

·临床研究·

庚型肝炎病毒不同地理株 5' 端非编码区 序列的变异性分析^①

李刚¹ 姚集鲁¹ 廖家杰² 姚春斓¹ 梁英杰³ 汤文辉⁴(1 中山医科大学传染病学教研室, 广州, 510630 2 香港大学玛丽医院胃肠肝病科, 香港
3 粤港肝炎研究中心, 广州 4 昆明医学院附属第一医院传染科, 云南)

摘要 目的: 为明确了解中国不同地区(广东、云南、香港)庚型肝炎病毒(HGV)株 5' 端非编码区(NCR)序列的差异。方法: 采用逆转录巢式聚合酶链反应(RT-PCR)技术, 从广东省 2 例、云南省 1 例、香港 3 例共 6 例 HGV 感染者血浆中扩增 HGV 5' NCR cDNA 片段, 为 238 bp, PCR 产物纯化后直接经双脱氧链末端终止法测定核苷酸序列。结果: 中国 HGV 株间 5' NCR 相应序列的同源性介乎 92.93%~97.98%, 与国外分离株比较, 同源性介乎 86.36%~91.92%。结论: 中国 HGV 株间 5' NCR 相应序列的同源性较大, 与国外分离株的同源性较小, 碱基变异在序列中呈散在分布, 部分区段变异较大; HGV 核酸变异与地域因素有关。

关键词 庚型肝炎病毒; 聚合酶链反应; 碱基序列; 变异(遗传学)

中图分类号 R 512.6

Diversity Analysis of 5' NCR Sequence of Hepatitis G Virus from Different Geographical Regions

Li Gang Yao Jilu Liao Jiajie Yao Chunlan Liang Yingjie Tang Wenhui

(Department of Infectious Diseases Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou 510630)

Abstract Objective: To explore the nucleotide sequence variation of 5' non-coding region (5' NCR) of hepatitis G virus (HGV) strains from different districts in China (including Guangdong province, Yunnan province, Hongkong). **Methods:** HGV RNAs derived from the plasmas of two patients with hepatitis non-A to E and one patient with hepatocellular carcinoma in Guangdong province, and an intravenous drug user in Yunnan province, and three patients with post-trans-plantation of bone marrow in Hongkong, totally 6 patients, were converted to cDNA by reverse transcription and subsequently amplified by polymerase chain reaction using 5' NCR primers. The products with 238 bp were purified and then directly sequenced. **Results:** The nucleotide homology of HGV 5' NCR was 92.93%~97.98% among strains isolated in China, and was 86.36%~91.92% between strains from China and several reported isolates from abroad. **Conclusions:** The homology was higher among strains isolated from China than that between strains from China and isolates from abroad. Nucleotide differences were distributed throughout the sequence, but striking diversity region was observed. Our results suggest that the nucleotide variation of HGV is associated with geographical factor.

Subject headings hepatitis G virus; polymerase chain reaction; base sequence; variation (genetics)

庚型肝炎病毒(HGV)是近年被国外学者证实的与肝炎相关的一种新型病毒。1995 年末 Leary 等报道从西非一个不明原因肝炎病人血浆中鉴定了一种新的黄病毒样肝炎病毒, 定名为 GBV-C^[1]。同一时

期 Linnen 等采用免疫筛选构建文库、分子克隆、巢式 PCR 等方法分别在 2 个美国病人(PNF 2161 和 R 10291)血浆中鉴定了一种新的黄病毒样肝炎病毒, 他们暂将其命名为 HGV^[2]。经分析 NS 3 区 331 bp 序列

后发现, GBV-C 与 HGV 核苷酸同源性为 85.5%, 氨基酸同源性为 100%。根据种系发生分析方法, 两者应属于同型肝炎病毒, 只是不同的变异株或亚型。HGV 为单股正义链 RNA 病毒, 基因组结构类似其他黄病毒, 如丙型肝炎病毒(HCV)、登革病毒等, 基因组全长约 9.4 kb, 由 5' 和 3' 非编码区及中间的结构蛋白和非结构蛋白编码区组成, 编码约 3 000 个氨基酸。HGV 是一种全球性分布的病毒^[3], 其不同国家或地区的变异情况是目前研究的热点。本文对来自中国广东、云南及香港的 6 株 HGV 5' NCR 进行了序列测定, 并分析他们的变异状况。

1 材料与方 法

1.1 血浆标本

2 份来自广州市, 1 份临床诊断为非甲乙丙丁戊型肝炎, 另 1 份为肝细胞癌; 1 份来自云南省昆明市某强制戒毒所一静脉吸毒者; 3 份来自香港骨髓移植患者。采得血浆在 -20°C 以下保存。

1.2 主要试剂

RNasin, AMV 逆转录酶, *Taq* DNA 聚合酶, 100 bp DNA Marker, Wizard PCR preps DNA purification system (Promega), Sequencing kit (ABI)。

引物: 根据 Genbank 中 GBV-C 序列 (U 36 380)、HGV PNF 2 161 株序列 (U 44 402) 及 HGV R 10 291 株序列 (U 45 966) 设计。位置及序列如下:

G1 5' ATGCGTGATGACAGGGTTGG 3' (+) (117-136, 按 PNF 2 161 株位置, 下同); G2 5' TAGGTGGCCCCATGCATTTCC 3' (-) (451-471); G3 5' GGTAGCCACTATAGGTGGGT 3' (+) (161-180); G4 5' CACTGGTCCTTGTCAACTCG 3' (-) (379-398)。G1, G2 为外引物, G3, G4 为内引物, 位于 5' NCR, 巢式扩增后产物为 238 bp。

1.3 逆转录聚合酶链反应^[4]

采用热变性法制备 RNA 模板^[3], 取待检血浆标本及阳性对照血浆标本各 100 μL , 分别加入裂解液 10 μL (成份: $\varphi_{\text{B}} = 0.005$ 2-巯基乙醇, 25 mmol/L MgCl_2), 95°C 15 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取裂解上清 10 μL 进行逆转录, 逆转录反应体积 20 μL , 内含引物 G 2 100 ng, AMV 逆转录酶 10 U, 0.25 mmol/L dNTP 2 μL , RNasin 40 U, $10 \times$ buffer 2 μL , 42°C 45 min。第 1 次 PCR 反应体积为 40 μL , 含逆转录液 20 μL , 引物 G1 100 ng, G2 50 ng, 0.25 mmol/L dNTP 4 μL , $10 \times$ buffer 4 μL , *Taq* DNA 聚合酶 2 U。在 94°C 30 s, 55°C

30 s, 72°C 40 s 循环 30 次, 72°C 延伸反应 7 min。第 2 次 PCR 反应体积为 50 μL , 内含第 1 次 PCR 反应液 10 μL , 引物 G3 100 ng, G4 100 ng, 0.25 mmol/L dNTP 5 μL , $10 \times$ buffer 5 μL , *Taq* DNA 聚合酶 2 U, 循环条件同第 1 次 PCR。取 10 μL 在含溴化乙锭的 $\varphi = 0.02$ 琼脂糖凝胶中电泳, 对照分子量标志, 在紫外灯下观察结果。

1.4 PCR 产物测序

取 PCR 产物 50 μL 按测序试剂盒所述方法纯化, 然后与特异引物混合、变性、冷却, 再与标记脱氧核苷酸混合进行双脱氧链末端终止反应, 用 *Taq* DNA 聚合酶引导测序反应, 具体方法按试剂盒说明。制备 $\varphi = 0.06$ 变性聚丙烯酰胺凝胶, 样品在 373A DNA 全自动测序仪 (ABI) 上电泳测定核苷酸序列, 同一片段经正反两方向测定。

2 结 果

2.1 PCR 产物的获取

HGV RNA 经热变性后释放到裂解上清液中, HGV 特异负链外引物 (G2) 引导逆转录反应, 合成 cDNA, 第 1 次 PCR 用外引物 G1, G2 扩增, 第 2 次 PCR 用内引物 G3, G4 扩增, 巢式扩增产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下溴化乙锭染色可见单一条带, 与标准分子量作对照, 其大小与预期的 238 bp 相符 (见图 1)。

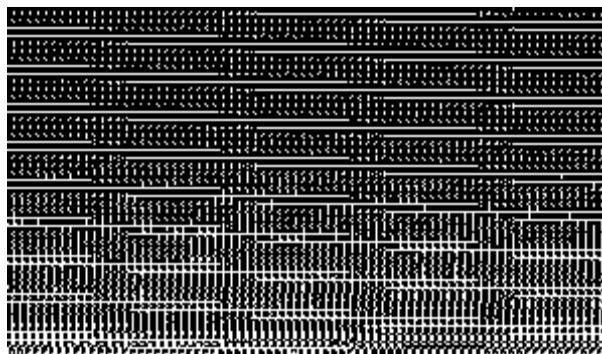


图 1 HGV 经 RT-PCR 获得的产物

Fig. 1 Amplified product from HGV by RT-PCR

Lane 1, 3, 5, 6: positive product; Lane 2, 4, 7: negative samples; Lane 8: 100 bp DNA ladder; Lane 9: positive control (238 bp)

2.2 HGV 中国株 5' NCR cDNA 核苷酸序列及其与国外已知分离株的比较

见图 2; 同源性分析, 见表 1。

```

HGV-GD      ggtagccactatagglgggt CTTAAGGGTT GGTCAAGGTC CCTCTAGCGC 210
HGV-GDCA      .....G ...T.....G....
HGV-YN      .....T .....G....
HGV-H10      .....G....
HGV-H8      .....T.....G....
HGV-H120     .....T.....G....
PNF 2161     .....A.AA ...T...A.T .....T.T..
R10291      .....A.AA ...T...A.T .....T.T..
GBV-C      .....GA ..CT.C.....T....

TTGTGGCGAG AAAGCGCACG GTCCACAGGT GTTGGCCCTA CCGGTGTGAA TAAGGGCCCG 270
.....T C.....
.....
.....TT .....
.....T .....
.....A T.TT.....CG.....A.....
C..C.....CC.....G.....
C..C.....CC.....G.....
A.A...A.GA .....T.....A....

ACGTCAGGCT CGTCGTTAAA CCGAGCCCAT TACCCACCTG GGCAAACAGC GCCCAGTAC 330
.....C ..A.....A.....
.....GA.....T.....
.....A.....
.....A.....
.....A.....
.....G.....GA.....
.....G.A...G.....GA.....
G..CT...A ..C.....G...T.C...GA.....

GGTECCAGTC GCCCTACAAT GTCTCTCTTG ACCAATAGGC TTTGCCGG gctcaactgttccctgggtcac 398
.....T.....
.....T.....
.....
.....T.....A.....
.....T.....A.....
.....T.....G.A.....
.....T.....G.....A.....
.....T.....G.A.....

```

图 2 HGV 不同地理株 5' NCR cDNA 相应序列的比较。

Fig. 2 Comparison of HGV 5' NCR cDNA sequences from different strains

Small letter stands for sequence of primers; Dot indicated identity with sequence of HGV-GD; HGV-GD, HGV-GDCA: HGV Guangdong strains; HGV-YN: HGV Yunnan strain; HGV-H10, HGV-H8, HGV-H120: HGV Hongkong strains; PNF 2 161, R 10 291, GBV-C: HGV strains from abroad

表1 HGV 不同地理株 5' NCR cDNA 序列的同源性分析

Table 1 Homology analysis of HGV 5' NCR cDNA sequences from different strains (%)

	HGV-GDCA	HGV-YN	HGV-H10	HGV-H8	HGV-H120	PNF2161	R10291	GBV-C
HGV-GD	95.45	896.97	97.98	96.97	93.94	90.40	89.39	86.87
HGV-GDCA		94.44	96.46	97.47	94.44	90.40	89.39	87.37
HGV-YN			96.97	95.96	92.93	90.91	89.90	86.36
HGV-H10				97.98	94.44	89.90	88.89	87.37
HGV-H8					96.46	91.92	90.91	88.89
HGV-H120						89.39	88.38	86.36
PNF2161							97.98	87.37
R10291								85.86

3 讨论

HGV 是继甲乙丙丁戊型肝炎病毒之后最近被证实的一种新型肝炎病毒,其传播途径类似 HCV,主要经肠道外传播,输血和不洁注射是获得感染的重要途径^[6]。据国外报道,HGV 在人群的感染率不低於 HCV,感染后可致持续病毒血症,大多数临床症状轻微。目前对 HGV 的特性、形态、致病作用等仍有待阐明,由于 GBV-C 和 HGV(PNF 2161 和 R 10291)是不同机构的研究结果,其命名有待进一步确定。

HGV 全基因组序列已被测定,其基因组结构类似其他黄病毒,为单股正义链 RNA,在核酸变异方面,HGV 株间同源性约 85%~90%,氨基酸同源性为 97%~100%,同一基因组的不同部位变异程度有所不同,5' NCR 较保守,结构蛋白区变异较大,非结构蛋白区中螺旋酶、蛋白酶及依赖 RNA 的 RNA 多聚酶的编码区有保守基序^[4]。HGV 在我国的研究尚在起步阶段,有关我国 HGV 株的变异情况仍不清楚。

本文分别从广东、云南和香港共 6 例 HGV 感染者血浆中扩增 HGV 5' NCR 基因,获得 238 bp 的片段,测定他们的核苷酸序列,比较序列后发现,同源性介乎 92.93%~97.98%。根据种系发生分析法,6 个 HGV 株应属于同一亚型。中国 HGV 株与国外已知分离株相应序列比较后发现,同源性介乎 86.36%~91.92%,比西非株(GBV-C)同源性较小,比美国株同源性较大。中国 HGV 株间同源性比中国株与国外株间的同源性大。株间不同的碱基呈散在分布,较大变异区位于第 187~223 位

核苷酸(按 PNF 2161 株位置),其他区段属高度保守区,只有散在的碱基变异,结果证实,HGV 核酸变异与地域因素有关。

HGV 在血液中滴度很低,其基因组必须经过 PCR 扩增后才能检测到,目前确立 HGV 感染的主要手段是 RT-PCR,由于 5' NCR 序列的保守性,设计 PCR 引物时多选择此区段,可提高检测的敏感性,本文测定的 HGV 5' NCR 序列可为设计适合我国 HGV 株检测的引物提供依据。

(感谢中山医科大学达安基因诊断中心的李全贞和任秀容老师在测序方面提供的帮助)

参 考 文 献

- 1 Leary T P, Muerhoff A S, Simons J N, *et al*. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the Flaviviridae associated with human non A-E hepatitis. *J Med Virol*, 1995, 48: 60
- 2 Linnen J, Wages J, Zhang keck Z Y, *et al*. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996, 271: 505
- 3 Nakatsui Y, Shin J W K, Tanaka E, *et al*. Prevalence of hepatitis G virus (HGV) in Japan. *AASLD abstract*. *Hepatology*, 1995, 22(4) pt2: 182A
- 4 李 刚,姚集鲁,陈 青,等.一种新型肝炎病毒——庚型肝炎病毒的 cDNA 克隆. *中山医科大学学报*, 1996, 17(3): 237
- 5 高志良,姚集鲁.热变性 HCV RNA 模板直接法扩增. *中山医科大学学报*, 1994, 15(3): 68
- 6 Kim J P, Linnen J, Wages J, *et al*. Identification of a new hepatitis virus (HGV) and its implication in post transfusion hepatitis. *AASLD abstract*. *Hepatology*, 1995, 22(4) pt 2: 18A

(1998-03-02 收稿 1998-10-06 修回)