

• 论 著 •

HBsAg+ /HBsAb+ 乙型肝炎患者 S 区基因克隆及碱基序列分析*

王 蕾, 宁小晓
(上海中医药大学附属龙华医院检验科 200032)

摘 要:目的 研究 HBsAg+ /HBsAb+ 乙型肝炎患者直接测序图中套峰现象,观察克隆后碱基差异,并分析其同源性。方法 出现套峰的标本中选取 3 例双阳乙型肝炎患者为实验组,4 例单阳患者作为对照组,对 S 区基因克隆测序分析。结果 同一患者不同克隆株的碱基序列并不一致;实验组的碱基突变率显著高于对照组($P=0.000$);两组患者的病毒同源性差异无统计学意义($P=1.000$)。结论 实验组患者 HBV 的复杂程度更高。同一患者体内有几种病毒株,使直接测序图中出现套峰;不同克隆株的碱基差异不至于构成不同的基因型或血清型,仍属于准种。

关键词:肝炎病毒,乙型; 肝炎抗原,乙型; 肝炎抗体,乙型; 突变; 克隆,生物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.004 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2011)16-1794-03

Sequence cloning and analysis of the S gene region in HBV DNA from patients for HBsAg+ /HBsAb+ *

Wang Lei[△], Ning Xiaoxiao

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated of Longhua Hospital Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Abstract: Objective To study the double-peak phenomenon on the direct sequencing chromatograms from HBsAg+ /HBsAb+ patients in previous study, observe the change of nucleotide mutations on after cloning and analyze its homology. **Methods** HBsAg+ /HBsAb+ patients with the double-peak phenomenon were tested as an experimental group ($n=3$), and HBsAg+ /HBsAb- patients with the double-peak phenomenon were served as a control group ($n=4$). The S gene of HBV DNA was amplified, cloned and sequenced. **Results** The sequencing results were not same. Furthermore, the rate of mutation of the experimental group was significantly higher than control group. In addition, there were no statistically significant difference in homology among both groups. **Conclusion** The HBV genome of the experimental group is more complex than that of the control group. There are some kinds of different HBV strains in one patient, which is the cause of the double-peak phenomenon in direct sequencing. However, the different nucleotide mutations between HBV strains were too little to represent a different genotype or serotype, which is called a quasispecies.

Key words: hepatitis B virus; hepatitis B antigens; hepatitis B antibodies; mutation; cloning, organism

中国是乙型肝炎病毒(HBV)感染的高流行区,1.2 亿多人有慢性感染^[1-2]。一般认为,HBsAb 出现于 HBsAg 转阴后一段时间,是病毒清除的典型特征,所以 HBsAg 与 HBsAb 理论上是不能在同一患者血清中同时检测到的。自 1976 年首次发现这一现象以来^[3-4],关于 HBsAg 与 HBsAb 同时阳性的研究屡有报道^[5-10]。本研究前期发现,部分 HBsAg+ /HBsAb+ 患者标本出现套峰现象。现选取部分有套峰现象的标本进行克隆测序,以求更深入、更全面地探讨 HBV 病毒株 S 区突变的特点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 在前期研究直接测序发生套峰现象的标本中,选取 3 例 HBsAg+ /HBsAb+ 乙型肝炎患者标本作为实验组。4 例在肝功能、HBV DNA 拷贝数等与实验组较匹配的 HBsAg+ /HBsAb- 乙型肝炎患者标本作为对照组。所有患者标本直接测序均为 C 基因型^[11]。

1.2 仪器与试剂 采用 ABI 7000 全自动基因扩增检测仪和 ABI3730 基因分析仪,(美国应用生物公司)。采用 HBV-DNA 荧光定量试剂盒(上海克隆生物高技术有限公司);克隆试剂盒、IPTG、X-Gal 和氨苄西林购自天根生化科技(北京)有限公

司。

1.3 方法 从患者血清中提取 HBV DNA,设计 PCR 扩增所需引物(引物序列由上海超世生物公司合成。上游引物:5' CTG CTG GTG GCT CCA GTT 3');下游引物:5' GCC TTG TAA GTT GGC GAG AA 3',扩增出目的片段,PCR 反应条件为 94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,45 个循环,72 ℃ 5 min。将纯化的 PCR 产物进行 T-A 克隆。克隆成功后,每个标本随机挑取约 10 个白色阳性克隆,进一步摇菌后进行测序(测序引物使用扩增引物)。

1.4 统计学处理 采用 Excel 软件进行数据整理,SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,突变率比较采用四格表 χ^2 检验和 Fisher 精确概率检验,以 $P<0.05$ (双侧)为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBV S 基因转化连接及 PCR 产物克隆结果 见表 1。

2.2 HBV S 基因碱基序列分析 进行克隆测序后,套峰现象消失。克隆后进行基因型分型,未发现除 C 基因型之外的其他基因型。将实验组和对照组克隆产物测序结果与参考序列参考序列采用 Guo 等^[12]于 1999 年测得的中国人 HBV C 基因

* 基金项目:上海卫生局科研课题局级科研项目(2007066)。

型序列,与其进行比对。发现在该区域内的 3 种碱基突变中,碱基替换最为常见。对照组中平均碱基替换率为 1.14%,缺失率为 0.01%,插入率为 0.01%;实验组中平均碱基替换率为 1.70%,缺失率为 0.01%,插入率为 0.01%。实验组突变率远

高于对照组($P=0.000$)。将各克隆产物测序结果与原标本直接测序结果汇总比对,发现在出现套峰的位点其不同克隆株之间的所表达的碱基并不完全相同,见表 2。

表 1 PCR 产物克隆结果

组别	标本号	克隆株
对照组($n=28$)	101	1102,1103,1104,1106
	103	1301,1302,1303,1304,1305,1306
	105	1501,1502,1503,1505,1506,1507,1510,1511,1512
	106	1601,1602,1603,1605,1606,1607,1609,1610,1612
实验组($n=28$)	201	2101,2102,2103,2104,2105,2111,2113,2114,2115,2116
	202	2202,2203,2204,2206,2207,2212,2213,2214,2215,2217,2219
	204	2401,2402,2404,2405,2406,2411,2420

对照组的标本号为 101、103、105、106,实验组为 201、202、204。“1302”表示标本 103 的第 2 株克隆,其中“1”表示对照组,“3”表示对照组的第 3 个标本,“2”表示该标本的第 2 个克隆株。

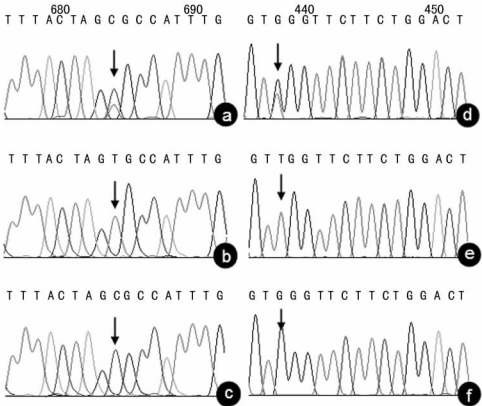
表 2 不同克隆株碱基突变统计

样本号 (克隆数)	套峰发生 位点	参考序列 碱基	直接测序 碱基	克隆测序 碱基
101($n=4$)	nt216	T	T	T(2)/C(2)
	nt375	G	G	G(2)/T(2)
	nt446	C	G	C(2)/G(2)
103($n=6$)	nt336	C	C	C(5)/A(1)
	nt587	G	G	G(2)/A(4)
105($n=9$)	nt294	C	C	C(7)/T(2)
	nt657	T	T	T(5)/C(4)
	nt684	T	C	T(3)/C(6)
106($n=9$)	nt762	C	G	C(1)/G(7)/A(1)
	nt441	T	T	T(4)/C(5)
201($n=10$)	nt201	A	C	A(7)/C(3)
	nt438	T	G	T(6)/G(4)
	nt453	A	A	A(4)/G(6)
	nt454	C	C	C(4)/T(6)
	nt456	A	A	A(6)/G(4)
	nt783	G	G	G(4)/T(6)
202($n=11$)	nt195	T	C	T(3)/C(8)
	nt240	C	T	C(4)/T(7)
	nt435	T	T	T(8)/C(2)/G(1)
	nt455	C	C	C(6)/A(5)
	nt732	C	C	C(7)/T(4)
	nt748	G	G	G(9)/A(2)
204($n=7$)	nt750	G	G	G(9)/T(2)
	nt766	T	A	T(2)/A(9)
	nt457	A	G	A(7)/G(0)
	nt587	G	G	G(5)/A(2)

表中 T(2)/C(2)表示标本 101 在 nt216 位点上直接测序表现为 T/C 套峰,而 4 株阳性克隆测序显示有 2 株在该位点上为 T,2 株为 C。灰色表示该样本直接测序结果显示碱基在该位点发生了突变。

2.3 测序图中套峰与碱基突变的关系 出现套峰的位点同一标本不同克隆株之间的所表达的碱基是不同的,见图 1。

2.4 HBV 实验组和的对照组克隆株 S 基因同源性比较 将各个标本的克隆株进行进化距离和同源性的比较发现,对照组的进化距离为 0.000~0.025,同源性为 97.5%~100%;实验组的进化距离为 0.000~0.024,同源性为 97.6%~100%。两者差异无统计学意义($P=1.000$)。



a、b、c:对照组标本 105 的测序图谱,标本 105 的直接测序图谱(a)在 nt684 出现 C/T 套峰,而其克隆株 1502(b)和 1505(c)在该位点分别表示为单一的 T 峰和 C 峰;d、e、f:实验组标本 201 的测序图谱,标本 201 的直接测序图谱(d)中 nt438 出现 G/T 套峰,而其克隆株 2101(e)和 2102(f)在该位点分别表示为单一的 T 峰和 G 峰。

图 1 标本 105、201 及其克隆株部分序列图片段

3 讨 论

对同一患者的不同克隆株的比对分析后发现各碱基序列不尽相同,说明同一患者的血清中确实存在不同的病毒株。从表 2 结果可见,随机选取的阳性克隆在相应套峰位点表达的碱基与直接测序所得碱基大部分相同(19/26),因此,一般而言克隆数较多的碱基在套峰位点峰值较高,说明直接测序更容易测出优势病毒株。如对照组 105 样本,在 nt684 位点直接测序出现套峰,克隆后发现 3 株克隆在该位点为 T,6 株为 C 峰,C 峰为优势株的碱基且信号更强;但是也发现有例外情况,如实验组 201 的 nt438 位点虽然 4 株克隆为 G 峰,6 株为 T 峰,而直接测序时 G 峰信号更强。此外,实验组 203 在 nt457 位点,5

株克隆中均表达为 A 峰,直接测序结果却为 G 峰。上述现象可能与选取的克隆数量有关,如适当扩大测序的克隆数量,可能得到更全面的统计结果。

患者感染了 HBV,经过免疫逃避机制后,可能出现新的病毒株。而在免疫压力下,优势株不断改变,HBV 各病毒株间的比率也是不断变化的,患者体内可能同时有几种病毒基因的不同突变组合,所以会在同一位点表达不同的碱基,造成同一患者不同病毒株的基因序列的差异。在本研究中,实验组的碱基突变率远高于对照组,差异有统计学意义($P=0.000$),说明实验组病毒群体复杂程度更高,这似乎解释了为何实验组更易出现套峰的原因,同时这也可能是导致 HBsAg 与 HBsAb 同时阳性的乙型肝炎患者病程长,预后差的原因之一。

本研究中对照组与实验组的进化距离和同源性差异均无统计学意义。HBV 同 HCV、HIV 类似,也可能存在准种现象^[13]。在病毒复制过程中,由于 HBV 多聚酶的逆转录功能域缺少 3′~5′校对功能,从而形成核苷酸序列高度一致但又存有差异的一群子代病毒组,即形成准种群,但各准种之间的差别不至于构成不同的基因型或血清型。

综上所述,在免疫压力下,患者血清中的病毒株部分发生突变,使得直接测序图中部分位点出现套峰,而 HBsAg+/HBsAb+患者发生碱基突变更多,其病毒基因组的复杂程度更高。然而 HBV 不同克隆株的这些碱基差异不至于构成不同的基因型或血清型,仍然属于准种。另外,直接测序法快速简便^[14],有利于宏观上了解病毒株整体的基因序列状况,在不了解其突变特点时可以进行初筛。但要研究特定序列的突变特点,在病毒基因组复杂性较高、序列差异较大时,应对其 PCR 产物进一步克隆纯化后再测序确定其序列。

参考文献

[1] Luo Z, Xie Y, Deng M, et al. Prevalence of hepatitis B in the southeast of China: a population-based study with a large sample size[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2011, 23(8): 695-700.

[2] Zhao SS, Tang LH, Dai XH, et al. Comparison of the efficacy of tenofovir and adefovir in the treatment of chronic hepatitis B: a systematic review[J]. Virol J, 2011, 8: 111.

[3] Tabor E, Gerety RJ, Smallwood LA, et al. Coincident hepatitis B

surface antigen and antibodies of different subtypes in human serum[J]. J Immunol, 1977, 118(1): 369-370.

[4] Biswas R, Gerlich WH, Schober A, et al. Determination of antibodies against subtypes of hepatitis B surface antigen (HBsAg) (proceedings) [J]. Zentralbl Bakteriell Orig A, 1976, 235 (1-3): 310-315.

[5] Lada O, Benhamou Y, Poynard T, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of “a” determinant variants[J]. Virol J, 2006, 80(6): 2968-2975.

[6] Zhang JM, Xu Y, Wang XY, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(9): 1161-1169.

[7] Colson P, Borentain P, Motte A, et al. Clinical and virological significance of the co-existence of HBsAg and anti-HBs antibodies in hepatitis B chronic carriers[J]. Virology, 2007, 367(1): 30-40.

[8] Zhang Z, Li L, Tian Y, et al. HBsAg/HBsAb double positive hepatitis B virus infection model in vitro and in vivo[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(5): 575-579.

[9] Zhang ZH, Peng J, Xia JB, et al. S gene mutations in HBsAg/HBsAb double positive chronic hepatitis B patients[J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2009, 17(4): 266-270.

[10] Wang L, Liu H, Ning X, et al. Sequence analysis of the S gene region in HBV DNA from patients positive for both HBsAg and HBsAb tests[J]. Hepatol Res, 2010, 40(12): 1212-1218.

[11] 王蕾, 刘华, 宁小晓, 等. HBsAg 和 HBsAb 双阳性慢性乙肝患者血清中 HBV 基因型与 S 区突变的关系[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, 30(10): 1226-1230.

[12] Guo YB, Hou JL, Dai W, et al. Establishment of the consensus sequence of hepatitis B virus prevailing in the mainland of China [J]. Chin J Microbiol Immunol, 1999, 19(3): 197-200.

[13] 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 62.

[14] 李媛, 侯可雷, 张静, 等. 杓楔 atpB-rbcL 序列 2 种测序方法的比较分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(20): 9405-9406.

(收稿日期: 2011-05-20)

(上接第 1793 页)

Chemother, 1998, 42(9): 2304-2311.

[5] 褚小玲, 孙立元, 朱英, 等. 急性泌尿生殖道症状患者支原体感染及抗生素的选择[J]. 中国皮肤性病杂志, 2003, 17(2): 115-116.

[6] Kenny GE, Young PA, Cartwright FD, et al. Sparfloxacin selects gyrase mutation in first-step mycoplasma hominis mutants, whereas ofloxacin selects topoisomerase IV mutation[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(10): 2493-2496.

[7] Bebear CM, Renaudin H, Charron A, et al. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of ureaplasma spp. and mycoplasma hominis resistant to fluoroquinolones[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(10): 3323-3325.

[8] 张冉, 吴移谋, 陈丽丽, 等. 次抑菌浓度喹诺酮类药物体外诱导人型支原体 ParE 基因突变的研究[J]. 衡阳医学院学报, 2000, 28(1): 8-10.

[9] Bebear CM, Bove JM, Charron A, et al. Mutations in gyrA, parC, and parE genes associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of mycoplasma hominis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(4): 954-956.

[10] 陈志和, 黄澎杰, 吴志周, 等. 人型支原体对 8 种药物的敏感性及喹诺酮类药物耐药基因 gyrA 突变的研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2003, 19(5): 424-425.

[11] 张庆, 张洪文. 人型支原体对喹诺酮类药物的耐药机制[J]. 国外医学计划生育: 生殖健康分册, 2007, 27(4): 218-222.

[12] Bebear CM, Bove JM, Bebear C, et al. Characterization of mycoplasma hominis mutations involved in resistance to fluoroquinolones[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(2): 269-273.

(收稿日期: 2011-05-09)