

• 基础检验研究论著 •

采用半巢式 PCR 技术从临床标本中克隆人类博卡病毒的全基因*

何涛君¹, 王 琼¹, 何 英¹, 黄 烈¹, 张银辉¹, 林广裕^{2△}, 陆学东^{1▲}

(1. 广东医学院附属福田医院检验医学部, 广东深圳 518033;

2. 汕头大学医学院第二附属医院儿科, 广东汕头 515041)

摘要:目的 为了对广东地区流行的人类博卡病毒生物学特性有更加全面的认识, 克隆得到人类博卡病毒全基因, 并与国际流行株进行比对。方法 采用半巢式 PCR 分子生物学技术直接从临床呼吸道标本筛查确认人类博卡病毒感染阳性标本中, 结合博卡病毒的全基因的生物信息学特点, 设计 6 条特异性引物可配对成 5 对, 通过 3 轮半巢式 PCR 方法特异性扩增人类博卡病毒的全基因序列。再将其定向连接到克隆载体中后进行测序, 然后向 GenBank 提交克隆的人类博卡病毒的全基因序列, 最后并对人类博卡病毒全基因的生物信息学分析。结果 成功克隆并向 GenBank 提交了 3 株人类博卡病毒全基因序列, 登录号分别为 GQ926981、GQ926982 和 GQ926983。3 株人类博卡病毒全基因序列与 GenBank 里的序列比对, 高度同源性达 98% 以上, 均属于人类博卡病毒 HBoV1 型。结论 广东地区流行的人类博卡病毒基因与国际流行株基因比对无大的变异, 可为人类博卡病毒相关蛋白的表达工作奠定基础。

关键词:聚合酶链反应; 博卡病毒属; 序列分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)01-0003-03

Half nested PCR cloning human bocavirus complete genome from clinical specimen*

He Taojun¹, Wang Qiong¹, He Ying¹, Huang Lie¹, Zhang Yinwei¹, Lin Guangyu^{2△}, Lu Xuedong^{1▲}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Futian Hospital of the Medical College of Guangdong,

Shenzhen, Guangdong 518033, China; 2. Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital of the Medical College of Shantou University, Shantou, Guangdong 515041, China)

Abstract: Objective To clone human bocavirus complete genome, and then compare to international epidemic strains, in order to more recognize bionomics of epidemic human bocavirus in Guangdong area. **Methods** Clinical specimens were selected screening out human bocavirus infection positive specimens by molecular biology technology, combing with bioinformatics characteristic on human bocavirus complete genome, six specific primers were designed, matched five pairs. After three series half-nested PCR, we can obtain human bocavirus complete gene order. Connecting directional to cloning vector and sequencing, then the complete human bocavirus sequences were submitted to GenBank, and bioinformatics analysis of human bocavirus complete genome was done. **Results** Three strains complete gene sequences were submitted successfully, and the login numbers were GQ926981, GQ926982 and GQ926983 respectively. Compared with the sequences in GeneBank, the high homology above 98%, belonging to HBoV type 1. **Conclusion** There is no conspicuous gene variation between epidemic human bocavirus in Guangdong area and in international epidemic strains. So it is helpful to express human bocavirus associated proteins in next step.

Key words: polymerase chain reaction; bocavirus; sequence analysis

人类博卡病毒(human bocavirus, HBoV)是2005年报道的一种感染人呼吸道的细小病毒,是人支气管炎的一种病原体^[1]。根据感染的物种不同,细小病毒科分为2个亚科:感染鸟类和哺乳动物的细小病毒亚科和感染节肢动物的浓核病毒亚科。细小病毒亚科与浓核病毒亚科之间没有序列同源性。HBoV属于细小病毒亚科博卡病毒属(Bocavirus),发现HBoV之前,细小病毒B19是所知的惟一感染人的细小病毒,属于红病毒属。

在发现该病毒短短一年多的时间里,世界上已有澳大利亚、加拿大、日本等十几个国家报道从呼吸道感染患者标本中检出博卡病毒,随后这些国家对人类博卡病毒进一步深入研究^[2-3]。中国北京、湖南、浙江学者也相继报道从急性呼吸道感染婴幼儿标本中检出该病毒^[4-5],广东地区在2007年报道了首例人类博卡病毒的检出及鉴定^[6]。本研究旨在获得人类博卡病毒的全基因序列,向GenBank提交广东地区地区流行的

人类博卡病毒的全基因序列,为人类博卡病毒相关蛋白的表达工作及后续血清学方面的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 Taq DNA 聚合酶, T₄ 连接酶, DNA Marker DL15000, DNA 回收试剂盒及 PMD-18T 载体购自大连 TaKaRa 生物工程公司;病毒 DNA 提取试剂盒购于美国 QiaGen 公司;离心柱型高纯度质粒小提试剂盒及 DH5 α 菌株购自天根生物科技有限公司。

1.2 患者标本的采集与博卡病毒的筛查 患者的标本均来源于深圳市福田区人民医院儿科和汕头大学医学院第二附属医院儿科 2010 年 3 月至 7 月住院支气管肺炎患儿鼻咽分泌物标本, -80℃ 保存。采用病毒 DNA 提取试剂盒提取病毒的 DNA, 置 -80℃ 保存备用。根据博卡病毒基因的特点, 设计特异性引物采用半巢式 PCR 扩增技术筛出患者标本的博卡病毒阳性株。上述工作本实验室均已顺利完成, 本实验室检出并鉴

* 基金项目:2013 年深圳市医疗卫生类科技计划项目(201303158);2013 年福田区卫生公益性科研项目(FTWS 201310)。作者简介:何涛君,女,主管检验师,主要从事细胞和分子免疫学研究。△ 通讯作者,E-mail:du0077@hotmail.com。▲ 通讯作者,E-mail:luxuedong2004@163.com。

定了广东地区首例人类博卡病毒 GD-1。上述工作的顺利开展为下一步人类博卡病毒全基因的克隆奠定了良好的基础。

1.3 半巢式 PCR 特异性扩增人类博卡病毒的全基因 首先登录 GenBank 获取人类博卡病毒的基因序列,设计 6 条特异性引物配对成 5 对特异性扩增引物,采用半巢式 PCR 法分 3 轮扩增,获得人类博卡病毒的全基因。P1、P2、P3 均为 5'端引物,P4、P5、P6 均为 3'端引物。第 1 轮半巢式 PCR 采用 P1 与 P5 配对,P2 与 P6 配对;第 2 轮半巢式 PCR 采用 P1 与 P4 配对,P3 与 P6 配对;第 3 轮半巢式 PCR 采用 P1 与 P6 配对,用于第二轮半巢式 PCR 后 2 个大片段的拼接。

第 1 轮与第 2 轮半巢式 PCR 的反应体系及程序都一致,不一样的是第 2 轮半巢式 PCR 的模板是第一轮半巢式 PCR 的稀释产物。半巢式 PCR 反应条件:95 ℃ 5 min,94 ℃ 45 s,56 ℃ 45 s,72 ℃ 60 s,35 次循环,72 ℃ 5 min。扩增产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。第 2 轮半巢式 PCR 结束后,得到的 2 个大片段长度分别为 2 453 bp 和 3 157 bp,稀释后同用于第三轮半巢式 PCR 的模板。第 3 轮半巢式 PCR 反应条件:先不加 P1 与 P6 引物,95 ℃ 5 min,94 ℃ 20 s,56 ℃ 30 s,68 ℃ 5 min,5 次循环,68 ℃ 10 min 延伸模板后,再加入 P1 与 P6 引物常规 PCR,20 次循环。最后把第 3 轮的半巢式 PCR 产物直接回收用于构建克隆载体的连接实验。

表 1 人类博卡病毒全基因克隆引物

引物	序列	长度(bp)	位置
P1	GCCGGCAGACATATTGGATTCC	22	1~22
P2	AITGGCGTGGTTACTTCTCATAG	25	2 079~21 03
P3	CTAGCACAGGAGACATCACAC	21	2 141~2 161
P4	CCTCTTTCTGGACTCCCTTTTC	22	2 432~2 453
P5	GGGTGTTCTCTGATGATATGAG	21	2 610~2 630
P6	TGTACAACAACAACATTTAAAAGATA	25	5 273~5 297

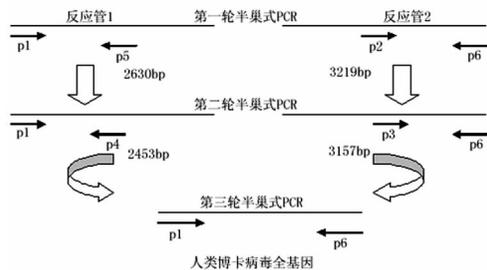


图 1 3 轮半巢式 PCR 扩增人类博卡病毒全基因的步骤图

1.4 构建克隆载体 PMD18-HBoV 并测序 将第 3 轮半巢式 PCR 扩增后的产物,直接从半巢式 PCR 反应体系中回收,准备连接实验。连接体系为:solution 9 μL,回收片断 10 μL,PMD-18T 1 μL 共 20 μL,18 ℃ 连接过夜。然后将连接过夜的产物转化至大肠杆菌 DH5α 菌株中,送往上海生物工程公司测序。

1.5 向 GenBank 提交广东地区流行的人类博卡病毒的全基因序列 将克隆并测序成功的 3 条人类博卡的全基因序列,按照提交序列的相关程序,向 GenBank 提交了 HBoV-GD-571(5 301 bp)、HBoV-GD-594(5 302 bp)和 HBoV-GD-621(5 299 bp),对应的 GenBank 登录号为:GQ926981、GQ926982 和 GQ926983,均属于人类博卡病毒 HBoV1 型。

1.6 人类博卡病毒全基因进化分析 将 HBoV-GD-571、HBoV-GD-594 和 HBoV-GD-621 的全基因序列与基因库中的序列进行比对,并在线进行进化树分析。

1.7 人类博卡病毒衣壳蛋白 VP1 的比对分析 将 HBoV-GD-571、HBoV-GD-594 和 HBoV-GD-621 对应的 VP1 蛋白序列与蛋白库中的序列进行比对,并在线进行分析。

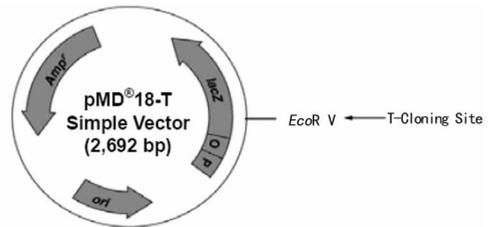
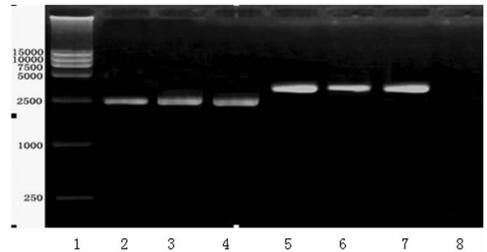


图 2 克隆载体 PMD18-T 的质粒图谱

2 结 果

2.1 半巢式 PCR 特异性扩增人类博卡病毒基因的 2 个大片段 采用半巢式 PCR 技术,设计特异性引物,通过两轮半巢式 PCR 可以获得人类博卡病毒的 2 个大片段大小为 2 453 bp 和 3 157 bp(结果见图 3),为扩增人类博卡病毒的全基因奠定了基础。



1. DNA Marker DL15000;2. 半巢式 PCR 扩增产物(HBoV-GD-571 by P1&P4);3. 半巢式 PCR 扩增产物(HBoV-GD-594 by P1&P4);4. 半巢式 PCR 扩增产物(HBoV-GD-621 by P1&P4);5. 半巢式 PCR 扩增产物(HBoV-GD-571 by P3&P6);6. 半巢式 PCR 扩增产物(HBoV-GD-594 by P3&P6);7. 半巢式 PCR 扩增产物(HBoV-GD-621 by P3&P6);8. 阴性对照 (without template)。

图 3 半巢式 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

2.2 人类博卡病毒全基因进化分析 目前在不同国家检出的 HBoV 核苷酸序列都表现出高度的一致性,似乎表明人类博卡病毒是一种高度保守的病毒。从 3 株广东地区的人类博卡病毒全基因序列与基因库里的序列比对,我们可以得出:3 株人类博卡病毒全基因序列均属于人类博卡病毒 HBoV1 型;HBoV-GD-594 与 WLL-1、WLL-2 和 WLL-3 有亲缘关系;HBoV-GD-621 与 HK-23 有亲缘关系;HBoV-GD-571 与 BJ3064 及 BJ3722 有亲缘关系。进化比对关系如图 4 所示。

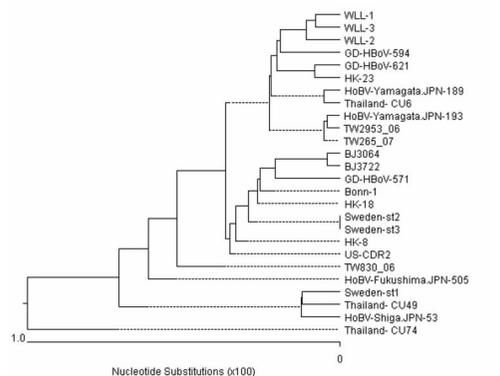


图 4 HBoV-GD-571、HBoV-GD-594 和 HBoV-GD-621 与基因库里的序列比对进化树

2.3 人类博卡病毒衣壳蛋白 VP1 的比对分析 选择 HBoV-GD-571、HBoV-GD-594 和 HBoV-GD-621 的 VP1 基因对应的蛋白部分,与蛋白库里的序列进行比对分析,发现 HBoV-GD-571 发生了 2 处氨基酸序列的改变,分别是 284 号位的 U 变成了 I 和 326 号位的 N 变成了 S。而另外两株的相应蛋白序列

与 WLL 株、BJ 株和 HK 株都高度同源,没有发生氨基酸序列的改变。同样的方法可以比对 3 株广东地区人类博卡病毒的全基因序列的 NP 和 NS 蛋白部分。因此,在后续的人类博卡病毒蛋白的表达工作中,优先选择 HBov-GD-594 和 HBov-GD-621 为模板株进行表达。

3 讨论

呼吸道病毒感染病原学十分复杂,目前报道在儿童急性呼吸道感染性疾病中,病毒感染主要病原为呼吸道合胞病毒、流感及副流感病毒、人鼻病毒、腺病毒、人偏肺病毒和冠状病毒等。还有一部分儿童的急性呼吸道感染,虽然认为是由病毒感染引起,但是其病原并未被阐明^[7-8]。人类博卡病毒是 2005 年瑞典学者 Allander 等^[1]采用随机半巢式 PCR 扩增,测序并结合生物信息学方法对儿童急性呼吸道感染样本进行大规模筛查而发现的一种新的细小病毒。

HBov 感染多见于婴幼儿,一年四季均可发生,以冬春季节为主,但不同国家报道的季节特征有所不同。HBov 的感染主要引起儿童肺炎、支气管炎等,同时部分伴随上呼吸道感染^[9-10]。值得注意的是,美国关于 HBov 感染的报道中约有 7.1% 的患者伴随有腹泻症状。最新的研究报道在腹泻患者的粪便中可以检测到人类博卡病毒,粪便中检测出的高浓度人类博卡病毒和星形病毒表明 HBov 是一种引起肠道疾病的病原菌,正如人类博卡病毒是一种引起呼吸道疾病的病原体一样^[11-12]。

为了对人类博卡病毒全面的认识,了解广东地区流行的人类博卡病毒株的生物学特点。笔者首先从临床呼吸道感染的标本中筛选出人类博卡病毒感染的阳性株,然后设计特异性引物 6 条配成 5 对,采用半巢式方法通过 3 轮半巢式 PCR 扩增出人类博卡病毒的全基因序列,向 GenBank 提交克隆的全基因序列获得基因登录号分别为 GQ926981、GQ926982 和 GQ926983,均属于人类博卡病毒 HBov1 型。最后对全基因序列及相应的蛋白序列的在线比对分析:不同国家检出的 HBov 核苷酸序列都表现出高度的一致性,表明人类博卡病毒是一种高度保守的病毒,而 HBov-GD-571 发生了部分氨基酸序列的改变,在后续的人类博卡病毒相关蛋白的表达工作中,我们优先选择 HBov-GD-594 和 HBov-GD-621 为模板株进行表达。随着测序工作的顺利完成,对人类博卡病毒的研究很快由病毒的筛选和基因组测序转向病毒蛋白组学等后基因组学

的研究。

参考文献

- [1] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 12891-12896.
- [2] Ma X, Endo R, Ishiguro N, et al. Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(10): 1132-1134.
- [3] Nawaz S, Allen DJ, Alandin F, et al. Human bocaviruses are not significantly associated with gastroenteritis; results of retesting archive DNA from a case control study in the UK [J]. PLoS One, 2012, 7(3): 413-426.
- [4] Guo L, Wang Y, Zhou H, et al. Differential seroprevalence of human bocavirus species 1-4 in Beijing, China [J]. PLoS One, 2012, 7(2): 396-404.
- [5] Khamrin P, Thongprachum A, Shimizu H, et al. Detection of human bocavirus 1 and 2 from children with acute gastroenteritis in Japan [J]. J Med Virol, 2012, 84(6): 901-905.
- [6] 陆学东, 林广裕, 周仁彬, 等. 广东地区首例人类博卡病毒的检出及鉴定 [J]. 中华传染病杂志, 2008, 26(5): 614-616.
- [7] Schildgen O, Qiu J, Soderlund-Venermo M. Genomic features of the human bocaviruses [J]. Future Virol, 2012, 7(1): 31-39.
- [8] Li J, Sun B, Ouyang J, et al. Genome cloning of human bocavirus and analysis of viral promoter activity [J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2011, 27(6): 909-916.
- [9] Kim JS, Lim CS, Kim YK, et al. Human bocavirus in patients with respiratory tract infection [J]. Korean J Lab Med, 2011, 31(3): 178-184.
- [10] Zeng S, Wang D, Fang L, et al. Complete coding sequences and phylogenetic analysis of porcine bocavirus [J]. J Gen Virol, 2011, 92(4): 784-788.
- [11] Chiochansin T, Simmonds P, Poovoraman Y. Determination and analysis of complete coding sequence regions of new discovered human bocavirus types 2 and 3 [J]. Arch Virol, 2010, 155(12): 2023-2028.
- [12] Lin F, Teng LF, Zheng MY, et al. Isolation and cell culture of human bocavirus by human bronchial epithelial cell lines [J]. Zhonghua Lin Chuang Bing Xue Za Zhi, 2009, 23(6): 427-429.

(收稿日期: 2013-10-25)

(上接第 2 页)

参考文献

- [1] 郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术 [M]. 北京: 三峡出版社, 1997: 143-144.
- [2] 杜丽娟, 王世光, 张立, 等. 两种方法纯化流感病毒的比较 [J]. 生物制品学杂志, 2007, 20(3): 216-215
- [3] OPits L, Hohlweg J, Reichl U, et al. Purification of cell culture-derived Influenza virus. A/ Puerto Riego / 8 / 34 by membrane-based immobilized. Metal affinity chromatography [J]. J Virolog Meth, 2009, 161(2): 312-316
- [4] 杨立清, 张晋, 卢立新, 等. 蔗糖梯度离心法纯化 Vero 细胞乙脑疫苗的纯度分析及层析法的比较 [J]. 微生物学免疫学进展, 2004, 32(4): 11-13.
- [5] Chikara Aizawa, Shigeo Hasegawa, Cheng Chih-yuan, et al. Large-scale purification of Japanese encephalitis virus from infected mouse brain for preparation of vaccine [J]. Appl Environ Microbiol, 1980, 39(1): 54-57.
- [6] 何锡忠, 王英, 蒋凤英, 等. PEG-6000 浓缩圆环病毒 2 型的研究 [J]. 上海农业学报, 2008, 2(1): 42-44.
- [7] Hanquet G, VanDamme P, Brasseur D, et al. Lessons learnt

- from pandemic A(H1N1) 2009 influenza vaccination. Highlights of a European workshop in Brussels (22 March 2010) [J]. Vaccine, 2011, 29(3): 370-377.
- [8] 曾祥兴, 李康生. 流感百年: 20 世纪流感大流行的回顾与启示 [J]. 医学与社会, 2010, 23(1): 4-6.
- [9] Mendelman PM, Cordova J, Cho I. Safety, efficacy and effectiveness of the influenza virus vaccine, trivalent, types A and B, live cold adapted (CAIV-T) in healthy children and healthy adults [J]. Vaccine, 2001, 19(17/19): 2221-2226.
- [10] World Health Organization. Use of cell lines for the production of influenza virus vaccines: An appraisal of technical, manufacturing, and regulatory considerations [J]. Initiative Vaccine Res, 2007, 12(1): 1-12.
- [11] 陈丽君, 王英, 胡建华, 等. 应用等密度梯度离心法提纯传染性支气管炎病毒 [J]. 上海农业学报, 1998, 14(3): 93-95.
- [12] Pyke AT, Phillips DA, Chuan TF, et al. Sucrose density gradient centrifugation and cross-flow filtration methods for the production of arbovirus antigens inactivated by binary ethyleneimine [J]. BMC Microbiol, 2004, 144(1): 3.

(收稿日期: 2013-08-09)