

· 快讯 ·

# 从中国非甲-庚型肝炎病人中克隆到 TT 病毒样 DNA 序列<sup>1</sup>

张 军<sup>1</sup> 杨海杰<sup>1</sup> 苏智军<sup>2</sup> 张奕返<sup>2</sup> 林长青<sup>1</sup>  
黄 鹤<sup>1</sup> 郭 庆<sup>1</sup> 王 颖<sup>1</sup> 曾 定<sup>1</sup> 夏宁邵<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室 厦门 361005 <sup>2</sup>福建省泉州市第一医院 泉州 362000)

肝炎是严重危害我国人民身体健康的疾病, 尽管至 1995 年底, 已发现的肝炎病毒有 HAV、HBV、HCV、HDV、HEV 和 HGV 达 6 种之多, 但仍有近 5% ~ 10% 的肝炎患者不能确定病原<sup>[1]</sup>. 即使目前各医院所用血制品都经过了乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)的筛选, 但受血者中依然有输血后肝炎的发生. 在慢性肝炎和肝硬化病例中, 还有相当一部分找不到任何 HBV 或 HCV 的血清标记, 因而被归为“病原不明”. 有部分爆发性肝炎病例的病原不能归因于甲、乙、丙、丁、戊或庚型肝炎病毒. 这些情况表明除了甲-庚型肝炎病毒之外还很可能存在有其它能导致肝炎的病毒. 1997 年底日本学者 Nishizawa 等<sup>[2]</sup>使用代表性差异分析法(RDA)从一个输血后非甲-庚型肝炎患者血清中克隆到一段未知 DNA 序列, 使用该序列合成引物进行巢式 PCR, 从 5 例输血后非甲-庚型肝炎患者血清中检测到了 3 例阳性, 且发现病人血清谷丙转氨酶(ALT)的水平与 TTV-DNA 含量呈正相关. 经氯化铯密度梯度离心发现该序列所处位置的密度为  $1.26 \text{ g/cm}^3$ , 与一般病毒颗粒类似, 进一步的研究表明该序列为单链 DNA, 遂根据该病例的姓名命名为 TT 病毒(TTV). 到目前为止, Genbank 中可检索到的 TTV 样序列仅有一条, 为该研究小组发表的部分 DNA 序列(收录号: AB008394), 长 3739 bp, 有两个开放读码框架(ORF), 分别编码 172 个氨基酸(ORF2)和 774 个氨基酸(ORF1). 将该序列及编码氨基酸与所有已知核酸、氨基酸序列比较, 均未见任何较大的同源序列. 为了证实 TTV 样序列在我国的存在, 并为开展 TTV 与肝炎的关系研究提供初步手段, 我们设计了两对特异性引物, 建立了检测血清中 TTV 样 DNA 的巢式 PCR 方法, 从 7 份非甲-庚型肝炎患者血清中检出 2 例阳性, 并克隆到一段 TTV 样 DNA 序列.

7 份非甲-庚型肝炎患者血清来自福建省泉州第一医院的肝炎住院患者. 各取 2 mL 血清, 用 20% 蔗糖溶液垫层, 进行超速离心( $200\ 000 \text{ g} \times 3 \text{ h}$ ), 沉淀以 TE(20 mM/L Tris-HCl, 1 mM/L EDTA, pH8.0)溶解, 用 TRIZOL LS 核酸提取液(GIBCO BRL 公司)按产品说明提取 DNA, 作为 PCR 扩增的模板, 同时根据 TTV 序列设计了 2 对特异性 PCR 引物, 外侧物对 TTVF1: 5'-TGCTACGTCACTAACCAAC-3' nt5 ~ 22), TTVR1: 5'-CTCCTCTGCG-

CGGTCTCCTTA-3'(nt733~713), 预计扩增片段长度为 729 bp; 内侧引物对 TTVF2: 5'-GTGCACTTCCGAATGGC-3'(nt95-111), TTVR2: 5'-GTAATGCCTGCCAATAAAC-3'(nt283-265), 预计扩增片段长度为 189 bp. 第一次 PCR 引物为 TTVF1 和 TTVR1, 反应体积 50 μL, Mg<sup>2+</sup> 终浓度为 1.5 mM/L, 反应参数为 94 变性 40 s, 50 复性 50 s, 72 延伸 50 s, 35 个循环, 最后一个循环后 72 后延伸 5 min. 取 1 μL 第一次 PCR 产物为模板, 以引物 TTVF2 和 TTVR2 进行第二次 PCR 扩增, 反应参数为 94 变性 30 s, 52 复性 30 s, 72 延伸 30 s, 35 个循环, 最后一个循环后 72 后延伸 5 min. 取两次 PCR 产物各 10 μL 在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析.

7 份血清中, 第一次 PCR 均未见明显条带, 第二次有 2 份标本扩增出 190 bp 左右的单一片段(见图 1). 该 2 份标本一份来自于亚急性重症肝炎恢复期患者, 另一份来自于反复 ALT 升高的慢性肝炎患者. 将后一份扩增片段(TS1)用 Wizard PCR Preps DNA 纯化系统(Promega 公司)回收纯化, 克隆入 pGEM-pGEM-T Easy 载体, 转化大肠杆菌 DH5α 株, EcoRI 酶切鉴定出正确插入重组子, 采用双链模板测序, 双链模板提取采用碱裂解, RNaseA 消化, 氯仿 2 次抽提, 异丙醇第一次沉淀, PEG-8000 第二次沉淀提取. 提取的双链模板, 1/5 量经 0.75% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见超螺旋 DNA 占 80% 以上. 采用双脱氧链终止法, 用 T7 启动子引物(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')在 ABI PRISM™ 377 型 DNA 测序仪上进行 Dye Terminator 反应, 测序所用成套试剂为美国 ABI 公司产品. 每一份标本测 3 个克隆, 纠正偏差后获得一段 199 bp 的序列. 将所获序列输入计算机, 用 DNASIS 软件(Hitachi Software Engineering Co. 1992)与 TTV 进行同源性比较, 结果显示 TS1 序列与 TTV 相应片段的同源性为 87% (见图 2). 因此可以确定我国非甲-庚型肝炎患者中有 TTV-DNA 样序列存在.

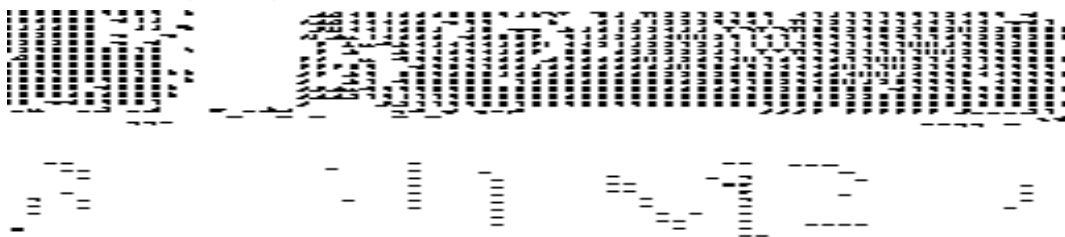


图 1 巢式 PCR 检测非甲-庚型肝炎病人 TTV-DNA 的第二次 PCR 产物凝胶电泳结果  
1~7: 病例编号 M: 核酸分子量标准(100 bp ladder)

Fig. 1 Electrophoresis results of PCR products of nested-PCR detection for TTV-DNA in non-A to G hepatitis patients

由于 TTV 在血清中的拷贝数较低(约每毫升 10<sup>1</sup>~10<sup>3</sup>), 为提高检测的灵敏度, 我们设计了较一般 PCR 更为敏感的巢式 PCR 进行检测, 并预先对血清进行了超速离心浓缩. 随后的实验表明, 不须经血清浓缩即可用同样的方法从少至 50 μL 血清中检测到 TTV-DNA. 为了初步

了解 TTV 在我国肝炎病人中及正常人群中的分布情况, 为进一步阐明 TTV 与肝炎的关系提供线索, 我们正在对从北京、泉州、漳州、厦门、湖南收集的一些健康人体检血清、献血员血清及各种肝炎患者血清进行 TTV-DNA 检测。

```

TTV  GTGCACTTCCGAATGGCTGAGTTTT CCA CG CCCG TCCG CA GCGGTGAAGCCACGGAGGGA 1 5 4
TS 1  ----- A G- G- - G- ----- AG

TTV  GATCTCCGCGTCCCCGAGGGCGGGTGCCGAAGGTGAGTTTACA CA CCGAAGTCAAGGGGGCA 2 1 4
TS 1  CTA- CGA- ----- G- ----- C- -----

TTV  ATTCCGGGCTCCGGACTGGCCGGGCTATGGGCAAGGCTCTGAA##### AAAAGCAT 2 6 4
TS 1  ----- T- GGGTATTCAATT- T- - AA- -

TTV  GTTTATTGGCAGGCATTAC 2 8 3
TS 1  -----

```

图 2 TTV 与 TS1 的 DNA 序列比较

# 插入 - 相同序列

Fig.2 Comparison of DNA sequence of TS1 with TTV

### 参 考 文 献

- 1 Alter H J. The cloning and clinical implications of HGV and HGBV-C. N. Engl. J. Med. 1996, 334: 1 536~1 537
- 2 Nishizawa T, Odamoto H, Konishi K et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. Biochemi. Biophys. Res. Comm. 1997, 241: 92~97
- 3 Odamoto H, Nishizawa T, Kato N et al. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. Hepatol. Res. 1998, 10: 1~16

## Cloning of a TT Virus-Like Sequence from Sera of the Patients with Non-A to G Hepatitis in China

Zhang Jun<sup>1</sup> Yang Haijie<sup>1</sup> Su Zhijun<sup>2</sup> Zhang Yifan<sup>2</sup> Lin Changqing<sup>1</sup>

Huang He<sup>1</sup> Guo Qing<sup>1</sup> Wang Ying<sup>1</sup> Zeng Ding<sup>1</sup> Xia Ningshao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>The State Lab. for Tumor Cell Engin. Xiamen Univ., Xiamen 361005)

(<sup>2</sup>The First Hospital of Quanzhou, Quanzhou Fujian 362000)

### Abstract

TT virus (TTV) is a novel single strand DNA virus which is associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. Two pairs of specific primers were designed and a nested-PCR method was established. From serum of seven non-A to G hepatitis patients, two were detected fragment as predicted after nested-PCR, from one of which a TTV-DNA like sequence was cloned and sequenced. The resulting sequence shows 87% homology with the TTV. These results indicated the existence of TTV in cryptogenic hepatitis in China.

### Key words

TT virus, non-A to G Hepatitis, Nested Polymerase Chain Reaction,