

· 基础论著 ·

维吾尔族 D 型乙型肝炎病毒株全基因克隆研究

鲁晓擘 李纲 汤影子 刘霖 张跃新

【摘要】 目的 进行新疆维吾尔族 D 型乙型肝炎病毒(HBV)全基因克隆。
方法 提取慢性 HBV 患者血清中的病毒 DNA, 以聚合酶链反应(PCR)对 HBV 的全基因组进行扩增, 克隆入 pUCM-T 载体, 并对测序结果进行比对分析。结果

通过 HBV 全基因克隆化研究, 获得我国首例维吾尔族慢性 HBV 感染者 D 型 HBV 病毒株的全基因序列。其基因组全长为 3174 碱基对(bp), 与目前 D 基因型参照序列比较同源性约为 92% ~ 98%, 位于 1760 ~ 1768 位出现 9 个碱基的缺失, 与一株来自中国的 D/C 重组基因型(GenBank 登录号: AY862865)序列比较同源性约为 91%。氨基酸序列分析其血清型为 ayw 2 型。
结论 新疆维吾尔族 D 基因型 HBV 病毒株有其自身特点。

【关键词】 维吾尔族; 乙型肝炎病毒

Analysis of genome sequence of a genotype D strain of HBV from Uighur patient in Xinjiang LU Xiao-bo*, LI Gang, TANG Ying-zhi, LIU Lin, ZHANG Yue-xin.

* Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Corresponding author: ZHANG Yue-xin, Email: zhangyx3103@163.com

[Abstract] **Objective** To determine the complete genome sequence of a genotype D strain of HBV from Uighur patient with chronic hepatitis B in Xinjiang. **Methods** The complete nucleotide sequence of a HBV derived from a Uighur patient with chronic hepatitis B was amplified by PCR, cloned into pUCM-T vector, and analyzed. **Results** The complete nucleotide sequence of Xinjiang HBV strain is 3174 bp. The complete nucleotide homology is 92% ~ 98% compared with the published sequence of genotype D strains, deletion of 9 bp was found in nt 1760 to nt 1768, 91% with the published sequence of genotype D/C recombinant HBV strains from China. This Xinjiang HBV strain belongs to ayw 2 serotype. **Conclusions** The genome sequence of a genotype D strain of HBV from Uighur patient with chronic hepatitis B was cloned for the first time, which has its own character.

【Key words】 Uighur; Hepatitis B virus

基金项目:新疆科技厅软科学基金资助项目(编号 960505003)

作者单位:830054 新疆医科大学第一附属医院感染科(鲁晓擘、张跃新);第三军医大学西南医院感染科(汤影子、刘霖);新疆武警总队医院感染科(李纲)

通讯作者:张跃新 Email: zhangyx3103@163.com

已有的研究工作提示^[1],新疆维吾尔族慢性HBV感染者HBV的优势基因型是D型。因此本研究将主要进行D型HBV全基因克隆,欲得到我国首例维吾尔族D型HBV全基因序列,并利用生物信息学技术分析新疆株HBV D基因型病毒株的病毒学特征,为今后工作奠定基础。

材料与方法

一、材料

1例维吾尔族慢性乙肝患者,来自新疆医科大学第一附属医院感染科。诊断符合我国2000年《病毒性肝炎防治方案》标准。采集血清,-20℃冻存。主要临床资料如下:男,17岁,基因型为D型(PCR-SSP法),接受拉米夫定治疗2年,停药后反弹;血清HBV DNA 1.5×10^8 拷贝/ml,HBsAg、HBeAg、抗-HBc为阳性;TBil 27.3 μmol/L, ALT 106 U/L, AST 98 U/L。

二、主要试剂

LA Taq DNA聚合酶,内切酶Eco R I购自日本TaKaRa公司。DNA纯化回收试剂盒购自博大泰克公司。质粒DNA小量纯化试剂盒,TA克隆试剂盒购自上海生工公司。引物^[2]由上海生工生物技术公司合成,序列为:P1:5'CCGGAAAGCT-TGAGCTCTTCTTTCACCTCTGCCTAATCA-3'(nt 1821~1841),P2:5'CCG-GAAAGCTTGAGCTCTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGG-3'(nt 1823~1806)。受体菌TOP 10由第三军医大学全军感染病研究所制备,参考Inoue等^[3]报道的SEM(simple and efficient method)法。

三、HBV全基因扩增

采用标准碱裂解-蛋白酶K消化-酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)方法进行HBV DNA提取,然后进行PCR扩增。50 μl反应体系:DNA模板2 μl,引物P1、P2各0.5 μl,10×Buffer(不含Mg²⁺)5 μl,MgCl₂ 5 μl,2.5 mM的dNTPs 8 μl,LA Taq DNA聚合酶0.5 μl,ddH₂O 28.5 μl。反应条件:94℃2 min预变性;94℃25 s、55℃25 s、72℃3 min(每10个循环增加2 min),35个循环;72℃延伸10 min。然后取4 μl产物电泳(70 V,0.7%琼脂糖凝胶,50 min),凝胶成像仪观察条带大小及亮度。使用DNA纯化回收试剂盒进行PCR产物的纯化回收。

四、HBV全基因克隆

取纯化的PCR产物在链接酶的作用下与pUCM-T载体连接,转化受体菌TOP 10,经蓝白斑筛选,挑取白斑(含目的基因)扩大培养,重组质粒采用PCR法和酶切法鉴定。(1)PCR法鉴定:提取的质粒1:20稀释,取2 μl作为PCR反应模板,以HBV RT区引物^[4,5]进行重组质粒的PCR鉴定,产物长约460 bp。引物序列:正向:5'-TGTGTCTGCGCGTTTATC-3',反向:5'-GTTTAAATGTATA-CCAGAGAC-3';(2)酶切鉴定:取提取的质粒1 μl,加入限制性内切酶Eco R I 1 μl,缓冲液2 μl,加入ddH₂O 16 μl,37℃水浴3 h。0.7%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

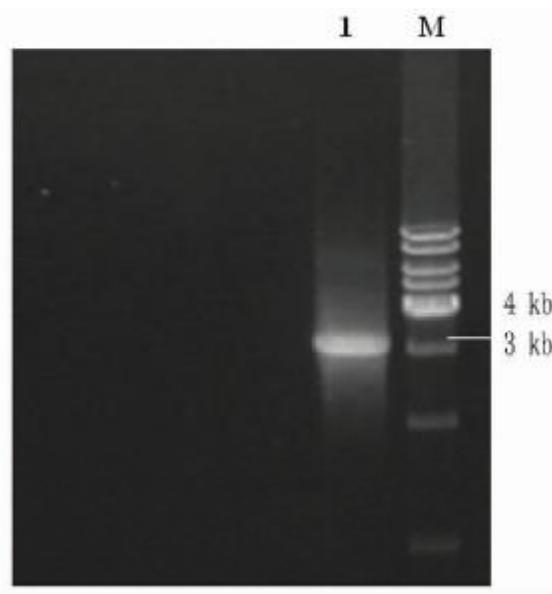
五、HBV 全基因测序及序列分析

将重组质粒测序工作交由上海生工公司完成。测序引物为通用引物 M13，并根据测序结果再设计下游测序引物直至测完。序列用 Bioedit、Clustal、Phylip 软件分析处理。重组位点使用 NCBI-Virology genotyping Tool 软件分析。参照序列来自 GenBank 数据库，基因序号分别是 AB109475、AY796032、AY373430、AJ344117、AF297620、AY862865、AY862864、AY057948、AY902772、DQ304551、AY862869、DQ304550、AB188243、AY796031、AY721612、AY721605、AY741796、AY741798、AB205128、AY902777、AY233296、AY233291、AY090453、AY090452、AF121239、AF121242、AB222713、AB210819、DQ329357、AB109478、AY862866、AY862863、AY817515、AY817509。

结 果

一、PCR 扩增 HBV 全基因及产物纯化回收

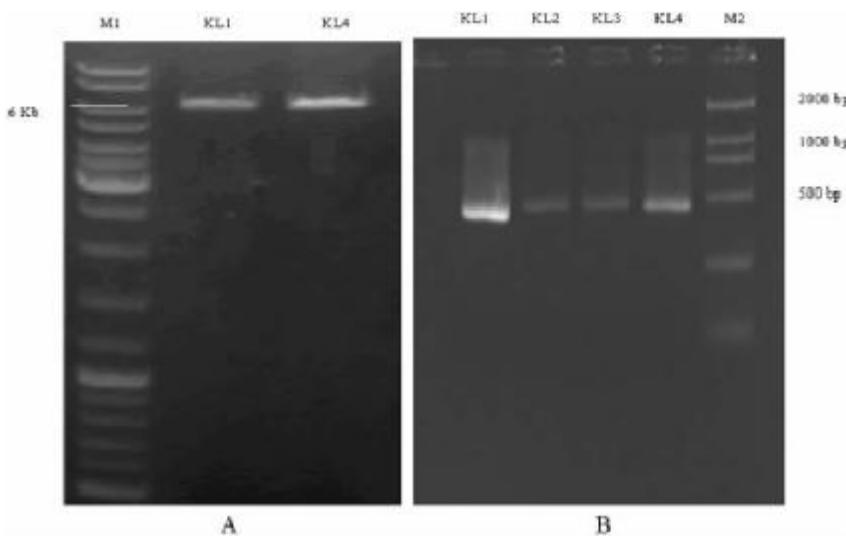
PCR 产物电泳后，可清晰看见电泳条带。HBV 全基因长约 3200 bp，产物大小与标准相符（图 1），并进行了纯化回收。



注:M. 标记物;1. PCR 产物
图1 PCR 扩增 HBV 全基因电泳图

二、重组质粒的鉴定

本研究使用 PCR 成功扩增出长约 3.2 kb 的 HBV 全基因组，克隆后分别以酶切法和 PCR 法对重组质粒进行了鉴定。T 载体上有 *Eco* R I 酶切位点，而 HBV 全基因及所用引物 P1、P2 未设计内切酶 *Eco* R I 的酶切位点，用该酶酶切后可出现一条清晰条带，为目的片段与 pUCM-T 载体，大小约 6.0 kb（图 2A），与预期大小一致。以 HBV RT 区引物进行 PCR 扩增，成功获得长约 460 bp 的 PCR 产物（图 2B），说明重组质粒构建成功，能用于序列测定。



注:A. PCR(HBV RT区)鉴定电泳图;B. Eco R I 酶切图;KL1-KL4. 随机挑取4个克隆的PCR产物;M1. 10 kb 标记物; M2. DL 2000 标记物
图2 HBV全基因组重组质粒鉴定电泳图

三、HBV全序列基因结构分析

由患者外周血分离得到的HBV病毒株的全基因序列经克隆后测序,结果其基因组全长为3174 bp,与目前D基因型参照序列比较同源性约为92%~98%,该新疆病毒株(命名为CHNXJ-124)属D基因型。与一株来自中国的DC重组基因型(GenBank登录号:AY862865)比较同源性约为91%。

进一步分析发现,该新疆病毒株与目前D基因型参照序列比较有9个碱基的缺失(位于核苷酸1760~1768位,序列为:ATTAAAGGT),即可能发生了缺失突变,该缺失突变恰位于HBV病毒株的X基因区,但并未使X基因发生移码突变。该区与BCP区有重叠,但在1896位、1899位核苷酸仍为“G”,未发生常见的“G→A”的变异。与参照序列比较,该病毒株RT区的184位氨基酸为“T”(苏氨酸),而非“A”(丙氨酸);RT区常见的变异位点,如173位(V,缬氨酸)、180位(L,亮氨酸)、181位(A,丙氨酸)、202位(S,丝氨酸)、204位(M,蛋氨酸)、222位(A,丙氨酸)、236位(N,天门冬氨酸)、250位(M,蛋氨酸)、336位(L,亮氨酸)氨基酸均未发生改变。序列比对同时发现,该毒株在1202位核苷酸多插入了一个碱基“C”,并且导致在第401位氨基酸处多翻译出了一个“P”(脯氨酸)。该毒株的S基因区核苷酸序列翻译为氨基酸后分析发现,其血清型为ayw2型。图3为核苷酸序列比对的部分结果。

讨 论

目前已知的HBV基因型至少可分为A、B、C、D、E、F、G、H8个型^[6-9],并且可有许多亚型^[10,11]。不同地区、不同种族基因型的分布有差别且有自身特点。研究表明^[12],我国内地地区流行的HBV基因型有A、B、C、D共4种,所占比例分别为1.2%、39.3%、50.2%、8.1%。各地区的HBV基因型分布也大不相同。在北

	1760	1761	1762	1763	1764	1765	1766	1767	1768	1769	1770	1771	1772	1773	1774	1775	1776	1777	1778	1779	1780	1781	1782	1783	1784	1785	1786	1787	1788	1789	1790	1791	1792	1793	1794	1795	1796	1797	1798	1799	1800	1801	1802	1803	1804	1805	1806	1807	1808	1809	1810	1811	1812	1813	1814	1815	1816	1817	1818	1819	1820	1821	1822	1823	1824	1825	1826	1827	1828	1829	1830	1831	1832	1833	1834	1835	1836	1837	1838	1839	1840	1841	1842	1843	1844	1845	1846	1847	1848	1849	1850	1851	1852	1853	1854	1855	1856	1857	1858	1859	1860	1861	1862	1863	1864	1865	1866	1867	1868	1869	1870	1871	1872	1873	1874	1875	1876	1877	1878	1879	1880	1881	1882	1883	1884	1885	1886	1887	1888	1889	1890	1891	1892	1893	1894	1895	1896	1897	1898	1899	1900	1901	1902	1903	1904	1905	1906	1907	1908	1909	1910	1911	1912	1913	1914	1915	1916	1917	1918	1919	1920	1921	1922	1923	1924	1925	1926	1927	1928	1929	1930	1931	1932	1933	1934	1935	1936	1937	1938	1939	1940	1941	1942	1943	1944	1945	1946	1947	1948	1949	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100	2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108	2109	2110	2111	2112	2113	2114	2115	2116	2117	2118	2119	2120	2121	2122	2123	2124	2125	2126	2127	2128	2129	2130	2131	2132	2133	2134	2135	2136	2137	2138	2139	2140	2141	2142	2143	2144	2145	2146	2147	2148	2149	2150	2151	2152	2153	2154	2155	2156	2157	2158	2159	2160	2161	2162	2163	2164	2165	2166	2167	2168	2169	2170	2171	2172	2173	2174	2175	2176	2177	2178	2179	2180	2181	2182	2183	2184	2185	2186	2187	2188	2189	2190	2191	2192	2193	2194	2195	2196	2197	2198	2199	2200	2201	2202	2203	2204	2205	2206	2207	2208	2209	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216	2217	2218	2219	2220	2221	2222	2223	2224	2225	2226	2227	2228	2229	2230	2231	2232	2233	2234	2235	2236	2237	2238	2239	2240	2241	2242	2243	2244	2245	2246	2247	2248	2249	2250	2251	2252	2253	2254	2255	2256	2257	2258	2259	2260	2261	2262	2263	2264	2265	2266	2267	2268	2269	2270	2271	2272	2273	2274	2275	2276	2277	2278	2279	2280	2281	2282	2283	2284	2285	2286	2287	2288	2289	2290	2291	2292	2293	2294	2295	2296	2297	2298	2299	2300	2301	2302	2303	2304	2305	2306	2307	2308	2309	2310	2311	2312	2313	2314	2315	2316	2317	2318	2319	2320	2321	2322	2323	2324	2325	2326	2327	2328	2329	2330	2331	2332	2333	2334	2335	2336	2337	2338	2339	2340	2341	2342	2343	2344	2345	2346	2347	2348	2349	2350	2351	2352	2353	2354	2355	2356	2357	2358	2359	2360	2361	2362	2363	2364	2365	2366	2367	2368	2369	2370	2371	2372	2373	2374	2375	2376	2377	2378	2379	2380	2381	2382	2383	2384	2385	2386	2387	2388	2389	2390	2391	2392	2393	2394	2395	2396	2397	2398	2399	2400	2401	2402	2403	2404	2405	2406	2407	2408	2409	2410	2411	2412	2413	2414	2415	2416	2417	2418	2419	2420	2421	2422	2423	2424	2425	2426	2427	2428	2429	2430	2431	2432	2433	2434	2435	2436	2437	2438	2439	2440	2441	2442	2443	2444	2445	2446	2447	2448	2449	2450	2451	2452	2453	2454	2455	2456	2457	2458	2459	2460	2461	2462	2463	2464	2465	2466	2467	2468	2469	2470	2471	2472	2473	2474	2475	2476	2477	2478	2479	2480	2481	2482	2483	2484	2485	2486	2487	2488	2489	2490	2491	2492	2493	2494	2495	2496	2497	2498	2499	2500	2501	2502	2503	2504	2505	2506	2507	2508	2509	2510	2511	2512	2513	2514	2515	2516	2517	2518	2519	2520	2521	2522	2523	2524	2525	2526	2527	2528	2529	2530	2531	2532	2533	2534	2535	2536	2537	2538	2539	2540	2541	2542	2543	2544	2545	2546	2547	2548	2549	2550	2551	2552	2553	2554	2555	2556	2557	2558	2559	2560	2561	2562	2563	2564	2565	2566	2567	2568	2569	2570	2571	2572	2573	2574	2575	2576	2577	2578	2579	2580	2581	2582	2583	2584	2585	2586	2587	2588	2589	2590	2591	2592	2593	2594	2595	2596	2597	2598	2599	2600	2601	2602	2603	2604	2605	2606	2607	2608	2609	2610	2611	2612	2613	2614	2615	2616	2617	2618	2619	2620	2621	2622	2623	2624	2625	2626	2627	2628	2629	2630	2631	2632	2633	2634	2635	2636	2637	2638	2639	2640	2641	2642	2643	2644	2645	2646	2647	2648	2649	2650	2651	2652	2653	2654	2655	2656	2657	2658	2659	2660	2661	2662	2663	2664	2665	2666	2667	2668	2669	2670	2671	2672	2673	2674	2675	2676	2677	2678	2679	2680	2681	2682	2683	2684	2685	2686	2687	2688	2689	2690	2691	2692	2693	2694	2695	2696	2697	2698	2699	2700	2701	2702	2703	2704	2705	2706	2707	2708	2709	2710	2711	2712	2713	2714	2715	2716	2717	2718	2719	2720	2721	2722	2723	2724	2725	2726	2727	2728	2729	2730	2731	2732	2733	2734	2735	2736	2737	2738	2739	2740	2741	2742	2743	2744	2745	2746	2747	2748	2749	2750	2751	2752	2753	2754	2755	2756	2757	2758	2759	2760	2761	2762	2763	2764	2765	2766	2767	2768	2769	2770	2771	2772	2773	2774	2775	2776	2777	2778	2779	2780	2781	2782	2783	2784	2785	2786	2787	2788	2789	2790	2791	2792	2793	2794	2795	2796	2797	2798	2799	2800	2801	2802	2803	2804	2805	2806	2807	2808	2809	2810	2811	2812	2813	2814	2815	2816	2817	2818	2819	2820	2821	2822	2823	2824	2825	2826	2827	2828	2829	2830	2831	2832	2833	2834	2835	2836	2837	2838	2839	2840	2841	2842	2843	2844	2845	2846	2847	2848	2849	2850	2851	2852	2853	2854	2855	2856	2857	2858	2859	2860	2861	2862	2863	2864	2865	2866	2867	2868	2869	2870	2871	2872	2873	2874	2875	2876	2877	2878	2879	2880	2881	2882	2883	2884	2885	2886	2887	2888	2889	2890	2891	2892	2893	2894	2895	2896	2897	2898	2899	2900	2901	2902	2903	2904	2905	2906	2907	2908	2909	2910	2911	2912	2913	2914	2915	2916	2917	2918	2919	2920	2921	2922	2923	2924	2925	2926	2927	2928	2929	2930	2931	2932	2933	2934	2935	2936	2937	2938	2939	2940	2941	2942	2943	2944	2945	2946	2947	2948	2949	2950	2951	2952	2953	2954	2955	2956	2957	2958	2959	2960	2961	2962	2963	2964	2965	2966	2967	2968	2969	2970	2971	2972	2973	2974	2975	2976	2977	2978	2979	2980	2981	2982	2983	2984	2985	2986	2

显示,其全长为 3174 bp,与目前 D 基因型参照序列比较同源性约为 92% ~ 98%,确定该新疆病毒株属 D 基因型。与一株来自中国的 DC 重组基因型比较同源性约为 91%。与参照序列比较有 9 个碱基的缺失,变异仅发生在 RT 区的 184 位氨基酸,而在 RT 区其他常见变异位点并未出现变异。在基因序列 1202 位有一个碱基“C”的插入,并且导致在第 401 位氨基酸处多翻译出了一个“P”(脯氨酸),具体的生物学意义尚不清楚。

根据 S 基因区编码的表面抗原的抗原性的不同,HBV 分为不同的血清型,基因型与血清型的对应关系为:A 型(adw 2 和 ayw 1)、B 型(adw 2 和 ayw 1)、C 型(adr、ayr 和 adw 2)、D 型(ayw 2 和 ayw 3)、E 型(ayw 4)、F 型(adw 4、ayw 4 和 adw 2)和 G(adw 2)^[7,14]。D 基因型对应的血清型通常为 ayw 2 和 ayw 3。通过该病毒株的 S 基因区核苷酸序列翻译为氨基酸后分析显示,其血清型为 ayw 2,与中国首例 D 基因型毒株的 ayw 3 血清型不同,说明新疆维吾尔族 D 基因型 HBV 病毒株依然有其自身特点。

本研究对我国首例维吾尔族 D 基因型 HBV 病毒株进行了克隆化研究,得到了其全序列,并初步阐述了其基因结构特点,为今后的研究奠定了一定基础,将会推动新疆少数民族 D 基因型 HBV 分子流行病学研究,并可进一步探讨新疆 D 基因型 HBV 病毒株的临床特点。

参 考 文 献

- 1 姚刚, 章廉, 包立华, 等. 新疆维吾尔族乙型肝炎病毒慢性无症状携带者的乙型肝炎病毒基因型测定. 西北国防医学杂志, 2001, 22:301-304.
- 2 Gunther ST, Li BC, Miska ST, et al. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol*, 1995, 69:5437-5444.
- 3 Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990, 96:23-28.
- 4 Yeh CT, Chien RN, Chu CM, et al. Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged Lamivudine therapy. *Hepatology*, 2000, 31:1318-1326.
- 5 Nafa S, Ahmed S, Tavan D, et al. Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2000, 32:1078-1088.
- 6 Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*, 1988, 69:2575-2583.
- 7 Norder H, Courouce AM, Magnus LO, et al. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*, 1994, 198:489-503.
- 8 Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*, 2000, 81:67-74.
- 9 Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in central America. *J Gen Virol*, 2002, 83:2059-2073.
- 10 Bowyer SM, Sim JG. Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at points across the genome: footprint of recombination in certain isolates. *J Gen Virol*, 2000, 81:379-392.
- 11 Norder H, Courouce AM, Coursaget P, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*, 2004, 47:289-309.
- 12 Wang Z, Liu Z, Zeng G, et al. A new intertype recombinant between genotypes C and D of hepatitis B virus identified in China. *J Gen Virol*, 2005, 86:985-990.
- 13 阎丽, 侯金林, 郭亚兵, 等. 乙型肝炎病毒 D 基因型系统进化树分析. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, 22:269-272.

- 14 Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. J Gen Virol, 2000, 81:67-74.

(收稿日期:2007-04-27)

(本文编辑:成军)