

· 基础论著 ·

## 维吾尔族 D 型乙型肝炎病毒株全基因克隆研究

鲁晓攀 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-zi, 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(鲁晓攀、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<sup>[1]</sup>,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  $1.5 \times 10^8$  拷贝/ml, HBsAg、HBeAg、抗-HBc 为阳性;TBil 27.3  $\mu\text{mol/L}$ , 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<sup>[2]</sup>由上海生工生物技术公司合成,序列为:P1:5' CCGGAAAGCT-TGAGCTCTTCTTTTTCACCTCTGCCTAATCA-3' (nt 1821 ~ 1841), P2: 5' CCG-GAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTGCATGCTGCTGG-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<sup>[3]</sup>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  $\mu\text{l}$  反应体系:DNA 模板 2  $\mu\text{l}$ , 引物 P1、P2 各 0.5  $\mu\text{l}$ , 10 × Buffer(不含  $\text{Mg}^{2+}$ ) 5  $\mu\text{l}$ ,  $\text{MgCl}_2$  5  $\mu\text{l}$ , 2.5 mM 的 dNTPs 8  $\mu\text{l}$ , LA Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 28.5  $\mu\text{l}$ 。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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  作为 PCR 反应模板,以 HBV RT 区引物<sup>[4,5]</sup>进行重组质粒的 PCR 鉴定,产物长约 460 bp。引物序列:正向:5' -TGTGTCTGCGGCGTTTATC-3', 反向:5' -GTTTAAATGTATAC-CCAGAGAC-3';(2) 酶切鉴定:取提取的质粒 1  $\mu\text{l}$ , 加入限制性内切酶 *Eco* R I 1  $\mu\text{l}$ , 缓冲液 2  $\mu\text{l}$ , 加入 ddH<sub>2</sub>O 16  $\mu\text{l}$ , 37℃ 水浴 3 h。0.7% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

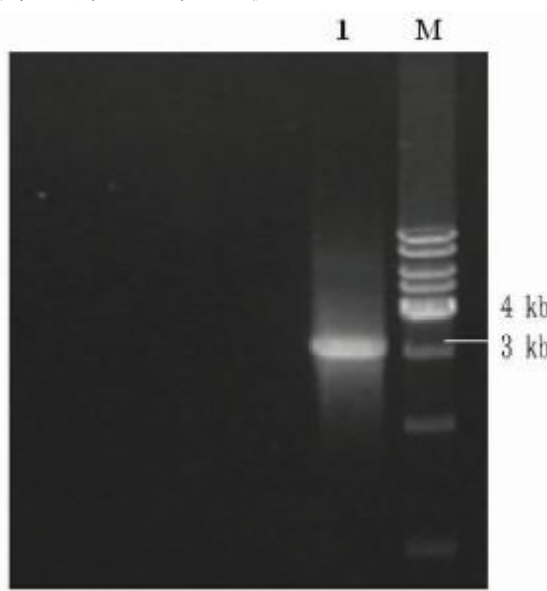
## 五、HBV 全基因测序及序列分析

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-Virol 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。

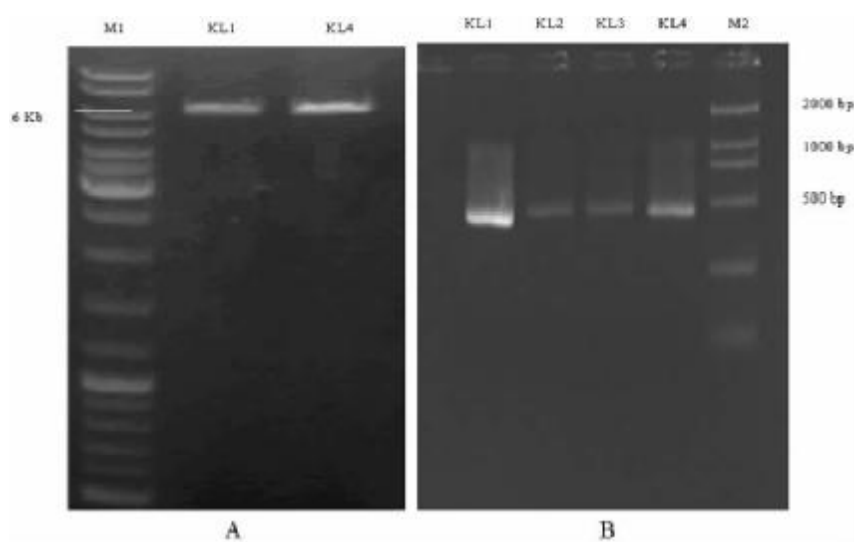


注:M. 标记物;1. PCR 产物

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 ayw 2 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、H 8 个型<sup>[6-9]</sup>,并且可有许多亚型<sup>[10,11]</sup>。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<sup>[12]</sup>,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

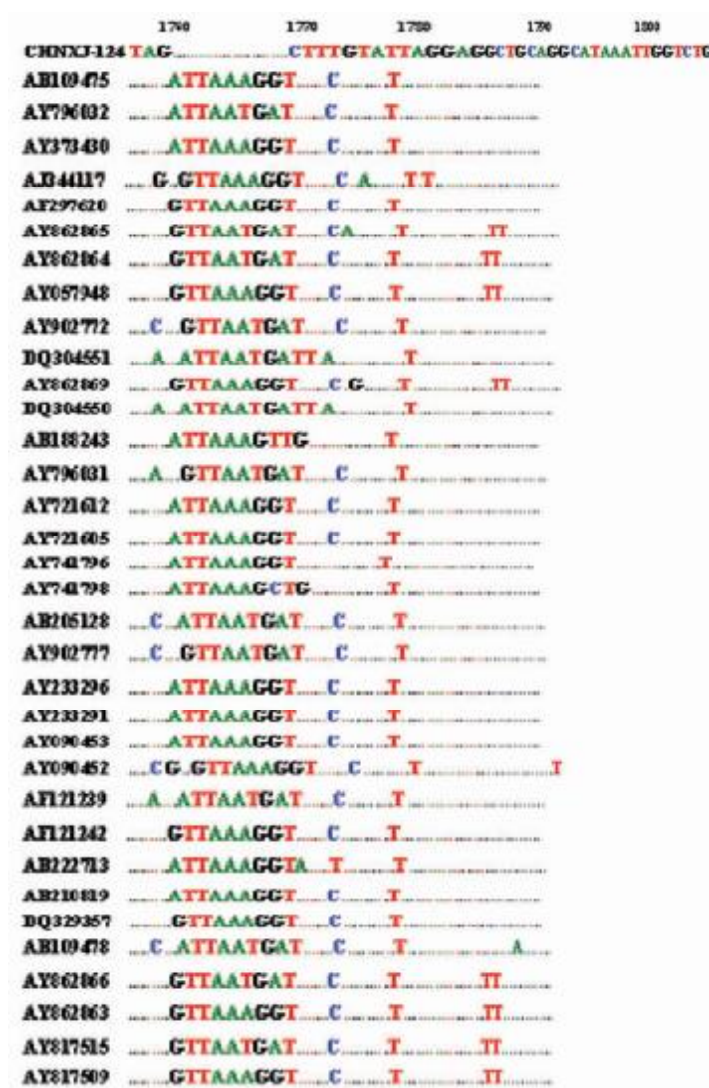


图 3 新疆 HBV 病毒株(CHNXJ-124)与参照序列核苷酸序列比对

方地区,以基因型 C 为主,占81.6%;南方则以基因型 B 为主,基因型 C 也占相当比例。少数地区存在 D 基因型,主要分布在我国西北地区。

D 基因型与其他基因型比较发现,在前-S1 起始密码子 ATG 之后(P 蛋白的间隔区)连续缺失 33 个碱基,全长为 3182 bp。使得前-S1 基因编码的前-S1 蛋白起始缺失 11 个氨基酸,同时致 P 基因在其编码氨基酸的第 183 ~ 193 位缺失 11 个氨基酸,但处于 P 基因不编码蛋白的间隔区,不影响 P 蛋白的功能,其它生物学意义目前研究较少。我国阎丽等<sup>[13]</sup>克隆了中国首例 D 基因型 HBV 病毒株,分析发现,该 HBV 病毒株(GenBank 登录号:AF280817)全长为 3182 bp,血清分型属 ayw 3 型,无前 C/C 变异,亦无 BCP 变异。中国 D 型株的首次克隆为认识 HBV D 基因型病毒株在我国的分布提供了依据。本研究对一例世居新疆的维吾尔族慢性 HBV 感染者血清病毒序列进行了克隆,得到了 HBV 全基因序列,通过分析

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)<sup>[7,14]</sup>。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, Courouge AM, Magnius 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, Courouge 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)