

一株长春地区戊型肝炎病毒全基因 cDNA 序列测定*

刘子玲**, 迟宝荣, 刘金香

(吉林大学第一医院, 吉林长春 130021)

Sequencing the Whole cDNA of Hepatitis E Virus from Changchun

LIU Zi-ling, CHI Bao-rong, LIU Jin-xiang

(The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Through analyzing the whole cDNA sequence of the sporadic *Hepatitis E virus* gene and comparing it with other genotypes, we can understand its variability. We used RT-nPCR to assay the HEV RNA of a patient who was diagnosed with sporadic hepatitis E virus. We designed the primers according to different segments respectively to amplify the whole gene, and sequenced the product. The whole cDNA of HEV contains 7139bp, which consists of 5' UTR (nt 1-9), ORF1 (nt 10-5130, 1706aa), ORF2 (nt 5127-7151, 674aa), ORF3 (nt 5155-5499, 114aa), and 3' UTR (nt 7152-7193). The identity of nucleic acid between it and genotype I, genotype II, genotype III, genotype IV is 73.2% ~ 74.1%, 72.4%, 73.95% ~ 75.2% and 83.9% ~ 85.6%, respectively. Analyzing the phylogenetic tree showed that it is relevant to HEV genotype IV line. Sporadic hepatitis E virus in Changchun is HEV IV, and it has higher heterogeneity.

Key words: *Hepatitis E virus*; Isogenesis of nucleic acid; Sequence mensurating.

关键词: 戊型肝炎病毒; 核苷酸同源性; 序列测定

中图分类号: R373.2 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)01-0079-03

我国报道的戊型肝炎病毒 (*Hepatitis E virus* HEV) 基因组序列, 大多数为散发型 HEV 部分基因序列的测定, 仅少数为全基因序列的分析结果, 而且, 各实验室所分析的 HEV 片段不同, 因此, 很难确定新型变异株, 远远不能满足中国基因分型的研究和临床诊断的需要。为此, 我们对长春地区一株散发性 HEV 进行了全基因 cDNA 序列测定。

1 材料和方法

1.1 血清样品

病例源于 2000 年 6 月我院住院患者, 女性, 52 岁, 因腹痛、腹泻、发热 10d 加重伴呕吐 2d 入院, 入院前曾有不洁饮食史。近期无外出旅游史。ALT 25.9 IU/L、GGT 110.0 IU/L、TBIL 36.6 μmol/L、DBIL 17.3 μmol/L、TBA 26.0 μmol/L、ICDH 10.3 IU/L、LAP 46.5 IU/L、戊肝抗体阳性, 乙肝两对半及丙型肝炎抗体均阴性。于急性发病期采集血清,

-80 冷冻保存。

1.2 试剂

核酸提取试剂盒为日本 EX-R & D 产品, DNA 测序试剂盒为 PE Applied Biosystems 产品, DNA 全自动测序仪 ABIPRISM™ 377 为 Applied Biosystems 产品。

1.3 引物

按照已发表的序列, 特别参考 Genotype 4 (AJ272108) 和 HEVJRA1 (AP003430) 序列设计引物。见表 1。

1.4 PCR 扩增及测序

应用核酸提取试剂盒, 从 50 μL 血清中提取 HEV RNA, 获 20 μL 纯化的 HEV RNA 水溶液。反转录反应体系: 10 × PCR buffer 1.0 μL, 3' 端引物 (100 ng/μL) 0.6 μL, dNTP (40 mmol/L) 1.0 μL, 反转录酶 0.5 μL, HEV RNA 5.0 μL, 超纯水 1.9 μL; 反应程序: 65 5min、42 60min、95 5min、-20 至

收稿日期: 2004-07-14, 修回日期: 2004-09-06

* 基金项目: 国际合作基金资助项目 (200305)

** 通讯作者: 刘子玲 (1964-) 女, 吉林省籍, 副教授, 副主任医师, 博士, 从事临床医学研究。

Corresponding author: Tel: 0431-5612740, E-mail: zilingliu@yahoo.com.cn

表 1 HEV-CCC220 引物设计一览表

Table 1 The primers of HEV-CCC220

Primer I. D.	Nt positions	Internal primer	Primer I. D.	Nt positions	External primer
E021	(0088-0106)	GCCCTKGC GAA TGCTGTGG	E019	(0002-0020)	TCGA TGCCA TGGA GGCCCA
E070-C	(0449-0430)	GTCGACCGCACTTACTGTTT	E205-C	(0028-0010)	ATGGA GGCCACCA GTTCA
E024	(0687-0706)	TGCKGGTTA YAA YCA YGA TG	E020	(0042-0061)	CA TCACTACTGCTA TTGA GC
E025-C	(0863-0844)	GT YCC YATCCC YCGKTCATC	E023	(0532-0551)	GCCGA GGCTA TGKYCCGCCA
E029	(1271-1290)	A TTA YA TCCCYGGCCGYCAG	E187R-C	(0543-0524)	CYGA TG TYGCSGA GGCTA TG
E101-C	(1379-1361)	TTGA TGA GGC TCCA TCTCTC	E026-C	(0885-0865)	GAA GTCTA TGTCGGTCCAT
E308	(1391-1410)	AGCCTTCTTCGCA GGGCTGC	E213	(1090-1108)	GGGTGGAA TGCCCTCTGAA G
E374-C	(2081-2062)	GGCCA TA TCTGGGA GTCTGC	E307	(1349-1368)	GTGTGCTTGTGTTTGA TGAG
E395	(2455-2474)	CTGGT KAA TGCMTC YAACCC	E031-C	(1463-1444)	CA GGA GTGYACCTGTTTCYT
E390	(2740-2759)	AGYTTYGA TGC YTGGA GCG	E373	(2041-2060)	TTGTTCCACCGTTT TCTCC
E391	(2776-2795)	GATGARCTWTA YCTGACTGA	E035-C	(2090-2071)	TGGSAGTCKGCTAA YCCATT
E400-C	(2827-2808)	CTGGTTTGA GTCCAACCGGC	E394	(2422-2441)	GCKGGS TCMCTKTTTGA GTC
E399-C	(2850-2831)	CAC TCCCTGCTCTACTA TC	E388	(2634-2653)	TAA YCCWAA GMGGCTTGA GG
E031-C	(1463-1444)	CA GGA GTGYACCTGTTTCYT	E398-C	(2883-2864)	CACGTACGGCGAACTTGCG
E037	(2974-2993)	GTSCCKGGMTCMGGCAA GTC	E058	(2904-2923)	AGA KGTTGGCCGTGCTTGTG
E038	(3079-3098)	GCYTTACMCKKACACWGC	E043-C	(3855-3836)	GCCCYGA GCTYGARCA GGGC
E102-C	(3212-3193)	GTCCA TCTCCTTGGTGACCC	E383	(3921-3940)	AGTGCACTGCCGTA TGCCGG
E117	(4105-4124)	GARGCCA TGGTRGA GAA GGG	E378	(4390-4409)	GTTGCA GGA GCCCCTGATTG
E118	(4350-4369)	TTA TGGCGACGCTATGAGG	E377	(4499-4518)	GTATGCCGCA GTGGA TGATC
E126-C	(4369-4350)	CCTGCCAAA TTAGTGCTTAC	E001	(4966-4984)	CAGRTGTGTGTGKA TGTTG
E375	(4450-4469)	CAAAACA ACTTCTCGTCCGG	E003	(5119-5138)	CGGGTGGAA TGAATAACA TG
E376	(4473-4494)	GGA GTGTA TAA TTA TGGAGGA G	E005-C	(5300-5282)	CGGTGGTTCTGGGGTGAC
E046	(4588-4608)	AA GAARCA YTC YGGTGA GCC	E006-C	(5356-5337)	CA TCCAACCAACCCCTTCGC
E047-C	(4641-4622)	GGAA YACWGTCTGGAA YATG	E008-C	(5495-5479)	CAGCTGGGGCYGCGCCG
E002	(5020-5038)	CATAACCTKAT TGGBATG C	E051-C	(5932-5913)	GAGCGCCTWCA YTA YCGTAA
VE066-C	(5139-5119)	CGGGTGGAA TGAATAACA TGT	E010	(6319-6339)	CGACA GAA TTGATTTCTGTCGG
E004	(5282-5300)	CGGTGGTTTCTGGGGTGAC	E011	(6372-6390)	GTCTCA GCCAA TGCGGAGC
E017-C	(5353-5333)	TAT TCA TCCAACCAACCCCTT	E053-C	(6436-6417)	GAGAA TGACACA GCA GGA TAA
E090-C	(5433-5415)	CTTGGCTCCGCTTGCCGCG	E141	(7084-7104)	CTTTCCA GTCTACTA TTGCTG
E050	(5711-5730)	TTA TGCCCA GTA YCGGGTTG	E014-C	(7143-7124)	GAA GGTRGGTAAAACYCGGG
E009-C	(5730-5712)	TATGCYCA GTA YCGGGTTG	E203-C	(7146-7127)	GGTRGGTAAAACYCGGGA GT
E067	(6633-6652)	ACCAACCCCA TGTA TGCTCT			
E013-C	(7051-7033)	CTTTYGATGA YTTCTGCC			

少 15min。第一轮 PCR 反应体系:10 ×PCR buffer (含镁离子) 5.0μL, dNTP(2.5 mmol/L) 5.0μL, 3'端和 5'端引物(10umol/L)各 5.0μL, Taq DNA 聚合酶 0.4μL, cDNA 5.0μL 最后用超纯水调整终体积至 50μL。反应程序:95 1min 扩增 1 个循环, 95 30sec、55 30sec、72 45sec 扩增 30 个循环, 72 7min 扩增 1 个循环。第二轮 PCR 反应体系:第一轮 PCR 扩增产物 2.0μL, 其余反应体系及反应程序同第一轮 PCR。应用 DNA 全自动测序仪测序(所用引物从表 1 中选择), 应用 GENETYX-MAC10.0 分析软件进行核苷酸序列同源性比较, 应用 Canvas™3.5 分析软件作进化树分析。

2 结果与讨论

2.1 PCR 产物直接测序结果

以表 1 所示引物进行多次核苷酸序列测定。所获得的 HEV 序列称之为 CCC220 (DDBJ/ EMBL/ GenBank 序列号:AB108537)。全长 7193bp, 由 5'

UTR(nt1~9), ORF1(nt10~5130, 1706aa), ORF2 (nt5127~7151, 674aa), ORF3 (nt5155~5499, 114aa), 和 3' UTR(nt7152~7193) 构成。如表 2 所示, CCC220 的 ORF2 编码的氨基酸比 HEV - 型序列长 14-15 个氨基酸; ORF3 编码的氨基酸比 HEV - 型序列短 8-9 个氨基酸; ORF1、ORF2、ORF3 编码的氨基酸长度与 HEV 型相同。可见 HEV-CCC220 基因结构符合 HEV 型特征。

表 2 HEV 病毒的基因结构比较

Table 2 The structure comparison of different HEV genotype

Genotypes	Number of aa		
	ORF1	ORF2	ORF3
Genotype-I	1693	660	123
Genotype-II	1691	659	123
Genotype-III	1698-1709	660	122
Genotype-IV	1684-1707	671-674	112-114
CCC220 (AB108537)	1706	674	114

2.2 核苷酸同源性比较

HEV-CCC220 与目前基因库 (GenBank, EMBL, DDBJ) 中的 32 株已知 HEV 核苷酸同源性比较, 与 HEV 型、型、型的分别为 72.2% ~ 79.6%、72.4% 和 73.9% ~ 75.2%, 与 HEV 型核苷酸同源性明显高于 HEV - 型, 为 83.9% ~ 85.6%。按照传统的分型将 HEV 分为 4 个基因型, 并有明显的区域性。国际上已完成 - 型的全基因序列分析^[1~4], 其全基因序列的核苷酸同源性在 75% 左右。以往报道, 我国为 HEV 型, 但近来王佑春等报道, 在中国不仅存在 HEV 型, 还存在 HEV 型, 散发性 HEV 感染几乎都属于 HEV 型^[5~8]。根据基因结构及核苷酸同源性结果分析判断, 长春地区散发性 HEV-CCC220 亦属 HEV 型。

2.3 基因进化树分析

图 1 为 CCC220 与 32 株已知 HEV 的 ORF1、ORF2 和 ORF3 全基因序列的基因进化树分析图, 结果显示: 进一步证实 HEV-CCC220 属 HEV 型, 遗传距离与属于 HEV - 型的中国株、越南株、缅甸株和巴基斯坦株等相距甚远, 而与同属 HEV 型的 Japan JAK-Sai (AB074915)、Japan JKK-Sap (AB074917)、Japan JSN-Sap (AB091395) 和 China T1 (AJ272108) 相对较近, 但有一定的演化

距离, 呈现独立的分枝结构。由此可见, HEV-CCC220 有较高的基因异质性, 是 HEV 型的特殊类型, 可能是一种新型毒株。

目前 HEV 感染的检测方法虽然不断改进, 但是阳性率仍较低, 检测结果常与临床不相符。其原因是因为引物设计存在误区和对 HEV 的变异性认识不足。最近研究表明, HEV 型蛋白的抗原性与型蛋白的抗原性可能存在一定的差异, 以往的序列分析所用引物多源于型的保守区, 只能扩增 HEV 型。若在抗 HEV 抗体的诊断试剂中仅用型抗原, 则容易造成对型病毒感染的漏诊^[7]。另外, 不同地区 HEV 基因变异性较大, 而同一地区的 HEV 基因序列相对保守。因此, 对长春地区散发性 HEV 全基因 cDNA 的序列测定, 可以更好地了解 HEV 型在我国的分布情况以及长春地区 HEV 变异性, 为研制敏感、特异的 HEV 诊断试剂盒提供资料。

参考文献

- [1] ye T, Uchida T, Ma X Z, *et al.* Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China[J]. *Nucleic Acide Res*, 1992; 20; 3512.
- [2] uang C C, Nguyen D, Fernandez J, *et al.* Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV) [J]. *Virology*, 1992; 191: 550-554.
- [3] Schlauder G G, Dawson G J, Erker J C, *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(Pt3) :447-456.
- [4] Wang Y, Zhang H, Ling R, *et al.* The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3[J]. *J Gen Virol*, 2000; 81: 1 675-1 686.
- [5] Bi S L, Purdy M A, McCaustland, *et al.* The sequence of hepatitis E virus isolated directly from a single siurce during an outbreak in China[J]. *Virus Research*, 1993; 28: 233-247.
- [6] Wang Y, Ling R, Erker J C, *et al.* A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis[J]. *J Gen Virol*, 1999; 80(Pt1) :169-177.
- [7] Wang Y, Zhang H, Li Z, *et al.* Harrison TJ: Detection of sporadic cases of hepatitis E virus (HEV) infection in China using immunoassays based on recombinant open reading frame 2 and 3 polypeptides from HEV genotype 4[J]. *J Clin Microbiol*, 2001; 39: 4 370-4 379.
- [8] Huang R, 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.

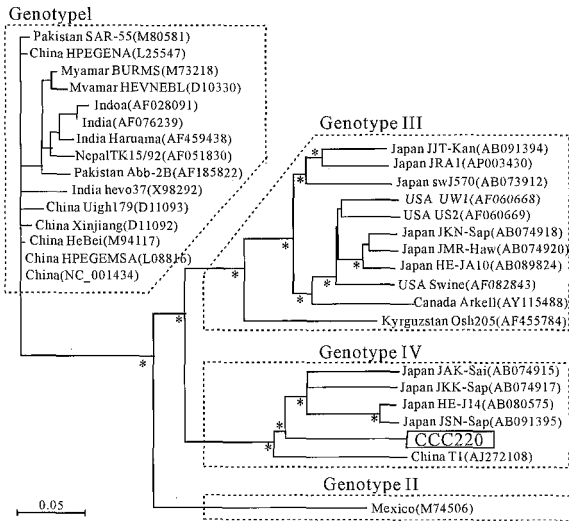


图 1 HEV 的 ORF1、ORF2 和 ORF3 全核苷酸序列的基因进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree (NJ) on the bases of complete ORF 1, 2, and 3 nucleotide sequence
The bifurcation nodes with a bootstrap score (1000 times) greater than 90% were indicated by asterisk. Accession number for each isolate is in the parenthesis.