

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000366

高通量测序分析 5 例母婴传播中 HBV 准种变化趋势

陈茹娟¹, 唐 香¹, 赖方方¹, 黄爱龙², 任 红³, 许红梅⁴

(1. 重庆医科大学附属儿童医院、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、

重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014;

2. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400014;

3. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所, 重庆 400010;

4. 重庆医科大学附属儿童医院感染消化科, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨 5 例乙肝疫苗接种失败儿童及其母亲在母婴传播过程中乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)“a”决定簇准种变化趋势。**方法:**选择 5 例重庆地区乙肝疫苗接种失败的儿童及其母亲,应用 PCR 法扩增其 HBV 基因组全长,构建 HBV 全基因组测序文库后进行 solexa 高通量测序,并对测序数据进行生物信息学分析。**结果:**母子 HBV 序列同源性为 99%~100%;5 对母子 HBV 基因型均为 B+C 混合型,其中 4 对优势基因型为 B 型,1 对为 C 型,母子优势基因型相同;所有儿童均在“a”决定簇存在复杂度明显增高位点;5 对母子“a”决定簇复杂度明显增高的氨基酸(Amino acid, aa)位点共有 10 个,仅存在于儿童的有 2 个,为 aa126 和 aa143,儿童中有 1 例发生优势氨基酸突变,突变形式为 G145R。**结论:**乙肝疫苗接种失败儿童在“a”决定簇存在准种现象,儿童体内的突变株可能来源于其母亲。

【关键词】高通量测序;乙肝病毒;准种;母婴传播**【中图分类号】**R512.62**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-04-28

Changing trend of HBV quasispecies in 5 cases of mother-infant transmission detected by high-throughput sequencing

Chen Rujuan¹, Tang Xiang¹, Lai Fangfang¹, Huang Ailong², Ren Hong³, Xu Hongmei⁴

(1. Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, the Children's Hospital of Chongqing Medical University; 2. Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University; 3. Institute of Hepatitis Viral, Chongqing Medical University; 4. Department of Infectious and Gastroenterology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the changing trend of hepatitis B virus (HBV) “a” determinant quasispecies in 5 children who failed to respond to hepatitis B vaccine and their mothers. **Methods:** Five children who developed into chronic HBV infection after receiving hepatitis B vaccine and their respective mothers were enrolled into the research. The full HBV genome was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and the sequences were determined by Solexa sequencing technology. **Results:** The sequence homology between paired mother and child was beyond 99%. The HBV genotype in 5 pairs of mother-child was mixture of B and C. Among them, 4 pairs had dominant B while the other 1 pair had dominant C. The dominant HBV genotype was identical between paired mothers and children. Significant complexity positions could be found in every immunized child. There were 10 significant complexity positions in “a” determinant region in 5 pairs of mother-child; aa126 and aa143 were observed only in one child. And one child had G145R mutant. **Conclusion:** “a” determinant quasispecies can be found in children who failed to respond to hepatitis B vaccine. The mutant strain in child may be transferred from her mother.

【Key words】high-throughput sequencing; hepatitis B virus; quasispecies; mother-infant transmission

作者介绍: 陈茹娟, Email: chenrujuan011240@sina.com,

研究方向: 小儿肝病。

通信作者: 许红梅, Email: xuhongmwp@yeah.com。

基金项目: 国家科技重大专项“十二五”资助项目(编号: 2012ZX10002007001)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000366.html>

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 最主要的传播途径是母婴传播。自 1992 年,我国开始在全国范围实施乙肝疫苗接种以来,HBV 感染率有了明显的下降。但仍然有部分儿童发展为慢性 HBV 携带者。HBV S 基因“a”决定簇变异被认为与乙肝疫苗接种失败密切相关,以往对“a”决定簇变异的研究多应用直接测序的方法仅发现了 HBV 优势氨基酸变异。然而,HBV 在宿主体内并非以单一的优势株存在,而是以一个优势病毒株及相关突变株混合组成病毒群体,即准种^[1]。也有研究者对 PCR 产物克隆后进行测序的方法研究 HBV 母婴传播中准种的变化^[2],但由于挑取的克隆数目有限,得到的序列信息较少,且费时费力,有一定的局限性。近几年发展起来的高通量测序技术,有着更高效的测序速度及更高的覆盖度,可敏感检测低频率的 HBV 突变株,更全面地体现病毒准种的多态性^[3],逐渐得到了广泛的应用。本研究应用高通量测序技术,分析 5 例乙肝疫苗接种失败儿童及其母亲体内的 HBV 全基因组序列频谱,对 HBV S 基因“a”决定簇复杂度显著增高的氨基酸位点进行研究,试探讨 HBV 母婴传播中“a”决定簇准种变化趋势。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 乙肝疫苗免疫失败儿童 5 例 所有患儿均为 2012 年 12 月至 2013 年 8 月期间,在重庆医科大学附属儿童医院就诊的 HBV 携带患儿,乙肝表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg) 阳性至少持续 6 个月,且已完整接种乙肝疫苗 3

次 (0、1、6 月)。

1.1.2 乙肝疫苗免疫失败儿童的母亲 5 例 患儿母亲在患儿出生前即确诊为慢性 HBV 携带者,血清收集时间与患儿一致。样本临床资料见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 实验室检查 采集患者空腹外周血后分离出血清,送至重庆医科大学附属儿童医院临床检验中心和临床分子中心进行 HBV 标志物 (HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBe)、肝功能 (ALT、AST)、HBV DNA 定量 (检测下限 5.0×10^2 IU/ml) 检测。

1.2.2 HBV DNA 提取 用病毒基因组 DNA 提取试剂盒 (DP315, 天根公司) 从 200 μ l 血清中提取 HBV DNA,溶于 100 μ l 双蒸水 (double distilled H₂O, ddH₂O) 中, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 PCR 扩增 HBV 基因组 3 215 bp 全长并纯化 HBV 基因组全长扩增引物参考文献 [4] 设计并改进,正向引物 PG1: 5'-CCGGAAAGCTTGACTTTTTCACCTCTGCCTARTC-3' (nt1821~1841 位),反向引物 PG2: 5'-CCGGAAAGCTTGCAAAAA-GTTGCATGGTGTCTGG-3' (nt1825~1806 位)。引物由北京华大基因科技股份有限公司合成。应用高保真 DNA 聚合酶 (Premix Prime Star, 日本 Takara 公司),采用 50 μ l 反应体系,反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 68 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 8 个循环; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 25 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察目的条带并切胶纯化 (QIAquickGel Extraction Kit, 德国 Qiagen 公司)。

1.2.4 打断 HBV 全长基因组并纯化片段化产物 应用一种含有转座子酶的特殊试剂盒 (Nextera™ DNA Sample Preparation Kit, 美国 Illumina 公司),利用转座子会在基因组上随机转位的特性,按照试剂说明书配制 10 μ l 反应体系,在 PCR 仪中 55 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后即可将 HBV 随机打断成 5' 端带转

表 1 样本临床资料

Tab.1 Clinical data of the samples

样本编号	性别	年龄 (岁)	HBsAg	HBeAg	ALT (U/L)	AST (U/L)	HBV DNA 定量 (IU/ml)	是否抗病毒治疗
1-C	男	15	+	+	19.0	29.0	6.21×10^7	否
1-M	女	40	+	-	7.0	25.0	2.62×10^8	否
2-C	男	7	+	+	25.0	30.0	1.08×10^8	否
2-M	女	40	+	-	16.0	19.0	$<1.0 \times 10^3$	否
3-C	女	1.5	+	+	38.0	42.7	1.49×10^6	否
3-M	女	27	+	+	11.0	17.0	5.83×10^7	否
4-C	女	1	+	+	23.3	32.3	2.34×10^7	否
4-M	女	27	+	+	23.0	23.0	8.99×10^7	否
5-C	女	4	+	+	42.0	44.0	3.83×10^7	否
5-M	女	30	+	+	37.0	35.0	1.99×10^8	否

注: C 代表儿童, M 代表母亲; ALT 为谷丙转氨酶 (alanine transaminase), AST 为谷草转氨酶 (aspartate transaminase), HBV DNA 为乙肝病毒脱氧核糖核酸 (hepatitis B viral DNA)

座末端序列的小片段,将片段化产物用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化(High Pure PCR Product Purification kit, 瑞士罗氏公司)。

1.2.5 PCR 加 barcode 反应并胶回收片段 根据 5'端转座末端序列设计 10 条 barcode 引物,应用 Taq DNA 聚合酶,采用 10 μ l 反应体系,反应条件为:72 $^{\circ}$ C 10 s;95 $^{\circ}$ C 60 s,94 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 10 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 3 min。由此给不同的样本加上各自的 barcode 标签。PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳,可见大多数片段集中于 250~500 bp,将此区域的片段切胶纯化。

1.2.6 Solexa 测序 每个样本的胶回收产物取约 500 ng 的 DNA 量混合在一起,送北京迈基诺基因公司应用 HiSeq2500 测序仪进行双向测序。

1.3 生物信息学分析

1.3.1 测序数据过滤与分库

1.3.1.1 原始数据过滤低质量、polyN 序列 将低质量碱基(碱基质量值低于 Q20)个数 ≥ 15 ,或连续低质量碱基个数 ≥ 8 ,或连续 N(测不出来的碱基)个数 ≥ 5 ,或 N 的总个数 ≥ 10 ,或某一种碱基占整条片段(reads)长度 $>80\%$ 的 reads 及其对应的 reads 过滤^[5]。

1.3.1.2 过滤非 HBV 序列 从美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology,NCBI)上下载现有的 HBV 序列共 1 700 条,通过序列比对,构建参照序列(reference sequence);将 reads 与 reference 比对,将同源性小于 90%的序列过滤。

1.3.1.3 Barcode 分库 根据 barcode 序列,将 barcode 对应样本的 reads 从原始 reads 中分离出来。分库标准:reads 5'端序列与 barcode 序列完全一致,即 100%匹配,可靠性较高。

1.3.2 HBV 全基因组图谱制作 过滤后的 reads 与 reference 进行比对,使其定位到 HBV 全基因组相对应的位置,计算基因组每个位置的覆盖度以及碱基分布情况,得到每个位置的核苷酸频谱,过滤掉低频碱基(频率 $<1\%$),最终得到全基因组频谱矩阵。

1.3.3 基因型判定 基因分型标准:从 NCBI 下载 HBV 全基因组序列,得到型别位点打分矩阵和 reference 标准序列,将 reads 与标准序列比对后,根据打分矩阵对该 reads 的型别进行打分评估,每条序列是 A/B/C/D 型可能性的一个打分值,分值越高,与该型序列相似度越高,分值区间为大于 0 小于等于 1;从而得到该 reads 的基因型,设定混合基因型按照 1%检出算。

1.3.4 确定复杂度显著增高的 aa 位点 用香农熵(shannon entropy, SE)来评估位点的复杂度,SE 是根据每个位点的碱基种类和碱基频率计算得到的数值,其值越大,位点复杂度越高^[6],用 pnorm 方法检验样本中 HBV 基因组上每个位点的 SE, $P<0.05$ 的位点则认为是复杂度显著增高的核苷酸位点,再转化为 aa 位点。SE 计算公式如下:

$$SE = - \sum_{i=1}^n f_i \log(f_i) n$$

是每个位点碱基种类, f_i 是碱基的频率。

2 结 果

2.1 母子对患者的相似性分析

2.1.1 HBV 全基因组序列同源性 5 对母子之间的 HBV 全基因组序列同源性为 99%~100%。

2.1.2 母子对进化树 用 Mega5 软件、以邻接法构建 5 对母子 HBV 全基因组序列系统树^[7],见图 1。

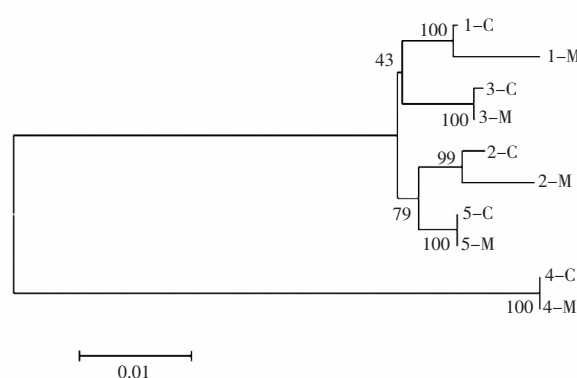


图 1 5 对母子中 HBV 基因组序列系统树

Fig.1 Phylogenetic tree of HBV in 5 pairs of mother-child

2.2 母子对的差异性分析

2.2.1 基因型 5 对母子基因型均为 B+C 混合型,其中 4 对母子优势基因型为 B 型,占 80.0%(8/10),1 对母子优势基因型为 C 型,占 20.0%(2/10)。

2.2.2 “a”决定簇复杂度显著增高位点 所有儿童均在“a”决定簇存在复杂度明显增高位点,5 对母子中“a”决定簇复杂度显著增高的氨基酸位点共有 10 个,分别为 aa124、126、130、137、139、140、141、142、143、145。其中有些位点在母子之间表现为不一致的复杂性,如 aa126 及 aa143 位点仅在 1 例儿童 2-C 中表现为复杂度明显增高,但在所有母亲中复杂度未明显增高;aa142 位点在儿童 1-C 中复杂度明显增高,而在其母亲 1-M 中复杂度未明显增高;aa124 位点在母亲 1-M 中复杂度明显增高,而在其儿童 1-C 中复杂度未明显增高;aa130、145 在儿童 4-C 中复杂度明显增高,但在其母亲 4-M 中未明显增高;其余位点在母子对中表现为相似的复杂度,即母子对之间表现为一致的复杂度增高或未增高。

只有 3-C 的 aa145 位优势型氨基酸表现为突变型,其突变形式为 G145R,相应的核苷酸突变为 G587A。nt587 位点在母亲 3-M 体内为 727 条序列读取碱基 A,而 4 930 条序列读取碱基 G(4930G/727A),以野生型为主导;而儿童 3-C 体内为 6 154 条序列读取碱基 A,而 384 条序列读取碱基 G

表 2 “a” 决定簇复杂度显著增高位在母子中的分布

Tab.2 Distribution of significant complexity positions in “a” determinant among 5 pairs of mother-child

		1-C	1-M	2-C	2-M	3-C	3-M	4-C	4-M	5-C	5-M
HBV DNA (IU/ml)		6.21×10^7	2.26×10^8	1.08×10^8	1.03×10^3	1.49×10^6	5.83×10^7	2.34×10^7	8.99×10^7	3.83×10^7	1.99×10^8
优势基因型		B	B	B	B	B	B	C	C	B	B
	124	~	16364C/33 90G/719S	~	~	~	~	~	~	~	~
	126	~	~	4884T/887	~	~	~	~	~	~	~
	130	~	21016G/15 88A/790E	~	~	~	~	20870G/1 665E/668 A	~	~	~
多 态 性 显 著 增 高 氨 基 酸 位 点	137	9938C/ 1207S	25716C/ 4718S	7509C/11 30S	42194C/6 656S	5627C/10 52S	5195C/74 8S	~	~	~	~
	139	~	~	~	~	~	~	23918C/3 885Y	24036C/3 893Y	10756C/1 419Y	17983C/2 323Y
	140	11175T/ 1469I	27148T/ 5463I	8296T/141 0I	41815T/77 59I	6533T/125 8I	5777T/894 I	~	~	~	~
	141	10194K/ 1436R	24756K/ 5336R	7590K/13 65R	37304K/7 553R	5978K/11 70R/104T	5304K/87 1R	23383K/2 280R	23652K/1 986R/312 T	9993K/11 27R	16685K/1 812R
	142	9212P/ 1035L	~	~	~	~	~	19977P/33 99L	20787P/31 24L	8722P/127 6L	14701P/19 52L
	143	~	~	6166T/878 S	~	~	~	~	~	~	~
	144	9003G/ 1164R	23358G/ 4267R	6183G/15 05R	37256G/5 798R	6154R/38 4G	4930G/72 7R	17197G/1 932R	~	~	~

注:字母 C 代表儿童,字母 M 代表母亲。“~”表示此位点仍然由多种氨基酸构成,但位点复杂度未明显增高

(6154A/384G),以突变型为主导;其他位点优势氨基酸仍然为野生型。“a”决定簇复杂度明显增高的氨基酸位在母子中的分布见表 2。

3 讨 论

HBV 最主要的传播途径为母婴传播,本研究通过对 5 对母子 HBV 全基因序列测定,发现母子 HBV 基因序列同源性为 99%~100%,即有很高的相似性,这与 Sa-Nguanmoo 等^[8]报道的基本一致,构建的进化树表明母子之间感染的 HBV 有很接近的进化关系,以上结果都表明,儿童体内的 HBV 可能由其母亲传播所致,宫内传播的发生可能导致了婴儿出生后乙肝疫苗接种的失败。

由于测序技术等因素的限制,B+C 混合基因型在以往的研究中较少报道。本研究中发现所有母子均为 B+C 混合型感染,混合型比例(100%)显著高

于其他文献的报道^[9],这提示了高通量测序较其他传统分型方法能更敏感地检测出混合基因型。本研究中优势 B 型较多,说明重庆地区 HBV 感染以 B 型为主,这之前对重庆地区 HBV 基因型的报道一致^[9-10]。且 5 对母子对之间优势基因型均相同,进一步印证 HBV 的母婴传播。

HBV S 基因“a”决定簇由 HBsAg 的 124~147 位氨基酸组成,国内外有多篇文献报道,乙肝疫苗接种失败者体内存在的“a”决定簇变异可能会导致 HBV 抗原性改变,使 HBsAb 对其反应下降,从而产生免疫逃逸^[11]。不同于以往只关注于优势核苷酸的变异,本研究应用高通量测序技术,得到 5 例乙肝疫苗接种失败儿童及其母亲体内 HBV 基因组上每个位点的核苷酸分布情况,发现每个位点均为野生型核苷酸和突变型核苷酸混合存在,证明了 HBV 在宿主体内以准种的形式存在。本研究还发现了一些复杂度显著增高的氨基酸位点,尽管这些位点的优

势型氨基酸可能仍然为野生型,但其突变型氨基酸种类和频率明显增高,意味着这些突变型氨基酸有发展为优势型氨基酸的潜力,最终可能会导致优势氨基酸突变,因此同样值得关注。

所有疫苗接种失败儿童均在“a”决定簇存在复杂度显著增高 aa 位点,存在于儿童的部分复杂度明显增高位点,如 aa137、aa139、aa140 及 aa141,在其母亲中也表现为一致的复杂度增高或未增高,说明儿童这些位点显著增高的复杂度可能是由其母亲宫内传播所致,与免疫压力的关系不大。而有些位点在某些儿童中复杂度明显增高却在其母亲中未显著增高,如 aa126、aa130、aa142、aa143 及 aa145 位点,说明儿童在这些位点的变异程度可能大于其母亲,这提示着这些位点可能更容易受到乙肝疫苗免疫压力的影响而发生变异,其中 aa126 和 aa143 位点仅在儿童中存在明显复杂性,而在所有母亲中并未发现,可能意义更大。

只有 1 例儿童发生优势氨基酸突变,为 aa145 位的甘氨酸突变为精氨酸(G145R),疫苗接种失败儿童体内 G145R 突变被国内外广泛报道。但以往的研究并未对此突变的来源进行阐明。本研究通过对比这对母子之间该位点的氨基酸种类和数量,发现这个位点在发生突变儿童的母亲体内,野生型氨基酸为优势氨基酸,突变型氨基酸为劣势氨基酸(4930G/727R)。而在儿童体内突变型氨基酸变为了优势氨基酸(6154R/384G)。可以看出,该位点在这对母子体内的氨基酸种类是相同的,而各自在 HBV 准群中所占的比例在母婴传播后发生了变化。这说明,儿童体内的突变株可能并不是凭空产生的,而是由其母亲传播而来,这些突变株原本就以劣势株存在于其母亲体内,当其传播给儿童后,可能在乙肝疫苗的免疫压力下,或者在慢性 HBV 感染发展的过程中被逐渐选择出来,成为儿童体内的优势株,可

能导致免疫逃逸。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学会.慢性乙型肝炎防治指南[J].中华传染病杂志,2005,13(12):421-431.
- [2] 许红梅,任红,彭明利,等.母婴传播感染 HBV 儿童及其母亲体内 HBV preS/S 基因准种序列以及变异特点研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2003,23(3):173-177.
- [3] Jabara CB, Jones CD, Roach J, et al. Accurate sampling and deep sequencing of the HIV-1 protease gene using a Primer ID[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(50):20166-20171.
- [4] Günther S, Li BC, Miska S, et al. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients[J]. J Virol, 1995, 69(9):5437-5444.
- [5] Bouquet J, Cheval J, Rogée S, et al. Identical consensus sequence and conserved genomic polymorphism of hepatitis E virus during controlled interspecies transmission[J]. J Virol, 2012, 86(11):6238-6245.
- [6] Liu F, Chen L, Yu DM, et al. Evolutionary patterns of hepatitis B virus quasispecies under different selective pressures: correlation with antiviral efficacy[J]. Gut, 2011, 60(9):1269-1277.
- [7] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10):2731-2739.
- [8] Sa-Nguanmoo P, Tangkijvanich P, Tharmaphornpilas P, et al. Molecular analysis of hepatitis B virus associated with vaccine failure in infants and mothers: a case-control study in Thailand[J]. J Med Virol, 2012, 84(8):1177-1185.
- [9] 曾爱中,黄爱龙,郭进军,等.型特异引物 PCR 法分析 238 株乙肝病毒基因型[J].重庆医科大学学报,2008,33(1):53-56.
- [10] 刘琦,曾爱中,秦波,等.荧光定量 PCR 法分析乙肝病毒基因型及载量[J].重庆医科大学学报,2011,36(7):829-832.
- [11] 钱福初,邹伟华,秦基取,等.湖州地区乙肝疫苗免疫失败儿童乙肝病毒 S 基因“a”决定簇变异分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2012,26(3):176-178.

(责任编辑:冉明会)