

· 乙肝疫苗免疫策略研究 ·

乙型肝炎病毒“a”决定簇突变对乙型肝炎疫苗保护效果的影响

张瑞 李荣成 朱凤才 李艳萍 刘社兰 张现臣 王升启 梁争论 李河民 庄辉

【摘要】 目的 研究乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)“a”决定簇热点突变对乙肝疫苗保护效果的影响。方法 根据 HBV 基因保守序列设计 PCR 扩增引物,针对“a”决定簇突变设计简并探针,制备检测 HBV“a”决定簇 16 种热点突变的基因芯片,并用克隆测序对芯片检测结果进行验证。基因芯片法检测 47 对乙肝疫苗阻断失败的母婴配对样本和 323 例阻断成功的母亲样本。结果 克隆测序证明,基因芯片法具有特异性。应用该法检测发现,野生株(阳性率为 78.66%)仍为主要流行株,依次为 126A(11.27%)、145R(5.76%)、126S-1(5.28%)、126S-2(4.56%)、129H(1.20%)、144A(0.72%)、129R(0.24%),但 126A 阳性率显著高于其他突变(P 值均 <0.01)。阻断失败组母婴均感染的样本与阻断成功组的 126A、126S-1、126S-2 和 145R 检出率的差异无统计学意义。结论 现有乙肝疫苗可阻断 126A、126S 和 145R 突变株的母婴传播,目前无需研制针对 126 和 145 位点突变的新型乙肝疫苗,但需加强对突变株的流行病学监测。

【关键词】 乙型肝炎病毒;基因芯片;“a”决定簇;突变

Role of mutations on the “hepatitis B virus ‘a’ determinant hotpoint” to the efficacy of hepatitis B vaccine ZHANG Rui*, LI Rong-cheng, ZHU Feng-cai, LI Yan-ping, LIU She-lan, ZHANG Xian-chen, WANG Sheng-qi, LIANG Zheng-lun, LI He-min, ZHUANG Hui. *National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China*
Corresponding author: LIANG Zheng-lun, Email: lzlun@yahoo.com

【Abstract】 Objective To study how hepatitis B virus(HBV) ‘a’ determinant hotpoint mutations were influencing the hepatitis B vaccine efficacy. **Methods** Primers were designed in HBV conservative region, and the degenerate probes for detecting 16 ‘a’ determinant hotpoint mutations were developed for gene chips. Sensitivity and specificity of the gene chips were evaluated by clone sequencing. Sera of 47 pairs of mothers and infants with immune failure and 323 mothers of children with immune protection of HB vaccine were detected by the gene chips. **Results** Result from clone sequencing demonstrated that the gene chips were specific for the detection of ‘a’ determinant hotpoint mutations. The wild type of HBV was still dominant, with the prevalence of 78.66%, and the mutation frequencies of 126A, 145R, 126S-1, 126S-2, 129H, 144A, and 129R were 11.27%, 5.76%, 5.28%, 4.56%, 1.20%, 0.72% and 0.24%, respectively. The prevalence of 126A mutation was significantly higher than that of other mutations ($P < 0.01$). No significant differences were found in mother-infant transmission rates of 126A, 126S-1, 126S-2 and 145R variants. **Conclusion** The currently available hepatitis B vaccine could block mother-infant transmission of 126A, 126S and 145R variants. It appears that there is no need to develop a new hepatitis B vaccine against 126 and 145 variants at present, but the consistent epidemiological surveillance on HBV mutants should be carried out.

【Key words】 Hepatitis B virus; Gene chip; ‘a’ determinant; Mutation

近年来,在世界许多地区均发现乙型肝炎(乙肝)疫苗阻断失败患者中存在“a”决定簇突变株^[1],

但突变株是否与阻断失败有关尚无确切证据,为探讨乙肝病毒(HBV)“a”决定簇热点突变对乙肝疫苗保护效果的影响,本研究首先制备了检测 HBV “a”决定簇热点突变的基因芯片,并用基因芯片检测乙肝疫苗阻断失败和阻断成功的母婴配对血清样本,根据这些配对母亲和婴儿有无突变株检出,研究现有疫苗是否能阻断突变株病毒母婴传播,为进一步提高乙肝疫苗保护效果提供依据。

基金项目:国家“十五”科技攻关课题资助项目(2004BA718B02)

作者单位:100050 北京,中国药品生物制品检定所疫苗二室(张瑞、张现臣、梁争论、李河民);广西壮族自治区疾病预防控制中心(李荣成、李艳萍);江苏省疾病预防控制中心(朱凤才、刘社兰);军事医学科学院(王升启);北京大学医学部微生物学系(庄辉)

通讯作者:梁争论,Email:lzlun@yahoo.com

材料与方 法

1. 对象: 从广西壮族自治区和江苏省筛选 47 对乙肝疫苗阻断失败的母婴配对血清样本, 323 例阻断成功的母亲血清样本。筛选对象的标准: 母亲怀孕期间 HBsAg 和 HBeAg 双阳性(HBeAg 以 S/CO 比值 >3 为阳性, 酶联免疫法); 婴儿按 0、1、6 个月程序接种剂量为 5 μg/0.5 ml 重组酵母乙肝疫苗(未注射乙肝免疫球蛋白), 于婴儿 1~2 岁时采集血清, 置 -70℃ 冰箱保存。本试验方案经伦理委员会审核同意, 受试者均签署知情同意书。

2. 方法: 选用美国 Abbott 放射免疫试剂盒 (RIA) 检测母婴 HBsAg 及 婴儿抗-HBs。选用深圳匹基 HBV 核酸扩增荧光定量试剂盒检测 HBV DNA。按试剂盒说明书操作和判断结果。根据 HBV 序列, 利用 Primer 5.0 软件设计特异性扩增 HBV“a”决定簇引物, 上游引物 Y1: 5'-GGT TGT TGC CCG TTT GTC CTC T-3', 下游引物 Y2: 5'-Cy3-GGC ACT AGT AAA CTG AGC CA-3'。根据文献[2-4], 选择 16 种“a”决定簇常见突变作为检测对象, 分别为 126 位 T/I 突变为 A(a [c/t]t 突变为 gct)、126 位 T/I 突变为 S(a [c/t]t 突变为 agt 或 tct, 分别记作 126S-1 和 126S-2)、129 位 Q 突变为 R(caa 突变为 cga)、129 位 Q 突变为 L(caa 突变为 cta)、129 位 Q 突变为 H(caa 突变为 cac 或 cat, 分别记作 129H-1 和 129H-2)、133 位 M 突变为 T(atg 突变为 acg)、142 位 P 突变为 S(cct 突变为 tct)、142 位 P 突变为 L(cct 突变为 ctt)、144 位 D 突变为 A(gac 突变为 aga)、145 位 G 突变为 R(gga 突变为 gaa)、145 位 G 突变为 E(gga 突变为 gaa)、144 位 D 和 145 位 G 突变为 AR(gac gga 突变为 gcc aga)、144 位 D 和 145 位 G 突变为 AE(gac gga 突变为 gcc gaa)、147 位 C 突变为 Y(tgc 突变为 tac)。由于待测突变位点两端存在正常的核苷酸变异^[5], 因此用 Primer 5.0 软件分别设计针对待测突变和野生序列的简并探针(表 1)。采用标准亚磷酸胺化学方法在 DNA 自动合成仪上合成寡核苷酸, 在引物 Y2 合成中,

用 Cy3 亚磷酸试剂在 5' 端进行荧光标记, 对所有探针 3' 端进行氨基修饰, 氨基与探针序列之间以间隔臂(聚乙二醇磷酸化试剂)相连, 合成结束后用浓氨水 55℃ 作用 15 h 进行脱保护和切割, 寡核苷酸纯化柱(OPC)反相柱纯化。

选用德国 Qiagen 公司 QLAamp MinElute Virus Spin Kit 提取 HBV DNA, 按说明书进行操作。PCR 扩增: PCR 反应总体积 20 μl, 其中模板 DNA 1 μl, 引物 Y1 0.2 μmol/L, 引物 Y2 2 μmol/L, dNTP 200 μmol/L, Ex-Taq DNA 聚合酶 0.5 U。PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 20 s, 54℃ 20 s, 72℃ 20 s, 循环 30 次; 72℃ 10 min。

(1) HBV 质粒参考品构建: 以构建成功的 HBV 野生株重组质粒为模板, 采用突变引物 PCR 扩增产生定点突变的方法, 在目标片段的特定位点引入突变碱基, 纯化目标片段, 用 T4 DNA 连接酶连接至 pGEM-T 载体, 转化感受态大肠埃希菌 DH5α 并经测序验证。紫外分光光度计测定核酸浓度, 用去离子水配制成 10⁶ 拷贝/μl 的原始参考品。以野生株和突变株质粒作为 PCR 标准模板, 来优化芯片杂交条件以及建立完全匹配与单碱基错配的探针间信号强度的比值。

(2) 寡核苷酸芯片制备: 将探针用点样液稀释至终浓度 50 μmol/L, 各取 6 μl 转移至 384 孔板。用微

表1 HBV“a”决定簇热点突变检测探针序列

检测的氨基酸	探针编号	探针序列	长度(bp)
126T/I	P1	5'-CTGCAC [G/A]A [C/T]TCCTGCTC	17
126A	P2	5'-CTGCAC [G/A]GCTCCTGCTC	17
126S-1	P3	5'-TGCAC [G/A]AGTCTCTGCTC	16
126S-2	P4	5'-CTGCAC [G/A]TCTCCTGCTC	17
129Q+133M	P5	5'-CTCAAGGAACCTCTATGT	18
129R	P6	5'-TCCTGCTCGAGAACCTC	18
129L	P7	5'-CTGCTCTAGGAACCTCT	17
129H-1	P8	5'-CTGCTCAGGAACCTCT	17
129H-2	P9	5'-CTGCTCATGGAACCTCT	17
133T	P10	5'-AACCTCTACGTTTCCCTC	18
142P+144D+145G	P11	5'-AAACCT [T/A]CGGACGGAAA	17
142S	P12	5'-GTACAAAACT [T/A]CGGAC	17
142L	P13	5'-GTACAAAACT [T/A]CGGAC	17
144A	P14	5'-AACCT [T/A]CGGCCGAAA	16
145R	P15	5'-CCT [T/A]CGGACAGAAA [C/T]TGC	18
145E	P16	5'-CT [T/A]CGGACGAAA [C/T]TGC	17
144A+145R	P17	5'-CCT [T/A]CGGCCAGAAA [C/T]TGC	18
144A+145E	P18	5'-CCT [T/A]CGGCCGAAA [C/T]TGC	18
147C	P19	5'-AAA [T/C]TGCAC [T/C]TGTATTCC	18
147Y	P20	5'-CGGAAA [T/C]TACAC [T/C]TGTAT	18
阴性探针	P21	5'-TGACATGAGGATTTACCG	17

注: 探针序列中标下划线处为待测突变

阵列点样仪将探针点至醛基化玻片上，每点体积约为 0.5 nl，直径约为 200 μm，点样时保持相对湿度 80%，温度 23℃。用已制备好的检测 126A、126S-1、126S-2、144A、145R、145E、144A + 145R、144A + 145E 突变的基因芯片和此次制备的检测 129R、129L、129H-1、129H-2、133T、142S、142L 和 147Y 突变的基因芯片对样本进行检测。Cy3 标记的单链 PCR 产物与杂交液(6 × SSC, 0.2% SDS)混合，转移 10 μl 混合液至芯片反应区。将芯片置于杂交盒中，48℃ 水浴杂交 1 h。杂交后的芯片依次在洗液 A(1 × SSC, 0.2% SDS)、洗液 B(0.2 × SSC)和洗液 C(0.1 × SSC)中分别洗涤 1 min。使用激光共聚焦扫描仪在激发波长 540 nm，发射波长 570 nm (Cy3) 扫描杂交芯片，产生分析精度为 10 μm 的 16 位 TIFF 图像，在扣除背景值后，重复点的均值即为每条探针的信号强度，并用配套 Genepix Pro 4.0 程序对扫描结果进行分析。根据野生型与突变型质粒参考品的杂交结果，确定杂交信号判断标准^[6]。

(3)DNA 测序验证:挑选 6 份样本进行 PCR 产物直接测序，每份样本挑选 10 例阳性克隆进行测序，由北京华大基因有限公司负责测序。

3. 统计学分析:用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。

结 果

1. 特异性检测: 129R、129L、129H-1、129H-2、133T、142S、147Y 突变株参考品和野生株参考品的 PCR 扩增产物进行基因芯片杂交，芯片阵列见图 1。基因芯片能特异检出“a”决定簇热点突变参考品和野生型参考品(图 2)。

2. 测序:选择 6 份样本，每份样本挑选 10 例阳性克隆，共 60 例克隆进行测序。样本 M928 的克隆测序检测出 1 例 134L 突变，M2016 的克隆测序检测出 1 例 144A 突变，而基因芯片法未检出该 2 例突变。其余克隆测序结果与基因芯片法检测结果一致，而 PCR 产物直接测序仅检出优势株(表 2)。

3. “a”决定簇突变率:47 例阻断失败的母亲中，

P5	P6	P7	P8	P9	P10
P5	P6	P7	P8	P9	P10
P5	P6	P7	P8	P9	P10
P11	P12	P13	P19	P20	P21
P11	P12	P13	P19	P20	P21
P11	P12	P13	P19	P20	P21

图1 基因芯片阵列示意图

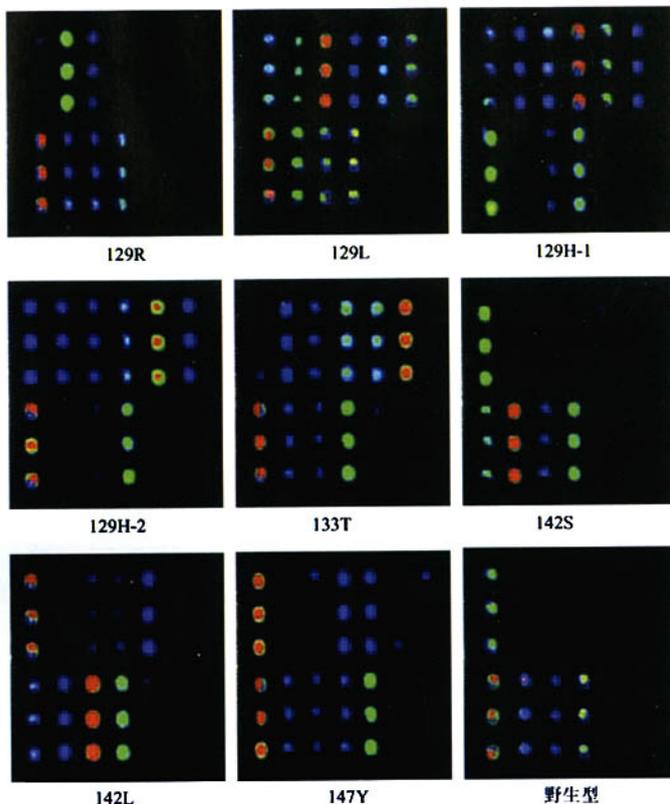


图2 基因芯片检测参考品特异性结果

15 例(31.91%) 检测出“a”决定簇突变,47 例阻断失败的婴儿中,14 例(29.79%) 检测出“a”决定簇突变;323 例阻断成功的母亲中,68 例(21.05%) 检测出“a”决定簇突变,三组突变率的差异无统计学意义($\chi^2 = 3.98, P = 0.137$)。

4. HBV 各种毒株检出率:417 例阻断成功和失败的样本中,基因芯片测得 WT(野生株)阳性率最高(78.66%),依次为 126A(11.27%)、145R(5.76%)、126S-1(5.28%)、126S-2(4.56%)、129H(1.20%)、144A(0.72%)、129R(0.24%)。126A 阳性率显著高于 126S-1、126S-2、129R、129H、144A 和 145R(P 值均 < 0.01)。

5. 感染 HBV 突变株情况:由表 3 可见,母婴均感染突变株的阻断失败组与阻断成功组,其感染各种突

变株发生率的差异无统计学意义(对于 126A、126S-1、126S-2 和 145R 突变株,两组间 P 值均 >0.05)。

表2 三种方法检测的结果比较

样本编号	PCR 产物直接测序	芯片检测	克隆测序
M255	WT	WT	WT
M928	WT	WT	134L, WT
M2013	126S-1	126S-1, WT	126S-1, WT
M2016	126S-2	126S-2, 126S-1, WT	126S-2, 126S-1, WT, 144A
5M	144A	144A, WT	144A, WT
10M	WT	WT	WT

表3 配对母婴感染 HBV“a”决定簇 126、145 位点突变株结果

感染 HBV 突变株情况	126A	126S-1	126S-2	145R
阻断失败组(47 对)				
母婴均感染	5(10.63)	1(2.13)	1(2.13)	2(4.26)
母亲未感染婴儿感染	2(4.26)	3(6.38)	2(4.26)	3(6.38)
母亲感染婴儿未感染	3(6.38)	2(4.26)	1(2.13)	4(8.51)
合计	10(21.28)	6(12.77)	4(8.51)	9(19.15)
阻断成功组(323 例)				
母亲感染婴儿未感染	32(9.91)	14(4.33)	15(4.64)	13(4.02)

注:括号外数据为例数,括号内数据为发生率(%);母婴均感染突变株的阻断失败组与阻断成功组间 126A($\chi^2=0.00, P=1.000$)、126S-1($\chi^2=0.10, P=0.748$)、126S-2($\chi^2=0.17, P=0.683$)、145R($\chi^2=0.00, P=1.000$)

讨 论

高危新生儿接种乙肝疫苗后可有效预防感染 HBV,疫苗保护率达到 87.29%^[7],但仍有一定比例的母婴传播阻断失败,其原因可能与母亲 HBV“a”决定簇突变、DNA 水平、基因型等因素有关,但尚无明确证据。因此,建立灵敏、特异的检测突变株的方法十分重要。目前,常用检测“a”决定簇突变株的方法为 PCR 产物直接测序法。有学者发现,“a”决定簇突变株主要是劣势毒株,PCR 产物直接测序法很难检测出^[8]。基因芯片技术具有高通量、高灵敏、自动化等特点,适宜于 HBV“a”决定簇突变的研究要求。因此,本试验建立了能特异、灵敏检测“a”决定簇热点突变的基因芯片法。克隆测序证实,在 60 例克隆中,除 1 例 134L 突变由于基因芯片中未设计相应探针而未检出,另 1 例由于 144A 后插入一个核苷酸而影响基因芯片的检出外,其余特定位点的突变株均能用基因芯片法检出。

基因芯片法检测结果表明,野生株仍为主要流行株,但 126、129、144、145 位点突变也存在,其中

126 A 突变较常见(阳性率为 11.27%),即发现突变多位于“a”决定簇的第一个环。这与国外文献报道的氨基酸突变多位于第二个环不同^[9]。但是,国内也有学者发现^[10, 11],突变多集中于“a”决定簇的第一个环。

为研究突变是否与阻断失败有关,本试验对阻断成功和失败的配对母婴样本进行特异位点的突变分析,根据这些配对母婴有无特异的突变株检出,证明现有疫苗是否能阻断突变株病毒的母婴传播。结果发现,阻断失败组和阻断成功组中,126A、126S-1、126S-2、145R 的母婴传播率差异无统计学意义,提示现有疫苗能阻断 HBV 特定位点突变的母婴传播。因此,目前毋需研制针对 126 和 145 位点突变的新型乙肝疫苗。

本研究建立的基因芯片法能特异、快速检出 HBV“a”决定簇多个热点突变,检测灵敏度显著优于 PCR 产物直接测序法。研究表明,现有疫苗虽可阻断 126A、126S、145R 热点突变株的传播,但需加强对突变株的流行病学监测。

参 考 文 献

- [1] Zuckerman JN, Zuckerman AJ. Mutations of the surface protein of hepatitis B virus. *Antiviral Research*, 2003, 60(2):75-78.
- [2] Cooreman MP, Leroux-Roels G, Paulij WP. Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *J Biomed Sci*, 2001, 8(3):237-247.
- [3] 付海军, 李荣成, 马景臣, 等. 接种乙肝疫苗后 HBsAg 携带者 S 区“a”决定簇变异. *中华传染病杂志*, 2002, 20(1):17-20.
- [4] 孙剑, 侯金林, 陈金军. 乙肝病毒 S 基因变异研究进展. *国外医学病毒学分册*, 1999, 6(3): 84-88.
- [5] 王佑春, 林京香, 张华远, 等. 乙型肝炎病毒 S 基因变异株的研究. *中国生物制品学杂志*, 2000, 13(2):65-67.
- [6] 张瑞, 李荣成, 李艳萍, 等. 检测乙型肝炎病毒“a”决定簇热点突变基因芯片的制备和初步应用. *中华肝脏病杂志*, 2007, 15:88-91.
- [7] 梁争论, 李河民, 张华远. 基因工程乙型肝炎疫苗免疫原性和免疫效果的评价. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, 23(9): 663-665.
- [8] 夏国良, Omana VN, 贾志远, 等. 单纯乙型肝炎疫苗免疫后携带者表面抗原氨基酸置换的频率特征. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2001, 15(3):212-215.
- [9] Francois G, Kew M, Van Damme P, et al. Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications? *Vaccine*, 2001, 19(28-29):3799-3815.
- [10] 侯金林, 廖慧钰, 王战会, 等. 在中国发现的几种乙型肝炎病毒外膜基因变异株. *中华医学杂志*, 1997, 77(8):608-609.
- [11] 徐陈槐, 黄晓燕, 刘克洲, 等. 乙型肝炎疫苗母婴阻断失败与乙型肝炎病毒 S 基因变异. *中华传染病杂志*, 2002, 20(1): 33-36.

(收稿日期:2007-02-01)

(本文编辑:张林东)