

北京市 2006 年 HIV-1 流行毒株的 gag 和 env 基因序列测定及亚型分析

叶景荣 邢辉 刘海林 黑发欣 赵月娟 刘胜牙 孙伟东 张启云
张琴 卢红艳 贺雄 邵一鸣

【摘要】 目的 监测 2006 年北京市北京户籍 HIV 感染者中 HIV-1 型流行病毒株的亚型分布特点和变化规律。**方法** 采集北京市 2006 年新确认北京户籍 HIV-1 感染者的抗凝全血样品 32 份,分离血浆,提取病毒 RNA,用巢式聚合酶链反应方法扩增病毒 gag 和 env 基因,并进行序列测定和亚型分析。**结果** 系统进化分析表明北京户籍 HIV-1 感染者样品分别属于 5 个亚型,分别为 B 亚型 9 份,泰国 B 亚型 2 份、C 亚型 2 份,流行重组型 CRF07_{BC} 亚型 5 份,流行重组型 CRF01_{AE} 亚型 4 份。**结论** 北京市居民中已存在多种 HIV-1 亚型和流行重组型,应加强对 HIV-1 毒株亚型变异的监测,及时调整防治策略。

【关键词】 人类免疫缺陷病毒 1 型;亚型;巢式聚合酶链反应

Subtype and sequence analysis of gag and env genes among HIV-1 strains circulating in Beijing residents during 2006 YE Jing-rong*, XING Hui, LIU Hai-lin, HEI Fa-xin, ZHAO Yue-juan, LIU Sheng-ya, SUN Wei-dong, ZHANG Qi-yun, ZHANG Qin, LU Hong-yan, HE Xiong, SHAO Yi-ming. *Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China

【Abstract】 Objective To investigate the subtype distribution and the prevalence of sequence characteristics of HIV-1 strains in Beijing residents during 2006 and to analyze the relationship between distribution of HIV-1 subtypes and transmission routines. **Methods** Blood samples from 32 new confirmed HIV-1 infected individuals from Beijing residents in 2006 and separated plasma specimens were collected. RNAs were extracted and the gag and env gene were amplified by RT-PCR and nest-PCR. PCR products were sequenced directly and phylogenetic analyses of gag and env gene were performed using the MEGA2 software. **Results** Among 32 HIV-1 plasma samples, 22 gag and 4 env gene fragments were amplified and analyzed. Five HIV-1 subtypes or circulating recombinant forms(CRFs) of HIV-1 including Thai B(2 strains), B(9 strains), C(2 strains), CRF07_{BC}(5 strains), CRF01_{AE}(4 strains) were identified being circulated in Beijing. The gene divergences of gag gene inside the subtypes were 6.6%, 4.3%, 6.8%, 4.9% and 3.0% in subtype B, Thai B, C, CRF01_{AE} and CRF07_{BC} respectively. Subtypes B were predominant in Beijing, accounted for 40.9% among 22 samples. **Conclusion** Five HIV-1 subtypes were identified in Beijing and the surveillance of HIV-1 gene variation should be paid more attention to.

【Key words】 Human Immunodeficiency virus-1; Subtype; Nest-polymerase chain reaction

由于人类免疫缺陷病毒(HIV)的反转录酶缺乏矫正功能,加上病毒群体的快速更替,使得 HIV 呈现高度变异性,在 HIV 全球的传播过程中产生了许多具有相对独立基因序列特征的组和亚型(包括 M、N 和 O 三个组, M 组又进一步分为 A~D、F~H、J 和 K 9 个亚型^[1])。通过序列测定方法研究某一地区的 HIV 亚型分布和基因变异情况,可以了解该地区流行毒株的种类、来源、人群分布、流行时间,对

掌握 HIV 传播规律和流行趋势、指导艾滋病预防控制具有重要的指导意义和理论价值。本文对北京市 HIV-1 流行株 gag 和 env 基因进行了序列分析和亚型研究,结果报告如下。

材料与方法

1. 样本来源:随机选取北京市 2006 年新确证的北京市户籍的 HIV-1 抗体阳性者血浆标本 32 份。使用德国 Qiagen 公司的 QIAamp Viral Mini Kit 从血浆中提取 RNA。

2. PCR 引物设计:设计合成扩增 gag 和 env 基因多对 PCR 引物,序列见表 1。提取的 RNA 样品

基金项目:国家高科技发展(863)计划资助项目(2006AA02Z418)

作者单位:100013 北京市疾病预防控制中心(叶景荣、刘海林、黑发欣、赵月娟、孙伟东、张启云、张琴、卢红艳、贺雄);中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心(邢辉、刘胜牙、邵一鸣)

采用一步法 RNA PCR 试剂盒 [One Step RNA PCR Kit (AMV), TaKaRa] 反转录, 然后用巢式 PCR 分别扩增 *env* 和 *gag* 基因。

表1 扩增使用的 PCR 引物

扩增区	引物名称	序列(5'~3')	用途	位置(HXB2)
GAG 区	gag-F2	ATGGGTGCGAGAGCGTCA RIATATA R=A or G	PCR	790~814
	gag-E2	TCCAACAGCCCTTTTTC TAGG	PCR	2032~2011
	306	GGGAAAAAATTCGGTTAA GGCC	PCR、 测序	836~857
	c-gag	TAGTTCCTGCTAIRTCAC TTCC R=A or G	PCR	1507~1486
	ENV 区	ED5	ATgggATCAAAgCCTAAAgC CATgTg	PCR
ED12		AgTgCTTCCTgCTgCTOCCA	PCR	7811~7792
Env7		CTgTTAAATggCAGTCTAgC	PCR、 测序	7002~7021
Env8		CACTTCTCCAATgTCCCTCA	PCR	7668~7648

3. PCR 扩增条件: *gag* 基因以 gag-F2 和 gag-E2 为外侧扩增引物进行第一轮 PCR 反应, 条件为: 50℃ 反转录 30 min, 95℃ 灭活反转录酶 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 120 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 取 5 μl 第一轮 PCR 产物, 以 306 和 c-gag 为内侧引物进行第二轮 PCR, 条件为 95℃ 变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min^[2]。

env 基因以 ED5 和 ED12 为外引物进行第一轮 PCR 反应, 条件为 50℃ 反转录 30 min, 94℃ 灭活反转录酶 2 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 90 s, 2 个循环; 94℃ 变性 15 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。取 5 μl 第一轮 PCR 产物为模板, Env7 和 Env8 为内侧引物进行第二轮 PCR 扩增, 条件为 94℃ 变性 2 min, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 1 个循环; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min^[3]。

4. PCR 产物的纯化和测序: PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳, 与 Marker 对照判定无误后, 切下特异扩增条带, 使用德国 Qiagen 公司的 Gel Extraction Kit 进行 PCR 产物纯化。然后用美国 Applied Biosystem 公司的 BigDye Terminator Sequencing Kit 和 ABI 377 型 DNA 测序仪测序。

5. 序列分析: 序列分析用 Vector NTI Suite 8 软件和 Bioedit 软件进行编辑、校正。系统进化树分析用 MEGA(version 2) 与 HIV-1 各个亚型国际参考株比较, 通过系统进化分析, 最后确定 HIV-1 病毒基因

亚型^[4]。

结 果

1. 标本来源和扩增情况: 32 份标本中最终扩增得到 22 份样品的 *gag* 基因序列 (扩增率 68.75%), 成功扩增 *gag* 基因 22 份标本中有 4 份标本成功扩增 *env* 基因序列 (扩增率 12.5%)。22 份标本中 3 份来自 VCT 咨询检测门诊, 为同性恋人群; 4 份来自劳教所, 为静脉吸毒人群; 15 份来自医院就诊和体检人群, 其中 3 份标本来自性病门诊患者。

2. 系统进化树分析: 将得到的 *gag* 和 *env* 基因与 HIV-1 各个亚型国际参考株比较, 并进行系统进化分析, 有 9 份与欧美 B 亚型 B. FR. 83. HXB2 株聚集在一起, 组内离散率为 6.0%; 2 份与泰国 B(B') 亚型 B. TH. 92. 92TH014 株聚集在一起, 组内离散率为 6.1%; 2 份与 C 亚型 C. IN. 95. 95IN21068 株聚集在一起, 组内离散率为 9.1%; 5 份与流行重组型 CRF07_BC 亚型 07_BC. CN. 97. CN54 株聚集在一起, 组内离散率为 2.9%; 4 份与流行重组型 CRF01_AE 亚型 01_AE. TH. 90. CM240 株聚集在一起, 组内离散率为 3.4% (表 2)。4 份 *env* 基因系统进化分析同 *gag* 基因结果一致, 2 份同 CRF07_BC 流行重组亚型 07_BC. CN. 97. CN54 株聚在一起, 组内离散率为 10.9%, 1 份与 B 亚型 B. FR. 83. HXB2-LAI-IIIB-BRU 株聚集在一起, 1 份与 B' 亚型 B. TH. 92. 92TH014 株聚集在一起 (表 3)。

表2 北京市 HIV-1 毒株 *gag* 基因与各亚型参考毒株的平均基因离散率

亚型	样本份数	B	B'	AE	07BC	C
		(B. FR. 83. HXB2)	(B. TH. 92. 92 TH014)	(01_AE. TH. 90. CM240)	(07_BC. CN. 97. CN54)	(C. IN. 95. 95IN 21068)
B	9	0.066	0.074	0.183	0.149	0.160
B'	2	0.063	0.043	0.178	0.151	0.166
AE	4	1.159	0.153	0.049	0.195	0.204
07BC	5	0.128	0.124	0.191	0.030	0.058
C	2	0.136	0.133	0.193	0.072	0.068
合计	22	9	2	4	5	2

表3 北京市 HIV-1 毒株 *env* 基因与各亚型参考毒株的平均基因离散率

亚型	样本份数	B	B'	AE	07BC	C
		(B. FR. 83. HXB2)	(B. TH. 92. 92 TH014)	(01_AE. TH. 90. CM240)	(07_BC. CN. 97. CN54)	(C. IN. 95. 95IN 21068)
B	1	0.171	0.159	0.255	0.284	0.277
B'	1	0.153	0.099	0.257	0.294	0.282
07BC	2	0.288	0.300	0.288	0.084	0.094
合计	4	1	1	0	2	0

本次调查发现,2006 年北京市 HIV-1 感染者当中存在 B、B'、C 3 种亚型和 CRF01_AE, CRF07_BC 2 种重组亚型的流行,所占比例依次为 40.9%、9.1%、9.1%、18.2%、22.7%,主要流行的 HIV-1 亚型为欧美 B 亚型。

3. 不同传播途径的亚型分布:在北京市户籍人口 HIV-1 感染者中 HIV-1 亚型分布特点也不相同。吸毒人群中主要存在 CRF07_BC;通过异性传播感染的人群中存在 B、B'、C 和 CRF01_AE 4 种亚型;同性恋人群中主要存在 B、CRF01_AE 和 CRF07_BC 3 种亚型,比文献[5]报道的多了 2 种亚型;采供血感染的病例为 B'亚型(表 4)。

表 4 北京市户籍人口 HIV-1 感染者中不同传播途径的 HIV 亚型分布

亚型	样本份数	传播途径				
		采供血	静脉吸毒	同性恋	异性恋	不详
B	9	-	-	3	3	3
B'	2	1	-	-	1	-
AE	4	-	-	2	2	-
07BC	5	-	4	1	-	-
C	2	-	-	-	2	-
合计	22	1	4	6	8	3

同一个亚型在不同人群中的基因离散率也有不同。从 CRF07_BC 重组亚型毒株离散率来看,组内离散率为 3.0%,在吸毒者中重组亚型的基因离散率为 2.4%,提示该亚型毒株在吸毒者中流行的过程中变异较小,与文献[6,7]报道的一致。CRF01_AE 流行重组亚型组内离散率为 3.4%,在异性传播人群中离散率为 5.1%,提示 CRF01_AE 流行重组亚型在异性传播人群中变异较大,流行时间相对较长。B 亚型组内离散率为 6.3%,在同性传播人群中的离散率为 2.8%,在异性传播人群中的离散率为 6.7%,提示 B 亚型在异性传播人群中变异率大,流行时间也较长。经采供血感染的病例长期居住在山东,在当地通过有偿献血感染 HIV-1,系统进化分析表明 BJ06109 与 B. TH. 92. 92TH014 株聚集在一起,基因离散率为 3.8%。本次研究未发现在北京市存在通过输献血感染的病例。

讨 论

截止到 2006 年 10 月底,北京市 2006 年新报告北京籍 HIV 感染者和艾滋病患者 130 例。本次成

功扩增了 22 例(16.9%)感染者的 *gag* 基因和 4 例 *env* 基因,从分子水平上证实了北京市居民中 HIV-1 毒株存在亚型多样性、不同人群中的流行株存在差异性、聚集性的特点。

北京市 HIV 的传播以静脉吸毒和性传播为主,静脉吸毒人群中 HIV-1 亚型比较单一,以 CRF07_BC 为主,性传播人群中 HIV-1 亚型分布广泛,包括 B、B'、C 和 CRF01_AE 4 种亚型。

我国首例 HIV 感染者是于 1985 年在北京市发现的^[8,9]。随着改革开放,北京市作为首都逐渐成为国际化的大都市,国际人员往来和国内人口流动日益频繁,国际上和全国各地流行的 HIV-1 主要亚型在北京市均有发现。多种 HIV-1 亚型的出现,为北京市今后艾滋病预防和控制工作提出了更为严峻的挑战。

参 考 文 献

- [1] Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science*, 2000, 288:55-56.
- [2] 姚亚萍,梁浩,杨介者,等.浙江省 HIV-1 流行毒株 *gag* 基因序列测定和亚型分析. *中国卫生检验杂志*, 2004, 14(6):660-661.
- [3] 邢辉,梁浩,洪坤学,等.我国 HIV-1 主要流行株外膜蛋白(*env*)基因 V3~V4 区变异及其与生物学特性的关系. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25(3):185-189.
- [4] HIV sequence database, Los Alamos, USA, www.hiv.lanl.gov/content/Hiv-db/SUBTYPE_REF/align.html.
- [5] 姚均,张福杰,何忠平,等.北京市同性恋 HIV-1 感染者的包膜基因 C2~V3 区序列测定和亚型分析. *中国性病艾滋病防治*, 2002, 8(3):131-141.
- [6] Lukashov VV, Karamov EV, Eremin VF, et al. Extreme founder effect in an HIV type 1 subtype A epidemic among drug users in Svetlogorsk, Belarus. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1998, 14:1299-1303.
- [7] Bobkov A, Kazennova E, Khanina T, et al. An HIV type 1 subtype A strain of low genetic diversity continues to spread among injecting drug users in Russia: study of the new local outbreaks in Moscow and Irkutsk. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001, 17:257-261.
- [8] 李兴旺,李秀兰,丁峥秋,等.北京地区艾滋病临床流行病学分析. *中华流行病学杂志*, 1997, 18(2-A):120-121.
- [9] Zeng Y, Fan J, Zhang Q, et al. Detection of antibody to LAV/HTLV-III in sera from hemophiliacs in China. *AIDS Res*, 1986, 2 Suppl 1:S147-149.

(收稿日期:2006-12-28)

(本文编辑:张林东)