

新疆维吾尔族 HIV-1 感染者 gag 基因序列分型研究

米吉提·买买提^{1#}, 周素娟^{2#}, 王发省¹, 常燕玲³, 艾尼⁴, 芮宝玲⁵, 王丽¹, 王昌敏¹, 高眉扬³, 何纳^{2*}

摘要:目的 通过扩增新疆地区 HIV-1 感染者 gag 基因片段, 确定 HIV-1 感染者流行株的基因亚型。方法 抽取 88 例新疆乌鲁木齐市和伊宁市 HIV-1 感染者的血浆标本的 RNA, 用巢式 PCR 扩增 gag 基因片段, 将所得到的序列与国际标准株进行比较, 确定被检标本的亚型。结果 在 88 例 HIV 感染者的血浆标本中, 共成功扩增 57 例 gag 基因片段, 扩增率为 64.8%。经 BLAST 初步判断和构建进化树并与国际标准株比对确认, 57 例感染者感染的 HIV 毒株序列中, 有 56 个为 CRF07_BC 亚型, 1 例为 C 亚型。57 例毒株之间的平均基因距离为 0.043 ± 0.003 , 与 3 例 CRF07_BC 亚型国际参考株之间的平均基因距离在 $0.034 \pm 0.004 \sim 0.039 \pm 0.005$ 之间。结论 新疆地区 HIV-1 感染者以 CRF07_BC 亚型为主要流行株。57 例序列相互之间以及与 3 株不同来源的国际参考毒株之间表现出高度的同源性。

关键词: HIV 感染者; gag 基因分型; 巢式 PCR

中图分类号: R512.91 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2012)12-1431-04

Study on subtypes of gag gene of HIV-infected patients in Xinjiang Uygur Autonomous Region. MIJITI·Mai-MaiTi^{1#}, ZHOU Su-juan^{2#}, WANG Fa-xing¹, et al. (1. Department of Prevention and Health Care, Xinjiang Uygur Autonomous Regional People's Hospital, Xinjiang 830001; 2. Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, P.R. China; *: Corresponding author: HE Na. Email: nhe@shmu.edu.cn)

Abstract: Objective To explore the prevalent subtype of gag gene from HIV-1 infected patients in Xinjiang. Methods The HIV-1 RNA was extracted from HIV-1 positive plasma from 88 HIV-1 infected patients in Xinjiang, then HIV-1 gag gene were amplified by nest-PCR, and was further subject to the DNA sequence and subtype analysis. Results The gag gene of 57 samples out of the 88 HIV-1 patients were successfully amplified by PCR accounted for 64.8%. Two HIV-1 subtypes, CRF07_BC(56 strains), C(1 strain) were identified. Average gene distance of the 57 sequence was 0.043 ± 0.003 . The average gene distance to the 3 international standard strains were between 0.034 ± 0.004 and 0.039 ± 0.005 . Conclusions The prevalent subtype of HIV-1 infected patients in Xinjiang was CRF07_BC. All the 57 sequences and 3 international standard strains were highly homogenous.

Key words: HIV-infected patients; Gag; Genotyping; Nested-PCR

HIV-1 病毒基因组长约 9 kb, 由结构基因(gag、env、pol)、调节基因(tat、rev)和辅助基因(nef、vif、vpr)组成, 一般分型常用 env 和 gag 基因序列^[1-3]。HIV-1 病毒基因变异大而产生了不同的亚型^[4], 全国第一次 HIV 分子流行病学调查发现的亚型为非重组亚型, 而第二次调查结果中重组毒株增多^[4, 5]。HIV 的基因亚型与传播途径相关, 血液途径感染的以 B (泰国 B) 亚型为流行亚型, 性传播途径感染的以 C 和 CRF-BC 亚型为主, 因此分析其序列和判定其亚型对 HIV-1 的防治工作具有指导意义^[6, 7]。基因距离可以很好地反映各基因序列之间的同源性, 基因距离越小则同源性越大, 而同源性比较可以推测毒株的来源和变异趋势^[8]。本文以 88 例新疆地区 HIV-1 病毒感染者为研究对象, 扩增 HIV-1 的 gag 基因片段并进行亚

型判定, 从而确定新疆地区流行的毒株亚型。同时对其基因距离分析, 找出同源毒株, 对 HIV-1 的防治工作提供数据和依据。

1 材料和方法

1.1 材料 88 例经 ELISA 初筛检测和 WB(Western Blot)确认的 HIV 感染者均为维吾尔族吸毒人员, 分别来自新疆乌鲁木齐市和伊宁市, 其中男 74 人, 女 14 人, 年龄为 25~47 岁。于 2011 年 9 月~11 月间采集其全血样本, 截止标本采集时, 有 1 例的 CD4⁺T 细胞低于 $50/\text{mm}^3$ 。将标本分离出血浆保存于 -80°C 备用。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取 使用柱式核酸纯化试剂盒(上海罗氏公司)提取血浆样本中病毒 RNA, 参照说明书操作, 所得 RNA 以 50ul 试剂盒提供的缓冲液溶解并保

基金项目: 本项目受新疆维吾尔自治区科技支疆项目计划资助(No.201191248)

工作单位: 1.新疆维吾尔自治区人民医院预防保健科, 新疆 乌鲁木齐 830001; 2.复旦大学公共卫生学院流行病学教研室, 上海 200032; 3.伊宁市人民医院, 新疆 伊宁 835000; 4.乌鲁木齐市水磨沟区人民医院, 新疆 乌鲁木齐 830002; 5.乌鲁木齐市疾病预防控制中心, 新疆 乌鲁木齐 830001;

作者简介: 米吉提·买买提(1964~), 男, 维吾尔族, 本科, 主任医师, 主要从事预防保健和艾滋病研究。

周素娟同为第一作者

*通讯作者 Email: nhe@shmu.edu.cn

存于-70℃待用。

1.2.2 反转录和巢式PCR 使用One Step RNA PCR Kit(AMV)(TAKARA 公司)进行反转录和外引物的扩增。反应各成分为:10×One Step RNA PCR Buffer 2.5 μl ,MgCl₂(25 mM)5 μl ,dNTP Mixture(各10 mM) 2.5 μl ,RNase Inhibitor(40 U/μl)0.5 μl ,AMV RTase XL(5 U/μl)0.5 μl ,AMV-Optimized Taq(5 U/μl)0.5 μl ,上游引物E2(20 μM) 0.5 μl ,下游引物F2 (20 μM)0.5 μl ,RNase Free dH₂O 8μl ,RNA 模板 5μl。反应条件为50℃30 min ,94℃2min 进入32个循

环 :95℃ 30sec ,54℃ 30sec ,72℃ 1min30sec ,最后72℃ 延伸 10 min ,4℃保存。第二轮反应:以5uL 第一轮 的PCR 反应产物为模板 ,Premix Ex Taq 12.5μl, 上游引 物C-gag(20μM)1μl,下游引物306(20μM)1μl,去离子 水 5.5μl。反应条件为 95℃ 30sec ,54℃ 30sec ,72℃ 50sec ,最后72℃延伸 10 min ,4℃保存。第二轮的PCR 产物使用2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。在目标位 置671bp 处出现条带的标本进行测序确认(测序所用 引物为C-gag和306)。

表1 gag基因的扩增引物

Tab 1 Primers for PCR Amplification of gag gene

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence(5'→3')	PCR 产物长度 Length PCR product	参考文献 Reference
外侧 E2	TCCAACAGCCCTTTTCCTAGG (2011-2032)	1243bp	Zhaofei,et al ^[4]
F2	ATGGGTGCGAGAGCGTCARTATTAA (790-814)		
内侧 306	GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCC (836-857)	672bp	
c-gag	TAGTTCCTGCTATRTCACTTCC (1507-1486)		

1.2.3 序列分析 将成功测序的57个序列提交到美国洛斯阿拉莫斯国家实验室LANL (Los Alamos National Laboratory)网站中进行搜索 搜索的截止日期为 2012年9月23号 ,网址为http://www.hiv.lanl.gov/con- tent/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html ,确认所 扩增的序列是HIV-1的GAG基因的特异性片段 ,并 通过初步BLAST进行亚型的初步判定。将每条序列 比对后打分最高的作为参考序列下载 ,参考序列的具 体来源见表2。将57个序列和文献中国际标准株以 及下载的参考株导入导入软件MEGA5.1 ,并与进行比 对 ,使用Mega 软件的Neighbor-joining 方法建立系统 进化树 ,以同源性高低判定病毒亚型归属。

2 结果

2.1 核酸检测阳性率 对88例HIV 感染者的病毒基 因进行扩增 ,共57例标本出现672bp 的目标条带 ,扩 增率为64.8%。

2.2 亚型判定和同源性分析 57个序列提交 Los Al- amos National Laboratory 网站后初步判定56例属于 CRF07_BC 亚型(98.2%) ,1例为C 亚型(1.8%)。将本 研究中的57个序列 ,3个CRF07_BC 亚型的国际标 准株序列 ,1个C 亚型的国际标准株序列 ,23个同源性高 的参考株序列放在一起分析基因距离和建立进化 树。57例毒株之间的平均基因距离为0.043±0.003 , 跟常用的CRF07_BC 亚型国际参考株CRF07_BC . CN . 97 . 97CN001的平均基因距离为0.034±0.004 , 与CRF07_BC.CN.97.C54A 新疆毒株的距离是0.039± 0.005 ,与 CRF07_BC . CN.98.98cn009 的 距离 是 0.038±0.004 ,与C 亚型国际标准株C.95IN21068 的距

离是0.064±0.008 ,与国内其他参考株的距离<0.04+ 0.003。

表2 研究中所使用的HIV-1 病毒的gag 基因的参考序列

Tab 2 Description of HIV-1 viruses gag gene used in this study

GenBank access No.	Name	Subtype	Origins	time
AF503396	CNGL179	CRF07_BC	CN	2006
AB213673	97CNKM007	CRF07_BC	Yunnan	1997
EF122505	00CNLN01	CRF07_BC	Liaoning	2000
EU178731	XJN0181GAG10	CRF07_BC	Xinjiang	2003
HQ007321	07CNBJ312	CRF07_BC	Beijing	2011
AB213689	02CNKM207	CRF07_BC	Yunnan	2002
EU178446	XJ0258GAG09	CRF07_BC	Xinjiang	2002
EU178712	XJN0171GAG02	CRF07_BC	Xinjiang	2003
HQ007350	08CNBJ046	CRF07_BC	Beijing	2008
EU178460	XJ0259GAG06	CRF07_BC	Xinjiang	2002
EU178475	XJ0260GAG04	CRF07_BC	Xinjiang	2002
EU178479	XJ0260GAG09	CRF07_BC	Xinjiang	2002
HQ007328	07CNBJ387	CRF07_BC	Beijing	2007
EU178681	XJN0024GAG14	CRF07_BC	Xinjiang	2003
EU178713	XJN0171GAG03	CRF07_BC	Xinjiang	2003
EU178441	XJ0258GAG20	CRF07_BC	Xinjiang	2002
AB078694	WS001	CRF07_BC	Yunnan	2000
AX149672	CN54_patent	CRF07_BC	CN	1997
EU178679	XJN0024GAG12	CRF07_BC	Xinjiang	2003
EU178453	XJ0258GAG19	CRF07_BC	Xinjiang	2002
HQ007325	07CNBJ382	CRF07_BC	Beijing	2007
AB213676	01CNKM013	CRF07_BC	Yunnan	2001
EU178484	XJ0260GAG14	CRF07_BC	Xinjiang	2002
AF067155	95IN21068	C	IN	1995
AF286226	97CN001_C54	CRF07_BC	CN	1997
AF286230	98CN009	CRF07_BC	CN	1998
AX149647	CN54_patent	CRF07_BC	CN	1997

进化树(见图1)上分成了2大进化簇,分别包含6个毒株和51个毒株,为方便描述分别命为进化簇6和进化簇51。进化簇6和进化簇51的组内距离分别为 0.032 ± 0.004 、 0.043 ± 0.003 ,而两者之间的组间距离为 0.043 ± 0.004 ,组间距离稍大于任一组内距离。与进化簇6关系近的参考株均来自新疆,而流行簇51与4例国际标准株聚集在一起,其关系近的参考序列分别来自中国的新疆、云南、北京三个地区,且均为CRF07_BC亚型。57个序列中唯一一个经Blast确认为C亚型的毒株5号与国际参考株C亚型C.95IN21068的基因距离为 0.066 ± 0.011 ,大于所有序列的平均基因距离。

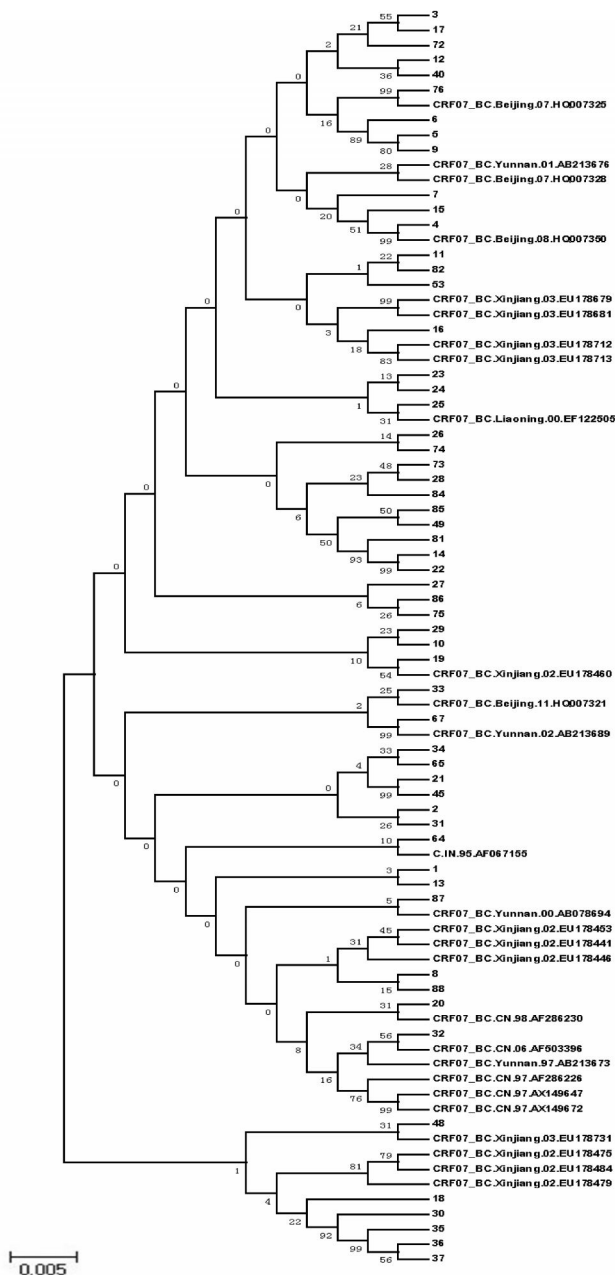


图1 新疆HIV-1感染者gag基因系统进化树分析

Fig1 Phylogenetic tree of gag gene of HIV-1 infected patients in

3 讨论

本研究扩增的新疆地区HIV-1感染者57个序列中,有56个为CRF07_BC亚型,CRF07_BC亚型明显为新疆地区的优势流行株,这与以往有关新疆地区的报道结果一致^[9,10]。57例毒株之间的平均基因距离为 0.043 ± 0.003 ,相对较小的基因距离提示所有的样本序列之间具有高度的同源性。57例毒株与3例CRF07_BC亚型国际参考株之间的平均基因距离在 $0.034\pm 0.004\sim 0.039\pm 0.005$ 之间,与参考株之间的平均基因距离小说明这些毒株相对比较稳定,变异不大。经blast分析,这些毒株与北京地区、云南地区的基因序列同源性很高,说明我国的HIV-1的这群毒株的来源相对固定,很有可能都是有同一来源的几株原始毒株传播过来的。新疆维吾尔自治区的HIV-1感染者,大部分为吸毒人群而少部分为与吸毒者有性接触的人群,所以该人群中的基因离散率较低,基因距离较近,造成该地区样本的基因同源性较高,亚型单一^[11]。

57个序列中唯一的一例C亚型毒株基因序列与国际C亚型的参考株基因距离大于所有序列的平均基因距离,并在进化树上与CRF07_BC亚型的毒株聚集在一起,此毒株可能与CRF07_BC亚型来自其相同祖先毒株,它的真实传播途径有待进一步研究。

参考文献:

- [1] L.K.H. Cunha, S. Kashima, M.F.C. Amarante, et al. Distribution of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in the State of Amazonas, Brazil, and subtype C identification[J]. Braz J Med Biol Res, 2012,45 (2):104-112.
- [2] Louwagie J, McCutchan F, Mascola J, et al. Genetic subtypes of HIV-1 [J]. AIDS Res HumRetroviruses, 1993, 9: S147-S150.
- [3] Sides T L, Akinsete O, Henry K, et al. HIV-1 subtype diversity in Minnesota[J]. J Infect Dis. 2005, 192(1):37-45.
- [4] Zhao F, Wang Z, and Li WJ, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes Prevalence in Central China [J]. Yonsei Med J, 2009, 50(5): 644-649.
- [5] Jin YT, Guo HJ, Jiang F, et al. Systematic review of public literatures on HIV-1 genetic subtype in China [J]. J Hyg Res, 2011, 40(5): 645-648(In Chinese). (金艳涛, 郭会军, 姜枫,等. 中国HIV-1基因亚型分布文献分析[J]. 卫生研究, 2011,40(5): 645-648.)
- [6] Zhao YC, Xing H, Zhao HR, et al. Subtype and sequence analysis on the gag and env genes for HIV-1 strains isolated in Hebei province in 2007[J]. Chin J Epidemiol, 2009, 30(8) 871-872. (In Chinese) (赵翠英, 邢辉, 赵宏儒,等. 河北省2007年HIV-1流行毒株基因序列测定及亚型分析[J]. 中华流行病学杂志, 2009,30(8) 871-872)
- [7] Zhao YC, Xing H, Zhao HR, et al. Subtyping and sequence analysis of the C2-V3 region of gp120 genes among HIV-1 strains in Hebei province [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2005, 25(7) 533-535(In Chinese) (赵翠英, 邢辉, 赵宏儒,等. 河北省HIV-1流行株的env基因序列

(下转第1456页)

深入研究证实。从遗传进化的角度去认识该菌,并从分子水平对其进行分类与鉴定,既保证时效性和广泛性,又能够快捷而可靠地鉴定出细菌的种属,在临床、科研中将得到更广泛而快捷的应用,也为栖稻假单胞菌的鉴定及其疾病的诊断、治疗提供参考。

参考文献:

- [1] Hawkins RE, Moriarty RA, Lewis DE, et al. Serious infections involving the CDC group Ve bacteria *Chryseomonas luteola* and *Flavimonas oryzihabitans*[J]. Rev Infect Dis 1991; 13:257-260.
- [2] Lucas KG, Kiehn TE, Sobeck KA, et al. Sepsis caused by *Flavimonas oryzihabitans*[J]. Medicine (Baltimore) 1994;73:209-214.
- [3] Qian K, Wang S. Infections caused by *Flavimonas oryzihabitans*[J]. Chin J Nosocomiol 2001,11(1):40-42(In Chinese)
(钱科卿,王苏建. 栖稻黄色单胞菌感染的临床表现和细胞免疫功能的报道[J]. Chin J Nosocomiol 2001,11(1):40-42)
- [4] Yao Y, Shao H. Analysis of the Risk Factors and Drug Resistance of Low Respiratory Tract Infection by *Flavimonas Oryzihabitan*[J]. Clin Pulmon Med, 2004, 1(9):20-22.(In Chinese)
(姚晔,邵淮鲁. 栖稻黄单胞菌致下呼吸道感染的特点和耐药性分析[J]. 临床肺科杂志, 2004, 1(9):20-22)
- [5] Giacommetti A, Cirioni O, Quartana M, et al. Unusual clinical presentation of infection due to *Flavimonas oryzihabitans*[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998 Sep; 17(9):645-648.
- [6] Kostman JR, Solomon F, Fekete T. Infection with *Chryseomonas luteola* (CDC group Ve-1) and *Flavimonas oryzihabitans* (CDC group Ve-2) in neurosurgical patients[J]. Rev Infect Dis 1991;13(2):233-236.
- [7] Aigner BA, Ollert M, Seifert F, et al. *Pseudomonas oryzihabitans* Cutaneous Ulceration From Octopus vulgaris Bite: A Case Report and Review of the Literature[J]. Arch Dermatol. 2011;147(8):963-966.
- [8] Papakonstantinou S, Dounousi E, Ioannou K, et al. A rare cause of peritonitis caused by *Flavimonas oryzihabitans* in continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) [J]. Int Urol Nephrol. 2005; 37(2):433-6.
- [9] Liu PY-F, Shi Z-Y, Lau Y-J, et al. Epidemiological typing of *Flavimonas oryzihabitans* by PCR and Pulsed-. Field gel electrophoresis[J]. J Clin Microbiol 1996; 34(1):68-70.
- [10] Teng S, Liu Y, Zhao L. Isolation, identification and characterization of ACC deaminase-containing endophytic bacteria from halophyte *Suaeda salsa*[J]. Acta Microbiologica Sinica. 2010,50(11):1503-1509(In Chinese)
(滕松山,刘艳萍,赵蕾. 具ACC脱氢酶活性的碱蓬内生细菌的分离、鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学报, 2010,50(11): 1503-1509)
- [11] Baptista L, Bodilis J, Barray S, et al. Recurrent recovery of *Pseudomonas oryzihabitans* strains in a karstified chalk aquifer[J]. Water Res. 2007 Jan;41(1):111-117.

收稿日期 2012-02-15 编辑 崔宜庆

(上接第1432页)

- 测定和亚型分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25(7): 533-535)
- [8] Zhang J, Fu JH, Wang TZ, et al. Subtyping analysis of HIV-1 strains in Shandong province[J]. J Pub Health Prey Med, 2006, 17(5): 10-13. (In Chinese)
(张静,傅继华,王同展,等.山东省HIV-1流行株多基因区亚型分析[J].公共卫生与预防医学, 2006, 17(5): 10-13)
- [9] Song YH, Xing H, Wang Z, et al. An analysis of gpl20 and gag gene variation of HIV-1 strains isolated from Henan and Xinjiang in China [J]. Chin J AIDS STD, 2007, 13(5): 405-408(In Chinese).
(宋艳辉,邢辉,王哲,等.河南和新疆地区HIV-1毒株gp120和gag基因的变异分析[J]. 中国艾滋病性病, 2007, 13(5): 405-408)
- [10] Department of Disease Control, Minister of Health, China; National Center for AIDS Prevention and Contro; Group of National HIV Sentinel Surveillance. National sentinel surveillance of HIV infection in China from 1995 to 1998[J]. Chin J Epidemiol, 2000, 21(1): 7-9(In Chinese)
(卫生部疾病控制司,卫生部艾滋病预防与控制中心,全国艾滋病哨点监测协作组. 中国1995-1998年艾滋病哨点监测报告[J]. 中华流行病学杂志, 2000, 21(1): 7-9)
- [11] Guan Q, Wei M, Huang HL, et al. Sequence analysis of gag-pol gene of HIV-1 B/C recombinant viruses in China[J]. Natl Med J China, 2004, 84(5): 387-391.(In Chinese)
(关琪,魏民,黄海龙,等.中国HIV-1 B/C重组病毒的gag-pol区基因序列特征分析[J].中华医学杂志, 2004, 84(5): 387-391)

收稿日期 2012-10-15 编辑 崔宜庆