维普资讯 http://www.cqvip.com

205-208

第14卷第3期 中国病毒学 Vol.14 No.3
1999年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1999

# 乙型肝炎病毒全基因序列的测定*

郭亚兵[1] 侯金林[1] 戴 炜[2] 骆抗先[1]
P. Karayiannis[3]

[1](南方医院传染病科,广州 510515)
[2](深圳东湖医院,广东深圳)
[3](英国伦敦 St. Mary's 医学院肝病实验室,英国伦敦)

R373.21

**摘 要** 测定7例慢性HBV携带者HBV基因组全序列,经同源性比较,确定基因型。2例基因型为B型,余均为C型;血清型adr 4例,adw 3例。各序列间X基因差异最大。未见$A^{1896}$、$T^{1762}A^{1764}$等重要位点的变异。结合已有的2株HBV中国流行株全基因序列,初步建立以中国流行株序列为基础的HBV标准序列,该标准序列与国外标准序列仅有22个位点的差异。

**关键词** 乙型肝炎病毒,基因,序列

我国是HBV高流行区,其流行株与欧、美和日本等低流行区应有区别。建立我国HBV流行株的基因库和标准序列,是HBV变异研究的基础工作。现存HBV标准序列多是用国外流行株全序列,而我国HBV基因全序列仅有少数几例。为此目的,测定了7例我国华南及东北地区的慢性HBV携带者HBV基因全序列。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 7例慢性HBV携带者,诊断符合1995年全国肝病会议修订诊断标准。男6例,女1例,年龄25~37岁。华南地区3例,东北地区4例。HBV血清标志物:HBsAg(+)、HBeAg(+)、HBcAg(+),余项阴性。另2株HBV全序列分别来自文献[1]和[2]。

**1.2 PCR扩增血清的HBV DNA** 常规方法抽提血清中HBV DNA,用4对引物扩增相互重叠的片段,片段f1:S1/Pol-3,f2:Reg1/Reg2,f3:M3/3C,f4:4Ca/BCS3。引物序列见表1。

**1.3 PCR产物直接测序** 用PCR产物直接测序试剂盒(T7 version 2, USB美国),按产品说明书进行。取10 μL PCR产物37℃ 15 min处理引物及游离核苷酸,85℃ 10 min后置于冰中用于测序反应。用不同的测序引物(表1)对HBV正、负链进行测序。结果用DNASIS分析软件处理。

## 2 结果

**2.1 序列同源性比较** 基因型:所测7株中有2株基因型为B型序(株间同源性为98.0%);5株基因型为C型(同源性95.7%~97.5%);B和C型间序列同源性为90%~91.5%。血清型:根据S基因编码第122位氨基酸(d/y亚型决定簇)及第160位氨基酸(w/r亚型决定族)标准[3],3例为adw,余为adr。另文献报道的2例基因型为C型。

收稿日期:1998-05-27,修回日期:1998-06-18
* 本研究受95国家自然科学基金重点课题资助(批准号:39630280)

维普资讯 http://www.cqvip.com



表1 PCR和序列分析引物序列

Table 1 Oligonucleotide sequence of primers for PCR and sequencing

| 引物 Primer | 位置 Location | 核苷酸序列 Nucleotide sequence (5′～3′) |
|---|---|---|
| S1B | nt 157～177 | ATGGAGAACATCACATCAGGA |
| Pol-3 | nt 1409～1395 | AAGGATCCAGTTGGC |
| Pol-6a | nt 781～797 | GTGAGTCCCTTTATACC |
| 2C | nt 2308～2291 | TTGGTGGTCTATAGGCTG |
| Reg1 | nt 942～960 | CTCGAGCTCTGCTTTAGAAAACTTCCT |
| Reg2′ | nt 1876～1859 | AGAAAGCTTAACTTGGAGGCTTGAACAGT |
| M3 | nt 1781～1791 | CTGGGAGGAGTTGGGGGA |
| 3C | nt 2439～2460 | CTAACATTGAGATTCCCGAGA |
| 4Ca | nt 2220～2237 | GGCTTACTTTTGGAAGAG |
| BCS3 | nt 669～689 | GGCACTAGTAAACTGAGCCA |
| Pol-1 | nt 912～895 | GCAAAGTTCCCCCAACTTC |
| X1 | nt 1298～1319 | GCTCGCAGCAGGTCTGGAGCA |
| Po3′a | nt 1676～1662 | GGAGTCCCAAGAGTCC |
| P2 | nt 1826～1806 | CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGG |
| Pol-9 | nt 1628～1642 | GCCCCATCAGATCCCTG |
| Prec/C2 | nt 1890～1912 | CTTTGGGGCATGGACATTGAC |
| Pol-8 | nt 2683～2665 | AGGATAGAATCTAGCAGGC |
| Pol-7 | nt 2882～2865 | AAGATTCGTCCCCATGCC |
| Pol-11 | nt 3183～3200 | CCACTGCATGGCCTGAGG |
| Pol-5 | nt 3137～3152 | CAATCGGCAGTCAGG |
| Pcl | nt 1811～1824 | GCGTTGGATCCGCACCATGCAACTT |

CAGCTC is recognition site of SacI, AAGCTT is recognition site of HindⅢ.

### 2.2 各株间HBV基因区的差异性比较

结果见表2。C型间的5个HBV序列各基因区核苷酸及氨基酸序列同源性比较见表2。S、C及P基因区差异性较小(同源性95%～98%),而X区差异性较大(同源性91.8%)。

### 2.3 标准序列初步拟定

比较7株C型HBV全序列,在每一位点有5株(5/7)是相同的核苷酸,即列为标准序列。由此而初步拟定中国人感染的HBV C型标准序列(图1)。该标准序列与根据GenBank中国外HBV全序列建立的标准序列相比,在个别位点上有些差异(表3)。

表2 中国HBV流行株C型间及C与B型间各基因区核酸、氨基酸序列同源性比较

Table 2 Homology comparison of nucleotide and amino acid sequences of four gene open read frames (ORF) of hepatitis B virus prevail in China within genotype C and between genotype C and B

| HBV | C—C | | C—B | |
|---|---|---|---|---|
| ORF | nt(%) | aa(%) | nt(%) | aa(%) |
| S | 98.6 | 95.6 | 93.7 | 89.9 |
| C | 97.9 | 98.0 | 96.4 | 97.2 |
| X | 94.0 | 91.8 | 91.7 | 89.0 |
| P | 97.0 | 96.8 | 90.5 | 92.0 |

C—C: Strains within genotype C.

C—B: Strains between genotype C and B.

nt: nucleotide. aa: amino acid.

## 3 讨论

我国HBsAg的流行率约为10%,南方高于北方,广东为15%;无症状携带者(AsC)是我国

维普资讯 http://www.cqvip.com



```
   1 CTCCACAACT TTCCACCAAG CTCTGCTAGA TCCCAGAGTG AGGGGCCTAT TCTTTCCTGC
  61 TGGTGGCTCC AGTTCCGGAA CAGTAAACCC TGTTCCGACT ACTGCCTCAC CCATATCGTC
 121 AATCTTCTCG AGGACTGGGG ACCCTGCACC GAACATGGAG AACACAACAT CAGGATTCCT
 181 AGGACCCCTG CTCGTGTTAC AGGCGGGGTT TTTCTTGTTG ACAAGAATCC TCACAATACC
 241 ACAGAGTCTA GACTCGTGGT GGACTTCTCT CAATTTTCTA GGGGGAGCAC CCACGTGTCC
 301 TGGCCAAAAT TCGCAGTCCC CAACCTCCAA TCACTCACCA ACCTCTTGTC CTCCAATTTG
 361 TCCTGGCTAT CGCTGGATGT GTCTGCGGCG TTTTATCATA TTCCTCTTCA TCCTGCTGCT
 421 ATGCCTCATC TTCTTGTTGG TTCTTCTGGA CTACCAAGGT ATGTTGCCCG TTTGTCCTCT
 481 ACTTCCAGGA ACATCAACTA CCAGCACGGG ACCATGCAAG ACCTGCACGA TTCCTGCTCA
 541 AGGAACCTCT ATGTTTCCCT CTTGTTGCTG TACAAAACCT TCGGACGGAA ACTGCACTTG
 601 TATTCCCATC CCATCATCTT GGGCTTTCGC AAGATTCCTA TGGGAGTGGG CCTCAGTCCG
 661 TTTCTCCTGG CTCAGTTTAC TAGTGCCATT TGTTCAGTGG TTCGTAGGGC TTTCCCCCAC
 721 TGTTTGGCTT TCAGTTATAT GGATGATGTG GTATTGGGGG CCAAGTCTGT ACAACATCTT
 781 GAGTCCCTTT TTACCTCTAT TACCAATTTT CTTTTGTCTT TGGGTATACA TTTGAACCCT
 841 AATAAAACCA AACGATGGGG CTACTCCCTT AACTTCATGG GATATGTAAT TGGAAGTTGG
 901 GGCACTTTAC CGCAGGAACA TATTGTACTA AAACTCAAGC AATGTTTTCG AAAACTGCCT
 961 GTAAATAGAC CTATTGATTG GAAAGTATGT CAAAGAATTG TGGGTCTTTT GGGCTTTGCT
1021 GCCCCTTTTA CACAATGTGG CTATCCTGCC TTAATGCCTT TATATGCATG TATACAATCT
1081 AAGCAGGCTT TCACTTTCTC GCCAACTTAC AAGGCCTTTC TGTGTAAACA ATATCTGAAC
1141 CTTTACCCCG TTGCCCGGCA ACGGCCAGGT CTCTGCCAAG TGTTTGCTGA CGCAACCCCC
1201 ACTGGATGGG GCTTGGCCAT AGGCCATCAG CGCATGCGTG GAACCTTTGT GGCTCCTCTG
1261 CCGATCCATA CTGCGGAACT CCTAGCAGCT TGTTTTGCTC GCAGCCGGTC TGGAGCAAAA
1321 CTTATCGGAA CCGACAACTC TGTTGTCCTC TCTCGGAAAT ACACCTCCTT TCCATGGCTG
1381 CTAGGGTGTG CTGCCAACTG GATCCTGCGC GGGACGTCCT TTGTCTACGT CCCGTCGGCG
1441 CTGAATCCCG CGGACGACCC GTCTCGGGGC CGTTTGGGCC TCTACCGTCC CCTTCTTCGT
1501 CTACCGTTCC GGCCGACCAC GGGGCGCACC TCTCTTTACG CGGTCTCCCC GTCTGTGCCT
1561 TCTCATCTGC CGGACCGTGT GCACTTCGCT TCACCTCTGC ACGTCGCATG GAGACCACCG
1621 TGAACGCCCA CCAGGACTTG CCCAAGGTCT TGCATAAGAG GACTCTTGGA CTCTCAGCAA
1681 TGTCAACGAC CGACCTTGAG GCATACTTCA AAGACTGTGT GTTTAAAGAC TGGGAGGAGT
1741 TGGGGGAGGA GATTAGGTTA AAGGTCTTTG TACTAGGAGG CTGTAGGCAT AAATTGGTCT
1801 GTTCACCAGC ACCATGCAAC TTTTTCACCT CTGCCTAATC ATCTCATGTT CATGTCCTAC
1861 TGTTCAAGCC TCCAAGCTGT GCCTTGGGTG GCTTTGGGGC ATGGACATTG ACCCGTATAA
1921 AGAATTTGGA GCTTCTGTGG AGTTACTCTC TTTTTTGCCT TCTGACTTCT TTCCTTCTAT
1981 TCGAGATCTC CTCGACACCG CCTCTGCTCT GTATCGGGAG GCCTTAGAGT CTCCGGAACA
2041 TTGTTCACCT CACCATACCG CACTCAGGAA AGCTATTCTG TGTTGGGGTG AGTTGATGAA
2101 TCTGGCCACC TGGGTGGGAA GTAATTTGGA AGACCCAGCA TCCAGGGAAT TAGTAGTCAG
2161 CTATGTCAAT GTTAATATGG GCCTAAAAAT CAGACAACTA TTGTGGTTTC ACATTTCCTG
2221 TCTTACTTTT GGAAGAGAAA CTGTTCTTGA GTATTTGGTG TCTTTTGGAG TGTGGATTCG
2281 CACTCCTCCT GCTTACAGAC CACCAAATGC CCCTATCTTA TCAACACTTC CGGAAACTAC
2341 TGTTGTTAGA CGACGAGGCA GGTCCCCTAG AAGAAGAACT CCCTCGCCTC GCAGACGAAG
2401 GTCTCAATCG CCGCGTCGCA GAAGATCTCA ATCTCGGGAA TCTCAATGTT AGTATCCCTT
2461 GGACTCATAA GGTGGGAAAC TTTACTGGGC TTTATTCTTC TACTGTACCT GTCTTTAATC
2521 CTGAGTGGCA AACTCCCTCC TTTCCTCACA TTCATTTACA GGAGGACATT ATTAATAGAT
2581 GTCAACAATA TGTGGGCCCT CTTACAGTTA ATGAAAAAAG GAGATTAAAA TTAATTATGC
2641 CTGCTAGGTT TTATCCTAAC CTTACCAAAT ATTTGCCCTT AGATAAAGGC ATTAAACCAT
2701 ATTATCCTGA ACATGCAGTT AATCATTACT TCAAAACTAG GCATTATTTA CATACTCTGT
2761 GGAAGGCTGG CATTCTATAT AAGAGAGAAA CTACACGCAG CGCCTCATTT TGTGGGTCAC
2821 CATATTCTTG GGAACAAGAG CTACAGCATG GGAGGTTGGT CTTCCAAACC TCGACAAGGC
2881 ATGGGGACGA ATCTTTCTGT TCCCAATCCT CTGGGATTCT TTCCCGATCA CCAGTTGGAC
2941 CCTGCGTTCC GAGCCAACTC AAACAATCCA GATTGGGACT TCAACCCCAA CAAGGATCAC
3001 TGGCCAGAGG CAAATCAGGT AGGAGCGGGA GCATTCGGGC CAGGGTTCAC CCCACCACAC
3061 GGCGGTCTTT TGGGGTGGAG CCCTCAGGCT CAGGGCATAT TGACAACAGT GCCAGCAGCA
3121 CCTCCTCCTG CCTCCACCAA TCGGCAGTCA GGAAGACAGC CTACTCCCAT CTCTCCACCT
3181 CTAAGAGACA GTCATCCTCA GGCCATGCAG TGGAA 3215
```

图1　初步拟定的中国HBV流行株基因C型标准序列

Fig. 1　Consensus sequence of genotype C of complete gene of hepatitis B virus which was produced from seven whole gene sequences of HBV from Mainland China.

维普资讯 http://www.cqvip.com



表3 中国大陆HBV基因C型标准序列与国外标准序列差异

Table 3 Comparison of hepatitis B virus consensus sequences of mainland China with that from Genbank

| Position | 51 | 855 | 903 | 912 | 961 | 1053 | 1139 | 1165 | 1329 | 1332 | 1371 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| China | T | A | C | G | A | A | A | C | A | C | T |
| GenBank | A | T | T | A | G | G | C | T | C | T | C |
| Position | 1383 | 1503 | 1636 | 1652 | 1719 | 2059 | 2070 | 2549 | 2652 | 2682 | 2702 |
| China | A | A | A | G | G | C | A | C | T | A | A |
| GenBank | C | G | T | A | T | A | C | A | C | G | T |

Position of putative EcoRI site is defined as 1.

HBV传播的最重要的传染源。婴幼儿期主要通过母婴传播，是形成人群AsC和HBV贮存库的重要原因[4]。因此，我国AsC机制多是因婴幼儿期HBV感染形成的特异性免疫耐受或免疫低下。在这种宿主中，HBV毒株受到的免疫压力小，在漫长的感染过程中相对变异发生率低，能较确实地反映我国HBV流行株存在情况。

现有的我国9株HBV全序列，其基因型为C和B型，相应血清型为adr和adw。近年来根据HBV全序列的积累及全序列比较，将HBV分为7个基因型(A～F)，同一基因型中序列同源性大于92%(差异性小于8%)。基因型和血清型间的关系：从基因分型角度看，不同血清型间仅是S基因区2个位点上的差异。因此，同一基因型内可有不同的血清型存在，而同一血清型可存在于不同的基因型中。如基因型C中可有3种血清型(adr、adw、ayr)，而adw型可存在于基因型A、B、C、E中[5]，ayw仅在B、D型中。我国HBV血清型主要为adr和adw，而推测我国流行的HBV毒株基因型主要为C和B型，现有结果支持这一推测。

HBV标准序列的建立是基于HBV全基因测序的积累。HBV标准序列的具体确定方法为：每一位点的核苷酸选择标准必须与80%的已知HBV毒株序列上相应位点的核苷酸相同[6]。当前我国已收集了9例无症状携带者HBV全序列，地区分布为：东北地区4例、广东地区3例、上海和北京各1例。我国地域广阔，民族众多，HBV流行株分布可能也不尽一致。要明确我国各地区(华东、华南、华西、华北、东北等)汉族人感染的HBV流行株序列特点，还有待积累更多的各地区HBV全序列资料。

根据我国HBV流性株(C基因型7株)初步拟定的标准序列，与国外C基因标准序列比较，有22个位点的差异，差异率为0.68%。这些位点的差异在既往研究中可能被视为变异。

## 参 考 文 献


1 甘人宝，储美瑾，沈绿萍等.克隆的adr亚型乙型肝炎病毒基因(PADR-1)的核苷酸顺序.生物化学与生物物理学报，1984，16(3)：316～319

2 琦祖和，阎据，熊伟军等.乙型肝炎病毒adr NC-1 DNA的全顺序测定.中国科学B辑，1988，12：1300～1304

3 Courouce AM, Soulier JP. Subtypes of HBsAg in Europe and Africa. Bibl Haematol (Basel), 1976, 42: 52～57

4 骆抗先.第十二章 流行率.流行环节.见：乙型肝炎—基础和临床.北京：人民卫生出版社，1997.158～161

5 Norder H. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. J Gen Virol, 1992, 73: 3141～3150

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

维普资讯 http://www.cqvip.com



## Sequencing of the Whole Gene of Hepatitis B Virus

Guo Yabin Hou Jinlin Dai Wei *et al*

(*Department of Infectious Disease, Nanfang Hospital, Guangzhou* 510515)

**Abstract** Seven cases of chronic hepatitis B virus carriers were included for sequencing of whole gene sequences of hepatitis B virus (HBV). The serotype of 4 strains of HBV were adr, and 3 strains were adw. Two strains were classified to genotype B, and the other 5 strains to genotype C. No significant mutations, such as $A^{1896}$, $T^{1762}A^{1764}$ were present. With other reported 2 complete sequences of HBV strains prevailing in mainland China, 7 strains of HBV whole sequences of genotype C from mainland China were analyzed to produce the consensus sequence of HBV of China. Comparing of the consensus sequence with that from Genbank, there were only 22 sites with different nucleotides.

**Key words** Hepatitis B virus, Gene, Sequence

# 第十一届国际病毒学会议概况

## A Survey of XI International Congress of Virology

第十一届国际病毒学会议于1999年8月9日至13日在澳大利亚悉尼会议及展览中心隆重召开。在热情洋溢的开幕式上,澳大利亚少儿合唱团一曲美妙的旋律,使本世纪最后一次全球性病毒学家大聚会充满着蓬勃与生机。与会代表2429人分别来自世界各国。大会共收到1762篇稿件,其中大会应邀报告51篇、专题报告611篇、墙报1100篇。位于前四位的代表团分别为美国(380人)、日本(181人)、英国(170人)及德国(105人)。中国大陆这次参加会议的人数较以往大为增加,有6人进行了专题发言。这次大会的主要议题有:(1)21世纪病毒学;(2)病毒的结构与组装;(3)分子生物学与疾病防治;(4)免疫学与致病性;(5)病毒的出现与进化;(6)脊髓灰质炎病毒的根绝。在21世纪病毒学报告中,四位诺贝尔奖获得者分别进行了关于HIV疫苗研究进展、朊病毒生物学与疾病以及病毒与免疫诱导等精辟论述。国际病毒分类命名委员会亦报道了最新的病毒分类标准。此外,大会分69个专题,围绕各科病毒研究进展及病毒学前沿研究课题分组进行了学术交流与探讨。这次大会盛况空前,国际上有40余家新闻媒体相继作了实况报道。大会在庄严的气氛中闭幕,并决定下一届国际病毒学会将于2002年在法国巴黎举行。

(中国科学院武汉病毒所 方勤)