技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)07-0926-04

核苷酸序列测定法定量评价病毒相对适合度

赵 耀,赵晓东

(重庆医科大学附属儿童医院 P2 实验室,重庆 400014)

【摘 要】目的:评价核苷酸序列测定法定量检测病毒相对适合度的可靠性。方法:用 RT-PCR 法扩增此前筛选获得的 Palivizumab 逃逸株 F 基因片断(分别于 F 基因第 816 位和 828 位带有区别于原型株的遗传标志)。RT-PCR 产物经纯化、定量并调节至相同浓度,按不同比例混合后进行核苷酸序列测定。用 ABI 公司 EDIT 软件分析序列双峰部位不同 RT-PCR 产物所占比例,代表病毒适合度水平,用分子克隆法定量验证序列分析定量评估病毒相对适合度的可靠性。结果:按不同比例预混得 RSV A2 原型株和 Palivizumab 逃逸株(MP4 和 F212)分别在 F 基因第 816 位和 828 位出现双峰。峰高测定所获 RT-PCR 产物比例与预混比例十分接近。采用分子克隆法获得的 RT-PCR 产物比例亦与序列测定定量分析结果基本一致。结论:序列测定定量分析法评估病毒相对适合度(Relative fitness)结果稳定可靠,简便易行,适用于临床检测 HIV 等病毒感染性疾病耐药毒株是否出现及其适合度变化。

【关键词】呼吸道合胞病毒;适合度;检测手段;核苷酸序列测定

【中国图书分类法分类号】R373.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-06

Quantitative evaluation of viral fitness by nucleotide sequence determination

ZHAO Yao, et al

(*P2lab, Children's Hospital of Chongqing Medicial University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate reproductivity of nucleotide sequencing for quantitative determination of viral fitness. *Methods*: F gene fragments from respiratory syncytial virus (RSV) A2 strain, palivizumab escape mutants, F212 and MP4, were amplified by RT-PCR, gel purified, quantified by spectrophotometry and adjusted to same concentration. A2, F212 and MP4 RT-PCR products were mixed at different ratios and determined for nucleotide sequence. Electropherograms at sites with ambiguity were visually measured by using ABI EDIT software. Proportion of RT-PCR products from prototype virus or escape mutants represented viral fitness level. Molecular cloning was utilized to validate input ratios of RT-PCR products. *Results*: Dual peaks were seen at 816 and 828 positions in the F gene for A2/F212 and A2/MP4 mixtures, respectively. Proportion of prototype virus and escape mutants were gained by measuring the heights of dual peaks. Measured ratios were similar to premixed ratios which were confirmed by molecular cloning. *Conclusion*: Nucleotide sequencing is reliable, easy assay for evaluation of viral fitness and practical for screening escape mutants and viral fitness in viral infections, such as HIV infection.

【Key words】Respiratory syncytial virus; Fitness; Assay; Nucleotide sequence determination

由于 RNA 病毒的复制依赖 RNA 聚合酶,而 RNA 聚合酶缺乏序列证实和修正功能,所有 RNA 病毒均以准种(Quasispecies)形式存在,其序列相关又高度异质[1]。准种内的某一病毒株能否在特定环境中获得生长优势取决于该病毒株的适合度(Fitness),即病毒在特定环境中的生长复制能力[2,3]。病毒的适合度与临床密切相关,病毒感染性疾病的发病和复发、病毒的组织嗜性、耐药毒株形成、病毒对治疗的反应等问题均取决于适合度的水平[4~8]。因此,病毒适合度已成为广受关注的前沿问题。

评价病毒适合度最常用的指标是相对适合度。将待评定适合度的病毒克隆和一个参照克隆按已知比例混合,连续传代,在不同时间点检测待评克隆与参照克隆的比例即获得待评病毒克隆的相对适合度[1]。因此,采用定量检测手段获得准确的待评克隆和参照克隆的构成比是相对适合度评价的核

作者介绍:赵 耀(1979-),男,助理研究员,硕士,研究方向:病毒感染与免疫。

通讯作者:赵晓东,男,教授,E-mail:zhaoxd530@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金(30471839,30800972)。

心问题。既往大多采用生物学方法鉴别两克隆，在此我们采用自行筛选获得的呼吸道合胞病毒（Respiratory syncytial virus，RSV）逃逸株和原型株，评价核苷酸序列测定法定量检测病毒相对适合度的可靠性。

1 材料与方法

1.1 原型株、逃逸株 RSV 及其遗传学标志

RSV 原型株 A2 为本实验室常规传代病毒。将 RSV A2 在针对 RSV F 蛋白单克隆抗体 -Palivizumab（PZ）存在的 HEp-2 细胞培养系统中连续传代，获得两株 PZ 逃逸株（F212 和 MP4）[9,10]。通过 F 基因全长序列测定发现，与原型株 A2 相比，F212 在第 816 位核苷酸发生突变（A-T），而 MP4 在第 828 位核苷酸发生突变（A-T），为混合病毒构成比分析提供了明确的遗传标志。

1.2 RSVF 基因 RT-PCR 扩增

采用 F 基因内引物（F622 For 5'-GTTACCTATTGTGAA-CAAGC-3'，F1225 Rev 5'-GCTGCTTACATCTGTTTTTG-3'），通过 RT-PCR 法扩增 RSV A2，F212 或 MP4 F 基因片断，片断长 603 bp，第 816 和 828 位核苷酸位于片断中部。

1.3 RT-PCR 混合、核苷酸序列测定及构成比定量分析

将上述 A2、F212 和 MP4 RT-PCR 产物用 Quickspin（Qiagen）凝胶纯化试剂盒纯化，核酸蛋白定量仪定量并调至相同浓度，按不同比例（A2:F212=0:100，25:75，50:50，75:25，100:0；A2:MP4=0:100，25:75，50:50，75:25，100:0）混合，用引物 F212For 在 ABI3100 自动测序仪上进行核苷酸序列测定并获得序列图谱。A2:F212 混合物图谱于 F 基因第 816 位核苷酸处显示 A（绿色峰，代表 A2）及 T（红色峰，代表 F212）两种信号，A2:MP4 则于 F 基因第 828 位核苷酸处显示 A（绿色峰，代表 A2）和 T（红色峰，代表 MP4）两种信号。用 ABI 公司 EDIT 软件，如图 1 所示测得相应位置 A 或 T 峰高，逃逸株 RT-PCR 产物所占比例由下式计算获得。逃逸株比例%=（T/A+T）× 100%。图 1 所示为测序图谱上显示的核酸序列数据。在我们的兴趣位点（即核苷酸中部），每个核苷酸的相对数目通过 ABI 公司的 Factura analysis 软件进行分析。A 或 T 的高度使用 ABI 公司的 EDIT 软件分析，F212 或 MP4 的相对比例分别 A、T 的高度来表示。

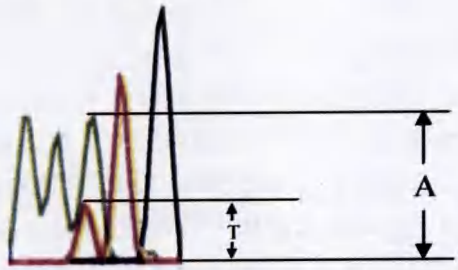


图 1 通过核苷酸序列测定定量分析法对构成比分析

1.4 RT-PCR 产物克隆及定量分析

采用 Invitrogen 公司 TOPOTM TA 克隆试剂盒（Cat# K4500-01），将上述不同比例混合的 A2:F212 或 A2:MP4 RT-PCR 产物克隆入质粒载体，转化大肠杆菌 DH5α，每一种混合比例随机挑取 20 个菌落作为模板，用引物 F622For 和 F1225Rev 扩增 F 基因片断，用自动序列测定仪测定其核苷酸序列。根据 F 基因第 816 位或 828 位遗传标志，判断其为 A2、F212 或 MP4，计算构成比并与前述序列定量测定法所获结果对比，评价其可靠性。

2 结果与分析

2.1 不同比例预混的 A2/F212 或 A2/MP4 RT-PCR 产物序列实测值

如图 2 所示：野生型（A2）和突变型（F212 或 MP4）的 RT-PCR 产物，通过核酸定量检测将产物的 DNA 浓度调整一致后，以不同比例将其混合（即为输入比率，A2：突变型），混合物通过核苷酸序列测定来确定。在核苷酸差异位点上，每个碱基的相对数量通过美国 ABI 公司的 Factura 分析软件进行。上半部的图为核苷酸的 814~818 位点测序图谱，黑色实心小三角标识为 268 位点，相对数量 A（绿色，来自 A2 株），T（红色，来自突变型 F212）进行对照。下半部的图为核苷酸的 826~830 位点测序图谱，黑色实心小三角标识为 272 位点，相对数量 A（绿色，来自 A2 株）、T（红色，来自 MP4 株）进行对照。

A2/F212 混合物中，于 F 基因第 816 位出现双峰，按 A2:F212=0:100，25:75，50:50，75:25，100:0 比例混合的 RT-PCR 产物通过序列测定及定量分析所获得的实测比例分别为 0/100，13/87，28/72，50/50，74/26，92/8 和 100/0。A2/MP4 混合物中，按 A2:MP4=0:100，25:75，50:50，75:25，100:0 比例混合的 RT-PCR 产物实测比例分别为 0/100，9/91，27/73，46/54，78/22，88/12，100/0。两体系中预混比例与实测比例十分接近，说明通过序列测定定量分析法可较为准确地获取不同 RT-PCR 产物的相对数量。

2.2 分子克隆法验证预混 RT-PCR 产物的相对数量

为进一步明确预混比例正确及序列测定定量分析法的可靠性，我们将相同的 RT-PCR 混合物克隆入 TA 质粒载体，随机挑取 20 个菌落再行 PCR 并测定其序列，明确其为 A2、F212 或 MP4 产物并计算其所占比例。如表 1 所示，通过分子克隆测得的 RT-PCR 产物相对比例与通过序列定量分析法

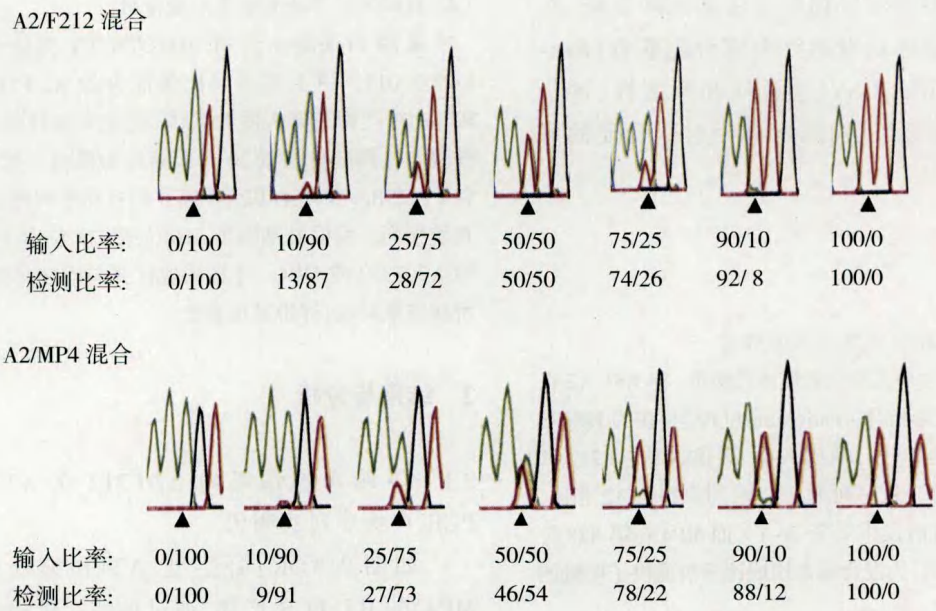


图 2　通过分析混合群体中 RT-PCR 产物核苷酸序列的相对比率进行实测

表 1　通过分子克隆验证序列测定定量分析法

输入比率	克隆数		分子克隆法测定的比率	序列测定法测定的比率
	野生型 (A2)	突变型(F212 or MP4)		
A2/F212				
0/100	0	20	0/100	0/100
25/75	6	14	30/70	28/72
50/50	11	9	55/45	50/50
75/25	14	6	70/30	74/26
100/0	19	1	95/5	100/0
A2/MP4				
0/100	1	19	5/95	0/100
25/75	4	16	20/80	27/73
50/50	10	10	50/50	46/54
75/25	16	4	80/20	78/22
100/0	20	0	100/0	100/0

所获得的结果相近，进一步证实序列测定定量分析的可靠性。

3　讨　论

RNA 病毒是人类主要的病员体之一，20 世纪 80 年代后开始的艾滋病疫情更给人类健康带来巨大威胁。由于 RNA 聚合酶和逆转录酶缺乏严密的自我校正功能，因而具有高突变率，即使最新克隆出的病毒种群（Populations），也可能是由一个或多个位点不同、但基因组序列相近的病毒所组成的混合群体[1]。RNA 病毒种群高度异质，形成由相关基因组构成的动态突变种群即为病毒准种[1]。正是由于病毒准种的存在，使得病毒种群能够在机体免疫能力、抗病毒药物的选择压力下复制、变异和生存。以 HIV 感染为例，病毒在体内的复制水平与临床发展过程密切相关，治疗后病毒耐药毒株是否出现及导致临床后果取决于其适合度[11]。因此，应用快速、准确的检测手段动态监测体内病毒株（尤其是耐药毒株）复制情况对病毒感染性疾病的防治具有重大意

义。

病毒适合度代表病毒在特定环境中的生长复制能力,病毒的适合度越高,其在同一环境中的生长复制能力越强,越容易获得生长优势并成为准种中的优势毒株。但由于在病毒自然宿主生物体(例如人类)进行病毒适合度的直接测定是相当困难且不准确的,以至于许多复杂的生物学现象、基础概念的建立需要一个简单模型系统来测定相对数值。因此通常采用相对适合度代表病毒适合度水平,将药物或抗体筛选获得逃逸株按一定比例与原型株混合,在同一环境(体内或体外)连续传代,计算出病毒株分别相对于起始混合物的量化比例[1]。

病毒适合度与病毒的生物学行为和对宿主的损害密切相关,准确评估病毒的适合度,特别是体内的适合度变化对病毒感染性疾病的治疗和预后判断具有重要意义。目前对于病毒相对适合度的评价多采用生物学的方法[12~17],如采用药物抵抗株的抗性特点鉴别野生株和抗性株等。而本文提供了另一种新的定量评价病毒相对适合度方法,即核苷酸序列测定法,并以分子克隆法为对照。通过我们的试验可知,序列测定定量分析法评估病毒相对适合度与采用分子克隆法获得的 RT-PCR 产物比例定量分析结果基本一致, 结果稳定可靠并且简便易行, 适用于通过血浆中病毒 RNA 水平的变化预测抗病毒治疗的临床疗效,通过检测病毒复制情况了解疾病进程,临床检测 HIV 等病毒感染性疾病耐药毒株是否出现并及检测适合度变化。

参 考 文 献

[1] Holland JJ, de la Torre JC, Clarke DK, et al. Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses[J]. J Virol, 1991, 65(6): 2960-2967.

[2] Domingo E, Menendez-Arias L, Holland JJ. RNA virus fitness [J]. Rev Med Virol, 1997, 7(2): 87-96.

[3] Domingo E. Viruses at the edge of adaptation[J]. Virology, 2000, 270 (2): 251-253.

[4] Troyer RM, Collins KR, Abraha A, et al. Changes in human immunodeficiency virus type 1 fitness and genetic diversity during disease progression[J]. J Virol, 2005, 79(14): 9006-9018.

[5] Geretti AM. The clinical significance of viral fitness [J]. J HIV Ther, 2005, 10(1): 6-10.

[6] Jason D. Barbour and Robert M. Grant. The Clinical Implications of Reduced Viral Fitness[J]. Curr Infect Dis Rep, 2004, 6(2): 151-158.

[7] Domingo E, Mas A, Yuste E, et al. Virus population dynamics, fitness variations and the control of viral disease: an update[J]. Prog Drug Res, 2001, 57: 77-115.

[8] Lahser FC, Wright-Minogue J, Skelton A, et al. Quantitative estimation of viral fitness using Pyrosequencing[J]. Biotechniques, 2003, 34(1): 26-28.

[9] Zhao X, Chen F, Sullender W. Respiratory syncytial virus escape mutant derived in vitro resists palivizumab prophylaxis in cotton rats[J]. Virology, 2004, 318(2): 608-612.

[10] Zhao X, Chen F, Sullender W. Variable resistance to palivizumab in cotton rats by respiratory syncytial virus mutants[J]. J Infect Dis, 2004, 190 (11): 1941-1946.

[11] Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection[J]. Nature, 1995, 373(6510): 117-122.

[12] Nurpeisov V, Hurwitz SJ, Sharma PL. Fluorescent dye terminator sequencing methods for quantitative determination of replication fitness of human immunodeficiency virus type 1 containing the codon 74 and 184 mutations in reverse transcriptase[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(7): 3306 -3311.

[13] Nemirov K, Lundkvist A, Vaheri A, et al. Adaptation of Puumala hantavirus to cell culture is associated with point mutations in the coding region of the L segment and in the noncoding regions of the S segment[J]. J Virol, 2003, 77(16): 8793-8800.

[14] Clotet B, Domingo E, Menendez-Arias L, et al. Insertions in the reverse transcriptase increase both drug resistance and viral fitness in a human immunodeficiency virus type 1 isolate harboring the multi-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance 69 insertion complex mutation[J]. J Virol, 2002, 76(20): 10546-10552.

[15] Van Rompay KK, Matthews TB, Higgins J, et al. Virulence and reduced fitness of simian immunodeficiency virus with the M184V mutation in reverse transcriptase[J]. J Virol, 2002, 76(12): 6083-6092.

[16] Devereux HL, Emery VC, Johnson MA, et al. Replicative fitness in vivo of HIV-1 variants with multiple drug resistance-associated mutations [J]. J Med Virol, 2001, 65(2): 218-224.

[17] Yuste E, Lopez-Galindez C, Domingo E. Unusual distribution of mutations associated with serial bottleneck passages of human immunodeficiency virus type 1[J]. J Virol, 2000, 74(20): 9546-9552.

(责任编辑:关蕴良)