

TT 型病毒基因组的克隆与进化分析*

任 浩¹ 董 辉¹ 朱分祿¹ 缪晓辉² 王 文¹ 戚中田^{1**}

(¹ 第二军医大学基础医学部微生物学教研室 上海 200433)

(² 第二军医大学长征医院感染科 上海 200433)

摘 要:利用 PCR 方法从输血传播性病毒(transfusion transmitted virus, TTV)阳性标本中获得不同长度且重叠覆盖 TTV 基因组的 DNA 片段。将 PCR 扩增片段克隆到 pT-Adv 载体中,筛选获得阳性克隆。DNA 序列测定结果表明所克隆的片段为 TTV 基因组序列。利用 DNA 片段中特有的限制性内切酶位点将 TTV 的 DNA 片段首尾相连,得到近全长的基因组克隆,命名为 TTV021。对 TTV021 的核酸序列进行分析,TTV021 长 3 472 nt,存在 2 个阅读框架 ORF1 和 ORF2,分别编码 785 和 146 个氨基酸。将 TTV021 与其它已知的 TTV 基因组全序列进行了同源性比较,并进行进化分析。结果表明,TTV021 序列与 TTV 分离株 CHN2、BDH1 的遗传距离较近,而与其它分离株相对较远。

关键词:输血传播性病毒,克隆,同源性,进化分析

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 04-0408-07

Nishizawa 等^[1]应用表现差异分析(RDA)技术,从一例日本输血后肝炎患者血中克隆到一种可能与肝炎有关的新病毒基因,命名为输血传播性病毒(transfusion transmitted virus, TTV)。TTV 基因组长约 3 739 nt^[2],为无包膜的单链 DNA 病毒,含有 ORF1 和 ORF2 两个开放读框,分别编码 770 个和 202 个氨基酸,根据其理化特性将其归属于微小 DNA 病毒属(Parvoviridae)。近来有研究认为^[3],TTV 基因组并非线形,而是一长约 3 852 nt 的单链环状 DNA 病毒,比先前报道的序列多了 113 个 GC 含量丰富(89%)的核苷酸,并建议将其归类于环状 DNA 病毒(Circinoviridae)。

目前,GenBank 中已注册的 TTV 全基因序列有 18 株,其中 13 株为环状 DNA 病毒序列。环状 DNA 病毒的分子生物学性状,如二级结构的复杂性、滚环复制以及读码框架的重复利用等与线性病毒有较大的差异。为了证实 TTV 基因组序列的形态与结构,以进一步了解病毒的复制、致病,以及与人类肝炎的关系,本研究首先检测了 TTV DNA 在正常献血员和血透病人中的阳性率,120 份 ALT 正常的献血员血清标本中,检出 TTV DNA 阳性标本 20 份,阳性率为 16.7%^[4]。68 份血透病人血清标本中,TTV DNA 阳性者 19 份,阳性率为 27.9%。在此基础上,扩增不同长度的重叠覆盖 TTV 基因组的 DNA 片段,获得了近全长的基因组克隆。现将结果报道如下。

* 国家杰出青年科学基金资助课题(39825116)

** 联系作者:戚中田, Tel:021-25070265; Email: qizt@smmu.edu.cn

作者简介:任 浩(1973-),女,山东人,第二军医大学微生物学教研室,博士,主要从事分子病毒学研究。

TTV021: GenBank; Accession NO. AF254410

收稿日期:2000-07-27,修回日期:2000-12-19

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及菌株:PCR 试剂采用宝灵曼公司的 Expand™ Long Template PCR System。pT-Adv 载体购自 CLONTECH 公司,其线性载体末端的 T-尾可与带 A-尾的 PCR 产物配对。限制性内切酶和连接酶购自 Biolab 或 Promega 公司。大肠杆菌 DH5 α 菌种由本室保存。

1.1.2 引物:根据 TTV TA278 株^[2]序列设计,共 10 条,由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 抽提:采用 QIAGEN 的病毒 DNA 抽提试剂盒,按照说明操作。阳性血清起始量为 200 μ L,最后用 50 μ L Tris-Cl(pH8.5)洗脱备用。

1.2.2 基因片段的扩增:所有 PCR 模板均取自一位 TTV DNA 阳性患者血清,以 10 μ L DNA 为模板,进行 PCR 扩增。扩增条件为:94℃变性 3min,然后根据所扩增片段的长度和引物的 T_m 值调整退火温度和时间。扩增程序分两阶段进行:(1)94℃变性 30~45s,55℃~60℃退火 60s,68℃延伸 120~150s,扩增 10 个循环;(2)每一循环延伸时间增加 10s,继续扩增 25 个循环。反应结束前于 68℃延伸 15min。

1.2.3 扩增片段的克隆及序列测定:PCR 产物纯化后,直接与 pT-Adv 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,蓝白斑筛选阳性克隆。挑取白色菌落抽提质粒,以 EcoRI 进行酶切鉴定插入外源 DNA 片段阳性克隆。使用 PE 公司的 ABI PRISM™ 337DNA 自动测序仪,用载体上的 M13 正反向引物对插入的外源 DNA 片段进行双向测序。每一片段多次测序,并应用 BLAST 软件将所测得的核酸序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比较。

1.2.4 DNA 片段的拼接:PC/Gene 软件分析所得 TTV 基因片段及 pT-Adv 载体上的酶切位点,利用片段上特有的酶切位点将 5 个片段以首尾方式连接,命名为 TTV021。

1.2.5 TTV021 的基因组结构特点:PC/Gene 软件分析 TTV021 的基因组结构特点,如非编码区的基因组成,有无重复序列和回文序列等,以及所编码的氨基酸的抗原性分析。

1.2.6 TTV 基因组序列的同源性分析:TTV021(AF254410)为本实验室自行克隆并测定的基因组序列,其它 18 个分离株(SANBAN AB025946, BDH1 AF116842, CHN1 AF079173, CHN2 AF129887, GH1 AF122913, JA1 AF122916, JA10 AF122919, JA20 AF122914, JA2B AF122918, JA4 AF122917, JA9 AF122915, TA278 AB008394, TK16 AB026346, TP13 AB026347, TRM1 AB026345, TUS01 AB017613, US32 AF122921, US35 AF122920)的全基因组序列均来自于 GenBank 数据库。使用 PILEUP 软件(Wisconsin Package, version 10.0)进行多序列的同源比较,并用 PLOTSIMILARITY (Wisconsin Package, version 10.0)对 19 个分离株全序列的各段区域进行相似性分析,绘图时的移动窗口大小为 80 nt。

1.2.7 TTV 基因组序列的进化分析:选取 TTV021 中 1881~2236bp 的一段序列,与其它分离株的相应核酸序列以及 GenBank 中其它一些相关的 TTV DNA 片段序列用 PILEUP 软件(Wisconsin Package, version 10.0)进行多序列的同源比对。通过 PAUPSEARCH 软件(Wisconsin Package, version 10.0)中的 Bootstrap analysis using neighbor-joining distance 分析其进化相关性、核酸序列的相对遗传距离(genetic distance)和进化分支的可靠性,进化分析结果使用 TREEVIEW 软件^[9]绘制进化树。

2 结果

2.1 TTV 基因片段的大小与位置

采用 5 对引物(表 1)分别扩增,获得 IS1-M1、S2-M2、P1-IAS2、IS3-NW4 和 P2-M3 等 5 个 TTV 基因组片段, DNA 测序证实其长度分别为 936bp,902bp,782bp,658bp 和 756bp。它们在基因组中的位置如图 1 所示。

表 1 TTV 扩增引物的序列和位置

Table 1 Sequence and location of primers for TTV amplification

Primer	Sequence(5' ~ 3')	Location in Genome	Polarity
IS1	TGCCGAAGGTGAGTTTACACACC	178 ~ 200	+
M1	CAAAGCGTCTGGGTAGTTGG	917 ~ 937	-
S2	TATGCCACACACTCAGACGATAC	895 ~ 917	+
M2	TGTGTAGTCCTCATTTGTCAAGG	1775 ~ 1797	-
P1	ACAGCAACCACAACAAC TTATGC	1603 ~ 1625	+
IAS2	CTAACAAGCTGTTGCCGAACG	2361 ~ 2381	-
IS3	GCCTATTACAATGAGAGCTAAATGGTATCC	2202 ~ 2231	+
NW4	GCTAACAAGCTAGGGTTGATATC	2836 ~ 2858	-
P2	AGAGGAAGAGACGCAGACCGT	2718 ~ 2738	+
M3	CTGTGACCTCACTGCAACCG	3454 ~ 3473	-

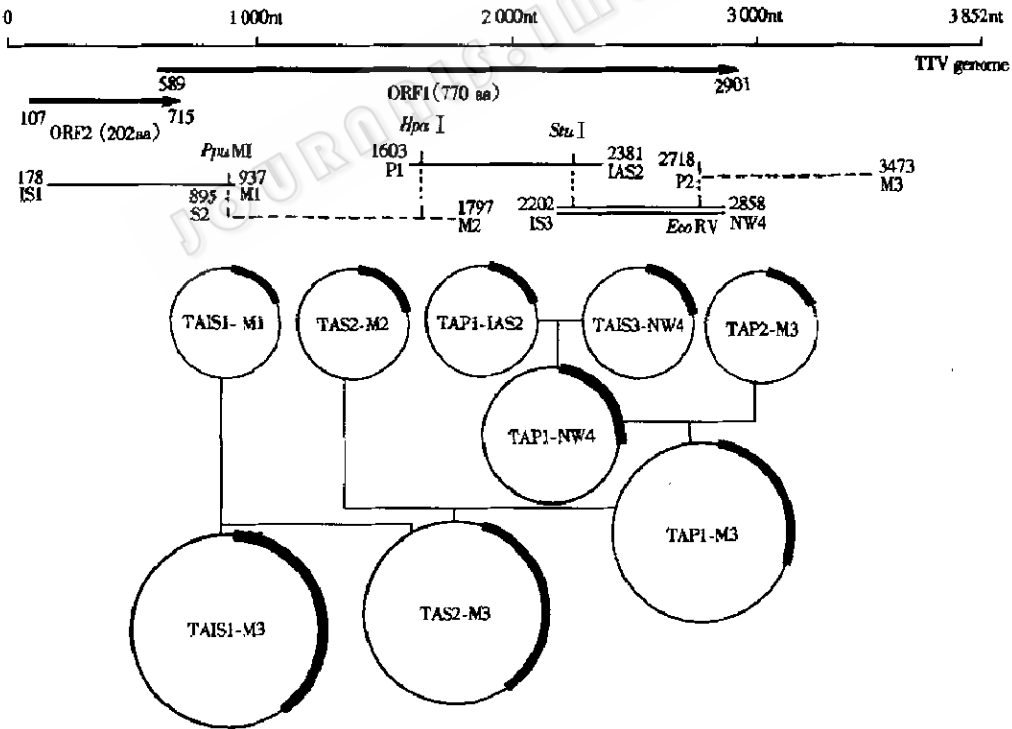


图 1 TTV 基因片段在基因组中的位置和拼接过程

Fig.1 Location of amplified fragments in TTV genome and strategy for construction of subgenome

2.2 TTV 基因片段的克隆

将 5 个 TTV 基因片段克隆到 pT-Adv 载体中,分别获得重组质粒 pTAIS1-M1,pTAS2-

M2, pTAP1-IAS2, pTAIS3-NW4 和 pTAP2-M3 (图 1)。pT-Adv 载体的多克隆位点有两个 *EcoRI* 酶切位点, *EcoRI* 单酶切鉴定重组克隆, 证实所得片段与预期大小一致。

2.3 TTV DNA 片段的连接

如图 1 所示, 利用 P1-ISA2 和 IS3-NW4 片段上的共同位点 *StuI* (pT-Adv 载体上无), 以 *StuI* 和 *XhoI* (载体上) 酶切 pTAP1-IAS2 和 pTAIS3-NW4, 回收相应的载体和片段, 连接获得 pTAP1-NW4 重组子; 利用 P1-NW4 和 P2-M3 片段上的 *EcoRV* 位点 (pT-Adv 载体上也有该位点), *EcoRV* 单酶切 pTAP1-NW4 和 pTAP2-M3, 通过鉴定连接方向获得 pTAP1-M3 重组子; 利用 S2-M2 和 P1-M3 片段上共同的 *HpaI* 位点 (pT-Adv 载体上无), *HpaI* 和 *BamHI* 双酶切 pTAS2-M2 和 pTAP1-M3, 连接获得 TAS2-M3 重组子, 最后再利用 IS1-M1 和 S2-M3 片段上的 *PpuMI* 位点 (pT-Adv 载体上无), *PpuMI* 和 *HindIII* 双酶切 TAIS1-M1 和 pTAS2-M3, 连接得到 pTAIS1-M3 重组子, 所克隆的片段长 3,472bp, 命名为 TTV021, 已获取 GenBank 注册登记, 序列号为 AF254410。

2.4 TTV021 的基因组结构特点

对 TTV021 的全序列进行分析, 其全长为 3472nt, G + C 含量为 47.5%, 存在 2 个阅读框架 ORF1 和 ORF2, 分别编码 785 (540 ~ 2896nt) 和 146 (86 ~ 535nt) 个氨基酸。在两个阅读框架中分别存在抗原决定簇, 其位置与组成分别是 ORF1: 19 ~ 28aa, Arg- Arg- Arg- Arg- Arg- Arg- Arg- Arg- Lys-Arg; ORF2: 102 ~ 107 aa, Arg- Arg- Arg- Arg- Arg- Asp-Tyr。5' 端非编码区的重复序列和回文序列较少, 3' 端非编码区的重复序列和回文序列较多 (数据未显示)。

2.5 TTV 基因组序列比较和相似性分析

将 TTV021 与其它 18 个分离株序列进行相似性分析, 结果如表 2 所示。各 TTV 基因组间的变异较大, 其中 SANBAN 与其它各株间的同源性较低, 最高仅 0.48, 其变异不仅位于编码 ORF1, ORF2, 非编码区序列的变异也很大 (数据未显示)。图 2 显示了不同国家或地区来源的 TTV 各区段的相似性结果, 图中的虚线代表平均相似值, 虚线以上表示序列同源性较高, 以下则表示相差显著。由此可见在 TTV 基因组 ORF1 区存在多个保守区, 1 个相对高变区; 在 ORF2 中有 1 个保守区, 而非编码区的变异较大。

2.6 TTV 基因组地进化分析

根据进化分支、相对遗传距离和进化分支的可靠性结果, 绘制了进化树 (unrooted phylogenetic tree, 图 3)。根据所有序列两两间

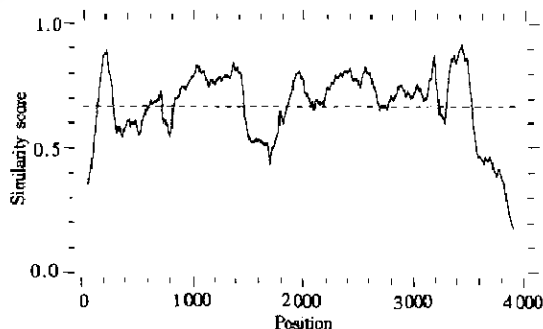


图 2 TTV 分离株的平均相似性分析

Fig.2 Running average of the similarity among the sequences of TTV isolates

Selected TTV isolates including: TTV021, BDH1, CHN1, CHN2, GH1, JA1, JA10, JA20, JA2B, JA4, JA9, SANBAN, TA278, TK16, TRM1, TP1-3, TUS01, US32 and US35 sequences fetched from GenBank. Plot-Similarity calculates the average similarity among all members of a group of aligned sequences at each position in the alignment. The sliding windows of comparison is 80 nt. The average similarity over the entire windows is plotted at the middle position of the windows. The average similarity across the entire alignment is plotted as a dotted line.

表 2 TTV021 和其它 TTV 分离株的核苷酸同源性

Table 2 Identity of nucleotide between TTV021 and other TTV isolate *

	TTV021	BDH1	CHN1	CHN2	GH1	JA1	JA10	JA20	JA2B	JA4	JA9	TA278	TK16	TP1 - 3	TRM1	TUS01	US32	US35
SANBAN	0.41	0.46	0.47	0.47	0.47	0.46	0.48	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.44	0.44	0.44	0.55	0.46	0.46
US35	0.57	0.67	0.68	0.68	0.70	0.92	0.70	0.69	0.92	0.71	0.69	0.69	0.67	0.67	0.67	0.53	0.93	
US32	0.57	0.68	0.68	0.68	0.70	0.96	0.70	0.69	0.96	0.70	0.69	0.69	0.67	0.67	0.67	0.52		
TUS01	0.44	0.52	0.52	0.52	0.53	0.52	0.51	0.51	0.52	0.52	0.53	0.53	0.48	0.48	0.48			
TRM1	0.80	0.97	0.98	0.90	0.93	0.67	0.69	0.85	0.67	0.68	0.98	0.98	0.98	0.98				
TP1 - 3	0.79	0.96	0.97	0.89	0.93	0.67	0.68	0.84	0.67	0.68	0.97	0.98	0.99					
TK16	0.80	0.97	0.97	0.89	0.93	0.67	0.69	0.84	0.67	0.68	0.97	0.98						
TA278	0.78	0.99	0.97	0.89	0.93	0.69	0.69	0.83	0.69	0.69	0.98							
JA9	0.77	0.96	0.96	0.88	0.93	0.69	0.69	0.83	0.69	0.69								
JA4	0.57	0.69	0.69	0.72	0.70	0.70	0.95	0.71	0.71									
JA2B	0.57	0.67	0.67	0.68	0.69	0.96	0.70	0.69										
JA20	0.71	0.82	0.83	0.82	0.84	0.69	0.70											
JA10	0.57	0.68	0.68	0.72	0.70	0.70												
JA1	0.57	0.67	0.67	0.68	0.69													
GH1	0.74	0.92	0.92	0.86														
CHN2	0.76	0.88	0.90															
CHN1	0.78	0.96																
BDH1	0.77																	

* The TTV isolates, TTV021, cloned and sequenced by our lab, BDH1, isolated from Beijing of China, was deposited in the GenBank with accession number AF116842; isolate CHN1 from Beijing of Chia (AF079173); isolate CHN2 from shenzhen of China (AF129887); isolate GH1 from U.S. (AF122913); isolate JA1 from Japan (AF122916); isolate JA10 from Japan (AF122919); isolate JA20 from Japan (AF122914); isolate JA2B from Japan (AF122918); isolate JA4 from Japan (AF122917); isolate JA9 from Japan (AF122915); isolate TA278 from Japan (AB008394); isolate TK16 from Japan (AB026346); isolate TRM1 from Japan (AB026345); isolate TP1 - 3 from Japan (AB026347); isolate TUS01 from U. S. (AB017613); isolate US32 from U. S. (AF122921); isolate US35 from U.S. (AF122920); isolate SANBAN from Japan (AB025946).

的相对遗传距离分析,可将这些序列分为若干遗传差异亚群(distinct genetic subgroups)或基因型(genotypes)。由于 TTV 基因组的高变性,还没有获得一个统一的分型标准,图 3 虽然没有获得明确的分型结果,但却显示可参至少存在五种基因型。TTV021 与 CHN1(中国北京)在进化中最为接近,并与日本原型 TA278 和 BDH1 同属一个分支,属于同一个基因亚型。TTV021 与另外 1 个中国来源的分离株 CHN2(中国 深圳)的遗传距离则相对较大,且处于不同的分支中,提示 TTV021、CHN1、BDH1 与 CHN2 等中国来源的分离株在进化及基因分型上存在一定的差异,但从相对遗传距离分析,TTV021 同中国来源的分离株 CHN1、BDH1、CHN2、日本来源的 TA278、JA20 及美国来源的 GH1 的相对遗传距离都较小,可能属于同一基因型中的不同亚型。

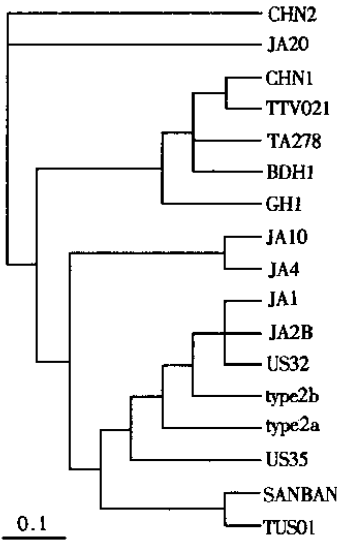


图 3 TTV 分离株的进化性分析

Fig.3 Phylogenetic tree (unrooted) of 356 nt (1881 ~ 2236) from TTV isolates

The fragment of 356 nt (1881 ~ 2236) was selected to perform the phylogenetic analysis. Branch length is proportional to the genetic distance (scale shown), the distances are expressed as substitutions per position. Isolates representing the subtype (1a, 1b, 2a and 2b) proposed by Okamoto *et al.*^[2] are labeled. The other TTV isolates were obtained as described in Table 2.

3 讨论

在临床病毒性肝炎患者中,有 10%左右的病例无法用已经建立的甲、乙、丙、丁、戊型肝炎的实验室诊断方法进行病原学分型,人们将其统称为非甲-戊型肝炎。1995 年鉴定出庚型肝炎病毒(HGV)基因组^[5], 尽管对其致病性尚有争议^[6,7],但仍可解释 10%~20%的非甲-戊型肝炎的病因。1997 年,日本学者 Nishizawa 等^[1]从一名输血后非甲-戊型肝炎患者(T.T.)中克隆 TTV。国内也有原因不明肝炎中检出 TTV 的报道^[10]。TTV 主要通过血液传播,Okamoto 等^[2]报告 12%的献血员可检出 TTV DNA, 57 例血透析病人中有 26 人 TTV DNA 阳性(46%)。本研究组曾报道上海地区 ALT 正常的献血员和血透病人中,TTV DNA 中的阳性率分别为 16.7%和 27.9%。献血员和血透病人中 TTV DNA 的高阳性率,增加了 TTV 经输血途径传播的概率,导致其在世界范围内的广泛分布,也说明有必要对其致病性进行深入研究。

关于 TTV 基因组变异的研究资料尚少。Okamoto 等^[2]根据 TTV 第 1902~2257 位核苷酸(356nt)序列,将日本的 78 个 TTV 基因序列分为 2 型,共 4 个亚型,即 type 1a、type 1b、type 2a 和 type 2b,认为在第 1902~2257 位核苷酸中有两个保守区。Mushahwar 等^[3]认为在 2240~2911 nt 为高保守区,1440~1827 nt 为相对高变区。对不同地区的 151 株 TTV DNA 1939~2198 位核苷酸进行进化树分析,表明存在 3 种基因型,认为 type 1 至少存在 2 种基因亚型,且 type 2a 和 type 2b 与以前报道^[2,8]的也不一致。近期有研究认为 TTV 至少存在 16 种基因型,且不同型之间的核苷酸和氨基酸变异相当大^[11]。本研究选择了 Okamoto 等分型所采用的 356nt 区域,对 17 个分离株的序列绘制进化树分析,结果提示除了已知的 type 1a、type 1b、type 2a 和 type 2b 外,还可能存在新的型或亚型。type 1a、type 1b 与 type 2a、type 2b 分别位于两个主要的基因型中,SANBAN、TUS01、JA4、JA10 等分离株序列由于变异较大,也同两个主要的基因型差异较大。进化树中 JA4 和 JA10 的进化距离较近,而 Mushahwar 等^[3]的分型却表明 JA4 和 JA10 属于不同的基因型,此差别可能是绘制进化树所选取的标本数量不同而致。因此,需要分析更多的序列以便对 TTV 进行更准确的分型。

本研究利用片段特有的酶切位点,将所克隆的五条片段首尾相连,成功地构建了近全长的 TTV021 基因组。TTV021 基因编码 ORF2 的序列与 TA278 存在较大的变异,但与 SANBAN 有着较高的同源性(数据未显示);而编码 ORF1 的基因序列与 TA278 有较高的同

源性。进化分析显示 TTV021 与其它各株间的进化距离较远,与 CHN1(中国北京)和 BDH1(中国北京)有较近的亲缘关系,与 TA278(日本株)同属于 G1a 型,而和另一株中国序列 CHN2(中国深圳)的亲缘关系较远,该差异可能与地理分布有关,提示在我国不同的地区可能存在 TTV 不同的型或亚型。目前对 TTV 的研究多局限在人群的感染率等流行病学方面,TTV 不同分离株所造成的流行和致病情况也因地而异,有必要阐明 TTV 基因组的变异性及其与致病性强弱间的关系。

参 考 文 献

- [1] Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **241**(1): 92 ~ 97.
- [2] Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, *et al.* *Hepatol Res*, 1998, **10**(3): 1 ~ 16.
- [3] Mushahwar IK, Erker, J C, Muerhoff A S, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 3177 ~ 3182.
- [4] 任 浩, 钱宝华, 朱分祿, 等. 第二军医大学学报, 1999, **20**(9): 605 ~ 607.
- [5] Linnen J, Wages JJ, Zhang-Keck, *et al.* *Science*, 1996, **271**(5248): 505 ~ 508.
- [6] Yashina T L. *J Infect Dis*, 1997, **175**(6): 1302 ~ 1307.
- [7] Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, *et al.* *J Med Virol*, 1998, **56**(2): 128 ~ 132.
- [8] Simmons P, Davidson F, Lycett C, *et al.* *Lancet*, 1998, **352**(9123): 191 ~ 194.
- [9] Page R D M. *Comput Appl Biosci*, 1996, **12**(4): 357 ~ 358.
- [10] 陈永鹏, 章 廉, 卢乔生, 等. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, **13**(3): 274 ~ 275.
- [11] Ukita M, Okamoto H, Nishizawa T, *et al.* *Arch Virol*, 2000, **145**(8): 1543 ~ 1559.

CLONING AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF HEPATITIS-ASSOCIATED TT VIRUS SUBGENOME *

Ren Hao¹ Dong Hui Zhu Fenlu¹ Miao Xiaohui² Wang Wen¹ Qi Zhongtian^{1**}

(¹ Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

(² Department of Infectious Diseases, Changzheng hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Polymerase chain reaction (PCR) was utilized for the DNA amplification from transfusion transmitted virus (TTV) positive serum samples. Five TTV DNA fragments, overlapped about 90% of the genome, were amplified by long template PCR for the generation of TTV subgenome. Recombinant plasmids were obtained by directly inserting PCR products into pT-Adv vector, and DNA sequence analyses showed they were TTV DNA fragments. By using specific restriction enzymes, five TTV DNA fragments were ligated into a TTV DNA subgenome clone and named as TTV021. TTV021 has been deposited in GenBank database with the accession number AF254410. The results of computer analyses showed that TTV021, 3472 nt long, contains two open reading frames (ORF1, 785 aa; ORF2, 146 aa). Identity alignments between TTV021 and other TTV isolates indicated several high conserved regions existed. Phylogenetic analysis of 356 nt from TTV021 suggested that the isolate has close evolutionary relationship with CHN1 (type 1a), but has far relation with other TTV isolates.

Key words: Transfusion transmitted virus, Clone, Homology, Phylogenetic analysis

* Chinese National Science Fund for Outstanding Youths (39825116) ** Corresponding author. E-mail: qizt@smmu.edu.cn