

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年8月15日 第11卷 第8期

(Volume 11 Number 8)



8/2003

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 8 月 15 日 第 11 卷 第 8 期 (总第 112 期)

述 评

1073 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识 成军, 董菁

1081 重视溃疡性结肠炎的诊断和个体化规范化治疗 江学良

病毒性肝炎

1083 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳

1091 乙型肝炎病毒基因组中前-S 区编码基因的界定 董菁, 成军

1097 乙型肝炎病毒基因组中前-X 编码基因的界定 董菁, 成军

1102 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因 1 的克隆化研究 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克

1107 乙型肝炎病毒 X 蛋白激活基因 1 的克隆化与序列分析 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克

1114 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白结合蛋白基因 S2-29 的克隆化研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 张玲霞

1118 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒 e 抗原结合蛋白 E-19 的研究 陆荫英, 邵清, 成军, 陈天艳, 王琳, 梁耀东, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞

1122 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白新基因 C-12 的研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞

1126 乙型肝炎病毒 X 蛋白与去唾液酸糖蛋白受体 2 突变体相互作用的研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞

1131 羧肽酶 N 调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林

1135 丙型肝炎病毒 NS5A 基因变异与干扰素疗效的关系 张琳, 赵桂珍, 石理兰, 曹丽

1139 汉族人 IL-12b 和 IL-10 启动子区基因多态性与 HBV 感染的相关性 李永纲, 刘明旭, 王福生, 金磊, 洪卫国

基础研究

1144 肝外胆管癌组织 BAG-1 与 BAD 表达与凋亡调控的原位定量研究 闫庆国, 师建国, 黄高昇, 张传山, 李青, 胡沛臻, 王文亮

1148 牛磺酸脱氧胆酸损伤线粒体诱导 HepG2 细胞凋亡 李光明, 谢青, 周霞秋, 俞红, 郭清, 廖丹, 李定国

1152 肝硬化大鼠肝部分切除后肝细胞生长周期的调控 陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立

1156 苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注中肝窦内皮细胞损伤的影响 仇毓东, 朱新华, 史敏科, 丁义涛

1160 犬肝动脉输注阿霉素联合血液灌流的研究 张志友, 张文怡, 钱绍诚

1164 中国人金属基质蛋白酶组织抑制因子-1 基因的克隆与表达 刘双虎, 谭德明, 侯珏, 胡国龄

1168 卡托普利对肝纤维化模型鼠 MMP-2, 3 TIMP-2, 3 表达的影响 李乾, 张桂英, 李新华, 徐美华

1172 垂体后叶素和特利加压素降低门胆汁性肝硬化大鼠门静脉高压对肝组织氧分压的影响 祝建波, 邓利群, 王思元

1175 电泳法检测肝和血清中醇脱氢酶同工酶 宓庆梅, 曹鲁宁, 高春芳

1178 肝细胞生成素核受体的确定及特性 王阁, 陈东风, 胡铭, 王军, 樊丽琳, 张晓荣

1182 PD98059 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增生的影响 马洪德, 蒋明德, 钟显飞, 解方为, 曾维政

1185 雌二醇对肝纤维化大鼠 I, III 型胶原及 TGF β_1 表达的影响 许君望, 龚均, 冯新利, 茆新明, 罗金燕, 董蕾, 贾皓, 徐贵平

1189 大鼠急性酒精性脂肪肝造模方法的改进 冯志强, 沈志祥, 谭诗云, 罗和生, 漆楚波, 郭洁, 李海霞

1193 丁酸钠联合穿琥宁对人大肠癌细胞 HCT-8 增生的影响 布立民, 纪欣, 韩英, 陈刚, 王志红, 孙淑红

1197 大肠癌组织胸苷磷酸化酶 / 血小板衍生内皮细胞生长因子的表达及意义 余细球, 邓长生, 朱尤庆, 程芳洲

1200 多粘菌素 B 及其模拟肽体外抗内毒素的实验研究 万志红, 王宇明, 刘国栋

1203 肥大细胞在胃嗜酸性肉芽肿发病中的作用 高振军, 罗和生, 操寄望, 余保平, 宋刘来

临床研究	1207 鱼腥草治疗初发型溃疡性结肠炎的临床研究 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1211 奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎随机对照研究 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1214 抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性溃疡性结肠炎 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1219 胃癌前病变演变过程中凋亡相关蛋白和PCNA的表达意义 伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 祝庆孚 1223 汉防己甲素抑制肝癌细胞增生的作用 荆绪斌, 李涛, 杨绮华, 郭光华, 胡辉, 陈素钻 1227 美蓝染色放大电子结肠镜观察结肠息肉与组织病理学的关系 苏鲁, 潘洪珍, 翁敬飏, 徐艺华, 陈芳, 洪梅燕 1230 肝硬化患者血浆胃动素、胆囊收缩素、生长抑素及其胃电的改变 张蓉, 闻勤生, 黄裕新, 赵海峰, 田力 1234 肠易激综合征 402 例发病时间分布及症状特征 许小幸, 李定国, 宋光辉, 周惠清, 刘清华
焦点论坛	1237 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的研究进展 成军 1238 准种是乙型肝炎病毒存在的基本方式 成军, 董菁, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚 1240 乙型肝炎病毒 X 基因启动子结构及调节研究 邵清, 成军, 白雪帆 1242 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮 1245 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 1248 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活作用的研究 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 洪源, 张树林 1250 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对于细胞周期素 A 的调节研究 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚 1255 乙型和丙型肝炎病毒对细胞周期素及细胞周期素依赖性蛋白激酶的调节 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 1258 乙型和丙型肝炎病毒对 MAPKK 信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林 1261 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林 1264 RNA 干扰与抗肝炎病毒治疗前景的研究 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚
临床经验	1222 一氧化碳中毒伴筋膜间隙综合征的综合治疗 邹淑杭, 马丽萍, 金镇勋, 贺红, 王一玲, 李冰 1267 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤 21 例 樊丽琳, 陈东风
病例报告	1143 成人不典型郎格罕组织细胞增生症 1 例 王巍峰, 黄启阳, 王志强, 杨云生 1147 慢性酒精性肝损伤致 Gilbert 综合征样改变 1 例 张文瑾, 王晓峰, 赵景民 1192 小肠血管结构不良 2 例 冯瑞娥, 赵大春, 陈杰
消息	1080 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 1090 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 1130 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1155 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 1226 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台
封面故事	1138 溃疡性结肠炎的基础和临床研究

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 2003-08-15
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(PJ)》
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
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 M 4481

国内定价 每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营 14010040

50

www.wjgnet.com

乙型肝炎病毒基因组中前 - 前 - S区编码基因的界定

董 菁, 成 军

董菁, 成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
董菁, 男, 1969-02-07生, 河北省徐水县人, 汉族, 博士, 1993年第四军医大学毕业, 主治医师。主要从事乙型肝炎病毒分子生物学与病毒性肝炎治疗的研究。发表论文25篇, 参编专著4部, 获军队科技进步奖1次。
国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135
项目负责人:成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

Study on definition of pre-pre-S region in hepatitis B virus genome

Jing Dong, Jun Cheng

Jing Dong, Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070690; and the Key Science and Technology Brainstorm Project of PLA during the 9th five year plan period, No. 98D063; the Start-up Funds for Returned Overseas Students of PLA, No. 98H038; and the Science and Technology Brainstorm Funds for Young Scholars of PLA during 10th five year plan period, No. 01Q138; and the Research and Technology Foundation of PLA during 10th five year plan period, No.01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: To investigate the new open reading frame (ORF) in hepatitis B virus (HBV) genome.

METHODS: The whole HBV genome was amplified by long-distance and accurate polymerase chain reaction (LA-PCR) method from the serum of 2 patients with chronic HBV infection, and then the PCR products were ligated into pGEM Teasy vectors. Five clones of HBV genome were sequenced. Sequences of our finding were compared with other HBV genome sequence deposited in GenBank.

RESULTS: A new ORF was found in HBV genome, just before Pre-S1 region. It was defined as pre-pre-S region. The pre-pre-S ORF was deduced to be translated with Pre-S1, Pre-S2 and S gene in frame. Its amino acids sequence was as the following: MQLIITSKLGIIYILCGRLVFYIREKLHAVPHFVGHHILGNKSYS. There was a TA-rich region before the ATG of pre-pre-S ORF, indicating a possible promoter for its transcription.

CONCLUSION: There is a new ORF pre-pre-S located upstream to pre-S1 region.

Dong J, Cheng J. Study on definition of pre-pre-S region in hepatitis B virus genome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1091-1096

摘要

目的: 乙型肝炎病毒(HBV)基因组内部结构基因与编码基因之间相互重叠,是基因组序列高度集中利用的一个典型。早期研究中确定了编码病毒蛋白的4个开放读码框架(ORF),本研究通过对于中国HBV感染者的流行病毒株的基因序列进行分析比较,阐明基因组结构的特点,并探索是否存在新型ORF的可能性。

方法: 考虑到HBV基因组序列的准种特点以及多聚酶链反应(PCR)技术的精确度,我们采用的技术是长距离且精确PCR(LA-PCR)技术,根据中国HBV患者的病毒基因序列设计PCR扩增用引物,自慢性HBV感染患者外周血血清中扩增HBV基因组序列,克隆入pGEM Teasy质粒,挑选克隆进行全基因组DNA测序,与其他HBV基因组序列进行比较。

结果: 测序结果5株HBV全基因组核苷酸序列存在一新的ORF,定义为前-前-S区,并发现该区之前存在一TA富集区,提示存在新型启动子的可能性。新界定的前-前-S区ORF编码氨基酸序列为MQLIITSKLGIIYILCGRLVFYIREKLHAVPHFVGHHILGNKSYS,与前-S1、前-S2和表面抗原主蛋白编码基因框架一致表达。

结论: 在HBV基因组中存在有一新的ORF,命名为前-前-S区。

董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前 - 前 - S区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1091-1096

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1091.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)基因组全长3200个核苷酸(nt)左右,为部分双链DNA病毒。1979年Gelibert et al发表了HBV基因组的第一个全长核苷酸序列^[1,2],长度为3182 nt,血清型为ayw亚型,并在HBV基因组中界定了4个开放读码框架(ORF),分别命名为S、C、P、X区。之后各种血清型的HBV基因组均被测序成功^[3-6],并储存于GenBank中,我国学者^[7,8]在1984年将中国大陆流行的adr亚型克隆测序成功。4个ORF中表达的氨基酸长度不同,其生物学功能也不相同^[9],其中全S区又因不同的起始密码子(ATG)而又人为的分为前-S1、前-S2和S三个区,前-S1、前-S2和表面抗原主蛋白是按照同

一开放读码顺序(in frame)进行翻译的. 我们应用长距离并且精确 PCR 技术(long and accurate PCR, LA-PCR)研究了乙型肝炎患者血清中存在的 HBV 病毒子基因组, 寻找新的 ORF 存在的证据, 并在既往已克隆的 HBV 基因组中得到了证实.

1 材料和方法

1.1 材料 应用的 LA-PCR 试剂成套试剂均购自日本 Takara 公司, pGEM Teasy 载体、玻璃奶试剂、和琼脂糖凝胶为 Promega 公司产品, 细菌 JM109 为本室保存, 蛋白酶 K 为 Merck 公司产品, 酚、氯仿、氨苄青霉素、X-gal 等均为国产试剂.

1.2 方法

1.2.1 血清来源和 DNA 分离 血清来源: 临床诊断为病毒性肝炎, 乙型患者慢性 2 例, 男女各 1 例, 编号分别为 G683 和 G376, 诊断均符合 2000 年西安会议《病毒性肝炎防治方案》(试行)标准^[10]. 临床检测表面抗原(HBsAg)、e 抗原(HBeAg)、核心蛋白抗体(抗-HBc)阳性. 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.

1.2.2 多聚酶链反应(PCR)扩增目的片段 参考文献[11, 12]中改进的全长 HBV 基因组扩增方法, 设计引物为 P1: 5' - CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA-3', P2: 5' - CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG G-3'. LA-PCR 参数如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延长 5 min, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延长 10 min.

1.2.3 克隆目的片段 将 PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 切取长度为 3.2 kb 目的片段, 玻璃奶法回收 PCR 产物, 与 pGEM Teasy 载体连接. 将重组质粒转入细菌 JM109, 氨苄青霉素和 X-gal 蓝白斑法筛选阳性菌落, 提取质粒进行限制性内切酶酶切分析鉴定.

1.2.4 DNA 测序 选择经鉴定 pGEM Teasy 内插入 3.2 kb 产物的菌落送检测序, 由上海博亚公司完成. 测序引物为 pGEM Teasy 载体自有的 T7、SP6 测序引物, 同时根据测序结果设计测序引物进行序列测定, 测序引物包括: P1: 5' - AGA TAG GGG CAT TTT GTG GT-3'; P2: 5' - ACG GGA CGT AGA CAA AGG AC-3'; P3: 5' - GGT TTC ACA TTT CCT GTC TT-3'; P4: 5' - CAT ATC CCA TGA AGT TAA GG-3'; P5: 5' - AAC TAC ACG CAG TGC CTC AT-3'. 测序结果存入美国国立卫生院 GenBank 中.

1.2.5 序列分析 应用 DNA SIS 对获得的 5 个克隆进行了 ORF 判读, 并将推断的 ORF 翻译为氨基酸序列, 应用 Vector 6.0 版软件对推定的 ORF 核苷酸序列与氨基酸序列与已经存储在 GenBank 中不同血清型的 HBV 核苷酸

与氨基酸序列进行比较, 血清型包括: adr^[5,8]、ayr^[4]、adw2^[3]、adw4 和 ayw^[1].

2 结果

2.1 HBV 基因组核苷酸序列的测定 以 2 例乙型肝炎患者血清中抽提的 HBV 基因组为模板, 应用 TA 克隆方法, 将患者体内存在的 HBV 基因组克隆到测序载体中. 经验证后, 选择 5 个克隆测序, 分别命名为 G683-A1、G683-A2、G683-A3、G376-A6 和 G376-A7, 获得的 HBV 基因组核苷酸长度分别为 3 215、3 182、3 213、3 215 和 3 125 nt. 测序结果存入美国国立卫生院的 GenBank 中, 序列号为 AF363961、AF363962、AF363963、AF384371 和 AF384372. G683 的 3 株克隆之间的同源性为 97.5%, G376 的 2 株克隆之间的同源性为 96.6%, 5 株之间的同源性为 93.6%.

2.2 核苷酸序列的比较 通过序列分析, 界定了 4 个主要 ORF 的长度, 其中按照 Gelibert 最初定义的 S 区分析 5 株克隆的全 S 区 ORF, 包括前-S1、前-S2 和主蛋白序列. 之后应用 DNA SIS 软件对上述 5 个克隆的 ORF 再分析过程中, 发现在前-S1 区的上游有一未定义的 ORF, 该区长 135 bp, 与前-S1、前-S2 和 S 基因按照同一开放读码顺序(in frame)进行翻译, 我们命名为前-前-S 区. 为了排除选择样本的误差, 在 GenBank 中选择不同血清型的全基因序列进行比较. 选择的 GenBank 序列号为: D12980 (adr^[5]): 3 215 bp; G329616 (adr^[8]): 3 221 bp; X04615 (ayr^[4]): 3 215 bp; X02763 (adw2^[3]): 3 221 bp; Z35717 (adw4): 3 221 bp 和 G329640 (ayw^[1]): 3 182 bp. 结果发现克隆株 G329616、D12980、X04615 存在前-前-S 区 ORF. 前-前-S 基因的起始密码子为 ATG, 而克隆 G329640 为 ATC, 克隆 X02763、Z35717 为 AGG, 由于点替换突变导致表达终止.

对前-前-S 区上游核苷酸序列分析, 发现存在一段 TA 富集区(TA-rich region), 在前-前-S 区起始密码子 ATG 上游有 3 段 TA 富基序列, 无 TATA-box 结构, 为 TATA 样盒(TATA-like box), 分别为: ATG 上游 -8 ~ -13: TATTAT; -17 ~ -22: ATTTAA; -39 ~ -46: AAATATTT.

2.3 氨基酸序列的比较 新的 ORF 长度为 135 bp, 编码 45 个氨基酸残基(aa), 氨基酸残基序列为: MQLIIT SKLGIIYILCGRLV(A)FYIREKLHAVPHFV(A)GHHILGN KSYS, G683 的 3 个克隆在第 20 和第 30 位均编码缬氨酸(V), 而 G376 的 2 株克隆编码为丙氨酸(A). 甘人宝 et al^[8]、Mukaide et al^[5]、Okamoto et al^[4]发表的克隆株的前-前-S 区第 20 和第 30 位均编码 A. 以 G683 的 3 个克隆编码的前-前-S 多肽分析, 该多肽 M_r 5200 左右, 有 19 个疏水 aa, 10 个极性 aa, 5 个强碱性 aa, 1 个半胱氨酸(C); 而 G376 的 2 个克隆编码的前-前-S 多肽有 21 个疏水氨基酸残基. 本研究 5 个克隆的前-前-S- 大蛋白与其他克隆的比较见图 1.

						Section 1
	(1)	1	10	20	30	49
G683-A1	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLVFYIREKLHAVPHFVGHHILGNKSYSMSGW				
G683-A2	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLVFYIREKLHAVPHFVGHHILGNKSYS----				
G683-A3	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLVFYIREKLHAVPHFVGHHILGNKSYSMSGW				
G376-A6	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYSMSGW				
G376-A7	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYSMSGW				
Gan adr	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRRAFYIREKLRAAPHFVGHHILGNKSYSMSGW				
Japan1 adr	(1)	MQLIITSKLGIIYIRCGRLAFYIREKLHAALHFVGHHILGNKSYSMSGW				
adw2	(1)	-----MGGW				
Poland adw4	(1)	-----MGGW				
Japan ayr	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYSMSGW				
Gelibert ayw	(1)	-----				
Consensus	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRL FYIREKLHA PHFVGHHILGNKSYSMSGW				
						Section 2
	(50)	50	60	70	80	98
G683-A1	(50)	SSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP				
G683-A2	(48)	--KPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDH--				
G683-A3	(50)	SSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP				
G376-A6	(50)	SSKPRQGMGTNLSVPNPLG-----				
G376-A7	(50)	SSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP				
Gan adr	(50)	SSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP				
Japan1 adr	(50)	SSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP				
adw2	(5)	SSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP				
Poland adw4	(5)	SSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP				
Japan ayr	(50)	SSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP				
Gelibert ayw	(1)	-----MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWP				
Consensus	(50)	SSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP				
						Section 3
	(99)	99	110	120	130	147
G683-A1	(99)	EAHQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPVAPPPASTNRQSG				
G683-A2	(91)	---QVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWNPQAQGILTTVPVAPPPASTNRQSG				
G683-A3	(99)	EAHQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPVAPPPASTNRQSG				
G376-A6	(69)	--NQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPAAPPPASTNRQSG				
G376-A7	(99)	EANQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPAAPPPASTNRQSG				
Gan adr	(99)	EANQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPVAPPPASTNRQSG				
Japan1 adr	(99)	DGIKVGAGDFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPAAPPPASTNRQSG				
adw2	(54)	AANQVGAGAFGPRLTPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSG				
Poland adw4	(54)	AANQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTVSTIPPPAYTNRQSG				
Japan ayr	(99)	EANQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPAAPPPASTNRQSG				
Gelibert ayw	(43)	DANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWSPQAQGILQTL PANPPASTNRQSG				
Consensus	(99)	EANQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTVP APPPASTNRQSG				
						Section 4
	(148)	148	160	170	180	196
G683-A1	(148)	RQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPKVRGLYFPAGGSSSGTV				
G683-A2	(137)	RQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPKVRGLYFPAGGSSSGTV				
G683-A3	(148)	RQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPKVRGLYFPAGGSSSGTV				
G376-A6	(116)	RQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPKVRGLYFPAGGSSSGTV				
G376-A7	(148)	RQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPKVRGLYFPAGGSSSGTV				
Gan adr	(148)	RQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPKVRGLYFPAGGSSSGTV				
Japan1 adr	(148)	RQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPKVRGLYFPAGGSSSGTV				
adw2	(103)	RQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTAFHQTLQDPKVRGLYFPAGGSSSGTV				
Poland adw4	(103)	RQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTAFHQALQDPKVRGLYFPAGGSSSGTV				
Japan ayr	(148)	RQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPKVRGLYFPAGGSSSGTV				
Gelibert ayw	(92)	RQPTPISPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPKVRGLYFPAGGSSSGTV				
Consensus	(148)	RQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPKVRGLYFPAGGSSSGTV				
						Section 5
	(197)	197	210	220	230	245
G683-A1	(197)	NPVPTTASPISSIFSRGTDPAPNMENTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRIL				
G683-A2	(186)	NPVPTTASPISSIFSRGTDPAPNMENTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRIL				
G683-A3	(197)	NPVPTTASPISSIFSRGTDPAPNMENTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRIL				
G376-A6	(165)	NPVPTTASPISSIFSRGTDPAPNMENTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRIL				
G376-A7	(197)	NPVPTTASPISSIFSRGTDPAPNMENTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRIL				
Gan adr	(197)	NPVPTTASPISSIFSRGTDPAPNMENTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRIL				
Japan1 adr	(197)	NPVPTTASPISSIFSRGTDPAPNMENTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRIL				
adw2	(152)	NPAPNIASHISSISARTGDPVTNMENTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRIL				
Poland adw4	(152)	NPAPNIASHISSISARTGDPVTNMENTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRIL				
Japan ayr	(197)	NPVPTTASPISSIFSRGTDPAPNMENTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRIL				
Gelibert ayw	(141)	NPVLTITASPISSIFSRIGDPALNMENTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRIL				
Consensus	(197)	NPVPTTASPISSIFSRGTDPAPNMENTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRIL				
						Section 6
	(246)	246	260	270	280	294
G683-A1	(246)	TIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCFGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWM				
G683-A2	(235)	TIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCFGQNSQSPTSNNH-----				
G683-A3	(246)	TIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCFGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWM				
G376-A6	(214)	TIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCFGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWM				
G376-A7	(246)	TIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCFGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWM				
Gan adr	(246)	TIPQSLHSWWTSLNFLGAAPTCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWM				
Japan1 adr	(246)	TIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCFGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWM				
adw2	(201)	TIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWM				
Poland adw4	(201)	TIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWM				
Japan ayr	(246)	TIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCFGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWM				
Gelibert ayw	(190)	TIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWM				
Consensus	(246)	TIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCFGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWM				

Section 7									
	(295)	295	300	310	320	330	343		
G683-A1	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTTST	--	GPCK				
G683-A2	(269)	-----							
G683-A3	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTTST	--	GPCK				
G376-A6	(263)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTT	TTTGPCK					
G376-A7	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTT	TT--	GPCK				
Gan adr	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PRTSTTST	--	GPCK				
Japan1 adr	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTTST	--	GPCK				
adw2	(250)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLI	PGSTTTST	--	GPCK				
Poland adw4	(250)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLI	PGSTTTST	--	GPCK				
Japan ayr	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTTST	--	GPCR				
Gelibert ayw	(239)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLI	PGSTTST	--	GPCR				
Consensus	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTTST		GPCK				
Section 8									
	(344)	344	350	360	370	380	392		
G683-A1	(342)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWASARFLWELASVRFS							
G683-A2	(269)	-----							
G683-A3	(342)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWASARFLWELASVRFS							
G376-A6	(312)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
G376-A7	(342)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Gan adr	(342)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Japan1 adr	(342)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
adw2	(297)	TCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Poland adw4	(297)	TCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Japan ayr	(342)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Gelibert ayw	(286)	TCMTTAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Consensus	(344)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Section 9									
	(393)	393	400	410	420	430	441		
G683-A1	(391)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
G683-A2	(269)	-----							
G683-A3	(391)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
G376-A6	(361)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
G376-A7	(391)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
Gan adr	(391)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
Japan1 adr	(391)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
adw2	(346)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPFLPLPIFF							
Poland adw4	(346)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPFLPLPIFF							
Japan ayr	(391)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
Gelibert ayw	(335)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLPIFF							
Consensus	(393)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
Section 10									
	(442)	442	448						
G683-A1	(440)	CLWVYI-							
G683-A2	(269)	-----							
G683-A3	(416)	-----							
G376-A6	(410)	CLWVYI-							
G376-A7	(440)	CLWVYI-							
Gan adr	(440)	CLWVYI-							
Japan1 adr	(440)	CLWVYI-							
adw2	(395)	CLWVYI-							
Poland adw4	(395)	CLWVYI-							
Japan ayr	(440)	CLWVYI-							
Gelibert ayw	(384)	CLWVYI-							
Consensus	(442)	CLWVYI							

图1 前-前-S基因编码多肽序列比较结果。

在美国国立卫生院(NIH)的门户网站,应用BLAST软件,以G683-A1前-前-S区编码的推断氨基酸序列MQLIITSKLGIYILCGRLVFIYIREKLHAVPHFVGHHILGNKSYS进行搜索,发现存储的5个克隆有前-前-S区多肽序列,分别为BAA32849、S43492、CAA25747、BAA89327和CAB38230,氨基酸序列同源性分别为95%(43/45)、93%(42/45)、93%(42/45)、77%(35/45)和66%(30/45)。克隆BAA89327来自大猩猩^[13]。

3 讨论

1979年, Gelibert et al^[1,2]首次报告了HBV基因组的全序列,并定位了4个ORF。早期的研究学者大多采用将HBV基因组限制性内切酶消化后克隆入载体质粒中,之后进行测序的方法获得的全序列。我国学者^[7,8]于1984

年报道了大陆HBV株(adr)的序列。而后的学者多利用重叠引物PCR法扩增HBV基因,之后对PCR引物直接进行测序以揭示不同基因型、血清型之间的区别。目前在美国国立卫生院的GenBank中,存储了200多HBV全基因组序列,但之后的学者对4个ORF分区的界定并无异议。

1995年,在分子生物学发展的基础上, Gunther et al^[11,12]利用LA-PCR技术,之后以TA克隆法将患者体内的HBV基因组克隆到质粒载体中,该技术核心是应用DNA多聚酶具有3'-5'外切酶功能。该方案保证了扩增片段与原模板之间的高度一致性,又展示了模板多样性,比Gelibert et al的研究方法简便,易于操作。本研究展示了同一患者来源的HBV基因组不同克隆之间的变异程度, G683的3株克隆之间的同源性为

97.5 %, G376 的 2 株克隆之间的同源性为 96.6 %, 5 株之间的同源性为 93.6 %, 各个克隆之间均存有一定差异, 证明患者血清内的序列是不完全相同的, 符合准种表现. 本研究其他报道^[13-22]以及其他学者近期的研究结果^[23-26]证实了 1990 年代初病毒学家^[27,28]提出的 HBV 准种假说.

本研究在分析所获得的 5 个克隆的过程中, 在前 - S1 区之前发现还存在一个 ORF, 长度 135 bp, 编码 45 aa, 命名为前 - 前 - S 区. 选择的 GenBank 中 6 个其他克隆株进行比较, 其中 3 个克隆具有前 - 前 - S 区 ORF, 另 3 个克隆由于在前 - 前 - S 起始密码子的部位发生点替换突变而导致表达不能. 应用 DNA SIS 软件的蛋白质分析功能分析了前 - 前 - S、前 - S1、前 - S2 和 S 基因的完全表达产物, 前 - 前 - S 区较以往认为的大蛋白多出一个小的疏水区. 如果前 - 前 - S 区被证明是真实存在的, 那么全 S 蛋白(含前 - 前 - S 区)与大蛋白有不小的差异. 其中的 19(21)个疏水氨基酸在前 - 前 - S 区形成了一个小的疏水功能域, 可能与蛋白的空间折叠或表面蛋白合成后分泌有关. 前 - 前 - S 多肽推断氨基酸序列中含有 6 个亮氨酸(L), 分别位于第 3、9、15、19、27、39 位, 前 3 个 L 是否可形成亮氨酸拉链结构, 尚需要进一步证实.

我们应用了 2 种方法来证实前 - 前 - S 区的真实存在. 方法一是在 GenBank 中选择不同血清型的 HBV 基因组全序列, 应用 DNA SIS 软件重新确定其 ORF, 结果发现甘人宝 et al^[8]、Mukaide et al^[5]、Okamoto et al^[4]克隆的 HBV 基因组序列中均存在前 - 前 - S 区 ORF. 方法二是利用 NIH 网站的 BLAST 软件, 将前 - 前 - S 区编码氨基酸序列输入后进行同源性搜索, 结果发现已经存入 GenBank 中的序列中, 有 5 个克隆中含有的氨基酸序列与本研究获得的序列有较高的同源性, 分别为: BAA32849^[29](1998 年)、S43492^[30](1990 年)、CAA25747^[31](1983 年)、BAA89327^[13](2000 年)和 CAB38230(资料未发表, 1998 年), 氨基酸序列同源性分别为 95 %、93 %、93 %、77 % 和 66 %. 综合上述 2 种方法证实的结果以及我们的资料, 可以肯定前 - 前 - S 区是实际存在的, 来源于不同的地域的 HBV 克隆株均有前 - 前 - S 区的明确编码. 前 - 前 - S 区 ORF 最早在 1983 年 Fujiyama et al^[31]克隆的 adr 亚型的 S 基因产物中被提及, 作者认为存在一身份不明的 ORF(unidentified reading frame (s gene)); 而 Mimms et al^[32]将克隆 S43492 进行再分析后, 认为该段多肽是前 - S1 多肽内部, 他们认为的前 - S1 长度为 164 aa, 而不是通常认为的 119 aa 或 108 aa. 我们认为多种资料的研究结果证明前 - 前 - S 区的存在, 以往的研究认为该区的编码并不是一种普遍现象, 因而未加以重视. Bruss et al^[33,34]界定了 HBV 表面抗原大蛋白的基因结构之后, 其他学者多认同这一观点, Gerlich et al^[35]或其他教科书均未提及前 - 前 - S 区的存在. 我们分析的结果提示具有前 - 前 - S 区的 HBV 克隆株多来自日本和中国, 欧美学者在最初的研究中获得的样本存在一定的

偏差, 这可能是忽视该区域的原因之一. 另外, 由于目前仍缺乏对 HBV 的大规模分子流行病学资料, 因而早期发现前 - 前 - S 区的学者可能认为一些位点发生变异, 而不认为这是一种主流现象, 但我们自抽取其他学者获得的克隆中发现前 - 前 - S 区, 应当认为前 - 前 - S 区的存在不是一种个别现象, 至少在中国和日本是非常常见的. 由于 HBV 表面抗原不仅是病毒遗传结构的包装蛋白, 而且截短型表面抗原中蛋白^[36,37]和大蛋白^[38]具有反式激活作用, 这种功能与是表面抗原的多种形式激活癌基因有关^[39], 我们的早期研究已经证明了 HBV 截短型表面抗原中蛋白和 X 蛋白^[40-42]具有强大的反式激活作用, 进一步将研究前 - 前 - S- 大蛋白完全表达产物是否具有反式激活作用.

来源于 G683 的三个克隆在前 - 前 - S 多肽的第 20 和第 30 位均编码 V, 而 G376 的 2 株克隆和甘人宝 et al^[8]、Mukaide et al^[5]、Okamoto et al^[4]发表的克隆株在这 2 个位点编码为疏水氨基酸 A, 这印证了我们^[43-45]以前的关于 HBV 在不同患者体内存在个体化变异的报告.

作为完整的基因, ORF 之前应当存在启动子区域, 经过比较发现在前 - 前 - S 区上游存在一段 TA 富集区. 在前 - 前 - S 区起始密码子 ATG 上游有 3 段 TA 富集序列, 无真核基因所特有的 TATA-box 结构, 仅有 TATA 样盒, 分别位于: TA1: TATTAT, ATG 上游 -8 ~ -13 bp; TA2: ATTAAA, 上游 -17 ~ -22 bp; TA3: AAATATTT, 上游 -39 ~ -46 bp. 如继续上溯, 在距前 - 前 - S 区 ATG 上游 -79 ~ -90 bp 处有一长的 TA 区, 为 ATTAAAATTAATTAT. 这段上游序列中是否具有启动子功能, 尚需要验证. 在前 - 前 - S 区内, 存在前 - S 区启动子 1(SP I)^[46], 具有典型的 TATA 结构; 在前 - S1 区内, 存在 SP II^[47]. SP I 和 SP II 分别调控既往定义的大蛋白和中/主蛋白的表达^[48-50]. 我们的初步分析认为前 - 前 - S 区之前可能存在一启动子区, 如经实验证实其启动子作用, 其功能为调控前 - 前 - S 区与大蛋白的融合表达. 我们已确立了检测启动子活性的方法^[51,52], 进一步的工作将验证 SP III 的存在.

总之, 在 HBV 前 - S1 ORF 之前存在有一融合编码的 ORF, 我们将其命名为前 - 前 - S 区. 前 - 前 - S 区之前可能有一新的启动子区域(SP III). 如前 - 前 - S 多肽的表达得到进一步证实, 将对 HBV 感染的检测、疫苗设计、HBV 进入肝细胞机制(受体学说)、表面抗原的表达过程及功能、宿主抗感染机制、HCC 产生机制研究均产生重大影响.

4 参考文献

- 1 Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 1979;281:646-650
- 2 Charnay P, Mandart E, Hampe A, Fitoussi F, Tiollais P, Galibert F. Localization on the viral genome and nucleotide sequence of the gene coding for the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Nucleic Acids Res* 1979; 7:335-346
- 3 Valenzuela P, Quiroga M, Zalvidar J, Gray P, Rutter WJ. The

- nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes. In: Fields BN Eds ANIMAL VIRUS GENETICS. New York, Academic Press, 1980:57-70
- 4 Okamoto H, Imai M, Shimozaki M, Hoshi Y, Iizuka H, Gotanda T, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Nucleotide sequence of a cloned hepatitis B virus genome, subtype ayr: comparison with genomes of the other three subtypes. *J Gen Virol* 1986;67:2305-2314
- 5 Mukaide M, Kumazawa T, Hoshi A, Kawaguchi R, Hikiji K. The complete nucleotide sequence of hepatitis B virus, subtype adr (SRADR) and phylogenetic analysis. *Nucleic Acids Res* 1992;20:6105
- 6 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 李莉. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002; 27:116-118
- 7 吴祥甫, 周翎钟, 冯宗铭, 李载平, 夏绍源. 人乙型肝炎病毒 -HBV adr 亚型基因组的克隆和限制酶切图谱. 中国科学 B 辑 1983;2: 162-167
- 8 甘人宝, 储美谨, 沈绿萍, 钱苏雯, 李载平. 克隆的 adr 亚型乙型肝炎病毒(pADR-1)的核苷酸顺序. 中国科学 B 辑 1986;5:55-65
- 9 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京:人民军医出版社, 1997:179-182
- 10 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001;19:56-62
- 11 Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 1995; 69:5437-5444
- 12 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
- 13 Takahashi K, Brotman B, Usuda S, Mishiro S, Prince AM. Full-genome sequence analyses of hepatitis B virus (HBV) strains recovered from chimpanzees infected in the wild: implications for an origin of HBV. *Virology* 2000;267:58-64
- 14 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒 DNA 序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 15 Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 16 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123.
- 17 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 18 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区异质性检测初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 19 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. HBsAg 抗 -HBs 同时阳性者体内 S 基因序列分析. 中国公共卫生 2002;18: 535-537
- 20 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 21 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325.
- 22 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:1-4
- 23 Cane PA, Mutimer D, Ratcliffe D, Cook P, Beards G, Elias E, Pillay D. Analysis of hepatitis B virus quasispecies changes during emergence and reversion of lamivudine resistance in liver transplantation. *Antivir Ther* 1999;4:7-14
- 24 Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, Van Reybroeck G, Zoulim F, Leroux-Roels G, Rossau R. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000;38:702-707
- 25 Ngui SL, Teo CG. Hepatitis B virus genomic heterogeneity: variation between quasispecies may confound molecular epidemiological analyses of transmission incidents. *J Viral Hepat* 1997;4:309-315
- 26 Kojima N, Horiike N, Michitaka K, Onji M. In situ detection of mutated hepatitis B virus in microdissected, formalin-fixed liver tissues from patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1999;30:359-65
- 27 Blum HE. Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants. *Intervirology* 1993;35:40-50
- 28 Carman W, Thomas H, Domingo E. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet* 1993;341:349-353
- 29 Takahashi K, Akahane Y, Hino K, Ohta Y, Mishiro S. Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virol* 1998;143:2313-2326
- 30 Loncarevic IF, Zentgraf H, Schroder CH. Sequence of a replication competent hepatitis B virus genome with a preX open reading frame. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4940
- 31 Fujiyama A, Miyanoara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N, Matsubara K. Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. *Nucleic Acids Res* 1983;11:4601-4610
- 32 Mimms LT, Solomon LR, Ebert JW, Fields H. Unique preS sequence in a gibbon-derived hepatitis B virus variant. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195:186-191
- 33 Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1059-1063
- 34 Bruss V, Thomssen R. Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation. *J Virol* 1994; 68:1643-1650
- 35 Gerlich KM. Structure and Molecular Virology. In: Zuckerman AJ, Thomas HC, eds. Viral Hepatitis. 2nd ed. Churchill Livingstone, Harcourt Publishers Limited, 1998:77-106
- 36 Lauer U, Weiss L, Hofschneider PH, Kekule AS. The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene. *J Virol* 1992;66:5284-5289
- 37 Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- 38 Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* 1996;225:235-239
- 39 成军. 肿瘤相关基因. 第1版. 北京:北京医科大学出版社, 2000:96-100
- 40 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
- 41 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙型肝炎病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 42 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002; 27:125-127
- 43 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列个体化特征的研究. 解放军医学杂志 2002; 27:119-121
- 44 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原基因多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:130-135
- 45 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-211
- 46 Zhou DX, Yen TS. Differential regulation of the hepatitis B viral surface gene promoters by a second viral enhancer. *J Biol Chem* 1990;265:20731-20734
- 47 Zhou DX, Yen TS. The hepatitis B virus S promoter comprise A CCAAT motif and two initiation region. *J Biol Chem* 1991; 266:23416-23421
- 48 Lu CC, Chen M, Ou JH, Yen TS. Key role of a CCAAT element in regulating hepatitis B virus surface protein expression. *Virology* 1995;206:1155-1158
- 49 Lu CC, Yen TS. Activation of the hepatitis B virus S promoter by transcription factor NF-Y via a CCAAT element. *Virology* 1996;225:387-394
- 50 Xu Z, Jensen G, Yen TS. Activation of the hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 1997;71:7387-7392
- 51 刘妍, 成军, 董菁, 王琳, 王刚, 夏小兵. HBV X 蛋白与 HCV 核心蛋白协同反式激活 SV40 病毒早期启动子 / 增强子的研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:39-41
- 52 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219



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
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

