型^[4]、D 亚型^[5]和 F 亚型^[6]。说明我国确实以 B 亚型和 BC 重组为主, 但不同地区, 甚至同一地区不同人群中 HIV 基因型的分布可能是不同的。

对北京地区 20 株病毒序列进行分析显示, 10 株序列为 HIV BC 重组, 占 50%; 9 株序列为 HIV

B 亚型, 占 45%, 其中有 6 株为泰国 B 亚型, 3 株为西方 B 亚型; 1 株序列为 HIV AE 重组。由此可见, 北京地区存在我国主要的流行株。但北京的 HIV 基因型的流行情况又不同于其他地区, 我国应主要为泰国 B 亚型和 BC 重组, 西方 B 亚型很少, 但我们所获得的 20 株序列有 15% 为西方 B 亚型, 这在其他地区很少见。这可能与北京地区的流动人口较多有关。

参考文献

- [1] Simons F, Mauciere P, Roques P, *et al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O[J]. *Nat Med*, 1998, 4: 1032-1037.
- [2] Gao F, Robertson D L, Morrison S G, *et al.* A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1[J]. *J Virol*, 1998, 72: 5680-5698.
- [3] McCutchan F E, Carr J K, Murphy D, *et al.* Precise mapping of recombination breakpoints suggests a common parent of two BC recombinant HIV type 1 strains circulating in China.[J] *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2002, 18: 1135-1140.
- [4] 苏玲, 邢辉, 羊海涛, 等. 中国首例人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) A 亚型毒株的鉴定[J]. *病毒学报*, 1997, 13: 265-268.
- [5] 邢辉, 秦光明, 冯毅, 等. 中国首例发现的人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) D 亚型毒株 *gag*、*env* 和 *tat* 基因的序列分析[J]. *中华临床和实验病毒学杂志*, 1999, 13: 157-162.
- [6] 潘品良, 曾常红, 范秀娟, 等. HIV-1 膜蛋白基因 (*env*) F 亚型毒株在中国的首例发现[J]. *病毒学报*, 1999, 15: 97-101.