

时间明显延长. 另外, 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞的培养比例仍需要进一步摸索. 在实验中, 我们对三种细胞培养比例进行了大量摸索实验(实验结果待发表), 结果发现肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞以 4 000 : 200 : 1 配比培养较为合适. 我们认为肝细胞生长虽然需要良好的框架, 但是在整体的培养体系中, 储脂细胞需要适当的数量才有利于肝细胞的生长, 过多的储脂细胞将会限制肝细胞的生长.

#### 4 参考文献

- 1 Kaufmann PM, Fiegel HC, Kneser U, Pollok JM, Kluth D, Rogiers X. Influence of pancreatic islets on growth and differentiation of hepatocytes in co-culture. *Tissue Eng* 1999;5: 583-596
- 2 Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Herbst H, Rogiers X. Heterotopic hepatocyte transplantation utilizing pancreatic islet cotransplantation for hepatotrophic stimulation: morphologic and morphometric evaluation. *Pediatr Surg Int* 1999;15:168-174
- 3 Murakami S, Ijima H, Ono T, Kawakami K. Development of co-culture system of hepatocytes with bone marrow cells for expression and maintenance of hepatic functions. *Int J Artif Organs* 2004;27:118-126
- 4 Agius L. Metabolic interactions of parenchymal hepatocytes and dividing epithelial cells in co-culture. *Biochem J* 1998; 252:23-28
- 5 Miura K, Nagai H, Ueno Y, Goto T, Mikami K, Nakane K, Yoneyama K, Watanabe D, Terada K, Sugiyama T, Imai K, Senoo H, Watanabe S. Epimorphin is involved in differentiation of rat hepatic stem-like cells through cell-cell contact. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:415-423
- 6 Arnaud A, Fontana L, Saez-Lara MJ, Gil A, Lopez-Pedrosa JM. Exogenous nucleosides modulate the expression of rat liver extracellular matrix genes in single cultures of primary hepatocytes and a liver stellate cell line and in their co-culture. *Clin Nutr* 2004;23:43-51
- 7 Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 1999;13:1883-1900
- 8 Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Probing heterotypic cell interactions: hepatocyte function in microfabricated co-cultures. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9:1137-1160
- 9 Griffith LG, Wu B, Cima MJ, Powers MJ, Chagnaud B, Vacanti JP. *In vitro* organogenesis of liver tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1997;831:382-397
- 10 Kudryavtseva EI, Engelhardt NV. Requirement of 3D extracellular network for maintenance of mature hepatocyte morphology and suppression of alpha-fetoprotein synthesis in vitro. *Immunol Lett* 2003;90:25-31
- 11 De Bartolo L, Bader A. Review of a flat membrane bioreactor as a bioartificial liver. *Ann Transplant* 2001;6:40-46
- 12 Bhandari RN, Riccalton LA, Lewis AL, Fry JR, Hammond AH, Tendler SJ, Shakesheff KM. Liver tissue engineering: a role for co-culture systems in modifying hepatocyte function and viability. *Tissue Eng* 2001;7:345-357
- 13 Rojkind M, Novikoff PM, Greenwel P, Rubin J, Rojas-Valencia L, de Carvalho AC, Stockert R, Spray D, Hertzberg EL, Wolkoff AW. Characterization and functional studies on rat liver fat-storing cell line and freshly isolated hepatocyte coculture system. *Am J Pathol* 1995;146:1508-520
- 14 Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE. Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology* 1992;15:5-11
- 15 Uyama N, Shimahara Y, Kawada N, Seki S, Okuyama H, Imuro Y, Yamaoka Y. Regulation of cultured rat hepatocyte proliferation by stellate cells. *J Hepatol* 2002;36:590-599

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 乙型肝炎病毒前 - 前 -S 蛋白结合蛋白新基因 PPSBP9 的克隆化

蔺淑梅, 成 军, 张树林, 刘 敏, 王 琳, 黄燕萍, 杨 媛, 白桂琴

蔺淑梅, 张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061  
成军, 刘敏, 王琳, 黄燕萍, 杨媛, 白桂琴, 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  
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: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒前 - 前 -S 蛋白结合蛋白新基因 PPSBP9 的克隆化.

方法: 构建前 - 前 -S 的酵母细胞表达载体, 采用酵母双杂

交系统筛选人肝细胞cDNA文库, 利用核苷酸数据库及生物信息学技术, 对于筛选结果进行分析. 发现其中有 1 个未知功能的新基因. 根据GenBank中的序列信息设计引物, 以HepG2细胞系cDNA文库为模板, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长编码序列, 并经测序证实, 命名该新基因为PPSBP9并在GenBank中注册, 注册号为AY553877.

结果: PPSBP9基因的编码序列全长为840个核苷酸(nt), 编码产物由279个氨基酸残基(aa)组成. 经核苷酸序列数据库(GenBank)和蛋白质一级结构序列数据库(SwissProt)同源序列的搜寻, 与已知基因序列和蛋白序列之间没有显著同源性.

结论: 筛选并成功的克隆了乙型肝炎病毒前 - 前 -S蛋白与肝细胞cDNA文库中结合蛋白新基因PPSBP9, 为进一步

研究HBV前-前-S及其肝细胞结合蛋白新基因在HBV致病中的作用奠定了基础。

蔺淑梅, 成军, 张树林, 刘敏, 王琳, 黄燕萍, 杨媛, 白桂琴. 乙型肝炎病毒前-S蛋白结合蛋白新基因PPSBP9的克隆化. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2733-2736

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2733.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染常见, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关<sup>[1-6]</sup>. HBV是很小的包膜病毒, HBV基因组全长在3200个核苷酸(nt)左右, 为部分双链DNA病毒. HBV至少含有4个开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区, 4个ORF中表达的氨基酸长度不同, 其生物学功能也不相同, 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. 最近董菁 *et al* 对于中国HBV流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 发现在前-S1区之前还存在一个ORF, 长度135 bp, 编码45 aa, 将其命名为前-前-S区. 并在既往已克隆的HBV基因组中得到了证实<sup>[7]</sup>. 杨倩 *et al* 对前-前-S基因启动子序列的鉴定和转录活性的研究证实, 前-前-S-基因ORF上游的序列具有启动子活性, 进一步证实了董菁 *et al* 发现的前-前-S编码基因存在<sup>[8]</sup>. 基因是通过蛋白质之间的相互作用而实现其功能的, 病毒蛋白和肝细胞蛋白之间的作用是病毒致病的关键. 为进一步研究前-前-S-基因在HBV致病中的作用, 我们利用酵母双杂交技术对肝细胞cDNA文库中与乙型肝炎病毒前-S相互作用的蛋白进行研究, 获得了一种能与HBV前-前-S蛋白结合的未知功能蛋白, 将编码该蛋白的基因命名为PPSBP9, 对其进行克隆化研究, 为今后进一步深入地研究新基因的生物学功能鉴定基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 pGBKT7-BD克隆载体, *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、人cDNA肝细胞文库等均购自Clontech公司. 酵母YPDA培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基, X- $\alpha$ -半乳糖苷酶(Gal)等购自Clontech公司, 半硫酸腺苷、醋酸锂购自Sigma公司. 复杂高效感受态(FSB), 本室自制. 大肠杆菌(DH5 $\alpha$ ), 本室保存. Taq酶、T4 DNA连接酶、*EcoRI*、*BamHI*等限制性内切酶、pGEM-T载体及RT-PCR试剂盒购自Promega公司. 玻璃奶回收试剂盒购自博大公司. 新基因PPSBP9的扩增引物合成及DNA序列测定由上海生工生物工程技术有限公司承担.

1.2 诱饵质粒载体的构建及酵母配合实验 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBV前-前-S蛋7中构建诱饵质粒, 酶切鉴定后, 用醋酸锂法转入酵母细胞AH109, 并在四缺培养基上培白编码基因, 连接入酵母表达载体pGBKT-养以排除其自身激活作用<sup>[9]</sup>. 挑取3 mm大小在SD/-Trp培养基上生长的转化了pGBKT7-前-前-S质粒的酵母AH109单菌落接种于SD/-Trp培养基中, 30℃ 250 r/min 振荡过夜, 次日离心后用2 × YPDA 培养液5 mL 重悬细胞, 计数浓度大于 $1 \times 10^9$  细胞/mL, 与肝细胞文库酵母细胞在50 mL 2 × YPDA 中30℃轻摇配合约22 h, 离心后用0.25 × YPDA 8 mL 重悬细胞, 分别铺板于150 mm的SD/-Trp/-Leu/-His(3缺), SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade (4缺)培养基板各25块上, 同时将配合产物按1:100、1:1 000、1:10 000 铺于SD/-Trp、SD/-Leu及SD/-Trp/-Leu培养基上检验配合效率. 生长10-14 d后挑取直径大于3 mm的菌落再次画线于铺有X- $\alpha$ -gal的4缺培养基上检查 $\alpha$ -半乳糖苷酶活性, 认为在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落.

1.3 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的操作指南Lyticase法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的SOB平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 阳性克隆DNA测序后, 提交GenBank 比对, 进行生物信息学分析.

1.4 多聚酶链反应(PCR)扩增PPSBP9新基因 根据GenBank的序列信息设计上下游引物. 上游引物: 5' -GAA TTC ATG CCA TAT ATT CCT CTC A-3', 下游引物: 5' -GGA TCC CTA ATA CAA ATG TAT GTG G-3'. 提取HepG2细胞的总RNA, 进行反转录, 以反转录产物为模板进行PCR, PCR参数如下: 94℃ 5 min 预变性, 94℃ 1 min 变性, 58℃ 1 min 退火, 72℃ 1 min 延伸, 共35个循环, 72℃再延伸10 min.

1.5 克隆目的片段 将PCR产物在12 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 切取目的片段, 玻璃奶法回收PCR产物, 与pGEM-T载体连接, 转化DH5 $\alpha$ 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37℃培养15 h. 挑取阳性菌落, 增菌. 提取质粒进行限制性酶切分析鉴定, 选择经鉴定的菌落送测序.

## 2 结果

2.1 pGBKT7-p-p-S诱饵与肝细胞文库酵母菌株配合结果 我们共挑选54个阳性克隆测序, 测序结果与GenBank 数据库进行初步比较, 其中8个克隆为未知功能蛋白基因. 其余46个均与已知基因序列高度同源.

2.2 新基因的序列分析及全长基因的获得 对所筛选到的未知功能蛋白基因其中之一利用美国国立卫生院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物工程中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其同源基因序列的搜索(BLASTN), 发现该克隆序列与GenBank 中注册的

已知功能基因序列没有同源. 电子拼接推定该基因的开放读码框架, 设计引物, 从HepG2细胞提取总RNA后, 进行RT-PCR, PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见1条清晰、单一、大小约840 bp的特异性扩增条带(图1), 其大小与预计的相吻合. PCR产物与T-载体连接, 转化大肠杆菌, 提取质粒进行酶切鉴定后送测序. 测序结果完全符合拼接序列, 表明我们已成功克隆出新基因的完整序列, 命名为PPSBP9, 其编码序列全长为840个核苷酸, 编码产物由279个氨基酸残基组成(图2). GenBank注册号为AY553877.

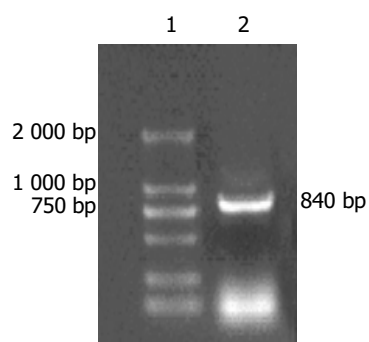


图1 PPSBP9基因的RT-PCR产物凝胶电泳图. 1: DNA marker; 2: PCR product.

ATG CCA TAT ATT CCT CTC ATG GAG TTC AGT  
M P Y I P L M E F S  
TGT TCA CAT TCT CAC TTA GTA TGC TTA CCC  
C S H S H L V C L P  
GCA GAG TGG AGG ACT AGC TGT ATG CCC AGT  
A E W R T S C M P S  
TCC AAA ATG AAG GAG ATG AGC TCG TTA TTT  
S K M K E M S S L F  
CCA GAA GAC TGG TAC CAA TTT GTT CTA AGG  
P E D W Y Q F V L R  
CAG TTG GAA TGT TAT CAT TCA GAA GAG AAG  
Q L E C Y H S E E K  
GCC TCA AAT GTA CTG GAA GAA ATT GCC AAG  
A S N V L E E I A K  
GAC AAA GTT TTA AAA GAC TTT TAT GTT CAT  
D K V L K D F Y V H  
ACA GTA ATG ACT TGT TAT TTT AGT TTA TTT  
T V M T C Y F S L F  
GGA ATA GAC AAT ATG GCT CCT AGT CCT GGT  
G I D N M A P S P G  
CAT ATA TTG AGA GTT TAC GGT GGT GTT TTG  
H I L R V Y G G V L  
CCT TGG TCT GTT GCT TTG GAC TGG CTC ACA  
P W S V A L D W L T  
GAA AAG CCA GAA CTG TTT CAA CTA GCA CTG  
E K P E L F Q L A L  
AAA GCA TTC AGG TAT ACT CTG AAA CTA ATG  
K A F R Y T L K L M

ATT GAT AAA GCA AGT TTA GGT CCA ATA GAA  
I D K A S L G P I E  
GAC TTT AGA GAA CTG ATT AAG TAC CTT GAA  
D F R E L I K Y L E  
GAA TAT GAA CGT GAC TGG TAC ATT GGT TTG  
E Y E R D W Y I G L  
GTA TCT GAT GAA AAG TGG AAG GAA GCA ATT  
V S D E K W K E A I  
TTA CAA GAA AAG CCA TAC TTG TTT TCT CTG  
L Q E K P Y L F S L  
GGG TAT GAT TCT AAT ATG GGA ATT TAC ACT  
G Y D S N M G I Y T  
GGG AGA GTG CTT AGC CTT CAA GAA TTA TTG  
G R V L S L Q E L L  
ATC CAA GTG GGA AAG TTA AAT CCT GAA GCT  
I Q V G K L N P E A  
GTT AGA GGT CAG TGG GCC AAT CTT TCA TGG  
V R G Q W A N L S W  
GAA TTA CTT TAT GCC ACA AAC GAT GAT GAA  
E L L Y A T N D D E  
GAA CGT TAT AGT ATA CAA GCT CAT CCA CTA  
E R Y S I Q A H P L  
CTT TTA AGA AAT CTT ACG GTA CAA GCA GCA  
L L R N L T V Q A A  
GAA CCT CCC CTG GGA TAT CCG ATT TAT TCT  
E P P L G Y P I Y S  
TCA AAA CCT CTC CAC ATA CAT TTG TAT TAG  
S K P L H I H L Y \*

图2 PPSBP9基因的核苷酸序列及编码产物一级结构序列.

### 3 讨论

酵母双杂交系统是近年来新发展起来的一种分析真核细胞中蛋白-蛋白相互作用的一种有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下相互作用提供了一种新的遗传学方法. 我们利用此技术, 已成功筛选到一系列与乙肝病毒蛋白及丙肝病毒蛋白相结合的蛋白基因, 其中, 也包括了一些未知功能蛋白的基因<sup>[9-11]</sup>.

1979年Galibert *et al*<sup>[12-13]</sup>首次报告了HBV基因组的全序列, 并确定4个主要的开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区, 一直沿用至今. HBV基因组只有3.2 kb, 其结构特点是结构基因与功能基因序列之间重叠, 甚至结构基因序列之间重叠<sup>[14]</sup>. 关于这一紧密DNA结构中是否存在新的编码序列, 一直没有进行系统的研究. 最近董菁 *et al*<sup>[7-8, 15-19]</sup>对于中国HBV流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 发现了前-S和前-X基因序列, 改写了HBV DNA编码基因序列研究的历史.

HBV表面抗原即外膜蛋白不仅是病毒遗传结构的包装蛋白, 病毒感染所必需, 也是引起宿主保护性应

答的免疫原表位,而且截短型表面抗原中蛋白和大蛋白具有反式激活作用<sup>[7]</sup>,这种功能是与表面抗原的多种形式激活癌基因有关<sup>[20]</sup>。董菁*et al*进一步应用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,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。进一步研究前-前-S所编码蛋白的功能及与之相互作用的蛋白具有重要意义。

我们应用酵母双杂交技术成功的筛选出肝细胞文库中与前-前-S蛋白相互作用的蛋白基因54种,其中包括HBV前-前-S蛋白结合蛋白9这一未知功能的新基因。根据GenBank的信息,电子拼接推定该基因的开放读码框架获得相应的全长编码基因,我们设计了新基因的上下游引物,并成功地从HepG2细胞的mRNA中逆转录出该基因的完整序列。PCR反应产物经T-A克隆测序完全符合计算机分析结果,表明我们已顺利得到了该新基因的编码序列,其编码序列全长为840个核苷酸,编码279个氨基酸残基。值得我们关注的是,在对这一未知功能新基因进行进一步生物信息学分析时发现,我们这一研究小组在用酵母双杂交技术筛选HCV F蛋白与肝细胞文库相互作用的蛋白时也筛选到这一相同的未知功能的新基因,故我们将其命名为PPSBP9/HCVFbp2。表明这一未知功能基因能与多种病毒蛋白结合,提示这一未知功能基因可能在HBV, HCV感染的致病过程中发挥重要作用。新基因的发现及克隆化成功为今后进一步深入地研究新基因的生物学功能奠定了基础。

#### 4 参考文献

- 1 成军. 肿瘤相关基因. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000:1
- 2 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列准种个体化特征的研究. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 3 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 4 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 5 Walton CM, Wu CH, Wu GY. A ribonuclease H-oligo DNA conjugate that specifically cleaves hepatitis B viral messenger RNA. *Bioconjug Chem* 2001;12:770-775
- 6 Wang X, Grammatikakis N, Hu J. Role of p50/CDC37 in hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 2002;277:24361-24367
- 7 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;11:1091-1096
- 8 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-前-S编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:761-762
- 9 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBeAg肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 10 张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 陈天艳, 洪源. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5B结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. 解放军医学杂志 2003;28:768-770
- 11 王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 梁耀东, 刘敏. 应用白细胞表达型cDNA文库的酵母双杂交技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白5A的结合蛋白. 中西医结合肝病杂志 2003;13:340-342
- 12 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
- 13 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
- 14 Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51-68
- 15 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1097-1101
- 16 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 王琳, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-X-编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:765-767
- 17 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
- 18 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
- 19 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. HBsAg与抗-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 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