维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷4期 中国病毒学 16(4):321-324
2001年12月 VIROLOGICA SINICA December 2001

# 乙肝病毒表面抗原和抗体双阳性者中病毒S区基因序列分析

辜文洁,林京香,王佑春**,张华远,蓝海云,李河民

(中国药品生物制品检定所,北京 100050)

# The Sequence Analysis of HBV S Gene Isolated from Both HBsAg and Anti-HBs Antibody Positive Blood Donors

GU Wen-jie, LIN Jing-xiang, WANG You-chun**, ZHANG Hua-yuan, LAN Hai-yun, LI He-min

(*Notional Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing* 100050, *China*)

**Abstract**: In order to investigate HBV genotype and variants from the blood donors positive for both HbsAg and anti-HBs antibody, 389 sera from HBsAg positive blood donors were tested for anti-HBs antibody with RIA assay. The sera positive for both HbsAg and anti-HBs were tested for HBV DNA with polymerase chain reaction (PCR). The positive PCR products were cloned and sequenced. The sequences were compared with the representative sequences of different HBV genotypes. The results showed that 10/389 sera positive for HBsAg were positive for anti-HBs. Five of these ten sera were positive for HBV DNA. The sequence analysis showed that all five sequences belonged to HBV genotype B, four sequences were adw serotype and one was adr serotype. Amino acids of antigen determinant "a" of two sequences have been changed.

**Key words**: Hepatitis B virus; Genotype; Mutant

**摘要**:为了解乙肝病毒(HBV)表面抗原和抗体双阳性患者中病毒的基因型及其HVB S区是否有变异。用放射免疫试剂检测HBsAg阳性样品中的抗-HBs抗体,用聚合酶链反应法检测双阳性样品中的HBV DNA,然后对阳性样品进行克隆和基因序列分析,并将所得序列与HBV不同基因型的代表株进行比较分析。结果显示389例HBsAg阳性样品中有10例为抗HBs抗体阳性;该10例双阳性样品中有5例为HBV DNA阳性;序列分析显示该5株HBV均为B基因型,其中4株为adw亚型,1株为adr亚型;其中有2株在S区的"a"决定簇的氨基酸发生了变异。

**关键词**:乙型肝炎病毒;基因型;变异

**中图分类号**:R373.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2001)04-0321-04

乙肝病毒表面抗体具有中和作用,一般情况下该抗体的出现意味着该病毒可能已被清除、人体已产生了保护作用。但近年来,有些研究显示部分人群中乙肝病毒的抗原和抗体可同时存在[1],这可能为抗体产生的初期,病毒还没有清除;也可能乙肝病毒发生了为变异,其抗体不能很好地中和病毒。为进一步了解在该类人群中乙肝病毒是否发生了变异,我们对乙肝表面抗原和抗体同时阳性的样品进行了HBV S区的基因序列检测,并对其基因序列进行分析。

收稿日期:2001-02-19,修回日期:2001-06-21

作者简介:辜文洁(1961-),女,江西南昌籍,主管技师,主要从事乙型和戊型肝炎病毒的研究及其相关制品的检定。

** 通讯作者:王佑春(1964-),山东茌平县籍,研究员,医学和哲学博士,主要对乙型、戊型、庚型肝炎病毒和TTV进行分子生物学的研究。Correspondence author.

维普资讯 http://www.cqvip.com



# 1 材料及方法

## 1.1 血清

389份血清HBsAg阳性血浆收集于北京、河南、四川、重庆、山东、甘肃等地区，该部分血清均用4种进口试剂(Othro, Abbott, Diasoria和Hepanostika HbsAg EIA试剂)检测，结果均为HBsAg阳性。

## 1.2 酶、克隆载体

Taq DNA聚合酶、EcoRⅠ限制性内切酶、T4 DNA连接酶和pGEM-T easy克隆载体均为Promega公司产品。

## 1.3 引物

外引物：正向引物 P1：5'-CTGCTGGTG-GCTCCAGTT-3'，反向引物 P2：5'-CAATACCACAT-CATCCAT-3'；内引物：正向引物 P3：5'-CCTGCTCGT-GTTACAGGC-3'；反向引物 P4：5'-GGCACTAG-TAAACTGAGC-3'。

## 1.4 抗-HBs抗体的检测

用北京生物制品研究所生产的抗-HBs抗体放射免疫试剂按说明书要求检测389份HBsAg阳性血浆，并按说明书判断结果。

## 1.5 HBV DNA的提取及PCR检测

用上海华顺公司的小量柱式病毒RNA/DNA抽提试剂盒按说明书操作从250μL血清中提取HBV DNA，获30μL纯化的HBV DNA水溶液。PCR扩增的反应液的组成为：纯化的DNA 10μL内外引物各25pmol，10x PCR buffer 5μL，Taq DNA聚合酶2.5U，dNTP(10mmol/L)1μL，$MgCl_2$(25mmol/L)4μL，最后用超纯水调整终体积至50μL；其反应程序为：94℃ 1min、50℃ 1min、72℃ 1min扩增，30个循环。第二轮反应液的组成为：第一轮的PCR扩增产物1μL，10x PCR buffer 5μL，$MgCl_2$(25mmol/L)4μL dNTP(10mmol/L)1μL，内外引物各25pmol，Taq DNA聚合酶2.5U，最后用超纯水调整终体积至50μL，其反应程序为：94℃ 1min、50℃ 1min、72℃ 1min，扩增30个循环。

## 1.6 克隆及测序

对阳性的反应产物进行纯化并将纯化的产物克隆到pGEM-T easy载体，然后对插入片段进行测序，具体方法见参考文献[2]。

## 1.7 序列分析

采用Clasta IW对所分析的基因序列进行对准比较，计算基因进化距离，并按此基因进化距离用Treeview画出基因进化树；用Genedoc软件计算氨基酸和核苷酸序列的同源性。该分析所用的序列为：HBV A基因型有X75699、X04820、Z35717和X75666；B基因型有D00329、D00330和AF100309；C基因型有X75656、X75665、X7592和X75667；D基因型有X75662、X75668、X0296和AJ131956；E基因型有X75657和X75664；F基因型有X75658、X75661、和X75663；G基因型有M74499。

# 2 结果

## 2.1 抗-HBs抗体的检测及HBsAg和抗-HBs双阳性样品中HBV DNA检测结果

对389例HBsAg阳性的血浆进行抗-HBs抗体检测，结果有10例为阳性，阳性率为2.5%；对该10例双阳性样品进行HBV DNA检测，结果10例中有5例为阳性，阳性率为50%(表1)。

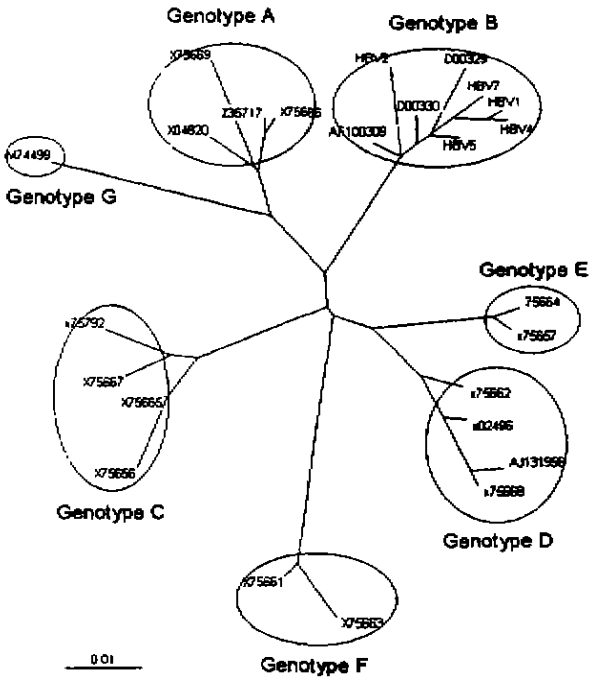


图1 HBV各基因型之间的基因进化树

Fig.1 Unrooted tree demonstration the relationship of different HBV genotypes

表1 HBsAg、抗-HBs抗体和HBV DNA的检测结果

Table 1 The detecting results of HBsAg, anti-HBs and HBV DNA

| NO | HBsAg | anti-HBsAg | PCR |
|---|---|---|---|
| 1 | >25 | 5.5 | + |
| 2 | 4.3 | 7.2 | + |
| 3 | >25 | 4.3 | − |
| 4 | >25 | 4.9 | + |
| 5 | >25 | 4.3 | + |
| 6 | >25 | 5.0 | − |
| 7 | >25 | 4.8 | + |
| 8 | >25 | 2.9 | − |
| 9 | >25 | 28.9 | − |
| 10 | >25 | 5.2 | |

注：以S/Co值表示，大于1为阳性。

## 2.2 核苷酸序列分析

对PCR阳性产物进行纯化，并克隆到pGEMT载

维普资讯 http://www.cqvip.com



体上,然后对其片段进行测序。将该5株基因序列与HBV各基因型代表株进行基因进化树的分析(图1),分析的结果显示该5株序列均与HBV B基因型的代表株(D00329、D00330和AF100309)形成一个分支,故该5株均属于HBV的B基因型。

### 2.3 氨基酸序列分析

将该5株的基因序列推测为氨基酸序列,并与血清型的基因序列进行对准比较(图2)。乙肝病毒有4个血清型[3,4],分别为adr、adw、ayr和ayw,a为共同的抗原决定簇,d和y与w和r为两对互相排斥的决定簇。a决定簇位于124~147位氨基酸;d和y由122位的氨基酸决定,若为赖氨酸(K)则为d决定簇,若为精氨酸(R)则为y决定簇;w和r由160位的氨基酸决定,若为赖氨酸(K)则为w决定簇,若为精氨酸(R)则为r决定簇。由图2可见,HBV1、HBV4、HBV5

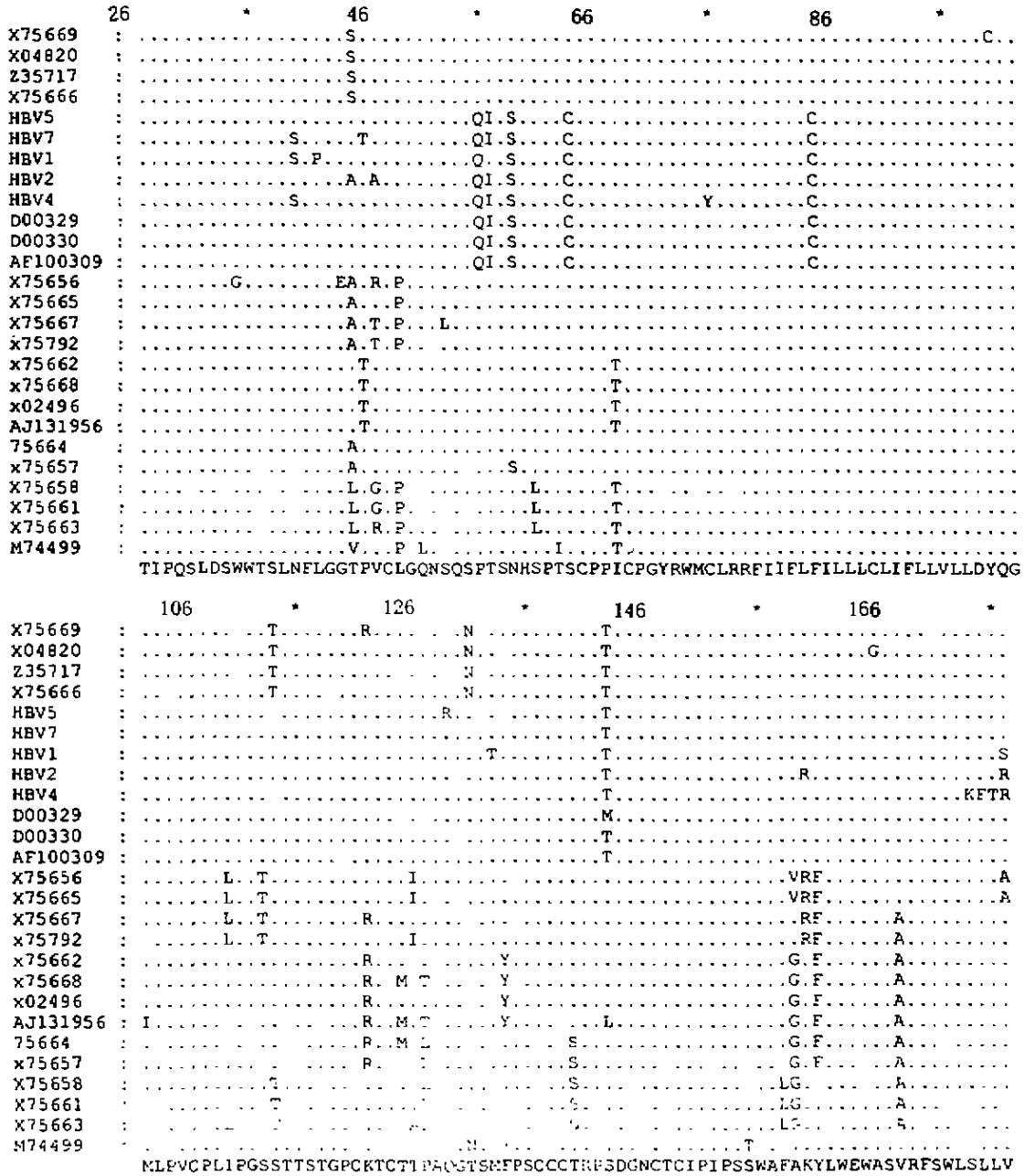


图2　HBV S蛋白27~178aa区域氨基酸序列比较

Fig.2　The alignment of amino acid sequences of HBV S region from 27-178aa

维普资讯 http://www.cqvip.com



和 HBV7 为 adw 亚型；HBV2 为 adr 亚型。HBV2、HBV4 和 HBV7 的 a 抗原决定簇没有发生变异，而 HBV1 和 HBV5 的 a 抗原决定簇则发生了变异，HBV1 的 133 位由甲硫氨酸(M)变为苏氨酸(T)；HBV5 的 129 位由谷氨酰胺(Q)变为精氨酸(R)。

## 3 讨论

HBsAg 是 HBV 的膜蛋白，其抗原性决定于 a 共同抗原决定簇和两对互相排斥的抗原决定簇 d/y 和 w/r，这样就组成了 HBV 的 4 个血清型，即 adw、adr、ayw 和 ayr。a 决定簇位于 S 蛋白的 124～147 位氨基酸；d 和 y 由 122 位的氨基酸决定；w 和 r 由 160 位的氨基酸决定。但血清型并不能反映 HBV 基因组的差异，Okamoto 和 Norder 等根据 S 基因的核苷酸序列的同源性，将其分为 A、B、C、D、E、F 和 G 七个基因型[5,6]，型内 S 基因的核苷酸序列的差异小于 3%，而型间的差异则大于 4%。我国以 B、C 和 D 基因型为主，我们从表面抗原和抗体同时阳性的血清中所克隆的 5 株基因序列均为 B 基因型，未发现其他的基因型，是否在表面抗原和抗体同时阳性的样品中存在其它基因型还需进一步分析。

a 决定簇为 HBsAg 的共同抗原决定簇，目前检测 HBsAg 的诊断试剂主要采用针对 a 决定簇的单克隆抗体，若 a 决定簇的氨基酸发生变异，则会引起抗原性改变，从而可改变诊断试剂的检测结果；而且正常的抗-HBs 抗体也不能完全和 a 决定簇变异的乙肝病毒，而造成这种现象：即体内虽然有抗-HBS 抗体，但仍不能排除变异的乙肝病毒的感染，形成体内抗原和抗体同时存在。本研究从抗原和抗体同时阳性的样品中克隆出的 5 株 HBV 序列中 2 株为 a 决定簇的变异株，其抗原性是否改变需进一步研究。

### 参考文献


[1] 尹华发，卢建溪，陈青，等. 乙型肝炎患者表面抗原与抗体检测和分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志，2000，14(3)：280.

[2] 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[J]. 中国生物制品学杂志，2000，13(2)：65－67.

[3] Le Bouvier G L. The heterogeneity of Australia antigen[J]. J Infect Dis，1971，23：671－675

[4] Bancroft W H，Mundon F K，Russell P K，*et al*. Detection of additional determinant of hepatitis B antigen[J]. J Immunol，1972，109(4)：842－848.

[5] Okamoto H，Imai M，Tsuda F，*et al*. Point mutantion in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blooddonors carrying a surface antigen of compound subtypes adyr or adwr[J]. J Virol，1987，61(10)：3030－3034.

[6] Norder H，courouce A M，Magnius Lo. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within four major subtypes[J]. J Gen Virol，1992，73：3141－3145.

[7] Norder H，Hammas B，Lofdahl S，*et al*. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classifcation of the corresponding hepatitis B Virus strain[J]. J Gen Virol，1992，73：1201－1208.