

· 简报 ·

# HCV 广东株基因组部分片段的序列测定<sup>①</sup>

李刚<sup>②</sup> 姚集鲁 彭文伟 吕凌 王斌<sup>③</sup>

(中山医科大学传染病学教研室,广州,510630)

**关键词** 丙型肝炎病毒(HCV); 逆转录聚合酶链反应; 分子克隆; DNA 序列测定

**中图分类号** R512.62; Q523.1

采用逆转录聚合酶链反应技术,从广东省阳春县一名慢性丙型肝炎病人血清中扩增 HCV NS1 区部分片段并将其插入 M13 噬菌体。通过双脱氧链末端终止法对其序列进行测定。与国内外多个株比较,同源性介乎 68.86%~90.84%。

## 1 材料和方法

### 1.1 血清标本

取自广东省阳春县 43 岁男性患者,临床诊断为慢性活动性丙型肝炎。无输血史。

### 1.2 主要试剂

AMV 逆转录酶, RNasin, Taq DNA 聚合酶, M13 噬菌体(华美公司)。随机引物,低熔点琼脂糖, T4DNA 连接酶(BRL 公司)。Hind III, Pst I (BM 公司)。引物由上海细胞生物学研究所合成,序列见后。

### 1.3 PCR 产物的获取

血清中 HCV RNA 经文献 1 方法(改进)抽提后,随机引物逆转录为 cDNA,聚合酶链反应在 93℃ 30s, 55℃ 30s 72℃ 1min 中进行 32 次循环。产物经电泳后在紫外灯下观察。

### 1.4 PCR 产物的分子克隆<sup>[2]</sup>

用内切酶 Hind III 和 Pst I 消化 M13mp18, M13mp19 及 PCR 产物,然后在低熔点琼脂糖中电泳,切下相应条带处的凝胶。连接反应直接在低熔点琼脂糖凝胶中进行。16℃ 过夜连接后转化 JM 109, 37℃ 平板培养 8h,挑取多个噬菌斑在 37℃ 振荡 5h。培养液离心后取上清提取单链噬菌体,沉淀提取双链噬菌体。用酶切法及 PCR 法筛选鉴定阳性克隆。

### 1.5 DNA 序列测定

单链 M13 DNA 模板通过双脱氧链末端终止法在 373A DNA 全自动测序仪(Applied Biosystems 公

司)上测定核苷酸序列。测序时采用 Taq DNA 聚合酶及荧光标记的通用引物。同一片段经正反两方向多次重复测定。

## 2 结果

HCV 广东株 NS1 部分片段的核苷酸序列与其它 HCV 分离株相应区段序列的比较见图。

## 3 讨论

HCV 核酸存在广泛的异质性,不同国家、不同地区的 HCV 株核酸序列有所差异,核酸变异可能与疾病严重性、引起丙肝慢性化及导致肝细胞瘤的频率等具有某种相关性。克隆和阐明广东地区流行的 HCV 株核酸序列及其变异对本地区 HCV 的分子流行病学及疫苗研制有一定的参考意义。

本文从一份来自广东阳春县无输血史的丙型肝炎病人血清中扩增并克隆到一段 273bp 的 HCV 基因组 NS1 区片段。经序列测定后发现,广东株该区段与河北株、台湾株、美国原型株、日本 4 个株的同源性分别为: 89.74%, 90.84%, 71.43%, 86.81%, 87.91%, 70.33%, 68.86%。提示该区段属高变区,可将各毒株加以区别。同时亦表明,我国各毒株间的变异较小,但广东株与美国及日本某些分离株间变异较大。

(本文测序工作得到中国预防医学科学院病毒学研究所陈南溥博士的帮助,特此致谢)

## 参 考 文 献

1 Yamada O, Matsumoto T, Nakashima M, et al. A new method for extracting DNA or RNA for

① 广东省科委基金资助  
② 第一作者, 29 岁, 男, 在职博士生  
③ 中山医科大学基础学院免疫学教研室

polymerase chain reacton. J Virol Methods. 1990,27:203

Spring Horbor Laboratory Press. 1989,201~227

2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. Molecular Cloning, A laboratory manual. Cold

(1994-02-24 收稿 1994-03-08 修回)

1444 cagaagctlltattgctggcactacGCACCCCGGCCGTGCGGTATCGTACCCGCGTCGTGGGTGTGCGGTCCAGTGTATT

HCV-HB -G-T-AAA-C-T-G
HCV-T -T-C-T-G
HCV-1 C-C-AAAA-T-T-G-AA-A-T-T-G-A
HCV-J -G-T-A-G-G-T-C-T
HCV-BK C-T-CA-AA-TACC-T-G-C-C
HC-J6 C-AA-A-A-T-G-A-CT-AGC-CT-T-C-C
HC-J8 C-C-GA-T-C-C-G-TAG-AC-T-A-G-C

1523 GCTTCACCCCAAGCCCTGTGTGGTGGGACGACCGATCGCTCCGGTGTCCCTACGTATACGTTGGGGGAGAATGAGAC

-T-C-C-T-T-C-A-GC
C-T-T-C-GC
T-C-C-G-A-A-CA-G-G-C-CG-C-C-C-GC-T-A-T
T-G-T-T-C-CT-GC
C-C-T-T-GA-C
-T-C-A-A-A-T-A-T-A-CG-C-T-C
-T-T-C-C-T-CAAGCAG-C-A-C-C-C-A-A-C

1602 AGACGTGCTGCTTCTCAACAACACGCGGCCCGCAAGGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGGGTTCC

C-T
G-A-C-T-A-A
G-CT-CG-C-T-T-CA-A-TG-T-T-C-CTCA-A
A-T-G-T-T-G-C-G-CA
T-G-C-A-C
-T-CT-C-AT-G-G-T-A-A-G-GTCA-C-G-CTC-C-A
C-T-CT-C-G-A-T-G-AA-A-C-G-AGCT-C-C-C-G

1681 ACCAATACATGCGGGGGCCCCCTGTAAACATTGGGGGTTCCGGCAACAACACCTTGACCTgccccacggattgctgcagaaa

G-G-G-T-G-C-G-T-T
G-G-G-C-GG-GT
AGTG-A-CG-T-T-GT-C-A-GCG-C-CA
G-G-T-G-C-C-G-GT
G-T-G-G-C-G-C
G-T-C-CA-A-CCG-A-CTGA-TT-TGC-G-TTG
-T-G-T-CA-A-T-CCG-A-AAAGA-TA-G-T-ATTG

附图 HCV 广东株 NS1 部分片段的核苷酸序列与其它 HCV 分离株相应区段序列

小写为两端引物位置。自上而下依次为:HCV 广东株,HCV 河北株,HCV 台湾株,HCV-1(美国原型株),HCV-J,HCV-BK, HC-J6,HC-J8(均为日本株)