

云南省猪戊型肝炎病毒全基因组扩增及进化分析

杨臣臣,龙飞燕,毕艳红,李云龙,王珏,禹文海,井申荣,黄芬

摘要:目的 对猪戊型肝炎病毒全长基因组进行扩增,分析其进化关系,为HEV的感染性克隆研究奠定基础。方法 利用巢式逆转录聚合酶链反应(RT-nPCR)和RACE技术对猪粪便中HEV样品进行全基因组扩增,利用DNAStar和MEGA4.0软件进行同源性比较和进化树分析。**结果** RT-nPCR方法扩增出HEV的5段目的基因序列和RACE技术扩增出HEV的5'和3'端,序列比对结果正确,HEV全长扩增成功。同源性分析显示其与新疆株(GU119961)同源性较高(96.1%)。系统进化树显示该病毒属于基因4型h亚型猪HEV。**结论** HEV全基因组序列扩增成功,为深入研究HEV奠定基础。

关键词:猪戊型肝炎病毒;巢式逆转录PCR;全长基因组分析

中图分类号:R373.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2015)06-0547-05

Amplification and evolution analysis on full-length genome of swine hepatitis E virus

YANG Chen-chen, LONG Fei-yan, BI Yan-hong, LI Yun-long,
WANG Jue, YU Wen-hai, JING Shen-rong, HUANG Fen

(Medical Faculty, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: To analyze the evolution trend and make a foundation for researching the infectious clone of swine Hepatitis E Virus (HEV), complete genome sequences of swine HEV was amplified by Reverse transcription nested PCR (RT-PCR). The homology and phylogenetic tree were analyzed by DNAStar and MEGA4.0 software, respectively. Results indicated that the full-length genome of swine HEV was successfully amplified by RT-nPCR and RACE. The homology analysis indicated that the swine HEV shared the highest homologies (96.1%) with swine HEV isolated from Xinjiang (GU119961). The phylogenetic tree suggested that this isolate belonged to swine HEV 4h sub-genotype.

Keywords: swine hepatitis E virus; RT-nPCR; complete genome sequences analysis

Supported by the National Science Foundation of China (No. 31360619), the Natural Science Foundation of Yunnan Province in China (Nos. 2011FZ068 and 2013FB032), and the China Postdoctoral Science Foundation (No. 2014M562672)

Corresponding author: Huang Fen, Email: huangfen6789@163.com

戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV),是一种经肠道传播,严重危害人类健康的病毒性肝炎病原体^[1]。HEV主要经过粪-口途径传播,食用HEV污染的水源和食物是导致HEV暴发流行的主要原因^[2-3]。戊型肝炎病毒对孕妇和胎儿危害尤为严重,极易造成胎儿早产、流产和死胎,妊娠晚期感染HEV后死亡率高达25%^[4-7]。我国1986—1988年新疆地区HEV大流行造成20多万人发病,死亡707人(孕妇414人),是迄今为止世界上最大的

国家自然科学基金资助(No. 31360619);云南省自然科学基金(No. 2013FB032, 2011FZ068);中国博士后科学基金(No. 2014M562672)资助,杨臣臣和龙飞燕同等贡献。

通讯作者:黄芬,Email:huangfen6789@163.com

作者单位:昆明理工大学医学院,昆明 650500

HEV流行^[8]。

根据HEV基因组全序列的差异,可以将戊型肝炎病毒不同毒株分为4个主要的基因型:基因1型、基因2型、基因3型和基因4型^[9-10]。新发现的禽HEV与其他4种基因型差异较大,成为一种新的基因型,命名为禽HEV^[11]。2009年Zhao等在家兔上分离到的HEV株与已知的4种HEV基因型和禽HEV同源性均较低,是一种能感染兔子的新HEV基因型^[12]。而鼠HEV是在德国挪威大鼠体内分离得到^[13-14]。

云南省以旅游产业为主,流动人口较大,卫生条件相对落后,至今还保留着生食猪肉的风俗,并且很多地方仍直接饮用不经消毒处理的露天生水,这增

加 HEV 的流行暴发的可能。但是到目前为止, 关于云南省 HEV 的分子流行调查较少, 仅有 2009 年李文贵等对昆明地区屠宰场猪肉产品中 HEV 的感染情况进行过初步的调查^[15]。在 2010 年, 我们对云南省农村猪群中 HEV 的流行情况进行了调查, 发现在猪群中存在较高的 HEV 感染率(阳性率为 10.26%)^[16]。本文通过选取其中一株阳性 HEV 样本, 进行 HEV 的全基因组扩增, 并对其同源性和进化关系进行分析, 为后续 HEV 研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 样品采集与处理 猪 HEV 粪便样本, 采用 0.1% DEPC 处理的 PBS 缓冲液(PBS 缓冲液, NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na₂HPO₄ 10 mmol/L, KH₂PO₄ 2 mmol/L, pH7.2~7.4)重悬粪便样本, 离心力 12 000 g 离心 15 min, 收集上清, -80 °C 保存。

1.2 RT-nPCR 法检测 HEV RNA 利用 Trizol (Invitrogen) RNA 提取试剂盒提取粪便上清总 RNA, 并进行逆转录合成 cDNA 链。逆转录试剂采用 TaKaRa 公司 AMV 逆转录试剂盒, 操作按试剂盒说明书进行。RT-nPCR 引物序列为人和猪 HEV 的兼并引物, 可以扩增人和猪 HEV 的所有序列, 引物序例如表 1^[17]。反应参数为: 42 °C 30 min, 95 °C

5 min。利用合成 cDNA 进行巢式 PCR, 扩增 HEV 衣壳蛋白 ORF2 区域部分片段(348 bp)。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。

1.3 HEV 基因序列全长扩增 利用 QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)试剂盒提取 HEV 阳性样品(27#)总 RNA, 利用 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver. 2 试剂盒扩增 HEV 的全基因组序列。全基因组序列分为 5 段进行扩增, F1 片段大小为 1 285 bp, F2 片段大小为 1 603 bp, F3 片段大小为 1 339 bp, F4 片段大小为 1 236 bp, F5 片段大小为 1 932 bp, 引物序列如表 1^[1]。PCR 反应参数为: 50 °C 30 min, 95 °C 3 min, 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 3 min。PCR 循环参数: 35 循环。HEV 5' 和 3' 端分别采用 5'-Full RACE Kit with ATP 和 3'-Full RACE Core set with PrimeScript™ RTase 试剂盒进行扩增, 5' 和 3' 端片段大小分别为 501 bp 和 936 bp, 反应条件参照说明书。具体为: 外套 95 °C 3 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min; PCR 循环参数: 20 循环; 72 °C 延伸 10 min。内套: 95 °C 3 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min; PCR 循环参数: 25 循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。目的条带胶回收纯化后进行克隆和测序。

c	Primer sequence (5'-3')	Product	Length /bp	Reference
S11	AGGCTCCTGGCRTYACTACTG	F1	1 285	[17]
A12	GCG GCA CTG GGC RTA AAA CT			
HEV-A3	GAAAAGTCTGGCCGTGATTAC	F2	1 603	This study
HEV-B2	TCCTCAGTAATAGTAAGGGC			
HEV-C3	GCCAGCCATAGCTGGTTGAAG	F3	1 339	This study
D3R	CTGGAAGAACATGTTACGAGACAC			
D4F	ATGGTGAGAAAGGCCAGGAT	F4	1 236	This study
ER2	GAAGGGGTTGGTTGGATGAAT			
EF1	TTTCTGGGGTGACCGGGTTGATT	F5	1 932	This study
HEV31	CAGGGAGCGCGAACGCAGAAAAGA			
5'Race-A1	GCAGTGARTARAGYGCAAYCCCHGTCT	5'RACE	501	[17]
5"Race-A2	CGRGCCATYGCCTCNGCRACATC			
3'Race-S1	ACYACNACTGCTGCYACACGBTTYATGA	3'RACE	936	
3'Race-S2	CTYTGTTYAACTTGCTGAYACGCKCTC			
HEV1	AATTATGCC(T)CAGTAC(T)CGG(A)GTTG	HEV detection	348	[16]
HEV2	CCCTTA(G)TCC(T)TGCTGA(C)GCATTCTC			
HEV3	GTT(A)ATGCTT(C)TGCATA(T)CATGGCT			
HEV4	AGCCGACGAAATCAATTCTGTC			

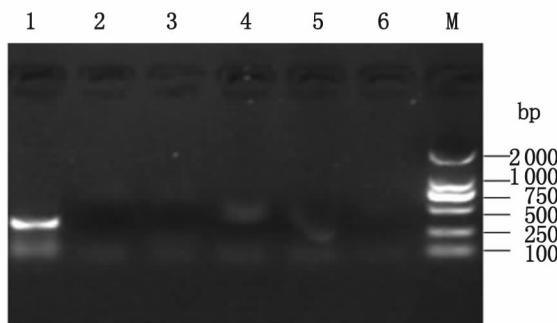
1.4 HEV 同源性和进化分析 采用 SeqMan 软件对 HEV 的 5 个片段和 5' 和 3' RACE 进行拼接,

HEV 全基因组序列进行 Blast 核苷酸序列比对分析, 并提交 GeneBank 数据库(KJ155502)。采用

DNAStar 软件和 Megalign 软件对其进行分别进行同源性分析和系统进化分析。HEV 基因型分析所采用的参照序列为:基因 1 型为 NC001434 和 M80581;基因 2 型为 M74506;基因 3 型为 JN906975 和 AB089824;基因 4 型为 GU206559。其中基因 4 型亚型分析采用的参照序列为:a 亚型为 AF117275 和 AJ344171;b 亚型为 AB124818 和 AJ344186;c 亚型为 AB082545;d 亚型为 AJ344181 和 AY596308;e 亚型为 AF324501;g 亚型为 AB108537;h 亚型为 JN542514 和 KF703731。

2 结果

2.1 猪 HEV RT-nPCR 检测 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,如图 1,目的片段和理论大小 348 bp 相一致。PCR 产物连接 pMD18-T 载体,进行序列测定,Blast 分析显示该病毒属于基因 4 型猪 HEV。



1~5: 样品编号;6: 阴性对照;M: DL2000 marker

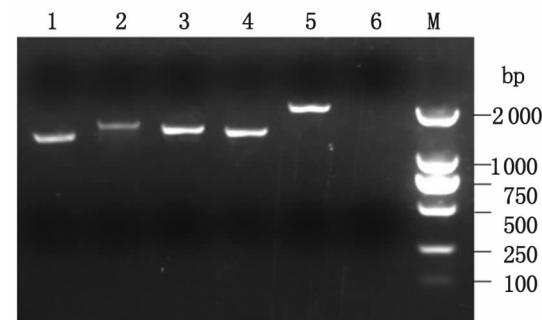
1-5: number of samples; 6: negative control; M: DNA Marker DL2000.

图 1 RT-nested PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of HEV gene fragment amplified by RT-nested PCR

2.2 猪 HEV 全长基因组序列扩增及分析 HEV 全基因组序列为 5 部分进行 PCR 扩增,取产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,5 个目的片段和理论大小相一致,结果如图 2。HEV 5' 和 3' 端扩增结果与理论大小一致,如图 3。PCR 产物连接 pMD18-T 载体,进行序列测定,经 Blast 分析显示结果正确,猪 HEV 全长扩增成功。HEV 全基因组序列提交 GenBank 数据库,序列号为 KJ155502。

本实验分离的 HEV 病毒株基因组全长为 7 240 bp(除去 Pol(A)部分),GC 含量为 55%。5' 端为 1 bp~26 bp,开放阅读框 1(ORF1)为 27 bp~5 150 bp,开放阅读框 2(ORF2)为 5 147 bp~7 171 bp,开放阅读框 3(ORF3)为 5 175 bp~5 519 bp,3' 端为 7 172 bp~7 264 bp,其 ORF1 和 ORF2 有 3 个

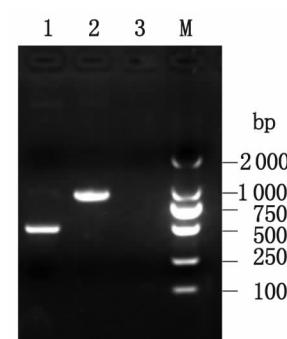


1:F1 片段 2:F2 片段 3:F3 片段 4:F4 片段;5:F5 片段;6:阴性对照;M:DL2000 marker

1: F1 fragment; 2: F2 fragment; 3: F3 fragment; 4: F4 fragment; 5: F5 fragment; 6: negative control; M: DNA Marker DL2000.

图 2 猪 HEV 全长基因组序列 PCR 扩增

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of HEV complete sequences fragment amplified by PCR



1:5'RACE PCR;2:3'RACE PCR 3: 阴性对照;M:DL2000 marker

1: 5' RACE PCR; 2: 3' RACE PCR; 3: negative control; M: DL2000 marker.

图 3 猪 HEV 基因组 5'RACE 和 3'RACE PCR 扩增

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of HEV 5'RACE and 3'RACE sequences fragment amplified by PCR

碱基的重叠,ORF3 与 ORF2 完全重叠。

2.3 猪 HEV 全长基因组序列同源性和系统进化分析 全长基因组同源性分析显示,该毒株与 HEV 1 型、2 型、3 型和 4 型的同源性为 39.1%~96.1%。与 2009 年分离自新疆(GU119961)、武汉(GU188851)和 2011 年分离自南京(JQ740781)的同源性最高分别为 96.1%、95.7% 和 95.5%;与 1993 年分离自墨西哥的人 HEV(M74506, 基因 2 型)同源性最低(39.1%),如图 4。

基于 HEV ORF2 部分序列(348 bp)的系统进化分析显示,本实验分离毒株(KJ155502)属于基因 4 型 h 亚型猪 HEV,与 2011 年分离自云南的猪 HEV(JN613156)、2009 年分离自新疆的猪 HEV(GU119961)、2009 年分离自武汉的猪 HEV(GU188851)和 2011 年分离自南京的人 HEV(JQ740781)亲缘关系较近,如图 5。

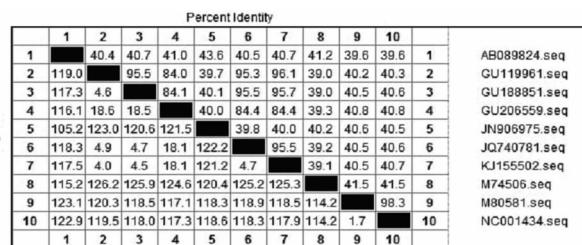


图 4 HEV 全基因组序列同源性分析(%)

Fig. 4 Homolog analysis of HEV complete genome sequences

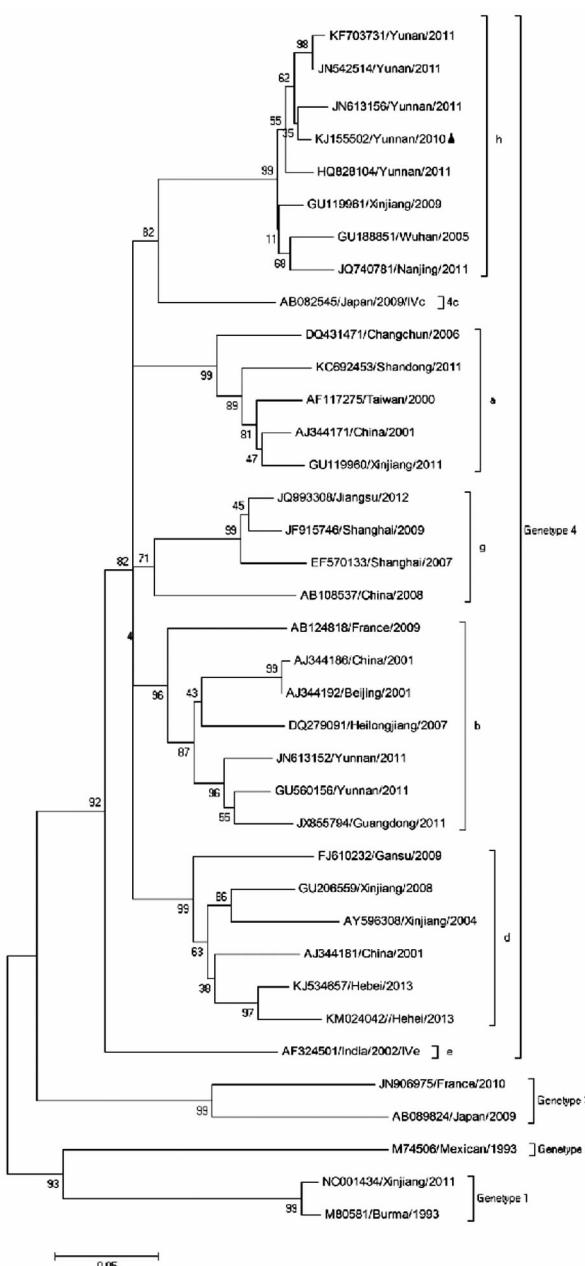


图 5 HEV 部分 ORF2 序列系统进化分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis base on HEV ORF2 partial sequence

3 讨 论

猪 HEV 病毒是一种人兽共患病病毒, 猪是 HEV

的主要宿主, 不卫生的饮食习惯和人畜相互接触都会引起 HEV 的传播感染。近几年, 在中国, 基因 4 型 HEV 已经代替基因 1 型成为优势基因型^[21]。本实验中分离的 HEV 病毒株全长核苷酸序列与基因 4 型猪 HEV 的同源性最高, 为 84.4%~96.1%。该毒株与 2011 李文贵等分离自云南的基因 4 型 h 亚型猪 HEV 毒株(JN613156)同源性较高^[20]。同时李文贵等在云南猪群中还分离到 HEV 基因 4 型 b 亚型(JN613152), 这说明在云南地区至少存在 b 和 h 两种亚型。本实验分离的猪 HEV 毒株与新疆、武汉和南京等地的 HEV 同源关系较近, 同属于 h 亚型, 这可能与云南省是一个旅游大省有关。因此, 一旦出现 HEV 污染水源或食物, 将可能会导致 HEV 的暴发流行。本次实验初步分析了云南省昆明地区猪 HEV 的序列特征, 丰富了 HEV 进化和分子流行病学的内容, 为 HEV 防治及 HEV 感染性克隆研究奠定基础。

参 考 文 献 :

- [1] Radha Krishna Y, Saraswat VA, Das K, et al. Clinical features and predictors of outcome in acute hepatitis A and hepatitis E virus hepatitis on cirrhosis[J]. Liver Int, 2009, 29(3): 392-398. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2008.01887.x
- [2] Banks M, Martelli F, Grierson S, et al. Hepatitis E virus in retail pig livers[J]. Vet Rec, 2010, 166(1): 29. DOI: 10.1136/vr.b5602
- [3] Feagins AR, Opiressnig T, Guenette DK, et al. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA[J]. J Gen Virol, 2007, 88(Pt 3): 912-917. DOI: 10.1099/vir.0.82613-0
- [4] Xu J, Wu F, Tian D, et al. Open reading frame 3 of genotype 1 hepatitis E virus inhibits nuclear factor-kappaB signaling induced by tumor necrosis factor-alpha in human A549 lung epithelial cells[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e100787. DOI: 10.1371/journal.pone.0100787
- [5] Kumar A, Beniwal M, Kar P, et al. Hepatitis E in pregnancy [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2004, 85(3): 240-244. DOI: 10.1016/j.ijgo.2003.11.018
- [6] Devhare PB, Chatterjee SN, Arankalle VA, et al. Analysis of antiviral response in human epithelial cells infected with hepatitis E virus[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63793. DOI: 10.1371/journal.pone.0063793
- [7] Chandra V, Holla P, Ghosh D, et al. The hepatitis E virus ORF3 protein regulates the expression of liver-specific genes by modulating localization of hepatocyte nuclear factor 4[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e22412. DOI: 10.1371/journal.pone.0022412
- [8] Huang RT, Li DR, Wei J, et al. Isolation and identification of hepatitis E virus in Xinjiang, China[J]. J Gen Virol, 1992, 73 (Pt 5): 1143-1148. DOI: 10.1099/0022-1317-73-5-1143
- [9] Okamoto H. Hepatitis E virus cell culture models[J]. Virus Res,

- 2011, 161(1): 65-77. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.01.015
- [10] Aggarwal R, Jameel S. Hepatitis E[J]. Hepatology, 2011, 54(6): 2218-2226. DOI: 10.1002/hep.24674
- [11] Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, et al. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States[J]. J Gen Virol, 2001, 82(Pt 10): 2449-2462.
- [12] Geng J, Wang L, Wang X, et al. Study on prevalence and genotype of hepatitis E virus isolated from Rex Rabbits in Beijing, China[J]. J Viral Hepat, 2011, 18(9): 661-667. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2010.01341.x
- [13] Zhang W, Shen Q, Hua X, et al. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10): 1981-1983. DOI: 10.3201/eid1710.101399
- [14] Johne R, Heckel G, Plenge-Bonig A, et al. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(9): 1452-1455. DOI: 10.3201/eid1609.100444
- [15] Li WG, She RP, Li RW, et al. Investigation of swine hepatitis E virus infection in the slaughtered swine in Kunming of Yunnan Province[J]. China Vet Sci, 2010, 40(6): 636-641. (in Chinese)
- 李文贵,余锐萍,李睿文,等.昆明屠宰猪戊型肝炎病毒感染情况的调查[J].中国兽医科学,2010,40(6):636-641.
- [16] Huang F, Yun WH, Ma TW, et al. Molecular epidemiology of swine hepatitis E virus in a village of Yunnan[J]. Chin J Zoonoses, 2012, 28(3): 274-277. (in Chinese)
- 黄芬,禹文海,马天武,等.云南省某农村猪戊型肝炎病毒分子流行病学调查[J].中国人兽共患病学报,2012,28(3):274-277.
- [17] Huang, FF, Haqshenas G, Guenette, DK, et al. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40: 1326-1332. DOI: 10.1128/JCM.40.4.1326-1332.2002
- [18] Fu H, Wang L, Zhu Y, et al. Analysing complete genome sequence of swine hepatitis E virus (HEV), strain CHN-XJ-SW13 isolated from Xinjiang, China: putative host range, and disease severity determinants in HEV[J]. Infect Genet Evol, 2011, 11(3): 618-623. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.01.018
- [19] Liang JR, Wei XF, Xue C, et al. Genotype and subgenotype of swine HEV[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2007, 27(8): 747-750. (in Chinese)
- 梁靖瑞,韦献飞,薛城,等.猪HEV基因型和亚型的研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2007,27(8):747-750.
- [20] Shu X, Duan X, Song C, et al. Genetic heterogeneity of swine hepatitis E virus isolates from Yunnan province[J]. Virol J, 2014, 11: 162. DOI: 10.1186/1743-422X-11-162
- [21] Zhang W, He Y, Wang H, et al. Hepatitis E virus genotype diversity in eastern China[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16: 1630-1632. DOI: 10.3201/eid1610.100873

收稿日期:2015-01-29;修回日期:2015-03-30

• 消息 •

《中国人兽共患病学报》开通微信公众平台订阅号

微信公众平台是为媒体和个人提供新的信息传播方式,构建与用户之间更好的沟通与管理的新一代网媒平台。利用微信公众平台给特定的用户推送各类资讯,内容丰富,信息交流高效、及时。

为了提升期刊影响力,实现信息传播的覆盖面和效果的最大化,《中国人兽共患病学报》开通微信公众平台:《中国人兽共患病学报》,订阅号:rsghb87552018;及时推送本刊当期目录、中英文摘要、全文链接、本刊动态、会讯、作者编者以及读者信息互动。欢迎各位读者、作者订阅。您只需点击微信,查找公众号:《中国人兽共患病学报》,添加关注后即可成为本刊的微信平台用户,或扫一扫微信二维码:

