

· 实验研究 ·

# 丙型肝炎病毒基因高变区(E1,E2/NS1)的分子克隆及基因型鉴定<sup>①</sup>

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

(中山医科大学传染病学教研室,广州,510630)

**提 要** 对广东省一个患者血清中的丙型肝炎病毒(HCV)基因高变区进行分子克隆及基因型鉴定。采用微粒吸附法提取 HCV RNA,随机引物逆转录后进行聚合酶链反应(PCR)。所用引物位于 E1,E2/NS1 区,扩增产物 806bp,产物提纯后定向插入 pBV220 质粒载体,重组体转染 DH5 $\alpha$  菌株,筛选菌落经增殖后碱变性法提取质粒,再通过 PCR 及酶切法鉴定阳性克隆。我们还用酶切法对此株克隆的基因型作了初步鉴定,证明属于 1 组 I 型。

**主题词** 肝炎病毒, 丙型; 克隆, 分子; 基因型

**中图分类号** R512.62; Q523.1

HCV 是单股正链 RNA 病毒,1990 年国际病毒命名委员会将 HCV 归为黄病毒科丙型肝炎病毒属。其基因组全长约 9.4kb,各基因区的功能和变异程度不同<sup>[1]</sup>。E1,E2/NS1 区内含两个高变区<sup>[2]</sup>,与 HCV 逃避机体免疫攻击密切相关,其变异可能涉及丙肝慢性化或癌变。有学者认为此高变区可刺激机体产生保护性抗体,对疫苗研制有潜在应用价值。HCV 基因型可分为 3 个组 5 个型<sup>[3]</sup>,不同基因型对干扰素的反应性,慢性化倾向,临床表现等可能具有一定程度的相关性。作者对广东地方株的 HCV 基因高变区(E1,E2/NS1)进行了分子克隆和型别鉴定,为核酸变异性分析,基因表达和疫苗研制等做好前期工作。

## 1 材料和方法

### 1.1 血清标本

来自广东阳春县 43 岁男性患者,临床诊

断为慢性活动性丙型肝炎,肝硬化。抗-HCV 阳性,谷丙转氨酶为 110 单位(赖氏法)。

### 1.2 主要试剂

AMV 逆转录酶, RNasin(华美公司)。Taq DNA 聚合酶(复旦大学遗传所)。随机引物,低熔点琼脂糖,Pst I(BRL 公司)。琼脂酶,EcoR I, BamH I, Nco I, X-gal, IPTG, RNase(Boehringer Mannheim 公司)。T<sub>4</sub>DNA 连接酶, Sal I,  $\lambda$ DNA/Hind III + EcoR I, pBR322/Hinf I, Bcl I(Promega 公司)。pBV220, DH5 $\alpha$  由中国预防医学科学院病毒学研究所赠送。引物由上海细胞生物学研究所合成,序列及位置如下:

LG1:5' TGGAATTCGATGATGAAC  
TGGTC 3'(958-980)(+)

LG2:5' CAGAAGCTTTATTGCTGG  
CACTAC 3'(1444-1467)(+)

LG3:5' TTTCTGCAGCAATCCGTG  
GGGCA 3'(1763-1741)(-)

① 本课题由广东省科委和学校科研基金资助

② 第一作者,1964 年出生,男,在读博士,医师

③ 中山医科大学基础学院免疫学教研室

### 1.3 HCV RNA 提取、逆转录、PCR

采用微粒吸附法提取 HCV RNA<sup>[4]</sup>。血清 100 $\mu$ l 加入微粒吸附剂 15 $\mu$ l, 裂解液 300 $\mu$ l, 室温放置 1h, 间中摇匀几次。4 000r/min 离心 30s, 弃液相, 用 1ml 70%酒精洗一次, 弃酒精后吹干。加入随机引物 300ng, AMV 逆转录酶 10 单位, 0.25mmol/L dNTP(三磷酸脱氧核苷酸)3 $\mu$ l, RNasin(核糖核酸酶抑制剂)40 单位, 10 $\times$ 反应缓冲液 3 $\mu$ l, 逆转录反应体积 30 $\mu$ l, 42 $^{\circ}$ C 1h, 间中摇匀几次。离心后吸出液相作 PCR 模板, PCR 总反应体积 50 $\mu$ l, 内含特异引物 LG1, LG3 各 100ng, 0.25mmol/L dNTP 5 $\mu$ l, 5 $\times$ 反应缓冲液 10 $\mu$ l, Taq 聚合酶 2 单位。在 93 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min 循环 32 次, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸反应 7min。取 10 $\mu$ l 电泳, 在紫外线灯下观察结果。

### 1.4 PCR 产物的分子克隆<sup>[5]</sup>

用内切酶 EcoR I 及 Pst I 消化 pBV220 和经酚、氯仿抽提的 PCR 产物, 然后在低熔点琼脂糖中电泳, 切下相应条带处的琼脂糖凝胶, 经琼脂酶处理后酒精沉淀 DNA。连接反应在总体积 20 $\mu$ l 中进行, 内含 pBV220, PCR 产物, DNA 连接酶 1.5 $\mu$ l, 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。加入 80 $\mu$ l DH5 $\alpha$  钙化菌, 转化过程按文献 5 方法。转化菌在 LBA 平皿中培养, 第 2 天观察菌落, 挑取 6 个克隆在液体培养基中增殖, 碱变性法提取质粒, 然后用 PCR、半巢式 PCR 及单、双酶切鉴定阳性克隆。

### 1.5 酶切法鉴定基因型

经筛选鉴定的重组质粒 pBL806 分别用内切酶 BamH I, Bcl I, Nco I, Sal I 消化, 以鉴定紫 HCV 克隆的基因型。

## 2 结果

### 2.1 PCR 产物的获取

HCV RNA 经微粒吸附剂抽提后, 随机引物逆转录为 cDNA, 采用一次 PCR 方法扩增 806bp 长片段, 在 1%的琼脂糖中电泳, 紫外灯下 EB 染色可见单一条带, 与标准 DNA

分子量对照, 其大小与预期相符(图略)。

### 2.2 HCV 阳性克隆的鉴定

HCV 高变区的 806bp 片段插入 pBV220 载体的多克隆位点 EcoR I 和 Pst I 之间, 重组质粒 pBL806 经 EcoR I 单酶切后与空载体 pBV220 比较, 电泳时跑得较慢。EcoR I 及 Pst I 双酶切后电泳, 见切出一条带, 与预定 806bp 相符(图 1)。

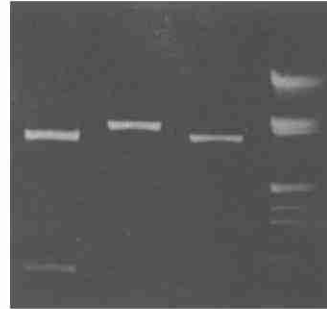


图 1 酶切鉴定阳性克隆

M: DNA 分子量标准( $\lambda$ DNA/Hind III + EcoR I)

1: 空载体 pBV220 经 EcoRI 消化

2: 重组体 pBL806 经 EcoRI 消化

3: 重组体 pBL806 经 EcoRI 及 Pst I 消化

另外, 我们以重组质粒为模板, 用特异引物 LG1, LG2, LG3 作 PCR 及巢式 PCR 扩增, 获得产物片段 806bp 和 320bp(图 2)。



图 2 PCR 及巢式 PCR 鉴定阳性克隆

M: DNA 分子量标准(pBR322/Hin I)

1: 重组体 pBL806 经引物 LG1, LG3 扩增

2: 重组体 pBL806 经引物 LG2, LG3 扩增

### 2.3 基因型鉴定

pBV220 内有 BamH I, Bcl I, Sal I 切点, 无 Nco I 切点, pBV220 插入 806bp 片段后在多克隆位点的 BamH I, Sal I 切点消失, 剩下一 Bcl I 切点。重组质粒经 Bcl I 酶切后成线性, 未切出片段, 说明插入片段内无 Bcl I 切点。经 BamH I 及 Pst I 双酶切, 切出一片段约 745bp, 说明插入片段内有一 BamH I 切点。经 Nco I 消化后成线性, 插入片段亦有一 Nco I 切点。重组质粒未能被 Sal I 消化(图 3)。



图3 酶切鉴定 HCV 基因型

M:λDNA/Hind III + EcoR I

1. pBV220 经 EcoR I 消化 2. pBL806 经 Bcl I 消化  
3. pBL806 经 BamH I 及 Pst I 消化 4. pBL806 经 Nco I 消化  
5. pBL806 经 Sal I 消化

与计算机分析的型特异的保守酶切位点比较, 此广东 HCV 株属于 1 组 I 型。

### 3 讨论

利用核苷酸序列分析软件 DNASIS、ING6PD 对 EMBL 和 GenBank 中的 HCV 核苷酸序列及我们输入的 HCV 序列资料(共约 20 株 HCV 的序列)进行分析, 在高变区内(E1, E2/NS1)挑选了 3 个多种基因型保守的寡核苷酸作为引物。在引物的 5' 末端分别设计有 EcoR I 和 Pst I 位点, 以便定向克隆于质粒载体。

HCV 在血清中滴度极低, 在人血液中的感染滴度约为  $10^3$  CI<sub>50</sub>/ml(黑猩猩半数感染量), 而 HCV RNA 在抽提过程中易被 RNA

酶破坏。我们设计的扩增片段在 E1, E2/NS1 高变区, 超过 800bp, 不像 5' 末端非编码区的片段容易获得, 同时, 为了提高 HCV 核苷酸序列的保真度, 避免 TaqDNA 聚合酶所致的错误配对。我们采用一次 PCR 方法, 而不用巢式 PCR。为获取尽可能多的 HCV RNA, 我们运用微粒吸附法(经文献 4 改进)吸附血清中的核酸, 并直接在吸附剂上用随机引物进行逆转录。实验证明, 此法简便、快速、成本低, 在获取 HCV RNA 及长片段 cDNA 中较常规酚、氯仿抽提法更优越。

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, 各地流行的基因型不尽相同, 而基因型与临床表现、预后、对干扰素治疗反应及疫苗研制等可能存在相关性<sup>[6]</sup>。我国已分离的河北株, 上海株, 台湾株, 北京株相互间核酸序列亦有较大差异。广东地区流行的 HCV 基因型尚未见报道。1992 年 Chan 等对已发表的 30 余份 HCV 基因组序列资料进行计算机分析<sup>[3]</sup>, 将 HCV 分 3 个组 5 个型, 1 组包括 I 型(PT)和 II 型(K1), 2 组包括 III 型(K2a)和 IV 型(K2b), 3 组为作者新发现的, 暂称为 V 型。HCV 基因分型主要采用酶切法, PCR 法和序列分析法。其中序列测定技术要求高, 耗时多, 花费昂贵。PCR 法至少需合成 7 个引物, 花费大, 如引物 3' 末端有一碱基变异即影响稳定性。而酶切法简便、快速、稳定。Nakao 等利用内切酶在 5' 非编码区分型<sup>[7]</sup>, Enomoto 在 NS5 区进行分型<sup>[8]</sup>。我们则利用内切酶消化 E1, E2/NS1 高变区中的保守序列, 对克隆进 pBV220 的 HCV cDNA 的基因型别作了鉴定。首先采用 DNASIS 分析所有已知 HCV 株该区段的酶位点, 发现有 1 组保守特异的 BamH I 和 Nco I 切点, 分别位于编码区的 1016 和 1088 位。1 组 I 型特异的 Sal I 和 Bcl I 切点, 分别位于 1141 和 1238。2、3 组均无以上切点。用这些内切酶消化克隆进 pBV220 内的片段。结果显示, 此片段能被 BamH I 和 Nco I 消化, 而不能被 Bcl

I 和 Sal I 消化,证明此广东 HCV 克隆属于 1 组 I 型。

我们所克隆的 E1, E2/NS1 片断变异程度最大,内含两个高变区,此区变异被认为是 HCV 逃避机体免疫攻击,使病毒在体内持续存在,导致丙肝慢性化和肝细胞癌的原因。同时,其中一个高变区为潜在的具有抗原性的位点,可能刺激机体产生保护性抗体(第 4 届东京国际肝病会议资料)。该区变异对有效疫苗的研制很重要,根据当地流行的基因型制备疫苗据认为是一种可行的预防措施,但尚须进一步的探讨。

### 参 考 文 献

- 1 Houghton M, Weiner A, Han J, et al. Molecular biology of hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*. 1991, 14(2): 381
- 2 Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, et al. Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res*

*Comm*. 1991, 175(1): 220

- 3 Chan SW, Mcomish F, Holmes EC, et al. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J General Virology*. 1992, 73: 131
- 4 Yamada O, Matsumoto T, Nakashima M, et al. A new method for extracting DNA or RNA for polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 1990, 27: 203
- 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. *Molecular cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
- 6 Pozzato G, Moretti M, Franzin F, et al. Severity of liver disease with different hepatitis C viral clones. *Lancet*. 1991, 338: 509
- 7 Nakao T, Enomoto N, Takada N, et al. Typing of hepatitis C virus genome by restriction fragment length polymorphism. *J General Virology*. 1991, 72: 2105
- 8 Enomoto N, Takada A, Nakao T, et al. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem Biophys Res Comm*. 1990, 170: 1021

(1994-02-21 收稿 1994-10-28 修回)

## MOLECULAR CLONING AND GENOTYPE IDENTIFICATION OF HEPATITIS C VIRUS VARIABLE GENOMIC REGION (E1, E2/NS1)

Li Gang Yao Jilu Peng Wenwei Wang Bin Lu Ling

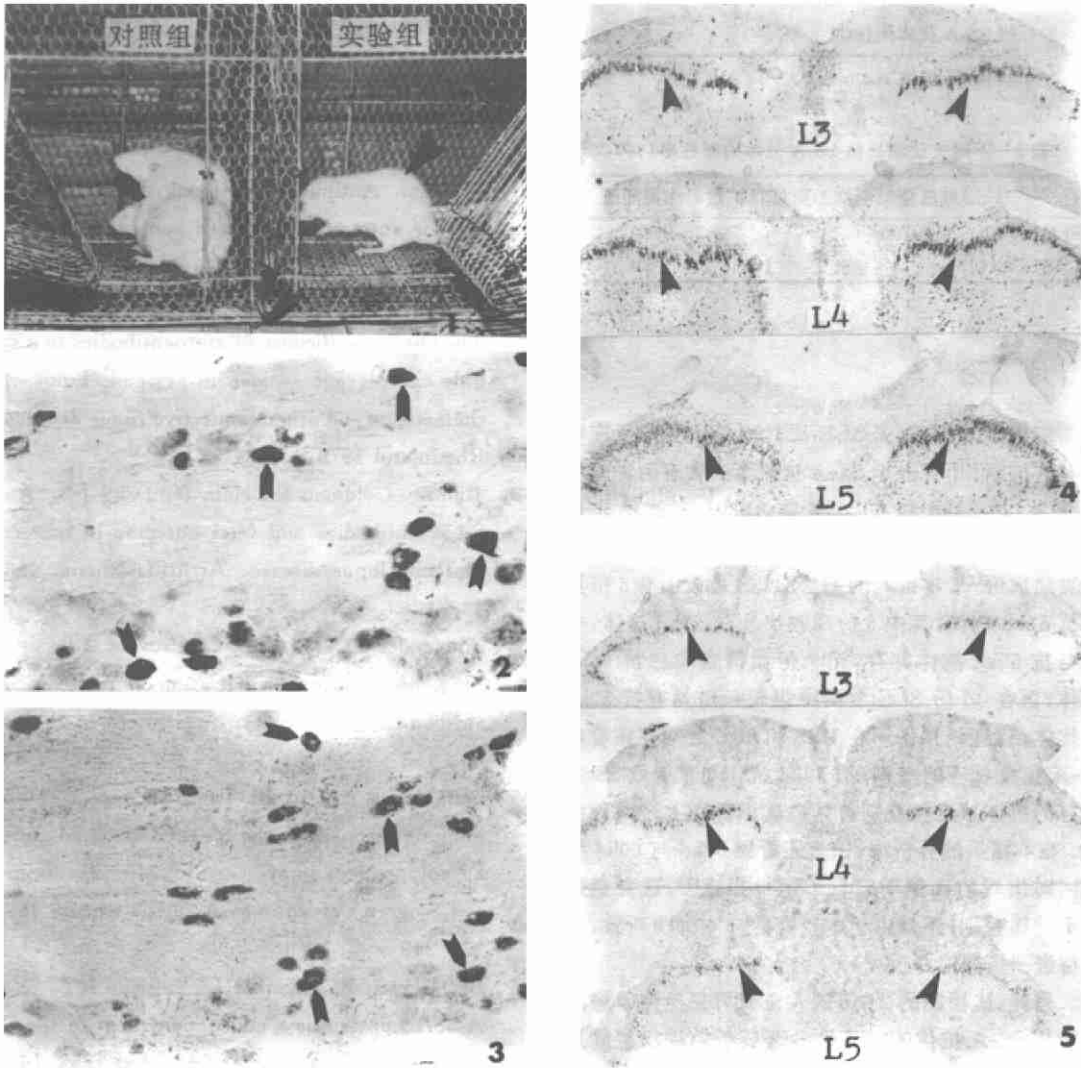
(Department of Infectious Diseases, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

The variable genomic region of the hepatitis C virus (HCV) derived from the serum of a patient in Guangdong province was cloned and its genotype was identified. HCV RNA extracted by powder-adsorption procedure was converted to cDNA by reverse transcription with random primer. Polymerase chain reaction (PCR) was performed with the primers which span the region between E1 and E2/NS1. Amplified product with 806bp was subsequently isolated, purified, and inserted into pBV220 plasmid vector by directional cloning. After transfecting DH5  $\alpha$  strain, the recombinant pBV220 was isolated by the alkaline denaturation from screened clones after propagated in DH5  $\alpha$  cell. The positive clones were identified by PCR and digestion of restriction endonuclease. We also determined primarily the genotype of the Guangdong HCV strain by restriction enzyme. These studies revealed that it was classified as genotype I of group 1.

**Subject headings** hepatitis C virus; cloning, molecular; genotype

## 吗啡对大鼠背根节和脊髓抗氟化物酸性磷酸酶活性的影响

(正文见第 13 页)



- 图 1 对照组和实验组大鼠出现躯体情况的比较,示实验组大鼠正在发生躯体(箭头)  
 图 2 对照组大鼠 L<sub>1</sub> 背根节,示含有 FRAP 阳性反应物的小神经元(箭头)。 10×10  
 图 3 实验组大鼠 L<sub>1</sub> 背根节,示含有 FRAP 阳性反应物的小神经元(箭头)。 10×10  
 图 4 对照组大鼠 L<sub>3</sub>、L<sub>4</sub>、L<sub>5</sub> 脊髓 I 板层 FRAP 分布(箭头)。 10×4  
 图 5 实验组大鼠 L<sub>3</sub>、L<sub>4</sub>、L<sub>5</sub> 脊髓 I 板层 FRAP 分布(箭头)。 10×4