

乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究*

董菁^{1,2}, 施双双¹, 皇甫竞坤¹, 成军^{1**}, 王勤环², 李莉¹, 斯崇文²

(1.解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 北京100039; 2.北京大学第一医院感染疾病科, 北京100034)

The Preliminary Study on Hepatitis B Virus Quasispecies:
X Gene and its MutantsDONG Jing^{1,2}, SHI Shuang-shuang¹, HUANGPU Jing-kun¹, CHENG Jun^{1**},
WANG Qin-huan², LI Li¹, SI Chong-wen²(1. Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China;
2. Department of Communicable Diseases, The First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China)

Abstract: The HBV genetic heterogeneity in the patients with chronic HBV infection was reported in this article. A set of specific primers was synthesized according to HBV DNA sequence of Chinese strain, the whole X region was amplified by PCR method from the serum of 9 patients with chronic HBV infection, and then the PCR products were subcloned into pGEM Teasy vectors. Clones were randomly selected to be sequenced. Comparison of the cloned sequence was made to find the difference. After being compared, each sequence of selected clones is of difference. The point mutation scattered through X region. Deletion mutations were detected in 19 clones of 37(51.4%), which caused different carboxyl endings of X protein. There is a hot region (after 123 aa code) where deletion mutation frequently happens. There were HBV quasispecies groups in sera from patients with chronic HBV infection. There was a hot deletion region near the 3' end of X gene, resulting in losing its transactivating activity.

Key words: Hepatitis B Virus; X gene; Quasispecies; Transactivation

摘要: 以乙型肝炎病毒(HBV)X基因序列的异质性表现来探讨HBV准种在慢性感染者中的存在状态。以中国株HBV基因序列为依据,设计特异性多聚酶链反应引物,自9例慢性HBV感染患者血清中扩增HBV X基因,克隆入pGEM Teasy质粒,随机挑选克隆进行DNA测序以确定病毒的变异程度。37例测序结果提示来源于不同患者HBV X基因序列高度保守,但每个序列均不一致。X区除了存在广泛的碱基点替换突变外,序列的缺失突变占测序克隆总数的51.4%(19/37);氨基酸缺失及移框突变多发生于123位氨基酸残基之后,可导致X蛋白多种羧基端形式。结果提示HBV长期携带者体内有HBV准种共存,X区内存在热点缺失突变区,该区突变结果可能影响X蛋白反式激活功能。

关键词: 乙型肝炎病毒; 准种; 反式激活; X基因

中图分类号: R512.62 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)01-0022-04

乙型肝炎病毒(HBV)基因组含有4个开放读码框架,分别为S、C、P和X区。近年来的研究提出

HBV感染者体内存在有准种^[1,2]的假说,我们以X区为研究靶区域,应用多聚酶链反应(PCR)扩增慢

收稿日期:2001-05-14,修回日期:2001-08-19

* 基金项目:军队回国留学人员启动资金资助(98H038)。

作者简介:董菁(1969-),男,主治医师,现在北京大学攻读博士学位。电话:010-66933392, E-mail: cj@genetherapy.com.cn

** 通讯作者。Correspondence author. 电话:010-66933391, E-mail: cj@genetherapy.com.cn

序列为美国国立卫生院 GenBank 所收录。

性乙型肝炎患者血清中的 X 基因,随机选择克隆测序,比较其结果,证实了 HBV 准种的存在,并发现多种基因的突变形式。

1 材料与方法

1.1 血清来源和 DNA 分离

血清来源:9 例患者均诊断为病毒性肝炎,乙型,慢性,诊断均符合 2000 年西安全国会议《病毒性肝炎防治方案》(试行)。临床检测 HBsAg、HBeAg、抗-HBc 阳性,9 例患者均无应用 HBV 疫苗史和抗病毒治疗史,其它肝炎病毒标志检测阴性;男性 6 例,女性 3 例。采集静脉血,蛋白酶 K 消化-饱和酚:氯仿(1:1)抽提法提取 200 μ L 血清中的 HBV DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2 多聚酶链反应(PCR)扩增 X 基因片段

以甘人宝等^[3]发表的序列为依据,设计引物序列。其上游引物为:5'-ATA CAC CTC CTT CCC ATG G-3',下游引物为:5'-GGC TTG AAC AGT AGG ACA TG-3',目的片段长度约 500bp。引物由赛百盛公司合成。PCR 参数如下:94 $^{\circ}$ C 1min 预变性,94 $^{\circ}$ C 40s 变性,55 $^{\circ}$ C 40s 退火,72 $^{\circ}$ C 40s 延长,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 再延长 10min。

1.3 克隆目的片段

将 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,切取目的片段,玻璃奶法回收 DNA,与 Promega 公司所产的 pGEM Teasy 载体连接过夜。将连接好的重组质粒转入细菌 JM109,氨苄青霉素(Amp)和 X-gal 蓝白斑法筛选阳性菌落,命名为 Teasy-X。

1.4 DNA 测序

提取重组质粒,经 EcoR I 酶切证实质粒 Teasy-X 存有靶片段后,随机选择菌落测序,由上海博亚公司完成。结果存入美国国立卫生院 GenBank 中。

2 结果

2.1 PCR 结果

自患者血清内扩增出 HBV X 基因,电泳图谱见 PCR 产物长度近 500bp,见图 1。

2.2 克隆株核苷酸序列比较

自 9 例患者血清中扩增出 HBV X 片段,分别构建亚克隆到 pGEM Teasy 载体中,获得了多个重组克隆。分别自这 9 例患者的重组克隆群中随机选择克隆进行测序,最少 1 例患者选择 2 个克隆(2/11, 18.2%),最多 1 例患者选择 9 个克隆(9/26,

34.6%),9 例患者共选择 37 个克隆进行测序。

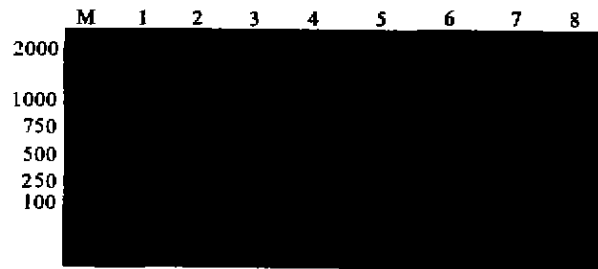


图 1 HBV X 基因 PCR 产物电泳
泳道 6、8 为 X 基因 PCR 产物阳性,余均为阴性;M 为分子量标准,其它泳道代表不同患者血清。

Fig. 1 Physical map of HBV X gene PCR products from serum
There are positive PCR results in lane 6 and 8, M is marker, other lanes indicate different patients sera.

PCR 产物序列靶长度为 512 bp,测序克隆中最短为 490 bp,15 个(40.5%)克隆 DNA 序列长度为 512 bp,19 个克隆在 X 蛋白编码序列内有缺失突变,3 个克隆在 X 蛋白编码序列之外有缺失突变,突变特点见表 1。

表 1 9 例患者测序克隆 X 基因编码区内碱基缺失特点

Table 1 Nucleotide acids site deletion in X gene from 9 patients

patients number	amount of clones sequenced	amount of clones with deletion	number of deletion(nt)	mutation site
645	9	5(55.6%)	20, 21, 22	after 369 nt
69	3	3(100%)	1, 8, 20	after 380 nt
841	3	0		
849	8	5(62.5%)	8, 9, 20	after 383 nt
X16	3	2(66.7%)	8, 9	after 386 nt
845	3	0		
30	3	0		
32	2	2(100%)	9, 21	after 383 nt
4	3	2(66.7%)	9, 10	after 383 nt
Total	37	19(51.4%)		

Base pair counting begin from the first ATG of X gene, adenosine as number 1.

碱基记数是 X 基因起始密码子(ATG)之腺嘌呤为记数 1,下同。

2.3 克隆株氨基酸序列比较

X 基因编码序列随分型的不同,编码序列自 145 至 155 aa 不等,37 个预测氨基酸残基序列中 18 个(48.6%)克隆编码 155aa,2 个克隆编码长于 155 aa,缺失突变为 16(43.2%),除点替换突变外,引起

X蛋白长度发生改变的突变可分为3类,一类是内部缺失突变,缺失长度自3aa(849-C3)至7aa(645-C2、32-2)不等,其羧基端结尾与正常形式相同;一类是缺失突变结合移框突变,X蛋白长度自133aa至152aa不等,羧基端多以TRRL或KV结束;另一类是移框突变造成的X蛋白延长(69-3、645-B9),这2个克隆所编码的蛋白长度可能长于本实验所取得的数值,这是由于亚克隆所获得的DNA片段编码终止于X基因3'端下游30nt处,未能展示可能的下游氨基酸序列。

3 讨论

准种概念是指物种的基因组DNA或RNA的碱基序列在统计学上高度一致,但个体之间又存在差异的一组群体。其产生的原理是由于RNA多聚酶或逆转录酶不具有3'-5'外切酶活性,缺乏校对功能,从而产生一群存在不同位点点变异的基因组DNA或RNA。在宿主免疫压力的作用下,或在药物的干预下,准种群经过筛选,遗留下优势种群耐受宿主内环境,并继续变异。1993年有学者^[1,2]分别独立的提出HBV存有准种的假说,近年来有少数研究^[4,5]证实了该学说。

我们选择X基因为HBV准种研究的靶区域是因为该区功能尚不明确,同时此段序列含有多个HBV病毒蛋白转录调控序列,在HBV生活史中有重要意义。经PCR扩增靶片段后,TA克隆法将单个患者血清内可以获得的克隆尽可能多的存储在载体中。测序结果发现来自同一患者体内HBV X基因呈现高度的多态性,测序的克隆无完全一致者,但同时又具有较高的同源性,符合准种定义。普通Taq酶的错配率为 $10^{-5} - 10^{-4}$,而我们扩增的靶片段长度仅500bp,因此可排除在PCR扩增过程中因错配而导致的突变。这证明了HBV准种在慢性感染者中的存在,也与我们^[6]S区准种特点的初步观察相一致。

本研究发现HBV X区的替换突变表现为散在分布,但相对集中于核苷酸序列的103-167nt和330-369nt两个区域,因此导致氨基酸序列的29-51aa和116-131aa两区域发生多个点突变。分析氨基酸序列时发现替换突变中存在3种形式,一种形式是突变具有广泛性,来源于多个患者的多个克隆在某氨基酸位点编码不同的氨基酸残基。以第4位氨基酸残基为例,来源于4个患者的15个克隆编码

蛋氨酸(M),其余22个克隆编码缬氨酸(V);第47位氨基酸残基,13个克隆编码苏氨酸(T),其余24个克隆编码丙氨酸(A)。部分患者所测的克隆可同时展现这2种编码形式。另一种形式提示突变可能具有个体特异性,患者841的3个克隆第22位氨基酸残基为丝氨酸(S),其余患者的34个克隆均编码甘氨酸(G);患者841的3个克隆第106位氨基酸残基为S,其余患者的34个克隆均编码T。第三种形式为散在的随机替换突变,最为常见。本研究提示:①X区可能存在不同的基因亚型或抗原型别。②HBV进入患者体内可能在个体免疫、药物等干预措施等影响下,病毒基因组发生相对较为特殊的突变,以最大程度的适应宿主环境。我们认为来源于不同宿主的X基因存在一定的差异,这种病毒的宿主特异性是由于宿主内环境不同,导致筛选出的HBV准种株出现较小的差异。

本研究还发现X区的缺失突变是相当常见的现象,我们发现37个克隆中有19例(51.4%)发生缺失突变,其集中于核苷酸序列的369-404nt区,导致123位氨基酸之后的X蛋白羧基端发生缺失,甚至提前终止。缺失突变类型可分为2种:一种为缺失8-10bp,另一种为缺失20-22bp。3例(8.1%)患者表现为内部缺失突变,缺失长度自3aa(1例)至7aa(2例)不等,其羧基端结尾与正常形式相同。另一种缺失突变结合移框突变,X蛋白长度自133aa至152aa不等,羧基端多以TRRL或KV结束。既往的研究表明X蛋白具有3个高度保守区,分别处于1-20、58-84和98-140位氨基酸,其反式激活作用可能与这3个区有关;X蛋白的二级结构含有4个 α 螺旋/卷曲,4个 β 片层,有一亮氨酸锌指结构(98-135位氨基酸残基),该结构是X蛋白反式激活作用的基础结构。人为X蛋白缺失实验研究结果提示羧基端的移框突变或替换突变,可导致反式激活作用消失,尤其以132-145位氨基酸区重要,但也有认为大的缺失突变不影响反式激活作用的报道^[7]。我们的研究发现在17个缺失突变及2个延长突变的克隆株均影响了98-140保守区的结构,影响了X蛋白羧基端的完整性,破坏了亮氨酸锌指结构。此外,替换突变也可发生在高度保守区,如患者645克隆B16中133位缬氨酸替换为丙氨酸,发生在X蛋白基本结构区之内。上述突变可能影响X蛋白的反式激活功能,这些突变株对反式激活作用的影响的研究正在进行中。

总之,通过 PCR 法自患者外周血中扩增出 HBV X 基因序列,通过序列测定发现慢性患者体内存有多种变异形式,构成 HBV 准种群;X 区存有缺失突变的热点区,该区的变异可能影响了 X 蛋白的反式激活作用。我们认为应加强针对 X 基因分型及其生物学意义的研究,应进一步加大 X 基因的测序工作,以明确突变的个体化现象的意义。

致谢:感谢北京大学第一医院病毒室张国庆老师在收集血清过程中的鼎力帮助。

参考文献

- [1] Blum H E. Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants[J]. *Intervirology*, 1993, 35:40-50.
- [2] Carman W, Thomas H, Domingo E. Viral genetic variation; hepatitis B virus as a clinical example[J]. *Lancet*, 1993, 341:349-353.
- [3] 甘人宝, 储美瑾, 沈绿萍, 等. 克隆的 adr 亚型乙型肝炎病毒 (pADR-1) DNA 的全序列[J]. *中国科学(B 辑)*, 1986, 1: 55-65.
- [4] Ngui S L, Teo C G. Hepatitis B virus genomic heterogeneity: variation between quasispecies may confound molecular epidemiological analyses of transmission incidents[J]. *J Viral Hepat*, 1997, 4:309-315.
- [5] Mutimer D, Pillay D, Dragon E, *et al*. High pre-treatment serum hepatitis B virus titre predicts failure of lamivudine prophylaxis and graft re-infection after liver transplantation[J]. *J Hepatol*, 1999, 30:715-21.
- [6] 董菁, 成军, 王勤环等. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究[J]. *中华内科杂志*, 2000, 40:838-839.
- [7] Kumar U, Jayasuryan N, Kumar R. A truncated mutant (residues 58-140) of the hepatitis B virus X protein transactivation function[J]. *PNAS*, 1996, 93:5647-5652.