

· 实验研究 ·

重庆地区乙型肝炎病毒 B/adw2 和 C/adrq + 亚型 PreS/S 基因参照序列的初步建立

许红梅 任红 卿玉玲 彭明利 凌宁

【摘要】 目的 建立重庆地区不同亚型乙型肝炎病毒(HBV)流行株 PreS/S 基因参照序列。方法 扩增 18 例 HBV 慢性无症状携带者的 PreS/S 基因,应用同源性分析和对齐比较等方法确定基因型/血清型,并选同 HBV 亚型的 PreS/S 拟定参照序列。结果 9 株基因型 B/血清型 adw2、6 株基因型 C/血清型 adrq +、3 株基因型 B/血清型 ayw1,建立的重庆地区基因型 B/血清型 adw2、基因型 C/血清型 adrq + HBV 流行株 PreS/S 参照序列,与华东华南、东北华南地区同亚型的参照序列比较分别有 6 个、13 个核苷酸差异,均可引起 4 个氨基酸差异。结论 初步建立了重庆地区 HBV 基因型 B/血清型 adw2、基因型 C/血清型 adrq + HBV 流行株 PreS/S 基因参照序列。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;PreS/S 基因;亚型;参照序列

Establishment of consensus sequence of PreS/S of hepatitis B virus with genotype B/serotype adw2 or genotype C/serotype adrq + prevailing in Chongqing of China XU Hong-mei, REN Hong, QING Yu-ling, PENG Ming-li, LING Ning. The Institute of Viral Hepatitis, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China

【Abstract】 Objective To develop consensus sequence of HBV PreS/S with different subtype in Chongqing of China. **Methods** The gene of PreS/S of HBV in 18 AsC was sequenced. The genotype and serotype of HBV were determined. The main HBV strain prevailing in Chongqing was identified to establish its consensus sequence. **Results** It was found that 9 strains were genotype B/serotype adw2, 6 were genotype C/serotype adrq + and 3 were genotype B/serotype ayw1. The consensus sequence of PreS/S of HBV with genotype B/serotype adw2 and genotype C/serotype adrq + were established. There were 6 nucleotide variants which causing 4 amino acids change between consensus sequence of PreS/S with genotype B/serotype adw2 in Chongqing and in Southeast of China (homology showed 99.5% and 99.0% respectively). There were 13 different sites that caused 4 amino acids change between consensus sequence of PreS/S with genotype C/serotype adrq + in Chongqing and in Northeast and South of China (homology showed 98.9% and 99.0% respectively). Comparing the two consensus sequence of PreS/S gene of different subtype HBV in Chongqing, there was 95 variants which caused 40 amino acids variants (the homology was 92.1% and 90.0% respectively). **Conclusion** The consensus sequence of PreS/S of hepatitis B virus with genotype B/serotype adw2 and genotype C/serotype adrq + prevailing in Chongqing was established.

【Key words】 Hepatitis B virus; PreS/S gene; Subtype; Consensus sequence

自 1989 年 Carman 等^[1]首先发现乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)变异以来,众多研究表明 HBV 变异与其血清学标志物表现形式、乙肝过程以及乙肝预防和治疗失败等可能有十分密切的关系。判断变异是以序列为参照,近年郭亚兵等^[2]根据 7 株华南、东北地区流行株基因型 C HBV 建立了该地区的参照序列。由于我国地域广阔,民族众多,HBV 毒株的

分布可能因地域不同而有所不同。HBV 的 4 个开放读架(ORF)中 S-ORF 即 PreS/S 编码的 3 种外膜蛋白在病毒的生命周期中有十分重要的作用,具有附着和侵入细胞、促使病毒的装配和分泌、阻断宿主的免疫应答使感染持续等功能,另一方面该段基因又携带有与宿主免疫应答有关的 B-淋巴细胞和 T-淋巴细胞表位,其中 a 决定簇是提供保护性免疫的免疫原。本研究拟初步建立本地区 B/adw2 亚型、C/adrq + 亚型 HBV PreS/S 参照序列,为研究 HBV PreS/S 变异奠定基础。

基金项目 国家自然科学基金重点基金资助项目(396-30280)

作者单位 400010 重庆医科大学病毒性肝炎研究所

第一作者现工作单位:400014 重庆医科大学儿童医院

材料与方法

1. 研究对象 :18 例 HBV 慢性无症状携带者 (AsC), 诊断符合西安肝病会议《病毒性肝炎防治方案》³ 的诊断标准, 年龄 12~29 岁, 均未接种过乙肝疫苗, 未使用过抗-HBV 药物, HBsAg、HBeAg、抗-HBc 阳性, 多次检查肝脏功能均正常, 血清保存于 -70℃ 冰箱备用。

2. 主要试剂 :抗-HAV-IgM、抗-HDV(北京科卫临床诊断试剂厂产品)、抗-HCV(厦门新创科技有限公司产品)、抗-HEV-IgM(北京大学医学院肝病研究所产品)、HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc(美国 Abbott 实验室产品)。HBV 核酸扩增荧光检测试剂盒(深圳市匹基生物技术开发有限公司产品)。Ex Taq DAN 聚合酶(大连 Takara 生物工程公司产品)。引物根据 HBV 序列⁴设计, 由上海生工生物工程公司合成, 扩增 PreS/S 上游引物 P1 :5' TTGCGGGTCACCATATTC 3', 下游引物 P2 :5' TAGCCCATGAACCTTTAGG 3', 目的基因 1 290 bp。

3. 实验方法 :

(1) 各种肝炎病毒血清学标志物的检测及血清 HBV 滴度的测定 :分别采用 ELISA 和定量聚合酶链反应 (PCR) 法。

(2) 血清 DNA 提取 :采用酚-氯仿抽提法。

(3) HBV PreS/S 扩增 :在实验中设立阴性对照以及含 HBV 的 pCEOb6 质粒为模板的阳性对照。PreS/S 扩增 PCR 条件为预变性 94℃ 5 min, 94℃ 50 s, 52℃ 50 s, 72℃ 90 s (35 个循环), 72℃ 7 min 延伸。

4. PCR 产物直接测序 :PCR 产物送上海生工生物工程公司测序, PreS/S 测序引物为 P1、P2。

5. 序列分析 :采用 DNA SIS 2.5 和 Clustalx (1.81) 应用软件分析序列。

结 果

1. 各种肝炎病毒血清学标志物的检测及血清 HBV 滴度的测定 :18 例 AsC 血清中抗-HAV-IgM、抗-HCV、抗-HDV、抗-HEV-IgM 均为阴性。HBV 血清学标志物 HBsAg、HBeAg、抗-HBc 阳性, 抗-HBs、抗-HBe 阴性。

18 例 AsC 血清 HBV 滴度 $10^7 \sim 10^9$ copies/ml (以 DNA 滴度 $\geq 10^7$ copies/ml 为 HBV 高病毒血症,

$\leq 10^4$ copies/ml 为低病毒血症, $10^5 \sim 10^6$ copies/ml 为中度病毒血症) 故均为高病毒血症。

2. PreS/S 扩增结果 :18 例患者均扩增出 1 290 bp 的 DNA 片段, 与预期目的基因大小相符合 (图 1)。

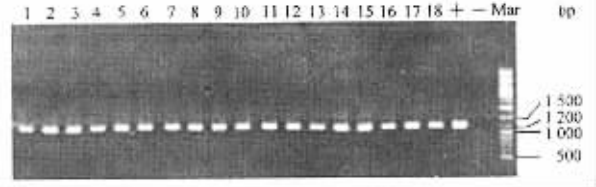


图1 18 例儿童慢性携带者 HBV PreS/S PCR 扩增产物电泳结果

3. 测序结果的分析 :

(1) 基因型及血清型的确定 :所测 S 基因序列与 GenBank 中不同基因型 HBV 的 S 基因比较, 根据相同基因型间异质性 $< 4\%$ ^[5] 的标准, 进行基因分型。根据 S 基因编码的 aa122 赖氨酸 (d) 或精氨酸 (y)、aa160 赖氨酸 (w) 或精氨酸 (r) 确定 d/y 或 w/r, 根据 aa127 脯氨酸/苏氨酸/亮氨酸/异亮氨酸确定 w1~4, 根据 aa159 丙氨酸或缬氨酸确定 q+ 或 q-^[6], 进行血清分型。结果显示 18 株 HBV 中, 9 株基因型 B/血清型 adw2, 6 株基因型 C/血清型 adrq+, 3 株基因型 B/血清型 ayw1。

(2) 同亚型 HBV PreS/S 基因核苷酸同源性比较 :表 1 表明, 重庆地区各亚型 HBV S 基因核苷酸同源性较高, PreS 核苷酸同源性较低。

表1 重庆地区同亚型 HBV PreS/S 核苷酸同源性比较

基因	B/adw2-B/adw2 (%)	C/adrq+-C/adrq+ (%)	B/ayw1-B/ayw1 (%)
PreS	93.9~99.3	97.3~98.1	98.3~99.2
S	97.4~99.6	98.3~99.3	98.4~99.5

4. 重庆地区 HBV PreS/S 参照序列的初步拟定 :根据参照序列每个位点的核苷酸必须与 80% 已知序列上相应位点核苷酸相同这一标准^[7], 对 9 株基因型 B/血清型 adw2 HBV PreS/S 的核苷酸序列进行排列, 每个位点 7/9 株以上相同的核苷酸, 即为本地区 B/adw2 亚型 HBV 流行株 PreS/S 参照序列 (图 2)。对 6 株 C/adrq+ 亚型 HBV PreS/S 的核苷酸序列进行排列, 每个位点有 5/6 株以上是相同的核苷酸, 即为 C/adrq+ 亚型 HBV 毒株 PreS/S 标准参照序列 (图 3)。

2848 ATGGGAGGTT GGTCTTCCAA ACCTCGAAAA GGCATGGGGA CAAATCTTTC TGTCCCAAT
 2908 CCCCTGGGAT TCCTTCCCGA TCATCAGTTG GACCTGTCAT TCAAAGCCAA CTCAGAAAAT
 2968 CCAGATTGGG ACCTCAACCC GCACAAGGAC AACTGGCCGG ACGCCAACAA GGTGGGAGTG
 3028 GGAGCATTGG GCGCCAGGGTT GACCCCTCCG CATGGGGGAC TGTTGGGGTG GAGCCTCAG
 3088 GCTCAGGGCC TACTCACAAC TGTCGACGCA GCTCTCTCTC CTGCTCCAC CAATCGGGAG
 3148 TCAGGAAGGC AGCCTACTCC CATATCTCCA CTCTAAAGG ACAGTCAATC TCAGGCGCATG
 3208 CAGTGGAACT CCACCACTTT CCACAAGCT CTCTCAAGATC CCAGAGTCCAG GCGCTGTGATC
 53 TTTCTGTCTG GTGGCTCCAG TTCAGGAACA GTGAGCCCTG CTCAGAAATC TGTCCTCTGC
 113 ATATCTGTCAA TCCTATUGAA GACTGGGAGC CCGTGAACCA ACATGGAGAA CATCAGATCA
 173 GGACTCTCTAG GACCCCTGCT GGTGTACAG GCGGGGTTTT TCCTGTGAC AAAAATCTCT
 233 AGAATACCAC AGAGTCTAGA CTCGTGGTGG ACCTTCTCTCA ATTTTCTAGG GGAAGACCC
 293 GTGTGTCTTG GCCAAAATTC GCAGTCCCAA ATCTCCAGTC ACTCACCAAC CTGTGTCTCT
 353 CCAATTTGTC CTGGTTATCG CTGGATGTGT CTGGGGGTTT TTATCATCTT CCTCTGCATC
 413 CTGCTCTCTT GCCTCATCTT CTGTGTGTTT CTCTCGACT ATCAAGGTAT GTTGCCCGTT
 473 TGTCTCTTAA TTCCAGGATC ATCAACAAC AGCACCGGAC CATGCAAAAC CTGCACAATC
 533 CCGCTCAAG GAACTCTAT GTTTCCTCTA TGTTGCTGTA CAAAACCTTC GGAGCGGAAAC
 593 TGCACCTGTA TTCCATCCCT ATCATCTTGG GCTTTGCGAA AATACCTATG GGAGTGGGCC
 653 TCAGTCCGTT TCCTTGGCT CAGTTTACTA GTGCCATTTG TTCAGTGGTT CTGATGGCTT
 713 TCCCCCACTG TCTGGCTTTC AGTTATATGG ATGATGTGGT ATGGGGGCC AAGTCTGATC
 773 AACATCTTGA GTCCCTTAT GCGCGTGTA CCAATTTTCT TTTGTCTTG GGTATACATT
 833 TGA 835

图2 重庆地区基因型 B/血清型 adw2 HBV PreS/S 基因参照序列 (nt2848~3215~0~835)

2848 ATGGGAGGTT GGTCTTCCAA ACCTCGAAAA GGCATGGGGA CAAATCTTTC TGTCCCAAT
 2908 CCCCTGGGAT TCCTTCCCGA TCACCAGTTG GACCTGCTGT TCGGAGCCAA TTCAAAACAT
 2968 CCAGATTGGG ACCTCAACCC CAACAAGGAT CACTGCGCAG CGGCAAATA GGATGGAGCG
 3028 GGAGCATTGG GCGCCAGGGTT CACTCCACCC CACGGCAGTC TTTTGGGGTG GAGCCTCAG
 3088 GCTCAGGGCA TATTGACAAC AGTCCAGCA GCGCTCTCTC CTGCTCCAC CAATCGGGAG
 3148 TCAGGAAGAC AGCCTACTCC CATTTCTCCA CTCTAAGAG ACAGTCAATC TCAGGCGCATG
 3208 CAGTGGAACT CCACAACATT CCACAAGCT CTGTAGACC CCAGAGTGG AGGCGTATAC
 53 TTTCTGTCTG GTGGCTCCAG TTCGGGAACA GTAAACCCTG TTCGACTAC TGCCCTACCC
 113 ATATCTGTCAA TCCTTCTGAG GACTGGGAGC CCGTGAACCA ACATGGAGAA CACAACATCA
 173 GGACTCTCTAG GACCCCTGCT GGTGTACAG GCGGGGTTTT TCCTGTGAC AAGAAATCTCT
 233 AGAATACCAC AGAGTCTAGA CTCGTGGTGG ACCTTCTCTCA ATTTTCTAGG GGAAGACCC
 293 AGTGTCTCTG GCCAAAATTC GCAGTCCCAA ACCTCAATC ACTCACCAAC CTCTGTCTCT
 353 CCAATTTGTC CTGGTTATCG CTGGATGTGT CTGGGGGTTT TTATCATCTT CCTCTGCATC
 413 CTGCTCTCTT GCCTCATCTT CTGTGTGTTT CTCTCGACT ATCAAGGTAT GTTGCCCGTT
 473 TGTCTCTTAA TTCCAGGATC ATCAACAAC AGCACCGGAC CATGCAAAAC CTGCACAATC
 533 CCGCTCAAG GAACTCTAT GTTTCCTCTA TGTTGCTGTA CAAAACCTTC GGAGCGGAAAC
 593 TGCACCTGTA TTCCATCCCT ATCATCTTGG GCTTTGCGAA AATACCTATG GGAGTGGGCC
 653 TCAGTCCGTT TCCTTGGCT CAGTTTACTA GTGCCATTTG TTCAGTGGTT CTGATGGCTT
 713 TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATATGG ATGATGTGGT ATGGGGGCC AAGTCTGATC
 773 AACATCTTGA GTCCCTTAT ACCTCTATTA CCAATTTTCT TTTGTCTTG GGTATACATT
 833 TGA 835

图3 重庆地区基因型 C/血清型 adrq+ HBV PreS/S 基因参照序列 (nt2848~3215~0~835)

5. 重庆地区 HBV PreS/S 参照序列与我国其他地区参照序列比较:

(1) 与华东华南地区 B/adw2 亚型 HBV PreS/S 基因标准参照序列比较: 与根据 GenBank 中我国 5 株亚型相同 HBV 的序列建立的参照序列进行比较 (5 例患者均为 AsC, 来源于华东华南地区, 登录号码分别为: AF100308、AF100309、AF461363、AF282917、AF282918), 结果显示有 6 个核苷酸位点的差异, 它们分别是 nt3171A(T), nt3186A(G), nt3191C(C)*、nt20G(A)*、nt108C(A)* 和 nt753A(T)*, 可致 4 个氨基酸差异 (* 所示), 同源性分别为 99.5%、99.0%。差异主要位于 PreS S 基因差异少 编码 a 决定簇的区域无变异。3 个差异氨基酸位于 PreS₁ 1 个位于 S 基因区域。

(2) 与东北华南地区 C/adrq+ 亚型 HBV PreS/S 参照序列比较: 与郭亚兵等^[2]根据东北华南地区 7 例 AsC 的 HBV 所建立的亚型相同的参照序列比较 结果显示两地区 C/adrq+ 亚型的 PreS/S 参照序列有 13 个核苷酸差异, 它们分别为 nt2875A(C)*、nt2958T(C), nt3008C(A)*、nt3051T(C), nt3057C(A), nt3064A(G)*、nt3084G(T), nt3120G(A), nt3171T(C), nt10A(T), nt31C(T), nt51A(T)*、

nt619C(T), 可致 4 个氨基酸差异 (* 所示), 同源性分别为 98.9%、99.0%。PreS 基因差异较多 (12/13), S 基因差异较少 (1/13), 其中编码 a 决定簇的基因无变异。4 个差异氨基酸均位于 PreS 区域。

以上结果表明, 重庆地区 HBV PreS/S 参照序列与其他地区的参照序列存在一定的差异。

6. B/adw2 亚型 HBV 与 C/adrq+ 亚型 HBV PreS/S 参照序列比较: 结果显示有 95 个核苷酸差异, 同源性为 92.1%, 可引起 40 个氨基酸改变, 同源性为 90.0%。以上结果表明, 同一地区不同亚型的 HBV 的 PreS/S 核苷酸、氨基酸序列存在较大的差异, 其差异高于地区不同但基因型及血清型相同的病毒株。

讨 论

由于 AsC 是我国 HBV 感染最主要的传染源, 其形成与母婴传播有关 (包括宫内传播或新生儿期的垂直传播, 以及以后的水平传播), 由于机体过早接触 HBV, 使机体对 HBV 产生特异性免疫耐受或免疫低下, 因此该途径是形成人群 AsC 和 HBV 贮存库的重要原因。由于其体内 HBV 受到的免疫压力小, 在感染过程中相对变异发生率低, 较能真实地反映该地区 HBV 流行株存在的状况, 所以本课题选定均为高病毒血症的 AsC 为研究对象。

从 20 世纪 80 年代以来, 根据 HBsAg 上特定氨基酸的差异, 将 HBV 分为 9 个血清型, 即 ayw1、ayw2、ayw3、ayw4、adw2、adw4、ayr、adrq+、adrq-。随着分子生物学技术的兴起, 不同血清型 HBV 的基因组得到了确定, 在此基础上 Okatoma 等^[8]发现同一血清型 HBV 间异质性范围较大, 其上限甚至超过不同血清型间异质性, 说明血清学分型并不能完全真正反映 HBV 间的差异以及病毒真正的种系发生关系, 故根据 HBV 间全基因异质性 ≥ 8% (同源性 < 92%) 对 HBV 进行分型, 建立了 HBV 基因分型方法。其后 Norder 等^[5]证明编码 HBsAg 的 S 基因异质性 ≥ 4% (同源性 < 96%) 进行基因分型与 Okatoma 的全基因分型完全一致, 从而简化了分型方法。目前全世界已发现七种基因型 (A、B、C、D、E、F 和 G), 同一种基因型可有几种不同的血清型, 同一种血清型可属于不同的基因型, 但呈相对的稳定性, 基因型有一定的地域分布, 亚洲东部以 B、C 流行为主^[9], 本实验结果以及国内有关研究^[10, 11]也支持该结论。研究^[10]显示, 在我国不同地区, HBV

优势株可能是基因型 B/血清型 adw2 或基因型 C/血清型 adr_q + ,北部、东部和南部以 C/adr_q + 亚型为主,而西部以 B/adw2 亚型为主。本研究显示重庆地区以 B/adw2 亚型 HBV 流行为主,C/adr_q + 亚型 HBV 也占一定的比例。本课题以具有相同基因型和血清型的 HBV 建立本地区参照序列,能最大限度地减少基因型或/和血清型不同引起的差异,最大可能地保证了 HBV 的同源性。此外,目的基因扩增实验中选用具有保真功能的 DNA 聚合酶,并设置阳性、阴性对照,从方法学上保证了基因序列的可靠性。

本项课题显示重庆地区 HBV PreS/S 标准参照序列与华东华南或东北华南地区的参照序列比较,B/adw2 亚型 HBV PreS/S 有 6 个核苷酸差异、可致 4 个氨基酸差异。C/adr_q + 亚型 HBV PreS/S 有 13 个核苷酸差异、可致 4 个氨基酸差异。PreS 基因差异较多,S 基因差异较少,S 基因编码 a 决定簇的核苷酸序列很稳定,无差异。说明不同地区 HBV PreS/S 参照序列存在一定的差异,而这些差异在以往的研究中被视为变异。本地区不同亚型 HBV PreS/S 参照序列有较大差异,PreS/S 有 95 个核苷酸差异、可引起 40 个氨基酸改变,以上结果也证明不同亚型 HBV 存在较大的差异,其差异高于地区不同但基因型及血清型相同的病毒株。所以在进行 HBV 基因变异研究时务必以本地区亚型相同的参照序列进行比较,才能得出正确的结论,否则会将某些差异误作为变异。

本地区基因型 B/血清型 adw2 HBV、基因型 C/血清型 adr_q + HBV PreS/S 参照序列的初步建立为进一步研究本地区的 HBV 准种、HBV 基因变异与 HBV 相关疾病的关系奠定了一定的基础。还将积

累更多的序列以进一步完善。

参 考 文 献

- 1 Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet*, 1989, 2: 588-591.
- 2 郭亚兵, 侯金林, 戴炜, 等. 乙型肝炎病毒中国株全基因参照序列的初步建立. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1999, 19: 197-200.
- 3 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001, 19: 53.
- 4 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997. 26-28.
- 5 Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*, 1994, 198: 489-503.
- 6 Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology*, 1995, 38: 24-34.
- 7 郭亚兵, 侯金林, 戴炜, 等. 乙型肝炎病毒全基因的测定. *中国病毒学*, 1999, 14: 205-208.
- 8 Okamoto H, Tsutsa F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen. *J Gen Virol*, 1988, 69: 2575-2583.
- 9 Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes and geographic origin of hepatitis B virus-large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis*, 1997, 175: 1285-1293.
- 10 范金水, 庄辉, 李远贵, 等. 我国 8 城市 HBsAg 阳性和阴性乙肝患者的病毒血清型和基因型分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1998, 18: 88-91.
- 11 Ding X, Mizokami M, Yao G, et al. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001, 44: 43-47.

(收稿日期 2002-08-21)

(本文编辑 尹廉)