

用邻位相连法方法确定 HIV-1M 组基因分型的最佳区域*

聂 滨, 欧阳龙, 雷开健, 逯心敏

(宜宾市第二人民医院, 四川宜宾 644000)

摘要:目的 为进一步确定 HIV-1M 组基因分型的最佳区域。方法 从 Genbank 中筛选出对各成熟肽区域有注释来源, 来自于不同国家地区的 104 条 HIV-1M 组全基因组序列。对序列的结构区域 gag 区、pol 区、env 区及 env 的亚区域 gp41 和 gp120 分别建邻位相连(NJ)系统进化树。结果 pol 区未能把 D 亚型和 B 亚型分开; gag 区未把 K 亚型和 F 亚型分开; env 区能对 HIV-1M 组正确分型; env 的亚区域 gp41 未能把 K 亚型与 H 和 F 亚型分开, J 亚型未与 A 亚型分开。env 的亚区域 gp120 未能把 J 亚型与 A1 亚型分开。结论 用 NJ 系统进化树方法确定 env 区最能代表 HIV-1M 全基因组序列进行分型。

关键词: HIV; 基因分型; 邻位相连法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)04-0463-02

Determine the best genotyping area of the HIV-1M group with NJ*

Nie Bin, Ouyang Long, Lei Kaijian, Lu Xinmin

(The Second People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan 644000, China)

Abstract: Objective To determine the best genotyping area of the HIV-1M group. **Methods** 104 complete genome sequences of HIV-1M group that had been given the annotation about every region and derived from different country were downloaded from Cenbank. Phylogenetic trees on gag region, pol region, env region, gp41 region and gp120 region were established by neighbor-joining method. **Results** The env region was the best region instead of the complete genome sequence. **Conclusion** We have found that the best genotyping region of HIV-1M group was env region sequences using bioinformatics.

Key words: HIV; genotype; neighbor joining method

HIV 基因分型在 HIV 的分子流行病学调查、疫苗研制、诊断及其临床药物治疗等方面均有重要作用^[1]。目前 HIV 基因亚型的分型方法有多种, 最准确的是全基因组测序, 但对其仪器要求高, 且费用较高, 在临床上难以普及。文献[2-5]报道了使用不同亚区域测序分型代替全基因组分型, 但在这些文献中未能阐述该测序区域是否能代替全基因组测序进行分型, 分型结果受到质疑。笔者对 HIV-1M 组基因结构区域 gag 区, pol 区, env 区以及 env 的亚区域 gp41 和 gp120 分别用邻位相连(NJ)法建系统进化树。希望筛选出最能替代全基因组分型的片段, 为简化测序法分型 HIV 提供理论依据。

1 材料与方 法

从 Genbank 中筛选出 104 条^[6]对各成熟肽区域有注释、来源于不同国家地区的 HIV-1M 组全基因组序列的接受号和基因型。根据注释分别选取全基因组序列的 gag 区, pol 区, env 区以及 env 的亚区域 gp41 和 gp120 的基因序列, 用 MEGA5.0 进行比对, 并用 MEGA5.0 NJ 法(Kimura-2-parameter 模型, Bootstrap 重复抽样 1 000 次)构建系统进化树^[6]。

2 结 果

用 MEGA5.0 NJ 法对 env、gag、pol 进行建树分型, pol 区建树中, D 亚型和 H 亚型没能与 B 亚型分开; K 亚型和 F 亚型未分开; AC 和 AE 位于 A 组中; BC 位于 C 组。gag 区未把 K 亚型和 F 亚型分开; AG 和 AE 位于 A 组中; BC 位于 C 组。env 区能对 HIV-1M 组正确分型, AG 和 AE 与 A 组单独分开; BC 位于 C 组^[6]。

用 MEGA5.0 NJ 法对 gp120 区系统进化树构建, J 亚型未与 A1 亚型(DQ396400)分开, 见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

用 MEGA5.0 NJ 法对 gp41 区系统进化树构建, BC 亚型位于 C 亚型中, K 亚型(AJ249253)未与 H 亚型分开, K 亚型(AJ249239)未与 F 亚型分开, J 亚型(AF082395)未与 A 亚型分开, 见附图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

不同亚型的 HIV 生物学特征及分子流行病学特征不同, 且 HIV 高度变异, 正确分型对于 HIV 的诊断、治疗, 以及疫苗研制都有重要的意义。由于 HIV-1 N 组、O 组和 HIV-2 型只局限在非洲某些局部地区流行, 而 HIV-1M 组在全世界范围内广泛流行, 对人类健康构成的威胁较严重, 笔者从 Genbank 中筛选出对各成熟肽区域有注释来源, 对来自于不同国家地区的 104 条 HIV-1M 组全基因组序列进行建树分型。建树分型的方法有最大简约性(MP)法、最大可能性(ML)法和邻位相连(NJ), 均能用于 HIV-1M 组分型研究, 但 NJ 法更为简便快捷^[7]。笔者对 HIV-1M 组的结构基因 gag、pol、env 进行分型研究, 发现 env 区能代替全基因组进行分型; 而 pol 区不能把 D、H 亚型与 B 亚型分开; 不能把 K 亚型与 F 亚型分开; gag 区未能把 K 亚型与 F 亚型分开。叶景荣等^[4]曾建立一种简便、快速基因分型方法, 对北京 HIV-1 病毒株 gag 基因区进行亚型鉴定, 如果研究结果中有 K 亚型(下转第 466 页)

* 基金项目: 宜宾市科技局基金项目(200903006; 2011SF007)。

作者简介: 聂滨, 男, 副主任检验技师, 主要从事分子诊断学的研究。

研究结果就显示：“小三阳”组中 HBV DNA 的阳性检出率仍高达 39.57%，表明许多“小三阳”患者体内 HBV 复制水平较高，仍具备较强的传染性，究其原因，可能与 HBV 易于突变引起的 e 抗原表达停止有关^[15]。因此，联合定量与血清标志物结果能够更准确地评价乙型肝炎患者的病情。

乙型肝炎病毒 DNA 是最直接反映 HBV 存在的指标，它也能可靠地反映病毒的复制状况和传染性强弱，对其动态监测的结果可提示治疗效果的好坏、是否产生耐药性，进而指导临床合理使用抗病毒药物。在我国这样一个 HBV 感染高发的国家，采用实时荧光定量 PCR 进行 HBV DNA 的检测对于 HBV 的感染和治疗监测有不可替代的作用。

参考文献

[1] Memon MR, Shaikh AA, Soomro AA, et al. Frequency of hepatitis B and C in patients undergoing elective surgery[J]. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2010, 22(2):167-170.

[2] Shi M, Zhang Y, Zhu YH, et al. Comparison of real-time polymerase chain reaction with the COBAS Amplicor test for quantitation of hepatitis B virus DNA in serum samples[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(3):479-483.

[3] 曹亦军. HBV-DNA 荧光定量 PCR 检测的临床意义[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2005, 26(11):1279-1280.

[4] 中华医学会肝病分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(12):881-891.

[5] Cabezas-Fernandez M, Cabeza-Barrera M. Introduction of an automated system for the diagnosis and quantification of hepatitis B and hepatitis C viruses[J]. Open Virol J, 2012, 6(1):122-134.

[6] 李金明. 聚合酶链反应临床应用的优越性和局限性[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(3):225-227.

[7] Payungporn S, Tangkijvanich P, Jantaradsamee P, et al. Simulta-

neous quantitation and genotyping of hepatitis B virus by real-time PCR and melting curve analysis[J]. J Virol Methods, 2004, 120(2):131-140.

[8] Henry LC, Nancy WL, Tracy CL, et al. Comparison of three different sensitive assays for hepatitis B virus DNA in monitoring of responses to antiviral therapy[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(9):3205-3208.

[9] Hui CK, Bowden S, Zhang HY, et al. Comparison of real-time PCR assays for monitoring serum hepatitis B virus DNA levels during antiviral therapy[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8):2983-2987.

[10] Sum SS, Wong DK, Yuen JC, et al. Comparison of the COBAS TaqMan HBV test with the COBAS Amplicor monitor test for measurement of hepatitis B virus DNA in serum[J]. J Med Virol, 2005, 77(4):486-490.

[11] 王宇萍, 蒋建东. Real-time PCR 检测 HBV DNA 的方法学[J]. 临床医学与护理学, 2010, 8(29):93-95.

[12] 李美忠, 王敏, 乐晓华, 等. 四种 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂比较及其结果分析[J]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2008, 2(1):7-12.

[13] 赵清, 许颂霄, 袁军, 等. 一种快速检测 HBV 基因的荧光定量 PCR 法的建立[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(4):244-246.

[14] Gish R, Jia JD, Locarnini S, et al. Selection of chronic hepatitis B therapy with high barrier to resistance[J]. Lancet Infect Dis, 2012, 12(4):341-353.

[15] Maylin S, Boyd A, Martinot-Peignoux M, et al. Quantification of hepatitis B e antigen between Elecsys HBeAg and Architect HBeAg assays among patients infected with hepatitis B virus[J]. J Clin Virol, 2013, 56(4):306-311.

(收稿日期:2013-11-05)

(上接第 463 页)

和 F 亚型,分型结论就有待全基因组测序证实。env 区域分为 gp41 与 gp120 两部分,本研究进一步提取出从 Genbank 中找出 104 条 HIV-1M 组全基因序列的 gp41 与 gp120 区域,通过 MEGA5.0 进行比对,建 NJ 系统进化树之后发现 gp120 区域未能把 J 亚型与 A1 亚型分开;GP41 区域未能把 K 亚型与 H 和 F 亚型分开,J 亚型未能与 A 亚型分开。宋丹等^[2]应用逆转录及套式 PCR 方法扩增 HIV-1 gp41 基因并进行测序,然后应用 MEGA3.1 软件构建系统进化树进行分型。如果分型存在 K、H、F、J 和 A 亚型,分型结论就有待全基因组测序证实。

本研究从生物信息学的角度应用 NJ 方法进行大样本序列建树分析,比较了 HIV 病毒结构基因 gag、env、pol、gp41、gp120 区域的基因分型结果,发现 pol 区没能把 D 亚型和 B 亚型分开;gag 区未把 K 亚型和 F 亚型分开;env 区能对 HIV-1M 组正确分型。而 env 的亚区域 gp41 和 gp120 也不能对 HIV-1M 组正确分型。env 为 HIV-1M 组正确分型的推荐区域,如果使用其他区域进行分型,部分亚型仍需要全基因组测序证实。

参考文献

[1] 何浩岚,何金洋,蔡卫平,等. HIV-1 亚型分子流行病学研究进展

[J]. 传染病信息, 2010, 23(6):369-371.

[2] 宋丹, 孙国清, 张艳敏, 等. 郑州市男同性恋中 HIV-1 gp41 基因亚型分析[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(8):728-731.

[3] 宋丹, 孙国清, 张艳敏, 等. 河南郑州市男男同性恋 HIV-1 感染者 gag 区基因亚型分析[J]. 病毒学报, 2012, 28(04):345-350.

[4] 叶景荣, 郭蕾, 白立石, 等. 北京市性传播 HIV-1 感染者流行毒株 gag 基因序列测定和亚型分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(2):136-139.

[5] 杨坤, 鲍作义, 李韩平, 等. 河南省 HIV-1 流行毒株 pol 基因的分型与系统发生分析[J]. 中国艾滋病性病, 2005, 11(3):165-167.

[6] 聂滨, 唐昌伟, 逯心敏, 等. 用生物信息学方法确定 HIV-1M 组基因分型的最佳区域[J]. 四川医学, 2011, 32(2):159-160.

[7] 聂滨, 唐昌伟, 逯心敏, 等. 用 ENV 区确定 HIV-1M 组基因分型最佳建树方法[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(2):134-138.

(收稿日期:2013-11-03)