

## 新疆羊粪便戊型肝炎病毒 RNA 的检测与序列分析

王永霞, 马勋\*

(石河子大学动物科技学院, 石河子 832003)

**摘要:**【目的】为了了解新疆地区羊群中是否存在戊型肝炎的感染, 我们从戊型肝炎病毒 (Hepatitis E virus, HEV) IgG 检测阳性的新疆某羊场采集 54 份 1-3 岁的羊粪便, 【方法】利用逆转录套式聚合酶链方法 (RT-nPCR), 检测 HEV RNA, 其中 6 份为阳性, 阳性率 11.11%。【结果】将 PCR 扩增产物克隆, 测序并进行序列分析, 结果表明, 6 株羊源 HEV 检测株在 HEV ORF2 189bp 99.38% - 100%, 为同一基因型; 与 HEV I、II、III 和 IV 型的同源性分别为 78.67% - 85.33%、81.33% - 82.67%、78.67% - 84.00% 和 84.67% - 95.36%, 与 IV 型最高同源性达 94.04% - 95.36%。以该 189 bp 片段绘制进化树, 发现与新疆牛源分离株、中国大陆猪源分离株 (FJ610232) 和中国大陆人源分离株 (AJ272108) 在同一分支上, 同属基因 IV 型; 【结论】提示新疆羊群中可能存在 HEV 感染, 并且羊可能是人类 HEV 传染源中除猪之外的新宿主。

**关键词:** 戊型肝炎病毒; 基因型; RT-nPCR; 羊

**中图分类号:** R392      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0937-05

戊型肝炎病毒 (hepatitis E virus, HEV) 是 1989 年在东京国际会议上正式命名的肠道传播的非甲-非乙型肝炎病毒, 是引致戊型肝炎的病原。HE 以在发展中国家水源性爆发流行和发达国家的急性散发为特点, 呈全球性分布, 世界卫生组织认为 HE 是发展中国家重要的公共卫生问题。其病毒核酸为单股正链 RNA, 大小约 7.2 kb, 整个基因组有 3 个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 其中 ORF1 位于非结构区, 主要编码与 HEV 复制有关的非结构蛋白; ORF2 长 1980 bp, 它编码结构蛋白和病毒衣壳蛋白, 它是编码病毒蛋白主要的开放阅读框; ORF3 位于 ORF1 和 ORF2 之间, 与二者都有不同程度的重叠, 全长约 369 bp, 它编码病毒特异性的免疫反应抗原<sup>[1]</sup>。

随着 HEV 不断被分离、克隆和鉴定, 新的基因型和亚型也不断出现, 目前根据 HEV 各分离株核苷酸及氨基酸同源性的比较及系统进化树分析, 已有

7 种分类方法, 但是大家公认的还是将 HEV 分为 4 个基因型。HEV 基因 I 型, II 型, III 型, IV 型的代表株分别为缅甸株、墨西哥株、US 株和中国株。基因 I 型主要分布在亚洲和非洲, 基因 II 型主要在墨西哥、尼日利亚和纳米比亚, 基因 III 型和 IV 型主要在美国、阿根廷、欧洲国家、日本和中国<sup>[2-3]</sup>。为了解新疆羊源 HEV 和我国人 HEV 的基因型的关系, 对新疆某 HEV IgG 的阳性羊场进行了 HEV RNA 的检测, 并对序列进行了分析。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 实验材料:** 2007 年在新疆北部农十师采集集约化羊场 1-3 岁年龄段的绵羊粪 54 份, 年龄均有记录, 所采集样品 -20 °C 保存备用。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** PCR 产物胶回收试剂盒、

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30760012); 新疆生产建设兵团科技局博士基金 (2007JC15); 国际科技合作项目 (2006DFA33740)

\* 通信作者。E-mail: maxun779@126.com

**作者简介:** 王永霞 (1984-), 女, 河南驻马店人, 硕士研究生, 研究方向为动物传染病诊断与防治。

**收稿日期:** 2010-02-06; **修回日期:** 2010-03-06

克隆载体 pMD19-T、*Taq* 聚合酶、dNTPs、质粒提取试剂盒购自天根生物公司。Rnasin、M-MLV 反转录酶、*Bam*H I、*Hind* III 限制性内切酶购自大连宝生物, TRIzol 为 invitrogen 公司产品, 氯仿、异丙醇等其他试剂均为分析纯试剂。

按照文献[4]由上海生工合成一套特异性简并引物(表1),  $E_4$  引物分为2条,  $E_{4.1}$  主要针对戊型肝炎病毒基因 I 型,  $E_{4.4}$  主要针对基因 IV 型, 使用时将这两条引物等量混合加入, 作为 nPCR 内侧下游引物。

表1 检测戊型肝炎病毒反转录套式 PCR 引物

Table 1 The primers' sequences for HEV RT-nPCR

Primer	Sequence#	Site *
$E_1$ (lateral upstream primer)	CTGTTTAAAYCTTGCTGACAC	6260-6279nt
$E_2$ (wall upstream primer)	GACAGAATTGATTTTCGTCC	6298-6316nt
$E_{4.1}$ (wall downstream primer)	TGTTGGTTRTCATAATCCTG	6486-6467nt
$E_{4.4}$ (wall downstream primer)	TGCTGGTTATCGTAATCCTG	6486-6467nt
$E_3$ (lateral downstream primer)	WGARAGCCAAAGCACATC	6568-6551nt

# Y = C/T, R = A/G, W = A/T. \* Sites on the genome of Burma strain (GenBank accession number: D10330).

## 1.2 HEV 基因组 RNA 的提取

用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4) 将羊粪便制备成 20% 的悬液, 充分混匀, 然后  $12000 \times g$  于  $4^\circ\text{C}$  离心 40 min, 收集粪便上清保存于  $-20^\circ\text{C}$ 。取 200  $\mu\text{L}$  粪便上清加 600 mL Trizol, 按按说明书操作, 最后获得纯化 RNA 溶液。

## 1.3 RT-nPCR

RT 反应体系组成: RNA 模板 5  $\mu\text{L}$ ,  $E_5$  (40 nmol/L) 引物 1  $\mu\text{L}$ ,  $72^\circ\text{C}$  5 min, 立即冰浴,  $5 \times$  反转录缓冲液 4  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTPs 4  $\mu\text{L}$ , M-MLV RT 0.5  $\mu\text{L}$ , Rnasin 0.5  $\mu\text{L}$ , Rnase free  $\text{H}_2\text{O}$  至终体积 20  $\mu\text{L}$ 。然后  $42^\circ\text{C}$  孵育 1 h,  $95^\circ\text{C}$  5 min。

PCR 反应体系组成: cDNA 3  $\mu\text{L}$  或第一轮 PCR 扩增产物 1  $\mu\text{L}$ ,  $10 \times$  PCR 缓冲液 2  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTPs 1.5  $\mu\text{L}$ , 内或外引物各 0.5  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ), *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 用  $\text{ddH}_2\text{O}$  调整终体积至 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件:  $94^\circ\text{C}$  变性 5 min 后,  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $56^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  40 s 扩增 35 个循环, 最后一个循环结束后  $72^\circ\text{C}$  延伸 5 min。反应结束后, 取

5  $\mu\text{L}$  于 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

## 1.4 PCR 扩增产物的纯化、克隆及测序

对阳性的 PCR 产物进行割胶纯化, 操作按照天根的柱式胶回收试剂盒说明进行。将回收的 PCR 产物连接到 PMD19-T 载体上, 将连接产物按常规方法转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 进行氨苄青霉素抗性筛选, 对抗性菌落利用天根质粒提取试剂盒提取质粒, 用 *Bam*H I、*Hind* III 限制性内切酶酶切和菌落 PCR 同时鉴定, 对阳性重组质粒进行测序, 测序由上海生工完成。

## 1.5 遗传进化树的构建

用 DNASTAR 进行序列的比对, 计算核苷酸序列的同源性, 绘制基因进化树。

## 2 结果

### 2.1 样品中 HEV RNA 的检测

在检测的 54 份样品中, 有 6 个粪样出现了预计的 189 bp 的单一一条带(图 1), 阳性率为 11.11%。

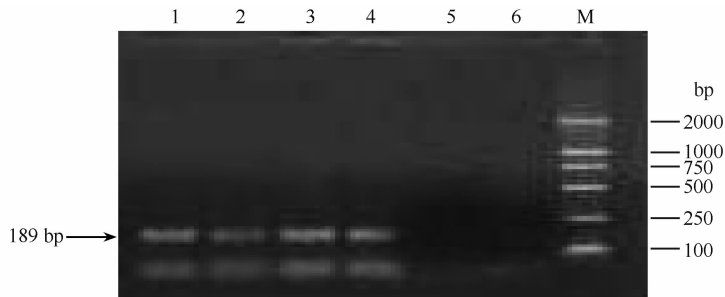


图1 PCR 样品扩增产物

Fig. 1 PCR product of samples. M: DNA Marker; 1-4: Sample; 5: negative control; 6: blank control.

## 2.2 酶切鉴定

对阳性克隆提取质粒, 用 *Bam*H I、*Hind* III 两种限制性内切酶进行酶切。

## 2.3 序列测定与进化分析

上述 6 个检测株编号为: Y1、Y2、Y3、Y4、Y5 和 Y6。用 DNASTAR 进行序列比对, 其同源性为

表 2 HEV ORF2 部分序列的核苷酸同源性比较结果 (%)

Table 2 Nucleotide identity of HEV ORF2 partial sequences (%)

Genotype(No of isolates)	1(12)	2(1)	3(8)	4(18)	This study(6)
This study(6)	78.67-85.33	81.33-82.67	78.67-84.00	84.67-95.36	99.38-100.00
4(18)	78.81-84.77	80.79-84.67	76.67-83.44	86.09-100	
3(8)	81.33-84.67	79.33-83.33	86.67-100		
2(1)	82.00-86.00	100			
1(12)	88.67-100				

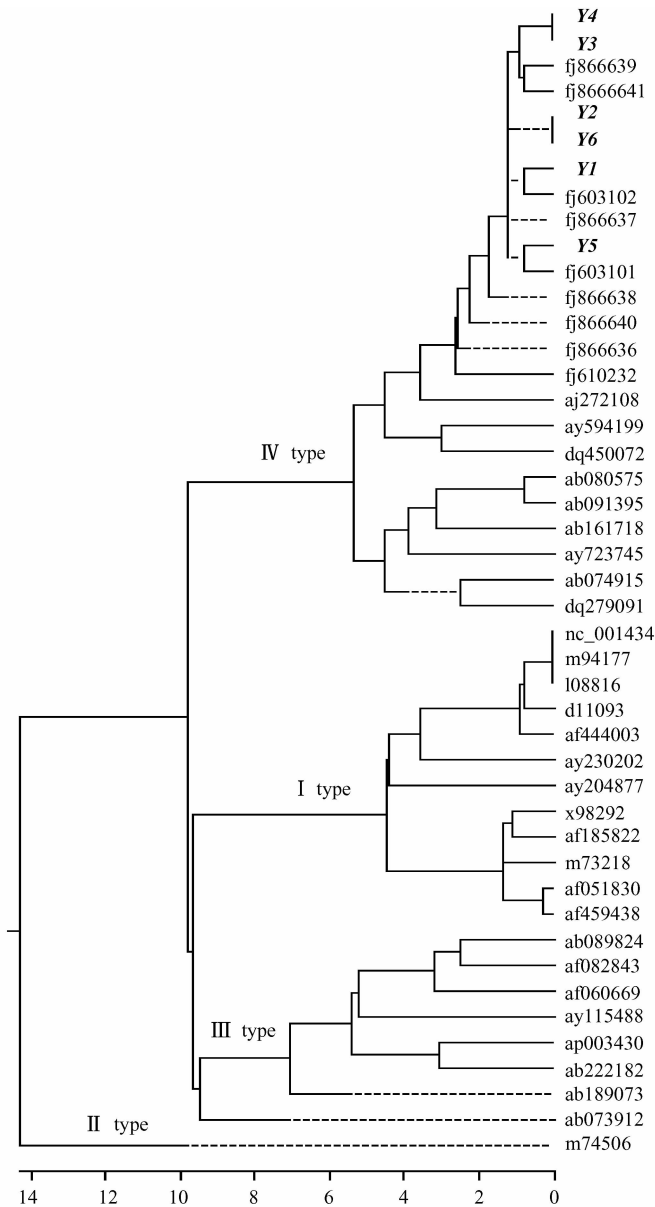


图 2 基于 HEV ORF2 189bp 核苷酸序列的进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of partial nucleotide sequence (189bp) from HEV ORF2. Detection of strains: Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6; Isolated from bovine sources in Xinjiang: FJ866637, FJ603102, FJ866638, FJ603101, FJ866636, FJ866639, FJ866640, FJ866641; Isolated from swine in mainland China: FJ610232 (Gansu), AY594199 (Xinjiang), DQ450072 (Nanjing), DQ279091 (Harbin); Isolated from human sources in mainland China: AJ272108; Isolated from the Japanese source: AB080575, AB161718, AB074915; Isolated from swine in Japan: AB091395; India swine isolates: AY723745.

99.38% - 100%, 为同一基因型。与 HEV I、II、III 和 IV 型同源性分别为 78.67% - 85.33%、81.33% - 82.67%、78.67% - 84.00% 和 84.67% -

95.36%, 其中与 IV 型的同源性最高, 6 个检测株与新疆猪源 (AY594199) HEV 的同源性为 91.33% - 93.33%。与中国大陆一株人源分离株 (AJ272108)

和一株猪源分离株 (FJ610232) 的同源性分别为 90.67% - 92.00% 和 94.04% - 95.36%, 与新疆牛源分离株 (FJ866637、FJ603102、FJ866638、FJ603101、FJ866636、FJ866639、FJ866640、FJ866641) 的同源性为 97.33% - 99.47% (表 1)。对以该 189 bp 片段绘制进化树 (图 2), 发现与新疆牛源分离株、中国大陆猪源分离株和中国大陆人源分离株在同一分枝上, 并且与 IV 型的亲缘关系最近。

### 3 讨论

本试验从新疆某羊场粪便内检测到 HEV RNA, 阳性率达 11.11%, 说明新疆存在羊源 HEV 的感染, 这是目前羊 HEV RNA 检测的首次报道。

6 个羊源 HEV 检测株 ORF2 189bp 同源性为 99.38% - 100%, 为同一基因型。与 I、II、III 和 IV 型的同源性分别为 78.67% - 85.33%、81.33% - 82.67%、78.67% - 84.00% 和 84.67% - 95.36%, 且与 IV 型的最高同源性达 94.04% - 95.36%, 与马勋<sup>[5]</sup>2004 年报道的新疆猪源 (AY594199) 同源性为 91.33% - 93.33%, 与胡广东等报道的新疆牛源 8 个分离株的同源性为 97.33% - 99.47%, 进化树显示在同一分枝上, 同属基因 IV 型。但也存在一定的异质性。这与目前普遍认为的基因 III 型和 IV 型序列变异相对较大相一致。

由于 HEV 序列变异比较大, 关于 HEV 基因分型的另一种方法认为可以在基因型的基础上再细分为亚型, 基因 I 型比较保守可分为 5 个基因亚型。基因 II 型序列数量有限。基因 III 型分为 10 个亚型, IV 型分为 7 个亚型, 来自中国大陆和台湾的基因 IV 型为 4a、4b、4d 亚型, 来自日本和印度的各成一亚型, 新疆株和部分北京株被归入 4d 亚型<sup>[6]</sup>。本试验基于 ORF2 189 bp 片段绘制的部分 HEV RNA 基因进化树也显示基因 IV 型明显的分为 2 个分支, 这可能就是 2 个不同的基因亚型。从基因进化树上可以看到, 新疆的猪源、羊源和牛源均在一个亚型分支上, 这可能与 HEV 基因型与地理位置有一定的关系相关。

现有报道能检测出 HEV RNA 的宿主主要是人、灵长类动物、猪以及野猪<sup>[4]</sup>等, 最近又在啮齿类、狗、猫、马、鸡、牛、鹿等多种动物中检测到 HEV 抗体或 RNA。但是现有的研究调查除表明猪场工作人员 HEV 抗体阳性率明显高于对照人群之外<sup>[7]</sup>, 与其他动物接触的职业人群中 HEV 感染状况知之甚少。1994 年前苏联科学家 Usmanov PK

等<sup>[8]</sup>用急性戊肝患者 10% 粪便悬液感染羔羊, 出现急性肝炎的生化和组织学改变, 用电镜检测羊粪便、外周淋巴结核小肠内容物标本, 观察到类似病毒样颗粒, 在羊的实质器官也检测到 HEV RNA。

新疆是一个多民族地区, 各民族饮食习惯中, 羊肉占有很大比例。曹文兵等<sup>[9]</sup>对新疆地区羊戊型肝炎血清流行病学调查表明, 羊群中 HEV 的感染率比较高。而在 20 世纪 80 年代新疆戊型肝炎流行期间, 病人是以放牧为生的少数民族为主, 这一方面可能与他们饮用水源有关, 另一方面是否由于与羊密切接触或食用未烹饪完全的羊肉而感染, 还需要对 HEV 流行病学以及 HEV 感染羊后的体内增殖、组织分布和排毒动力学进行研究, 由于戊型肝炎可能是一种人畜共患病<sup>[10]</sup>, 虽然至今还没有因食羊奶或羊肉而引起人 HEV 感染的报道但是羊作为 HEV 的一个宿主, 在戊型肝炎的传播流行过程可能起到重要作用。

### 参考文献

- [1] Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E virus. // Knipe DM, Howley PM (eds.). *Fields Virology*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001: 3051-3061.
- [2] Lu L, Li C, Hagedom CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Reviews in Medical Virology*, 2006, 16(1): 5-36.
- [3] Y Wang, R Ling, JC Erker, H Zhang, H Li, S Desai, IK Mushahwar and TJ Harrison. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *Journal of general Virology*, 1999, 80 (pt): 169-177.
- [4] 葛胜祥, 郭清顺, 李少伟, 张军, 夏宁邵. 基因 I、IV 型戊型肝炎病毒高灵敏度通用引物的设计和初步应用. *病毒学报 (Chinese Journal of Virology)*. 2005, 21(3): 181-187.
- [5] 马勋, 陆承平. 猪戊型肝炎病毒新疆株 swCH25 全基因序列的分析. *中国农业科学 (Scientia Agricultura Sinica)*, 2005, 38(8): 1669-1674.
- [6] 李峰, 孟继鸿, 董晨, 戴星, 杨义贵, 周镇先. 戊型肝炎病毒通用性 PCR 引物的设计及其基因分型的研究. *病毒学报 (Chinese Journal of Virology)*. 2009, 25(1): 9-15.
- [7] Nishizawa T, Takahashi M, Endo K, Fujiwara S, Sakuma N, Kawazuma F, Sakamoto H, Sato Y, Bando M, Okamoto H. Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *Journal of general Virology*. 2005; 86(12): 3321-6.

- [ 8 ] Usmanov RK, Balaian MS, Dvoynikova OV, Alymbaeva DB, Zamiatina NA, Kazachkov luA, Belov VI. An experimental infection in lambs by the hepatitis E virus. *Voprosy Virusologii*, 1994, 39(4):165-168.
- [ 9 ] 曹文兵, 马勋, 李岩, 胡广东. 新疆地区羊、牛戊型肝炎血清流行病学调查. 中国畜牧兽医 (*Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary*), 2009, 36(8):157-159.
- [ 10 ] Masaji N, Kazuaki T. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: demonstration of anti-HEV anti-bodies and a full- genome nucleotide sequence. *Hepatology Research*, 2006, 34:137-140.

## Detection and sequences analysis of sheep hepatitis E virus RNA in Xinjiang Autonomous Region

Yongxia Wang, Xun Ma\*

(College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To understand whether hepatitis E virus (HEV) was infectious in sheep in Xinjiang. [ **Methods** ] We used reverse transcription-nested polymerase chain reaction (RT-nPCR) to detect HEV RNA in feces. The feces were collected from sheep with positive anti-HEV antibodies in a sheep farm in Xinjiang Autonomous Region. [ **Results** ] Six of 54 (11.11%) sheep were positive for HEV RNA. PCR amplification products were cloned, sequenced and analyzed. The homology among HEV of the 6 sheep HEV ORF2 189bp nucleotide amplification sequences was 99.38% - 100%. They should belong to the same genotype. They were respectively compared with HEV genotype I, II, III and IV corresponding 189bp nucleotide sequences. The average homology was 78.67% - 85.33%, 81.33% - 82.67%, 78.67% - 84.00% and 84.67% - 95.36%. The maximum homology between 6 nucleotide amplification sequences and one sequence of genotype IV was 94.04% - 95.36%. Based on sequence of the nucleic acid fragments, a phylogenetic tree was constructed. Six sheep HEV ORF2 189bp nucleotide amplification sequences in this study and bovine HEV, swine HEV and human HEV locate the same evolutionary vine and belong to genotype IV. [ **Conclusion** ] The finding suggested that infection of HEV probably exists in the sheep group in Xinjiang Autonomous Region and the sheep may be a new animal host except swine in origins of HEV infection.

**Keywords:** Hepatitis E virus; Genotype; Reverse transcription nested polymerase chain-reaction; Sheep

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation (30760012), the Science and Technology Bureau of Xinjiang Production and Construction Corps, Dr. fund (2007JC15) and the International science and technology cooperation projects (2006DFA33740)

\* Corresponding author. Fax: +86-993-2038582; E-mail: maxun779@126.com

Received: 6 February 2010/Revised: 6 March 2010

### 《微生物学报》审稿程序

问: 贵刊的审稿程序是怎样的? 一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答: 本刊严格遵守“三审制”, 即: 编辑部内审, 专家外审, 主编、副主编总审。从投稿日期开始, 争取在 2 个月之内给出审稿结果, 5-7 个月之内发表。

(1) 收到来稿后, 首先将请 2 位专家进行初审, 再送主编进行最后的总审, 这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审 2 位专家的意见分歧较大, 编辑部将再请第 3 位专家进行初审, 之后再送主编总审, 那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。

(2) 完成审稿后 (即主编给出总审意见), 编辑会给出作者发出 E-mail 告知修改意见 (包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后, 经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者, 在没有完成全部审稿之前, 不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。