

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.12.012

丙型肝炎患者血清病毒宏基因组学研究*

李 旺,倪 萍,周成林[△]

(江苏省泰州市人民医院检验科 225300)

摘要:目的 了解健康人群和丙型肝炎病毒(HCV)-RNA 阳性患者血清标本中病毒群落的组成;比较健康组与 HCV 感染组血清标本中病毒群落组的差异性;挖掘新型 HCV 及其他新病毒。方法 提取血浆样品中的全部核酸,反转录后采用 Illumina index primers 进行扩增构建病毒文库,随后进行 Miseq 深度测序,通过生物信息学分析筛选出与病毒相关的序列。结果 HCV01 文库中总病毒序列数为 1 514 条,主要由黄病毒科(48%)、指环病毒科(29%)、反转录病毒科(7%)、微小噬菌体科(2%)构成;HCV02 文库中总病毒序列数为 2 820 条,主要由指环病毒科(61%)、黄病毒科(18%)、反转录病毒科(8%)、微小噬菌体科(1%)构成;HCV03 文库中总病毒序列数为 3 534 条,主要由指环病毒科(78%)、黄病毒科(4%)、反转录病毒科(4%)、人类内源性反转录病毒科(2%)、微小噬菌体科(1%)构成;HCV04 文库中总病毒序列数为 3 549 条,主要由指环病毒科(90%)、反转录病毒科(2%)构成。结论 血液中存在多种病毒,HCV 感染患者血液中主要存在指环病毒科、黄病毒科、反转录病毒科病毒,而健康人群血液中主要为指环病毒科、反转录病毒科病毒;血清中 HCV 水平可能对指环病毒科病毒的复制有抑制作用,即 HCV 水平越高则指环病毒科病毒水平越低。

关键词:丙型肝炎; 病毒宏基因组; 基因组学; 病毒群落

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)12-1737-04

Study on the genome of serum virus in patients with hepatitis C virus*

LI Wang, NI Ping, ZHOU Chenglin[△]

(Department of Clinical Laboratory, Taizhou People's Hospital, Taizhou, Jiangsu 225300, China)

Abstract: Objective To understand the composition of virus community in serum sample of both healthy people and patients infected with HCV, to compare the difference of composition of serum sample of health group and patient group, and to discover new genotype hepatitis C virus and new virus. **Methods** All the nucleic acids in the plasma samples were extracted and the virus library was amplified by Illumina index primers after reverse transcription. Then the Miseq sequence was sequenced and the virus related sequences were screened by bioinformatics analysis. **Results** The total number of virus sequences in the HCV01 library was 1 514, including Flaviviridae (48%), Anelloviridae (29%), Retrovirus (7%), Microviridae (2%); the total number of virus sequences in the HCV02 library was 2 820, including Anelloviridae (61%), Flaviviridae (18%), Retrovirus (8%), Microviridae (1%); the total number of virus sequences in the HCV03 library was 3 534, including Anelloviridae (78%), Flaviviridae (4%), Retroviridae (4%), Microviridae (1%); the total number of virus sequences in the HCV04 library was 3 549, including Anelloviridae (90%), Flaviviridae (4%), Retroviridae (2%). **Conclusion** There are many kinds of virus in the blood, in the serum of patients infected with HCV Anelloviridae, Flaviviridae and Retroviridae are the main viruses, but Anelloviridae and Retroviridae are the main viruses in the healthy group. The level of HCV in serum may inhibit the replication of Anelloviridae. The higher the level of the virus, the lower the level of Anelloviridae.

Key words: hepatitis C virus; metagenomics; genomics; virus community

病毒宏基因组学方法在病毒学研究方面具有独特优势,它能够检测标本中的已知病毒,又能够检测标本中的未知病毒。目前,病毒宏基因组学方法已得到广泛应用。KRABERGER 等^[1]应用病毒宏基因组学方法从污水处理池发现了许多新的单链环形

DNA 病毒。杨凡力等^[2]同样应用病毒宏基因组学方法在蝙蝠体内发现腺病毒、圆环病毒、细小病毒、博卡病毒等新病毒。ZHANG 等^[3]应用病毒宏基因组学方法在牛肉中检测与感染灵长类多瘤病毒亲缘关系最近的牛多瘤病毒(BPyV2-SF)。用病毒宏基因组学

* 基金项目:江苏省泰州市科技支撑计划(社会发展)资助项目(TS201623);江苏省泰州市人民医院级科研基金资助项目(ZL201732)。

作者简介:李旺,男,主管技师,主要从事病毒学方面的研究。△ 通信作者,E-mail:18762340015@126.com。

方法对腹泻儿童及健康儿童的粪便标本进行检测,发现腹泻标本中主要存在指环病毒、杯状病毒和 Sali-virus,而正常儿童粪便标本中最多的病毒依次为指环病毒、Tymovirus 和人双埃可病毒。此外,两组标本中病毒序列数量相差甚远,并且首次在中国儿童腹泻粪便标本中发现了第 4 基因群型(诺如病毒)。应用病毒宏基因组学方法对儿童呼吸道标本和脑脊液样本进行研究显示,不同标本及不同健康状态下病毒群体的组成存在一定差异。丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)引起的一种传染性疾病,全球有 1.3~2.1 亿人感染 HCV 并转变为慢性感染者,对人类的健康造成严重威胁^[4]。因此,进行 HCV 致病机制及相关性研究对于预防和治愈丙型肝炎有重要意义。本研究应用病毒宏基因组学方法对 HCV-RNA 阳性血清标本进行研究,以了解 HCV-RNA 阳性血清标本中病毒群落的组成,与健康人群血清病毒群落的组成进行比较,发现二者之间病毒组成的差异性,为探索和研究与丙型肝炎相关的其他病毒提供前期研究基础,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本采集 选取 2015 年 4 月至 2016 年 7 月泰州市人民医院收集的 30 份 HCV-RNA 阳性患者血清标本,男、女性各 15 份;另选取 10 份健康人群血清标本,男、女性各 5 份。

1.2 标本分组设计 考虑到构建病毒文库成本较高,本研究根据性别及病毒载量将每 10 份标本作为一组,各组内每份标本取 150 μ L 混合制成混合液,构成 4 个标本文库。详细信息见表 1。

表 1 标本组合信息

文库名称	男/女(n/n)	标本数量(份)	HCV 病毒载量(U/mL)
HCV01	5/5	10	$>1.0 \times 10^6$
HCV02	5/5	10	$1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$
HCV03	5/5	10	$<1.0 \times 10^5$
HCV04	5/5	10	阴性

1.3 核酸酶消化 在 4 支 1.5 mL 的无 RNA 酶离心管内分别加入 10 \times Buffer Cocktail 20 μ L、Cocktail of DNases 7 μ L、Micrococcal Nuclease 5 μ L、RNase A 2 μ L 及混合血清 166 μ L,混匀后 37 $^{\circ}$ C 反应 60 min,反应至 30 min 时轻轻混匀几次使反应充分。

1.4 病毒核酸提取 采用病毒核酸提取对核酸酶消化处理后的标本进行病毒核酸提取,最后病毒核酸溶于 50 μ L buffer AVE 中再加入 0.5 μ L RNA 酶抑制剂,混匀冰上放置待用。

1.5 反转录及合成双链 DNA 应用 SuperScript III 反转录试剂盒进行反转录反应,取 4 支无 RNA 酶的聚合酶链反应(PCR)管分别加入 dNTP(10 nmol/L) 1 μ L、含接头的 6 碱基随机引物(100 μ mol/L) 1 μ L、

RNA 1 μ L,涡旋混匀后瞬时离心后置于 PCR 仪上,65 $^{\circ}$ C 反应 5 min,迅速置于冰上 >2 min。随后向各管中分别加入 Buffer Cocktail 4 μ L、Script III[®] RT Enzyme Mix I 1 μ L、DTT 1 μ L,涡旋混匀后瞬时离心后,于 25 $^{\circ}$ C 10 min、50 $^{\circ}$ C 60 min、85 $^{\circ}$ C 5 min、95 $^{\circ}$ C 2 min 后迅速置于冰上放置 ≥ 2 min。再向各反应管中加入 Klenow 酶 1 μ L,涡旋混匀后瞬时离心,置于 PCR 仪上进行 37 $^{\circ}$ C 60 min、75 $^{\circ}$ C 20 min 反应。最后将得到的双链 DNA 产物保存待用。

1.6 构建病毒文库 取 4 支无 RNA 酶的 PCR 管分别加入 10 μ L TD buffer、5 μ L ATM 及 5 μ L 双链 DNA,混匀后 2 100 r/min 离心 1 min 后置于 PCR 仪上进行 55 $^{\circ}$ C、5 min 反应,反应结束后当温度降至 10 $^{\circ}$ C 时迅速向每管中加入 5 μ L NT buffer,混匀,2 100 r/min 离心 1 min。随后分别转移至 4 个预先分别加有 Illumina index primer(5 μ L N primer 和 5 μ L S primer)和 15 μ L NPM buffer 的混合液中混匀,2 100 r/min 离心 1 min,置于 PCR 仪上进行 72 $^{\circ}$ C 3 min、95 $^{\circ}$ C 30 s、94 $^{\circ}$ C 10 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s,共 15 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min 反应,即得到病毒文库。

1.7 筛选 DNA 片段 使用 Qiaquick 公司生产的 PCR 核酸纯化试剂盒纯化病毒文库以去除引物二聚体。随后利用 Ampure 磁珠(Beads)对病毒文库 DNA 长度进行筛选:取 4 支 1.5 mL 离心管分别向各管加入 30 μ L 文库 DNA 和 27 Beads,加样枪上下轻轻混匀,室温静置 5 min,然后再置于磁力架上 5 min 后吸弃上清液。再向管内加入 80%乙醇溶液 500 μ L 的洗涤 Beads,洗涤 2 次后吸弃乙醇溶液,打开管口室温静置 5 min,使乙醇完全挥发。随后从磁力架上取下离心管加入 30 μ L 无菌水,加样枪上下轻轻混匀,静置 2 min。再将离心管置于磁力架上静置 3 min,吸取 20 μ L 上清液于 0.2 mL 的 PCR 管中用于 Miseq 测序。

1.8 Miseq 深度测序及生物信息学分析应用 Illumina 测序平台对文库进行 Miseq 深度测序,随后将测序原始数据传至美国加州大学旧金山分校,通过其病毒宏基因组学分析平台对原始数据进行生物信息学分析。应用 Bowtie 2 软件滤除数据中真核及原核基因组序列。再应用 Phred、VecScreen CAP3、meta-Velvet、ABYSS 和 SOAPdenovo 2 等一系列软件实施序列尾部剪切、引物序列和接头去除、序列拼接等操作。随后将序列放入本地病毒蛋白组数据库中进行 BLASTx 搜索。再将所有可能为病毒基因的核酸序列放在平台内的 NVNR 蛋白组数据库中进行 BLASTx 搜索,最后筛选出病毒核酸序列。

2 结果

2.1 各文库中病毒群落组成 对 4 个病毒文库中病毒群落序列进行整理,文库 HCV01、HCV02、HCV03、HCV04 中病毒群落构成见图 1~4。数据显

示, HCV01 文库中总病毒序列数为 1 514 条, 主要由黄病毒科(Flaviviridae)48%、指环病毒科(Anelloviridae)29%、未分类科病毒(None)8%、反转录病毒科(Retroviridae)7%、微小噬菌体科(Microviridae)2% 构成; HCV02 文库中总病毒序列数为 2 820 条, 主要由 Anelloviridae 61%、Flaviviridae 18%、Retroviridae 8%、None 3%、Microviridae 1% 构成; HCV03 文库中总病毒序列数为 3 539 条, 主要由 Anelloviridae 78%、None 5%、Flaviviridae 4%、Retroviridae 4%、人类内源性反转录病毒科(HERV)2%、Microviridae 1% 构成; HCV04 文库中总病毒序列数为 3 549 条, 主要由 Anelloviridae 90%、None 4%、Retroviridae 2%、藻类脱氧核糖核酸病毒科(Phycodnaviridae)1%、其他病毒科 1% 构成。

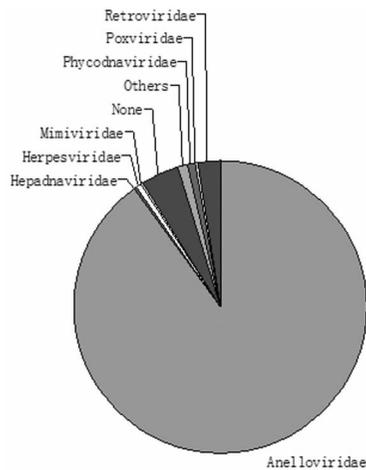


图 4 HCV04 病毒群落构成

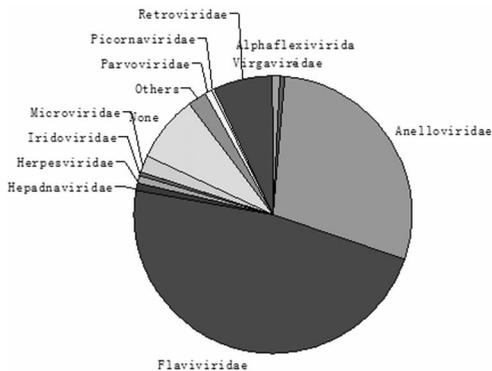


图 1 HCV01 病毒群落构成

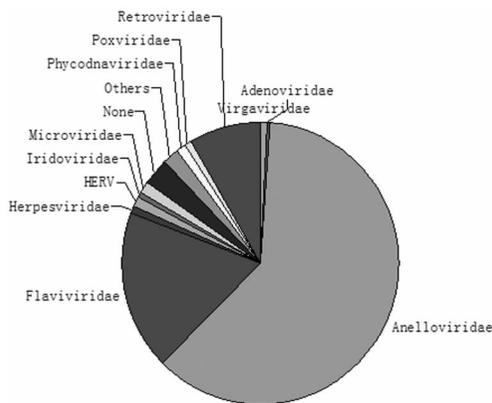


图 2 HCV02 病毒群落构成

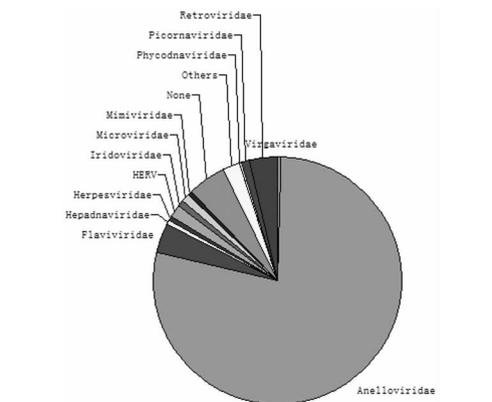


图 3 HCV03 病毒群落构成

2.2 HCV 序列检测 HCV01 和 HCV03 文库中分别检测到的 719 条、138 条 Flaviviridae 序列均为 HCV 序列; HCV02 文库中检测到的 515 条 Flaviviridae 序列中有 504 条为 HCV 序列, 11 条为瘟疫病毒(Pegivirus); HCV04 文库中检测到的 3 条 Flaviviridae 序列均为 Pegivirus。

2.3 各文库中病毒群落构成比较 见表 2。

表 2 各文库中病毒群落构成比较(n)

病毒科	HCV01	HCV02	HCV03	HCV04
Adenoviridae	5	11	0	3
HERV	4	31	61	2
Iridoviridae	12	13	25	2
Papillomaviridae	0	4	7	2
Parvoviridae	11	3	9	0
Picornaviridae	7	0	32	2
Microviridae	27	39	44	0
Retroviridae	103	235	132	84
Poxviridae	0	21	0	11
Podoviridae	0	6	7	3
Phycodnaviridae	0	31	17	29
Herpesviridae	9	22	26	19
Baculoviridae	2	1	0	5
Anelloviridae	437	1 721	2 758	3 181
polyomaviridae	0	2	8	1
Hepeviridae	2	8	0	2
Alphaflexiviridae	7	0	7	0
Hepadnaviridae	13	4	14	6
Virgaviridae	12	24	21	0
Flaviviridae	719	515	138	3
Mimiviridae	0	9	18	9
Adenoviridae	5	11	0	3
None	117	91	169	154
Others	22	18	41	28
合计	1 514	2 820	3 534	3 549

3 讨 论

传统研究病毒的方法具有一定的局限性, 如 PCR

只能扩增已知病毒或低变异病毒,而高变异病毒及未知序列病毒此法则难以实施;血清学方法则难以获得新病毒的特异抗体;细胞培养法,很多病毒缺乏特异的细胞系及大多数病毒不能进行细胞培养。病毒宏基因组学专注于病毒群体,能够检测标本中已知和未知病毒再发现新病毒,在检测病毒流行情况方面展现出强大的优势。

本研究应用病毒宏基因组学方法对江苏省泰州地区健康者及 HCV-RNA 阳性患者血清病毒群落组成进行研究。结果显示,4 个病毒文库中 Flaviviridae 序列水平由多至少分别是 HCV01、HCV02、HCV03、HCV04,该结果与 HCV-RNA 检测结果相符。文库 HCV04 为健康对照组,该文库中仅检测到 3 条 Flaviviridae 序列为 Pegivirus;4 个文库中总病毒序列数及 Anelloviridae 病毒序列数由多至少分别是 HCV04、HCV03、HCV02、HCV01,这可能是由于血清中高 HCV 水平抑制了 Anelloviridae 病毒的复制,从而导致文库中 Anelloviridae 病毒序列水平与 HCV 水平呈相反现象。4 个文库中 Anelloviridae 病毒序列均占有相当大的比例,除文库 HCV01 外,其他 3 个文库中 Anelloviridae 病毒序列数最多,说明正常情况下 Anelloviridae 病毒是构成血液中病毒群落的主体。

ABUODEH 等^[5]研究显示,人类感染 Anelloviridae 病毒可高达 90%,说明人类普遍感染 Anelloviridae 病毒,可能该病毒科病毒是人体内的正常病毒群落。近年来,一定数量的新型 Anelloviridae 病毒被发现,且这些新型病毒可能与人类的某些疾病有一定关系。如 GALMÈS 等^[6]研究显示,Anelloviridae 病毒的一种新型 TTMV 病毒可能与严重的儿童肺炎有关;ZHANG 等^[7]通过对患有慢性牙龈炎孕妇的研究发现了一种新的 Anelloviridae,并发现该病毒可能与牙龈炎的发生有密切关系。ALAVI 等^[8]研究显示,Anelloviridae 与丙型肝炎有一定关系,但其对肝脏的影响甚微。本研究中 Anelloviridae 序列构成了病毒文库的主体,该病毒科中是否存在一些新型的并与疾病相关的病毒还有待进一步研究。同时,丙型肝炎患者血清中是否存在与疾病相关的其他未知的病毒还需要今后的深入研究。

目前病毒宏基因组学已广泛应用于很多领域,但还存在很多技术难题和缺陷。(1)标本过滤处理时导致病毒颗粒的丢失^[9]。(2)核酸酶不能完全消化游离核酸,从而增加了测序成本及对测序数据分析的难度^[10]。(3)目前病毒宏基因组学方法成本高、历时长,作为紧急检测方法应用于临床检测还有很大难度。(4)一次测序获得的数据有限,如标本量较多,就会导

致部分数据被掩盖;反之,如标本量较少,则增加了测序成本。相信随着科技的不断进步,以上技术难题将会逐步得以解决,病毒宏基因组学技术将来一定能够成为临床上的常规检测项目,更好地为人类的健康生活服务。

参考文献

- [1] KRABERGER S, ARGÜELLO-ASTORGA G R, GREENFIELD L G, et al. Characterisation of a diverse range of circular replication-associated protein encoding DNA viruses recovered from a sewage treatment oxidation pond[J]. *Infect Genet Evol*, 2015, 31(1): 73-86.
- [2] 杨凡力, 王意银, 郑文成, 等. 中国部分地区蝙蝠携带病毒的宏基因组学分析[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(5): 586-600.
- [3] ZHANG W, LI L, DENG X, et al. What is for dinner? Viral metagenomics of US store bought beef, pork, and chicken[J]. *Virology*, 2014, 9(16): 303-310.
- [4] GAYET-AGERON A, COMBESCURE C, LAUTENSCHLAGER S, et al. Comparison of diagnostic accuracy of PCR targeting the 47-Kilodalton protein membrane gene of *Treponema pallidum* and PCR targeting the DNA polymerase I gene: systematic review and meta-analysis[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(11): 3522-3529.
- [5] ABUODEH R, AL-MAWLAWI N, AL-QAHTANI A A, et al. Detection and genotyping of torque teno virus (TTV) in healthy blood donors and patients infected with HBV or HCV in Qatar[J]. *J Med Virol*, 2015, 87(7): 1184-1191.
- [6] GALMÈS J, LI Y, RAJOHARISON A, et al. Potential implication of new torque teno mini viruses in parapneumonic empyema in children[J]. *Eur Respir J*, 2013, 42(2): 470-479.
- [7] ZHANG Y, LI F, SHAN T L, et al. A novel species of torque teno mini virus (TTMV) in gingival tissue from chronic periodontitis patients[J]. *Sci Rep*, 2016, 25(6): 26739.
- [8] ALAVI S, SHARIFI Z, VALESHABAD A K, et al. Clinical outcomes of Torque teno virus-infected thalassemic patients with and without hepatitis C virus infection[J]. *Korean J Hematol*, 2011, 46(2): 123-127.
- [9] THURBER R V, HAYNES M, BREITBART M, et al. Laboratory procedures to generate viral metagenomes[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(4): 470-483.
- [10] DJIKENG A, HALPIN R, KUZMICKAS R, et al. Viral genome sequencing by random priming methods[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 5-9.