

HIV-1 基因亚型分型:异源双链泳动分析法

于红¹ 苏玲¹ 邵济钧² J Mullins³ 邵一鸣¹

摘要 应用套式 PCR(nested-PCR)对 24 份 HIV 感染者外周血单核细胞(PBMC)样品进行扩增,从样品中获得了 HIV-1 膜蛋白(env)基因的核酸片段,然后与已知各标准亚型的对照质粒的相同片段 PCR 产物进行杂交,使样品 DNA 与质粒 DNA 同源部位配对形成异源双链体,根据其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的泳动率可确定其亚型。并将这种异源双链泳动分析法(heteroduplex mobility assay, HMA)的结果与 DNA 序列测定结果比较。实验证明, HMA 是一种快速、简便、特异和可靠的 HIV 亚型的分析方法。

关键词 HIV-1 异源双链泳动分析 序列分析

Genetic Subtyping of HIV-1 Strains by Heteroduplex Mobility Assay Yu Hong, Su Ling, Shao Ji-jun, et al. *Institute of Virology, CAPM, Beijing 100052*

Abstract DNA fragments of HIV-1 env gene were amplified by nested PCR from uncultured peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from 24 HIV-1 infected individuals. The PCR products were separated by melting and annealing with denatured PCR product prepared from reference plasmid of representative subtypes. Heteroduplex were then formed between the single-stranded DNA from the two sources and were analysed on polyacrylamide gels. The results from heteroduplex mobility assay(HMA) were compared with HIV-1 subtype results determined by DNA sequencing. With advantages of high speed, low cost and high specificity, HMA is a reliable screening method for HIV-1 subtyping.

Key words HIV-1 Heteroduplex mobility assay Sequencing

人类免疫缺陷病毒(HIV)与其它逆转录病毒一样,具有高度的变异性。根据以往研究最多的 HIV-1 膜蛋白基因(env)核酸和氨基酸序列的同源性,目前已确定由 A-I 和 O 等至少十种 HIV-1 亚型, A-I 亚型间的差异一般在 30%, 而 O 亚型与 A-I 各亚型间的差异高达 45% 以上,同时,这些亚型的分布具有明显的地区性^[1~3]。分析感染人群中 HIV-1 亚型的分布特点,一方面是分子流行病学研究的必需课题,另一方面又为研制有针对性疫苗打下了基础。

确定 HIV 亚型的方法很多,目前比较常用的主要有序列分析、血清学分型及生物学分型

等方法。血清学分型法比较快速简便,但某些亚型间不能区分;序列分析所得的结果较准确,但操作过程复杂,需特殊设备,成本较高。美国华盛顿大学 Mullins 教授在 HIV 分型中建立了一种操作简单,省时,价廉,适用于大规模的样品分析的 HIV 亚型分析的方法——异源双链泳动分析法(heteroduplex mobility assay, HMA)^[4],目前此方法已在全球 HIV 分离鉴定网上广泛应用。我们用 HMA 对来自国内的 24 份 HIV-1 阳性样品进行了亚型分析,并且将 HMA 结果与序列分析结果进行了比较。

材料与方法

一、研究对象和样品:研究对象系 1996 年全国 HIV 分子流行病学调查期间采集的 24 份样品。每份样品采集 5ml 全血,肝素抗凝,用淋巴细胞分离液分离单个核细胞(PBMC), PBS 洗两遍后,使用 Qiagen 公司的 QiAamp Blood

1 中国预防医学科学院病毒所艾滋病参比实验室 北京 100052

2 青岛医学院分子病毒学研究室

3 美国华盛顿大学

试剂,按说明提取细胞染色体 DNA,核酸样品冻存于 -20℃。

二、PCR:采用套式 PCR 方法扩增 HIV-1 env 基因,引物及对照质粒由 Mullins 教授惠赠(表 1)。以 ED3/ED14 为外侧扩增引物进行第一次 PCR 反应,条件为 94℃ 1 分钟,55℃ 1 分钟,72℃ 1 分钟,3 个循环;94℃ 30 秒,55℃ 45 秒,72℃ 3 分钟,32 个循环;72℃ 延伸 5 分钟。取 2μl PCR 产物或 1μl 对照质粒,以 ED5/ED12 为内侧引物进行第二次 PCR,条件为 94℃ 1 分钟,55℃ 1 分钟,72℃ 1 分钟,3 个循环;94℃ 30 秒,55℃ 45 秒,72℃ 2 分钟,32 个循环;72℃ 延伸 5 分钟。取 5μl PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳,与 Marker 及阴性和阳性对照对比判断结果。未扩增出特异产物的样品再用 ED5/ED12 为外侧引物,ES7/ES8 为内侧引物进行扩增,条件同上。

表 1 引物序列及其在 HIV-1 基因组中的位置

引物序列	在 HIV-1 基因组中的位置
ED3	TTAGGCATCTCCTATGGC AGGAAGAAGCGG (5537~5566)
ED14	TCTTGCCCTGGAGCTGCTT GATGCCCCAGAC (7509~7538)
ED5	ATGGGATCAAAGCCTAAA GCCATGTG (6134~6159)
ED12	ATGGCTTCCTGCTGCTCC CAAGAACCCAAG (7359~7388)
ES7	TGTAAAACGACGGCCAGTC TGTTAAATGGCAGTCTAGC (6579~6598)
ES8	CAGGAAACAGCTATGACCC ACTTCTCCAATTGTCCCTCA (7225~7245)

三、异源双链体的形成:在 500μl Ependorf 管中加入 5μl 第二次 PCR 产物(约 100~250ng DNA), 5μl 对照质粒的 PCR 产物(或 H₂O), 1. 1μl 异源双链体杂·交液(heteroduplex annealing buffer, 100mmol/L NaCl 10mmol/L Tris, pH7. 8; 2mmol/L EDTA), 94℃ 水浴 1 分钟,冰浴 10 分钟,即可形成异源双链体。

四、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE):每份杂交样品中加入 3μl 6 × loading buffer,以 4% 非变性聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳(TBE 缓冲

液),若分析 ED5/ED12 扩增片段形成的异源双链体,电压 200V,电泳 6 小时;若分析 ES7/ES8 扩增片段形成的异源双链体,则电压 250 V,电泳 3 小时。电泳完毕,将胶浸入 0.5μg/ml 溴化乙锭中染色 1 小时,在紫外灯下检测结果。

五、异源双链体泳动率的测定及亚型的确定:若样品与某一亚型的对照质粒形成的异源双链体泳动率最快,则可确定该样品为其相应亚型。一般情况下,样品与其相应亚型的质粒形成的异源双链体有两条带,对于某些较复杂或变异较多的样品,可能形成两条以上的异源双链体带,则取其最重要的异源双链体带计算其泳动率。

六、DNA 序列测定及亚型确定:以提纯的 PCR 产物为模板,用 ABI 公司荧光标记末端终止物循环测序试剂盒,在 PE 公司 9600 型 PCR 仪上进行测序反应,样品用量约 1μg,引物用量 6pmol,反应产物经提纯后用 ABI 公司 373A 型 DNA 序列测定仪进行序列测定。测得的序列用 SeqEd 和 DNA 软件进行编辑校正,每个样品 C2-V3 区核苷酸的最终序列根据两个同向或反向测序引物所测结果重叠校核后确定。序列的同源性分析及亚型确定,使用威斯康星 GCG 公司软件包完成。

结 果

应用套式 PCR 从 24 名 HIV-1 抗体阳性者 PBMC 样品中扩增到可用于 HMA 的 HIV-1 env 基因 ED5/ED12 片段(1 200bp),其中有 21 份样品通过 HMA 法,可清楚地确定其亚型,并且与测序结果一致(表 2),2 份样品(YN18, SZ1)不易确定其亚型,又用 ES7/ES8(700bp)引物进行第二次 PCR 扩增,再进行 HMA 分型,结果 YN18 为 B、C 亚型,测序结果为 C 亚型 SZ1 为 A、E 亚型,而测序结果为 B、E 亚型;另外 1 份经 ED5/ED12 扩增阴性的样品,再用 ES7/ES8 进行第二次 PCR 反应,结果 1 份样品(sx3)出现阳性结果,HMA 分型为 B 亚型,测序结果亦为 B 亚型(附图)。

HMA 与 DNA 测序结果比较(表 2), 两者符合率为 91%, 与文献报道 94% 相近^[5,6]。

13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1



附图 标本 SX3、YN18 的 700bp 扩增片段的 HMA 结果

1~4 依次为 SX3 与 H₂O, 对照质粒 B3、B3、C3 的杂交
5~8 依次为 YN18 与 H₂O, 对照质粒 B2、B3、C3 的杂交
9 对照质粒 B2 与 B3 的杂交
10~12 依次为对照质粒 B2、B3、C3 的自身杂交
13 Marker

表 2 HMA 与 DNA 序列结果的比较

样 品	HMA 分析结果		序列分析结果
	ED5/ED12 产物*	ES7/ES8 产物**	
1 NM2	B		B
2 NM3	B		B
3 SX2	B		B
4 SX3	(-)	B	B
5 YN6	B		B
6 YN8	不明	B, C	C
7 XJ8	C		C
8 GD1	E		E
9 GD3	E		E
10 GD4	E		E
11 GD7	E		E
12 GZ1	B		B
13 SZ1	不明	A, E	B, E
14 SZ4	A		A
15 AH6	B		B
16 AH11	B		B
17 GX10	B		B
18 GX11	B		B
19 GX16	E		E
20 GX17	E		E
21 HB8	B		B
22 HB14	A		未做
23 HN9	B		B
24 BJH	B, E		未做

* 1 200bp, ** 700bp

讨 论

HMA 用于 HIV 分型的主要原理是根据不

同样品的单链 DNA 与已知标准亚型的单链 DNA 形成的异源双链体在聚丙烯酰胺凝胶电泳中泳动率的快慢来确定其亚型。如样品与某一亚型形成的异源双链体的泳动率最快, 则可确定该样品为其相应的亚型。HMA 操作简单省时(1~2 天), 不需要特殊仪器设备, 成本较低, 适于大规模的基因分析, 因此 HMA 可对 HIV-1 快速分型, 同时也可分析 HIV-1 基因变异情况^[6~8]。

所有 HIV 感染样品中的 DNA 或对照质粒中的 DNA, 其双链是完全互补, 自身能形成同源双链体, 为保证实验的特异性, 每次实验都应设立样品自身杂交及质粒自身杂交作为对照。PAGE 中单链 DNA(ss DNA)带的出现, 是由杂交过程中断裂的单链 DNA 形成, 其泳动率大约为 Ho 的 40%, 且位置比较固定, 因此有助于判断 He 的泳动率。为保持实验的稳定性和重复性, PAGE 条件要相对恒定, 包括每次实验的电泳装置、凝胶浓度及缓冲液、电泳时间、电压都要一致, 同时, 电泳温度越高, 异源双链体的泳动率越慢, 因此需要冰浴条件下电泳。有些样品经 HMA 不能明确分型, 可能由于其核苷酸缺失或配对错误, 从而影响异源双链体的形成。因此根据我们的实验结果, 建议对某一未知样品进行 HMA 分型时, 应遵循以下几个步骤: ①用 ED5/ED12 引物扩增(1 200bp), 并与各亚型的对照质粒杂交, 若扩增结果为阴性或 HMA 不能明确分型, 则进行②用 ES7/ES8 引物扩增(700bp), 作 HMA 时, 应选择与 ED5/ED12 扩增片段杂交时泳动率较快的对照质粒进行杂交, 若仍不能确定其亚型, 则进行③ DNA 序列测定。

综上所述, 与 DNA 序列测定方法相比, HMA 不失为一种快速、简便、特异和可靠的 HIV 亚型的分析方法, 易于在基层推广应用。

参 考 文 献

- 1 Weniger BG. The molecular epidemiology of HIV in Asia. AIDS, 1994, 8(suppl): s1.
- 2 Janssons W. Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes

G and H in central Africa. AIDS Res Hum Retrov, 1994, 10: 877.

3 Myers G, Korber S, Wain - Hobson RF, et al. Human Retroviruses and AIDS 1993. Los Alamos New Mexico: Los Alamos, Los Alamos National Laboratory, 1993.

4 Delwart EL. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. PCR Meth Appl, 1995, 4: s202.

5 Novitsky V, Arnold C, Clewley JP. Heteroduplex mobility assay for subtyping HIV-1: Improved methodology and comparison with phylogentic analysis of sequence data. J Virol Meth 1996, 59: 61.

6 Wasi C. Determination of HIV-1 subtypes in injecting drug users in Bangkok, Thailand, using peptidebinding enzyme immunoassay and heteroduplex mobility assay: evidence of increasing infection with HIV-1 subtype E. AIDS, 1995, 9: 843.

7 Delwart EL, Sheppard HW, Walker BD, et al. Human immunodeficiency virus type 1 evolution in vivo tracked by DNA heteroduplex mobility assay. J Virol, 1994, 68: 6672.

8 Delwart EL, Shpaer EG, McCutchan FE, et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. Science, 1993, 262: 1257.

(收稿: 1997-03-03 修回: 1997-03-29)

成都市 1991~1995 年以乡为单位儿童免疫接种率达 85% 效果研究

钱映璋 李新达 许正炜 黄蓉娜

作者对成都市 1991~1995 年实现以乡为单位儿童免疫接种率达 85% 目标。5 年计划免疫工作质量和所取得的效益进行分析。按卫生部颁布的以乡为单位接种率审评的批质量检验抽样法(LQAS), 于 1996 年 1 月抽取成都市所辖 9 区(县)27 个乡, 783 名 1994 年 1 月 1 日至 1994 年 12 月 31 日出生儿童, 调查 12 月龄内卡介苗、脊髓灰质炎疫苗、百白破三联制剂、麻疹疫苗接种情况。现场调查表明: 26 个乡上述四种疫苗基础接种率达到 90%, 1 个乡达 85% (因 1 名儿童百白破制剂提前接种)。计免相关疾病得到有效控制。1991~1995 年脊髓灰质炎、白喉、百日咳无病例发生, 麻疹发病率由 1991 年的 0.09/10 万降至 1995 年的零, 根据医院和居民疫情漏报调查, 疫情报告率平均为 98% 和 95%。为证实疫苗的可靠性的接种效果, 按《全国计划免疫技术管理规程》规定方法, 1991~1995 年连续 5 年监测结果表明: 麻疹疫苗和脊灰疫苗效价市站、区(县)站、乡卫生院三级合格率 5 年均均为 100%; 健康人群 2~4 岁、6~8 岁、13~15 岁、25~39 岁四个年龄组抗体水平监测, 其中麻疹监测 629 人, 中和抗体平均滴度为 1:57.55, 监测 232 名麻苗初免儿童, 阳转率为 97%

~100%; 脊灰监测 861 人, I、II、III 型抗体阳性率平均在 92% 以上, 三型抗体平均滴度分别为 1:81.90、1:62.36、1:74.81; 百日咳监测 483 人, 阳性率均在 98% 以上, 保护率为 36.88%~44.83%; 白喉监测 815 人, 阳性率在 86.80%~97.81%, 保护率为 80.00%~96.35%。监测数据说明我市儿童通过计划免疫获得了高抗体水平, 能有效的控制麻疹、百日咳、白喉和脊灰在我市的发生和流行。对成本效益进行分析, 成本与效益之比为 1:56.75, 社会效益和经济效益显著。

以上结果表明: 成都市计划免疫已实现了以乡为单位 85% 目标, 可靠的疫苗质量使人群在接种“四苗”后均产生了高免疫水平, 防止了儿童计免相关疾病的发生和流行, 由于积极开展计免有偿服务, 调动了实施计免的儿童家长和接种人员双方的积极性和责任感, 1991~1995 年 0~7 岁儿童入保率从 80.73% 上升至 90.05%, 高入保率促进了接种率和接种质量的提高。但百日咳抗体水平监测其保护率仅为 36.88%~44.83%, 与四川省卫生防疫站实验监测结果一致, 从百日咳发病来看, 虽然保护率较低, 但 1991 年至 1995 年无病例发生, 认为免疫是成功的。