·实验研究·

异源双链泳动分析法在人类免疫缺陷病毒 1 基因亚型分析中的应用

陈亮　严延生　翁育伟　王惠榕　吴守丽　陈舸　郑兆双　郑健　颜苹苹

【摘要】　目的　运用异源双链泳动分析法(HMA)进行人类免疫缺陷病毒 1(human immunodeficiency virus-1, HIV-1)基因亚型分析,了解福建省 HIV-1 亚型的流行情况。方法　收集细胞培养中 HIV-1 感染的外周血单个核细胞(PBMC),聚合酶链反应(PCR)扩增 HIV-1 膜蛋白基因(*env*)区的核酸片段,与标准亚型的对照质粒的 PCR 产物进行杂交,形成异源双链二聚体,根据其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的泳动率确定其亚型,并进一步对标本进行序列测定和系统树分析。结果15 份标本中,80.00%为 E 亚型,6.67%为 B 亚型,2 份不能确定其亚型。比较异源双链泳动法和序列测定法的结果,显示两种分析方法对 HIV-1 病毒基因分型有较高的一致性,其亚型一致率为86.67%。结论　福建省流行的 HIV-1 毒株以 E 亚型为主。亚型分析法具有快速、简便、经济和高特异性的特点,可用作对 HIV 流行毒株进行长期监测的重要手段。

【关键词】　人类免疫缺陷病毒;异源双链泳动分析;基因亚型;序列测定

Application of heteroduplex mobility assay in genetic subtyping on human immunodeficiency virus type 1

CHEN Liang, YAN Yansheng, WENG Yuwei, WANG Huirong, WU Shouli, CHEN Ge, ZHENG Zhaoshuang, ZHENG Jian, YAN Pingping. Fujian Provincial Sanitary and Anti-Epidemic Station, Department of AIDS Prevention and Control, Fuzhou 350001, China

【Abstract】　Objective　Using heteroduplex mobility assay (HMA) to subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) for the purpose of understanding HIV-1 subtype epidemic in Fujian province. **Methods**　DNA fragments of HIV-1 *env* gene were amplified from peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cocultures of HIV-1 infected individuals by nested polymerase chain reation (PCR). Heteroduplexs were formed through hybridizing PCR products from the samples and reference plasmid. According to the mobility of heteroduplexs in polyacrylamide gel electrophoresis, HIV-1 subtype from that sample was characterized and further confirmed by nucleotide sequencing analysis. **Results**　Thirteen of 15 (86.67%) samples were successfully subtyped by HMA, except 2 failures. Subtype E and B took up 80% (12/15) and 6.67% (1/15) respectively. Results indicated a high concordance between HMA and nucleotide sequencing analysis and concordance rate was 86.67% (13/15). **Conclusions**　Subtype E appeared to be the major epidemic strain of HIV-1 in Fujian. HMA showed the characteristics of fastness, easiness, economie and with high specificity, and can be used in the survillence for the epidemic strain of HIV-1.

【Key words】　Human immunodeficiency virus; Heteroduplex mobility assay; Gene subtype; Sequencing

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)属逆转录病毒科(Retroviridae),RNA 基因组通过逆转录酶逆转录为 DNA 时,由于逆转录酶缺乏校正能力,容易发生差错,同时在机体巨大的免疫压力下,HIV 也需要发生变异以适应其生存,因此在其传播过程中产生许多具有基因序列特性的亚型(subtype),并在全球范围流行蔓延过程中形成一定的地区性分布特点[1]。HIV-1 的流行最为广泛,根据 *gag* 和 *env* 区的基因序列及系统树分析可将 HIV-1 分为 M、N 和 O 群,再根据 *env* 区基因序列的不同,可将 M 群分为 A ~ J 亚型[2,3]。目前,用于 HIV 分型的方法主要有 DNA 序列测定、血清法、核酸探针法及异源双链泳动分析法(heteroduplex mobility assay, HMA)[4]。序列测定是确定 HIV 流行株型别的最准确方法,但由于其技术要求高,费用高,因此不易普及。据 HIV-1 感染者血清抗体对不同 HIV-1 毒株 V3 肽的反应性,可以推测 HIV-1 毒株的类型[5]。但血清学分型与基因分型结果不完全一

作者单位:350001 福州,福建省卫生防疫站艾滋病防治研究室

致，用它进行亚型分析时准确性较低。异源双链泳动分析法是一种简单、快速、经济和高特异的亚型分析方法，目前已广泛用于 HIV 亚型分析[6]。进行 HIV-1 亚型分子流行病学的调查，一方面可以从分子水平上解释我省 HIV-1 传播类型和流行规律，另一方面可以为 HIV-1 疫苗的研制和我省艾滋病的防制提供依据。我们利用该方法对 15 份 HIV-1 阳性标本进行分型，然后与序列测定和系统树分析结果进行比较，现将结果报道如下。

材料与方法

1.研究对象：按照卫生部颁发的《全国艾滋病检测工作规范》检测血清 HIV 抗体。经福建省卫生防疫站艾滋病防治研究室确认的 HIV 抗体阳性者，无菌操作抽取静脉血 15 ml，共 15 份，注入含肝素抗凝剂的无菌试管中（其肝素钠含量为 10 ~ 20 IU/ml）。15 份标本中，有 13 份血样在取血 6 h 内进行共同培养分离 HIV-1，P24 抗原检测阳性，其中 2 份直接用感染者及艾滋病病人的外周血单个核细胞（PBMC）。采用上海华舜公司的核酸提取试剂盒提取核酸模板，方法按照说明书进行。

2.流行病学调查：对确认的 15 例 HIV 抗体阳性者进行个案调查，了解其可能的感染途径。

3.常规培养：从 HIV 感染者全血中分离出 PBMC，将感染者 PBMC 与植物血凝素（PHA）预激活的健康供者 PBMC 共同培养在 15 ml 的淋巴细胞生长液中[其中每毫升生长液中含有 10%热灭活胎牛血清、100 IU 青霉素、100 μg 链霉素、100 U 白细胞介素-2（IL-2）、2 mmol/L 谷氨酰胺、0.003 U 神经氨酸酶以及 5 μg 的海美溴铵]，每隔 3 ~ 4 d 换液 1 次。其中在第 7、14 及 21 天还需补充 5×10^6 活化的供者 PBMC，共培养 28 d。

4.PCR：采用套式 PCR 方法扩增 HIV-1 *env* 基因部分片段。以 ED1/ED2 为外侧扩增引物进行第一轮 PCR 反应，扩增参数为 95℃ 7 min，94℃ 30 s，55℃ 1 min，72℃ 2 min，30 个循环，72℃ 5 min。以 ED3/ED4 为内侧引物进行第二轮 PCR，扩增参数为 94℃ 30 s，55℃ 1 min，72℃ 1 min，30 个循环，72℃ 5 min。用引物 ED3/ED6 进行第三轮扩增，采用第二轮的扩增条件。取 2 μl PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳，EB 染色后在紫外透射仪上显影。引物序列及其在 HIV-1 基因组中的位置见表 1。

5.异源双链泳动分析：

（1）异源双链的形成：在 200 μl 的 PCR 扩增管中加入 10 μl 第三轮 PCR 扩增产物，10 μl 亚型对照质粒的 PCR 产物，2.2 μl 10 倍异源双链二聚体复性缓冲液［heteroduplex annealing buffer（HAB），1 mol/L NaCl，100 mmol/L Tris，pH 7.8，20 mmol/L EDTA］，沸水浴10 min，置于冰浴中8 min，即可形成异源二聚体。

（2）聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）：每份标本中分别加入 4 μl 加样缓冲液（0.25% 溴酚蓝，40%蔗糖水溶液），在 5%的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。电泳缓冲液为 1 倍 TBE，150 V 电泳 5 h，电泳结束后，将凝胶浸入0.5 μg/ml 溴化乙锭中染色 20 min，在紫外透射仪内观察检测结果及摄像。

（3）被测标本基因亚型的确定：若被测标本与某一亚型的对照质粒形成的异源双链二聚体泳动最快，则可确定该标本为其相应亚型。

6.DNA 序列测定和系统树分析：使用测序引物和提纯的 PCR 产物，用 PE 公司的荧光标记末端终止物循环测序试剂盒，按说明进行循环测序反应，然后用 ABI377 测序仪进行序列测定。应用 Phylip 软件包对测得序列进行排列和比较，作系统树分析。

结　果

1.PCR 检测结果：标本和标准质粒模板 DNA 用引物ED1/ED2、ED3/ED4和ED3/ED6扩增后，其产物经 1%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，在紫外透射仪下观察可见一条大小约 782 bp 的核酸片

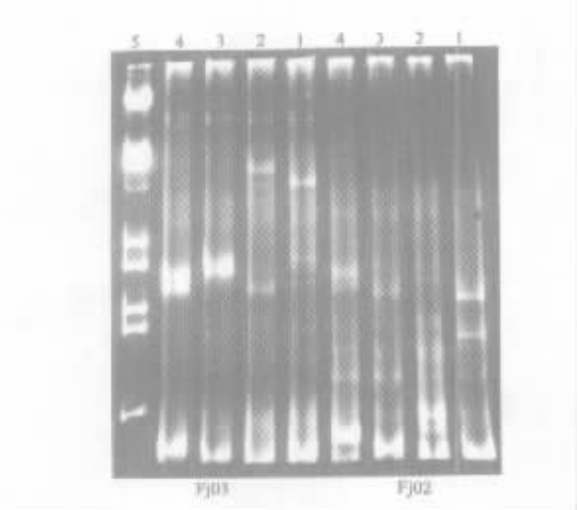
表1　引物序列及其在 HIV-1 基因组中的位置

引物	序　　列	在 HIV-1 基因组中的位置	扩增片段长度(bp)
ED1	TATTATGGGGTACCTGTGTGGAAAGAAGCA	108 ~ 137	
ED2	CTCAGCAAATTGCTTTGCTGTTGCACTATA	1 642 ~ 1 613	1 535
ED3	GAGCCAATTCCCATACATTATTGT	640 ~ 663	
ED4	GCGCCCATAGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAG	1 567 ~ 1 538	928
ED6*	AATTCACTTCTCCAATTGTCC	1 421 ~ 1 401	782

* 引物 ED6 与 ED3 配对

段。

2.异源双链泳动分析法(HMA)的分型结果:15 份被检标本中,12 份(Fj03 ~ 11,Fj13 ~ 15)为 E 亚型,占80.00%,Fj02 为 B 亚型,占7.69%。13 份标本经 HMA 可以确定其亚型,占标本总数86.67%,其余 2 份则不能进行准确地分型。见图 1。



标本 Fj02 与对照质粒 BR20、TH14、TH22、TH06 杂交,结果为 B2 亚型;标本 Fj03 与对照质粒 BR20、TH14、TH22、TH06 杂交,结果为 E2 亚型;1、2、3、4 分别为对照质粒 BR20、TH14、TH22 和 TH06,5 为 DNA 分子量标准-λDNA/EcoR Ⅰ/Hind Ⅲ

图1　标本 Fj02,Fj03 的异源双链泳动分析结果

3.感染途径分析:12 例 E 亚型中,有 11 例是通过异性性接触途径感染 HIV,另外 1 例不详。1 例 B 亚型是通过血途径感染 HIV。

4.HMA 分型与序列测定的比较:比较 HMA 分型和序列测定分型的结果见表 2,两者一致率为 86.67%。2 份经 HMA 不能确定其亚型的标本,序列测定结果均为 E 亚型。

讨　论

我国目前已发现 HIV-1 有 A、B、C、D、E、F、G 7 个亚型和 B 亚型变种(泰国 B 亚型)[7,8]。但以 B、C 和 E 亚型为主,B 和 C 亚型分布在我国云南、新疆等地,主要经静脉共用注射器等血途径传染。E 亚型主要发现于东南沿海省份,经性途径传播。福建省 HIV 的流行主要以性传播为主,根据严延生等[9]的报道,对福建省 25 例 HIV 感染者进行 HIV 核苷酸序列分析,发现其中 16 例为 E 型,6 例为 B 亚型,2 例为 C 亚型,1 例为 A 亚型。证实了福建省流行的 HIV-1 毒株的特点是以 E、B 亚型为主,多种亚型并存[10]。且流行病学调查发现 E 亚型基本上是通过性途径感染。因此,本研究将 15 份标本与 B 亚型的 BR20(B1)和 TH14(B2)、E 亚型的 TH22(E1)和 TH06(E2) 4 种参考亚型的质粒进行 HMA 分析定型。

表2　用 HMA 分型与序列测定的 HIV-1 基因亚型比较

标本序号	HMA 分型	序列测定分型
Fj01	I*	E
Fj02	B	B
Fj03	E	E
Fj04	E	E
Fj05	E	E
Fj06	E	E
Fj07	E	E
Fj08	E	E
Fj09	E	E
Fj10	E	E
Fj11	E	E
Fj12	I*	E
Fj13	E	E
Fj14	E	E
Fj15	E	E

* 为未确定

从本研究 HMA 图谱可以看出,有的标本与标准质粒杂交比较充分,因此,在凝胶上看不到单链 DNA;而有的则出现多条异源二聚体条带,这可能是因为用于扩增的核酸模板中看不到单链 DNA,或因为用于扩增的核酸模板中含有病毒准种的序列,在混合溶液中,同时扩增的不同变异型也可以形成异源二聚体的原因所致。2 份经 HMA 不能确定其亚型的原因可能有两个,一方面可能是 PCR 扩增效率低,扩增产物的量达不到形成异源二聚体所需的浓度,另一方面可能是因为被检标本引物设计区的部分碱基发生变异,引物不能与模板很好地结合,以致无法扩增出所需的目标片段。

比较 HMA 与序列测定结果,两者符合率为 86.67%。2 份经 HMA 不能确定的标本,序列测定结果均为 E 亚型。从上述结果可以看出,序列测定的结果准确可靠,但费用高,操作起来比较复杂,需要专门技术人员才能完成,因此难以推广。虽然 HMA 在准确性方面与序列测定相比有一定差距,但两者仍存在较高的一致率。因此 HMA 作为一个快速、简便、经济、特异的 HIV 亚型分析方法,可在具备一定实验条件的基层单位开展,以达到长期监测 HIV-1 亚型的分布及传播动向,为研制适合当地使用的疫苗提供科学依据。

参 考 文 献

1 于恩庶,李子华,焦新安,等主编.新发现和再肆虐的传染病续编.香港:亚洲医学科学出版社,2000.85-115.

2 Janssens W, Hevndrickx K, Fransen K, et al. Genetic and Phylogenetic analysis of *env* subtype G and Centerl Africa. AIDS Res Hum Retroviruses, 1994, 10:877-879.

3 Kostrikis LG, Bagdades E, Cao Y, et al. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus; identification of a new subtype designated subtype I. J Virol, 1995, 69: 6122-6130.

4 姚均,潘品良,刑辉,等.应用异源双链泳动分析法快速确定(HIV-1)基因亚型.病毒学报,1999,15:296-304.

5 邵一鸣,曾毅,赵全壁,等.中国及外国某些地区 HIV 感染者血清 HIV-1 gp120 V3 肽反应的比较研究.中华微生物学和免疫学杂志,1993,13:1-5.

6 Eric LD, Belinda H, Allen GR, et al. Genetic Subtyping of Human Immunodeficiency Virus using a Heteroduplex Mobility Assay. PCR Methods and Applications, 1995.203-206.

7 肖瑶,姚均,陈刚,等.克隆中国 B,C,E 亚型的 HIV-1 代表株建立适于我国流行株的异源双链泳动分析.中华实验和临床病毒学杂志,1999,13:33-36.

8 韩梅,冯毅,付宗道,等.重庆市 HIV-1 样本的亚型分析及 G 亚型 HIV-1 毒株在我国的发现.中国性病艾滋病防治,2000,6:89-91.

9 严延生,陈舸,郑兆双,等.福建省艾滋病流行态势及影响因素的分析.海峡预防医学杂志,2000,6:1-3.

10 翁育伟,严延生,陈舸.福建省 HIV-1 流行毒株序列测定与亚型分析.中国人兽共患病杂志,2000,16:17-19.

(收稿日期:2001-03-30)
(本文编辑:尹廉)

·短篇报道·

一起乙型流行性感冒局部爆发性流行的调查

胡永勤 干伟群 杨其法 范力强

2001 年 4 月 18 日至 5 月 8 日,杭州市余杭区临平镇城北中学和中心小学发生一起乙型流行性感冒(流感)爆发。疫情发生后区疾病预防控制(疾控)中心等单位有关人员赶赴现场调查处理。现将调查情况报道如下。

1.材料与方法:病例资料来源于现场流行病学调查,按统一设计的个案调查表逐项进行调查,方法按照《全国卫生防疫工作规范》爆发疫情调查处理进行。流感病毒分离由浙江省疾控中心病毒所完成。按照国家技术监督局和卫生部颁布的《流行性感冒诊断标准及处理原则》(GB15994-1995)确诊病例。

2.结果:(1)流行特征:①罹患率:两校累计发病 425 例,罹患率为47.54%,其中中学发病 129 例,罹患率37.61%,小学发病 296 例,罹患率48.52%。②发病时间:小学从 4 月 18 日出现首发病例,呈逐日递增趋势,至 4 月 26、27 日达发病高峰,发病数占病例总数的48.69%,4 月 29 日至 5 月 8 日发病数每天 1~4 例。中学从 4 月 21 日出现首发病例,呈逐日递增趋势,4 月 28、29 日达发病高峰,占病例总数的53.49%,5 月 8 日复访发病已得到有效控制。整个流行历时3周左右。③发病者年龄与性别分布:发病年龄在8至17岁之间,男生 220 例,女生 205 例,教职员工无一发病。(2)临床症状和实验室检测:①潜伏期:从首发病例引入至发病高峰一般在 2~4 d。②主要症状:对两校 365 例病例按病人主诉统计有:头痛占57.00%,流涕52.33%,咳嗽43.84%,咽痛39.45%,纳差36.71%,乏力32.33%,发热32.05%,腹痛17.26%。③病毒培养分离:由专业人员采集 7 份现症病人口腔含漱液,培养分离出 4 株乙型流感病毒(维多利亚类)。

3.讨论:本次流感爆发始于城北小学,迅速地向毗邻的中学蔓延,发病逐日递增,短期内迅速达到发病高峰后并逐渐地波及周围村小学,流行仅局限在临平镇城北片,全区疫情监测未发现有跨地区和沿交通线传播的迹象,可能与学生在学习期间活动范围受到一定限制有关。本次中、小学生的罹患率基本一致,临床症状表现极其相似,并且在中、小学生中均分离到相同的乙型流感病毒(维多利亚类),表明发生在两校的流感爆发实为一次由同一病毒引起的同源性爆发。

本次流感爆发提示我区中、小学生可能对流感病毒存在普遍易感性,因此寻找针对本地区流感病毒流行株的疫苗,加强对中学、小学、幼托机构等易感人群密集的单位进行预防接种十分必要。

(收稿日期:2001-10-27)
(本文编辑:杨莲芬)

作者单位:311100 杭州市余杭区疾病预防控制中心传染病防治科