

研究简报

我国厦门地区散发性戊型肝炎病毒部分核苷酸序列分析*

黄如统 廖绵初* 李晓英 夏小兵 苑锡同 干侣仙* 刘敏霞 李德荣

军事医学科学院微生物学流行病学研究所 北京 100850

自新疆发生戊型肝炎(HE)暴发流行以来,已陆续报道我国其他地区存在散发感染^[1]。本实验室已报道我国广州地区的散发性 HEV 与我国北方和国外 HEV 在基因结构上有明显不同^[2,3]。最近又对从厦门地区急性 HE 病人的血清中检出的 HEV RNA 作序列分析,结果证实了我国南方存在不同的 HEV 基因型。

1 材料与与方法

1.1 血清标本

1997年11月至1997年2月期间采集厦门地区确诊为 HE 病人的急性期血清标本 8 份,由厦门大学抗癌研究中心廖绵初副教授提供。血清标本于 -25℃ 冰箱保存。

1.2 抗-HEV 抗体的测定

用 HEV ELISA 试剂盒(分别由中国预防医学科学院病毒研究所和本实验室提供)测定血清标本中的抗-HEV IgG 抗体。

1.3 引物

根据已报道的缅甸株 HEV 序列^[4],分别在军事医学科学院生物工程研究所和中国科学院微生物研究所合成两对引物。

1.4 RNA 的抽提

取 200 μl 血清,采用蛋白酶 K 异硫氰酸胍-水饱和酚法提取病毒 RNA,方法见文献^[3]。

1.5 RT-PCR

提取的 RNA 全部直接用于逆转录和套式 PCR 扩增。具体方法见文献^[2]。

1.6 克隆及鉴定

阳性 PCR 产物经乙醇沉淀回收后,与 pGEM-T 载体(Promega 公司产品)连接,并转化 JM109 菌。阳性菌落先经 PCR 初步鉴定^[5],然后用 EcoRI 和 HindIII 双酶切鉴定,均按分子克隆的有关操作进行。

1.7 序列分析

鉴定阳性菌增殖后,收集菌体,并送中国科学院微生物研究所基因工程中心进行纯化和序列分析。

1.8 序列的比较

本研究从厦门 1 号血清中检出 1 株 HEV 核苷酸序列(相应缅甸株的 4 522~4 76 位),与我国广州株 G-20 北京株 B-

9^[2]和国外缅甸株^[4]的相应序列进行同源性比较。

2 结果

2.1 抗-HEV 抗体和 HEV RNA 的检测

用 HEV 重组抗原试剂盒和自制的全病毒抗原试剂测定厦门地区 8 份可疑 HE 病人急性期血清中的抗-HEV IgG 抗体,获得阳性血清 12 份。取其中 8 份再用 RT-PCR 方法检测 HEV RNA,1 号和 6 号血清标本在琼脂糖凝胶电泳上可见一条约 239 bp 的带,而其余 6 份未见任何带(图 1)。

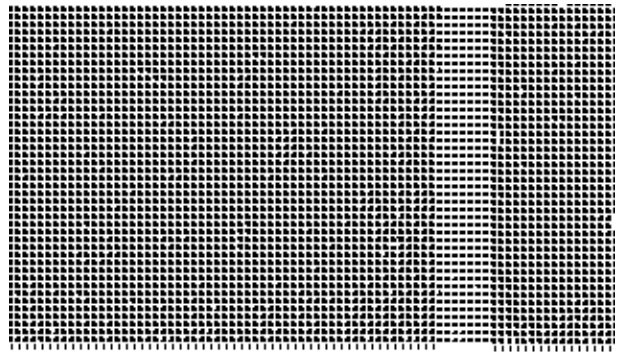


图 1 厦门血清标本 PCR 产物电泳结果

M: pBR 322 DNA/HindI 消化; A~G 分别为 1~7 号血清标本(1 号和 6 号有 239bp 带)

2.2 克隆和鉴定

将厦门血清标本 1 号和 6 号(X-S 和 X-S6)的 PCR 产物,克隆到 pGEM-T 载体并转化 JM109 菌,分别得到 2 个和 4 个白斑。用 PCR 初步鉴定, X-S 标本中有 1 个白斑扩增出 239 bp 带, X-S6 号标本中有 2 个白斑可扩增出 239 bp 带。初步鉴定阳性后再用 EcoRI 和 HindIII 双酶切鉴定,结果各有一株菌可切出 239 bp 带。

2.3 核苷酸序列分析及比较

取厦门 X-S 1 号阳性质粒进行核苷酸序列分析,对照已发表的缅甸株 HEV 相应序列,认为 X-S 是 HEV 序列,可测

* 总后指令性课题(9608037)

** 厦门大学抗癌研究中心 厦门 361005

黄如统,男,1942年11月生,副研究员

出 239 bp 带,核苷酸既没有丢失,也没有插入。其中有 48 个碱基发生改变,第一位改变 5 个,第二位改变 4 个,第三位改变 39 个。厦门株 X-S1 序列与我国广州株 G-20,北京株 B-9 以及缅甸株相应核苷酸序列进行比较,同源性分别为 86.2%、79.9% 和 79.9% (图 2)。

3 讨论

急性 HE 病人血清中早期存在短暂的病毒血症,此时可

检测 HEV RNA 为了减少盲目性,提高检出率,血清标本先进行抗-HEV 抗体检查,然后从抗体阳性的标本中提取 HEV RNA 本研究从 8 份抗体阳性的标本中检出 HEV RNA 阳性 2 份。

将厦门地区 X-S1 株 HEV 的核苷酸序列与我国广州 G-20 株、北京 B-9 株^[2]和缅甸株^[4]进行比较,发现厦门 X-S1 株比较接近于我国广州株,但它们之间也有差异,而它与我国北京株和缅甸株的差异性较大。本研究的结果进一步证明

	4522						
1. 厦门株 X-S1	GCGTGGATCT	TGCAGGCCCC	AAAAGAGTCC	CTGCGCGGCT	TTTGGGAAGAA	GCACTTTGGT	
2. 广州株 G-20	G..G.....	T...G...	.C.....C...	
3. 北京株 B-9	G..G....TA..G.	A...CC...	
4. 缅甸株 Bur-121	G..G....TA..G.	A...CC...	
1	GAACCCGGCA	CCCTGCTGTG	GAACACCGTC	TGGAACATGG	CGGTTATAGC	GCATTGTTAT	GAGTTCGGTG
2	..G..A..T.	..T..T...T..T...C....	A..C.....C.
3	..G.....	..T..T..A..	..T..T...T....	.C....TA.	C..C.....	..C....C.
4	..G.....	..T..T..A..	..T..T...T....	.C....TA.	C..C.....	..C....C.
1	ACCTTAAAGT	TGCGGCATTC	AAAGGGGATG	ACTCTGTTGT	GCTCTGCAGA	GATTATCGGC	AGAGTCGTGA
2	..T.....G..TT.....T..T	..C.....	..A..C..CA.
3	..TT..C.G..	G..T..C..TT....	..T..GA..A..	...T....T	..G....T.CA.G
4	..TT..C.G..	G..T..C..TT....	..T..GA..A..	...T....T	..G....T.CA.G
				4761			
1	TGCGGCTGCC	TTAATCGCCT	GCTGTGGCTT	GAAGTTGAA			
2	C.....C...	..G..T...			
3	A..T...T.	C.G.....G			
4	A..T...T.	C.G.....G			

图 2 4 株 HEV 的核苷酸序列比较

了我国南方存在明显不同于亚洲地区 HEV 的基因型,最近魏绍静^[6]也报道了同样的结果。我国其他地区的 HEV 毒株是否还存在不同的基因型尚需进一步研究。

关键词 戊型肝炎病毒;病毒基因;核苷酸序列

中国图书资料分类法分类号 R373.2

参考文献

- 庄辉.丙型和戊型肝炎的流行病学及预防.中国公共卫生,1996; 12: 55
- Huang RT, Nakazono N, Ishii K *et al.* Existing variations on the gene structure of hepatitis E virus strains from some regions of China. *J Med Virol.* 1995; 47:

- 303
- 黄如统,中园直树,石井庆藏等.我国散发性戊型肝炎病毒核苷酸和氨基酸序列测定.军事医学科学院院刊,1996; 20: 185
- Tam AW, Smith MM, Guerra ME *et al.* Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 1991; 185: 120
- 魏汉东,瞿成奎,贺福初等. PCR 技术在鉴定阳性重组子中的应用.军事医学科学院院刊, 1995; 19: 61
- 魏绍静, Walsh P,唐漾波等.广州地区散发性戊型肝炎病毒基因片段序列分析.中华微生物学和免疫学杂志, 1998; 18: 92 (1998-02-24 收稿)