

乙型肝炎病毒 P 基因 YMDD 变异的意义

王平忠, 张 岩, 白雪帆, 张 颖, 李谨革, 陈红梅, 王九平

王平忠, 张岩, 白雪帆, 张颖, 李谨革, 陈红梅, 王九平, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038
王平忠, 男, 1963-03-01 生, 陕西省汉中市人, 汉族. 博士, 讲师. 主要从事病毒感染免疫及实验诊断研究.

项目负责人: 王平忠, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. wangpzj@hotmail.com
电话: 029-3377595

收稿日期: 2003-06-27 接受日期: 2003-08-16

Significance of the YMDD motif mutation of P gene of hepatitis B virus

Ping-Zhong Wang, Yan Zhang, Xue-Fan Bai, Ying Zhang, Jin-Ge Li, Hong-Mei Chen, Jiu-Ping Wang

Ping-Zhong Wang, Yan Zhang, Xue-Fan Bai, Ying Zhang, Jin-Ge Li, Hong-Mei Chen, Jiu-Ping Wang, The Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of Chinese PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Ping-Zhong Wang, The Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of Chinese PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. wangpzj@hotmail.com

Received: 2003-06-27 Accepted: 2003-08-16

Abstract

AIM: To determine significance of the YMDD motif mutation of P gene of hepatitis B virus during lamivudine therapy for chronic hepatitis B and to provide guideline for the clinical treatment.

METHODS: Dynamic change of HBV DNA quantitation was measured with fluorescence quantitative PCR during lamivudine treatment. 40 patients from chronic hepatitis B were treated with lamivudine for 48 weeks. In 17 patients HBV DNA remained to be positive, YMDD mutation were examined by GeneChip and Uniarray techniques.

RESULTS: In patients treated with lamivudine for 48 weeks, HBV DNA turned negative in 23 cases (57.5%). In 17 patients HBV DNA remained to be positive, there was HBV DNA rebound in 8 patients during lamivudine treatment. There were YMDD mutations in 7 cases (5 cases from patients of HBV DNA rebound). The rate of YMDD mutation was 17.5%(7/40).

CONCLUSION: During Lamivudine treatment, HBV YMDD in some patients can mutate. The HBV DNA rebound is associated with emergence of YMDD mutants. Detection of the YMDD motif mutation of P gene of hepatitis B virus is important to clinical treatment for chronic hepatitis B.

Wang PZ, Zhang Y, Bai XF, Zhang Y, Li JG, Chen HM, Wang JP. Significance of the YMDD motif mutation of P gene of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):600-603

摘要

目的: 了解拉米夫定治疗慢性乙型肝炎过程中HBV P基因

YMDD 变异的意义, 为临床治疗提供指导.

方法: 用定量PCR监测40例拉米夫定治疗期间的HBV DNA动态变化, 对治疗 48 wk 时 HBV DNA 仍为阳性的患者, 采用Uniarray技术和基因芯片检测YMDD突变.

结果: 拉米夫定治疗48 wk时, HBV DNA转阴者23例(57.5%). HBV DNA 仍为阳性者 17 例, 其中 8 例在治疗过程中出现 HBV DNA定量反跳. 用基因芯片法与Uniarray技术共检测出7例YMDD变异(5例出现于8例HBV DNA定量反跳者), 变异率为 17.5%(7/40).

结论: 拉米夫定治疗过程中, 可导致部分患者的HBV YMDD 发生变异. 该变异使多数患者HBV DNA定量反跳. 检测HBV YMDD变异对慢性乙型肝炎的治疗具有重要的指导意义.

王平忠, 张岩, 白雪帆, 张颖, 李谨革, 陈红梅, 王九平. 乙型肝炎病毒 P 基因 YMDD 变异的意义. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):600-603

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/600.asp>

0 引言

拉米夫定(lamivudine)是核苷类的抗乙型肝炎病毒(HBV)的新药, 是HBV复制强有力的抑制剂, 其作用靶为HBV DNA多聚酶, 通过抑制前基因组 RNA 逆转录为负链 DNA 及 DNA 链延伸过程中起到链终止作用来抑制 HBV 复制. 拉米夫定用于治疗慢性乙型肝炎已有较明确的疗效, 但由于其难以完全清除体内病毒, 尤其是对cccDNA无直接作用, 故需要长期用药以期耗竭cccDNA库来达到清除HBV的目的. 但长期用药可引起 HBV DNA 多聚酶活性区核苷酸序列的变异, 称为YMDD变异. 国内学者报道YMDD变异发生率第1a和第2a分别为14%和49%^[1], 变异后的HBV对拉米夫定的敏感性下降, 从而导致治疗失败^[2-4]. 因此, 检测YMDD基序变异对及时调整治疗方案、合理用药及提高疗效具有重要的指导意义^[5]. 为更好地监测慢性乙型肝炎患者应用拉米夫定治疗过程中耐药性的产生, 我们用定量PCR监测了40例拉米夫定治疗期间的HBV DNA动态变化, 对治疗48 wk时HBV DNA仍为阳性的患者, 用基因芯片和Uniarray技术检测YMDD突变.

1 材料和方法

1.1 材料 本院1999-12/2000-11住院和门诊患者血清标本40例, 男28例, 女12例. 年龄15-68(平均36.7岁). 临床诊断符合2000-09西安会议《病毒性肝炎防治方案》标准. 入选患者HBsAg, HBeAg阳性; 抗HIV,

抗-HDV, 抗-HCV 阴性(华美公司试剂). HBV DNA 斑点杂交阳性(上海医科大学预防医学研究所生产的试剂盒测定), 且HBV DNA 定量均大于 10^3 拷贝/L(荧光定量PCR法). 所有患者口服拉米夫定 100 mg/d, 疗程 48 wk. 于治疗前及治疗 24 wk、36 wk 和 48 wk 时采集外周血, 分离血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 统一检测. HBV DNA 定量试剂由中山大学达安基因诊断中心提供. Uniarray 技术检测试剂为上海基达基因技术有限公司生产的 UniArray™ HBV 拉米夫定耐药检测试剂盒. 所用仪器为 GeneAmp 5700 Sequence Detection System (applied biosystem 公司) 荧光 PCR 扩增仪. HBV YMDD 检测芯片由联合基因集团上海博华基因芯片技术有限公司制备. 图片扫描仪为 ScanArray 300 (美国).

1.2 方法 (1)HBV DNA 定量 采用荧光定量 PCR 法. 按说明书进行操作. (2)Uniarray 技术 主要步骤如下: 取待测血清、质控品 I(内参照阳性、YIDD 阳性、YVDD 阴性)和质控品 V(内参照阳性、YVDD 阳性、YIDD 阴性)各 50 μL , 分别加入 DNA 提取液 A 50 μL , 振荡混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清. 再加入 DNA 提取液 B 50 μL , 振荡混匀, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清 5 μL 进行 PCR 扩增. 扩增 PCR 反应体系为 50 μL , 包括 PCR 缓冲液 31 μL , MgCl_2 6 μL , Taq 酶 3 μL , 荧光探针 5 μL , 待检 DNA 样品 5 μL . 将各反应管按一定顺序放入 PE Gene Amp 5700 荧光 PCR 扩增仪上, 先 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 2 min, 再 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 然后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s, 40 个循环. 结果以 YIDD 或 YVDD 引物孔的 Ct 值与内参照引物孔的 Ct 值 (基准值) 之差 (ΔCt) 的大小作为突变是否发生的依据. 若 ΔCt 小于或等于 3, 则为 YMDD 变异; 若 ΔCt 大于 3, 则为 YMDD 野生型. (3)基因芯片测定方法 HBV YMDD (拉米夫定耐药基因) 检测芯片选定 HBV P 基因的保守区序列, 并设计了相关的引物, 扩增出包含有 YMDD 变异区的核苷酸片断, 针对 L528M, A548V, M552I 及 M552V 4 个位点设计探针, 将探针固定在经过特殊处理的玻片上, 并且与特定的 PCR 法标记扩增的片断杂交. 经过洗脱后, 在微排列扫描仪上扫描, 用专门的软件分析确定耐药的类型. 取待检测血清 10 μL , 采用常规酚、氯仿、异戊醇方法抽提 HBV DNA, 异丙醇沉淀; 取 5 μL 用于 PCR 扩增, 共 35 个循环; 再吸取 PCR 产物 2 μL , 加入 CY5 标记的 dUTP, 进行 PCR 标记, 共 35 个循环. 标记的产物沉淀后加入杂交试剂, 并与芯片分别于 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 冷却后将杂交液 10 μL 滴于芯片的上样区, 封闭后在湿盒内 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杂交 1.5 h, 然后用 $0.1\times\text{SSC}$ 洗涤 10 min, 双蒸水冲洗并避光晾干; 将杂交后的芯片插入 ScanArray 300 扫描仪(美国)中进行扫描, 扫描强度 55-60 %, 获得的图片用 GenArray-Check 软件分析各点的信号状况, 根据信号强度及比值作出判断结果(图 1, 表 1).

2 结果

2.1 HBV DNA 定量水平 治疗 48 wk 时, 17 例 HBV

DNA 仍为阳性, 对这 17 例患者治疗前及治疗 24 wk、36 wk 和 48 wk 的系列血清进行了 HBV DNA 定量检测. 结果发现, 8 例患者治疗过程中一度降低的 HBV DNA 水平又复升高(2 例于 36 wk 升高, 6 例于 48 wk 升高)(表 2). 2.2 Uniarray 技术检测结果 用 Uniarray 技术测定 40 例拉米夫定治疗 48 wk 时 HBV DNA 仍为阳性的 17 例血清, 3 例为 YVDD 变异, 4 例为 YIDD, 其余 10 例全部为野生株(表 3).

表 1 基因芯片扫描信号强度(1 例 YIDD 变异结果)

	平均值	比值	结果
YIDD 突变点	116.65	0.05	野生
单点差异对照	165.19		
单点差异对照	261.10		
YMDD 野生点	2 267.16		
A548V 突变点	186.37	0.02	野生
单点差异对照	320.44		
单点差异对照	804.78		
A548V 野生点	8 212.13		
L528M 突变点	4 271.79	0.34	野生
单点差异对照	8 890.03		
L528M 野生点	1 2670.01		
L528M 野生点	8 189.31		
YIDD 突变点	24 518.07	4.86	突变
单点差异对照	1 704.71		
单点差异对照	1 471.62		
YMDD 野生点	5 039.73		

表 2 治疗组 8 例 HBV DNA 反跳者定量检测结果

编号病例	t /wk			
	0	24	36	48
03	8.19×10^7	5.41×10^6	2.28×10^5	4.19×10^6
06	2.35×10^8	3.08×10^6	4.72×10^7	2.31×10^6
16	3.27×10^8	4.84×10^6	6.18×10^5	2.17×10^7
21	4.32×10^8	2.32×10^6	$<1.00\times 10^3$	7.18×10^6
23	6.18×10^7	1.28×10^6	4.42×10^5	2.21×10^6
25	7.84×10^7	1.35×10^5	4.05×10^6	8.12×10^6
28	4.67×10^6	3.22×10^5	5.09×10^4	6.16×10^5
30	5.56×10^8	4.32×10^6	3.92×10^4	1.92×10^6

表 3 YMDD 变异检测结果

病例编号	基因芯片	Uniarray 技术
03	YVDD+L528M	YVDD
16	YIDD	YIDD
18*	YIDD	YIDD
21	YVDD+ 野生株	YVDD
23	YIDD	YIDD
27*	YVDD+L528M	YVDD
30	YIDD	YIDD

*HBV DNA 未反跳, 但 48 wk 时仍为阳性.

2.3 基因芯片法检测结果 用基因芯片法测定治疗48 wk HBV DNA 仍为阳性的17例患者血清,发现YMDD变异7例,9例为野生株(无变异),1例为阴性.在7例YMDD变异中,YVDD变异3例,YIDD变异4例.3例YVDD中,2例合并528突变(核苷酸C⁶⁶⁹→A,使氨基酸由亮氨酸⁵²⁸→蛋氨酸),1例变异株和野生株同时存在(表3).

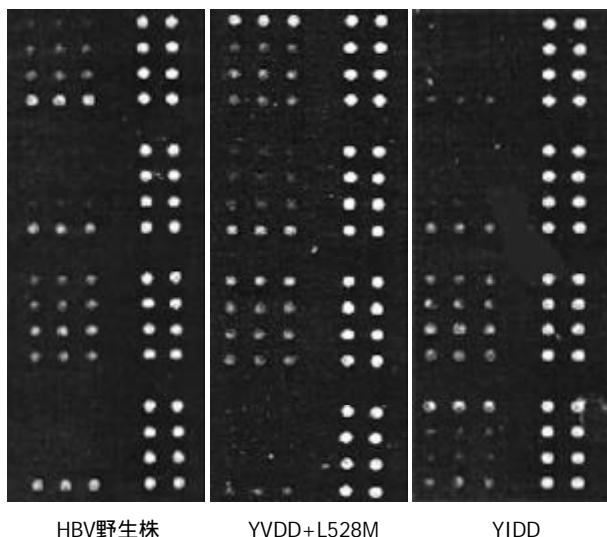


图1 YMDD变异的基因芯片扫描图.

3 讨论

拉米夫定是HBV复制强有力的抑制剂,能够与HBV DNA多聚酶YMDD(酪氨酸-蛋氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸)基序特异性结合,从而起到抑制病毒复制的作用.拉米夫定的临床试验结果表明,拉米夫定可明显抑制HBV的复制,进而达到控制炎症、稳定病情甚至阻止肝纤维化的进展.但对肝细胞内cccDNA无直接作用,而且他所抑制的HBV DNA多聚酶的活性在停药后又回复到原来的水平.因此其抑制病毒复制作用短暂,停药后易于复发,需要长期用药.但随着用药时间的延长,在药物和人体免疫选择压力下,可能产生耐药.体内外研究均已表明,拉米夫定耐药主要是由HBV P基因C区YMDD变异所引起.YMDD变异分为两种,一种是HBV P基因第550位氨基酸由蛋氨酸(methionine, M)突变为缬氨酸(valine, V),此乃YVDD变异,同时伴有528位的突变(核苷酸A⁶⁶⁹→C,使氨基酸由亮氨酸⁵²⁸→蛋氨酸);另一种是HBV P基因第550位氨基酸由M突变为异亮氨酸(isoleucine, I),此乃YIDD变异.这两种变异分别由HBV第739位碱基A→G和741位G→T突变所引起^[6-7].一旦出现YMDD变异株,对拉米夫定不再敏感.耐药可能会伴有HBV DNA定量反跳和肝功能变化,甚至导致病情恶化.de Man et al^[8]报道了1例肝移植术后HBV感染者,乙型肝炎免疫球蛋白治疗导致HBsAg逃避变异株,用泛昔洛韦治疗(500 mg 3次/d) 6 mo无效,P基因测序发现第513位氨基酸有异亮氨酸→亮氨酸的突

变,改用拉米夫定100 mg 1次/d,HBV DNA水平骤降,但拉米夫定治疗12 mo后HBV DNA复升,且发生重症肝炎,最后死亡.测序发现在YMDD区域附近有突变.因此在出现YMDD变异株后要密切监视病情变化,包括肝功能、HBV DNA定量等.如出现ALT明显升高,临床症状加重,则应停药.新出现的一些核苷类似药物如阿的福韦,对YMDD变异株仍然有效,将来上市后可以作为治疗这种变异株的有效药物^[9-10].

随着拉米夫定耐药株的出现,国内外研究者都在积极寻找检测他的有效方法.目前对变异株的检测与分析多采用RT-PCR产物测序法、错配PCR-RFLP及PCR-ELISA等^[11-13].这些方法存在着烦琐、费时、只能检测单个位点突变、不能提供全面的变异株情况等特点.基因芯片技术是近年来发展起来的高效分子诊断技术,已广泛应用于药物筛选,基因表达谱测定,多态性分析,新基因鉴定,测序,临床检测等领域的研究^[14-30].但该技术需专用仪器,不便推广使用.Uniarray技术是近年出现的又一检测YMDD变异的新技术,他是以UT-PCR(通用模板信号扩增技术)为基础的多基因/位点同时检测的阵列技术.UT-PCR是在Taqman荧光定量PCR基础上建立起来的新型PCR技术,主要是使用通用模板和通用荧光探针.通用引物由5'端的通用模板(UT)序列和3'的特异引物序列构成,通用模板序列不与任何天然核酸序列相匹配,只能与通用荧光探针匹配.通用荧光探针5'端标以荧光发射基团FAM标记,3'端以荧光淬灭基团TAMRA标记,由于距离相近,基团相互作用不产生荧光.该技术将各个被测基因位点的特异性UT引物置于标明的反应容器中,如微型试管中,利用UT-PCR的通用条件优势,在同一热循环中扩增和检测.他绕过了目前国际流行基因芯片技术需要大量的PCR预合成和核酸杂交等繁琐步骤,直接在阵列中进行成百上千个特异性的UT-PCR扩增检测反应,检测成本低,并且不需要特殊专用仪器.能够快速准确地检测出HBV耐药突变中临床最常见YMDD变异,并且能够与现在主流荧光实时PCR仪配合.因此UT-PCR和Uniarray的高灵敏、高特异、高精度和高通量特点,在临床病原体检测、药效监测、突变分析以及相关科学研究领域中具有广阔的应用前景.

我们采用基因芯片法和Uniarray技术测定了40例拉米夫定治疗48 wk,HBV DNA仍为阳性的17例患者血清.共检出7例YMDD变异,其中5例为HBV DNA定量反跳者.提示YMDD变异与HBV DNA定量反跳密切相关,是HBV耐药的主要原因.对8例HBV DNA定量反跳者治疗前、治疗24、36、48 wk的系列血清进行了DNA定量检测,发现24 wk时DNA定量均下降,36 wk时有2例反跳,48 wk时有6例反跳,但仍低于治疗前基线水平,可能与变异病毒复制能力降低有关.基因芯片和Uniarray技术对YMDD变异检测结果基本相符.但

基因芯片能同时检测出多个点位的变异, 而且能检测出野生株和变异株共存, 即混合感染. 这种情况往往早于临床 HBV DNA 定量和肝功能的变化, 因此可以及早发现患者的病情变化. 同时, 如果检测结果由混合感染变为单一变异株或野生株, 也有利于指导临床是否再继续使用拉米夫定或停药改用其他药物. 随着拉米夫定的广泛和长期应用, 国内慢性乙肝患者中由此而引起 HBV YMDD 变异导致耐药、肝炎复发、以致发生病情恶化的问题会更引人关注. 因此, 临床上迫切需要一种简便、高效、成本较低的方法, 对应用拉米夫定治疗的患者进行动态监测, 以指导临床合理用药. Uniarray 检测技术的开发和应用, 期望能够解决这一问题.

4 参考文献

- 马红, 尤红, 尹珊珊, 贾继东, 王宝恩. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎 2 年临床疗效. 中华实验和临床病毒学杂志 2001;5:147-149
- Wakil SM, Kazim SN, Khan LA, Raisuddin S, Parvez MK, Guptan RC, Thakur V, Hasnain SE, Sarin SK. Prevalence and profile of mutations associated with lamivudine therapy in Indian patients with chronic hepatitis B in the surface and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 2002;68:311-318
- Fischer KP, Gutfreund KS, Tyrrell DL. Lamivudine resistance in hepatitis B: mechanisms and clinical implications. *Drug Resist Update* 2001;4:118-128
- Zoller B, Petersen J, Schroter M, Laufs R, Schoder V, Feucht HH. 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in Hepatitis B virus subtypes adw. *Lancet* 2001;357:934-935
- Jaboli MF, Fabbri C, Liva S, Azzaroli F, Nigro G, Giovanelli S, Ferrara F, Miracolo A, Marchetto S, Montagnani M, Colecchia A, Festi D, Reggiani LB, Roda E, Mazzella G. Long-term alpha interferon and lamivudine combination therapy in non-responder patients with anti-HBe-positive chronic hepatitis B: Results of an open, controlled trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:1491-1495
- Niesters HG, Honkoop P, Haagsma EB, de Man RA, Schalm SW, Osterhaus AD. Identification of more than one mutation in the hepatitis B virus polymerase gene arising during prolonged lamivudine treatment. *J Infect Dis* 1998;177:1382-1385
- Xiong X, Flores C, Yang H, Toole JJ, Gibbs CS. Mutation in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro. *Hepatology* 1998;28:1669-1673
- de Man RA, Bartholomeusz AI, Niesters HG, Zondervan PE, Locarnini SA. The sequential occurrence of viral mutations in a liver transplant recipient re-infected with hepatitis B: Hepatitis B immune globulin escape, famciclovir non-response, followed by lamivudine resistance resulting in graft loss. *J Hepatol* 1998;29:669-675
- 王小众, 陈运新, 马连生, 马景云, 潘伯荣. 中国慢性乙型肝炎抗病毒治疗的现状. 世界华人消化杂志 2002;10:745-748
- 侯金林, 孙剑. 乙型肝炎病毒核苷类似物耐药性监测和预防及其处理. 中华医学杂志 1999;79:806-807
- 孙剑, 侯金林, 王战会, 章廉, 骆抗先. 拉米夫定治疗中国乙型肝炎患者中发现 YMDD 耐药变异株. 解放军医学杂志 2000;25:11-13
- Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. Emergence and take-over of YMDD motif mutant Hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and Re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 1998;27:1711-1716
- 郭宴海, 赵锦荣, 崔大祥, 阎小君. PCR-ELISA 检测血清 HBV 聚合酶 YMDD 基因变异. 第四军医大学学报 2002;23:347-350
- 杨守平, 胡德昌, 郑可飞, 孙小兵, 陶维玉, 马宁. 基因芯片检测拉米夫定治疗慢性乙型肝炎中 HBV YMDD 变异 25 例. 世界华人消化杂志 2002;10:1067-1068
- 李刚, 舒欣, 马会慧, 陈伟, 陈文思, 陈青, 江元森, 姚集鲁. 基因芯片技术检测 HBV HCV 及 HBV YMDD 变异株. 世界华人消化杂志 2003;11:178-181
- Wilson JW, Bean P, Robins T, Graziano F, Persing DH. Comparative evaluation of three human immunodeficiency virus genotyping systems: the HIV-GenotypR method, the HIV PRT GeneChip assay, and the HIV-1 RT line probe assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:3022-3028
- Honda M, Kaneko S, Kawai H, Shiota Y, Kobayashi K. Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology* 2001;120:955-966
- Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 2001;61:2129-2137
- Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q, Cai T, Zhang X, Xiao HS, Qu J, Liu F, Huang QH, Cheng ZH, Li NG, Du JJ, Hu W, Shen KT, Lu G, Fu G, Zhong M, Xu SH, Gu WY, Huang W, Zhao XT, Hu GX, Gu JR, Chen Z, Han ZG. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:15089-15094
- Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, Shibata D, Sato F, Wang S, Olaru A, Deacu E, Liu TC, Abraham JM, Meltzer SJ. Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene* 2002;21:4855-4862
- Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, Hoshino Y, Kapikian AZ, Chumakov K. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 2002;40:2398-2407
- Bustin SA, Dorudi S. The value of microarray techniques for quantitative gene profiling in molecular diagnostics. *Trends Mol Med* 2002;8:269-272
- Shoemaker DD, Linsley PS. Recent developments in DNA microarrays. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:334-337
- Wu CG, Salvay DM, Forgues M, Valerie G, Farnsworth J, Markin RS, Wang XW. Distinctive gene expression profiles associated with Hepatitis B virus x protein. *Oncogene* 2001;20:3674-3682
- Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-7066
- Wen WH, Bernstein L, Lescallett J, Beazer-Barclay Y, Sullivan-Halley J, White M, Press MF. Comparison of TP53 mutations identified by oligonucleotide microarray and conventional DNA sequence analysis. *Cancer Res* 2000;60:2716-2722
- Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, Wu L, Halachmi N, Yang SC, Wehage S, Jen J, Sidransky D. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7382-7387
- Wikman FP, Lu ML, Thykjaer T, Olesen SH, Andersen LD, Cordon-Cardo C, Orntoft TF. Evaluation of the performance of a p53 sequencing microarray chip using 140 previously sequenced bladder tumor samples. *Clin Chem* 2000;46:1555-1561
- Ishii M, Hashimoto S, Tsutsumi S, Wada Y, Matsushima K, Kodama T, Aburatani H. Direct comparison of GeneChip and SAGE on the quantitative accuracy in transcript profiling analysis. *Genomics* 2000;68:136-143
- 张建中, 黄英武, 刘冬梅, 杨利桃, 韩瑞刚, 王晋芬, 岳茂兴. 组织芯片技术的建立及其在大肠癌的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:157-160