

• 临床检验研究论著 •

乙型肝炎病毒基因组中罕见大片段缺失突变分析*

俞 杨¹, 鄢 兰¹, 焦 杰¹, 杜同信¹, 王自正¹, 颜 宁²

(南京医科大学附属南京医院: 1. 核医学科分子诊断室; 2. 感染性疾病科, 江苏南京 210006)

摘 要:目的 对来源于一例慢性乙型肝炎患者的包含罕见大片段缺失的乙肝病毒(HBV)全基因组进行序列分析。方法 提取乙肝病毒基因组 DNA, 扩增全长基因组, 通过单克隆化分析不同准种中大片段缺失的位点和长度; 将包含两段缺失突变的片段分别进行扩增, 通过扩增产物的序列分析验证准种分析的结果。结果 该标本的 HBV 基因组中的确存在超过 1.4 kb 的大片段缺失突变, 其中 P 基因上存在 nt2449~489 的 1 256 bp 的缺失突变, C 基因上存在大约 nt2088~2298 的 209 bp 的缺失突变。结论 该患者 HBV 基因组中存在罕见大片段缺失突变。

关键词:乙型肝炎病毒; 缺失突变; 慢性乙型肝炎

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 11. 005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)11-1357-03

Analysis of rare mutation of large fragment deletion in the genome of hepatitis B virus

Yu Yang¹, Wu Lan¹, Jiao Jie¹, Du Tongxin¹, Wang Zizheng¹, Yan Ning²

(1. Laboratory of Molecular Diagnosis, Department of Nuclear Medicine; 2. Department of Infectious Disease, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210006, China)

Abstract: **Objective** To analyze the whole genome sequence of hepatitis B virus(HBV) including rare large fragment deletion from a patient with chronic hepatitis B. **Methods** Genomic DNA was extracted from HBV and the whole genome was amplified. The sites and sizes of large fragment deletion in different quasispecies were subjected to monoclonal analysis. Fragments including two deletion mutations were amplified respectively, and the results of quasispecies analysis were confirmed by sequencing analysis of amplified products. **Results** Mutation of over 1.4 kb large fragment deletion exactly existed in HBV genome of this sample, with 1 256 bp nt2449—489 mutation in P gene and about 209 bp nt2088—2298 deletion mutation in C gene. **Conclusion** There is a mutation of rare large fragment deletion in HBV genome of the patient.

Key words: hepatitis B virus; deletion; chronic hepatitis B

乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染是严重危害人类健康的疾病, 在感染过程中, 由于 HBV 聚合酶缺乏严格的校正功能, 因此基因组中容易出现各种类型的突变^[1]。HBV 基因组中的缺失突变常常改变病毒的生物学特征, 从而对疾病进程产生影响^[2]。以往的研究表明, HBV 基因组中前 S(preS)区的缺失突变和疾病进程具有较为明确的相关性, 特别是 preS 区缺失, 无论在成人还是在儿童中, 都是 HBV 慢性感染相关的原发性肝癌发生的重要危险因素^[3-5]; 而且, preS 区的大片段缺失是肝移植术后乙型肝炎复发的独立预测因子^[6]。最新的研究表明 preS 区、C 区和 C 基因启动子(BCP)区是 HBV 缺失突变的热点区域, 其中 preS 区的突变频率最高、突变模式最复杂^[2]。以往的研究曾经报道过 HBV 基因组中出现的大片段(>100 bp)缺失^[6-7], 本研究选取了 1 例慢性 HBV 感染的女性患者, 该患者的 HBV 基因组中存在大于 1.4 kb 的缺失突变。通过对全基因组准种和包含缺失突变片段的 DNA 测序, 对这一罕见的大片段缺失突变进行了分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 1 例 28 岁的女性慢性乙型肝炎患者, 标记为 B423, 其血浆中 HBV-DNA 的滴度为 5.98×10^7 IU/mL (采用上海复星试剂检测); ALT 为 369 IU/L (采用 Roche 试剂检测); HBV 血清免疫标志物的结果为: HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 均为阳性 (采用 Abbott 试剂检测)。

考虑到该患者 HBsAg 和 HBsAb 均为阳性, 因此进行了重复检测, 仍为该结果; 询问病史, 患者否认乙型肝炎疫苗和免疫球蛋白的接种史。静脉采集该患者 2 mL EDTA 抗凝全血, 2 h 内分离血浆进行后续的 HBV 基因组提取。本研究符合南京医科大学伦理委员会伦理审查标准并取得了患者的知情同意。

1.2 仪器与试剂 HBV 基因组提取试剂盒 E. Z. N. A. Viral DNA Kit 和切胶纯化试剂盒 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 来自 Omega Bio-Tek 公司; 高保真 DNA 聚合酶 (Expand High Fidelity PCR System) 来自 Roche 公司; pGEM-T Easy 克隆载体来自 Promega 公司; S1000 PCR 仪和 Gel Doc EZ Imager 凝胶成像系统来自 Bio-rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 HBV 基因组 DNA 的提取 根据 E. Z. N. A. Viral DNA Kit 的说明书提取患者血浆标本的 HBV 基因组 DNA, 最终用 50 μ L 洗脱液洗脱, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 HBV 全基因组的扩增和纯化 利用巢式 PCR 对 HBV 的全基因组进行扩增。用引物 HBV full-out F(5'-TTT TTC ACC TCT GCC TAA TCA TCT C-3'; nt1821~1845) 和 HBV full-out R(5'-AAA AAG TTG CAT GGT GCT GGT GAA C-3'; nt1825~1801) 进行第一轮扩增; 用引物 HBV full-in F(5'-TTC ACC TCT GCC TAA TCA TCT C-3'; nt1824~1845) 和 HBV full-in R(5'-AAA GTT GCA TGG TGC TGG

* 基金项目: 南京市医学科技发展资金卫生青年人才培养项目(NJH201132)。 作者简介: 俞杨, 男, 检验主管技师, 主要从事 HBV 分子生物学研究。

TGA AC-3';nt1823~1801)进行第二轮扩增。每一轮扩增的体系为 50 μ L,其中包含 2.25 mmol/L 的 $MgCl_2$ 、0.2 mmol/L 的 dNTP 和 5 U Expand High Fidelity Taq 聚合酶。每一轮的扩增条件为:94 $^{\circ}C$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}C$ 变性 30 s,50 $^{\circ}C$ 退火 30 s,68 $^{\circ}C$ 延伸 3.5 min,循环 10 次;94 $^{\circ}C$ 变性 30 s,50 $^{\circ}C$ 退火 30 s,68 $^{\circ}C$ 延伸 3.5 min,在此基础上每个循环的延伸时间增加 20 s,循环 25 次;68 $^{\circ}C$ 延伸 7 min。用 1.5% 琼脂糖电泳检测 HBV 全基因组的 PCR 扩增产物,并根据 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 的说明书对特异性扩增的条带进行切胶纯化。

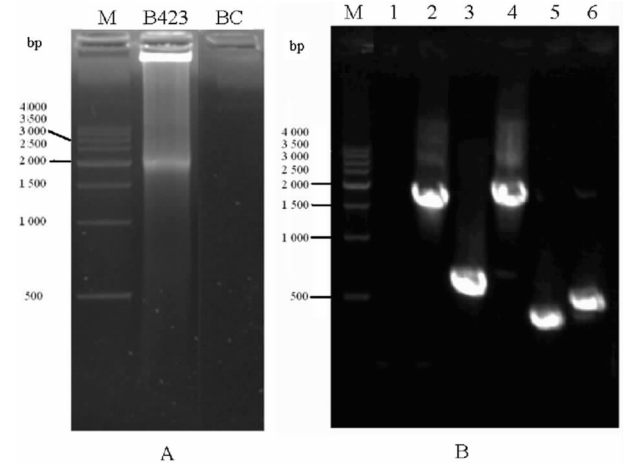
1.3.3 HBV 全基因组的克隆和大片段缺失的序列分析 将切胶纯化的产物按照 pGEM-T Easy 克隆载体的说明书进行克隆,在转化后的平板培养基上挑取 6 个单克隆重组载体,按照说明书进行双酶切鉴定,只选择其中插入片段大小与全基因组扩增产物大小吻合的 2 个克隆,B423-2 和 B423-4,送南京金斯瑞公司进行测序。测序引物为:T7、SP6、HBS1 (5'-TGC ACR AYT CCT GCT CAA GG-3';nt524~543)、HBS2 (5'-GCC AAG TGT TTG CTG ACG-3';nt1175-1192)、HBS4 (5'-CAA ATG CCC CTA TCT TAT CAA-3'; nt2304~2324)、HBAS2(5'-TTG ATA AGA TAG GGG CAT TTG-3';nt2324~2304) 和 HBAS5(5'-CAR WAC CAY ATC ATC MAT AT-3';nt758~739)。将测序结果在 NCBI Genotyping Tool(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>,在 Select 中选择 HBV)中通过序列比对进行基因分型。确定基因型后再根据 NCBI Genotyping 中相应基因型的参考序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/view.cgi?db=2>),利用 DNASTAR Lasergene7 软件的 Seqman 模块进行序列分析,确定 HBV 基因组中的片段缺失区域。

1.3.4 HBV 全基因组中缺失片段的分段确认 根据以上缺失片段的分析结果,明确缺失的片段位于 HBV 基因组中的 P 基因和 C 基因两个区域。设计两对引物 HBS4/HBAS5(包含 P 基因的缺失区域,序列如上所示)和 HBV full-in F/HBAS2(包含 C 基因的缺失区域,序列如上所示)对 HBV 全基因组中包含缺失片段的区域进行 PCR 扩增。扩增体系同上,扩增条件为:94 $^{\circ}C$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}C$ 变性 30 s,50 $^{\circ}C$ 退火 30 s,68 $^{\circ}C$ 延伸 1 min 30 s,循环 35 次;68 $^{\circ}C$ 延伸 7 min。用 1.5% 琼脂糖电泳检测 HBV 全基因组的 PCR 扩增产物,观察基因组缺失的片段大小,并根据 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 的说明书对特异性扩增的条带进行切胶纯化。将切胶纯化的产物送南京金斯瑞公司进行测序,P 基因扩增产物的测序引物为 HBS4 和 HBAS5,C 基因扩增产物的测序引物为 HBV full-in F 和 HBAS2。利用 DNASTAR Lasergene7 软件的 Seqman 模块,将测序结果与 NCBI Genotyping 中相应基因型的参考序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/view.cgi?db=2>)进行比对,确定 HBV 基因组中的片段缺失区域。

2 结 果

2.1 HBV 全基因组的扩增和缺失突变分析 B423 标本 HBV 全基因组的扩增结果(见图 1A)显示,特异性扩增的条带出现在大约 2 kb 的位置,而不是应有的大约 3.2 kb,重复的基因组扩增也显示相同的结果。这提示该标本的基因组可能存在大片段的缺失突变。将基因组分离为单克隆酶切鉴定后,发现 B423-2 和 B423-4 的插入片段大小与该标本 HBV 全基因组扩增的片段大小相吻合(见图 1B)。测序结果比对发现,2 个克隆均为 HBV C 基因型,与 C 基因型的参考序列比对的结果证实,B423-2 基因组全长 1 811 bp,在 P 基因上存在 nt2449~

489 的 1 256 bp 的缺失突变,在 C 基因上存在 nt2088~2235 的 148 bp 的缺失突变,全基因组上的大片段缺失为 1 404 bp; B423-4 基因组全长 1 776 bp,在 P 基因上存在 nt2449~489 的 1 256 bp 的缺失突变,在 C 基因上存在 nt2088~2270 的 183 bp 的缺失突变,全基因组上的大片段缺失为 1 439 bp(见图 2)。酶切结果提示 B423-3、B423-5 和 B423-6 的插入片段大小与全基因组扩增产物大小不吻合(见图 1A 和图 1B),因此未进行测序。



A: B423 标本的 HBV 基因组扩增产物的琼脂糖凝胶电泳; B: B423 单克隆重组载体酶切产物的琼脂糖凝胶电泳; M: 500 bp DNA 分子标记物; B423: B423 标本的 HBV 全基因组扩增产物; BC: 空白对照; 1~6: B423 标本 6 个不同的单克隆(分别为克隆 B423-1、B423-2、B423-3、B423-4、B423-5、B423-6)重组载体。

图 1 B423 标本的 HBV 基因组扩增产物及单克隆重组载体酶切产物琼脂糖凝胶电泳图

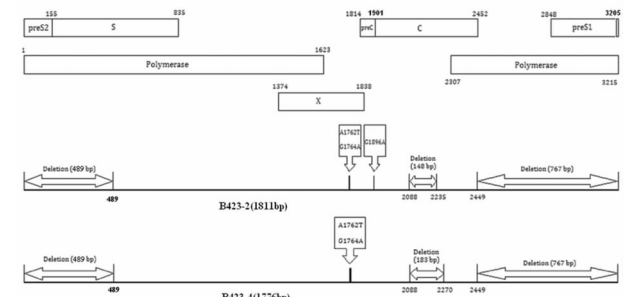
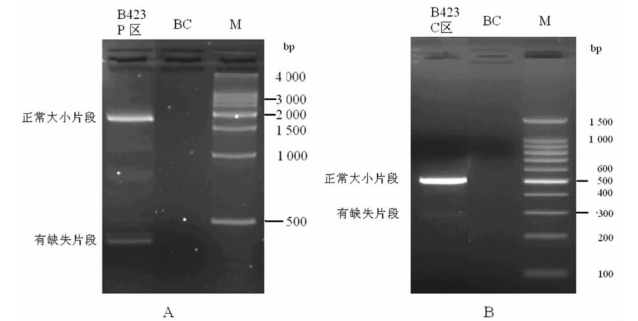


图 2 B423-2 和 B423-4 的基因组大小和缺失突变



A: B423 包含 P 区缺失突变片段的扩增产物的琼脂糖凝胶电泳; B: B423 包含 C 区缺失突变片段的扩增产物的琼脂糖凝胶电泳; M: 500 bp(A)和 100 bp(B)的 DNA 分子标记物; B423 P 区: B423 包含 P 区缺失突变片段的扩增产物; B423 C 区: B423 包含 C 区缺失突变片段的扩增产物; BC: 空白对照。

图 3 B423 包含 P 区和 C 区缺失突变片段的扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

2.2 HBV 全基因组中缺失突变的确证 包含 B423 P 基因和 C 基因缺失部分的两个片段的 PCR 扩增结果(见图 3A 和 3B)显示,P 基因存在正常大小片段(约 1 586 bp)和小片段(约 331 bp);C 基因也存在正常大小片段(约 501 bp)和小片段(约 318 bp)。测序结果的比对(见图 4)证实,P 基因和 C 基因 PCR 扩增结果中出现的正常大小片段和小片段均为 HBV 基因组中相应区域的序列;P 基因和 C 基因出现小片段的原因是因为其分别包含了一个 nt2449~489 的 1 256 bp 和 nt2088~2298 的 209 bp 的缺失突变;基因组中 P 基因和 C 基因缺失突变的大小和位点与单克隆 B423-2 和 B423-4 的情况相吻合。这提示患者体内同时存在含有完整目的片段的基因组和目的片段缺失突变的基因组。

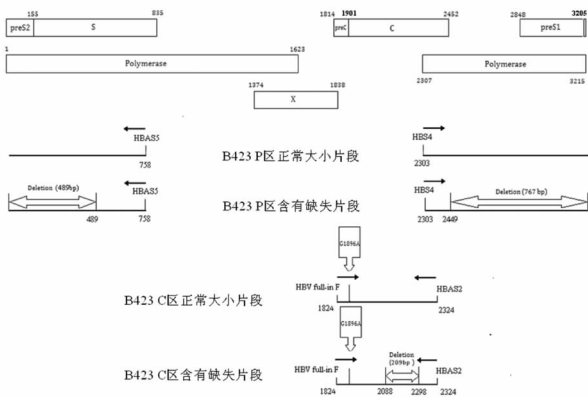


图 4 B423 P 区和 C 区缺失突变的分段确认

3 讨 论

HBV 基因组中的缺失突变因为是 HBV 慢性感染病程进展的重要影响因素,所以近年来引起了研究者的广泛兴趣。本研究选择了 1 例 HBV 基因组中存在大于 1.4 kb 缺失突变的慢性 HBV 感染的女性患者,通过对全基因组准种和包含缺失突变片段的 DNA 测序,对这一罕见的大片段缺失突变进行了序列分析。

本研究中,B423 全长基因组扩增结果提示只有包含缺失突变的基因组存在,3 次重复的 PCR 扩增均为上述结果,但是分段扩增显示含有完整目的片段的基因组和目的片段缺失突变的基因组均存在于患者体内。分段扩增序列的分析结果提示,HBV 基因组中的一些准种出现了整个 preS 区域和大部分 S 区的缺失,这一缺失位点和片段大小与全基因组的分析结果相吻合。实际上,尽管 preS 区在整个基因组中容易出现高度的异质性,但是 preS1 的存在对于结合细胞上的受体和启动感染都是必需的,而且和 S 区重叠的 P 区逆转录酶结构域对 HBV 的复制也是必需的^[8-10]。考虑到 B423 具有很高的病毒复制(5.98×10^7 IU/mL),因此可以认为如同分段扩增的结果所示,必定存在含有完整目的片段的 HBV 基因组。笔者推测造成 HBV 全基因组扩增只出现缺失突变基因组的原因是 PCR 的效率问题,尽管本研究采取了经典的 HBV 全长基因组的扩增方法^[7],但是不可否认全长基因组的扩增效率不及分段扩增的效率,其结果需要用分段扩增的结果来证实。

值得注意的是,本研究中 B423 标本的大片段缺失突变的大小和位点与以往在一例来源于韩国的慢性乙肝患者中的发现十分相似^[7],而且两者的 ALT 水平和 HBV-DNA 复制滴度都很高,显示出很强的免疫病理反应。特殊的是,本研究中

B423 标本的 HBV 血清免疫标志物的结果显示 HBsAg 和抗-HBs 抗体同时为阳性,在 HBV 血清免疫标志物的模式中这种情况比较罕见,一些研究认为这与 preS 区的缺失突变存在某种联系^[11],但是更加系统性的研究表明这种联系不是必然的,此类患者体内的 HBsAg 和抗-HBs 抗体并没有相互匹配的特异性作用,也不是导致 HBV 基因组中出现某种特异性突变的根本原因^[12]。

本研究涉及的 B423 标本存在 preS 区缺失和 BCP 区 A1762T/G1764A 双突变的准种(见图 2),中国人群的巢式病例对照研究结果表明,这种 HBV 基因组的复杂突变增加了慢性乙肝患者原发性肝癌的发病风险^[13]。而且,该患者为具有高病毒复制滴度(5.98×10^7 IU/mL)的 C 基因型,因此有必要进行密切的临床随访。

参考文献

- [1] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection[J]. New Engl J Med, 2008,59(14):1486-1500.
- [2] Zhang D, Dong P, Zhang K, et al. Whole genome HBV deletion profiles and the accumulation of preS deletion mutant during antiviral treatment[J]. BMC Microbiol, 2012,12(1):307.
- [3] Fang ZL, Sabin CA, Dong BQ, et al. Hepatitis B virus pre-S deletion mutations are a risk factor for hepatocellular carcinoma: a matched nested case-control study[J]. J Gen Virol, 2008,89(11):2882-2890.
- [4] Abe K, Thung SN, Wu HC, et al. Pre-S2 deletion mutants of hepatitis B virus could have an important role in hepatocarcinogenesis in Asian children[J]. Cancer Sci, 2009,100(12):2249-2254.
- [5] Kao JH, Liu CJ, Jow GM, et al. Fine mapping of hepatitis B virus pre-S deletion and its association with hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2012,32(9):1373-1381.
- [6] Wu TJ, Chen TC, Wang F, et al. Large fragment pre-S deletion and high viral load independently predict hepatitis B relapse after liver transplantation[J]. PLOS One, 2012,7(2):e32189.
- [7] Kim H, Jee YM, Song BC, et al. Analysis of hepatitis B virus quasi-species distribution in a Korean chronic patient based on the full genome sequences[J]. J Med Virol, 2007,79(3):212-219.
- [8] Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution[J]. Virus Res, 2007,127(2):164-176.
- [9] Locarnini S, Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection[J]. Antivir Ther, 2010,15(S3):3-14.
- [10] Mauss S, Berg T, Rockstroh J, et al. Hepatology 2012: a clinical textbook[M]. Germany: Flying Publisher, 2012:66-70.
- [11] Huang X, Qin Y, Zhang P, et al. PreS deletion mutations of hepatitis B virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies[J]. J Med Virol, 2010,82(1):23-31.
- [12] 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[J]. Clin Infect Dis, 2007,44(9):1161-1169.
- [13] Qu LS, Liu TT, Jin F, et al. Combined pre-S deletion and core promoter mutations related to hepatocellular carcinoma: a nested case-control study in China[J]. Hepatol Res, 2011,41(1):54-63.