

戊型肝炎病毒细胞分离株部分核苷酸序列分析*

陈万荣 田辛 鲍作义 李敬云 邓大荣^{**} ✓

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

R373.21

A 提要 用抗原捕获/多聚酶链反应(AC/PCR)对戊型肝炎病毒(HEV)细胞分离株 XJ90 和 R25 基因组的部分核苷酸序列进行扩增,获得了与 HEV 缅甸株 ET1·1 相同的 cDNA 扩增带。该 cDNA 扩增带纯化后用双脱氧核苷酸 DNA 链末端终止法测序, XJ90、R25 株的核苷酸和氨基酸序列与 ET1·1 克隆的同源性分别为 99.6%、100% 和 99%、99%,从而证明 XJ90 和 R25 毒株为 HEV。

关键词 细胞培养, 戊型肝炎病毒(HEV), 抗原捕获/多聚酶链反应(AC/PCR), 序列测定

核苷酸序列分析

戊型肝炎(HE)为一种特殊的小 RNA 病毒所致的急性传染病,广泛流行于亚洲、非洲和美洲发展中国家和地区(含我国)。现已确定,公共卫生条件差、饮用水源被病人粪便污染是导致 HE 暴发和流行的主要原因。育壮年发病率较高,孕妇病死率高(20—40%),是危害人类健康及生命的重要传染病之一。目前应用分子生物学技术已从实验感染动物胆汁内克隆到 HEV 的全部基因,并完成了序列测定^[1]。但迄今国外尚未见用细胞培养分离到 HEV 的报道。

近年,我们用 Hep-G₂ 细胞分别从 HE 病人、实验感染动物潜伏期和急性期粪便中分离到几株致细胞病变(CPE)的病毒^[2,3],经理化试验、中和试验、免疫电镜和生物学特性等研究,疑似 HEV,为了进一步确定细胞培养分离的病毒是否为 HEV,最近采用 AC/PCR 对其中两株 XJ90、R25 的部分基因组进行了扩增和核苷酸序列测定,均证实为 HEV,现报告如下。

材料和方法

- 1 病毒** 疑似 HEV 细胞分离株 XJ90 和 R25 在 Hep-G₂ 细胞中传至 7 代,细胞病变(CPE)达卅—卅时收取,经四次冻融,3000r/m 离心 30 分钟去细胞碎片后用常规 PEG 浓缩至 10—20 倍,置-80℃低温冰箱备用。
- 2 ET1·1 克隆和引物** 均由美国 Genelabs 公司 Reyes 博士惠赠。两对引物系根据 ET1·1 核苷酸序列设计合成。第一对:反向引物(R1)为 5'-GCT ATT ATG GAG GAG TGT GG-3',正向引物(F1)为 5'-CAG GGC CCC AAT TCT TCT C-3',扩增片段为 418bp(4459—4876);第二对:反向引物(R2)为 5'-GCG TGG ATC TTG CAG GCC-3',正向引物(F2)为 5'-TTC AAC TTC AAG CCA CAG CC-3',扩增片段约 238bp(4522—4760)。引物用无 RNA 酶水稀释成 40 pmol/L 置-20℃备用。
- 3 RT-PCR 试剂** 反转录酶(RT),Taq DNA 多聚酶和四种 dNTP 等均为 Promega 公司产品,购自华美生物试剂公司。
- 4 AC/PCR** 在 0.5ml 微量离心管内进行,具体操作步骤另文报道。反转录后依次加入 F₁μl(40pmol/L),R1 0.5μl(20pmol/L),dNTPs 2μl(5mmol/L),Taq DNA 多聚酶 1μl(2U),混合后加入 50μl 液体石蜡油覆盖。置 PCR 热

本文于 1993 年 8 月 16 日收到,9 月 23 日修回

• 世界卫生组织资助课题

** 新疆军区军事医学研究所

循环反应仪中扩增,循环周期依次为变性(90℃ 60秒)、退火(52℃ 60秒)和延伸(72℃ 100秒),共35个循环周期。每次试验设正常细胞培养物、阳性对照(ET1·1克隆)和空白对照(不加模板DNA)。

5 AC/PCR产物的电泳分析 取PCR产物5 μ l和pBR322DNA/Hinf I分子量参比标志物,在含0.5 μ g/ml溴化乙锭的2%琼脂糖中电泳2-3小时,然后在紫外灯下观察扩增产物的区带荧光和拍照。

■ AC/PCR产物的核苷酸序列分析 用2%低熔点琼脂糖凝胶电泳分离PCR扩增产物,经Promega公司(Magic PCR preps DNA purification system)试剂盒纯化,由中国科学院微生物研究所用Model 373A自动荧光扫描DNA测序仪,经双脱氧核苷酸DNA链末端终止直接测定PCR扩增的核苷酸序列,并与Tam A W等报道的缅甸株ET1·1序列进行同源性比较和分析。

结 果

1 AC/PCR产物分析

由图1可见,疑似HEV细胞分离株XJ90和R25,经AC/PCR两轮扩增,扩增产物与阳性对照ET1·1的完全一致,扩增带长度约238bp,正常细胞培养物和空白对照没有类似条带。



图1 AC/PCR检测细胞培养分离的HEV基因

1. DNA分子量标志 pBR322 DNA/Hinf I, 2 纯化的 R25 株扩增产物;
3. ET1·1 克隆 cDNA; 4. XJ90 株; 5. R25 株; 6. 正常细胞; 7. 空白对照

Fig. 1 Genome of HEV isolated by cell culture was amplified by AC/PCR

1. Nucleic acid molecular weight marker; pBR322 DNA/Hinf I,
2. Purified amplification product of R25, 3. cDNA of ET1·1 clone,
4. XJ90 strain, 5. R25 strain, 6. Normal cells; 7. Blank control.

2 cDNA序列分析

如图2所示,AC/PCR扩增的XJ90和R25cDNA片段核苷酸序列几乎完全相同,与缅甸株ET1·1相应序列比较,其核苷酸和氨基酸序列同源性分别为99.6%、100%和99%、99%。

	W	I	L	Q	A	P	K	E	S	L	1-1499
ET1.1	TGG	ATC	TTG	CAG	GCC	CCG	AAG	GAG	TCT	CTG	4554
XJ-90	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	R	G	F	W	K	K	H	S	G	E	1-1509
ET1.1	CGA	GGG	TTT	TGG	AAG	AAA	CAC	TCC	GGT	GAG	4584
XJ-90	A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	P	G	T	L	L	W	N	T	V	W	1-1519
ET1.1	CCC	GGC	ACT	CTT	CTA	TGG	AAT	ACT	GTC	TGG	4614
XJ-90	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	N	M	A	V	I	T	H	C	Y	D	1-1522
ET1.1	AAT	ATG	GCC	GTT	ATT	ACC	CAC	TGT	TAT	GAC	4644
XJ-90	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	F	R	D	F	Q	V	A	A	F	C	1-1539
ET1.1	TTC	CGC	GAT	TTT	CAG	GTG	GCT	GCC	TTT	AAA	4674
XJ-90	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	G	D	D	S	I	V	L	C	S	E	1-1549
ET1.1	GGT	GAT	GAT	TCG	ATA	GTA	CTT	TGC	ACT	GAG	4704
XJ-90	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	G	D	D	S	I	V	L	C	S	E	1-1549
ET1.1	GGT	GAT	GAT	TCG	ATA	GTA	CTT	TGC	ACT	GAG	4904
XJ-90	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Y	R	Q	S	P	G	A	A	V	L	1-1559
ET1.1	TAT	CGT	CAG	AGT	CCA	GCA	GCT	GCT	GTC	CTG	4734
XJ-90	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	I	A	G	C	G	L	K	L	K	V	1-1569
ET1.1	ATC	GCC	GGC	TGT	GCC	TTG	AAG	TTC	AAG	GTA	4764
XJ-90	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TAC	-----

图 2 XJ-90,R-25 株病毒与缅甸株 ET1.1 基因组序列比较

Fig 2 Comparison between XJ90,R25 and ET1.1 clone of HEV Burma strain

讨 论

HEV 为一种特殊的小 RNA 病毒, 现已证明其基因组的核苷酸序列与已知的人类任何病毒均不相同。我们用 Hep-G₂ 细胞从 HE 病人粪便及其实验感染的第二代动物急性期粪便中分离到两株致 CPE 的病毒(XJ90、R25), 不仅在形态上与 HEV 相同, 在血清学上与抗-HEV 阳性血清发生特异性反应(IEM), 而且本实验结果表明, 它们的部分核苷酸和氨基酸序列与 HEV 缅甸株 ET1·1 克隆高度或完全一致, 与毕胜利^[4]报道的我国 HEV 基因组 cDNA 相应序列比较, 同源性约为 92%, 提示它们可能为同一基因型。

HEV 在病人和实验感染动物粪便、胆汁等标本内的含量均很低, 同时在保存和纯化过程中很容易失活, 因此, 人们至今得不到定量的纯化病毒粒子来进行该病毒的生物学特性研究。各国学者曾用多种培养细胞, 试图从病人和实验感染动物标本中分离 HEV, 然而除黄如统等^[6]已报道的 87A 株外, 其他人的尝试均未成功。我们用 Hep-G₂ 细胞从 HE 病人和实验感染动物粪便中同时分离到 HEV, 不但证明 HEV 可用细胞培养增殖, 而且为 HEV 生物学特性研究、HE 疫苗研制等奠定了基础, 对 HE 的防治具有重要意义。

致谢 本研究在经费上得到世界卫生组织的积极资助; 在材料上得到美国 Genelab 公司 Reyes 博士友好惠赠 ET1·1 克隆和引物, 在此一并致谢。

参 考 文 献

- 1 Tam A W, Smith M M, Guerra M E, *et al.* Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and Sequencing of the full-length viral Genome. *Virology*, 1991, 185, 120
- 2 陈万荣, 田辛, 鲍作义, 等. 从戊型肝炎病人粪便中分离到两株疑似戊型肝炎病毒, 中华实验和临床病毒学杂志, 1993, 7(1), 73
- 3 陈万荣, 田辛, 鲍作义, 等. 从实验感染动物粪中分离到两株疑似戊型肝炎病毒. 同病毒学, 1993, 8(1): 111
- 4 毕胜利, 刘崇柏, 曹学义, 等. 我国戊型肝炎病毒基因组 cDNA 全序测定及分析. 病毒学报, 1992, 8(3): 272
- 5 黄如统, 魏君, 田辛, 等. 从我国肠道传播的非甲非乙型肝炎病人粪便分离出一株小 RNA 病毒. 军事医学科学, 1989, 13(4): 237

Partial Genome Sequence Analysis of Hepatitis E Virus Isolated by Cell Culture

Chen Wanrong Tian Xin Bao Zuoyi Li Jingyun Deng Daolong

(*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071*)

Genome of presumed hepatitis E virus XJ90 and R25 was partially amplified by antigen capture polymerase chain reaction (AC/PCR). cDNA band same as ET1·1 clone was observed. After purification, this cDNA band was sequenced using dideoxy mediated chain termination method. The nucleotide and amino acid homology between XJ90, R25 and ET1·1 clone were 99.6%, 100% and 99%, 99%, respectively. This result showed that both XJ90 and R25 are hepatitis E virus.

Key words Cell culture, Hepatitis E virus, Antigen capture/polymerase chain reaction, Sequencing