



mol/LTris-Cl)和 10mg/ml 蛋白酶 K10 滋... 离子水至总体积 200 滋... 益消化 2 h袁常规苯酚和 氯仿法抽提

1.2.4 PCR 扩增 以上述抽提的 HBVDNA 为模板袁 取 10 滋... 用外引物 BS1 和 S1R 进行第 1 轮 PCR 扩 增袁取 5 滋... 第 1 轮扩增产物用内引物 BS1 和 P29 行 第 2 轮 PCR 扩增袁得到 700bpS 区遥PCR 所用引物 序列见表 1袁CR 反应条件见文献咱

表 1 PCR 所用引物

Tab.1 Primers used for the polymerase chain reactions

Primer	Sequence	Position
BS1	5'CTGCTGGTGGCTCCAGTTCC3'	S56~76
S1R	5'TAGGGTTTAAATGTATACCC3	S842~822
PreS2	5'GGGACACCATATTCTGG3'	S2820~2837
P29	5'TACCCAAAGACAAAAGAAA3'	S827~807

1.2.5 PCR 产物克隆 载体为 PGEM-T(试剂盒 购自 Promega 公司)袁受体菌为 JM109 (本室传代保 存)遥在连接酶作用下袁 益水浴连接过夜袁连接产物转 化受体菌袁在 IPTG 和 X-ycl 存在下有外源基因插入 者为白斑袁挑取白斑扩大培养袁用 PCR 法筛检阳性克 隆袁克隆产物直接测序遥测序由上海生物工程公司进 行袁在 ABI377 型自动测序仪上测序袁引物为 BS1 遥

2 结果

2.1 婴儿 HBV 感染情况

95 例 HBsAg 阳性母亲的婴儿袁 年内有 7 例测 得 HBsAg 阳性袁阳性率为 7.3%遥其中 3 例在出生后 24 h 静脉血即出现 HBsAg袁 例出生后 6 月出现 HB- sAg袁 例出生后 12 月出现 HBsAg遥

2.2 母亲病毒水平

95 例 HBsAg 阳性母亲检测出 HBVDNA 阳性 58 例袁 例免疫失败的婴儿的母亲亦在其中遥 7 例免 疫失败组婴儿和另 51 例免疫成功组婴儿母亲血清中 HBVDNA 含量水平比较见图 1袁两者比较有显著性 差异(F=17.42袁<0.01)遥

2.3 克隆测序结果

7 对母婴配对样本克隆后每 1 标本各取 5 个克 隆测序袁共测 70 个克隆袁分析其序列遥其中 1 对样本 中婴儿体内的优势株为母体内的弱势株袁新测母婴各 5 个克隆中袁26 位苏氨酸仅见于母亲的 1 个克隆袁 在婴儿体内所测 5 个克隆全部为 126 苏氨酸遥另有 1 标本与母亲序列比较婴儿出现 131 位苏氨酸到丙 氨酸变异遥

3 讨论

文献报道咱袁约 6%~7%(8/108)的婴儿尽管给予 乙型肝炎疫苗和 HBIG 联合免疫袁在出生后 1 年内仍

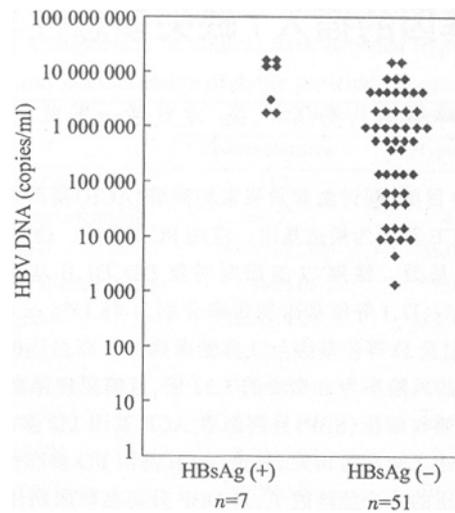


图 1 联合免疫失败组与成功组婴儿母亲 HBVDNA 含量 Fig.1 HBV DNA levels in the mothers of 7 infected nonresponders and in 51 HBV DNA-positive mothers of noninfected responders to hepatitis B vaccine and immunoglobulin

发生 HBV 感染遥本研究也有类似结果袁约 7%~8% (7/95)的婴儿出生后 1 年内发生 HBV 感染遥发生感染 婴儿母亲血清中 HBVDNA 水平显著高于联合免疫 后得到保护的婴儿母亲血清中的水平遥

自从 Carmen 等咱报导了在给予了免疫预防但仍 感染了 HBV 的婴儿体内发现 a 决定簇变异后袁长期 以来一直认为 a 决定簇变异是导致免疫预防失败的 主要原因遥但 vonWeizsacker 等咱所做的一份研究发 现袁HBsAg 阳性母亲所生 321 例经联合免疫的婴儿 20 例渊%袁发生 HBV 感染遥对此 20 例中的 17 例进 行序列研究仅 2 渊%袁出现 S 基因变异遥我们的结 果和该结果类似袁 例发生乙型肝炎感染的婴儿中仅 1 例渊4.3%袁出现 S 基因 131 位氨基酸由苏氨酸到丙 氨酸的变异遥因此袁疫苗逃避性变异似乎不是免疫失 败的主要原因遥

克隆测序结果显示母婴配对样本中有 1 例母亲 的毒株群体和婴儿的毒株群体显著不同袁婴儿的序列 直接源于母亲袁但是母亲感染的毒株群体只有一小部 分传播给婴儿曰母亲感染的少数株袁 个克隆中的 1 个克隆袁成为婴儿的优势株 5 个克隆中的全部遥文献 也有类似的报道咱遥国内学者咱也做过阳性孕妇血清 中 HBVS 基因存在相似株的研究遥提示从婴儿体内 检测出新毒株袁未必是其感染后新出现的变异株袁 可能在母亲病毒群体中所占比例过少袁难以检出袁 而在新宿主体内得以扩增遥本病例选择性发生在 126 位氨 基酸袁母亲 126 位氨基酸为苏氨酸和异亮氨酸混合感 染袁婴儿 126 位氨基酸为苏氨酸单一毒株遥苏氨酸和 异亮氨酸亲水性不同有可能导致 a 决定簇抗原性改