文章编号:0253－3626(2003)01－0039－04

# 重庆地区 HBV 流行株 PreS/S、EnhII/CP/PreC 基因标准参照序列的初步建立

许红梅，任　红，凌　宁，彭明利，卿玉玲

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所，重庆　400010)

【摘　要】目的：建立重庆地区 HBV 流行株 PreS/S、EnhII/CP/PreC 基因标准参照序列，为 HBV 变异的研究奠定基础。方法：测定 15 例无症状携带者 HBV 的 PreS/S、EnhII/CP/PreC 序列，应用同源性分析和对齐比较等方法确定基因型/血清型，并拟定标准参照序列。结果：9 株基因型 B/血清型 adw2、3 株基因型 B/血清型 ayw1、3 株基因型 C/血清型 adrq＋；建立的重庆地区 HBV 流行株(基因型 B/血清型 adw2)PreS/S、EnhII/CP/PreC 标准参照序列与华东华南地区同亚型的标准参照序列比较分别有 6 个、1 个核苷酸差异。结论：初步建立了重庆地区 HBV 流行株 PreS/S、EnhIICP/PreC 基因标准参照序列。

【关键词】乙型肝炎病毒；PreS/S、EnhII/CP/PreC；标准参照序列

【中国图书分类法分类号】R512　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－05－30

# Establishment of consensus sequence of PreS/S and EnhII/CP/PreC of hepatitis B virus prevailing in Chongqing, China

*XU Hongmei, et al*

(*Institute of Virus Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish the consensus sequence of PreS/S and EnhII/CP/PreC in Chongqing, China. *Methods*: The genes of PreS/S and EnhII/CP/PreC of HBV in 15 AsC were sequenced. The genotype and serotype of HBV were determined. The HBV strain prevailing in Chongqing was found and its consensus sequence was established. *Results*: Nine strains were genotype B/serotype adw2, 3 were genotype B/serotype ayw1 and 3 were genotype B/serotype adrq＋. There were 6 and 1 site differences between the consensus sequences of PreS/S and EnhII/CP/PreC of HBV with genotype B/serotype adw2 and that in Southeast China. *Conclusions*: The consensus sequence of PreS/S and EnhII/CP/PreC of hepatitis B virus prevailing in Chongqing was established.

【Key words】HBV; PreS/S、EnhII/CP/PreC; Consensus sequence

自 1989 年意大利学者 Carman[1] 首先发现 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、乙肝疾病过程以及乙肝预防和治疗失败等可能有十分密切的关系。判断变异是以标准序列为参照，现存的 HBV 标准参照序列大多是借用国外的流行株序列，近年郭亚兵[2]根据 7 株华南、东北地区流行株基因型 C HBV 建立了该地区的标准参照序列。由于我国地域宽阔，民族众多，HBV 毒株的分布可能因地域不同而有所不同。重庆地区是我国乙型肝炎高流行区，建立本地区 HBV 流行株标准参照序列十分有必要，也是研究乙型肝炎发病机制以及HBV变异十分重要的基础性工作。本研究拟建立本地区 HBV 流行株 RreS/S、EnhII/CP/PreC 标准参照序列，为研究本地区 HBV PreS/S、EnhII/CP/PreC 变异奠定基础。

作者介绍：许红梅(1965－　)，女，副教授，
主要研究方向：HBV 母婴传播及其变异。

## 1　材料与方法

### 1.1　研究对象

15 名 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]，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℃超低温冰箱备用。

### 1.2　主要试剂

抗 HAV－IgM、抗 HDV(北京科卫临床诊断试剂厂)，抗 HCV(厦门新创科技有限公司)，抗 HEV－IgM(北京大学医学院肝病研究所)，HBsAg、抗－HBs、HBeAg、抗－HBe、抗－

HBc(美国 Abbott 实验室)。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)。Ex Taq DAN 聚合酶(大连 Takara 生物工程公司)。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′ TTGCGGGTCACCATATTC3′、下游引物 P2 5′TAGCCCATGAACTTTAGG3′，目的基因 1290bp；扩增 EnhII/CP/PreC 上游引物 P3 5′CTTCACCTCTGCACGTTG3′、下游引物 P4 5′AACTCCACAGTAGCTCCA 3′，目的基因 355bp。

1.3 研究方法

1.3.1 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 QPCR 法。

1.3.2 血清 DNA 提取　采用酚－氯仿抽提法。

1.3.3 HBV PreS/S 及/EnhII/CP/PreC 的扩增　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℃ 5min，94℃ 50s、52℃ 50s、72℃ 90s(35 个循环)，72℃ 7min 延伸。EnhII/CP/PreC 扩增 PCR 条件为预变性 94℃ 5min，94℃ 30s、51℃ 30s、72℃ 45s(35 个循环，72℃ 7min 延伸。

1.4 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，EhnII/CP/PreC 测序引物为 P3。

1.5 序列的分析

采用 DNA SIS2.5 和 Clustalx(1.81)应用软件分析序列。

## 2 结　果

2.1 各种肝炎病毒血清学标志物的检测及血清 HBV 滴度的测定

15 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。

15 例 AsC 血清 HBV 滴度 $10^7 \sim 10^9$copies/ml (以 DNA 滴度≥$10^7$Copies/ml 为 HBV 高病毒血症，≤$10^4$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。

2.2 PreS/S 及 EnhII/CP/PreC 扩增结果

15 例病人分别扩增出 1290bp、355bp 的 DNA 片段，与预期目的基因大小相符合。

2.3 测序结果的分析

2.3.1 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%的标准[5]，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；w 亚型根据 aa127 脯氨酸/苏氨酸/亮氨酸/异亮氨酸确定 w1～4，r 亚型根据 aa159 内氨酸或缬氨酸确定 q＋或 q－[6]，进行血清分型。

15 株 HBV 中，9 株基因型 B/血清型 adw2，3 株基因型 B/血清型 ayw1，3 株基因型 C/血清型 adrq＋。故基因型 B/血清型 adw2 HBV 为重庆地区的优势株。

2.3.2 同亚型 HBV PreS/S、EnhII/CP/PreC 基因核苷酸同源性比较　表 1 表明：重庆地区各亚型 HBV、PreC、S 基因核苷酸同源性较高，其次为 EnhII/CP，PreS 核苷酸同源性较低。

**表 1　重庆地区同亚型 HBV PreS/S、EnhII/CP/PreC 核苷酸同源性比较**

| | B/adw2－B/adw2 | B/ayw1－B/ayw1 | C/adrq＋－C/adrq＋ |
|---|---|---|---|
| PreS | 93.9%～99.3% | 98.3%～99.2% | 97.3%～98.1% |
| S | 97.4%～99.6% | 98.4%～99.5% | 98.3%～99.3% |
| EnhII/CP | 96.9%～99.5% | 98.4%～99.2% | 98.0%～99.1% |
| PreC | 100% | 100% | 100% |

2.4 重庆地区 HBV 流行株 PreS/S 及 EnhII/CP/PreC 标准参照序列的初步拟定

根据标准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 及 EnhII/CP/PreC 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，即为基因型 B/血清型 adw2 HBV 流行株 PreS/S 及 EnhII/CP/PreC 标准参照序列，见图 1 和图 2。

2.5 重庆地区 HBV 流行株 PreS/S、EnhII/CP/PreC 标准参照序列与华东华南地区同亚型标准参照序列比较

重庆地 HBV 流行株 PreS/S、EnhII/CP/PreC 标准参照序列与根据 GenBank 中我国华东华南 5 株亚型相同 HBV 序列建立的参照序列进行比较(5 例患者均为 AsC，登陆号码分别为：AF100308、AF100309、AF461363、AF282917、AF282918)，结果见表 2。

经比较，两地区基因型 B/血清型 adw2 HBV 的 PreS/S 标准参照序列有 6 个核苷酸差异，可致 5 个

氨基酸差异，同源性分别 99.5%、98.8%。差异主要位于 PreS，S 基因差异少，编码 a 决定簇的区域无差异。EnhII/CP/PreC 有 1 个核苷酸差异（位于 EnhII/CP 区域），可致 1 个氨基酸差异，核苷酸同源性为 99.6%。

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2848 | ATGGGAGGTT | GGTCTTCCAA | ACCTCGAAAA | GGCATGGGGA | CAAATCTTTC | TGTCCCCAAT |
| 2908 | CCCCTGGGAT | TCTTCCCCGA | TCATCAGTTG | GACCCTGCAT | TCAAAGCCAA | CTCAGAAAAT |
| 2968 | CCAGATTGGG | ACCTCAACCC | GCACAAGGAC | AACTGGCCGG | ACGCCAACAA | GGTGGGAGTG |
| 3028 | GGAGCATTCG | GGCCAGGGTT | CACCCCTCCC | CATGGGGGAC | TGTTGGGGTG | GAGCCCTCAG |
| 3088 | GCTCAGGGCC | TACTCACAAC | TGTGCCAGCA | GCTCCTCCTC | CTGCCTCCAC | CAATCGGCAG |
| 3148 | TCAGGAAGGC | AGCCTACTCC | CATATCTCCA | CCTCTAAGAG | ACAGTCATCC | TCAGGCCATG |
| 3208 | CAGTGGAACT | CCACCACTTT | CCACCAAGCT | CTTCAAGATC | CCAGAGTCAG | GGCCCTGTAC |
| 53 | TTTCCTGCTG | GTGGCTCCAG | TTCAGGAACA | GTGAGCCCTG | CTCAGAATAC | TGTCTCTGCC |
| 113 | ATATCGTCAA | TCTTATCGAA | GACTGGGGAC | CCTGTACCGA | ACATGGAGAA | CATCACATCA |
| 173 | GGACTCCTAG | GACCCCTGCT | CGTGTTACAG | GCGGGGTTTT | TCTTGTTGAC | AAAAATCCTC |
| 233 | ACAATACCAC | AGAGTCTAGA | CTCGTGGTGG | ACTTCTCTCA | ATTTTCTAGG | GGGAACACCC |
| 293 | GTGTTGCTTG | GCCAAAATTC | GCAGTCCCAA | ATCTCCAGTC | ACTCACCAAC | CTGTTGTCCT |
| 353 | CCAATTTGTC | CTGGTTATCG | CTGGATGTGT | CTGCGGCGTT | TTATCATCTT | CCTCTGCATC |
| 413 | CTGCTGCTAT | GCCTCATCTT | CTTGTTGGTT | CTTCTGGACT | ATCAAGGTAT | GTTGCCCGTT |
| 473 | TGTCCTCTAA | TTCCAGGATC | ATCAACAACC | AGCACCGGAC | CATGCAAAAC | CTGCACAACT |
| 533 | CCTGCTCAAG | GAACCTCTAT | GTTTCCCTCA | TGTTGCTGTA | CAAAACCTAC | GGACGGAAAC |
| 593 | TGCACCTGTA | TTCCCATCCC | ATCATCTTGG | GCTTTCGCAA | AATACCTATG | GGAGTGGGCC |
| 653 | TCAGTCCGTT | TCTCTTGGCT | CAGTTTACTA | GTGCCATTTG | TTCAGTGGTT | CGTAGGGCTT |
| 713 | TCCCCCACTG | TCTGGCTTTC | AGTTATATGG | ATGATGTGGT | ATTGGGGGCC | AACTCTGTAC |
| 773 | AACATCTTGA | GTCCCTTTAT | GCCGCTGTTA | CCAATTTTCT | TTTGTCTTTG | GGTATACATT |
| 833 | TGA 835 | | | | | |

**图 1 重庆地区 HBV 流行株 PreS/S 基因标准参照序列(nt2848～3215～0～835)**

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1624 | ACGCCCACCG | GAACCTGCCC | AAGGTCTTGC | ATAAGAGGAC | TCTTGGACTT | TCAGCAATGT |
| 1684 | CAACGACCGA | CCTTGAGGCA | TACTTCAAAG | ACTGTGTGTT | TAATGAGTGG | GAGGAGTTGG |
| 1744 | GGGAGGAGAT | TAGGTTAAAG | GTCTTTGTAC | TAGGAGGCTG | TAGGCATAAA | TTGGTGTGTT |
| 1804 | CACCAGCACC | ATGCAACTTT | TTCACCTCTG | CCTAATCATC | TCATGTTCAT | GTCCTACTGT |
| 1864 | TCAAGCCTCC | AAGCTGTGCC | TTGGGTGGCT | TTGGGGC 1900 | | |

**图 2 重庆地区 HBV 流行株 EnhII/CP/PreC 标准参照序列(nt1624～1900)**

**表 2 重庆地区 HBV 流行株 PreS/S 和 EnhII/CP/PreC 标准参照序列与华东华南地区同亚型标准参照序列比较**

| | PreS/S | | | | | | EnhII/CP/PreC |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| No. of. Position | 3172 | 3186 | 3191 | 20 | 108 | 753 | 1632 |
| Chongqing | A | A | G | G | C | A | C |
| Southeast of China | T | G | C | A | A | T | A |

Position of putative EcoR I site is defined as 1

## 3 讨 论

AsC 是我国 HBV 感染最主要的传染源，其形成与母婴传播有关，由于机体过早接触 HBV，使机体对其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。在 AsC 体内 HBV 受到的免疫压力小，变异发生率相对低，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 AsC 为研究对象较为合理。

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[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%对 HBV 进行分型，建立了 HBV 基因分型方法。其后 Norder[5]证明编码 HBsAg 的 S 基因异质性≥4%进行基因分型与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。种系发生关系显示，F 型是 HBV 最原始的一簇，B 和 C，A、D 和 E 亲缘关系较近[6]。基因型有一定的地域分布，亚洲东部以 B、C 流行为主[9]。国内研究[10,11]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 adrq+，在西部地区还存在基因型 B/血清型 ayw1，与重庆地区以基因型 B/血清型 adw2 HBV 为优势株、基因型 C/血清型 adrq + 和基因型 B/血清型 ayw1 HBV 也占一定比例的结果一致。

本课题显示重庆地区 HBV 流行株 PreS/S、EnhII/CP/PreC 标准参照序列与华东华南地区同亚型的标准参照序列比较，PreS/S 有 6 个核苷酸差异、可致 5 个氨基酸差异，EnhII/CP/PreC 有 1 个核苷酸差异，可致 1 个氨基酸差异。PreS 基因差异较多，EnhII、CP 和 S 基因差异较少，PreC 以及 S 基因编码 a 决定簇的核苷酸序列很稳定，均无差异。说明两地区同亚型 HBV 存在一定的差异。所以在进行 HBV 基因变异研究时务必以本地区的标准序列作为参照进行比较，才能得出正确的结论，否则会将某些差异误作为变异。

## 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 [J]. Lancet, 1989; 2(8663): 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[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，1999; 19(3): 197 - 200.

[3] 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志，2001; 19(1): 53.

[4] 成 军，杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学[M]. 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[J]. Virology, 1994; 198(2): 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 [J]. Intervirology, 1995; 38(1): 24 - 34.

[7] 郭亚兵，侯金林，戴 炜，等. 乙型肝炎病毒全基因的测定[J]. 中国病毒学，1999; 14(3): 205 - 208.

[8] Okamoto H, Tsusa F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nulectide sequence. comparison of surface antigen [J]. J Gen Virol, 1988; 69(10): 2575 - 2583.

[9] Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants , and geographic origin of hepatitis B virus - large - scale analysis using a new genotyping method [J]. J Infect Dis, 1997; 175(6): 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[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，1998; 18(2): 88 - 91.

[11] Ding X, Mizokami M, Yao G, et al. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai [J]. China. Intervirology, 2001; 44(1): 43 - 47.