

## 中国河南两株庚型肝炎病毒(HGV) NS5区部分 cDNA的克隆与序列分析

谭文杰 陈刚 夏宁邵 黄鹤 丛郁 苗季 詹美云  
(中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京 100052)

**摘要** 通过逆转录-聚合酶链反应从我国河南省2例重叠感染HCV或HBV/HDV的献血员中,分离到HGV NS5区的部分cDNA,对其进行序列分析比较,结果表明:河南株HGV NS5区核苷酸与两株中国HGV株的同源性(>91.9%)高于国外代表株(88.5%–90.6%),但由核苷酸推导的氨基酸的同源性都无明显的地区性区别。HGV NS5区氨基酸序列较保守(同源性>91%),缺乏明显高变区。中国4株HGV在7384位发生了由C<sup>→</sup>T的变异,从而导致一个共同的保守位点的产生(由F<sup>→</sup>A)。重叠感染其他肝炎病毒时,河南株HGV NS5基因结构并无特异性改变。

**关键词** 庚型肝炎病毒,非结构基因,序列分析

自1995年后,一种新的与人类肝炎相关的病原因子GBV-C/HGV(统称为庚型肝炎病毒),相继由美国Abbott公司Simons等人<sup>[1]</sup>与Genlab公司Linnen等人<sup>[2]</sup>率先独立报道。其基因组为单股正链RNA,长约9kb,编码一个单一长ORF,其结构类似于同属黄病毒科的丙型肝炎病毒,蛋白N端包括两个包膜糖蛋白(E1、E2),C端含有解旋酶、蛋白酶与RNA依赖的RNA多聚酶的保守序列。目前,国际上已发表多株HGV/GBV-C的全序列<sup>[1-6]</sup>(包括两个中国株)。序列分析结果表明,HGV/GBV-C与HCV相比主要有以下几个特点:5'UTR区相对较长;核壳蛋白编码区缺如;毒株间序列较保守,缺乏明显高变区(尤其在包膜区)。

通过研究HGV/GBV-C在不同地区与不同人群的感染状况发现<sup>[7-9]</sup>,庚型肝炎病毒是一种广泛分布经肠道外途径传播的病原因子。它在急慢性肝炎、献血者(或受血者)、静脉药瘾人群中具有较高检出率,在ALT正常的人群中也有检出。HGV/GBV-C经常与其他肝炎病毒(如HBV、HCV、HDV等)重叠感染导致急慢性肝炎,但对单纯HGV/GBV-C感染在肝炎发病中的作用尚不明确。

鉴于HCV非结构区NS5在发展HCV EIA诊断试剂中的地位,以及它对IFN- $\alpha$ 治疗效果的不同影响,为发展HGV/GBV-C的重组抗原EIA试剂,探讨HGV/GBV-C NS5的结构特点,我们从河南省周口地区两例确证重叠感染HCV或HBV/HDV献血员的血清中,克隆出庚型肝炎病毒NS5区部分基因,并对其cDNA序列进行了分析比较。

本课题得到卫生部“九五”攻关课题与国家863课题(102-07-02-07)的资助。

\* 厦门大学生物系 厦门 361005

1997年6月17日收稿,8月1日修回。

## 材料与方法

1 标本来源 两例献血员标本采自河南周口地区。两人均为成年男性, ALT 间歇性中度升高。用 HGV/GBV- C NS3 区或 5' UTR 区特异性引物进行 RT- PCR, HGV/GBV- C RNA 阳性。血清临用前置- 70℃ 保存。这两例标本的其他病毒学指标检测结果: A 标本(王××) 合并感染 HCV, HCV RNA 阳性(RT- PCR), 抗- HCV 抗体阳性(ELISA); B 标本(张××) 合并感染 HBV 与 HDV, HBV DNA 阳性(打点杂交与 PCR), HBsAg 与 HBeAg 阳性(ELISA), HDV RNA 阳性(RT- PCR 与打点杂交), 抗- HDV 抗体阳性(ELISA)。这两例标本均已排除 HIV(Western blot, PCR) 与 HAV、HEV(PCR) 感染。

2 病毒核酸提取、cDNA 合成与克隆<sup>[12, 13]</sup> 取血清标本 100μl, 用 Trizol 试剂(GIBCOL 公司) 抽提 RNA 后溶于 DEPC 水, 用随机引物与 Superscript™ MuLV 进行逆转录合成 cDNA 链, 然后进行 PCR, 引物设计见表 1。将 PCR 产物用低熔点琼脂糖胶回收, 纯化后克隆于 pGEM- T 载体(Promega), 转化 DH5α 宿主菌, 挑斑筛选鉴定。

表 1 用于克隆 HGV NS5 区的引物  
Table 1 The primers used for cloning the NS5 region of HGV isolates

| 引物 Primer | 位置 Position | 序列 Sequences                      |
|-----------|-------------|-----------------------------------|
| F1        | 6904- 6928  | 5' - CTCTTTGTGGTAGCCGAGAGAT- 3'   |
| F2        | 6978- 7004  | 5' - TCGGTTACTGAGAGCTCAGATGAG- 3' |
| F3        | 7526- 7548  | 5' - AGGATGGACAAGGTGACYYTCT- 3'   |
| F4        | 7609- 7629  | 5' - CGCTCAAGCCAGCCTAAGCA- 3'     |
| R1        | 7672- 7694  | 5' - AGATCATCAGCCCATGGCAGCAT- 3'  |
| R2        | 8014- 8032  | 5' - GCGTCCACACAGATGGCGC- 3'      |
| R3        | 8174- 8194  | 5' - CAATACCTCTCACCGACGG- 3'      |

Y= C or T

3 cDNA 序列测定与分析 每一个扩增片段来源的克隆, 挑取 2- 3 个独立的菌落, 扩增后用 Wizard 柱抽提纯化。在美国 ABI 公司的 373A DNA 测序仪上采用 SP6 与 T7 引物进行正反两个方向测序。序列结果输入计算机, 用 DNA 软件(MBCRR) 进行分析比较。本文比较所用其它序列来源为: HGV(GenBank accession No U44402), HGV2(U45966), HGVCN(U45966), HGVC964(U75356), HGV- IW(D87255), GBV- C(U36380), GBVC- EA(U63715)。本文测定的两株序列分别为 HGV- WLX 和 HGV- ZHL(GenBank 登记号分别为 AF18031 和 AF18032)。比较各序列在 NS5 区的核苷酸范围(从 6904- 8032nt, 以 U44402 定位)。

## 结 果

1 从两例重叠感染献血员分离到的 HGV/GBV- C NS5 区的部分序列, 及其与其它已知毒株的比较

我们从 HCV 与 HGV 重叠感染献血员王×× 分离克隆到 791bp、506bp、424bp 3 个片段, 从 HBV/HDV 与 HGV 重叠感染献血员张×× 分离克隆到 717bp、506bp、424bp 3 个片段。对这 6 个片段进行序列测定, 分别获得 2 个长 1130bp(6904- 8032nt) 与 1056bp(6978- 8032nt) 的 cDNA 序列, 其中包括了 NS5A C 端的 2/3 与 NS5B N 端的 1/3(图 1)。这两个序列(HGV- WLX、HGVZHL) 与已知的其他 HGV/GBV- C 的对应序列的核苷酸同源性比较见表 2, 它与国内株(HGVCN、HGVC964) 的同源性 > 91.9%, 而与国外株的同源性 < 90.3%。各毒

株间核苷酸的变异分布较为随机(未示)。

```

5' CTTTGTGGTAGTAGCCGAGAGATGCCTGTATGGGGAGAAGACGTCCCCCGCACACCCATCGCCTGCACTTA
TCTCGGTTACGGAGAGCAGCTCAGATGAGAGGACCCCGTGGTGTCTCTTTCGCAGGAGGATACCCCGTC
5' -----T-----A-----C-----C-----
CTCGGACTCATTGGAAGTCATCCAAGAGTCTGATACTGCTGAGAGTGAGGATAGCGTCTTCAACGTGGCT
T-----T-----T-----T-----
CTTTCGGTACTCAAAGCCTTATTTCCACAGAGCGCAGCCACACGCAAGCTTACGGTTAGGATGTCATGCT
-----
GTGTGGAGAAGAGCGTACACGCTTCTTTTCCTTGGGTCTGACTGTTGCTGACGTGGCAAGCCTGTGTGA
-----C-----
GATGGAAATCCAGAACCATACAGCCTATTGTGACAAGGTGCGCACTCCGCTCGAATTGCAAGTTGGGTGC
-----
TTGGTGGGCAATGAATTTACCTTTGAATTTGACAAATGTGAGCCACGGCAAGAGACCTTGGCTTCCTTTT
-----C-----G-----G-----
CCTACATCTGGTCTGCGCGGCCGCTGACGCGGGCAACGCCGGCAAGCCTCCAGTGGTGC GGCCGGTGGG
-----G-GC-----
GTCCCTATTAGTGGCGGACACCACCAAGGTGTATGTGACCAACCCGGACAATGTGGGTAGAAGGGTCGAC
-----T-----
AAGGTGACCTTTTGGCGCGCTCCACGGGTTACGACAAGTTTCTCGTGGACTCGATCGAGCGGGCTCGGA
-----
AGGCTGCTCAAGCCTGCCTAAGCATGGGTTATACTTATGAGGAGGCAATAAGGACTGTTAGGCCGCATGC
-----T-----T-----
TGCCATGGGCTGGGGATCTAAGGTGTCAGTCAAGGACTTGGCCACCCCGCGGGGAAGATGGCCGTCCAC
-----G-----T-----
GACAGGCTCCAAGAGATACTTGAAGGGACTCCGGTCCCCTTTACCTTGACTGTGAAAAGGAGGTGTTCT
-----TC-----
TCAAAGACCGCAAGGAGGAGAAGGCCCCCGCCTCATTGTGTTCCCTCCCCTGGACTTTCGGATAGCTGA
-----T-T-----C-----C-----C-----
AAAGCTAATCCTGGGAGATCCGGGGCGAGTGGCCAAAGCGGTGTTGGGGGGGGCTTACGCCTTCCAGTAC
---A--T--T---A-----G--AT---G--C-GTGΔT-----C---
ACCCCAAACCAGCGAGTTAAGGAGATGCTGAGACTGTGGGAGTCAAAGAAGACCCCGTGCGCCATCTGTG
-----T-----A-----A-----C-----A-----
TGGACGC 3'
----- 3'

```

图1 中国河南2株HGV NS5区部分基因的cDNA序列

上: HGVWLX(6904- 8032nt); 下: HGVZHL(6978- 8032nt)。

Figure 1 The nucleotide sequence of HGV cDNA fragments in NS5 region isolated from Henan of China

The upper line: HGVWLX(6904- 8032nt); The lower line: HGVZHL(6978- 8032nt) .

### 2 推导的氨基酸序列与其它已知代表株的比较

上述核苷酸序列推导的氨基酸序列及与其它代表株的氨基酸序列的比较见图2, 同源性比较见表3, 可见河南株与其它已知HGV毒株的氨基酸同源性较高(> 92. 9%), 河南株与

GBC- EA(东非株)的氨基酸同源性最高,而与 HGV(美国株)同源性最低,中国 4 株 HGV 在图 2 中 163 位发生了一个共同变异(F<sup>→</sup>A)。

表 2 HGV 河南株(HGVWLX、HGVZHL)与其他已知 HGV/GBV- C 毒株核苷酸序列同源性比较(%)  
Table 2 Nucleotide sequence identity among Henan (HGVWLX、HGVZHL) and other known isolates of HGV (%)

|          | HGV- WLX | HGV- ZHL | HGVCN | HGVC964 | HGV  | HGV2 | GBV- C | GBVC- EA | HGV- IW |
|----------|----------|----------|-------|---------|------|------|--------|----------|---------|
| HGV- WLX |          | 95.9     | 93.4  | 94.3    | 88.5 | 89.2 | 90.6   | 89.8     | 89.4    |
| HGV- ZHL | 95.9     |          | 91.9  | 92.1    | 90.3 | 87.6 | 88.5   | 89.3     | 88.6    |

表 3 HGV 河南株与其他已知毒株氨基酸序列(aa 2150- 2524)同源性比较(%)  
Table 3 Amino acid sequence identity among Henan and other known isolates of HGV (%)

|          | HGVWLX | HGVZHL | HGVCN | HGVC964 | HGV  | HGV2 | GBV- C | GBVC- EA |
|----------|--------|--------|-------|---------|------|------|--------|----------|
| HGVZHL   | 94.6   |        |       |         |      |      |        |          |
| HGVCN    | 94.6   | 93.7   |       |         |      |      |        |          |
| HGVC964  | 93.9   | 93.4   | 93.8  |         |      |      |        |          |
| HGV      | 93.2   | 92.9   | 93.9  | 94.7    |      |      |        |          |
| HGV2     | 94.1   | 93.5   | 94.3  | 94.4    | 97.6 |      |        |          |
| GBV- C   | 93.9   | 94.6   | 94.3  | 94.4    | 96.0 | 96.1 |        |          |
| GBVC- EA | 95.2   | 94.6   | 95.6  | 95.1    | 97.4 | 97.7 | 96.2   |          |
| HGVIW    | 93.9   | 93.5   | 95.4  | 91.9    | 95.6 | 95.5 | 93.7   | 95.2     |

## 讨 论

许多临床资料表明,HBV 与 HCV 或 HBV 与 HDV 重叠感染常常会加剧肝功能损害,表现为 ALT 持续性异常升高。HGV 是否也能在重叠感染中加剧肝功能损害呢?为此,我们从河南周口地区选择了两例重叠感染多种肝炎病毒(甲: HGV 与 HGV;乙:HBV/HDV 与 HGV)的献血员为研究对象,尽管这两例献血员可同时存在重叠感染的多种病毒的病毒血症(血清中可检出病毒核酸的存在)。但其 ALT 仍只表现出间歇性异常,说明重叠感染庚型肝炎病毒至少在一部分人群中并不加剧肝功能损害;而且核苷酸与氨基酸序列分析结果显示,在重叠感染多种病毒的情况下,HGV 的基因结构并无特异改变。

HCV 是一种变异性很高的 RNA 病毒,其 NS5A 的羧基端包含了一个干扰素敏感决定簇区域(the interferon sensitivity determining region, ISDR, 2219- 2419 aa)<sup>[14]</sup>。在不同基因型的 HCV 毒株(1a, 1b, 2a, 2b, 3a)中,这个区域存在很大的异质性<sup>[15]</sup>,尤其是在 2 型 HCV 毒株中存在 4 个氨基酸的缺失或多个氨基酸的置换,及多处 4- 20 个氨基酸长度的插入。这个区域的变异很可能与不同毒株对干扰素治疗的敏感性相关<sup>[14]</sup>。HGV 虽与 HCV 同属黄病毒科,在基因结构上存在许多相似之处,但从我们对多株 HGV NS5 区的 cDNA 序列分析结果来看,HGV NS5a 区尽管核苷酸存在较大的异质性(4.1% - 12.4%),但氨基酸相对保守(氨基酸同源性> 93%),没有发现氨基酸缺失或插入现象。这是否意味着 HGV 对干扰素治疗存在较为一致的效果,尚待进一步研究确证。此外,中国 HGV 毒株在 NS5a 区由于在 7384 位(按 HGV 序列定位)发生了一个共同的核苷酸变异(TTC<sup>→</sup>TTT,图未示),从而存在一个独特的保守位点(F 变为 A),这可能为中国毒株的进化标志。

HGV NS5 区基因的功能尚不清楚,但从 HCV NS5A 的功能来看,它不仅与对于干扰素的敏

|  |     |
|--|-----|
| LCGSSREMPVWGEDVPRTPSPALISVTESSSDERTPSVSSSQEDTPSSSDSAEVIQESDТАESEDVFNVA | 70  |
| -----K-----V   | 70  |
| ---TD-----K-----E-----   | 70  |
| -----I-----K-L-----L-----E---T-E-----                                  | 70  |
| -----I-----K-----F-----E---G-E-----                                    | 70  |
| -----I-----K-----F-----E---G-E-----                                    | 70  |
| -----I-----K-----F-----E---G-E-----                                    | 70  |
| -----I-----K-L-T-----A-E-----  | 70  |
| -----I-----K-----F-----E---G-----                                      | 70  |
| LSVLKALAPQSDATRKLTVRMSCCVEKSVTRFASLGLTVADVASLCEMEIQNHTAYCDKVRTPLELQVGC | 140 |
| -----S-----  | 140 |
| -----F-----K-----  | 140 |
| ---E-F-----K-----AF-----   | 140 |
| -----K-----  | 140 |
| -----K-----AF-----Q-----   | 140 |
| ---E-----N-----  | 140 |
| -----K-----  | 140 |
| -----K-----  | 140 |
| LVGNEATAEADKCEPRQETLASASYIWSARPLTRATPAKPPVVRPVGSLLVADTTKVYVTNPДNVGRRVD | 210 |
| ---L---C---A---GA-----   | 210 |
| ---L---C---A---GV-----   | 210 |
| ---L---C---A---GV-----   | 210 |
| ---L---C---A---F---GV-----   | 210 |
| ---L---C---A---F---GV-----   | 210 |
| ---L---C---A---F---GV-----   | 210 |
| ---L---C---A---F---GV-----   | 210 |
| ---L---C---A---F---GV-----   | 210 |
| ↓ ← NS5B   |     |
| KVTAWRAPRVHDKFLVDSIERARKAAQAQLSMGYTYEEAIRTVRPHAAMGWGSKVSVKDLATPAGKMAVH | 280 |
| -----F-----Y-----  | 280 |
| ---F---I---A-----R-----  | 280 |
| -----A-----S-----  | 280 |
| ---F---Y---KR-----   | 280 |
| ---F---Y---KR-----   | 280 |
| ---F---Y---R---Q-----  | 280 |
| ---F---R---G-----  | 280 |
| ---F---A-----  | 280 |
| DRLQEILEGTPVPATLTVKKEVFFKDRKEEKAPRLIVFPPLDARIAEKILIGDPGRVAKAVLGGAYAFQY | 350 |
| -----HF-----N---S---GV---H---  | 350 |
| -----F-----L---  | 350 |
| -----GV---R---   | 350 |
| -----F-----  | 350 |
| -----F---M-----  | 350 |
| -----F-----  | 350 |
| -----F---GV-----   | 350 |
| -----F-----  | 350 |
| TPNQRVKEMLRRLWESKKTPCAICVD   | 375 |
| -----K-----  | 375 |
| ---R-----  | 375 |
| -----R---K-----  | 375 |
| -----K-----  | 375 |
| -----K-----  | 375 |
| -----K-----  | 375 |
| -----K-----  | 375 |

图 2 中国河南株 HGV NS5 区部分氨基酸的序列(2150- 2524aa) 及其他代表株的比较

1- 4 皆为中国 HGV 毒株, 分别为 HGVWLX、HGVZHL、HGV- CN、HGV C964; 5- 9 皆为国外的 HGV 毒株, 分别为 HGV- IW、HGV、HGV2、GBV- C、GBVC- EA。

Figure 2 Comparison of the amino acid sequence in NS5 region(2150- 2524 aa) of HGV isolated from Henan and other areas 1, 2, 3, 4 are Chinese HGV isolates, indicated as HGVWLX, HGVZHL, HGV- CN, HGV- C964 strains respectively; 5, 6, 7, 8, 9 are HGV isolates from other countries, indicated as HGV- IW, HGV, HGV2, GBV- C, GBVC- EA strains respectively.

感性有关,而且可能参与 NS3 蛋白酶对 NS4 蛋白酶的有效加工<sup>[16]</sup>。此外,NS5 区在发展 HCV EIA 诊断试剂方面具有较大意义。鉴于 HGV 与 HCV 的结构相似性,在 cDNA 序列分析基础上,我们可以通过原核或真核细胞系统对所克隆的 HGV NS5 区 cDNA 基因进行表达与功能研究,从而为阐明 HGV NS5 区的功能并发展简便有效的 HGV EIA 试剂奠定基础。

### 参 考 文 献

- 1 Simons J N, Leary T P, Dawson G J, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med*, 1995, 1: 564- 569
- 2 Linnen J, Wages J J, Zhang- Keck Z Y, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*, 1996, 271: 505- 508
- 3 Leary T P, Muerhoff A S, Simons J N, et al. Sequence and genomic organization of GBV- C: a novel member of the flaviviridae associated with human non- A- E- hepatitis. *J Med Virol*, 1996, 48: 60- 67
- 4 Shao L, Shinzawa H, Ishikawa K, et al. Sequence of hepatitis G virus genome isolated from a Japanese patient with non- A- E- hepatitis: amplification and cloning by long reverse transcription- PCR. *BBRC*, 1996, 228: 785- 791
- 5 Erker J C, Simons J N, Muerhoff A S, et al. Molecular cloning and characterization of a GB virus C isolated from a patient with non- A- E hepatitis. *J Gen Virol*, 1996, 77: 2713- 2720
- 6 周育森, 王海涛, 何玉先, 等. 中国庚型肝炎病毒全基因结构特点及其感染地理分布. *微生物学报*, 1997, 24: 27- 30
- 7 Moaven L, Bowden D S, Locarnini S A. Hepatitis G virus and hepatitis GB viruses. *Today's Life Sci*, 1995, 21: 24
- 8 Nubling C M, Lower J. GB- C genomes in a high- risk group, in plasma pools and in intravenous immunoglobulin. *Lancet*, 1996, 347: 68
- 9 Dawson G J, Schlander G G, Pilot- Matias T J, et al. Prevalence studies of GB virus C infection using RT- PCR. *J Med Virol*, 1996, 50: 97- 103
- 10 Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutation in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Eng J Med*, 1996, 334: 77- 81
- 11 Deleys R. Diagnosis of HCV infection using synthetic peptides. *Current opinion in therapeutic patients*, 1993, 3: 545- 560
- 12 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 239- 298
- 13 谭文杰, 夏宁邵, 王海林, 等. 我国庚型肝炎病毒 NS3 区部分基因的克隆与序列分析. *高技术通讯*, 1996, 6: 34- 37
- 14 Enomoto N, Ikuo S, Yasuhiro S, et al. Comparison of full- length sequences of interferon- sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. *J Clin Invest*, 1995, 96: 224- 230
- 15 Yamada N, Tanihara K, Mizokami M, et al. Full- length sequence of genome of hepatitis C virus type 3a: comparative study with different genotypes. *J Gen Virol*, 1994, 75: 3279- 3284
- 16 Hijikata M, Mizushima H, Tanji Y, et al. Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 10773- 10777

## CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF HEPATITIS G VIRUS IN PARTIAL NS5 REGION ISOLATED FROM TWO BLOOD DONORS IN HENAN PROVINCE

Tan Wenjie    Chen Gang    Xia Ningshao    Huang He  
Cong Yu    Miao Ji    Zhan Meiyun  
(*Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052*)

Non- structural region 5(NS5) gene fragments were isolated from two blood donors in Henan Province who were co- infected with hepatitis C or B/D viruses. These fragments were obtained by using reverse transcription and polymerase chain reaction( RT- PCR), and these overlapping fragments were cloned into pGEM- T vector. Sequences were determined and then analyzed by computer. The results indicated as follows: the nucleotide identity of HGV NS5 cDNA among the Henan isolates and the other Chinese isolates(HGVCN, HGV C964) were higher (> 91.9%) than that among Henan and foreign country(Africa, American, Japan, Europe) isolates( 88.5% - 90.6%); but the amino acid homology didn't show any significant difference among them. The NS5 fragments of HGV strains compared were very conserve(above 91.9% identical to each other) in amino acid level and didn't exist distinct hypervariable region. Four Chinese isolates of HGV consisted a common variation( $C \rightarrow T$ ) in 7384 nucleotide (the position number according to U44402) and this led to a unique amino acid variation( $F \rightarrow A$ ). It can be suggested that the HGV fragments isolated from Henan area didn't exist characteristic change when they were co- infected with other hepatitis viruses.

**Key words:** Hepatitis G virus/ GB virus C, Non- structural region gene, Sequence analysis