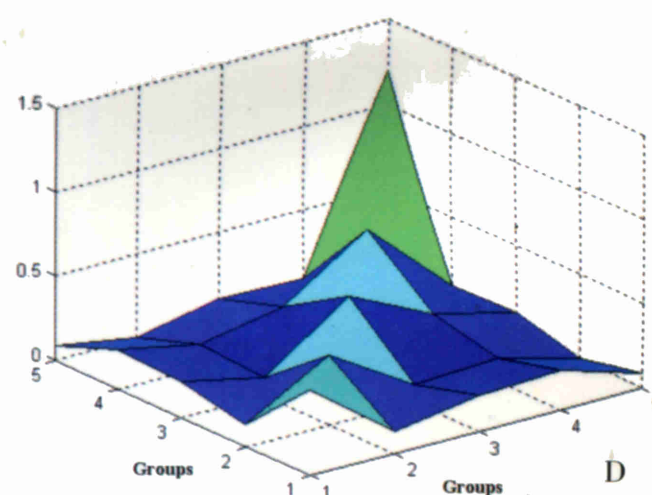
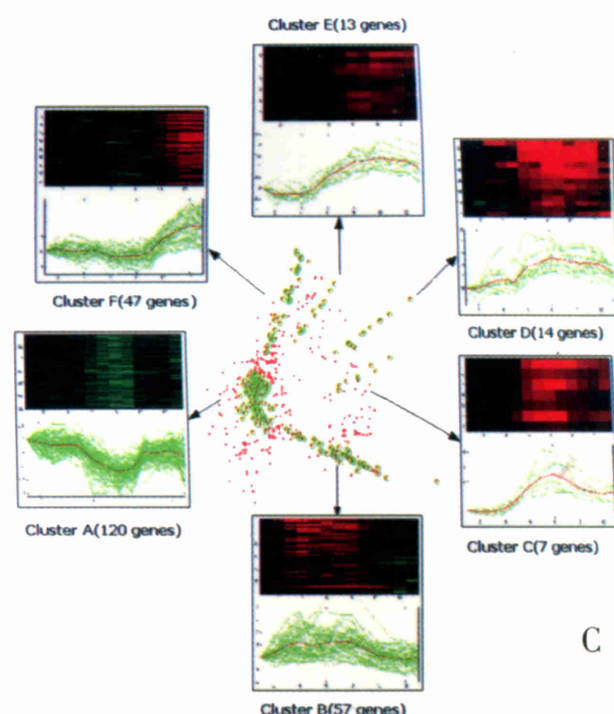


# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 10 月 15 日 第 11 卷 第 10 期 (Volume 11 Number 10)



**10/2003**

ISSN 1009-3079



名誉总编辑  
潘伯荣  
总编辑  
马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports® Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.



# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003 年 10 月 15 日 第 11 卷 第 10 期 (总第 114 期)

述 评	1465 复杂性疾病生物信息学研究的策略与方法 李梢, 张学工, 季梁, 李衍达
幽门螺杆菌	1470 幽门螺杆菌黏附素基因 babA <sub>2</sub> 的克隆、序列测定及其生物信息学分析 白杨, 黄文, 王继德, 张兆山, 周殿元, 张亚历 1475 幽门螺杆菌 HspA 与大肠杆菌 LTB 基因融合及表达 郭红, 邹全明, 赵晓晏, 吴超 1480 人幽门螺杆菌热休克蛋白 A 编码基因的克隆、表达及抗原性研究 姜政, 蒲丹, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙 1485 幽门螺杆菌对克拉霉素耐药的分子基础 郝庆, 李岩, 高红, 张显忠
基础研究	1488 氧化苦参碱对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化 I, III, IV 型胶原表达的影响 陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 邱德凯, 杨文卓, 贾一韬, 曹爱平 1492 粉防己碱、大黄与潘生丁抗肝纤维化作用比较 王如涛, 陈颖伟, 卫新革, 徐芹芳, 李定国 1497 珍珠梅水提物对大鼠肝损伤的保护作用 张学武, 朴龙, 刘超, 孙权, 金海玲, 尹宗柱 1500 乙型肝炎病毒 S 基因系列单突变克隆人工构建 余祖江, 杨东亮, 张俊, 郝友华, 王宝菊, 郝连杰 1505 急性胰腺炎大鼠肝脏 NF- $\kappa$ B 对 ICAM-1 表达的调控及其意义 石力, 田伏洲, 黄大熔, 李旭, 赵碧, 顾大勇, 唐旭东, 王雨 1508 丁酸钠对结肠癌细胞株 HT-29 组织蛋白酶 D 表达水平的影响 李曦, 罗和生, 李凡 1511 国人青年结直肠癌解剖部位分布及临床病理特点 谢正勇, 卿三华 1515 慢性乙型肝炎病毒清除自杀基因平衡制约载体系统的构建 阙全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰 1520 人工构建含丙型肝炎病毒核糖体插入位点的双顺反子表达载体 阙全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰 1524 溃疡性结肠炎患者肠黏膜 Th1/Th2 类细胞因子 m-RNA 的表达 崔海宏, 陈村龙, 杨玉捷, 张祚建, 张耀东, 崔耀升
临床研究	1528 自膨胀金属支架治疗晚期食管癌吞咽困难 26 例 张朋彬, 赵晓晏, 李宜辉, 达四平 1531 胃癌组织 CD <sub>44</sub> v9 和 MMP-2 基因的表达 张翠萍, 田宇彬, 赵清喜, 武军, 梁永信 1535 奥沙利铂综合治疗胃癌的疗效及机制 林万隆, 李定国, 陈强, 陆汉民, 马小明, 孙培龙 1540 聚合酶链反应检测 SEN 病毒 D 型和 H 型方法的建立及初步应用 唐蔚, 彭晓谋, 张瑛, 王辉, 蒋晓玲, 周伯平 1544 肝病患者血清 IGF-I 和 IGF-II 的变化 邵静鸣, 俞丽芬, 张曙, 吴云林 1547 ERCP 对儿童胰腺炎的诊断与治疗价值 李兆申, 许国铭, 施新岗, 邹晓平, 金震东, 孙振兴 1550 急性胆源性胰腺炎内镜诊治疗效及安全性 王东, 李兆申, 张文俊, 潘雪, 孙振兴, 邹晓平 1554 胰腺癌组织 ChAT, GAD65 和 PKC 酶活性的表达 杨竹林, 王群伟, 邓星辉, 李代强, 吕芳, 李永国 1558 国人胆囊结石的形态结构特征 吴杰, 杨海珉, 李静仪, 宋一德, 刘刚 1563 结核性腹膜炎与恶性腹水端粒酶活性 赵金满, 李福才, 于继红, 崔巍, 傅宝玉, 沙文阁
科研方法	1566 山莨菪碱联用地塞米松治疗腹部外科疾病并发 MODS 临床研究的操作方案 岳茂兴
文献综述	1569 门脉高压性肠病 尹朝晖, 刘浔阳 1572 肝纤维化治疗研究进展 叶方鹏, 肖冰, 张万岱 1576 现代肝脏局部解剖在活体部分肝移植应用的研究进展 方驰华, 朱新勇 1581 生长抑素类似物治疗肝细胞肝癌的抗肿瘤作用及其机制 冒海蕾, 黄介飞 1588 胰头部解剖在扩大胰十二指肠切除术中的应用 方驰华, 马俊勋, 钟世镇 1593 p53 基因在肿瘤基因治疗中的研究进展 张艳, 何凤田 1597 血管抑素的研究进展 陈建发, 黄宗海 1601 TGF $\beta$ -Smad 信号转导通路与肝纤维化 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙 1606 消化管发育中上皮细胞凋亡研究进展 李均, 汪维伟 1609 生物芯片技术及其在消化系统疾病研究中的应用 蒋业贵, 李兆申



文献综述	1614 Wilson病的诊断和治疗 林连捷, 郑长青 1618 E- 钙粘蛋白与食管癌侵袭转移的关系 吴静, 薛群基, 刘维民, 王爱勤, 寇伟 1621 胰腺癌的光动力学治疗 丁新民, 顾瑛, 刘凡光 1624 Ets 转录因子家族在发育和肿瘤发生中作用的研究进展 张健, 高福禄, 刘芝华 1628 核因子-κB 与细胞凋亡关系的研究进展 於亮亮, 于皆平, 罗和生, 于红刚
研究快报	1632 paxillin 在胃腺癌中的表达及临床意义 田素芳, 熊永炎, 余少平, 汪必成 1634 丹参对 TGF-β1 刺激的 NIH/3T3 细胞 <i>c-fos</i> mRNA 表达和 AP1 蛋白结合活性的影响 胡旭东, 王晓玲, 童普德, 吴小江, 刘平 1636 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用 郝悦, 周新民 1638 端粒酶在大肠癌细胞中的活性表达及临床意义 鲁明良, 林富林, 郑国宝, 姜朝晖 1640 多种因子在门脉高压大鼠结肠黏膜中的表达 尹朝晖, 刘浚阳, 黄飞舟, 黄穰浪, 任树平 1642 黄连素对 HT-29 人结肠癌细胞系 Ca <sup>2+</sup> 的抑制作用 台卫平, 罗和生 1645 DPC4 蛋白在不同病理分期的结肠肿瘤中的表达 唐朝晖, 邹声泉, 杨想平, 陈启奇 1646 Genistein 和 PD98059 对 aFGF 及 bFGF 诱导的 CCL229 细胞增生的抑制作用 尚海, 张颐, 单吉贤 1649 CO <sub>2</sub> 气腹对肠道菌群生物学特性影响的实验研究 周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿 1652 CO <sub>2</sub> 气腹对大鼠胃肠肌电作用的实验研究 周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿 1654 CO <sub>2</sub> 气腹对胃黏膜血管活性肠肽及 P 物质含量的影响 周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿
临床经验	1656 腹腔严重感染致多器官功能障碍的临床救治新对策 岳茂兴 1657 解毒固本冲剂治疗腹腔感染合并全身炎性反应综合征的临床研究 姜玉峰, 岳茂兴 1659 TIPSS 和 EVS 治疗食管静脉曲张破裂出血的临床分析 诸葛宇征, 王英德, 刘丽娜, 宫爱霞, 赵钢
消 息	1504 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 1568 欢迎订阅 2004 年度世界华人消化杂志 1571 欢迎订阅 2004 年度 World Journal of Gastroenterology® 1580 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1613 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 1655 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助
封面故事	1553 清华大学生物信息学研究所、生物信息学教育部重点实验室

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名  
陈可冀 题写版权刊名  
(月刊)

创刊 1993-01-15  
改刊 1998-01-25  
出版 2003-10-15  
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀  
黄象谦  
黄志强  
黎介寿  
刘耕陶  
裘法祖  
汤钊猷  
王宝恩  
危北海  
吴孟超  
吴咸中

社长总编辑 马连生  
中文编辑 潘伯荣  
王瑾晖  
英文编辑 朱丽虹  
排版 李少华  
校对 李天华

张金哲  
张学庸  
赵东海  
周殿元

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会  
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号  
E-mail: wcjd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市 2345 信箱  
E-mail: wcjd @ wjgnet.com  
http://www.wjgnet.com  
电话: 010-85381892  
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局  
国外: 中国国际图书贸易总公司  
(100044, 北京 399 信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部  
(100023, 北京市 2345 信箱)  
电话: 010-85381892  
传真: 010-85381893  
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

## 本刊已被国内外检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》  
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》  
俄罗斯《文摘杂志(PЖ)》  
中国科技论文统计与分析  
中国学术期刊文摘  
中国中医药信息服务网  
中国生物医学文献光盘数据库  
《中文科技资料目录(医药卫生)》  
中国生物医学期刊目次数据库  
中国医学文摘外科学分册(英文版)  
中国医学文摘内科学分册(英文版)

## 特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期 24.00 元 全年 288.00 元	1401004000050

www.wjgnet.com



# 乙型肝炎病毒S基因系列单突变克隆人工构建

余祖江, 杨东亮, 张俊, 郝友华, 王宝菊, 郝连杰

余祖江, 杨东亮, 张俊, 郝友华, 王宝菊, 郝连杰, 华中科技大学同济医学院同济医院临床免疫研究室 湖北省武汉市 430030  
余祖江, 男, 1970-06-03, 河南信阳人, 2001年博士毕业于华中科技大学, 从事病毒性肝炎慢性化分子机制研究。  
国家“十五”科技攻关项目, No.2001BA705B05  
国家重大基础研究项目, No.973-20014CB51008  
项目负责人: 杨东亮, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院临床免疫研究室. dlyang@tjh.tjmu.edu.cn  
电话: 027-83662894  
收稿日期: 2003-03-07 接受日期: 2003-03-28

## Construction and analysis of HBV S gene clones with artificial mutation sites

Zu-Jiang Yu, Dong-Liang Yang, Jun Zhang, You-Hua Hao, Bao-Ju Wang, Lian-Jie Hao

Zu-Jiang Yu, Dong-Liang Yang, Jun Zhang, You-Hua Hao, Bao-Ju Wang, Lian-Jie Hao, Division of Clinic Immunology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Correspondence to: Zu-Jiang Yu, Division of Clinic Immunology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, Hubei Province, China.  
Received: 2003-03-07 Accepted: 2003-03-28

## Abstract

AIM: To study the mutation in a determinant of HBV S gene, to explore how it influenced the biologic characteristics of S gene.

METHODS: Through site-mutation PCR, we constructed series variant clones (T126S, M133L, T144A) of HBV S gene 'a' determinant according to epidemiologic data.

RESULTS: After analysis of sequence and expression of cells, sequences of mutation clone were correct and the mutation of different positions in 'a' determinant could influence antigenicity of expressed HBsAg.

CONCLUSION: The successful construction and expression of variant clone provide the theoretical basis for developing new detection kit, HBV vaccine and HBIG.

Yu ZJ, Yang DL, Zhang J, Hao YH, Wang BJ, Hao LJ. Construction and analysis of HBV S gene clones with artificial mutation sites. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1500-1504

## 摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒(HBV)S基因高频突变位点(T126S, M133L, T144A)变异对HBV生物学活性的影响, 开发新的检测HBsAg试剂盒, 混合HBV多价疫苗及多效价的乙型肝炎免疫球蛋白(HBIG)。

方法: 利用人工定点突变技术, 基因重组, 建立系列HBV S基因'a'决定簇真核细胞表达的质粒。

结果: 测序和计算机软件分析, 克隆的质粒基因突变序列完全正确, 并且能在真核细胞中表达, 被HBsAg单克隆抗体识别。

结论: 所构建的乙型肝炎病毒S基因单突变克隆能够在真核细胞表达蛋白, 所表达的蛋白可以正确折叠, 维持天然二级构象, 具有良好的抗原性, 为开发新的检测试剂盒, HBV疫苗及高效价的乙型肝炎免疫球蛋白奠定物质基础。

余祖江, 杨东亮, 张俊, 郝友华, 王宝菊, 郝连杰. 乙型肝炎病毒S基因系列单突变克隆人工构建. *世界华人消化杂志* 2003;11(10):1500-1504  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1500.asp>

## 0 引言

我国是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的高流行区, 有报道全国血清学调查, HBsAg携带率达9.75%, 约1.2亿人, 慢性乙型肝炎患者约为3000万, 其中10-20%可以发展为肝硬化和肝癌。HBV在如此众多的人群中相互传播, 经受着巨大的宿主主动和被动免疫抵抗, 必须以变异等多种形式逃避宿主的免疫清除。由于病毒外膜蛋白在宿主保护性免疫起着重要作用, 因此外膜蛋白的变异是HBV变异最为常见的方式之一<sup>[1-6]</sup>。我们根据流行病学的调查结果<sup>[7-9]</sup>, 通过PCR定点突变技术(基因拼接重叠扩增PCR, gene SOEing PCR, gene splice of overlap extending PCR), 对患病人群中HBV S基因'a'决定簇高频突变频率位点进行人工定点突变, 得到真核细胞内表达克隆, 即T126S, M133L, T144A。最后采用真核细胞表达系统, 探讨HBV S基因'a'决定簇突变对其表达蛋白(HBsAg)的抗原性和免疫原性的影响。

## 1 材料和方法

1.1 材料 pcDNA3质粒购自Invitrogen公司, pCR3.1/SHBV质粒(含野生株HBVS基因). BHK-21(叙利亚仓鼠肾细胞)系本室保存. DNA/RNA定量分析仪, Pharmacia Biotech公司产; PTC-200PCR扩增仪, 美国MJ Research公司产; 凝胶成像分析系统, 美国UVP公司. Pfu聚合酶, EcoRI内切酶, SmaI内切酶, XhoI内切酶购自武汉中科建公司. 小牛碱性磷酸酶(CIAP), 123bp分子大小标准, 羊抗鼠免疫荧光抗体购自Gibco BRL公司. 凝胶回收试剂盒, 德国Qiagen公司. HBsAg鼠单克隆抗体由北京生物公司提供。

## 1.2 方法

**1.2.1 变异克隆的构建** PCR3.1/SHBV 和 pcDNA<sub>3</sub> 同时被 ECOR I 37 °C 酶切 5h(其中 pcDNA<sub>3</sub> 酶切后线装载体作以后连接用), 前者酶切后混合产物, CIAP 5' 去磷酸化, 与 pcDNA<sub>3</sub> EcoR I 酶切后线状载体连接. 提供下一步 Gene SOEing PCR 反应所需的模板. Gene SOEing PCR 引物(武汉金贝生物科技有限公司合成)HBV S 基因上, 下游引物 ZL、ZR 和 pcDNA<sub>3</sub> 载体对应引物 SP6R: ZL: (5' 位于 HBV 157, 5' - GCGCTGAACATGGAG AACATCAC-3', ZR: (5' 位于 HBV 860, 5' - CCA TCTTTTTGTTTTGTAAAGG-3'; 引物 SP6R, 位于 pcDNA<sub>3</sub> 载体上 SP6 启动子序列区: SP6R: 5' -AGCAT TTAAGTGACACTATAQAATAAG-3'. 定点突变 HBV S 基因 126, 133, 144 位的互补突变引物: 126 位突变互补引物 126L: 5' -CTGCATGACTAATGCTCAAGGAAC-3' (439-415), 126R: 5' -TTCTTGAGCACTAGTCATGCAG GTCC-3' (460-434); 133 位突变互补引物 133L: 5' -CCAGGAACCTCTCTGTATCCCTCC-3' (455-431), 133R: 5' -AGGGATACAGAGAGG TTCCTTGAGCA-3' (476-450); 144 位突变互补引物 144L: 5' -AACCTTCG GCCGAAA TTGC-3' (492-472), 144R: 5' -GTGCA ATTTCCGGCCGAAGGTTTG-3' (513-489). 按照 Horton et al (Gene, 1989;77: 61-68)方法进行, Pfu 酶保守扩增. 简单的说, 第 1 次 PCR: ZL 与 126R 扩增 126 位突变 S 基因的上半段; ZL 和 133R 扩增 133 位突变 S 基因的上半段; ZL 与 144R 扩增 144 位突变 S 基因的上半段(见图 1A). 126L 与 SP6R 扩增 126 位突变的 S 基因的下半段; 133L 与 SP6R 扩增 133 位突变的 S 基因的下半段; 144L 与 SP6R 扩增 144 位突变的 S 基因的下半段(见图 1B). 第 2 次 PCR 扩增利用引物 ZL 和 SP6R 进行(见图 1C). 最后提取 T126S, M133L, D144A 突变的 S 基因全长的 PCR 扩增产物(含有 pcDNA<sub>3</sub> 载体的多克隆酶切位点). XHOI 和 ECOR V 双向酶切 pcDNA<sub>3</sub>, 提纯. 同时用 XHOI

酶切 HBV S 基因定点突变产物, 提纯后与线状 pcDNA<sub>3</sub> 载体连接. 连接产物按常规方法进行转化感受态细胞后, 涂板, 37 °C 培养, 挑取单菌落, 常规培养转化后的菌株. 转化培养细菌 2 μl, ZL 和 ZL 为引物, 以 PCR3.1/SHBV 质粒作阳性对照, 进行鉴定和筛选. PCR 阳性克隆, 常规小提制备质粒, 分别 ECOR I 和 XHOI 双酶切鉴定. 小量提纯后质粒, 送大连宝生物工程公司, 采用双脱氧终止法进行全自动序列测定. 测序的结果利用计算机软件进行分析(见结果 2.2).

**1.2.2 变异克隆在真核细胞表达** 常规培养细胞, 转染前 1 d 将 BHK 细胞接种到 8 孔槽中, 加入含 10 % FCS 的 DMEM 培养基, 在 37 °C 和 5 % 的 CO<sub>2</sub> 中培养至细胞的融合率为 50-80 %. 用 QIAGEN 小量提取质粒试剂盒提取质粒 SHBV、T126S、M133L 和 D144A, 测定浓度后稀释到 1 g/L. 按 lipofectamine 试剂盒(boehringer mannheim biochemicals Co.USA)说明转染细胞, ELISA 检测细胞培养上清. PBS 洗涤细胞 2 次后用 4 °C 的甲醇和丙酮各半混合液低温固定 15 min, 间接免疫荧光检测. 固定后的细胞加鼠抗 HBsAg mAb(1:100 稀释), 37 °C 1 h 孵育. PBS 洗涤后加羊抗鼠 IgG-FITC (1:100 稀释, 含 1 g/L 的伊文氏蓝) 37 °C, 50 min. PBS 再洗涤后, 甘油封片后在荧光显微镜下观察照相.

## 2 结果

**2.1 S 基因上半段第 1 次 PCR 扩增产物结果电泳图(图 A); S 基因下半段产物第 1 次 PCR 扩增结果电泳图(图 B); 第 2 次 PCR 扩增的结果(图 C).**

**2.2 翻译蛋白质与 S 蛋白氨基酸序列同源性分析结果** Wshbvaa 代表野生株 HBsAg 的氨基酸序列, T126Saa, M133Laa 和 D144Aaa 分别代表 126, 133 和 144 位点突变后 HBsAg 的氨基酸序列. 黑体方框部分为 'a' 决定簇氨基酸序列一级结构和同源性序列比较结果如下.

	0	10	20	30	40	50	
	*	*	*	*	*	*	
Wshbvaa	MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTI PQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSN						
T126Saa	.....						
M133Laa	.....						
D144Aaa	.....						
	60	70	80	90	100	110	
	*	*	*	*	*	*	
Wshbvaa	HSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFI LLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGP						
T126Saa	.....						
M133Laa	.....						
D144Aaa	.....						
	120	130	140	150	160	170	180
	*	*	*	*	*	*	*
Wshbvaa	CRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQ						
T126Saa	.....S.....						
M133Laa	.....L.....						
D144Aaa	.....A.....						
Wshbvaa	WFVG						
T126Saa	.....G						
M133Laa	.....G						
D144Aaa	.....G						

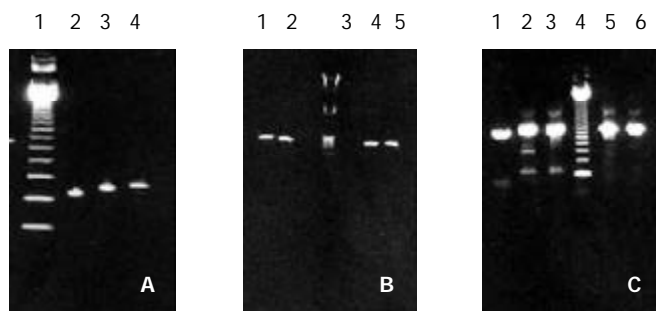


图1 SOEing PCR 扩增结果(图A, B, C). 图A: 泳道1为1 kb的Marker; 泳道2, 3, 4为126、133、144位S基因上半段序列第1次扩增产物, 分子量大小为378 bp、399 bp和432 bp. 图B: 泳道3为1 kb的Marker; 泳道1, 2, 4, 5分别为126、133和144, 144位S基因下半段序列第1次PCR扩增产物, 长度为380 bp、359 bp和326 bp(均含pcDNA<sub>3</sub>载体MCS位点及SP6启动子全长序列). 图C: 泳道4为123 bp的Marker; 泳道1为利用ZL, ZR扩增S基因的结果, 703 bp; 泳道2, 3, 5, 6 ZL和SP6R扩增相应模板的结果, 分别为126、133、144, 全长为758 bp(皆含有pcDNA<sub>3</sub>载体MCS位点及SP6启动子全长序列和相应的突变位点).

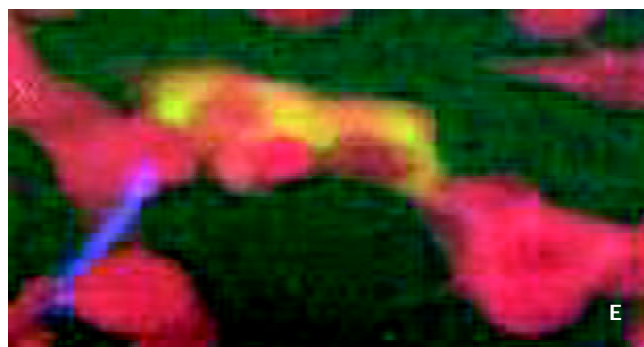


图2 系列突变克隆质粒转染后免疫荧光检测. A: Wild S; B: 阴性对照; C: T126S; D: M133L; E: 144A.

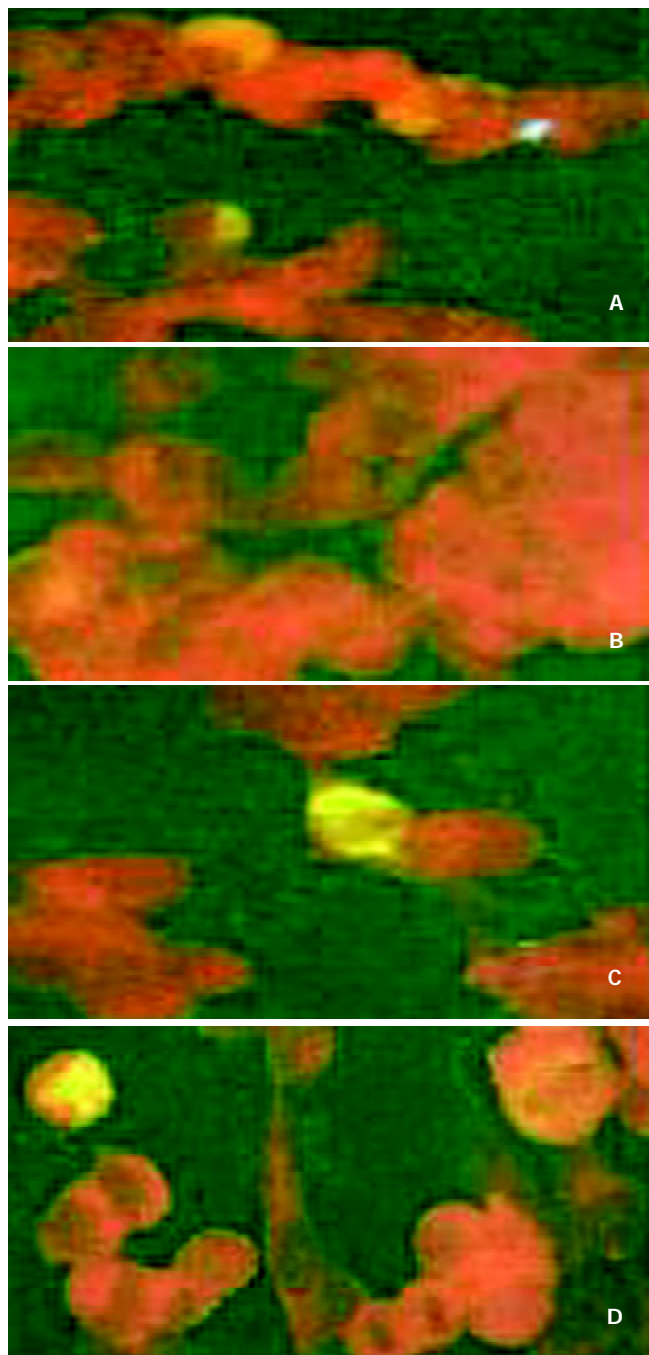
**2.3 BHK-21 细胞免疫荧光检测** 各突变质粒经脂质体包裹后, 转染BHK细胞3 d后, 收获细胞, HBsAg单克隆抗体免疫荧光检测各突变质粒表达产物, 细胞内或膜表面出现特异性荧光颗粒为阳性(荧光图片下标题表明相应的质粒转染细胞结果, Wild S表示未发生变异的S基因克隆, 空载体转染细胞的结果为阴性对照, 图2).

### 3 讨论

体外实验已经证实, S蛋白是形成HBV亚病毒颗粒的主要组成部分, 和其他蛋白一样由粗面内质网的膜结合核糖体合成的, 由226个氨基酸构成, N端信号I引导蛋白进行跨膜转运, 其下游的信号II在第80-90位氨基酸之间有一个疏水结构, 在信号II和S蛋白疏水性C末端形成一个环状结构, 其上携带主要的HBsAg抗原决定簇‘a’(Howard CR. J Viral Hepatology. 1995;2: 165-170). HBsAg‘a’决定簇是HBsAg诱导保护性抗体最主要的抗原决定簇, 其氨基酸表位上共有28个氨基酸, 含有构象依赖性B细胞表位和T<sub>H</sub>细胞表位, 他们与HBsAg抗原性及抗HBS的产生密切相关<sup>[7]</sup>. 通常基因组合的HBV疫苗包含S或者M蛋白, ‘a’决定簇的氨基酸任何变异, 在空间构象都会对疫苗产生的抗体有决定性影响<sup>[10-12]</sup>.

HBsAg是HBV感染的最重要标志, 一般认为抗-HBS出现表示宿主已将病毒清除并具备中和外来HBsAg的能力. 目前研究显示, HBsAg阴性或抗HBS阳性并不能排除HBV病毒血症. 提取这些病毒核酸, 序列分析的结果显示HBV S基因往往出现变异.

Carman et al最早发现在一意大利无症状携带者体内的G145R突变株可以稳定存在5 a. Ogata et al<sup>[13]</sup>从意大利患儿获得的G145R突变株血清感染黑猩猩, 证明该突变株可以在体内完整复制, 具有感染性和致病性. Coleman et al<sup>[14]</sup>对乙型肝炎病毒S基因‘a’决定簇在患者人群中高突变频率位点G145R, M133A突变质粒等分析表明, 不同的商业试剂盒对这些产生突变质粒所表达的HBsAg识别能力下降或根本不具备识别能力. 在被动免疫预防的儿童, 国内也发现了‘a’决定簇的变异: 在评估这些基因突变及其可能影响中发现, 逃避



被动免疫的儿童重新感染的HBV基因组中,有93.4%的样品的HBV基因组发生突变,其中对HBV S基因‘a’决定簇的点突变占30%以上,他们可以水平或垂直传播,并且不易被现有HBsAg检测试剂盒检测<sup>[15]</sup>.

在慢性感染患者人群中,S基因突变十分常见,突变位点多集中于‘a’决定簇第一个环上面.另外在乙型肝炎疫苗主动预防失败和高效价HBIG预防器官移植患者再感染HBV的人群中,‘a’决定簇也常常发生突变,但突变的位点多集中于a决定簇第2个环上面<sup>[16,17]</sup>.HBV‘a’决定簇的基因突变可以导致HBsAg明显抗原性和免疫原性变化,导致现有的试剂盒诊断的漏诊、误诊和疫苗预防和HBIG被动免疫的失败,因此早期检测和预防显得十分必要.解决上述问题关键在于对这些突变株所表达的蛋白在体内和体外的生物学活性进行细致的研究.

Coleman et al用HBsAg的单克隆抗体,可以检测标准试剂盒无法检测的‘a’决定簇129位氨基酸和145氨基酸突变<sup>[14,18]</sup>.Van Deursen et al<sup>[19]</sup>用PCR检测了HBsAg试剂盒检测阴性的慢性HBV感染者, Ma et al<sup>[20]</sup>用突变PCR检测了HBV基因组第551位核苷酸突变.闻玉梅 et al用单克隆抗体识别129位氨基酸突变,并构建了相应的突变基因克隆.他们在分析该克隆所表达的抗原的抗原性和免疫原性时发现:相应突变的HBsAg的抗原性和免疫原性发生了很大的变化<sup>[21]</sup>,后来他们又通过基因免疫的方式进一步阐述前述的结果<sup>[22]</sup>.为了在整体上分析突变位点对HBV生物活性的作用,最近Liu et al一次克隆了HBV全基因组,分析HBV基因突变与病毒免疫清除之间的关系,位点突变对HBV生物学特性的影响<sup>[23]</sup>.

在不同的患者人群中,HBV S基因‘a’决定簇上每一个氨基酸都可以发生点突变或和其他位点突变一起产生复合突变<sup>[24-26]</sup>,不同的位点突变对HBsAg的抗原性都会存在着或多或少的影响.因此对不同人群中高突变频率的位点研究显得更具有意义.

我们根据流行病学调查结果,以HBV S基因野生株为基础,利用Gene SOEing PCR技术,获得系列HBV S基因突变克隆.经过序列测定和氨基酸同源性分析表明:与野生株HBV S基因克隆相比,除目的位点突变外,除目的位点氨基酸突变外,其余位点氨基酸与野生株HBsAg的氨基酸同源性比较为100%(见结果2.2).以上结果表明我们对野生株S基因‘a’决定簇高突变频率位点实行了定点突变,获得了3株在不同患者人群中具有高突变频率的S基因‘a’决定簇突变克隆.

HBsAg体外表达具有其特殊性:由于HBsAg对大肠杆菌有一定的毒性,他不能完整的在原核细胞内表达,必须通过一定基因修饰才能在大肠杆菌中表达<sup>[27,28]</sup>,这势必会影响到HBsAg的抗原性和免疫原性的变化;另外基因工程乙型肝炎疫苗大多在酵母和昆虫等真核表达系统中生产,但在酵母等系统表达的HBsAg不能分

泌到细胞外,且表达水平也不高,因此也具有一定的局限性<sup>[29-31]</sup>.我们将HBV S基因不同位点突变的基因克隆入真核表达载体pcDNA3中,转染BHK中表达,转染细胞上清用ELISA检测,细胞用间接免疫荧光法进行检测.结果表明,HBV S基因系列突变(T126S, M133L, T144A)克隆能在真核细胞中表达,正确折叠,维持天然二级构象,能够被HBsAg单克隆抗体识别(见结果2.3),具有良好的抗原性.可以用作开发新型乙型肝炎混合多价疫苗,高效价HBIG及HBsAg检测试剂盒,同时也为分析不同位点突变的HBV S基因克隆在体内表达HBsAg生物学活性,特别对其抗原性和免疫原性的分析奠定基础.

#### 4 参考文献

- 1 Chen HB, Fang DX, Li FQ, Jing HY, Tan WG, Li SQ. A novel hepatitis B virus mutant with A-to-G at nt551 in the surface antigen gene. *World J Gastroenterol* 2003;9:304-308
- 2 Weinberger KM, Zoulek G, Bauer T, Bohm S, Jilg W. A novel deletion mutant of hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol* 1999;58:105-110
- 3 Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Vargas V, Quer J, Cotrina M, Martell M, Esteban R, Guardia J. Genetic alterations in the S gene of hepatitis B virus in patients with acute hepatitis B, chronic hepatitis B and hepatitis B liver cirrhosis before and after liver transplantation. *Liver* 1999;19:177-182
- 4 Cabrerizo M, Bartolom inverted question mark J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 2000; 32:116-23
- 5 Koyanagi T, Nakamura M, Sakai H, Sugimoto R, Enjoji M, Koto K, Iwamoto H, Kumazawa T, Mukaide M, Nawata H. Analysis of HBs antigen negative variant of hepatitis B virus: unique substitutions, Glu129 to Asp and Gly145 to Ala in the surface antigen gene. *Med Sci Monit* 2000;6:1165-1169
- 6 Lee KM, Kim YS, Ko YY, Yoo BM, Lee KJ, Kim JH, Hahm KB, Cho SW. Emergence of vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus with multiple surface gene mutations in a Korean child. *J Korean Med Sci* 2001;16:359-362
- 7 Karthigesu VD, Allison LM, Ferguson M, Howard CR. A hepatitis B virus variant found in the sera of immunised children induces a conformational change in the HBsAg “a” determinant. *J Med Virol* 1999;58:346-352
- 8 Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Jantaradsamee P, Poovorawan Y. Variants within the “a” determinant of HBs gene in children and adolescents with and without hepatitis B vaccination as part of Thailand’s expanded program on immunization (EPI). *Tohoku J Exp Med* 2001;193:197-205
- 9 Wu L, Yuan ZH, Liu F, Waters JA, Wen YM. Comparing the immunogenicity of hepatitis B virus S gene variants by DNA immunization. *Viral Immunol* 2001;14:359-367
- 10 Karthigesu VD, Allison LM, Ferguson M, Howard CR. A hepatitis B virus variant found in the sera of immunised children induces a conformational change in the HBsAg “a” determinant. *J Med Virol* 1999;58:346-352
- 11 Preikschat P, Meisel H, Will H, Gunther S. Hepatitis B virus genomes from long-term immunosuppressed virus carriers are modified by specific mutations in several regions. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 10):2685-2691
- 12 Shinji T, Koide N, Hanafusa T, Hada H, Oka T, Takayama N, Shiraha H, Nakamura M, Ujiike K, Yumoto Y, Tsuji T. Point mutations in the S and pre-S2 genes observed in two hepatitis B virus carriers positive for antibody to hepatitis B surface antigen. *Hepatogastroenterology* 1998;45:500-502
- 13 Ogata N, Zanetti AR, Yu M, Miller RH, Purcell RH. Infectivity

- and pathogenicity in chimpanzees of a surface gene mutant of hepatitis B virus that emerged in a vaccinated infant. *J Infect Dis* 1997;175:511-523
- 14 Coleman PF, Chen YC, Mushahwar IK. Immunoassay detection of hepatitis B virus surface antigen mutants. *J Med Virol* 1999;59:19-24
- 15 Zhu Q, Lu Q, Xiong S, Yu H, Duan S. Hepatitis B virus S gene mutants in infants infected despite immunoprophylaxis. *Chin Med J* 2001;114:352-354
- 16 Mesenas SJ, Chow WC, Zhao Y, Lim GK, Oon CJ, Ng HS. Wild-type and 'a' epitope variants in chronic hepatitis B virus carriers positive for hepatitis B surface antigen and antibody. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:148-152
- 17 Schories M, Peters T, Rasenack J. Isolation, characterization and biological significance of hepatitis B virus mutants from serum of a patient with immunologically negative HBV infection. *J Hepatol* 2000;33:799-811
- 18 Yukimasa N, Ohkushi H, Fukasawa K, Fukuchi K, Takagi Y, Gomi K. Hepatitis B virus gene mutations in the sera of three patients with coexisting hepatitis B surface antigen and anti-surface antibody. *Rinsho Byori* 2000;48:184-188
- 19 Van Deursen FJ, Hino K, Wyatt D, Molyneaux P, Yates P, Wallace LA, Dow BC, Carman WF. Use of PCR in resolving diagnostic difficulties potentially caused by genetic variation of hepatitis B virus. *J Clin Pathol* 1998;51:149-153
- 20 Ma CL, Fang DX, Chen HB, Li FQ, Jin HY, Li SQ, Tan WG. A mutation specific polymerase chain reaction for detecting hepatitis B virus genome mutations at nt551. *World J Gastroenterol* 2003;9:509-512
- 21 Wu L, He JW, Yao X, Li HM, Wen YM. A novel hepatitis B virus variant S 129 (Gln-->Leu): lack of correlation between antigenicity and immunogenicity. *J Med Virol* 1999;59:424-430
- 22 Liu CJ, Chen PJ, Lai MY, Kao JH, Chang CF, Wu HL, Shau WY, Chen DS. A prospective study characterizing full-length hepatitis B virus genomes during acute exacerbation. *Gastroenterology* 2003;124:80-90
- 23 Bahn A, Gerner P, Martine U, Bortolotti F, Wirth S. Detection of different viral strains of hepatitis B virus in chronically infected children after seroconversion from HBsAg to anti-HBs indicating viral persistence. *J Hepatol* 1997;27:973-978
- 24 Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Lin HH, Wang SM, Chen DS. Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute or chronic infections despite immunoprophylaxis. *Hepatology* 1997;26:786-791
- 25 Kalinina T, Riu A, Fischer L, Will H, Sterneck M. A dominant hepatitis B virus population defective in virus secretion because of several S-gene mutations from a patient with fulminant hepatitis. *Hepatology* 2001;34:385-394
- 26 Gu B, Ren H, Zhang D. Expression of recombinant inserting mutants of HBsAg in vitro and its antigenic analysis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1999;79:139-142
- 27 Lee YH, Tung YT, Lo SJ. Expression and secretion of hepatitis B viral surface antigen in E.coli. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;135:1042-1049
- 28 Gu B, Ren H. Expression of HBsAg by using various eukaryotic expression vectors. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 1999;7:98-100
- 29 Kalinina T, Riu A, Fischer L, Will H, Sterneck M. A dominant hepatitis B virus population defective in virus secretion because of several S-gene mutations from a patient with fulminant hepatitis. *Hepatology* 2001;34:385-394
- 30 Qin S, Tang H, Zhao LS, He F, Lin Y, Liu L, He XM. Cloning of HBsAg-encoded genes in different vectors and their expression in eukaryotic cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1111-1113

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2002 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快

截止到 2002-07, 中国被著名检索系统 SCI 收录的科技期刊数从 63 种增加到了 67 种. 从制作 SCI 的美国 ISI (美国科学情报所) 发布的 JCR (期刊引证报告) 上的数据看, 有指标数据的 59 种我国科技期刊中, 80 % 以上的期刊影响因子呈上升趋势; 约 90 % 的总被引频次都提高了.

在 2001 年的 JCR 中, 总被引频次超过 1000 次的中国科技期刊有 4 个, 他们是《高等学校化学学报》(中文版)(1959 次), 《科学通报》(1628 次), 《物理学报》(中文版)(1227 次), 《中国物理快报》(1215 次).

首次有两个中国科技期刊的影响因子超过 1, 他们是《细胞研究》(2.102) 和《世界胃肠病学杂志》(1.445), 这两种期刊均为中国英文版科技期刊.

从期刊影响因子在本学科的排位看, 进入 SCIE 的我国科技期刊, 有 8 个期刊排在本学科的中上水平, 他们是《力学学报》, 《高等学校化学学报》(中文版), 《中国物理》, 《中国物理快报》, 《科学通报》, 《中国科学 B》, 《中国科学 E》, 《中国有色金属学报》.

在本学科国际期刊中, 我国有 10 个期刊被引频次位于中上水平的. 他们是: 《科学通报》, 《高等学校化学学报》(中文版), 《中国科学 A》, 《物理学报》(中文版), 《中华医学杂志》, 《化学学报》(中文版), 《中国物理快报》, 《中国有色金属学报》(英文版), 《中国科学 B》, 《中国药理学报》.

在 SCI 网络版收录的中国科技期刊中, 有 25 个期刊是由中国科学出版社出版的, 其中在 JCR 中有指标的期刊有 18 个.

另外, 除 SCI 系统外, 中国科技期刊被其他几个重要国际检索系统收录的数量也呈上升趋势. 例如, 在反映工程技术论文的历史超百年的检索系统《EI》(工程索引) 中, 中国被收录的科技期刊从最少时的 40 种, 增加到了 2000 年的 104 种. 这也直接反映了我国科技期刊被国际认可的程度.

国家科技部中国科技信息研究所, 每年对我国科技期刊在国内的情况做出统计分析, 定期出版《中国科技期刊引证报告》. 以 2000 年数据看, 我国科技期刊的平均影响因子由上一年的 0.208 上升到 0.240, 其中影响因子超过 1 的有 20 个; 总被引频次的平均值达到了 192.2 次, 总被引频次超过 1000 次的期刊有 25 个, 其中《科学通报》的总被引频次达到了 2979 次.

目前, 我国科技期刊数量已达到 4600 余种, 已经形成了一定的规模, 而且门类相对齐全, 为我国基础研究的发展和科研成果转化为生产力做出了重要的贡献, 但我们承认中国的科技期刊发展水平与世界发达国家之间存在较大的差距. 随着中国加入 WTO, 对于中国的科技期刊, 既是机遇又是挑战. 我们相信, 通过我国学术界和编辑部门的共同努力, 一定会在不远的将来产生一批具有国际水准的科技期刊.

(2002-11-08)





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

