

应用单基因组扩增法分析 HIV-1 准种基因变异

秦彦珉 王晓辉 孔东锋 张顺祥

【摘要】 目的 探索应用单基因组扩增分析 HIV-1 准种基因变异。方法 将深圳 2010 年 6 个基因测序出现重叠峰的样本 RNA 稀释至单拷贝,采用一步法 RT-PCR 套式扩增,扩增产物纯化后进行基因测序,应用 Mega 4.02 多功能基因分析软件分析不同准种序列的基因距离,构建进化树模型。同时,测定样本的 CD4⁺T 淋巴细胞浓度和病毒载量。结果 同一感染者体内 HIV-1 准种在进化树上形成了各自独立的簇,有些簇存在明显的亚簇,表明某些病毒株在复制中具有竞争优势。6 个样本 HIV 准种的基因距离介于 0.008 与 0.06 之间,与感染持续时间和病毒载量有关。结论 单基因组扩增法可以很好地分辨出 HIV-1 准种的基因变异,对于 HIV-1 准种基因距离的分析可以判断感染时间和分析免疫逃逸机制,其相关影响因素尚需更大样本的分析。

【关键词】 HIV; 基因扩增; 准种; 有限稀释法

The analyses of HIV-1 quasispecies in HIV-infected subjects by the application of single genome amplification assay Qin Yanmin*, Wang Xiaohui, Kong Dongfeng, Zhang Shunxiang.* *Infectious Disease Control Department of Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China*
Corresponding author: Zhang Shunxiang, Email: zhangsx@szcdc.net

【Abstract】 Objective To establish the single genome amplification (SGA) method and analyze the quasispecies in HIV-infected patients. **Methods** All 6 sample RNA acquired in 2010 in Shenzhen and genetic sequenced as overlap peaks were extracted and diluted to a single copy, nest-PCR after one step RT-PCR was employed to amplify HIV-1 genome, and then PCR products was purified and sequenced. Mega 4.02 software was used to analyze the genetic distance among HIV-1 quasispecies, and phylogenetic tree was constructed. **Results** Our data showed that viral sequences derived from different patients were grouped into different clusters. Subcluster was also observed in several clusters, indicating these existed competition and preferential replication of certain viral strains. The genetic distance within one cluster of 6 samples were between 0.008 and 0.06, it was likely to associate with the duration since infection and viral load. **Conclusion** SGA is a useful approach to gain information on quasispecies, the genetic distance within one cluster may help to determine the infection time and immune escaping. The analysis of related affecting factors need more samples.

【Key words】 HIV; Gene amplification; Quasispecies; Limiting dilution method

HIV-1 分为 3 个组,分别为 M、O 和 N 组,其中 M 组有 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 等 10 余个亚型。此外,近年来发现多个流行重组型。HIV-1 感染者对同一亚型或不同亚型的 HIV 毒株感染缺乏保护性,同一亚型或不同亚型的 HIV-1 毒株或重组株有可能感染同一个体,造成亚型内或亚型间混合感染的情况^[1-2]。研究表明,在混合感染中,再次感

染的毒株较初次感染的毒株具有更强的适应性和复制能力^[3-4]。HIV 基因的高度变异性不仅体现在众多的亚型和重组亚型中,在同一感染者体内的不同病毒株同样存在基因序列的差异,称为准种(quasispecies)。HIV 准种序列的变异分析对了解 HIV 的基因变异规律有重要价值,也是分析混合感染所必需的,本研究中笔者就 HIV 准种的检测和分析方法进行初步探讨。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.09.015

基金项目:2012 年深圳市科技计划项目(201202095)

作者单位:518055 深圳市疾病预防控制中心传染病防制科(秦彦珉、孔东锋、张顺祥),艾滋病防制科(王晓辉)

通信作者:张顺祥,Email: zhangsx@szcdc.net

材料与与方法

1. 材料:在以往对深圳市 HIV 感染者进行分子流行病学的研究中,发现 2009 年有 6 例感染者的基

因测序图出现较多重叠峰,且无法消除,样本有可能存在混合感染或变异较大的准种序列,拟对这些样本进行准种分析以了解其基因变异的特点。

2. HIV-1 RNA 的提取及稀释终点的确定:应用 QIAamp Viral RNA extraction kit 核酸提取试剂盒(德国 Qiagen 公司)从血浆中提取 HIV-1 RNA。为保证用于分析的序列来源于同一病毒株,参考样本的病毒载量,采用有限稀释法,对样本进行 3 个稀释度的系列稀释,每个稀释度扩增 3 管,根据每个梯度的阳性数,使用美国华盛顿大学开发的 Quality Java Applet 网上分析工具初步估算出标本的稀释终点浓度。对该稀释度的标本进行 30 个巢式基因扩增,当 PCR 扩增阳性数占该稀释度 PCR 总数的 30% 或以下时,该稀释度接近终点稀释度,在该稀释度进行足够数量的扩增以获得分析所需要的准种序列数。

3. RT-PCR 及基因测序:应用一步法逆转录扩增试剂盒(Prime Script One Step RNA RT-PCR Kit)和 ExTaq 扩增酶(日本 TaKaRa 公司),用巢式聚合酶链反应(nested-PCR)扩增 HIV-1 env C2~V3 区和 gag p17/p24 连接区。按巢式 RT-PCR 方法设计合成多对 PCR 引物,引物设计原则同文献[5]。

取 5 μ l 第二次 PCR 产物,用 2.0% 的琼脂糖凝胶,100 V 电压,电泳 30 min。电泳结果与 100 bp 的 Marker 比对鉴定无误后,选取阳性结果送往上海生物工程技术服务有限公司纯化并测序。测序引物为 207(5'-CTGTTAAATGGCAGTCTAGC-3')。

4. 单基因组扩增(single genome amplification, SGA)的质量保证:应用有限稀释法进行 SGA 分析必须在达到稀释终点时将扩增阳性率降低到 30% 以下,这样阳性孔扩增产物的序列近似于单个病毒株基因序列。

5. 序列分析:测序结果用美国 ABI 公司 Sequence Scanner 软件判断序列质量,剔除不合格的序列。用美国 Los Alamos HIV database (<http://www.hiv.lanl.gov>) 核酸序列库中提供的基因分型工具 BLAST 程序结合系统树分析进行基因型判定并选择参考基因序列,用 Mega 4.02 多功能基因分析软件 Clustal W 程序将获得的样本 env 区基因序列与国际标准参考序列进行比对,进行必要的手工调整。HIV 亚型标准参考序列从美国 Los Alamos HIV 数据库 (<http://www.hiv.lanl.gov>) 下载。用 Neighbor Joining Bootstrap 方法构建系统进化树,利用 Distance 程序计算组内和组间基因距离。进化树模型中簇(cluster)之间的判别以自展值(bootstrap)

大于 90.0% 为标准。

6. 病毒载量和 CD4⁺T 淋巴细胞分析:采用瑞士 Roche 公司 Amplicor HIV-1 MonitorTM 1.5 病毒载量检测试剂盒和 COBAS Amplicor 分析仪进行病毒载量的分析,检测分析后直接读取结果。CD4⁺T 淋巴细胞计数采用美国 BD 公司 FACSCalibur 型流式细胞仪和 CD4/8/3 三色荧光标记单克隆抗体进行检测,应用 MultiSET 软件分析 CD4⁺T 淋巴细胞数。

结 果

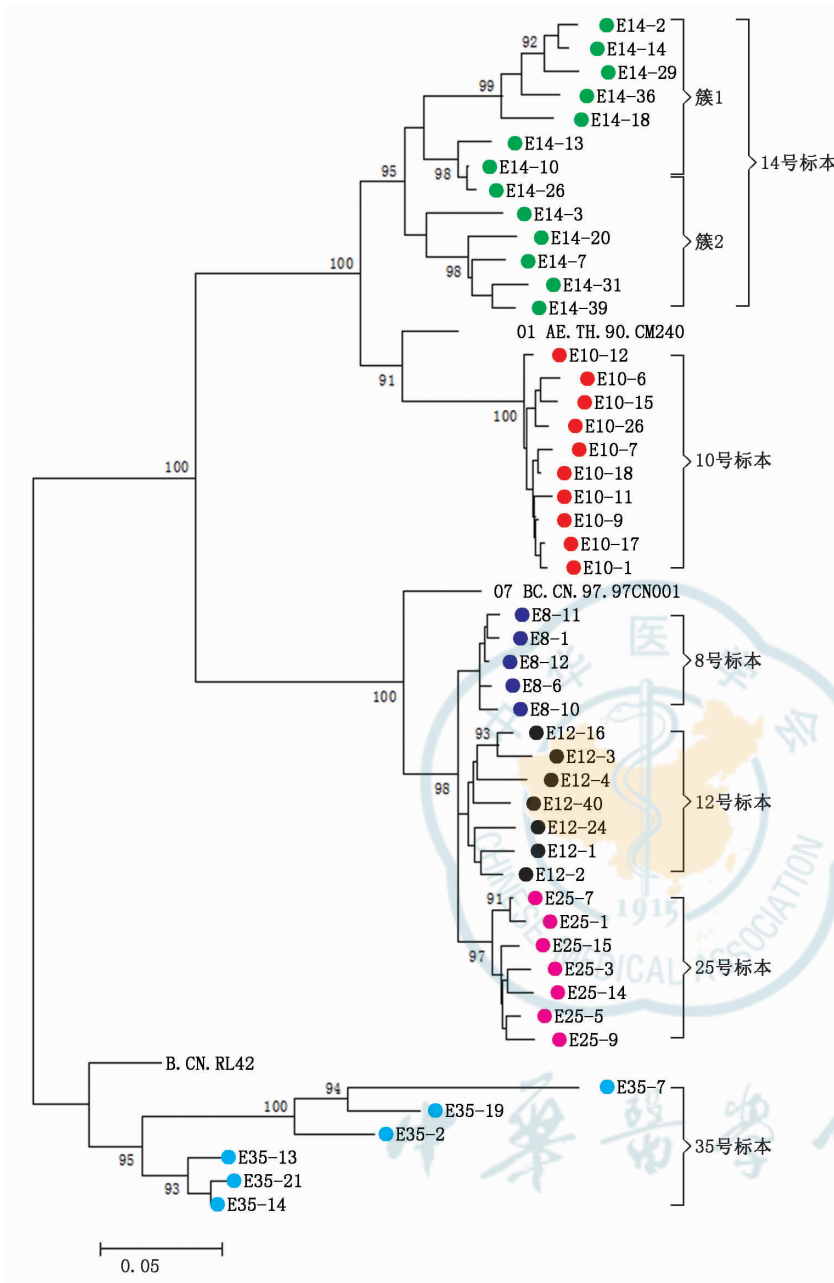
1. 准种进化树模型分析:从图 1 的进化树模型可以看出,同一 HIV 感染者体内出现了多个不同的 HIV 准种基因序列,每一例感染者体内的 HIV 准种序列聚集成簇,且各个簇相对独立。14 号标本的准种基因离散率较大,形成了两个明显的亚簇(subcluster);35 号样本准种基因离散率也较大,35-7 准种株与其他准种株之间的基因距离很大,但还是可以与 35 号样本其他的准种株及中国 B 亚型标准株形成独立的簇。8 号、10 号和 12 号标本准种之间的基因离散率相对较小。

2. HIV 感染者相关检测指标及个体间准种基因距离分析:6 例 HIV 感染者均为男性,病毒载量、CD4⁺T 淋巴细胞计数、亚型、感染时间和个体内准种基因距离见表 1,从表中数据可以看出,个体内 HIV 准种的基因距离与感染时间有正向的关系,感染时间长,准种的基因距离总体上呈增大的趋势;准种的基因距离与病毒载量有反向的关系,这尤其体现在病毒载量最低的 8 号样本与病毒载量最高的 14 号、35 号样本悬殊的基因距离差异上。同时,CD4⁺T 淋巴细胞计数与感染时间也呈明显的反向关系。

讨 论

目前,HIV 分型的方法主要有 DNA 序列测定法、DNA 酶联免疫技术(DNA enzymes immunoassay)、限制性片段长度多态性分析(restriction fragment long polymorphism, RFLP)、基因芯片技术等^[6]。多种逆转录病毒如 HIV、丙型肝炎病毒(HCV)等不但存在亚型,每个感染者体内还存在不同基因序列的准种,以上方法可以分析感染者体内优势病毒株的基因变异,但是不能分析出病毒准种间的差异。

有限稀释法最初是应用于单细胞克隆技术的方法,在 PCR 技术灵敏度达到可以有效进行 SGA 之



标在每一个节点上的是 bootstrap 值,均大于 90.0%;图中不同颜色的圆点,一种颜色代表一个样本,同一种颜色的不同圆点代表来自同一个样本的不同准种序列

图 1 6 株深圳地区 HIV-1 毒株准种进化树模型

的核酸样本,统计学推断样本的稀释终点,然后在稀释终点浓度进行大量扩增(终点稀释法),扩增的阳性率小于 30% 时,扩增出的序列近似于单个基因组序列。有限稀释法测定 HIV 准种序列,提高了基因变异分析的灵敏度,但是该方法需要做大量的巢式 PCR 扩增,容易产生交叉污染,对实验室和操作者的要求条件很高。笔者经过大量的条件摸索,发现样本稀释后直接进行一步法 RT-PCR 扩增的效率较高,优于样本先逆转录然后再稀释进行 PCR 扩增的方法,这种方法在国外也经常使用^[7-8]。

HIV 准种序列的分析对于深入了解 HIV 的基因变异规律很有帮助,已有的研究表明,HIV 准种序列的复杂性与感染时间密切相关,同时也受宿主基因背景的影响^[9]。笔者应用有限稀释法成功地分析出深圳市 HIV 毒株准种序列,结果显示,不同感染者体内 HIV 准种基因距离的差异是很大的,这与感染时间和 CD4⁺ T 淋巴细胞计数的数据大致吻合。同时,笔者发现,准种的基因距离与病毒载量也有很明显的关联,病毒载量在 HIV 急性感染后的大部分时间里是比较稳定的,体现了病毒复制与免疫系统控制病毒复制之间的平衡关系,其高低可能与不同感染者的基因背景有关。理论上,病毒载量高,病毒复制活跃,其准种之间基因距离增加的速率应

后,有限稀释法作为样本处理的步骤被引入病毒准种的 SGA 分析。该方法首先需要扩增几个稀释度

该大于病毒载量低的个体,14 号、35 号样本较高的准种基因距离与较高的病毒载量可以为这个理论提

表 1 HIV 感染者相关检测指标及个体间准种基因距离分析

样本编号	年龄(岁)	传播途径	病毒载量(拷贝/ml)	CD4 ⁺ T 淋巴细胞计数(个/μl)	亚型	感染时间(年)	个体内准种基因距离
8	36	异性	8.38 × 10 ³	640	07_BC	1	0.008
10	60	异性	1.74 × 10 ⁴	364	01_AE	3	0.016
12	11	输血	3.90 × 10 ⁴	439	07_BC	4	0.034
14	32	静脉吸毒	3.95 × 10 ⁵	228	01_AE	6	0.069
25	26	静脉吸毒	7.33 × 10 ⁴	387	07_BC	5	0.021
35	62	非法采供血	3.78 × 10 ⁵	172	B	>10	0.060

供一定的数据支持。

总之,准种序列分析对于深入研究 HIV 基因变异规律很有帮助,可以帮助我们更好地理解 HIV 的免疫逃逸机制,但准种间的基因离散率可能受多个因素影响。本研究所获得的有效准种序列的数量有限,今后需要扩大样本量,尤其是需要扩大长期和急性感染期的样本数量,分析感染时间对准种基因离散率的影响大小。如果能结合病毒载量和 HIV 感染相关基因多态性,则可以更深入地分析 HIV 在感染者体内的基因变异规律及其影响因素。

参 考 文 献

[1] Chohan B, Lavreys L, Rainwater SM, et al. Evidence for frequent reinfection with human immunodeficiency virus type 1 of a different subtype[J]. J Virol, 2005, 79(16):10701-10708.

[2] Jost S, Bernard MC, Kaiser L, et al. A patient with HIV-1 superinfection[J]. N Engl J Med, 2002, 347(10):731-736.

[3] van der Kuyl AC, Kozaczynska K, Ariën KK, et al. Analysis of infectious virus clones from two HIV-1 superinfection cases

suggests that the primary strains have lower fitness [J]. Retrovirology, 2010, 7(60):1-15.

[4] 王晓辉,鲍毅,何太平,等. 深圳市男男性行为人群人类免疫缺陷病毒 1 型流行株的聚集性分析[J]. 中华医院感染杂志, 2011, 21(14):2892-2894.

[5] 刘建礼,孙福军,朱红. HIV 基因亚型检测方法研究进展[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2010, 33(1):64-66.

[6] Aparicio E, Franco S, Parera M, et al. Complexity and catalytic efficiency of hepatitis C virus (HCV) NS3 and NS4A protease quasispecies influences responsiveness to treatment with pegylated interferon plus ribavirin in HCV/HIV-coinfected patients[J]. J Virol, 2011, 85(12):5961-5969.

[7] Demma LJ, Logsdon JM Jr, Vanderford TH, et al. SIVsm quasispecies adaptation to a new simian host[J]. PLoS Pathog, 2005, 1(1):e3.

[8] Eberle J, Gürtler L. HIV types, groups, subtypes and recombinant forms: errors in replication, selection pressure and quasispecies[J]. Intervirology, 2012, 55(2):79-83.

[9] Henn MR, Boutwell CL, Charlebois P, et al. Whole genome deep sequencing of HIV-1 reveals the impact of early minor variants upon immune recognition during acute infection[J]. PLoS Pathog, 2012, 8(3):e1002529.

(收稿日期:2014-02-08)

(本文编辑:陈丽)

· 文献速览 ·

中国北京 2004—2008 年空气污染对寿命损失年的负担: 回顾性回归分析

Guo Y, Li S, Tian Z, et al. The burden of air pollution on years of life lost in Beijing, China, 2004-2008: retrospective regression analysis of daily deaths. BMJ, 2013, 347:f7139.

为了更好的评价空气污染对死亡的负担,我们分析了北京空气污染对寿命损失年(Years of life Lost, YLL)的影响。采用 2004—2008 年间的北京死亡分类管理系统记录的 80 515 个死亡病例(其中 48 802 名男性,31 713 名女性)数据。在调整长期趋势、季节性、星期几效应和天气情况后,分析日空气污染物(PM_{2.5}、PM₁₀、SO₂ 和 NO₂)与每日 YLL 的联系,以及与空气污染相关的死亡风险。

PM_{2.5}、PM₁₀、SO₂ 和 NO₂ 的日平均浓度分别为 105.1 μg/m³、144.6 μg/m³、48.6 μg/m³、64.2 μg/m³。在单污染物模型中,所有的空气污染物都对寿命损失年有明显的影 响。PM_{2.5}、PM₁₀、SO₂ 和 NO₂ 每升高一个四分位数(an interquartile rang, IQR),YL 相应增加 15.8、15.8、16.2 和 15.1 年。空气污染对 YLL 的影响当天出现并且持续两天

(lag 0-1); PM_{2.5} 每升高 IQR 单位对女性每日 YLL 的影响(11.1 年,95%可信区间(CI)4.7~17.5 年)高于男性(4.7 年,95% CI: -2.9~12.3),对 65 岁及以下人群 YLL 的影响(12.0 年,95% CI: 2.9~21)比 65 岁以上的人群(3.8 年,95% CI: -0.9~8.6)更明显。而 PM_{2.5} 每升高 1 个 IQR 对死亡风险的影响,65 岁以上人群的死亡率(2.5%, 95% CI: 0.6%~4.5%)明显高于 65 岁以下的人群(0.7%, 95% CI: 0.8%~2.2%)。YLL 可以为空气污染对死亡影响的研究提供方法学的补充。YLL 的增加与空气污染物的增加有关。本文结果支持降低中国北京的空气污染以保护人群健康。

[该文摘自《英国医学杂志(BMJ)中文版》2014 年第 17 卷第 1 期第 28-32 页]