

一株鸭乙型肝炎病毒 DHBV 全基因的克隆和序列分析

梁蔚芳, 刘志华, 何海棠, 骆抗先 (第一军医大学南方医院感染内科, 广东 广州 510515)

摘要:目的 从本地樱桃谷鸭血清中克隆鸭乙型肝炎病毒(DHBV)DNA, 并进行序列分析。方法 用 PCR 扩增 DHBV 全基因, 连接至 T 载体上, 挑选克隆进行测序分析, 与 GenBank 中 16 株 DHBV 全基因组进行同源性比较, 并进行分子进化树分析。结果 24-18 与 16 株 DHBV 基因组比较, 核苷酸同源性介于 89.4%~99.3%之间, 各开放阅读框氨基酸同源性比较显示差异显著地方位于 P 区。结论 24-18 属于 DHBV 西方基因型中的一个亚型。

关键词:鸭乙型肝炎病毒; 同源性分析; 基因型

中图分类号: R512.6; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)04-0404-04

Cloning and sequence analysis of the genome of a strain of duck hepatitis B virus

LIANG Wei-fang, LIU Zhi-hua, HE Hai-tang, LUO Kang-xian

Department of Infectious Diseases, Nangfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To clone and analyze the genome of a duck hepatitis B virus (DHBV) strain isolated from the ducks found in the local area. **Methods** The complete genome of DHBV was amplified by PCR prior to cloning into T vector and sequencing, with also homology and phylogenetic analyses. **Result** Genome comparison of an isolated DHBV strain and 16 DHBV strains in GenBank revealed a homology of 89.4% to 99.3% at the nucleotide level, and the amino acid identity of the 3 open reading frames showed that the P region harbored more obvious variations than the other regions. **Conclusion** The isolated DHBV strain might belong to a subtype of the virus found in the western countries.

Key words: duck hepatitis B virus; homology analysis; genotype

鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus, DHBV)与人乙型肝炎病毒(HBV)同属嗜肝 DNA 病毒科, 它们的基因组组成、病毒复制及组织嗜性等方面均有很大的相似性, 常作为研究 HBV 发病机制、防治等的参考动物模型。国内外既有采用垂直感染的先天感染鸭乙肝模型, 也有采用后天感染鸭乙肝模型。本实验采用聚合酶链方法(PCR 法)从本地樱桃谷鸭血清中分离出一株 DHBV 新毒株, 并与 GenBank 中序列进行比较, 研究 DHBV 之间的基因同源性, 有助于进一步了解动物的遗传背景, 及建立鸭乙肝动物模型。

1 材料与方法

1.1 标本

66 只樱桃谷鸭购自广州某鸭场。鸭子经腿静脉采血, 分离血清后置 -20 °C 保存。按常规方法^[1]提取血清 DNA 作为模板。

1.2 试剂

Taq 酶、PGEM-T 载体购自大连宝生物有限公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自美国 Promega 公

司。大肠杆菌 JM109 由本实验室保存。

1.3 引物

根据 GenBank 中的序列, 设计引物, 由上海生物工程技术服务公司合成。引物序列如下: D1: 5'CATG CTCATTTGAAAGCTTAT3'(nt 1-21); D1r: 5'AATTCT AGCCGTAATCGGATA3'(nt 3 000-3 021); D2: 5'ATG CTTCTAGAGCCTTAGCCAATG 3'(nt 2 657-2 680); D2r: 5'AGTGGGAGGTATAACAGCTCTTAA3'(nt 2 866-2 889); 其中 D1D1r 用来扩增 DHBV 全长基因组, D2D2r 用来筛选 DHBV 阳性血清。

1.4 阳性血清的筛选

以 D2D2r 为引物, PCR 扩增鸭血清提取物, 以检验提取物中是否含有 DHBV DNA。

1.5 DHBV 全基因的扩增

1.5.1 PCR 扩增 取筛选出的 14 例阳性血清进行全长基因组的 PCR 扩增。反应条件如下: 94 °C, 40 s; 55 °C, 40 s; 72 °C, 3 min; 35 个循环后, 72 °C 延伸 5 min。取 5 μl PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.2 PCR 产物的胶回收 取 PCR 扩增产物 20 μl 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 将 3 kb DNA 条带从凝胶上切下来, 用小量胶回收试剂盒回收, 操作按说明书进行。

1.5.3 克隆测序 将回收后的 PCR 产物分别克隆到 PGEM-T 载体上, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 接种到含 ampicillin/IPTG/X-gal 的 LB 平板上, 挑选

收稿日期: 2003-10-26

基金项目: 军队“十五”重点课题(01Z046)

Key Project Foundation of the "Tenth Five-year Plan" of PLA

作者简介: 梁蔚芳 (1975-), 女, 广西北海人, 第一军医大学在读硕士, 研究实习生, 电话: 020-61641888-87314

白色菌落筛选阳性克隆,用小量质粒提取试剂盒提取质粒。质粒送上海生物工程技术服务公司测序。

1.6 同源性比较

序列分析用 DNASIS 软件(Hitachi Version 7.0),氨基酸序列分析采用 PROSIS(Hitachi Version 5.0)软件,进化树分析采用 CLUSTAL W 软件。在 Internet 上用 BLAST 程序在 GenBank 中搜索与之有同源性的序列。用 BANKIT 程序申请序列登录号。

2 结果

2.1 阳性血清的筛选

引物 D2D2r 的扩增产物为 233 bp (图 1);66 只鸭子中检出 14 只为阳性,阳性率为 21.2%。

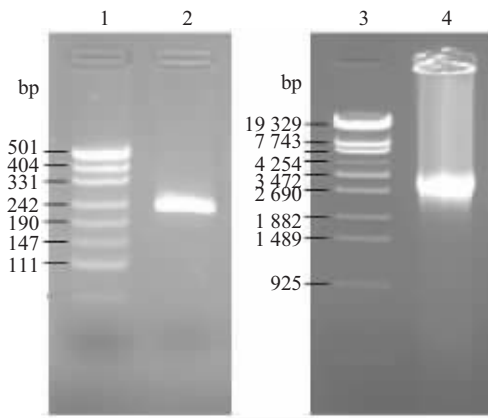


图 1 DHBV DNA 扩增结果

Fig.1 PCR amplification of the DHBV DNA

Lane 1: PCR marker; Lane 2: D2D2r for DHBV (233 bp); Lane 3: λ -EcoT14I fragment; Lane 4: D1D1r for DHBV (3 021 bp)

2.2 DHBV 全基因组的扩增

PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,14 例阳性标本均可扩增出大小约 3 kb 条带。

2.3 DHBV 全基因的克隆和鉴定

将扩增出的 PCR 产物分别进行胶回收后,克隆至 pGEM-T 载体上,经蓝白斑筛选,PCR 鉴定,阳性克隆进行 P 基因区段的测序,各标本间的核苷酸同源性高达 99.9%,提示鸭子自然感染的 DHBV 属于同一基因型的病毒。随机选取二个标本的阳性克隆进行全长测序。将测序得到核苷酸序列用 BLAST 程序相互比较,同源性高达 99%,认为二者属于同一病毒株。选取其中 1 个 24-18 与 GenBank 中序列进行比较,与其它地区的 DHBV 序列均存在一定差异。

2.4 DHBV 基因组结构

用 DNASIS 软件对 DHBV 基因组结构进行分析,计算机预测 DHBV 序列中含有 3 个开放阅读框(open reading frame, ORF):分别为 P-ORF (170-2 530 nt)、PreS/S-OR(801-1 787 nt)、PreC/C-ORF(2 518-3 021, 1-414 nt),分别编码 P 蛋白、S 蛋白及 C 蛋白。

2.5 核苷酸的同源性分析

为了分析 24-18 与其它 DHBV 序列的同源性,从 GenBank 中调出已有的 16 株 DHBV 全基因组进行比较。核苷酸分析结果表明,24-18 与其它序列均具有较高同源性,介于 89.4%~99.3%之间(表 1),其中与 AF493986(美国株)同源性最高,为 99.3%,与 M32991(上海株)和 AJ006350(澳大利亚株)同源性最低,为 89.4%。

表 1 24-18 与 GenBank 中 16 株 DHBV 病毒株核苷酸序列及各编码区氨基酸同源性比较

Tab.1 Homology analysis with the 16 isolates from GenBank

GenBank ID	Genomic Length(nt)	Origin		Reference	Nucleotide identity (%)	Amino acid(%)		
		Avian species	Location			C region(262)	S region(167)	P region(786/788)
'Chinese' DHBV								
M32990	3027	Duck brown	Shanghai	Uchida, <i>et al.</i> (1989)	90.1	96.2	95.2	86.4
M32991	3027	Duck white	Shanghai	Uchida, <i>et al.</i> (1989)	89.4	96.2	93.4	84.1
NC001344	3027	Duck domestic	China	Tong, <i>et al.</i> (1990)	90.1	96.2	92.8	87.1
X60213	3027	Duck domestic	Shanghai	GenBank	90.1	96.2	92.8	87.1
AJ006350	3027	Duck Pekin	Australia	Triyatni M, <i>et al.</i> (2001)	89.4	96.2	92.8	84.4
M21953	3024	Duck domestic	Shanghai	Tong, <i>et al.</i> (1990)	90.1	96.6	95.8	87.2
X58568	3024	Duck domestic	China	Sprengel, <i>et al.</i> (1991)	90.6	95.0	95.8	87.3
X58569	3024	Duck domestic	Shanghai	Sprengel, <i>et al.</i> (1991)	90.6	95.0	95.8	86.8
AF404406	3024	Duck brown	Chongqian	Hu J, <i>et al.</i> (2001)	90.0	96.6	96.4	86.7
'Western country' DHBV								
K01834	3021	Duck Pekin	USA	Mandart, <i>et al.</i> (1984)	99.1	98.9	100.0	99.7
M60677	3021	Duck Pekin	USA	GenBank	99.1	98.9	100.0	99.1
AF493986	3021	Duck domestic	USA	Wang C, <i>et al.</i> (2002)	99.3	98.9	100.0	99.7
AF505512	3021	Duck domestic	USA	Wang C, <i>et al.</i> (2002)	99.2	98.9	100.0	199.5
X12798	3021	Duck domestic	Germany	Mattes, <i>et al.</i> (1990)	98.6	98.5	100.0	98.2
X74623	3021	Duck domestic	India	GenBank	98.1	97.7	99.4	97.2
AF047045	3021	Duck domestic	Canada	GenBank	99.1	98.5	100.0	99.9

2.6 氨基酸同源性比较

为了进一步了解 24-18 与各基因型之间的差异, 将各病毒株所编码的 3 个蛋白(P、S 和 C 蛋白), 采用 PROSIS 软件分别对其氨基酸序列进行同源性比较。结果表明, 24-18 与各基因型的 C 蛋白及 S 蛋白比较, 氨基酸同源性均较高, 其中 C 蛋白氨基酸同源性为 95.0%~98.9%, S 蛋白同源性为 92.8%~100.0%, P 蛋白氨基酸的差异相对较大, 同源性介于 84.1%~99.9%之间(表 1)。

2.7 进化树分析

采用 CLUSTAL W 软件对 24-18 及 GenBank 中的 16 株 DHBV 全基因组进行分析, 可将其分为两个型。其中, 国内所得到的 8 株病毒株和一枚由澳大利亚所分离得到的病毒株(AJ006350)同属于一个型, 称之为中国基因型(Chinese), 而其它 7 株则属于另一个基因型, 为西方基因型(Western country)。24-18 属于西方基因型中的一个亚型(图 2)。

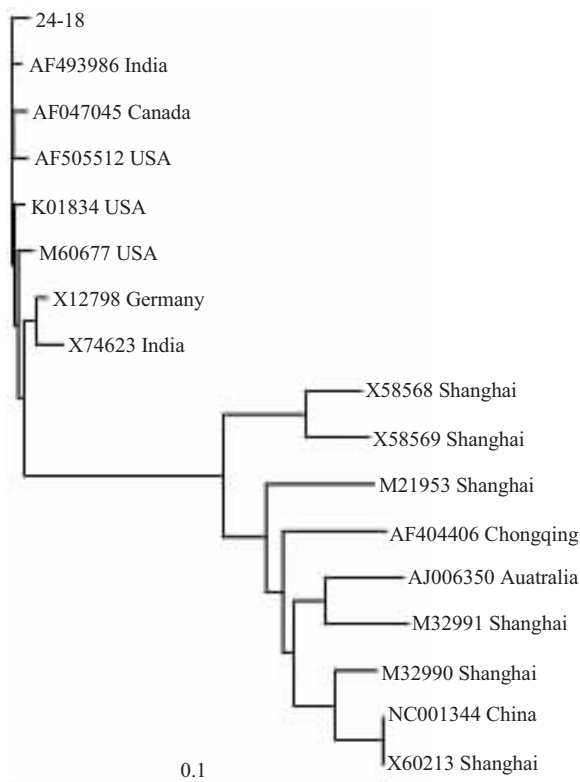


图 2 17 株 DHBV 全序列的进化树分析

Fig.2 Phylogenetic tree of 17 DHBV genomes

在 INTERNET 上用 BANKIT 程序进行序列登记。28-16 的登记号是 AY294656。

3 讨论

DHBV DNA 结构与其它嗜肝 DNA 病毒的基因组结构相似, 但分子较小, 仅 3 021~3 027 bp。由于缺

乏方便的 HBV 的组织培养系统, 迄今对 HBV 复制的绝大部分知识均来自家鸭中鸭乙型肝炎病毒模型的研究。我国的家鸭中有很高的 DHBV 感染率, 因其来源丰富, 易饲养, 取材方便, 可进行较大数量的研究, 是建立乙型肝炎动物模型的理想动物之一。

目前国内主要选用北京鸭为 DHBV 动物模型, 而本地市场上主要的肉食鸭是樱桃谷鸭, 其外形、毛色与北京鸭相似, 并含有北京鸭血统, 由于其产肉比率高, 目前在国内已渐取代北京鸭, 广泛饲养^[1]。国内外都有用此作为鸭乙型肝炎动物模型的报导^[2,3]。了解病毒的来源及其遗传背景, 对进一步进行动物实验有重要的意义。

Triyatni^[4]把 GenBank 中已有的 DHBV 基因型分为中国基因型和西方基因型。与 HBV 基因型的分型特点^[6]类似, DHBV 基因型的分布也具有明显的地理学特点。但由于近年来动物国际间的相互引进, 以及病毒的交叉感染, 使得本地鸭子之间可能存在有不同的基因型。本文中所获得的这一病毒株, 全长 3 021 bp, 比国内其它地区报导的分别少 3 和 6 bp^[4,6-9]。经核苷酸同源性比较, 与国内其它地区分离出的 8 株病毒株均存在一定的差异(核苷酸同源性为 89.4%~90.6%), 反而更接近于国外所分离得到的病毒株(核苷酸同源性为 98.1%~99.3%)。进化树分析显示该病毒株属于西方基因型中的一个亚型。认为原因如下: 一是在本地自然感染的鸭子中存在着以前研究中没有发现的新 DHBV 病毒亚型; 二是本地鸭子受到国外引进鸭的感染, 因而携带着与国内其它地区不同基因型的病毒。

DHBV DNA 基因组可分为 3 个开放阅读框: PreC/C、PreS/S 和 P 基因, 分别编码核壳蛋白 C, 外膜蛋白 S 和聚合酶蛋白 P, 各基因结构紧密, 在同一序列上有重叠的 ORF。DHBV 缺少哺乳动物嗜肝 DNA 病毒的 X 蛋白, 提示 HBx 并不参与基因组复制或毒粒装配机制。但如在基因组的相应部位改换终止密码子, 尽管序列同源性有限, 能得到与 X 蛋白的亲水性谱密切配比的假设的蛋白^[10]。如将 24-18 的 nt2301 的 TTA 换为起始密码子, 刚能产生结构类似的 X 蛋白(nt 2 301-nt 2 645)。该假设的 X-ORF 区与 P-ORF 的 3' 末端及 PreC/C-ORF 的 5' 端重叠。本文将 24-18 与 DHBV 各基因型三个编码蛋白的氨基酸序列进行同源性比较, 发现 24-18 的 S 蛋白及 C 蛋白与其它各毒株均高度保守; S 蛋白的基因型内氨基酸同源性可高达 100%, 而型间最大差异也仅为 7.2%; C 蛋白的各基因型氨基酸差异也仅在于 1.1%~5.0%之间。P 蛋白则显示出较大异质性, 氨基酸同源性比较显示 24-18 与其它基因型间差异介于 0.1%~15.9%, 从而认

为可用 P 蛋白的序列来代替全序列进行基因分型。在本研究中,对其中二例标本进行全长基因的测序,而对其它 12 例标本进行了 P 基因区段的测序,通过对 P 基因序列的分析,同样也证明了 P 基因可以代替全长来进行基因分型。

对于人乙型肝炎,不同基因型病毒对不同地区人群可能有不同致病性^[11]。而 DHBV 是否也类似于 HBV,不同鸭群对不同基因型病毒也存在着不同的耐受性或易感性,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 邓学龙,刘妮,郭兴伯,等.鸭乙型肝炎病毒实验感染樱桃谷鸭后在肝脏和外周血中的动态[J].广州中医药大学学报,1997,14(1):37-9.
Deng XL, Liu N, Guo XB, *et al.* Dynamics of DHBV-DNA and peripheral blood of cheny valley ducks infected with duck Hepatitis B virus[J]. J Guangzhou Tradit Med, 1997, 14(1): 37-9.
 - [2] 朱清静,聂广,李翰,等.鸭乙型肝炎肝纤维化模型的研究[J].临床与实验病理学杂志,2000,16(6):501-3.
Zhu QJ, Nie G, Li HM, *et al.* Duck model of hepatic fibrosis induced by duck hepatitis B virus[J]. J Clin Exp Pathol, 2000, 16(6): 501-3.
 - [3] Oliver MD, Jonker A. Effects of sweet, bitter and soaked micronised bitter lupins on duck-ling performance[J]. Br Poult Sci, 1998, 39(5):622-6.
 - [4] Triyatni M, Ey P, Tran T, *et al.* Sequence comparison of an Australian duck hepatitis B virus strain with other avian hepadnaviruses [J]. J Gen Virol, 2001, 82(Pt 2): 373-8.
 - [5] Stuyver L, Gendt S, Geyt C, *et al.* A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness [J]. J Gen Virol, 2000, 81: 67-74.
 - [6] Tong S, Mattes F, Teubner K, *et al.* Complete nucleotide sequence of a Chinese duck hepatitis B virus [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6139.
 - [7] Uchida M, Esumi M, Shikata T. Molecular cloning and sequence analysis of duck hepatitis B virus genomes of a new variant isolated from Shanghai ducks [J]. Virology, 1989, 173: 600-6.
 - [8] Sprengel R, Schneider R, Marion PL, *et al.* Comparative sequence analysis of defective and infectious avian hepadnaviruses [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(15): 4289.
 - [9] Hu J, Tang N, Huang AL. Sequence analysis of cloned duck hepatitis B virus genome from a Chongqing brown duck [J]. Chin J Hepatol, 2003, 11(6): 341-3.
 - [10] Lin B, Anderson DA. A vestigial X open reading frame in duck hepatitis B virus [J]. Intervirology, 2000, 43:185-90.
 - [11] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, *et al.* Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B [J]. Gastroenterology, 2000, 118: 554-9.
-
- (上接 399 页)
- #### 参考文献:
- [1] Genbacev O, DiFederico E, McMaster M, *et al.* Invasive cytotrophoblast apoptosis in pre-eclampsia [J]. Hum Reprod, 1999, 14 (Suppl 2): 59-66.
 - [2] 程宝鸾. 动物细胞培养技术 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2001. 56-73.
 - [3] 孔令红, 刘忠, 陈士岭, 等. 人绒毛膜滋养层细胞的培养 [J]. 第一军医大学学报, 2000, 20(1): 10-1.
Kong LH, Liu Z, Chen SL, *et al.* Culture of human trophoblastic cells [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2000, 20(1): 10-1.
 - [4] 卢圣栋. 现代分子生物学试验技术 [M]. 第 2 版, 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 458-65.
 - [5] Bischof P, Meisser A, Campana A. Control of MMP-9 expression at the maternal-fetal interface [J]. J Reprod Immunol, 2002, 55(1-2): 3-10.
 - [6] Bischof P, Campana Aldo. A putative role for oncogenes in trophoblast invasion [J]? Hum Reprod, 2000, 15 (Suppl 6): 51-8.
 - [7] Shimonovitz S, Hurwitz A, Hochnor D, *et al.* Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down-regulation by progesterone [J]. Am J Obstet Gynecol, 1998, 178(3): 457-61.
 - [8] Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour [J]. Trends Cell Biol, 1998, 8(11): 437-41.
 - [9] Schwartz GK, Wang H, Lampen N, *et al.* Defining the invasive phenotype of proximal gastric cancer cells [J]. Cancer, 1994, 73(1): 22-7.
 - [10] Fang J, Shing Y, Wiederschain D, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(8): 3884-9.
 - [11] Meisser A, Chardonnens D, Campana A, *et al.* Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases [J]. Mol Hum Reprod, 1999, 5(3): 252-60.
 - [12] Todt JC, Yang Y, Lei J, *et al.* Effects of tumor necrosis factor-alpha on human trophoblast cell adhesion and motility [J]. Am J Reprod Immunol, 1996 Aug, 36(2): 65-71.
 - [13] Yang Y, Yelavarthi KK, Chen HL, *et al.* Molecular, biochemical, and functional characteristics of tumor necrosis factor-alpha produced by human placental cytotrophoblastic cells [J]. J Immunol, 1993, 150(12): 5614-24.
 - [14] Knackstedt M, Ding JW, Arck PC, *et al.* Activation of the novel prothrombinase, fg12, as a basis for the pregnancy complications spontaneous abortion and pre-eclampsia [J]. Am J Reprod Immunol, 2001, 46(3):196-210.